

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences AGRO-VETERINAIRES**

**Département des Sciences Agronomiques**

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Phytopathologie

**LES PSEUDOMONAS SPP.FLUORESCENTS**

**PHYTOBENIFIQUES: COMPETENCE RHIZOSPHERIQUE ET**

**SYNTHESE DE SIDEROPHORES**

Par

**Rafik BERDJA**

Devant le jury composé de :

|                     |                         |              |
|---------------------|-------------------------|--------------|
| S.A. SNOUSSI        | Professeur, U.S.D.Blida | Président    |
| H. BELKEHLA         | Professeur, U.S.D.Blida | Examinatrice |
| A. GUENDOUZ-BENRIMA | Professeur, U.S.D.Blida | Examinatrice |
| M. BENCHABANE.      | M.C.A., U.S.D. Blida    | Promoteur    |

Blida, Janvier 2012

## RESUME

L'objectif de notre travail est la mise en évidence de la capacité de souches de *Pseudomonas fluorescens* à coloniser efficacement la rhizosphère des plantes cultivées. Cette étude a été réalisée en trois parties principales : la première porte sur la compétence rhizosphérique des souches de *Pseudomonas fluorescens* en interaction avec onze génotypes appartenant à quatre genres végétaux différents (Tomate, Orge, Blé dur, et Haricot). La deuxième partie porte sur l'étude de la croissance et la production de biomasse et de métabolites secondaires par les souches de *Pseudomonas fluorescens* en croissance sur différents milieux de culture liquide soumis à différentes conditions de pH et de température. La troisième partie porte sur la modélisation de la croissance et de la production de métabolites secondaires sur microcosme et sur milieu de culture liquide.

La bactérisation des plantules dans les différents microcosmes, a montré un seuil de colonisation rhizosphérique appréciable " $10^{13}$  CFU / g de sol".

Dans l'essai du suivi de la croissance sur différents milieux de culture liquide, nous avons observé des différences de croissance des souches de *Pseudomonas fluorescens* sur les trois milieux de culture utilisés. plusieurs éléments minéraux (FeSo<sub>4</sub>, EDTA, CuSo<sub>4</sub>) se sont avérés être significativement influent sur la croissance et la production de sidérophores des deux souches de *Pseudomonas* étudiés.

la modélisation a permis de prédire des tailles des populations importantes qui furent cohérentes avec nos résultats d'expérimentation et ont permis d'exprimer certaines critiques quant à une éventuel utilisation de ces modèles pour des études routinières de laboratoire, portant sur le monitoring des populations bactériennes en croissance sur microcosmes ou sur bioréacteurs.

**Mots clés** : Compétence rhizosphérique, *Pseudomonas spp.* .fluorescents, Microcosme, Sidérophores, modélisation.

## ABSTRACT

The aim of our work is the demonstration of the ability of *Pseudomonas fluorescens* strains to efficiently colonize the rhizosphere of plants. This study was conducted in three main parts: the first one was conducted on the *Pseudomonas fluorescens* rhizospheric competence in interaction with eleven genotypes belonging to four different plant genera (Tomato, Barley, Durum wheat, and beans). The second main part, concerns the study of the growth and production of biomass and secondary metabolites "sidérophores" by *Pseudomonas* strains grown in different liquid media, exposed to different levels of pH and temperature. The third part focuses on the modeling of bacterial growth in microcosm and liquid culture medium.

The bacterisation seedlings in the microcosms, showed that applied rhizobacteria strains are characterized by a high level of rhizospheric colonization, reaching  $10^{13}$  CFU / g of soil, despite their plant origin. Therefore, we found a high levels of colonization in the rhizosphère onto the different root network of studied plants.

In the trial of monitoring the growth of *Pseudomonas fluorescens* strains on different liquid culture media, we observed a better growth rate on succinate culture medium with an optimal growth reached at different points of temperature and pH.

For testing growth on different culture media supplemented each one with a specific mineral compound, several minerals were founded to be significantly influencing the growth and sidérophores synthesis.

For the third part of our work, mathematical modeling of equations quantifying (1) the effect of available substrate present in the soil solution and the dynamic of growth in microcosms; (2) and onto liquid culture medium, (3) and the kinetic of product synthesis "sidérophores" in function of time, have been checked and predictions of population sizes were carried out and compared with our experimental data.

Those comparisons permitted to find out some consistent results with our experimental results and an allowed us to express some criticism about possible use of these models for routine monitoring of bacterial populations growth on microcosms and bioreactors.

**Keywords:** Rhizospheric competence, *Pseudomonas* spp. Fluorescents, Microcosms, Siderophores, modeling.

## الملخص

الغرض الأساسي من دراستنا التجريبية هو إبراز فعالية و قدرات بعض عزلات *Pseudomonas spp. fluorescents* على استعمار المجمع الجذري لعدد من النباتات. الجزء الأول يتناول قدرة عزلتين من *Pseudomonas spp. fluorescents* على تعميم أربع أصناف نباتية ، الطماطم، الشعير، القمح الصلب، الفاصوليا. في أوساط مصطنعة تركيبية ( نبات + بكتيريا) وكذلك لإبراز قدرات هذه البكتيريا في تعميم المجموع الجذري. الجزء الثاني يتعلق باستعمال العزلات البكتيرية لدراسة النمو وإنتاج الكتلة الحيوية و الايضية الثانوية في أوساط سائلة مصطنعة تركيبيا وضعت في ظروف نمو مختلفة.الجزء الثالث يركز على تطبيق نماذج حسابية رياضية لنمو البكتيريا في أوساط مصطنعة تركيبية ( نبات + بكتيريا) وأوساط مصطنعة سائلة

دراسة مستوى اعمار عزلات - اظهر مستويات تجاوزت  $10^{13}$  cfu/غ من التربة و ذلك بالرغم من اختلاف أصول تلك العزلات

بالنسبة لرصد نمو سلالات البكتيرية على مختلف الأوساط السائلة المصطنعة تركيبيا ، لاحظنا معدل نمو أفضل في وسط Succinate مع نمو أمثل تم التوصل إليه في نقاط مختلفة من الحرارة ودرجة الحموضة للسائلتين.

أظهرت اختبارات النمو على أوساط نمويه تختلف بعضها بعضاً بزيادات مركب معدني محدد، وجدت أن العديد من هذه المعادن لها تأثير بشكل كبير و مباشر على النمو وإنتاج المركبات الثانوية.

بالنسبة للجزء الثالث من عملنا، اظهرت الدراسة الرياضية الافتراضية الرياضية لمعادلات قياس تأثير تركيزالعناصر الكيميائية المتاحة والموجودة بشكل حرفي محلول التربة، و كذلك ديناميكيات النمو في الأوساط المصطنعة التركيبية ( نبات + بكتيريا) السائلة و الصلبة ، و أثرها على مدى تشكيل المركبات الإيضيه الثانوية بالنسبة للوقت ان تنبؤات أحجام البكتيريا المقاسة والمقارنة مع البيانات التجريبية المستنبطة من أعمالنا التجريبية مقبولة. وكذا للتعبير عن بعض الانتقادات حول إمكانية استخدام هذه النماذج لمراقبات روتينية على المجمعات البكتيرية

الكلمات الرئيسية: الاختصاص الجذر, *Pseudomonas spp. fluorescents*، مصغر، siderophores، النمذجة.

## REMERCIEMENTS

L'expression de mon entière gratitude et de mes plus vifs remerciements vont d'abord à mon promoteur Monsieur le Dr. Benchabane Messaoud, maître de conférences à l'université de Blida. A coté de ce monsieur qui a accepté la direction de ce travail et qui m'a dirigé, orienté et pondère quelques fois au cour de ces 4 dernières années, je ne saurais jamais exprimer mon eternal reconnaissance.

Pour avoir été un model et une référence à suivre, pour son enseignement, ces conseils et l'empreinte qu'il a laissé en moi et en la personne de mes camarades de promotion, ainsi que pour avoir eu le génie de nous intéresser à la chose biologique, notamment à celle de la phytopathologie contemporaine, qui s'est traduite des nos premiers contacts, par un désir devenu presque instinctif d'acquisition de savoir et de connaissance, je lui répète aujourd'hui ma profonde et eternal gratitude.

C'est également avec un grand plaisir que j'adresse mes vifs remerciements et mon profond respect aux membres du jury, qui en dépit de leurs charges m'honorent aujourd'hui de leur présence pour examiner ce modeste travail.

Pour monsieur le professeur SNOUSSI, madame la professeur BELKAHLA, et madame la professeur GUENDOUZ, veuillez trouver ici l'expression de ma parfaite gratitude, pour les enseignements que vos m'avez prodigué et la tradition de travail que vous avez si généreusement voulu partager avec vos étudiants et avec moi en particulier. Aussi, je vous remercie pour la bonne ambiance et pour la qualité du dialogue que vous avez su instaurer avec vos étudiants et espère vous avoir le plus possible comme interlocuteur.

Je voudrais également remercier les membres du laboratoire de Microbiologie (Djamila, Samia,) ainsi que tout les étudiant(e)s que j'ai eu la chance et le plaisir de connaitre et de côtoyer dans les murs des enceintes des laboratoires de l'USDB.

Un autre grand merci va à tout le personnel du département des sciences agronomiques de l'USDB, qui avec le temps sont un peu devenu une seconde famille pour moi et qui ont également su remplir mon quotidien de plein de sourires, bonté, et de tellement d'anecdotes plus drôles les unes les autres.

Un merci tout spécial va à ma famille, et à mes ami(e)s, en particulier à mes très chers parents qui ont fait de moi ce que je suis et qui m'ont toujours assuré de leurs soutien inconditionnel et indéfectible pour que je me consacrer exclusivement aux études. Ainsi, ils ont toujours fait en sorte que je n'éprouve jamais le sentiment de besoin ou de manque de soutien moral ou matériel.

Enfin, une pensée particulière va directement à toutes les personnes merveilleuses que nous avons connu dont nous aurions voulu avoir aujourd'hui qu'ils soient parmi nous pour partager ces instants mais qui hélas nous ont quitté. Pour toutes ces personnes qui ont marqué mon existence je prie le tout puissant miséricordieux de les accueillir dans son vaste paradis.

## TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| RESUME   |    |
| ABSTRACT   |    |
| ملخص   |    |
| REMERCIEMENTS  |    |
| TABLE DES MATIERES   |    |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX  |    |
| INTRODUCTION   | 15 |
| CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LES RHIZOBACTERIE   | 18 |
| 1.1. Effet phytobénéfique des <i>Pseudomonas spp fluorescens</i>                           | 18 |
| 1.1.1. Généralités sur les <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i>                            | 18 |
| 1.1.2. Stimulation de la croissance végétale   | 19 |
| 1.1.3. Induction de la résistance systémique   | 20 |
| 1.1.4. Protection des plantes contre les maladies d'origines telluriques                   | 20 |
| 1.2. La Compétence Rhizosphérique  | 20 |
| 1.3. Facteurs Physiologiques   | 22 |
| 1.3.1. NADH : ubiquinone oxydoréductase  | 22 |
| 1.3.2. Nitrate réductase chez la souche C7R12  | 24 |
| 1.4. Facteurs biochimiques   | 25 |
| 1.4.1. Rôle des l'antigène-O des LPS dans la colonisation                                  | 25 |
| 1.4.2. Les antibiotiques   | 26 |
| 1.4.2.1. Biosynthèse de l'acide phenazine-1-carboxylique (PCA)                             | 27 |
| 1.4.2.2. Biosynthèse du 2.4-diacetylphloroglucinol (DAPG)                                  | 28 |
| 1.4.3. Synthèse et rôle des acides amines  | 30 |
| 1.4.4. Système de sécrétion de type 3 chez les <i>Pseudomonas ssp fluorescents</i> (SST3S) | 31 |
| 1.4.5. Le quorum sensing   | 33 |
| 1.4.6. Les sidérophores  | 36 |
| 1.4.7. Médiation du transport du fer par les sidérophores et signalisation bactérienne     | 37 |
| 1.4.8. Acquisition du fer et du phosphore  | 39 |
| 1.4.8.1. Acquisition par les racines des plantes   | 39 |



|   |           |
|---|-----------|
| 1.4.8. 2. Acquisition du fer par les microorganismes du sol   | 41        |
| 1.5. Facteurs Génétiques  | 42        |
| 1.5.1. La Recombinase Site-Spécifique   | 42        |
| 1.6. Modélisation Des Populations Microbiennes  | 44        |
| 1.6.1. Évaluation générale des modèles mathématiques disponibles  | 45        |
| 1.6.2. Diversité des facteurs environnementaux  | 48        |
| 1.6.3. La modélisation de la biodiversité microbienne du sol  | 50        |
| 1.6.4. Expression de la croissance bactérienne  | 51        |
| 1.6.5. La sélection d'un modèle mathématique  | 51        |
| <b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES</b>   | <b>53</b> |
| 2.1. Le sol   | 53        |
| 2.2. Les souches bactériennes   | 53        |
| 2.3. Etude de la compétence rhizosphérique  | 54        |
| 2.3.1. Préparation du végétal   | 55        |
| 2.3.2. Microcosmes  | 55        |
| 2.3.3. Bactérisation des microcosmes  | 56        |
| 2.3.4. Dispositif expérimental  | 57        |
| 2.3.4.1. Essai de dynamique des populations bactériennes  | 57        |
| 2.3.4.2. Dénombrement bactérien   | 59        |
| 2.4. Effet de la température et du pH sur la production de Sidérophores   | 60        |
| 2.4.1. Les milieux de culture   | 61        |
| 2.4.2. Estimation du poids cellulaire sec   | 61        |
| 2.4.3. Test de la production des sidérophore  | 62        |
| 2.4.3.1. Modélisation de la taille de la population bactérienne en fonction du temps en microcosme                                  | 63        |
| 2.4.3.2. Modélisation de la taille de la population bactérienne et de la production de sidérophores en croissance en milieu liquide | 65        |
| <b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET INTERPRETATIONS</b>  |           |
| 3.1. Etude de la compétence rhizosphérique  | 62        |
| 3.1.1. Dénombrement bactérien   | 62        |
| 3.1.2. Interprétation statistique   | 72        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.2. Discussion  | 74         |
| 3.3. Modélisation de la biomasse en fonction du substrat et du temps   | 77         |
| 3.3.1. Estimation de la concentration bactérienne en fonction du substrat  | 77         |
| 3.3.2. Modélisation de la taille de la population bactérienne en fonction du temps                               | 80         |
| 3.3.3. Modélisation de la taille de la population bactérienne en fonction du temps sur milieu de culture liquide | 84         |
| 3.3.4. Modélisation de la production de sidérophores en fonction du temps  | 86         |
| 3.4. Discussion et critique des modèles  | 88         |
| 3.5. Effet de la température sur la croissance et la production de sidérophores                                  | 91         |
| 3.6. Effet du pH sur la croissance et la production de sidérophores  | 93         |
| 3.7. Rapport biomasse sidérophores   | 94         |
| 3.8. Discussion  | 95         |
| 3.9. Effet de des microéléments additionnés à 6µg/l sur la production de biomasse et de sidérophores             | 97         |
| 3.10. Production de biomasse et de sidérophores par les souches D2 et C7R12                                      | 99         |
| 3.11. Discussion   | 104        |
| <b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE</b>  | <b>107</b> |
| <b>CONCLUSION</b>  | <b>111</b> |
| <b>APPENDICES</b>  | <b>114</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>   | <b>119</b> |

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Figure 1.1</b>  | Schéma de réactions intervenantes au niveau de la membrane et de la matrice mitochondriale.  | 23 |
| <b>Figure 1.2</b>  | Schémas de la biosynthèse de la PCA à partir de l'acide chorismique DHHA, ainsi que le mécanisme d'action de la PhzF.  | 28 |
| <b>Figure 1.3</b>  | Gènes identifiés dans la biosynthèse de la 2-4 DAPG.   | 29 |
| <b>Figure 1.4</b>  | Rôle des produits des gènes PhlA, PhlB, PhlC, et la PhlD dans la biosynthèse de la MAPG et de la 2,4-DAPG  | 29 |
| <b>Figure 1.5</b>  | Localisation des gènes Put chez <i>Pseudomonas putida</i> KT2442 sur vecteurs pLCR4, 12 et pSLH4   | 31 |
| <b>Figure 1.6</b>  | Schémas de succession des gènes hrcR, S et T chez <i>P. fluorescens</i> C7R12  | 32 |
| <b>Figure 1.7</b>  | Schémas comparant l'organisation des clusters hrp de <i>P. fluorescens</i> KD et SBW25, avec les clusters de <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000.   | 33 |
| <b>Figure 1.8</b>  | Structure chimique de quelques molécules signal ayant une action quorum sensing.   | 34 |
| <b>Figure 1.9</b>  | Traits régulés par le quorum sensing chez les bactéries Gram + et Gram   | 35 |
| <b>Figure 1.10</b> | Schémas des 3 groupes de PVD de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> avec leurs différents radicaux.  | 37 |
| <b>Figure 1.11</b> | Schémas de signalisation et de transport du fer médié par les sidérophores.  | 39 |
| <b>Figure 1.12</b> | Mécanismes par les quelles les microorganismes augmentent ou diminuent la biodisponibilité des nutriments pour les plantes. Ainsi que quelques mécanismes influençant l'intensité des réactions chimiques survenant dans le sol. | 40 |
| <b>Figure 1.13</b> | Carte de restriction d'un fragment d'DNA de <i>P. fluorescens</i> WCS365, incluant un fragment de 5-kb HindIII complétant le déficient de colonisation.  | 44 |
| <b>Figure 1.14</b> | Les facteurs environnementaux qui affectent les communautés de microorganismes du sol compensant les variables primaires indépendants  | 49 |
| <b>Figure 2.1</b>  | Les différents constituants du microcosme.   | 56 |
| <b>Figure 2.2</b>  | Dispositif expérimental de l'étude de la dynamique bactérienne.  | 58 |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Figure 3.1</b>  | Boîtes présentant des colonies bactériennes sur le milieu King B après 24 heures d'incubation.  | 67 |
| <b>Figure 3.2</b>  | Croissance des différents génotypes étudiés en microcosmes, après une durée de 15, 18, 20, et 30 jour du semis et de la bactérisation.  | 68 |
| <b>Figure 3.3</b>  | Densités des populations bactériennes dans les microcosmes des 11 génotypes étudiés   | 69 |
| <b>Figure 3.4</b>  | Densité des populations bactériennes dans les microcosmes des 11 génotypes étudiés.   | 70 |
| <b>Figure 3.5</b>  | Densité de population atteinte après 15, 18, 20 et 30 jours de croissance pour les génotypes ensemencés avec la souche <i>Pseudomonas putida</i>  | 71 |
| <b>Figure 3.6</b>  | Densités de populations atteintes après 15, 18, 20 et 30 jours de croissance pour les génotypes ensemencés avec la souche <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12                                      | 71 |
| <b>Figure 3.7</b>  | Distribution normale des résultats logarithmiques de la densité de population finale des 11 microcosmes en interaction avec les deux souches bactériennes.  | 72 |
| <b>Figure 3.8</b>  | Estimation de la dynamique de croissance de <i>Pseudomonas putida</i> D2 en interaction avec les différentes variétés végétales étudiés en fonction de la concentration du substrat dans le sol.    | 78 |
| <b>Figure 3.9</b>  | Estimation de la dynamique de la croissance de <i>Pseudomonas putida</i> D2 en interaction avec les différentes variétés végétales étudiés en fonction de la concentration du substrat dans le sol. | 78 |
| <b>Figure 3.10</b> | Estimation de concentration bactérienne par gramme de sol en fonction du temps (15,18, 20 et 30 jours).   | 81 |
| <b>Figure 3.11</b> | Distribution et qualité d'ajustement des données prédites par rapport au temps en distribution normale.   | 82 |
| <b>Figure 3.12</b> | Qualité d'ajustement des probabilités de réalisation des données prédites par rapport au temps vis-à-vis des données expérimentales.  | 82 |
| <b>Figure 3.13</b> | Courbes d'ajustement des fonctions linéaire et quadratique de l'interaction liant la densité des populations prédites par rapport au temps  | 82 |
| <b>Figure 3.14</b> | Divergence des valeurs prédites entre le model initial et la courbe d'interpolation cubique obtenue par interpolation des 20 premiers points prédits par ce même modèle.                            | 83 |
| <b>Figure 3.15</b> | Estimation de la quantité de biomasse produite par litre de milieu de culture ( $\mu\text{g/l}$ ).  | 84 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Figure 3.16</b> | Distribution et qualité d'ajustement des données prédites par rapport au temps vis à vis de la distribution normale pour la quantité de biomasse produite par litre de milieu de culture ( $\mu\text{g/l}$ ).      | 85  |
| <b>Figure 3.17</b> | Qualité d'ajustement des probabilités de réalisation des données prédites par rapport au temps pour la quantité de biomasse produite par litre de milieu de culture ( $\mu\text{g/l}$ ).                           | 85  |
| <b>Figure 3.18</b> | Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et quadratique de l'interaction liant la densité de population prédite par rapport au temps.  | 85  |
| <b>Figure 3.19</b> | Estimation de la production de sidérophores sur milieu de culture liquide (g/l).   | 86  |
| <b>Figure 3.20</b> | Distribution et qualité d'ajustement des données prédites par rapport au temps vis à vis de la distribution normale pour la production de sidérophores sur milieu de culture liquide (g/l).                        | 87  |
| <b>Figure 3.21</b> | Qualité d'ajustement des probabilités de réalisation des données prédites par rapport au temps vis-à-vis des données expérimentales obtenu pour la production de sidérophores sur milieu de culture liquide (g/l). | 87  |
| <b>Figure 3.22</b> | Courbes d'ajustement de fonctions linéaire et cubique de l'interaction liant la production de sidérophores par rapport au temps sur milieu de culture liquide.   | 87  |
| <b>Figure 3.23</b> | Production de sidérophores des deux souches de <i>Pseudomonas putida</i> D2 et <i>P.fluorescens</i> C7R12, sur milieu de culture Succinate en fonction de la température.  | 92  |
| <b>Figure 3.24</b> | Production de sidérophores des deux souches de <i>Pseudomonas putida</i> D2 et <i>P.fluorescens</i> C7R12, sur milieu de culture king B en fonction de la température.   | 92  |
| <b>Figure 3.25</b> | Production de sidérophores des deux souches de <i>Pseudomonas putida</i> D2 et <i>P.fluorescens</i> C7R12, sur milieu de culture Minimum Rhizobial "RM" en fonction de la température.                             | 93  |
| <b>Figure 3.26</b> | Production de sidérophores des deux souches de <i>Pseudomonas putida</i> D2 et <i>P.fluorescens</i> C7R12, sur milieu de culture minimum rhizobial "RM" en fonction du pH.   | 94  |
| <b>Figure 3.27</b> | Effet des microéléments additionnés à $6\mu\text{g/l}$ sur la production de biomasse et de sidérophores pour les deux souches bactériennes étudiés.  | 97  |
| <b>Figure 3.28</b> | Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et cubique de l'interaction liant la quantité de Biomasse et de sidérophores produit par la souche <i>Pseudomonas putida</i> D2.                                      | 100 |

|                           |  |     |
|---------------------------|--|-----|
| <b>Figure 3.29</b>        | Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et exponentielle de l'interaction liant le niveau de croissance bactérienne a la quantité de sidérophores produit par la souche <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12. | 102 |
| <b>Figure 3.30</b>        | Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et cubique de l'interaction liant le niveau de croissance et la quantité de Biomasse produit par la souche <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12.                      | 102 |
| <b>Figure 3.31</b>        | Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et quadratique de l'interaction liant la quantité de Biomasse et de sidérophores produit par la souche <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12.                          | 103 |
| <b>Tableau 1.1</b>        | Déterminants bactériens requis pour la compétence rhizo et endophytique.   | 22  |
| <b>Tableau 1.2</b>        | Molécules signal produite par chaque genre bactérien.  | 34  |
| <b>Tableau 1.3</b>        | Equations utilisés dans la modélisation de la dynamique des populations microbiennes   | 47  |
| <b>Tableau 2.1</b>        | Origine des souches bactériennes.  | 54  |
| <b>Tableau 2.2</b>        | Espèces et variétés végétales étudiées.  | 55  |
| <b>Tableau 2.3</b>        | Composition des différents milieux de culture  | 60  |
| <b>Tableau 2.4</b>        | Description des paramètres rentrant dans la constitution de l'équation modélisant la croissance bactérienne en microcosme.   | 64  |
| <b>Tableau 3.1</b>        | Qualité d'ajustement des données logarithmiquement transformés de la densité de population obtenu après dénombrement, par trois tests d'ajustement statistiques.   | 73  |
| <b>Tableau 3.2</b>        | Rapports de production de biomasse et des sidérophores sur les différents milieux de culture utilisés.   | 95  |
| <b>Tableaux 3.3 ; 3.4</b> | Qualité d'ajustement et coefficients de pseudo- corrélation $R^2$ du modèle.   | 98  |
| <b>Tableau 3.5</b>        | Estimation de la signification des différents micros éléments constitutifs des milieux de culture étudiés  | 98  |
| <b>Tableau. 3.6</b>       | Corrélations simple et partielle du niveau de croissance en fonction de la production de sidérophores et de biomasse pour la souche D2.  | 99  |
| <b>Tableau. 3.7</b>       | Corrélations simple et partielle du niveau de croissance en fonction de la production de sidérophores et de biomasse pour la souche <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12.  | 101 |

## INTRODUCTION

L'environnement est aujourd'hui l'un des enjeux majeurs du 21<sup>ème</sup> siècle, ainsi les problèmes de la lutte phytosanitaire qui se posent à l'humanité en ce début de siècle sont aussi nombreux et divers qu'ils l'ont pu l'être durant les 12 siècles d'histoire de l'agriculture. Des les années 40, l'explosion de la démographie et l'émergence de nouveaux pays indépendants ont donné lieu à une augmentation de la demande en denrées alimentaire à travers le monde.

Dans ce contexte, l'émergence d'une agriculture spéculative a conduit au basculement vers une agriculture intensive et extensive, reposant essentiellement sur l'utilisation systématique et irraisonnée des intrants agro-chimiques au détriment de la sauvegarde de l'environnement et des écosystèmes, qui a eu pour conséquence de contaminer et d'accumuler des polluants dans les sols et les nappes phréatiques, ainsi que l'atteinte de millions d'organismes non cibles et auxiliaires ayant débouchés sur l'extinction de centaines d'espèces biologiques.

Le développement agricole représenté par la forte hausse des rendements et l'obtention de meilleures caractéristiques qualitatives et gustatives a été, le fruit de l'introduction massive d'intrants chimiques. Ainsi, la lutte contre les dépréciateurs des cultures s'est vu intensifier et depuis, plusieurs stratégies de lutte ont été développés. Parmi elles citons la lutte sémi-chimique utilisant des médiateurs chimiques impliqués dans les interactions inter et intra spécifique, ainsi que la lutte génétique consistant à apporter des modifications sur le génome afin d'améliorer les aptitudes de l'organisme source pour qu'il réponde rapidement et efficacement aux situations de stress en synthétisant des molécules bioactives ayant un rôle dans la résistance.

Notons en fin, qu'au cours des dernières décennies une évolution très nette c'est faite à la faveur de l'utilisation des moyens de lutte microbiologique qui fait appel au potentiel des agents microbiologiques natifs du sol et de la rhizosphère. Ces microorganismes telluriques dont une fraction constitue le groupe des rhizobactéries sont aujourd'hui considérés comme étant des organismes efficient ayant des actions d'association ou de complémentarité

pouvant être bénéfiques et assurer des stimulations et des augmentations en terme de production, le groupe des PGPR « plant growth promoting rhizobacteria » a attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche, en raison de ces actions de promotion et de protection des cultures.

Fravel [1] a listé de nombreux agents de biocontrôle qui ont été définitivement admis et enregistrés auprès de l'agence environnementale de la protection des végétaux appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* et *Streptomyces*.

Les bactéries du groupe des *Pseudomonas* constituent un genre très particulier, capable de coloniser la rhizosphère des racines en croissance [2,3], s'adapter et s'associer à plusieurs espèces végétales, sur les quelles elles induisent une amélioration des rendements via des effets de phytostimulation [4,5, 6, 7, 8]. Aussi, elles sont aptes à assurer un effet de biocontrôle en induisant une résistance systémique contre de multiples parasites [9, 6, 10]. Elles présentent également, des effets bénéfiques sur le plan écologique vu que elles sont utilisés pour dégrader certaines substances xénobiotiques toxiques dans l'environnement (sol, eau) [11, 12, 13, 14, 15, 16].

Certaines de ces souches sont capables de produire des métabolites bioactives tels que : 2,4-diacétyl-phloroglucinol (DAPG), pyoluteorine, pyrrolnitrine et les dérivés de la phénazine qui ont été décrites comme étant les déterminants principaux de l'activité antagoniste, [17, 18, 19] cyanure d'hydrogène, exoenzymes lytiques, [18] des lipopeptides cycliques [20]. L'action des sidérophores qui augmentent la biodisponibilité et l'absorption des éléments minéraux tel que le fer, carbone et phosphore par le biais de la minéralisation de la matière organique soluble et insoluble ultérieurement libéré sous forme cessibles aux végétaux, donne un avantage aux rhizobactéries pour concurrencer la flore indigène pour les nutriments et la colonisation des niches écologiques [21].

D'autres effets de bioaugmentation leurs sont également prêtés, vu qu'elles sont capables d'améliorer la croissance et la morphologie des racines via l'induction de la production de phytohormones, telles que les auxines dont l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines [22, 23, 24].



Cependant, même avec un volume de travaux très important ayant apporté un nombre considérable d'éléments de compréhension des facteurs abiotiques et autres déterminants génétique, physiologique et biochimiques, pouvant affecter la colonisation et la persistance des *Pseudomonas* sur les racines en croissance. Il n'en demeure pas moins que le maintien durable de l'efficacité de la couverture phytosanitaire, et de la stabilité de ces microorganismes après formulation et conditionnement, reste fortement tributaire des aléas pédoclimatiques et de la variation des génotypes végétaux aux quelles elles sont associés. Ainsi, la plupart des travaux de recherche ont mentionné l'intérêt particulier de l'étude du comportement de ces rhizobactéries dans le sol en association avec les racines des plantes d'une part et d'autre part la compréhension de l'action des métabolites secondaires associées à ces effets.

Dans ce contexte notre travail s'est articulé sur trois parties principales se présentant comme suit :

- Une première partie consistant à mettre en évidence le pouvoir colonisateur de deux souches de *Pseudomonas fluorescens*, inoculés dans des microcosmes, dans le but de montrer la compétence rhizosphérique de ces souches en association avec des plantules de Tomate, Blé dur, Orge et Haricot.
- Une deuxième partie vise à étudier l'effet que peuvent avoir différents facteurs nutritionnels "sources de carbone, acides aminés, source d'azote, microéléments" rentrant dans la composition des milieux de culture synthétiques, ainsi que l'effet de leurs interaction à différentes concentrations sur la croissance et la production de métabolites secondaires
- Une troisième, partie porte sur l'application et la critique de deux modèles prédictives, portant sur la modélisation de la densité microbienne et le niveau de production de sidérophores sur microcosme et sur milieu de culture liquide

# CHAPITRE 1

## GENERALITES SUR LES RHIZOBACTERIES

### 1.1. Effet phytobénéfique des *Pseudomonas spp fluorescens*

#### 1.1.1. Généralités sur les *Pseudomonas spp. fluorescents*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à coloration Gram négative (Gram-), non sporulantes, très généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio organotrophes [25]. Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe  $\gamma$  des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires fréquemment rencontré dans diverses niches écologiques [26; 27].

Depuis la découverte du genre *Pseudomonas* [28], plusieurs changements de nomenclatures ont été proposés dès le début de l'année 1968, actuellement, l'édition de 2005 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology rapporte une soixantaine d'espèces au genre *Pseudomonas* [29]. Néanmoins, 188 espèces sont actuellement répertoriées sur le site internet <http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>.

Les *Pseudomonas* telluriques qui constituent le pool de rhizobactéries colonisatrices de la rhizosphere, appartiennent aux groupes des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéria), synonyme de Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes [2, 3].

Les bactéries du genre *Pseudomonas* arrivent à s'adapter facilement et s'associent avec plusieurs plantes et induisent deux types de réactions qui peuvent mener à une situation de déséquilibre métabolique causant une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple chez les nombreux pathovars de *P. syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes [30].. Ou alors à des interactions mutualistes très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet

promoteur sur la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les MHB et les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes via l'induction de la résistance systémique [31]. D'autres effets bénéfiques sur le plan écologique leurs sont conférés notamment par leur rôle dans la dégradation de certaines substances xénobiotiques dans le sol et les eaux pollués [12, 13, 14, 15, 16].

les actions bénéfiques de ces bactéries sont souvent le résultat d'un métabolisme secondaire très actif qui sont impliqués chez ces bactéries aux caractéristiques intrinsèques des souches bactériennes et leurs interactions avec les conditions environnementales à l'exemple des sidérophores, les antibiotiques, les substances de croissance et les phénazines [8].

### 1.1.2 Stimulation de la croissance végétale

De nombreux travaux effectués sur plusieurs espèces végétales font état d'une stimulation de la croissance après bactérisation avec des souches de *Pseudomonas spp fluorescents* [32, 33, 34, 34]. La mise en évidence de cette stimulation a été rapportée dans différentes conditions expérimentales et à divers stades phénologiques: sur le développement de vitroplants, pendant la rhizogénèse, sur la faculté germinative [36, 37, 38], sur la levée et l'élongation des tiges et sur l'accroissement de la phytomasse de plantes herbacées et ligneuses [39].

Les mécanismes qui induisent ces gains de croissance sont souvent la conséquence d'une production ou d'un changement dans la concentration de certaines métabolites secondaires, tels que l'acide indolacétique (AIA) [40], l'acide gibbérellique [41], l'éthylène [42] l'acide succinique [43] et certaines vitamines [44].

### 1.1.3 Induction de la résistance systémique

Les rhizobactéries peuvent réduire la sévérité d'une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante [10].

Les études réalisées par Van Loon et al [45], ont démontré que certaines rhizobactéries peuvent induire l'expression des capacités défensives chez certaines plantes. Ce mécanisme décrit comme l'induction de la résistance systémique (ISR) a fait l'objet d'autres études [46, 47, 48], en mettant en évidence le renforcement des systèmes de défenses chez plusieurs plantes, tels que le radis, le tabac, l'haricot et le concombre [49, 50, 51, 52].

l'ISR est également peu spécifique concernant la nature de l'agent infectieux contre lequel la phytoprotection est assurée. Etant donné la systémicité du phénomène, l'état induit s'exprime dans tous les organes de la plante, des racines aux feuilles et aux fruits.

### 1.1.4. Protection des plantes contre les maladies d'origines telluriques

L'utilisation de bactéries du groupe des *Pseudomonas spp. fluorescents* pour lutter contre les maladies d'origine tellurique a fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques [53, 54,55,56, 57].

Des résultats intéressants en matière de biocontrôle ont été obtenus dans le cas du piétin échaudage des céréales [136], les fontes de semis du concombre et du blé [58,59,60], la pourriture racinaires de la pomme de terre due à *Erwinia Carotovora* [33], quelques maladies fongique des agrumes [11] et les fusarioses vasculaires provoquées par divers formes spécifiques de *Fusarium oxysporum* [61,62, 63,64].

## 1.2. La compétence rhizosphérique

Thomashow et Weller [19] ont défini la colonisation des racines comme le processus par lequel les rhizobactéries introduites sur semence, organes de multiplication végétative, ou sur sol deviennent répartis tout le long des racines en croissance en se multipliant, puis en persistant pendant plusieurs semaines en présence de la microflore indigène.

La colonisation des racines inclut deux schémas majeurs de colonisation caractérisant deux groupes de rhizobactéries ayant chaque une des spécificités préférentielle pour coloniser la rhizosphère, rhizoplan, et/ou l'intérieur des racines.

Ces deux schémas de colonisation sont sous la dépendance d'un nombre important de déterminants génétique, physiologique et biochimiques regroupés sous le vocable de compétence rhizosphérique pour le premier groupe constitué de plusieurs groupes de bactéries phytostimulatrices de la croissance et de bio contrôle (ex : *Pseudomonas*, *Bacillus*) ; et la compétence endophytique pour le deuxième groupe de rhizobactéries symbiotiques fixatrices d'azote et promotrice de la croissance (ex : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* et, *Sinorhizobium*) (Tableau. 1).

Chez le groupe des *Pseudomonas ssp. fluorescents*, la compétence rhizosphérique est le résultat d'une somme de traits physiologiques sous dépendance génétique permettant de (i) croître rapidement et être produite en masse sur milieu de culture artificiel; (ii) métaboliser rapidement le contenu des exsudats racinaires; (iii) se multiplier et coloniser l'environnement rhizosphérique et la spermosphère ainsi que l'intérieur des plantes (mycorhization), conférer le caractère suppressif à certains sols; (iv) produire un large spectre de métabolites bioactives; (v) être agressive en tant que compétiteur de la microflore indigène; et en fin (vi) s'adapter a des environnements stressants (hautes températures, dessiccation, exposition aux formes actives de l'oxygène, forte osmolarité, faible taux de matière organique, etc.) [65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 51].

**Tableau 1.1. :** Déterminants bactériens requis pour la compétence rhizo et endophytique.

| Compétence rhizosphérique    | Compétence endophytique           |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Flagelles                    | Flagelles                         |
| Système de sécrétion         | Système de sécrétion              |
| Grande taux de croissance    | Gènes Nod                         |
| Protéines extra membranaires | Enzymes de dégradation des parois |
| Recombinase site spécifique  | Mécanismes de détoxification      |
| NADH déshydrogénase I        | Mobilité                          |
| Antigènes – O des LPS        | Lipopolysaccharides (LPS)         |
| Production de sidérophores   |                                   |
| Production d'antibiotiques   |                                   |
| Synthèse d'acides aminés     |                                   |
| Production de vitamine B1    |                                   |
| Quorum sensing               |                                   |
| Fimbriae                     |                                   |
| Agglutinine                  |                                   |

### 1.3. Facteurs physiologiques

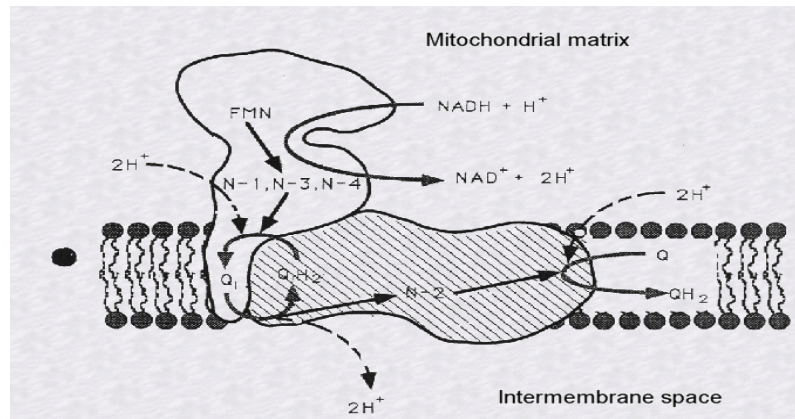
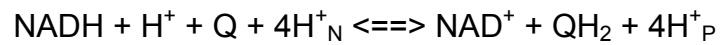
#### 1.3.1. NADH : ubiquinone oxydoréductase

Des expérimentations menées sous anaérobiose sur des mutants WCS365, ont montré qu'un taux d'oxygène trop bas menait à la perte de la compétence rhizosphérique de ces bactéries, se traduisant par une incapacité de coloniser le système racinaire et une baisse du temps de génération et de la mobilité.

Des expérimentations d'insertion de transposon mutagènes ont révélé que l'insertion du transposon Tn5lacZ sur l'opéron **nuo-4** est responsable de la génération d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane, qui génère une force protomotrice utilisée pour la synthèse de l'ATP, le transport actif de divers nutriments, et la rotation des flagelles ATP dépendent [72].

L'opéron **nuo (nuoA à nuoN)**, qui code les différentes sous unités de l'enzyme NADH : ubiquinone oxydoréductase ou **NADH** déshydrogénase I de la chaîne respiratoire aérobie de *P.fluorescens* est organisée en 14 gènes [73].

La **NADH** : ubiquinone oxydoréductase I catalyse l'oxydation du **NADH**, la réduction de l'ubiquinone, et le transfert de  $4H^+$  / **NADH** à travers la membrane de couplage selon la réaction suivante :



[http://www.life.illinois.edu/crofts/bioph354/complex\\_i.html](http://www.life.illinois.edu/crofts/bioph354/complex_i.html)

**Figure.1.1.** Schéma de réactions intervenants au niveau de la membrane et de la matrice mitochondriale.

La **NADH** déshydrogénase I appelé **NDH-1** est codée par l'opéron **nuo** alors que une autre **NADH** déshydrogénase **NDH-2** se compose d'une seule sous unité est codée par le gène **ndh** [74, 75, 76, 77]. Chez le genre *Pseudomonas*, la plus grande partie du flux d'électrons semble transiter à travers le système **NDH-1** qui a l'inverse de son homologue **NDH-2** nécessite moins d'énergie pour fonctionner [78]. Une double mutation dans les deux **NADH** déshydrogénases I conduit à des temps de génération plus long, alors que des mutations dans un seul des **NADH** déshydrogénases ne semble pas modifier le taux de croissance du mutant, en comparaison avec la souche sauvage WCS365 [79].

L'étude de l'activité des promoteurs des deux opérons **nuo** et **ndh** à différent niveau d'oxygénation montre que les deux promoteurs sont surexprimés lorsqu'ils sont soumis à une baisse de la concentration en oxygène et que leur niveau d'expression varie selon le stade de croissance. Les *P. fluorescens* possède deux **NADH** déshydrogénases, qui sont exprimés dans la

rhizosphère de la tomate. Durant le processus de colonisation racinaire **NDH-1** joue un rôle crucial dans la colonisation concurrentielle de la l'extrémité des racines. Dans la rhizosphère les cellules requièrent le fonctionnement du système **NDH-1** qui leurs procure l'énergie nécessaire pour maintenir un état physiologique stable leurs permettant d'être compétitif [80].

Il a été démontré que sous conditions de stress semblables à celles rencontrés dans la rhizosphère, liée au manque de nutriments (source de carbone) et d'oxygène, les mutants défectueux **NDH-2** n'ont aucune influence sur la compétence des cellules vu que l'énergie fournie par ce système est trop basse pour maintenir un taux de croissance et un niveau de motilité normale des cellules bactériennes. Par conséquent, leur déficience peut être compensée par le système (**NDH-1**) dont la mutation conduit à une perte complète et totale de la compétence rhizosphérique [80].

### 1.3.2. Nitrate réductase chez la souche C7R12

La disponibilité de l'oxygène dans le sol étant variable, certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* sont capables de s'adapter aux limitations d'oxygène en utilisant le protoxyde d'azote comme accepteur alternative d'électrons [81].

La souche sauvage de *Pseudomonas fluorescentes* C7R12 est capable de réduire les nitrates en di nitrogène par le biais d'une série de quatre réactions catalysées par la métallo enzymes nitrate réductase codé par le gène (**narG**), nitrite réductase codé par le gène (**nirS**, **nirK**), nitrique oxyde réductase (**norB**), et l'oxyde nitreux réductase (**nosZ**) [82, 83].

L'avantage concurrentiel de la souche sauvage C7R12, confère par la nitrate réductase sur les mutants défectueux est plus fortement accentué sous conditions d'anaérobiose, du fait de l'avantage que procure la capacité d'alterner d'une voie métabolique (chaîne respiratoire) à l'autre (la respiration azotée) et ce non seulement dans la rhizosphère, mais aussi également en dehors de la rhizosphère, indiquant que ce caractère bactérien est impliqué dans la compétence saprophytique des bactéries du sol [84].



## 1.4. Facteurs biochimiques

### 1.4.1. Rôle des l'antigène-O des LPS dans la colonisation

Les *Pseudomonas* arborent sur leurs membranes externes des Lipopolysaccharides (LPS) de taille et de structure différentes, qui sont considérés comme étant à la fois des motifs antigéniques et/ou des facteurs de virulence chez les organismes pathogènes [85]. Les chaînes O-polysaccharidiques du LPS (O-antigènes) représentent le constituant majeur des motifs antigéniques rencontrés chez les *Pseudomonas*. L'étude immunospécifique de ces chaînes montre une diversité de structure variant par rapport au nombre et ordre d'agencement des oligosaccharides [85].

Lors du processus de biosynthèse des LPS, les oligosaccharides portés par des lipides sont polymérisés par la voie O-antigène polymérase (**Wzy**) dépendante qui est initiée au départ par la galactosylphosphate transférase (**WbpL**) médiateur du transfert du premier monosaccharide vers l'undecaprenyl phosphate (**Und-P**) suivant cette séquence:  $UDP\text{-Sug} + \text{Und-P} = \text{Und-P-P-Sug} + \text{UMP}$ . Les différentes chaînes constituées sont en fin transférées vers le noyau LPS externe [85].

La connaissance de la structure biologique, du nombre et ordre d'agencements des oligosaccharides permet d'élucider la voie de biosynthèse de ces différents groupes antigéniques et de dégager les différents stéréotypes immunospécifiques différenciables de par le saccharide non réducteur situé à l'extrémité de la chaîne LPS O-polysaccharide [85].

Les mutants de *P. fluorescens* WCS374 et *P. putida* WCS358 ayant perdu la capacité de synthétiser l'antigène-O LPS, ont montré une incapacité à coloniser les racines de tomate et de pomme de terre, néanmoins ces souches présentent un même temps de génération, comparés avec leurs souches sauvages respectives, cultivés sur le milieu King B toute seule, elles se sont avérées être déficientes en compétition sur le même milieu de culture tout comme l'étaient les mutants O-antigène négative de *P. fluorescens* WCS365 et *P. putida* WCS358 [86].

Notons enfin que selon les travaux de Dekkers et al [87] des mutants ayant un motif antigénique court de la chaîne latérale ont montré une aussi bonne compétitivité que la souche sauvage en croissance sur milieu King B et que les déficiences en longueur de la chaîne latérale du LPS était la cause de mutation situés sur un gène homologue au gène **htrB** qui code une lauroyl transférase qui est nécessaire a la biosynthèse du lipide A en utilisant le lipide **(Kdo)2-IVA** comme accepteur du lauréate [86]. Tous les mutants O-antigène tout comme les mutants **htrB** ont montre une grande incapacité à croître au contact d'exsudats, plus spécialement lorsque ces derniers ont été testés en compétition avec leurs souches parentales respectives [87].

#### 1.4.2. Les antibiotiques

La production d'antibiotiques est reconnue comme un mécanisme important par le quel les PGPR, peuvent empêcher la prolifération et développement de certains agents phytopathogènes [88, 89]. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs potentiels d'une gamme variée d'antibiotiques avec un large spectre d'action, leur permettant de contribuer à la compétence écologique des souches productrices [90].

La biosynthèse des antibiotiques ou autres composés antifongiques est régulée par une cascade de signaux endogènes qui mettent en jeu des récepteurs kinase, qui réagissent aux stimuli de l'environnement et répondent aux régulateurs codés par les gènes **lemA** et **gacA** de la cellule bactérienne productrice [91, 92, 90], facteurs sigma codé par **rpoD** [91] et **rpoS** [92] et le quorum sensing auto induit par l'N-acyl-homéométrie lactone [93].

Les phénazines à structure simple comme l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) et ses dérivés hydroxy et carboxamide, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) appartenant a la famille des Phloroglucinoles phénoliques sont les déterminants majeurs impliqués dans le bio contrôle de plusieurs agents phytopathogènes tel que *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, responsable du piétine échaudage dans des agro écosystèmes naturels ou se pratique la monoculture du blé [94, 95, 96 ,97].

Il a été montré que la production de molécules antibiotiques aidait à l'établissement des populations bactériennes introduites sur boutures ou semences durant les premières phases de la colonisation de la rhizosphère.

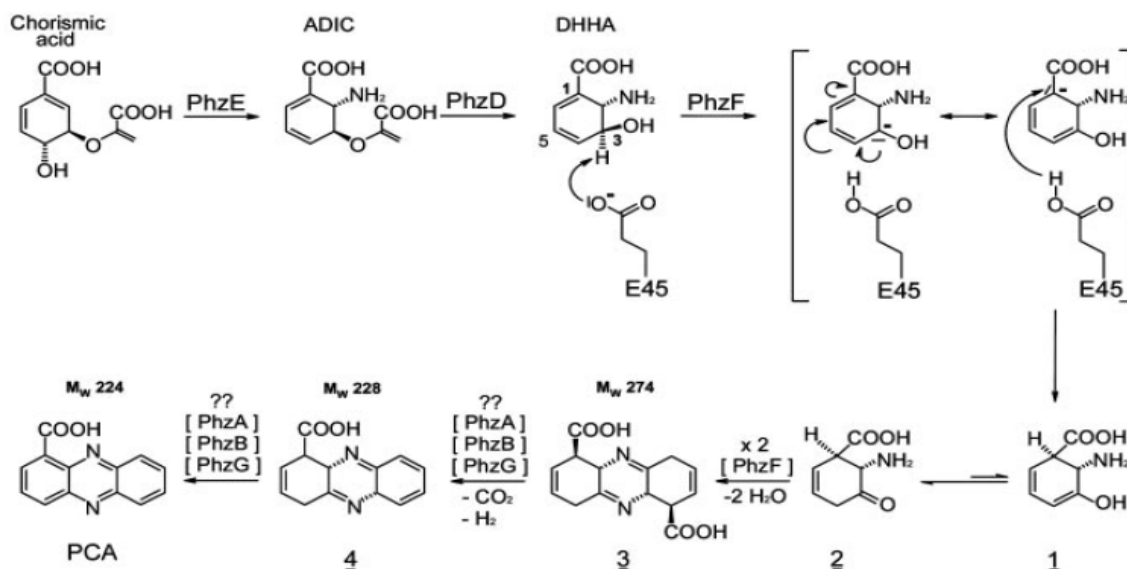
Cependant, plusieurs études ont montré que l'introduction de souches déficientes en synthèse d'antibiotiques n'avait pas plus d'avantage de colonisation ou d'effet de bio contrôle et/ou de stimulation par rapport aux souches sauvages respectives. Ce constat pourrait être expliqué par le fait qu'au delà d'un certain seuil d'accumulation des antibiotiques dans la rhizosphère aucun effet bénéfique n'est apporté [98, 99, 100].

Une expérimentation de bactérisation de semences de blé menée avec la souche recombinante Q8r1-96 de *Pseudomonas fluorescens* capable de produire la phenazines (PCA) et le polyketide 2,4-DAPG n'a pas donné plus d'effet de biocontrôle que sa souche sauvage malgré que il y'a eu une forte induction du promoteur **Tac** responsable de la régulation de l'opéron **Phz** qui s'est traduite par une forte accumulation de PCA et une surproduction de la 2,4-DAPG du fait du déroulement de la voie de biosynthèse de la synthèse du PCA [101].

#### 1.4.2.1. Biosynthèse de l'acide phenazine-1-carboxylique (PCA)

La souche *Pseudomonas fluorescens* 2-79 ainsi que d'autres *Pseudomonas* spp fluorescentes produisant PCA qui est codée par un opéron composé de sept gènes hautement conservé qui sont les gènes **phzABCDEFG** [102, 103]. **PhzC**, **PhzD**, et **PhzE** sont des enzymes similaires aux enzymes rencontrés dans la voie de biosynthèse de l'acide shikimique qui avec **PhzF**, sont absolument nécessaires à la synthèse de phénazines.

McDonald *et al.* [104], ont démontré que l'acide 2-amino-2-deoxyisochorismique (ADIC), synthétisée par **PhzE** à partir de l'acide chorismique, est converti par **PhzD** (isochorismatase), en acide trans-2,3-di hydro-3-hydroxyanthranilique (DHHA) (Figure.1.2) [102].



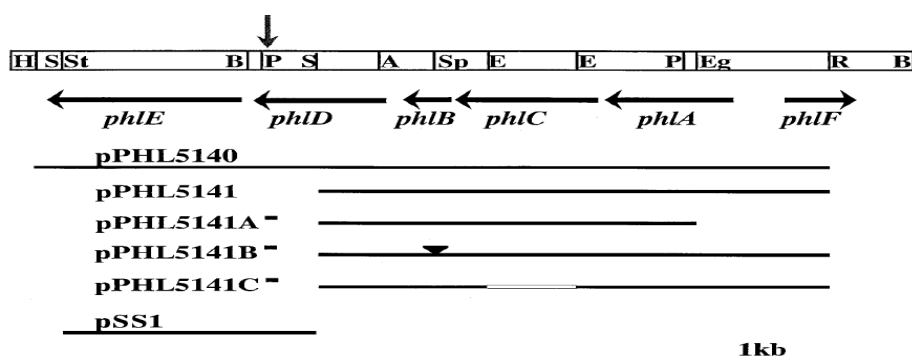
**Figure 1.2.** : Schémas de la biosynthèse de la PCA à partir de l'acide chorismique DHHA, ainsi que le mécanisme d'action de la PhzF.

#### 1.4.2.2. Biosynthèse du 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)

2,4-DAPG est dérivé du monoacetylphloroglucinol (MAPG) qui est transformé en 2,4-DAPG via une enzyme à activité acétyltransférase chez la souche *Pseudomonas* sp. F113 [103]. Pas de précurseurs du MAPG n'ont encore été identifiés, cependant les groupes hydroxyles en position alternée sur le noyau phloroglucinole indiquent un schéma de biosynthèse similaire à celui des polykétides. Les Polykétides naturels sont produits par la condensation successive de petits fragments d'acides carboxyliques par la polykétide synthétases (PKS) qui montre des similitudes avec d'autres PKS ainsi que les gènes responsables de la synthèse des acides gras vu que les processus d'assemblage des unités constitutives sont plus ou moins similaire [104, 105].

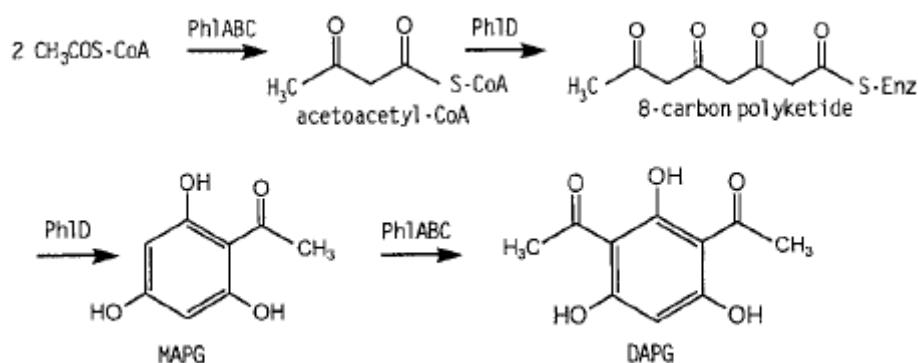
Trois types de PKS sont connus. Chez les *Pseudomonas* spp deux types de polykétide synthétases sont fonctionnelles, le type I PKS qui a été identifié comme étant nécessaire à la production de la pyoluteorine qui est un métabolite antifongique par *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 [105], et la PKS de type II qui est impliqué dans la synthèse de l'acide coronafacique (CFA), qui est le polyketide qui compose la phytotoxine coronatine produite par *Pseudomonas syringae* [106, 107].

Les gènes responsables de la synthèse du 2,4-DAPG et son précurseur, MAPG sont organisés en opéron de six gènes organisés en trois unités de transcription. Quatre gènes forment l'opéron **phIACBD** dont les produits sont nécessaires à la synthèse des deux molécules MAPG et 2,4-DAPG (Figure 1.3).



**Figure 1.3.** Gènes identifiés dans la biosynthèse de la 2-4 DAPG.

Les produits des gènes **phIACBD** ne ressemblent aucunement aux deux enzymes PKS de types I et II. Cependant, **PhID** présente une grande homologie avec la chalcone synthase végétale, l'ensemble de l'opéron de biosynthèse est flanqué de part et d'autre par des gènes séparément transcrit qui sont **phIE** et **phIF**, qui codent respectivement pour des protéines de régulation (répresseur ou promoteur) non nécessaires à la production du phloroglucinol [108] (Figure. 1.4).



**Figure.1.4.** Rôle des produits des gènes PhIA, PhIB, PhIC, et la PhID dans la biosynthèse de la MAPG et de la 2,4-DAPG. [Enz= enzyme]

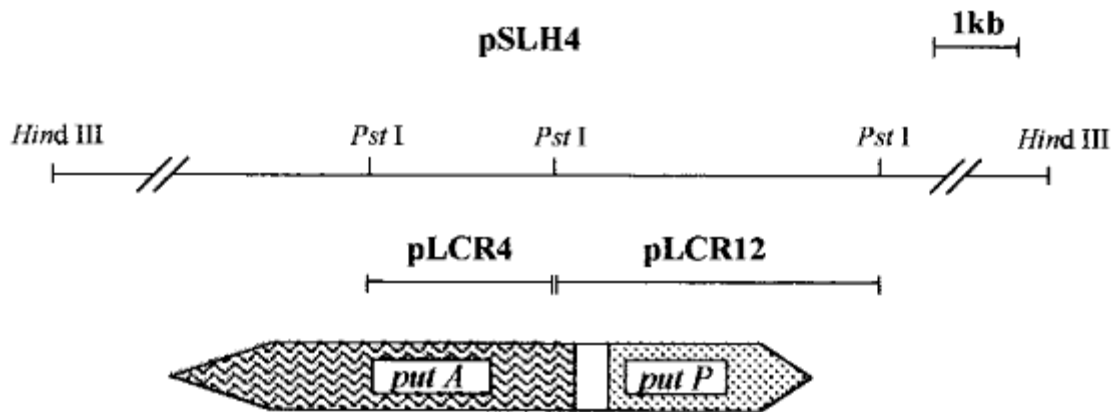
### 1.4.3. Synthèse et rôle des acides aminés

La capacité de synthétiser les acides aminés et organiques qui sont des sources importantes d'énergie pour les bactéries du sol, s'est révélé être essentielle pour la colonisation des racines. Les mutants de *P. fluorescens* WCS365 n'ayant pas la capacité de croître avec certains sucres constitutifs des exsudats racinaires, ont montré les mêmes aptitudes de colonisation que leurs souches sauvages respectives. En revanche, les mutants ne métabolisant pas les acides organiques qui représentent le principal groupe de composés exsudés, ont montré une réduction de leurs taux de colonisation et concurrence dans la rhizosphère de la tomate, indiquant que l'utilisation des acides organiques est la base nutritionnelle majeure pour la colonisation des racines par la souche WCS365 [109].

Les mutants auxotrophes pour la leucine, arginine, histidine, valine/ isoleucine, ou même du tryptophane sont incapables de coloniser efficacement les racines de tomate même si l'acide aminé en question est ajouté de manière exogène [110].

Chez *P. putida*, l'ajout de la proline qui est l'un des composants majeur des exsudats racinaires, utilisés comme source de carbone et d'azote par les micro-organismes du sol durant les premières étapes de la colonisation des racines, semble agir comme inducteur et amplificateur d'activité d'environ 4 à 20 fois de deux gènes **PutA** et **PutP** [111].

Le gène **PutA** code une polyprotéine unique qui a un rôle de régulateur d'un gène qui lui est adjacent **PutP**, qui code une protéine intégrale de la membrane interne appartenant à la famille des symporteurs de substrat  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$ / proline ;  $\text{Na}^+$ / glucose, bicarbonate, etc.), qui a en charge d'absorber la proline qui sera par la suite converti en acide glutamique via un processus de transformation de deux étapes pris en charge par la proline déshydrogénase (PDH) (EC 1.5.99.8), et la déshydrogénase pyrroline-5-carboxylate (P5CDH) (EC 1.5.1.12) [112, 113, 114, 115, 116] (Figure. 1.5).



**Figure 1.5.** Localisation des gènes **Put** chez *Pseudomonas putida* KT2442 sur vecteurs pLCR4, 12 et pSLH4.

#### 1.4.4. Système de sécrétion de type 3 chez les *Pseudomonas spp fluorescentes* (SST3S)

Les T3SSs sont connues comme médiateurs des interactions de nature pathogène entre les cellules bactériennes et eucaryotes. Cependant, la présence de souches saprotrophes de *Pseudomonas spp. fluorescentes* ayant un pouvoir de biocontrol contre les pathogènes telluriques dans la rhizosphère [117], indique l'implication de ces systèmes dans des processus autre que pathogène, telles que les associations symbiotiques menant à l'augmentation du taux d'échange des nutriments au niveau des arbuscules mycorhiziens (AM) se développant sur les cellules corticales des racines [118].

Des études de colonisation conduites avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 déficiente ayant subi une altération du gène *hrcC*- du SST3 par mutagenèse dirigée ont montré que la présence du SST3 n'avait aucun effet sur la survie de la bactérie dans la rhizosphère et que contrairement à la souche SST3 + qui avait montré un effet de bio stimulation de la croissance des racines lie a l'association avec les MA. Les mutants *hrcC* - ont été neutres voir délétères pour le processus de mycorhization [119,120].

La relation entre MA et l'augmentation de la croissance médiée par la souche C7R12 est supposé être le fait de la croissance végétale liée à la promotion de la croissance du système racinaire, tributaire de l'effet bénéfique qu'apporte les MA et non pas à la fixation d'azote atmosphérique [121].

L'abondance des *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3 dans la rhizosphère indique que ces derniers sont préférentiellement associés aux racines mycorhizes plutôt qu'aux racines nues ou non mycorhizes, et que ces bactéries sont actives au contact de mycorhizes fonctionnelles, plutôt qu'avec des champignons mycorhizogènes pré symbiotique. [120].

Sur le plan génétique, les souches de *P. fluorescents* saprotrophes ou bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes, montrent différentes séquences qui concernent un nombre réduit des gènes codant les SST3, ne permettant pas de comparer leur organisation les uns par rapport aux autres. Il est intéressant de noter que la succession des gènes **hrcRST**, caractéristique des clusters **hrp** de la famille **Hrp-I** décrits pour les *Pseudomonas* pathogènes a été retrouvée chez un grand nombre de *Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes (*P. fluorescens* et *P. putida*) [122].

Preston *et al.* [123], ont comparé l'organisation du cluster **hrp** d'une souche de *Pseudomonas* pathogène, *P. syringae* pv. *syringae* 61, avec celle de SBW25, pour montrer que le cluster **hrp** de *P. syringae* présentait de fortes homologies et un fort degré de similarité avec les clusters de SBW25 qui ont été nommés **rsp** (Rhizosphère-expressed sécrétion) (Figure. 1.6).

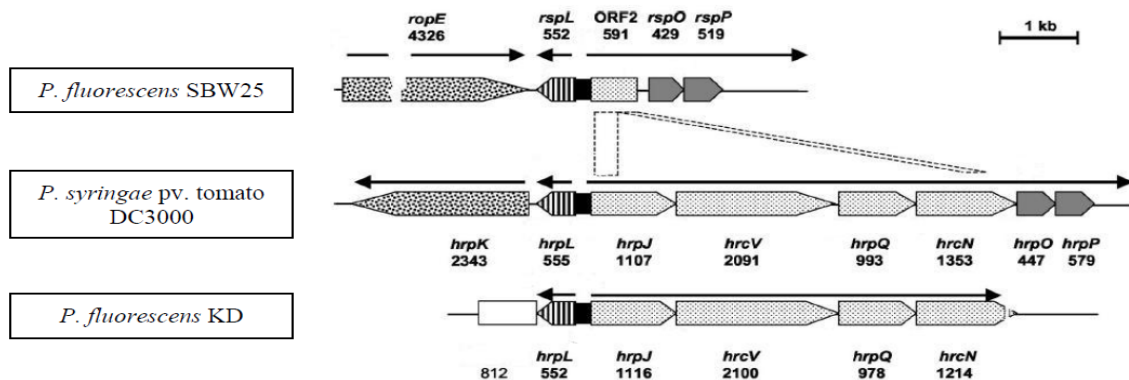


**Figure 1.6.** Schémas de succession des gènes **hrcR**, **S** et **T** chez *P. fluorescens* C7R12

Toutefois, comme énoncé dans la première partie (Paragraphe 1-p12), des différences principales ont été observées. Ainsi, une partie importante de l'opéron **hrcV** ainsi que l'intégralité de **hrpZ** du cluster **hrp** de *P. syringae* ne possèdent pas d'équivalent au sein du cluster **rsp** de *P. fluorescens* SBW25. De même, SBW25 ne possède qu'un seul homologue de régulateurs de réponse (**rspR**), au lieu de **hrpR** et **hrpS** chez *P. syringae*.



Enfin, sur le cluster *rsp*, *ropE* se trouve à une localisation totalement opposée de son homologue *avrE* chez *P. syringae* [124] (Figure. 1.7).



**Figure. 1.7.** Schémas comparant l'organisation des clusters hrp de *P. fluorescens* KD et SBW25, avec les clusters de *P. syringae* pv. tomato DC3000.

#### 1.4.5. Le quorum sensing

Le quorum sensing désigne le phénomène par lequel des molécules de signalisation spécifiques sont synthétisées par des bactéries en nombre suffisant (densité cellulaire suffisante) pour s'accumuler dans l'environnement pour coordonner leur comportement les unes par rapport aux autres afin de répondre efficacement à un stimulus environnemental à travers l'induction ou la répression de l'expression des gènes spécifiques réglés par des protéines régulatrices du signal [125].

Pour qu'une molécule soit classée comme molécule signal induisant une réponse de type quorum sensing plusieurs critères importants doivent être réunies [125]:

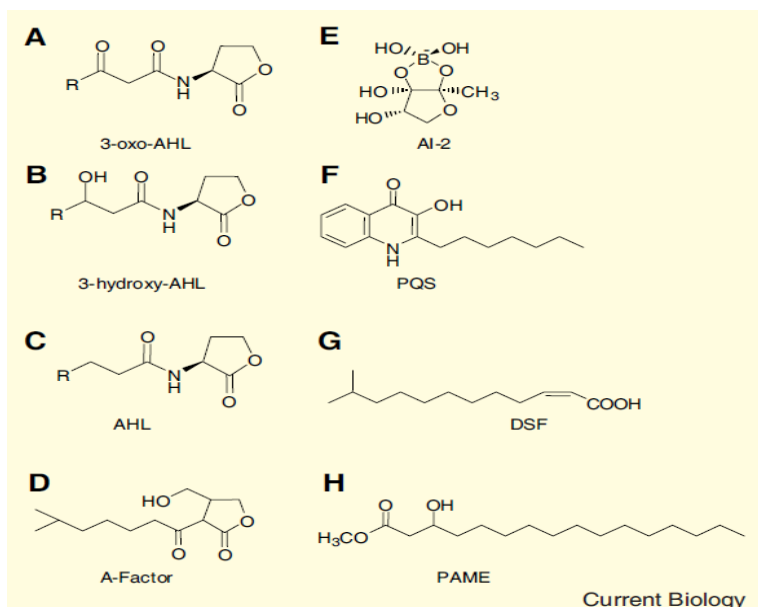
(i), la production du signal quorum sensing doit prendre place durant des stages spécifiques de la croissance ou en réponse à un changement particulier de l'environnement, (ii) le signal doit s'accumuler dans l'environnement extracellulaire et être reconnu par un récepteur membranaire spécifique, (iii) l'accumulation de la molécule doit atteindre une concentration nécessaire et suffisante supérieur ou égale à un seuil critique capable de stimuler une réponse coordonnée, (vi) la réponse cellulaire doit dépasser le stade des

changements physiologiques nécessaires au métabolisme ou à la détoxification.

Les HSL diffusibles représentent un groupe de molécules signal reconnues et utilisées pour maintenir une balance écologique équilibrée pas les différentes communautés poly-microbiennes qui les métabolisent, mais également par d'autres organismes coexistants dans la rhizosphère et la phyllosphère des plantes [126, 127, 128, 129, 130]. Selon Venturi, [131], le genre *Pseudomonas* a la capacité de produire une multitude de molécules signal N-acyl homosérine lactone (HSL) qui se présentent comme suit (Tableau. 1.2) (Figure 1.8).

**Tableau 1.2.** : Molécules signal produite par chaque genre bactérien.

| SOUCHE BACTERIENNE                        | MOLECULE SIGNAL                |
|---|--------------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i>                      | C4HSL / 3 - oxo-C12-HSL        |
| <i>P. syringae</i>                        | 3-oxo-C6HSL                    |
| <i>P. chlororaphis</i>                    | C6HSL                          |
| <i>P.chlororaphis</i> subsp. aureofaciens | C6HSL*                         |
| <i>P. putida</i>                          | 3-oxo-C12HSL / 3-OH-C14 :1-HSL |

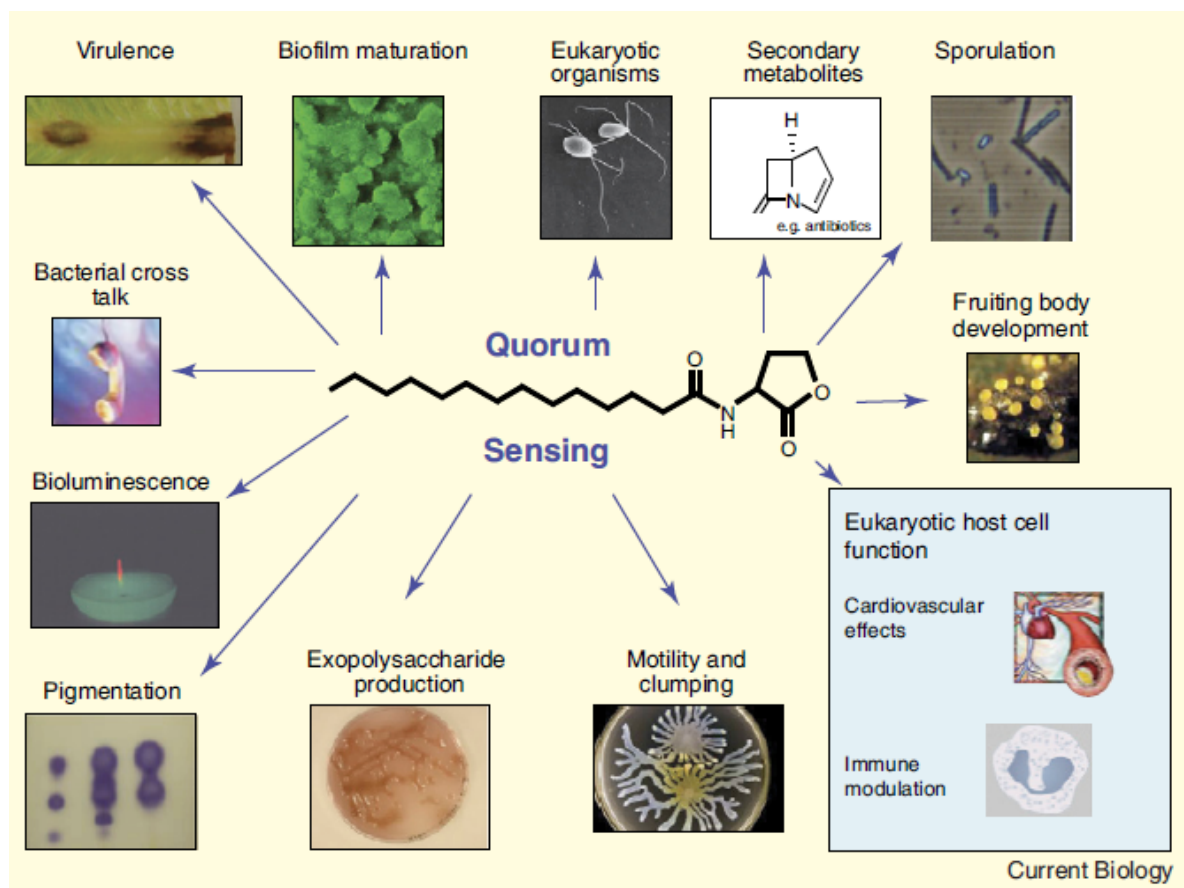


(A) 3-oxo-AHL, *N*-(3-oxoacyl) homoserine lactone; (B) 3-hydroxy-AHL, *N*-(3-hydroxyacyl) homoserine lactone and (C) AHL, *N*-acylhomoserine lactone where R ranges from C1 to C15. (D) A-factor, 2-isocapryloyl-3-hydroxy-methyl-g-butyrolactone; (E) AI-2, autoinducer-2, furanosyl borate ester form; (F) PQS, *Pseudomonas* quinolone signal, 2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone; (G) DSF, 'diffusible factor', methyl dodecenoic acid; (H) PAME, hydroxyl-palmitic acid methyl ester.

**Figure 1.8.** Structure chimique de quelques molécules signal ayant une action quorum sensing.

La synthèse des AHL est assurée par un gène de type « I », lorsque la concentration cellulaire de ces derniers atteint un seuil critique, ils forment un complexe actif avec un activateur transcriptionnel intracellulaire de type « R », qui va engendrer l'expression de l'opéron spécifique au quorum sensing [132, 133].

Chez les la plupart des *Pseudomonas fluorescents* plusieurs traits bénéfiques (production d'antibiotiques de type phénazine, production de métabolites secondaires antifongiques AFM, production de toxines et d'exopolysaccharides, formation de bio film, mobilité, etc.) sont régulés par le quorum sensing médié par l'émission de molécules auto inductrices de N-acylhomosérine lactone (HSL) [131] (Figure. 1.9).



**Figure 1.9.** Traits régulés par le quorum sensing chez les bactéries Gram + et Gram - .

Il est à noter que les bactéries pathogènes et non pathogènes productrices d'AHL interagissent autour des plantes les unes avec les autres via le même système de signalisation. Ainsi, il a été rapporté que certains micro-organismes avaient le potentiel de dégrader ces mêmes molécules signal HSL via un système inverse dit (Quorum quensing) [134, 135].

Les *Pseudomonas* ssp *fluorescents* peuvent contrôler les agents phytopathogènes et interagir avec d'autres colonisateurs bénéfiques, à cet effet de nombreux chercheurs ont tenté d'utiliser les molécules signal HSL pour induire la résistance et/ou promouvoir la croissance des cultures en contrôlant les populations phytopathogènes présentes dans la rhizosphère. Cependant, beaucoup de ces tentatives ont échoué à cause des difficultés liées à la consommation des HSL et à la complexité des phénomènes de régulation des fonctions microbiennes in vivo conduites à grande échelle agricole [136].

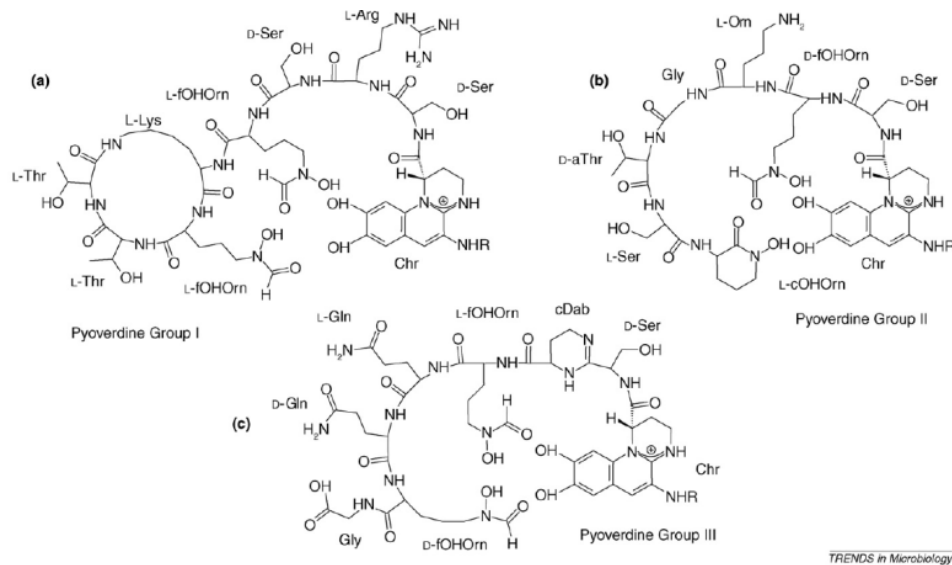
#### 1.4.6. Les sidérophores

Les sidérophores sont des chélateurs qui sont sécrétés par de nombreux microorganismes pour séquestrer le fer dans l'environnement afin de le délivrer à la cellule. Il existe dans la nature plusieurs groupes de sidérophores dont les catécholate et les l'hydroxamate (parfois b-hydroxy-acide) qui fournissent des sites de haute affinité de liaison pour le  $Fe^{3+}$  [137].

La pyoverdine (PVD) qui représente le système primaire d'absorption du fer chez les *Pseudomonas fluorescents*, désigne également un autre groupe de sidérophores qui est un composé diffusible vert fluorescent historiquement reconnu comme trait phénotypique distinctif du groupe 1 d'homologie ARNr.

Une grande diversité de structures des PVD a mené à l'élaboration d'un système de typage spécifique aux *Pseudomonas* spp, dit sidérotyping [138]. À ce jour, la structure de plus de 50 PVDs appartenant à différentes souches et espèces de *Pseudomonas*, ont été déterminées [139]. Ces PVDs sont tous composés de trois parties (Figure. 1.10) : (i) un chromophore conservé dihydroxyquinoline fluorescentes ; (ii) une chaîne latérale acyle (soit de l'acide dicarboxylique ou un amide) lié au groupe amine du chromophore, et (iii) une chaîne peptidique variable liée par un groupe amide au C1 (rarement C3)

groupe carboxyle du chromophore responsable de la reconnaissance et liaison avec les récepteurs membranaires apparentes.



**Figure 1.10.** Schémas des 3 groupes de PVD de *Pseudomonas aeruginosa* avec leurs différents radicaux.

a Thr, allo-threonine ; cDab, tetrahydropyrimidine ; Chr, chromophore cOHOrn, N<sup>5</sup>-hydroxyornithine cyclique ; Dab, 2,4-diaminobutyrate ; fOHOrn, N<sup>5</sup>-formyl-hydroxyornithine.

Les PVD jouent un rôle crucial dans le contrôle biologique des micro-organismes phytopathogènes de la rhizosphère [140 ; 141]. À pH neutre ou légèrement alcalin, les souches capables d'émettre les PVD sont capables de jouer un rôle d'antagoniste bactérien en ayant la capacité d'utiliser un large panel sources de fer en séquestrant le pool limité de fer présent dans la rhizosphère, par le biais de la formation d'un complexe stable avec le Fe<sup>3+</sup>, d'ont l'assimilation aide respectivement d'une manière directe et indirecte à la croissance de organisme producteur et des végétaux.

#### 1.4.7. Médiation du transport du fer par les sidérophores et signalisation bactérienne

Dans la rhizosphère, les Fe<sup>3+</sup> chargés (Ferri-) sidérophores sont sélectivement reconnus et liés à des récepteurs de haute affinité se trouvant sur la surface cellulaire [la membrane externe (OM) des bactéries Gram-négatif], puis transportés dans la cellule [142]. Certains de ces récepteurs se lient à l'apo-sidérophores apparenté en l'absence de ferri-sidérophores (Figure.

2.11a) ; le déplacement de l'apo-sidérophores à partir du récepteur du ferri-sidérophores apparenté initie un transport actif à travers l'MO (Figure. 2.11b).

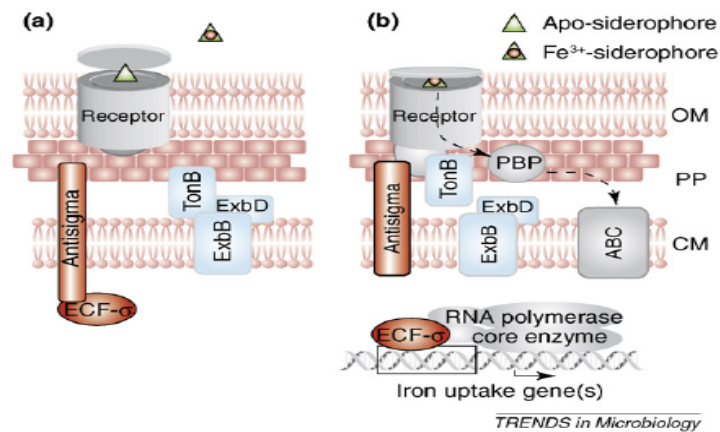
Le transport des sidérophores par les récepteurs de la MO est couplé à la perte du gradient de protons sur la membrane cytoplasmique (CM). La transduction de l'énergie est médié par la protéine **TonB** dans le périplasma (PP), qui répond à la force proton-motrice de la CM [109].

Selon le modèle actuel, le passage de **TonB** de la CM à l'OM, où ce dernier achemine l'énergie au récepteurs lié au ligand-chargées (Figure 1.11b), puis se réassocie avec ses partenaires **ExbB**, **ExbD** de la CM, qui sont nécessaires pour l'excitation et l'association de **TonB** avec la CM (Figure 1.11a)

La fixation du ferri-sidérophores induit un changement dans la conformation du domaine plug qui permet le transport du ferri-sidérophores vers PP (Figure. 2.11b).  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ - sidérophores chargés sont ensuite transférés dans le cytoplasme par une protéine periplasmique d'attachement (PBP), qui les livre à un transporteur ABC apparentés situe sur la CM [143]. En suite le transporteur ABC transloque le ligand a travers la CM utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP dans le cytoplasme. L'expression de la synthèse des sidérophores et des gènes d'absorption est réprimée dans des conditions où le milieu est riche en fer par une protéine répresseur, qui s'assemble en complexe avec le  $\text{Fe}^{2+}$  sur le promoteur des gènes en charge du transport du fer. Certains sidérophores ont également des propriétés autorégulatrices qui permettent une expression maximale des gènes apparentés à la synthèse et absorption et ce dans le cas où les sidérophores est efficace dans sa capacité de livraison du  $\text{Fe}^{3+}$  à la cellule. Un mécanisme comme cela implique une voie de signalisation qui est déclenchée lorsque le récepteur se lie au ligand approprié [144] (Figure. 1.11b).

Chez *P. aeruginosa* PAO1, la signalisation PVD implique quatre partenaires protéiques : le récepteur PVD de la MO **FpvA**, le CM- couvrant le facteur antisigma **FpvR** et deux facteurs sigma extra cytoplasmique (ECF-s), PVD et **Fpvi** [145, 146]. Après fixation du ligand par le récepteur **FpvA**, un signal est transmis au facteur antisigma **FpvR**, résultant sur l'activation des facteurs sigma **Fpvi** et **PvdS**. **PvdS** dirige la transcription de gènes de synthèse

PVD, en plus de ceux codant des enzymes secrétées, **Fpvl** reconnaît le promoteur du gène codant pour **Fpva**. Par ce mécanisme, la molécule PVD déclenche non seulement sa propre synthèse et absorption, mais également l'expression coordonnée de plusieurs gènes de virulence **PvdS**-dépendant, qui contribuent en fin à la pathogénicité de *P. aeruginosa*. A ce jour on ne sait pas encore si la molécule de signalisation est **Fe-PVD** ou **apo-PVD** [147].



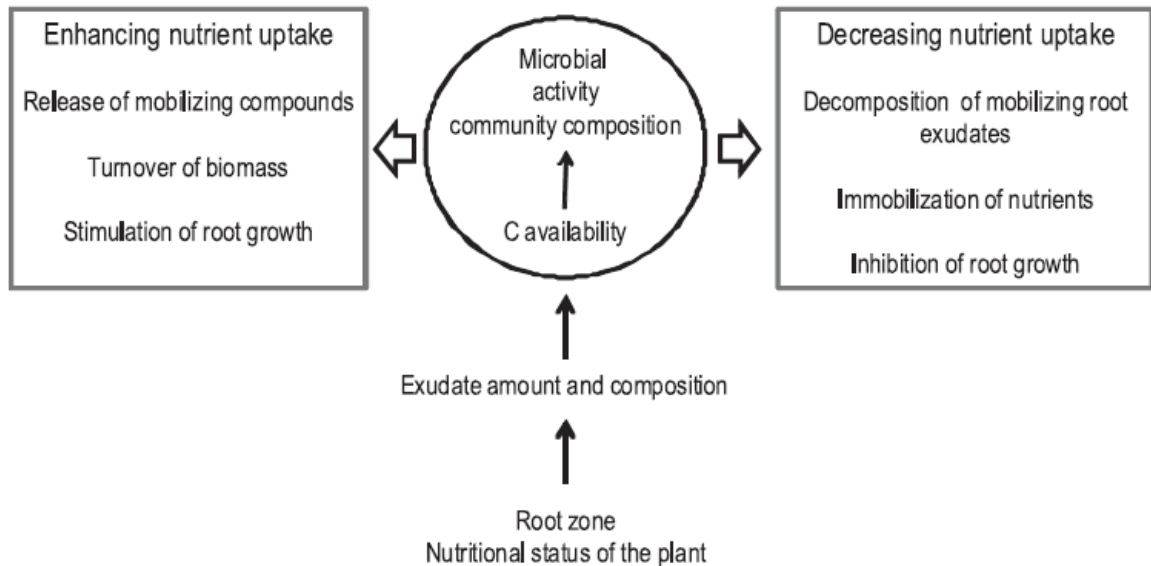
**Figure 1.11.** : Schémas de signalisation et de transport du fer médié par les sidérophores.

#### 1.4.8 Acquisition du fer et du phosphore

##### 1.4.8.1. Acquisition par les racines des plantes

Les plantes et les microbes ont développé des mécanismes similaires pour la mobilisation et l'absorption du Fer et du Phosphore. Dans la rhizosphère, le Fer et le Phosphore sont mobilisés par la plante ou les métabolites secondaires dérivés des micro-organismes, l'acquisition de ces macroéléments est sujette à une concurrence intense [152].

De manière générale, il semble que les microorganismes soient plus compétitifs que les plantes, car ils ne sont pas seulement en mesure d'absorber les éléments nutritifs liés à des composés d'origine végétale, mais aussi capable de décomposer les matériaux dérivés de plantes et immobiliser les éléments nutritifs dans la biomasse avant qu'ils n'atteignent la surface de la racine [152]. (Figure. 1.12)



**Figure 1.12.** : Mécanismes par les quelles les microorganismes augmentent ou diminuent la biodisponibilité des nutriments pour les plantes. Ainsi que quelques mécanismes influençant l'intensité des réactions chimiques survenant dans le sol.

La teneur totale en Fer dans le sol varie généralement de 2 à 4% (w / w), mais dans les sols aérés leurs disponibilité pour les organismes est limitée par la faible solubilité du Fe (III) et de la lente décomposition des minéraux ferreux. Ainsi, les plantes et les micro-organismes ont mis au point pour augmenter la biodisponibilité du Fe des stratégies différentes [115, 114].

D'une manière générale, les plantes peuvent induire des changements dans la morphologie et l'histologie des racines (gonflement des extrémités de la racine, augmentation de la ramification des racines, augmentation du nombre de poils absorbants, formation de cellules de transfert rhizodermale, etc.) [114].

Deux stratégies majeure sont à prendre en considération dont la première qu'on rencontre chez les plantes (dicotylédones et les monocotylédones n'appartenant pas aux graminées) consiste à accroître la disponibilité du fer en libérant des protons qui abaissent le pH du sol et le taux d'anions d'acides organiques qui peuvent complexer le  $Fe^{3+}$  et le maintenir sous une forme soluble et diffusible pour les racines ainsi que l'utilisation de la réductase présente sur la membrane plasmique des cellules qui réduit les formes peu solubles de  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  plus soluble à l'extérieur ou à l'intérieur de l'enveloppe cellulaire de la racine [115].



Contrairement au dicotylédones, la deuxième stratégie adoptée par les plantes notamment celles appartenant aux (Poaceae) est la libération de phytosidérophores non-protéinogéniques ayant pour origine les différents acides aminés présent dans le cytosol et dont le principal constituant est l'acide mugineic [116, 117].

En cas de déficience sévère en Fer, les phytosidérophores peuvent représenter 50 à 90% des exsudats libérés à la pointe des racines [117]. Leur libération est très localisée dans l'espace et montre un rythme diurne distinct, avec un taux de libération maximale survenant dans les zones d'allongement apparaissant durant quelques heures après l'apparition de la lumière [119].

Ces chélateurs se fixent préférentiellement au Fe et accessoirement au Zn et au Cu, ils ont pour rôle principale de former un complexe chélateur (phytosidérophore- Fe) qui a pour but de séquestrer le fer et de le délivrer à la racine [119, 118].

#### 1.4.8. 2. Acquisition du fer par les microorganismes du sol

Les micro-organismes produisent de nombreux sidérophores différents, comme le ferrichrome synthétisé par les champignons, ou l'enterobactine, pyoverdine et ferrioxamines qui sont libérés par les bactéries [119]. Une espèce microbienne donnée peut produire un ou plusieurs sidérophores et acquérir le fer lié à une diversité de chélateurs exogènes, y compris ceux des sidérophores hétérologue [120, 121]. Ce trait peut conduire à une forme de tricherie, qui fait que certaines espèces microbiennes bénéficient de l'activité des autres microorganismes sans toutefois fournir aucun effort de synthèse de molécules hydrocarbonée ou d'énergie [148].

L'utilisation de différents sidérophores semble être importante pour la capacité concurrentielle des espèces bactériennes [148]. Il existe différents mécanismes par lesquels les microorganismes de la rhizosphère peuvent augmenter ou diminuer l'absorption en Fe des plantes. Les sidérophores d'origine bactérienne sont généralement considérées comme des sources pauvres en Fe pour les plantes monocotylédones et dicotylédones. Typiquement, la concentration des sidérophores qui est nécessaire pour fournir des quantités suffisantes de Fe pour les plantes varie entre de 5 à 50 mM dans

les solutions hydroponiques contenant les chélats de Fe [149]. Dans la rhizosphère, la production localisée de sidérophores dans des microsites à activité microbienne intense donne des concentrations élevées de sidérophores, mais leur contribution à la nutrition des plantes n'est pas claire.

Les interactions entre les différents chélateurs de Fe, et la concurrence entre les organismes pour cet élément minéral, dépend de l'affinité des chélateurs envers le Fe et de leurs concentrations relatives [150]. Comparé aux phytosidérophores, les sidérophores bactériens tels que la pyoverdine ont une affinité beaucoup plus élevée envers le Fe. Ainsi, si les sidérophores et les phytosidérophores sont présents à des concentrations similaires dans un système quelconque, le Fe est retiré du complexe Fe-phytosiderophore ou Fe - citrate et se lie préférentiellement aux sidérophores microbiens.

En définitive, les micro-organismes décomposent plus rapidement les anions d'acides organiques et phytosidérophores, en les utilisant comme source d'énergie et d'éléments nutritifs [151, 152]. Ainsi, les micro-organismes semblent être très compétitif pour le Fe par rapport aux racines des plantes, car les micro-organismes peuvent utiliser le Fe lié à des chélateurs originaires des plantes, (ii) décomposer les chélateurs dérivés de ces plants, et (iii) produire des chélateurs qui ont une plus grande affinité pour le fer comparés à ceux des végétaux.

## 1.5. Facteurs génétiques

### 1.5.1. La Recombinase Site-Spécifique

Dybvig, [153], a postulé que les bactéries sont capables de générer des sous-populations de phénotypes différents dans certains milieux astringents, au moyen de réarrangements de l'ADN, qui se traduisent par l'apparition de nouvelles aptitudes qui permettent de s'adapter à de brusques changements de l'environnement et ce quelque soit le nombre de cellules viables et cultivables.

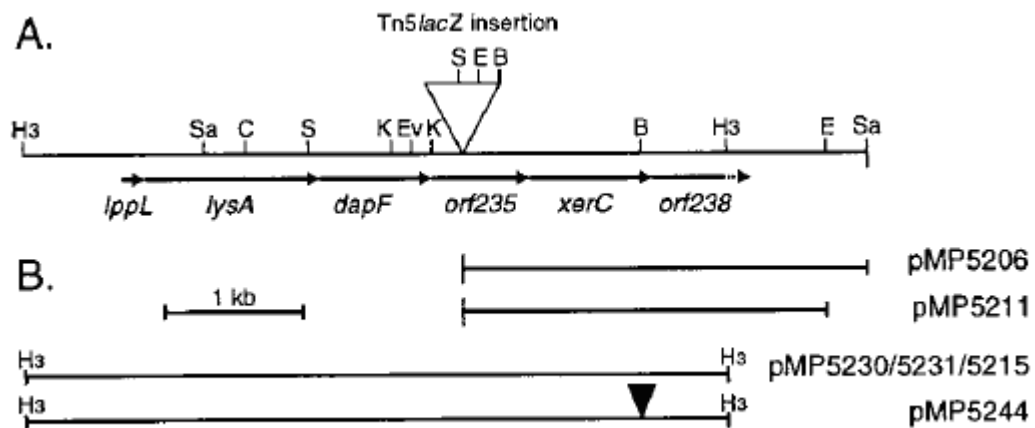
Ces réarrangements génétiques ont pour rôle de promouvoir la recombinaison conservatrice réciproque (qui ne nécessite pas la synthèse d'ADN) qui survient sous l'action de la recombinaison site spécifique ou

recombinaison site spécifique conservatrice, qui est un type de recombinaison génétique dans lequel s'effectue des réarrangements de segments d'ADN par reconnaissance et liaison à des séquences d'ADN courtes (sites d'environ 15 pb) sur lesquelles des hélices d'ADN sont coupés, échangés et ligaturés. Ces recombinaisons sont très spécifiques, rapide et efficace, même face à des génomes eucaryotes complexes [154, 155, 156, 117, 157]. Ils sont employés dans une variété de processus cellulaires, dont la réplication des génomes bactériens, la différenciation et la pathogénèse, le mouvement d'éléments génétiques (îlots de pathogénicité). La régulation de l'expression des différents motifs antigéniques de la surface cellulaire à savoir les fimbriae, flagelles, LPS, et lipoprotéines [153, 158].

Des mutants défectives de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 ayant perdu leurs pouvoirs de compétition sur racines de pomme de terre, radis, blé et tomate en conditions naturelles ou sur microcosme, ont montré une mutation survenant au niveau de l'opéron **Sss/XerC** qui code une protéine de la famille  $\lambda$  intégrase des recombinases site-spécifiques responsable de la variation de phase générant la variabilité phénotypique [159].

**Sss/XerC** est constituée de six ORF ayant une moyenne G/C d'environ 63,7% [138]. Chaque ORF est précédée par une séquence codant un motif de Shine-Dalgarno correctement espacé des différents codons de départ, exception faite pour l'ORF5, qui est transcrit avec l'ORF4 [159].

Aucune séquence promotrice n'a été rapportée à l'intérieur de l'opéron **Sss/XerC**. Cependant, une région promotrice très hautement conservée se situant en amont des deux gènes **LppL/lysA** a été rapportée chez les espèces de *Pseudomonas*, suggérant un rôle de liaison avec des facteurs de transcription ainsi qu'une régulation génique de **lysA** médiée par un système de type atténuation [160] (Figure 1.13).



**Figure. 1.13.** : Carte de restriction d'un fragment d'ADN de *P. fluorescens* WCS365, incluant un fragment de 5-kb HindIII complétant le déficient de colonisation.

(A) les flèches situées sur le fragment HindIII de 5-kb indiquent la direction et taille des six ORFs. (B) les fragments utilisés pour la complémentarité de séquençage du fragment simple brin ADN. B, BamHI; C, ClaI; E, EcoRI; Ev, EcoRV; H3 HindIII; K, KpnI; S, SmaI; Sa, Sall

## 1.6. Modélisation des populations microbiennes

Comprendre les mécanismes de succession et décrire la dynamique des communautés microbiennes telluriques dans un environnement en perpétuel changement a été traditionnellement l'un des problèmes les plus importants et les plus difficiles en écologie du sol. Peu de travaux ont été spécialement consacrés aux microorganismes et à la microfaune du sol. Ce domaine est critique en raison de l'importance des actions écologiques que peuvent avoir les communautés microbiennes sur l'ensemble de l'écosystème (décomposition de la litière végétale, de l'azote fixation, dénitrification fixation et dénitrification, formation et consommation des molécules à l'état gazeux, la transformation de métaux, la réduction du sulfate, la production de phytohormones, etc.).

La modélisation mathématique joue un rôle très important dans la mesure où elle permet de vérifier différentes hypothèses en écartant celles qui sont manifestement fausses qui ne s'accorde pas avec les données expérimentales. Ces procédures permettent de gagner du temps et du matériel en permettant de simuler différents scénarios pouvant survenir dans l'écosystème, en modifiant les paramètres constitutifs des équations utilisés.

### 1.6.1. Évaluation générale des modèles mathématiques disponibles

Les modèles mathématiques décrivant la croissance et l'activité microbienne peuvent être déterministes et stochastiques, empirique et mécaniste, numériques et analytiques ou dynamique et statique.

Les modèles mécanistes (explicatives), sont préférées aux modèles empiriques (descriptives) parce qu'ils sont construits pour rendre compte des processus biochimiques contrôlant la croissance microbienne [161, 162]. Cependant, si le mécanisme régissant le processus étudié est inconnu, les fonctions mathématiques doivent être utilisées de manière empirique, et la pertinence du modèle est statistiquement évaluée à partir du niveau d'ajustement aux données expérimentales. De ce fait, les modèles empiriques peuvent être développés en modèles mécanistes au fur et à mesure que les données constituant le système deviennent disponibles [163].

Les modèles empiriques axés sur les processus orientés, rendent compte des mouvements de transformation de la matière ou de l'énergie, et ne tiennent aucunement compte des organismes vivants (micro-organismes, animaux, plantes) comme variables d'état explicite. [164]

La biomasse microbienne est parfois traitée dans certains modèles comme une partie active de la matière organique du sol [165, 166], mais les mécanismes réels de l'activité microbienne, qui sont, la multiplication cellulaire et la croissance, l'induction de la répression des enzymes de dégradation et de synthèse, le Co-métabolisme de la lignine et de l'humus ne sont pas exprimés.

Les modèles à procédé dirigé "process-oriented models" ou modèles empiriques ont l'avantage d'être relativement simples permettant une simulation à grande échelle spatiotemporelle. Comme ces modèles n'expriment pas explicitement les mécanismes biologiques, ils n'ont pas la généralisation nécessaire et peuvent faillir à simuler la biodynamique observé sans qu'elle nécessite plusieurs interventions à différents stades spécifiques de la modélisation. De ce fait leur utilisation reste compliquée à mettre en œuvre.

L'approche mécaniste a été largement utilisée pour rendre compte de la croissance somatique et de la dynamique des populations, ainsi un grand nombre de fonctions sigmoïdes ont été utilisés pour la modélisation de la croissance somatique et la dynamique des populations [161], pouvant être appliquées à la croissance microbienne « mono moléculaires, logistiques et de Gompertz » [167, 168, 161] (Tableau. 1.3).

Ce type de modèles explicatifs des mécanismes biologiques repose sur une approche de type "organism-oriented models" qui simulent le flux de matière ou d'énergie, en se basant sur le comportement de différents groupes fonctionnels ou taxinomique d'organismes du sol [164]. Ces groupes peuvent être d'ordre communautaire général (bactéries, champignons) ou représentent plus spécifiquement des membres appartenant à des chaînes trophiques développées [169]. En conséquence, ces modèles fournissent un outil efficace de recherche pour l'examen des comportements complexes des dynamiques des micro-organismes : la croissance et la survie, la différenciation et l'extinction, l'état d'équilibre et de dynamique transitoire, les variations dans la composition de la cellule, la synthèse des sous-produits, etc.

**Tableau. 1.3.** Equations utilisés dans la modélisation de la dynamique des populations microbiennes.

| Candidate functions     | $f(t)$   |
|-------------------------|--|
| Linear LIN              | $L_0, \quad t \leq \tau$ $L_0 + \mu(t - \tau), \quad \tau < t < t_f$ $L_\infty, \quad t \geq t_f$  |
| Logistic LOG            | $\frac{L_\infty}{1 + e^{-\lambda(t-t^*)}}$   |
| Gompertz GMP            | $L_\infty \exp[-e^{-\lambda(t-t^*)}]$  |
| von Bertalanffy VNB     | $L_0 + (L_\infty - L_0)(1 - e^{-\lambda t})^{1/v}$   |
| Richards RCH            | $\frac{L_\infty}{[1 + v e^{-\lambda(t-t^*)}]^{1/v}}$   |
| Morgan MRG              | $\frac{L_0 K^v + L_\infty t^v}{K^v + t^v}$   |
| Weibull WBL             | $L_\infty - (L_\infty - L_0) \exp[-(\lambda t)^v]$   |
| France FRN              | $L_0, \quad t < \tau$ $L_\infty - (L_\infty - L_0) e^{[-\lambda(t-\tau) + d(\sqrt{t} - \sqrt{\tau})]}, \quad t \geq \tau$  |
| Baranyi and Roberts BAR | $L_0 + \mu_{\max} t + L_1 - L_2,$ $L_1 = \ln[e^{-\mu_{\max} t} - e^{-\mu_{\max}(t+T)} + e^{-\mu_{\max} T}],$ $L_2 = \ln \left[ 1 + \frac{e^{\mu_{\max}(t-T)} + e^{-\mu_{\max} T}}{e^{(L_\infty - L_0)}} \right]$ |

$\tau$  (h) temps discret de la phase exponentielle, K (h) temps pour le quelle la moitié de la croissance est achevé, t (pas d'unité) tendance de la courbure,  $L_1$  log du maximum de la taille de la population microbienne.

Ainsi et malgré l'existence d'un nombre élevé d'équations non linéaires utilisées pour la modélisation de la croissance microbienne, il n'existe pas de fonctions qui soient significativement supérieur aux autres. [170, 171]

Lopez et al [172], ont effectué une évaluation statistique détaillée sur les résultats prédits par les équations figurant dans le tableau (1.3). Cette étude a révélé des différences significatives entre les modèles dans leurs performances et leur précision.

Les Modèles BAR, LIN, RCH et WBL ont montré des performances constantes pour les deux types de courbes de la croissance microbienne. Bien qu'il ait été noté que les modèles BAR et LIN avaient de meilleur ajustement pour les données obtenus par comptage sur boîte Pétri ainsi que le modèle

RCH qui semble être plus adéquat pour modéliser les données obtenues par la mesure des densités optiques.

Néanmoins, en se basant que sur des critères statistiques, il serait approprié de choisir des modèles tels que BAR, LIN, RCH et WBL pour une utilisation générale décrivant les courbes de croissance microbienne [172].

#### 1.6.2. Diversité des facteurs environnementaux

Les modèles théoriques simulant la croissance et la vie rhizosphérique des bactéries telluriques, sont basés sur les différents profils d'exsudation, ainsi que sur la dispersion des nutriments dans la solution du sol [173, 174, 175]. Certains de ces modèles ont été développés pour rendre compte de la dynamique des populations bactériennes évoluant dans des conditions d'environnement rhizosphériques supposées parfaites, n'intégrant pas le fait que la rhizosphère soit en réalité un environnement complexe où plusieurs facteurs interagissent entre eux pour avoir des actions, qui soient directe sur l'activité microbienne, (ex : effet de l'humidité, de l'aération et de la texture du sol sur la croissance bactérienne) ; ou indirecte dite de rétroaction capable d'agir sur ces mêmes facteurs environnementaux (Ex : effet de l'acidité moyenne et le pH du sol généré par l'absorption et l'excrétion d'anions et de cations sur l'activité microbienne).[166]

Cette complexité caractéristique de tout sol naturel (Figure. 1.14), représenté par une grande diversité de composantes biotiques et environnementales, présente en comparaison avec les systèmes artificiels le principal obstacle à la construction de simulations mathématiques réaliste. Cependant, il n'est pas possible de simuler tous ces facteurs, car un tel modèle mathématique serait trop compliqué à résoudre et à utiliser pour des analyses routinières,

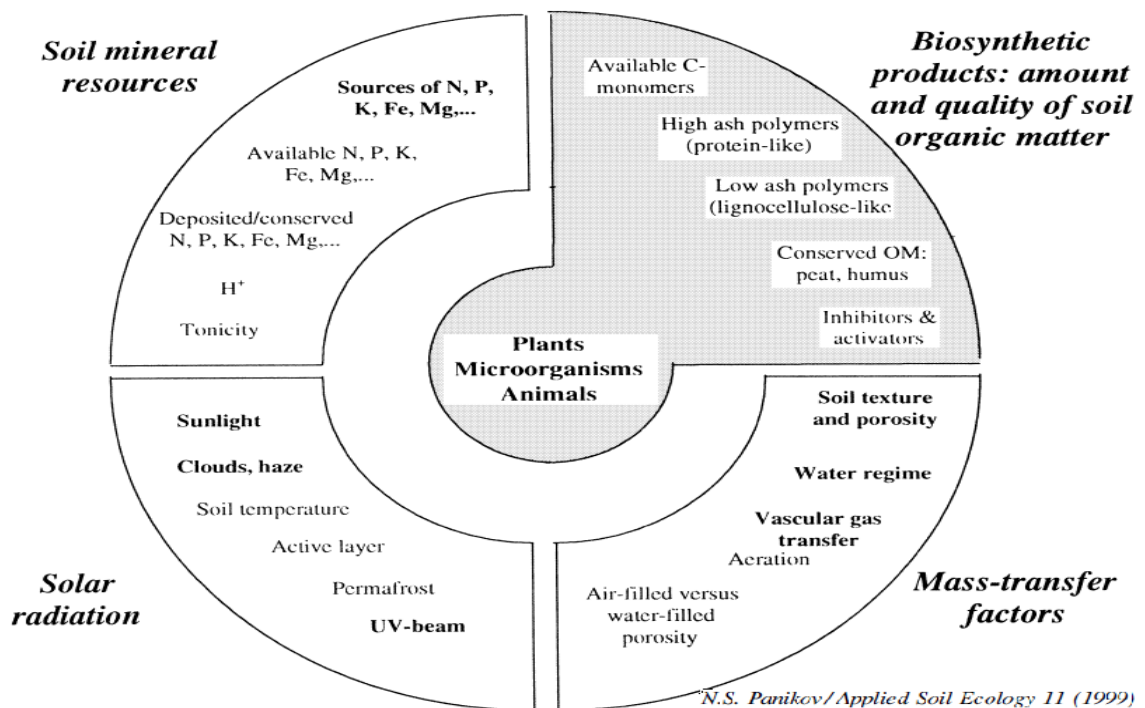
Les modèles dit compliqués ayant un nombre important de variables posent un autre problème qui est l'impossibilité de leur appliquer les analyses statistiques usuelles telles que les régressions non linéaires, qui sont sensible au nombre de valeurs et a leur distribution [166]. Par conséquent, le reparamétrage de ces modèles est souhaitable, et une procédure dans laquelle



certaines hypothèses simplificatrices sont émises afin de simplifier les équations originales [163].

Nous pouvons en fin, considérablement réduire le nombre de facteurs rentrant dans la constitution des équations d'estimation, en tenant compte de quelques considérations qui sont principalement :

- La limitation du nombre de facteurs qui constituent les variables indépendantes primaires, qui doivent être considérées comme des paramètres d'entrée du modèle de simulation.
- Sélectionner d'autres variables qui sont des variables dépendantes secondaires pouvant être "automatiquement" générées par les différents équations mathématiques construites sur la base de relations mécanistes bien déterminés.



**Figure. 1.14.** Les facteurs environnementaux qui affectent les communautés de microorganismes du sol compensant les variables primaires indépendants (en gras) et les variables dépendantes (normale).

### 1.6.3. La modélisation de la biodiversité microbienne du sol

La plupart des simulations mathématiques prennent en charge de modéliser la taille globale des micro-organismes qui rendent compte des différentes fonctions biogéochimiques. En réalité, n'importe quel groupe physiologiques (Méthanogènes, méthanotrophes, les bactéries nitrifiantes, microorganismes aérobies hétérotrophes, etc.) est représenté par un nombre de populations en compétition pour les substrats communs. La différence entre les différentes populations de la même niche trophique est fonction de sa stratégie de vie [176].

On peut distinguer trois types de stratégies de vie qui sont le résultat de différents schémas évolutifs survenus sous la pression de la sélection naturelle.

- **Schéma de sélection-K** pour les organismes ayant développé une forte affinité aux substrats monomères nécessitant peu de dépenses d'entretien, pouvant rapidement accumuler les substrats carbonés polymériques, qui sont stockés en tant que composés de réserve. (bactéries autochtones et oligotrophes ainsi que les champignons).
- **Schéma de sélection – r** pour les organismes caractérisés par une croissance intense et qui ont une activité de biosynthèse très soutenue, lorsque ils sont soumis a des conditions de croissance limitantes dotées de structures biologiques spécifiques tell que des ribosomes et des enzymes du métabolisme primaire (Les populations et les copiotrophic et les populations zymogène, les levures).
- **Schéma de sélection-L** pour deux groupes d'organismes d'ont un groupe est adaptée aux environnements défavorables (Psychro-, thermo-, halo,acido-organismes et de alkalotolerant), et le second s'est adapté au stress par la formation de structures dormantes de résistance (spores, kystes), et est capable de produire des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires ayant le pouvoir de dégrader des toxiques (aromatiques et polymères composés).

#### 1.6.4. Expression de la croissance bactérienne

La croissance microbienne a souvent été exprimée en termes de nombre d'unités microbiennes CFU (unités formant une colonie) ou indirectement mesurée par le biais de la densité optique [177]. Ces paramètres sont fréquemment utilisés parce que leurs mesures sont simples et rapide à estimer. Cependant, la taille des cellules peut varier en fonction des conditions de croissance, donnant un nombre de cellules inférieur à la biomasse.

Pour contourner ce biais d'estimation, la quantification du taux d'O<sub>2</sub> consommé ou de CO<sub>2</sub> émis peuvent être utilisés pour rendre compte de la croissance [176].

Les densités de populations obtenues par le comptage CFU et la densité optique, nécessitent une transformation logarithmique en raison de leur hétéroscédasticité (distribution ne suivant pas la loi normale). Dans les cas contraire, les régressions appliquées à ces valeurs seront imparfaites et donnerons des valeurs hautement dispersées [178].

#### 1.6.5. La sélection d'un modèle mathématique

Pour modéliser le comportement des microorganismes du sol dotés de stratégies de vie différentes, des modèles s'appuyant sur des données actualisées portant sur la physiologie et la biologie moléculaire des espèces microbiennes sont nécessaires [176].

Les expériences en laboratoire menées sur des cultures pures et des cultures mixtes sont les seuls sources d'information renseignant sur le métabolisme microbien. Ces données sont obtenues en soumettant ces microorganismes à différents facteurs environnementaux affectant la croissance (température, concentration en substrat, le spectre de substrats assimilés, modèle dynamique du substrat livraison).

Les données obtenues en laboratoire sont extrapolés *ex situ* sur des situations naturelles survenant *in situ*, puis d'utiliser les caractéristiques intégrales (par exemple, le taux de croissance spécifique de la population) pour les comparer les unes aux autres en appliquant des tests de signification et en définissant la meilleur équations d'ajustement expliquant la plus grande partie

de la variance en appliquant des régressions non linéaires. Ainsi, si la concordance est grande entre les deux pools de données, le modèle peut être considéré comme pertinent et peut être utilisé pour la prédiction.

Indirectement, L'analyse cinétique de croissance basée sur l'étude des combinaisons entre modélisation mathématique et expérimentation dynamique sur terrain, peut ultérieurement fournir des indications sur les mécanismes sous-jacents permettant de mettre en évidence de nouvelles perspectives expérimentales.

## CHAPITRE 2 MATERIELS ET METHODES

### 2.1. Le sol

Le sol utilisé dans nos expérimentations a été prélevé au niveau de la station expérimentale du département d'agronomie de (Université de Blida), à partir d'une parcelle nue non cultivée. Les caractéristiques physicochimiques du sol ont été étudiées durant l'année 2006 au niveau du laboratoire de pédologie du département d'Agronomie de l'Université de Blida [179] (Annexe A).

Après séchage et tamisage (4 millimètres de diamètre) afin d'éliminer les éléments grossiers. Le sol a été désinfecté par autoclavage (deux autoclavages à 120°C pendant 30 minutes séparées de 24 heures d'intervalle).

### 2.2. Les souches bactériennes

Deux souches de *Pseudomonas fluorescens* ont été utilisées dans nos expérimentations (Tableau 3.1), il s'agit de la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12 et de la souche D2 de *Pseudomonas putida*. Ces souches font partie de la collection microbienne du laboratoire de phytopathologie (Département d'Agronomie, Université Saad Dahleb – Blida).

*Pseudomonas fluorescens* C7R12 est un mutant spontané de la souche sauvage C12, résistante à la rifampicine elle a été isolée à partir du sol de Chateaufort (France) et gracieusement fourni par P. Lemanceau (INRA Dijon, France).

*Pseudomonas fluorescens* D2 est originaire de France, elle a été isolée à partir de la rhizosphère du lin et elle a été utilisée dans de nombreux travaux expérimentaux s'apparentant à l'étude de son aptitude et compétence dans le domaine du bio contrôle et de colonisation rhizosphérique [8].

La pureté des souches a été vérifiée sur le milieu B de King (KB) [180] (Annexe B), en réalisant plusieurs repiquages successifs. Les souches purifiées ont été conservées à 4° C.

**Tableau. 2.1. :** Origine des souches bactériennes

| Souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Rhizosphère | Type de culture | provenance | Origine  |
|---|-------------|-----------------|------------|--|
| C7R12.                                    | Vigne.      | pérenne         | France.    | Collection du laboratoire de phytopathologie de l'université de Blida. |
| D2.                                       | Lin.        | industrielle    | France.    | Collection du laboratoire de phytopathologie de l'université de Blida  |

### 2.3. Etude de la compétence rhizosphérique

L'étude de la compétence rhizosphérique vise à évaluer les potentialités d'adaptation et de colonisation des souches bactériennes au niveau de la rhizosphère. A cet effet, un essai portant sur la mise en évidence de l'effet de la plante sur les aptitudes de deux souches bactérienne à coloniser la rhizosphère a été réalisé.

Les interactions ont été réalisées avec quatre espèces végétales composés chaque une de trois génotypes différents excepté pour l'haricot ou on a étudié deux génotypes. (Tableau. 2.2)

- Tomate (*Solanum lycopersicum* L., 1753) X ( Marmande, Saint pierre, Heinz )
- Blé dur (*Triticum turgidum* ssp. Durum (Desf.) Husn. 1899).X (Gta dur, Vitron, Waha )
- Orge (*Hordeum vulgare* L. 1753) X (Saida, Tichedrette, Rihane)
- Haricot (*Phaseolus vulgaris* L., 1753 ) X (Djadida, Contender)

Sur chaque une de ces variétés nous avons appliqué deux traitements avec les deux souches bactériennes C7R12 et D2.

**Tableau 2.2. : Espèces et variétés végétales étudiées.**

|                    |   |                                     |                                      |   |
|--------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Espèces végétales. | Tomate<br>( <i>Lycopersicum esculentum mill.</i> ). | Blé dur.<br><i>Triticum durum</i> , | Orge.<br>( <i>Hordeum vulgare.</i> ) | Haricot.<br>( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) |
| Variétés.          | Marmande.   | Gta dur.                            | Saida.                               | Djadida.                                  |
|                    | Saint pierre.                                       | Vitron.                             | Tichedrette.                         | Contender.                                |
|                    | Heinz.  | Waha.                               | Rihane.                              | /   |

### 2.3.1. Préparation du végétal

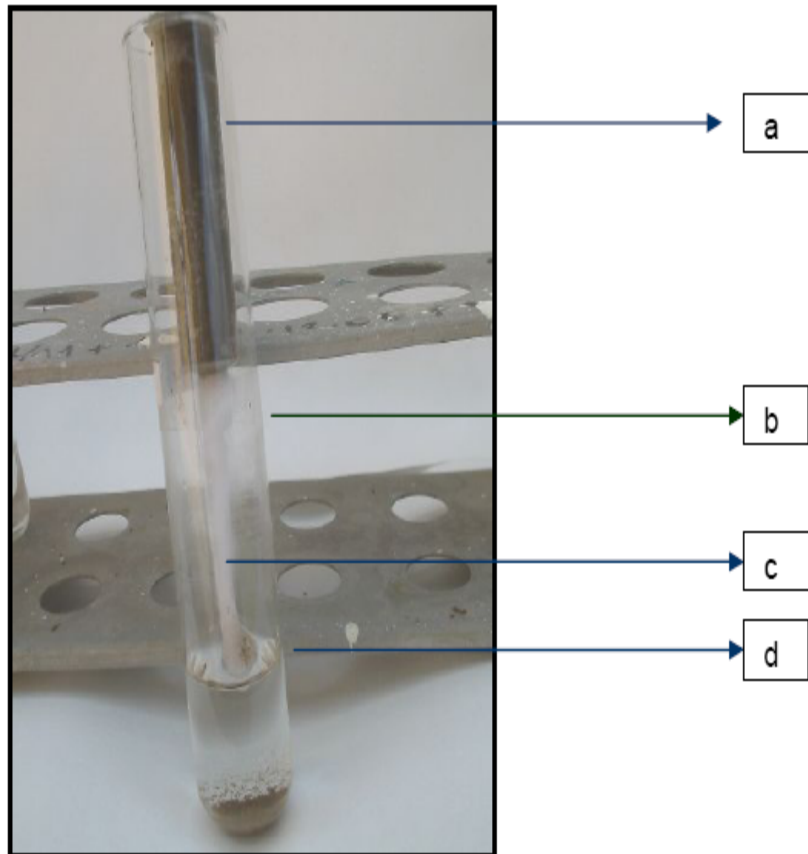
Les espèces végétales utilisées dans les essais relatives à la compétence rhizosphérique, à savoir Tomate, Blé dur, orge et haricot, ont subi une désinfection par trempage dans l'eau javellisée à 6° pendant 20 minutes, suivi de trois rinçages successifs, de 3 minutes chacun, dans de l'eau distillé stérile et séchées sur papier filtre stérile.

### 2.3.2. Microcosmes

Les essais ont été conduits dans des microcosmes conçus selon la description de Latour et al [181] (Figure. 2.1).

Le microcosme se compose de trois parties :

- Un tube à essai d'une dimension de 150mm x 25mm, contenant 20 ml d'eau stérile.
- Une seringue stérile d'un volume de 10 ml
- Une bande de tissu stérile absorbant mesurant 8 cm de long sur 2 cm de large, insérée partiellement, environ 1 cm, à la base de la seringue, qui est remplie avec 9 g de sol désinfecté, et placée dans le tube à essai.



**Figure. 2.1.** Les différents constituants du microcosme.

**(a)** : Seringue stérile contenant 10 g de sol.

**(b)** : Tube à essai d'une dimension de 150mm x 25 mm.

**(c)** : Bande de tissu mesurant 8 cm x 2 cm.

**(d)** : Niveau d'eau.

### 2.3.3. Bactérisation des microcosmes

Les graines de tomate, blé dur, orge et haricot désinfectées ont été déposées dans un tube contenant 9 g de sol et recouverts immédiatement par 1g de sol, pour avoir 10 g de sol dans chaque microcosme.

Les suspensions bactériennes des deux souches (C7R12 et D2) ont été préparées dans de l'eau distillée stérile à partir de cultures âgées de 24 heures, cultivées sur milieu B de King. La détermination de la concentration a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu), à la longueur d'onde  $\lambda = 600$  nm pour déterminer la concentration de  $10^8$  CFU / g de sol.



#### 2.3.4. Dispositif expérimental

##### 2.3.4.1. Essai de dynamique des populations bactériennes

Cet essai a été réalisé selon un dispositif expérimental en randomisation totale avec 7 répétitions pour chaque traitement (Figure. 2.2), comparant l'interaction de deux facteurs.

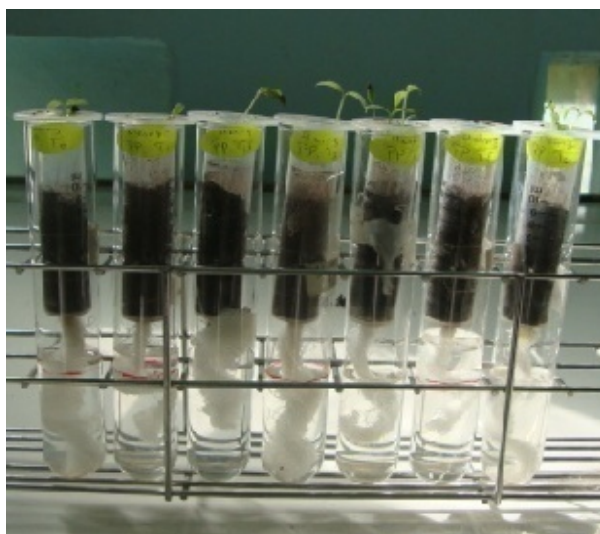
**Facteur 1** : Quartes espèces végétales Tomate, Blé dur, orge et haricot.

**Facteur 2** : Deux souches bactériennes C7R12 et D2.

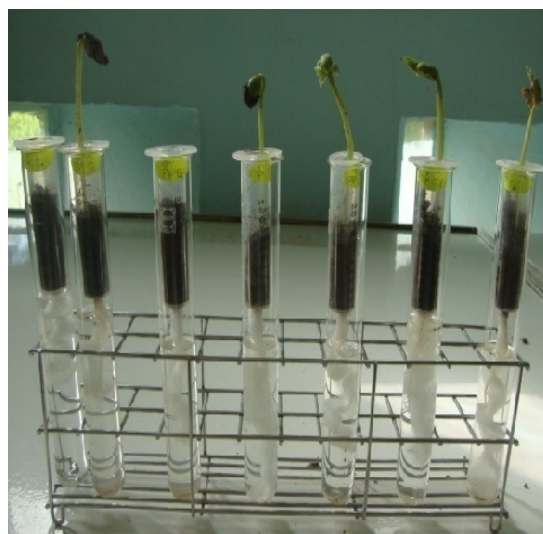
L'étude a été réalisée en quatre périodes après 15, 18, 20 et 30 jours de la bactérisation. Les 7 traitements issus de cette l'interaction sont :

**T1** : témoin positif contenant 10g de sol bactérisés respectivement par les deux souches C7R12 et D2 pour chaque traitement.

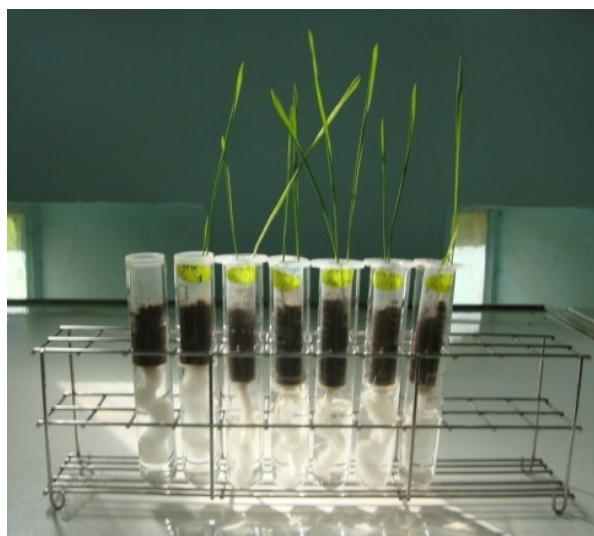
**T2 à T7** : Plants de tomate, Blé dur, orge et haricot bactérisés respectivement par les deux souches C7R12 et D2.



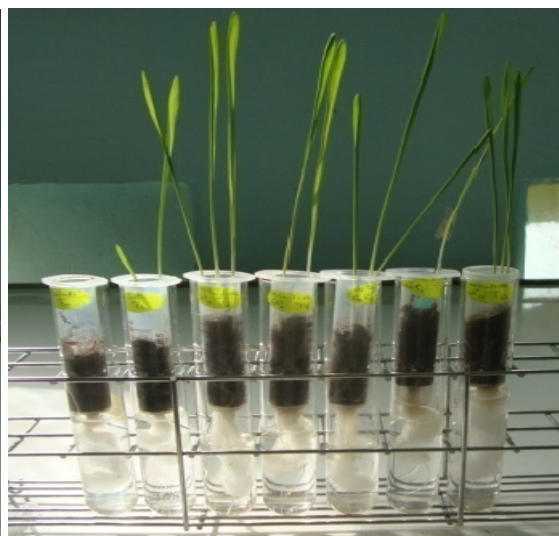
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figure. 2.2.** Dispositif expérimental de l'étude de la dynamique bactérienne.

(A) : Tomate (Marmande, s<sup>1</sup> pierre, Heinz). (B) : Haricot (Contender, Djadida).

(C) : Blé dur (Gta dur, Waha, Vitron). (D) : Orge (Tichedrette, Saida, Rohane).

#### 2.3.4.2. Dénombrement bactérien

Après avoir découpé les parties aériennes, au raz du sol, avec un scalpel désinfecté, le contenu de la seringue a été récupéré et mis en suspension dans un Erlen Meyer contenant 99 ml d'eau distillé stérile. Après homogénéisation, la suspension obtenue est mixée (mixeur Blender) pendant 5 minutes et 1ml de la mixture est déposé dans un tube à essai contenant 99 ml d'eau distillée stérile. Pour obtenir une dilution de  $10^{-10}$ .

Les opérations d'isolement pour le dénombrement ont été effectuées avec les dilutions  $10^{-10}$ , pour certains traitements avec trois répétitions pour chaque dilution.

L'ensemencement du milieu de culture B de king a été effectué avec 0.1 ml de chaque dilution, étalé à l'aide de billes en verre, ( $\varnothing$ 2 mm), sur la surface de la boîte de Pétri. L'incubation a été réalisée à 25 °C pendant 24 à 48 heures [180].

Selon le protocole de dénombrement établi au laboratoire d'écologie microbienne et pathologie des sols (UMR-INRA-Dijon-France), seul les boîtes présentant entre 30 et 600 colonies ont été retenues. Le calcul de la concentration bactérienne de la solution mère se fait selon la formule suivante :

**Concentration de la solution mère = Nombre de colonies / (Volume x dilutions).**

Les résultats obtenus ont subi une analyse de la variance et la comparaison des traitements a été effectuée selon le test kruskal wallis au seuil de risque d'erreur de 5% pour déterminer les amplitudes significatives, permettant de se prononcer sur les significations des traitements étudiées [182].

#### 2.4. Effet de la température et du pH sur la production de Sidérophores

Les conditions optimales de croissance et de production des métabolites secondaires antagonistes (Sidérophores) de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 et *Pseudomonas putida* D2 ont été contrôlé par le biais du monitoring du taux de croissance des deux souches bactériennes sur trois milieux de culture à savoir, le milieu **B de king**, et le milieu **Succinate** qui sont deux milieux de référence connu pour leurs promotion de la croissance des *Pseudomonas fluorescens* et le milieu RM « **Rhizobial minimum media** » supplémente d'urée pour lequel nous avons ajouté des éléments **minéraux** (  $\text{FeSo}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSo}_4$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{OOCCH}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , EDTA, EDTA +  $\text{FeSo}_4$ , ainsi que l'ensemble de ces éléments minéraux et ce a deux concentrations différentes a savoir 6 et 60  $\mu\text{m}$ ) Tableau 2.3.

**Tableau. 2.3.** : Composition des différents milieux de culture.

| Milieu.                | RM+ $\text{FeSo}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | RM+ $\text{CuSo}_4$ | RM+ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | RM+ $\text{Zn}(\text{OOCCH}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | RM+ EDTA | RM+ EDTA + $\text{FeSo}_4$ | RM+ L'ensemble des éléments minéraux |
|------------------------|---|---------------------|---|---|----------|----------------------------|--------------------------------------|
| [C] /150 ml de milieu. |   |                     |   |   |          |                            |                                      |
| 6 $\mu\text{m}$ .      | 0.25g   | 0.22g               | 0.18g   | 0.2g  | 0.26g    | 0.23+.0.12g                | 0.05+0.048+0.05<br>+0.04+0.05g       |
| 60 $\mu\text{m}$ .     | 2.5g  | 2.24g               | 1.86g   | 2.0g  | 2.68g    | 1.34+1.25g                 | 0.5+0.448+0.5+0.<br>402+0.536g       |

[C] : concentration

La quantité de soluté à ajouter pour constituer le milieu a été calculée comme suit pour les deux concentrations de 6 et 60  $\mu\text{m}$  :

**Concentration = nombre de moles / volume.**

Sachant que :

**Le nombre de moles = masse / masse atomique.**

Donc :

**La masse = la concentration x le volume x la masse atomique.**

#### 2.4.1. Les milieux de culture

Les souches bactériennes ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu King B solide préparé avec de l'eau distillée. Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures jeunes de 48 h, dont la crème a été récupérée et mise en suspension dans des flacons contenant de l'eau distillée stérile mis en agitation à 240 tour / minute.

La charge bactérienne de ces suspensions a été fixée à  $10^8$  CFU / ml à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu,  $\lambda = 600$  nm). Des séries de 0.1 ml de ces suspensions ont été utilisés pour inoculer dix tubes à essai contenant les différents milieux de culture et mis en incubation à 25° C pendant 48 h.

#### 2.4.2. Estimation du poids cellulaire sec

La croissance bactérienne a été estimée par turbidimétrie en utilisant un spectrophotomètre (Shimadzu) étalonné avec des cuves de 1.0 cm, contenant de l'eau distille stérile. Le poids cellulaire sec (g/L) a été estimé par la multiplication de la  $DO_{600}$  par le facteur de conversion (0.57), obtenu à partir d'une courbe standard de transformation entre le poids cellulaire sec et la  $DO_{600}$ .

Pour l'estimation du poids cellulaire sec, deux tubes à essai contenant 10 ml de milieu de culture ont été passés à travers du papier filtre whatman 0.2  $\mu\text{m}$ , dont le résidu a été séché à l'étuve à température constante de 70 °C pendant une nuit.

### 2.4.3. Test de la production des sidérophore

La quantification des sidérophore a été effectuée suivant le protocole de Meyer et Abdullah [183]. Le bouillon de culture a été centrifugé a  $6000 \times g/20$  min pour la séparation des deux phases et éliminer la phase solide. La DO du surnageant a été lue à l'aide du spectrophotomètre ( $\lambda = 400$  nm). Selon les travaux de Snow [184], et étant donné que les sidérophores produits par les deux souches testés sont de type hydroxamate positive, la concentration en sidérophore (g/L) a été calculée en utilisant l'expression suivante :

$$(\text{DO})_{400 \text{ nm}} \times \text{MW}/\epsilon$$

Sachant que  $\epsilon$  qui représente la valeur du coefficient d'extinction est égale à  $20.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et le poids moléculaire, **MW** est égale a 1500 Da.

Les cellules précipitées en amas au fond des tubes de centrifugation ont été remises en suspension dans 5 ml d'eau distillé a fin de déterminer la turbidité de la suspension et ainsi déduire le taux d'accroissement dans les différents bouillons de culture a une longueur d'onde de 600 nm.

Notons en fin que les mêmes traitements ont été effectués sur la croissance sur les deux milieux de culture de référence King B et Succinate à différentes températures (20, 25 et 30°C), et a différent pH (6, 7, et 8) sur une période s'étendant sur 7 jours.

### 2.4.3.1. Modélisation de la taille de la population bactérienne en fonction du temps en microcosme

L'équation du modèle utilisé pour estimer la taille des populations bactériennes en fonction de la quantité de substrat présente dans le sol, en interaction avec les différentes variétés végétales de tomate, de blé, d'orge et d'haricot, a été intégrée, par rapport au temps pour obtenir une prédiction des tailles de populations bactériennes sur (15, 18, 20, et 30 jours) avec les paramètres du tableau 2.4.

le déroulement mathématique de l'équation (1) donne :

$$\int_0^n dGw / dt = \mu_{\max} \frac{(Sr * Gw)}{(Sr + Ks \theta)} - Kw * Gw \quad (1)$$

$$dt * \left( \frac{dGw}{dt} \right) = \left[ \frac{(\mu_{\max} * Sr)}{(Sr + Ks \theta)} - Kw \right] * Gw * dt \quad (2)$$

$$\frac{dGw}{Gw} = \left[ \frac{Gw (\mu_{\max} * Sr)}{(Sr + Ks \theta)} - Kw \right] * dt \quad (3)$$

$$\int \frac{dGw}{Gw} = \int \left[ \frac{(\mu_{\max} * Sr)}{(Sr + Ks \theta)} \right] dt - \int Kw dt \quad (4)$$

Le remplacement des variables par leurs valeurs respectives tirés à partir de précédentes études portant sur la colonisation rhizosphérique sous conditions d'humidité constantes de 100 kPa [185] (Tableau. 2.4). Après intégration avec un solveur numérique de Runge-Kutta-Merson imbriqué d'ordre 4 et 5, sur matlab R2010a, les valeurs prédictives de la taille des populations bactériennes présentes dans les microcosmes sont obtenues.

**Tableau. 2.4.** Description des paramètres rentrant dans la constitution de l'équation modélisant la croissance bactérienne en microcosme.

| Paramètre    | Description  | Valeurs                       |
|--------------|--|-------------------------------|
| Gw           | taille prédite de la population après N jours de croissance.   |                               |
| $\mu_{\max}$ | Maximum de Croissance spécifique, déterminé en fonction de la concentration de substrat et suivant une cinétique de croissance de Monod [172]. | 0.1 / Heure.                  |
| Sr           | Concentration du substrat tout type confondu présent dans la solution su sol.  | 100 $\mu\text{g}$ .           |
| Ks           | Constante de saturation de la croissance.  | 4 $\mu\text{g} / \text{Cm}^3$ |
| $\Theta$     | Potentiel hydrique.  | 0.34.                         |
| Kw           | Constante de mort cellulaire.  | 0.05/ Heure                   |

Nous obtenons l'équation suivante :

$$\ln Gw = \int 0.098 dt - \int 0.05 dt \quad (5)$$

$$e^{\ln Gw} = e^{0.098 t} - e^{0.05 t} \quad (6)$$



### 2.4.3.2. Modélisation de la taille de la population bactérienne et de la production de sidérophores en croissance en milieu liquide

Afin de modéliser la croissance bactérienne, une équation logistique (1') indépendante du substrat est utilisée :

Ainsi :

$$\int_0^n d x / d t = \mu m \left( 1 - \frac{x}{x m} \right) * x \quad (1')$$

Ou :

X : poids cellulaire sec ( $\mu\text{g/l}$ ).

$\mu m$  : Maximum de Croissance spécifique.

Xm : maximum de poids cellulaire sec ( $\mu\text{g/l}$ ).

X0 : poids cellulaire sec initial ( $\mu\text{g/l}$ ).

L'intégration de l'équation (1') avec  $x = x_0$  et ( $t = 0$ ), donne la variation sigmoïdale de la masse microbienne prédite en fonction du temps, comme cela est indiqué par l'équation (2') ci-dessous :

$$x = \frac{x e^{\mu m t}}{\left[ 1 - \left( \frac{x_0}{x m} \right) * (1 - e^{\mu m t}) \right]} \quad (2')$$

Le remplacement des variables par leurs valeurs respectives tirés de l'étude précédente menée en microcosmes, en considérant le poids de 1 cellule bactérienne comme l'équivalent d'un poids de 1pg. Nous calculons le poids cellulaire sec inoculé initialement dans les tubes a essai ainsi que le maximum de poids cellulaire sec obtenu à partir des résultats de l'expérimentation mené sur microcosmes avec un taux de croissance maximum spécifique de l'ordre de 0.1.

Nous intégrons l'équation (2') avec un solveur numérique de Runge-Kutta-Merson imbriqué d'ordre 4 et 5, sur matlab R2010a qui nous donne des valeurs prédictives sur la densité des populations bactériennes présentes en croissance dans les milieux de culture sur une période de 24h de croissance.

Pour la cinétique de formation de métabolites secondaires « sidérophores » l'équation (3') basée sur l'équation de Luedeking–Piret, qui a été développée pour la prédiction de la production de l'acide lactique par la bactérie *Lactobacillus delbrueckii* [186] a été utilisée.

Ainsi, l'intégration de l'équation (3') en utilisant les termes de l'équation (2') pour  $X(t)$ , avec  $P=0$  à  $T=0$ , donne le profil de formation du produit en fonction du temps comme indiqué par l'équation (4') :

$$\int_0^t dP / dt = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x \quad (3')$$

$$P = \alpha x_0 \left[ \frac{e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{x_0}{xm}\right) * (1 - e^{\mu t})} - 1 \right] + \frac{\beta xm}{\mu} * \log \left[ 1 - \frac{x_0}{xm} (1 - e^{\mu t}) \right] \quad (4')$$

Ou :

$P$  = Concentration du produit prédit (g/l).

$\alpha$  = Coefficient de croissance associé à la formation du produit (sans unité),

$\beta$  = coefficient associé a la production de métabolite non associés à la formation de croissance. ( $h^{-1}$ ).

En ce qui concerne la résolution mathématique de l'équation (4'), la même procédure que celle utilisée pour résoudre les équations (6) et (2') a été utilisée.

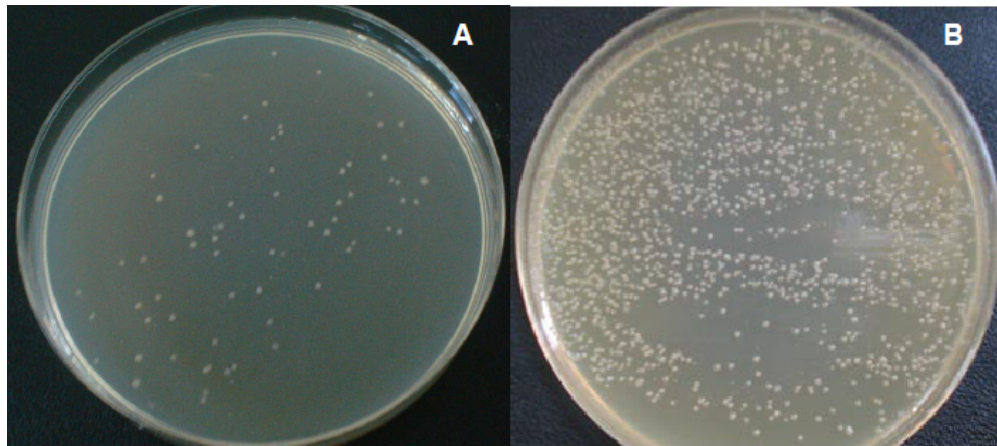
## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET INTERPRETATIONS

#### 3.1. ETUDE DE LA COMPETENCE RHIZOSPHERIQUE

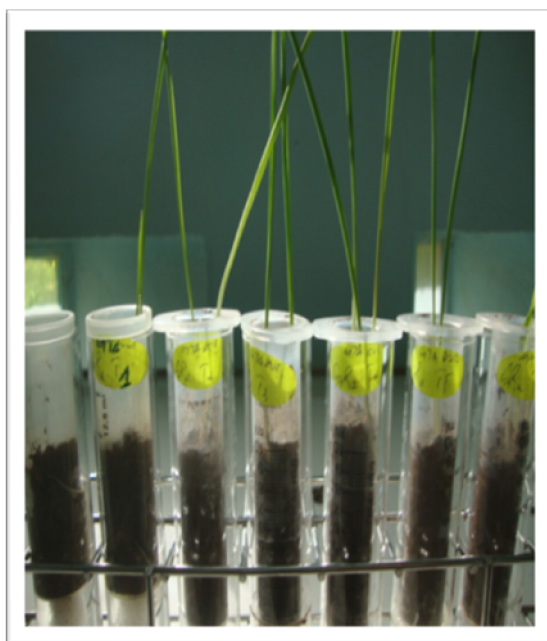
##### 3.1.1. Dénombrement bactérien

En suivant le protocole de dénombrement établi au laboratoire d'écologie microbienne et pathologie des sols (UMR-INRA-Dijon-France), nous avons sélectionné les boîtes présentant entre 30 à 600 colonies (Figure. 3.1).

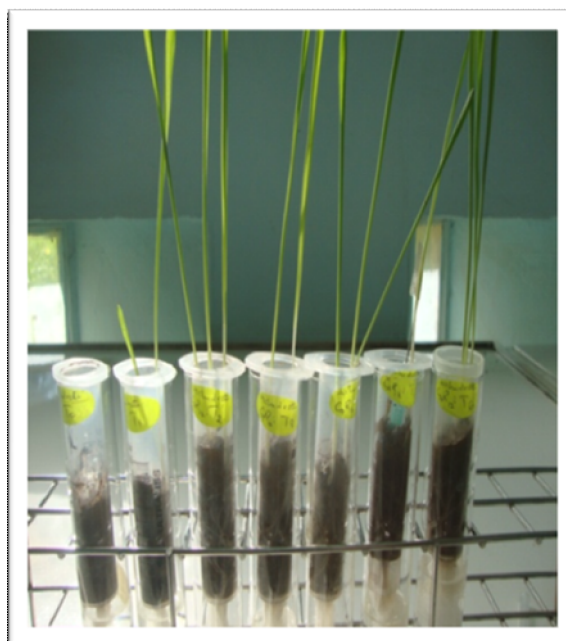


**Figure. 3.1.** Boîtes présentant des colonies bactériennes sur le milieu King B après 24 heures d'incubation. (A : boîte contenant plus de 30 colonies ; B : boîte contenant moins de 600 colonies).

Les dénombrements ont été respectivement réalisés, après 15, 18, 20, et 30 jours du semis pour les 4 genres végétaux étudiés (Blé dur, Orge, Haricot et Tomate). Ainsi les résultats obtenus pour les 11 génotypes cultivés en microcosme son



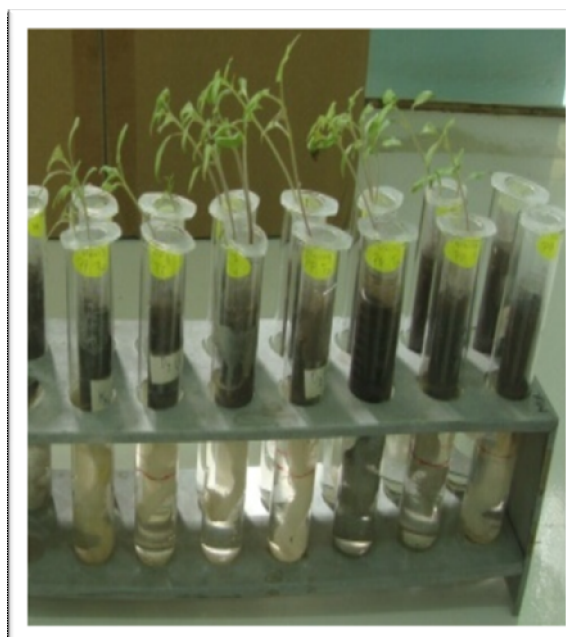
(a)



(b)



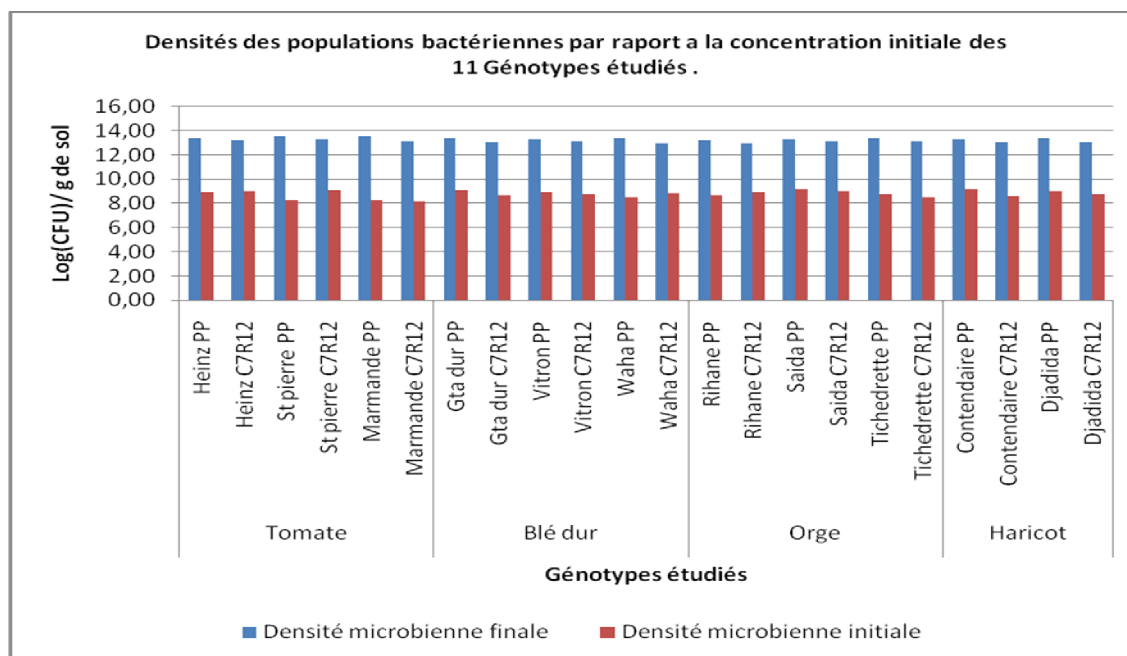
(c)



(d)

**Figure. 3.2.** Croissance des différents génotypes étudiés en microcosmes : (a) Blé dur, (b) Orge, (c) Haricot, (d) Tomate, après une durée de 15, 18, 20, et 30 jour du semis et de la bactérisation.

Les résultats du dénombrement ont donné lieu à des cultures très denses variant de 30 à 600 colonies par boîte de Pétri. La transformation logarithmique de ces résultats a montré une nette évolution des populations bactériennes par rapport aux apports initiaux de ( $10^8$  CFU/ g de sol) (Figure. 3.3).



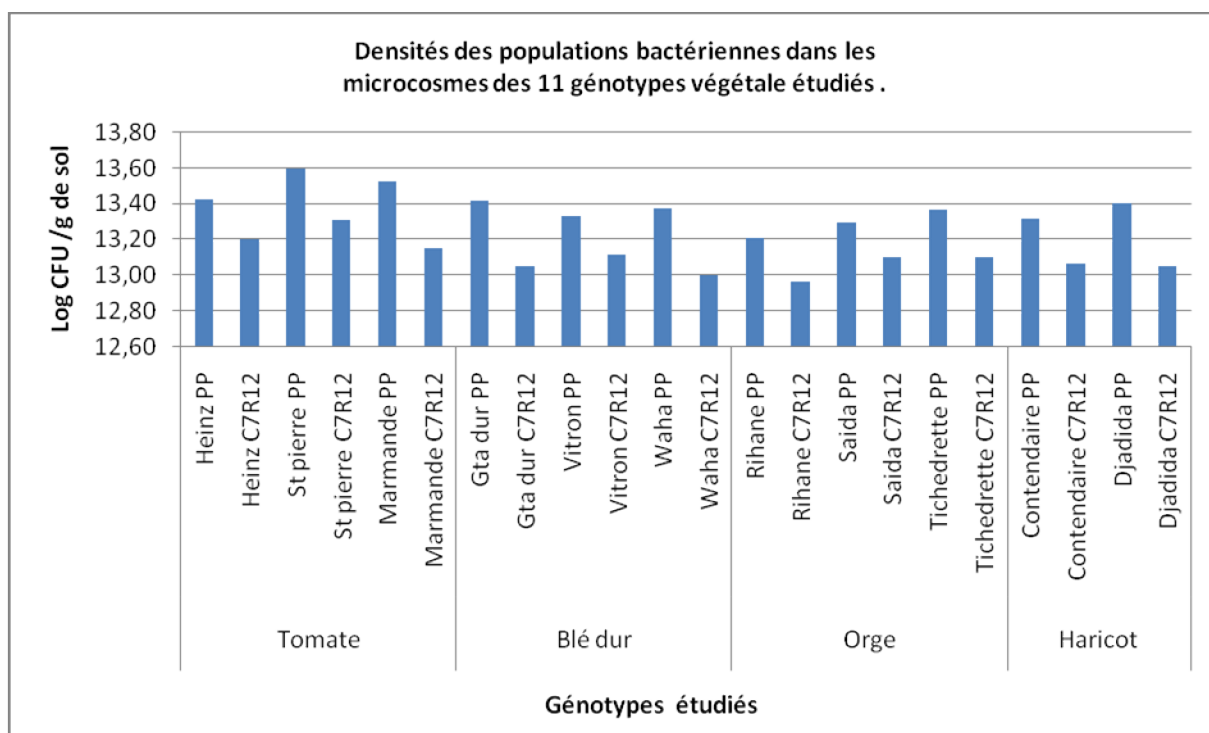
**Figure. 3.3.** Densités des populations bactériennes dans les microcosmes des 11 génotypes étudiés.

Pour les 3 variétés de tomate, ayant la plus longue période de croissance, nous avons relevé des tailles de populations importantes atteignant  $10^{13}$  CFU/g de sol ; avec un pic de colonisation de l'ordre de  $3,96 \cdot 10^{13}$  CFU/g de sol pour la variété s<sup>t</sup> pierre inoculée avec la souche *Pseudomonas putida* D2 (Figure. 3.4).

Pour les variétés de Blé dur, nous avons observé une nette progression de la taille des populations bactériennes initiales, qui après 18 jours de croissance ont atteint des tailles moyennes de l'ordre de  $10^{13}$  CFU/g de sol; avec un maximum de  $2,6 \cdot 10^{13}$  CFU/g de sol pour la souche *Pseudomonas putida* D2 inoculée sur la variété de blé dur (Gta), et un minimum de  $9,96 \cdot 10^{12}$  CFU/g de sol avec le génotype Waha inoculé par la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (Figure : 3.4).

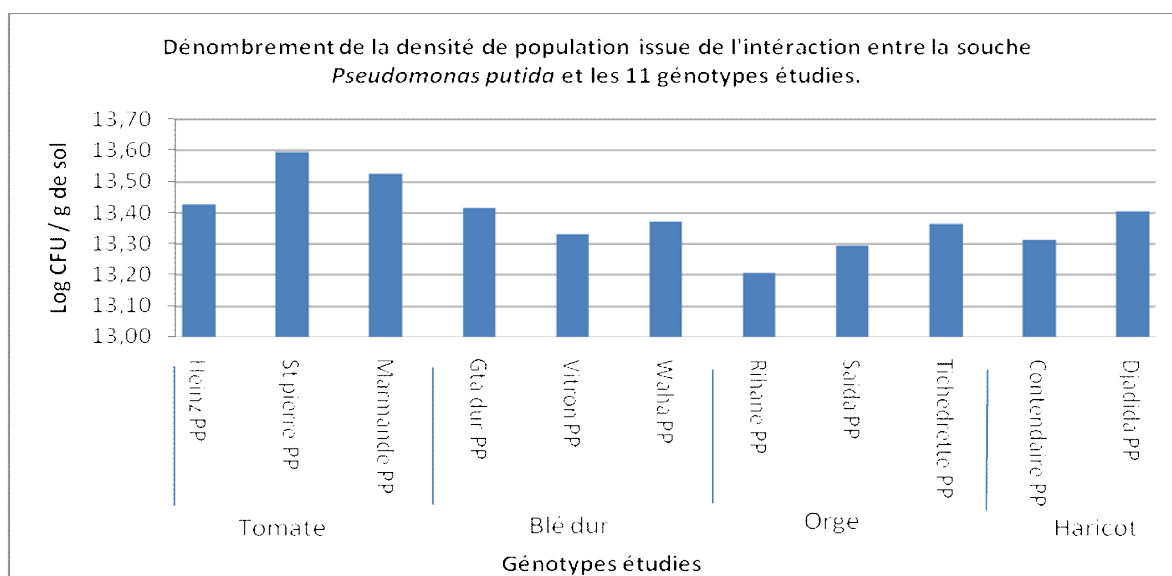
Pour les géotypes d'orge, nous avons relevé des tailles de populations moyennes de l'ordre de  $10^{13}$  CFU/g de sol, avec une densité maximale de  $2.32 \cdot 10^{13}$ . Pour la variété Tichedrette inoculée par la souche *Pseudomonas putida* D2, et un minimum de  $9.25 \cdot 10^{13}$  CFU/g de sol pour la variété Rihane inoculée avec *Pseudomonas fluorescens* C7R12. (Figure. 3.4).

Notons en fin, que pour les deux géotypes d'haricot, la même moyenne en densités de populations a été atteinte après 25 jours de croissance avec respectivement un maximum de  $2,54 \cdot 10^{13}$  CFU/g de sol et un minimum de  $1,13 \cdot 10^{13}$  pour la même variété Djadida inoculée avec *Pseudomonas putida* D2 et *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (Figure. 3.4).

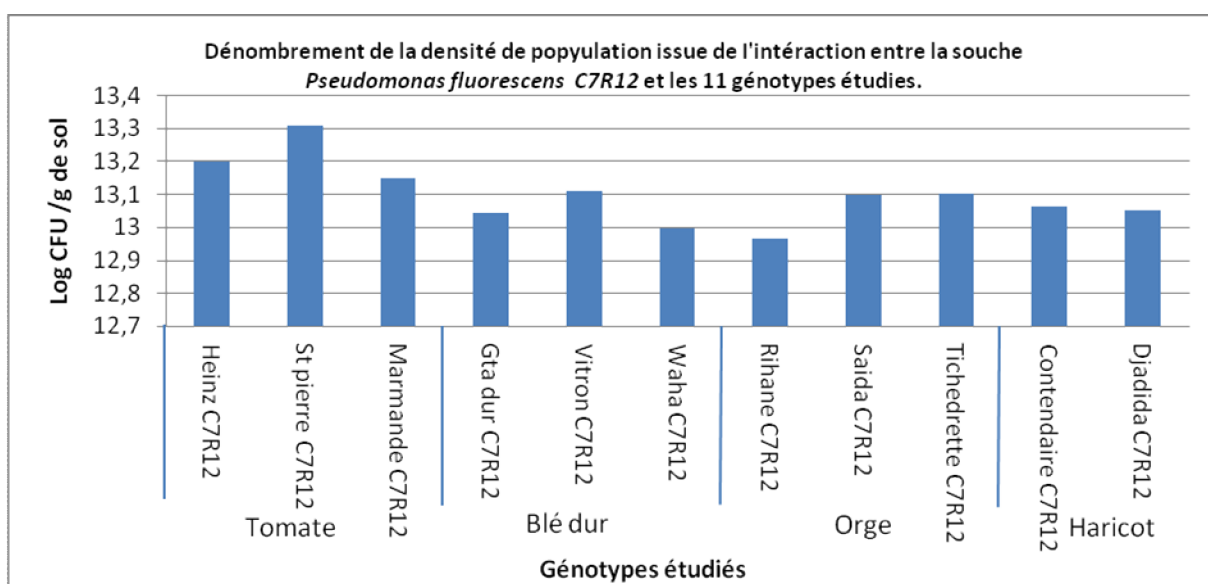


**Figure. 3.4.** Densité des populations bactériennes dans les microcosmes des 11 géotypes étudiés.

La comparaison du potentiel de colonisation des deux souches utilisées dans notre expérimentation, montre une différence quantitative de colonisation. Ainsi, la souche *Pseudomonas putida* D2 a montré une meilleure compétence rhizosphérique par rapport à la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (Figure. 3.5 ; 3.6).



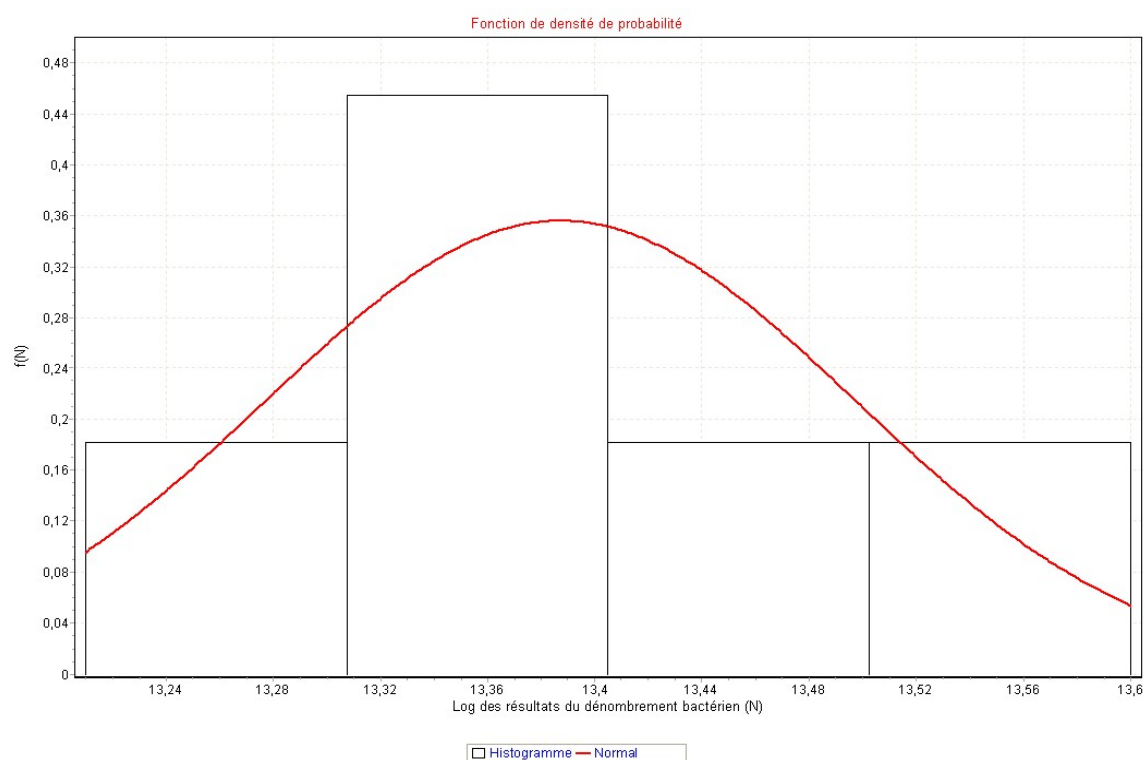
**Figure. 3.5.** Densité de population atteinte après 15, 18, 20 et 30 jours de croissance pour les géotypesensemencés avec la souche *Pseudomonas*



**Figure. 3.6.** Densités de populations atteintes après 15, 18, 20 et 30 jours de croissance pour les géotypesensemencés avec la souche *Pseudomonas fluorescens C7R12*

### 3.1.2. Interprétation statistique

L'application d'un test d'adéquation sur les résultats du dénombrement des 11 Génotypes étudiés, en interaction avec les deux souches bactériennes, ont montré que les données de la densité des populations logarithmiquement transformées suivait une distribution normale. Le test d'hypothèses d'égalité des variances estimées par trois tests d'ajustement acceptent l'adéquation à différents seuil de signification (Tableau. 3.1 & Figure. 3.7).



**Figure. 3.7 .** Distribution normale des résultats logarithmiques de la densité de population finale des 11 microcosmes en interaction avec les deux souches bactériennes.



**Tableau. 3.1.** Qualité d'ajustement des données logarithmiquement transformés de la densité de population obtenu après dénombrement, par trois tests d'ajustement statistiques.

| <b>Normal</b>           |         |         |         |        |        |
|-------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|
| Kolmogorov-Smirnov      |         |         |         |        |        |
| Taille de l'échantillon | 11      |         |         |        |        |
| Statistique             | 0,16608 |         |         |        |        |
| Valeur de P             | 0,8744  |         |         |        |        |
| Rang                    | 37      |         |         |        |        |
| $\alpha$                | 0,2     | 0,1     | 0,05    | 0,02   | 0,01   |
| Valeur critique         | 0,30829 | 0,35242 | 0,39122 | 0,4367 | 0,4677 |
| Rejeter?                | Non     | Non     | Non     | Non    | Non    |
| Anderson-Darling        |         |         |         |        |        |
| Taille de l'échantillon | 11      |         |         |        |        |
| Statistique             | 0,23596 |         |         |        |        |
| Rang                    | 33      |         |         |        |        |
| $\alpha$                | 0,2     | 0,1     | 0,05    | 0,02   | 0,01   |
| Valeur critique         | 1,3749  | 1,9286  | 2,5018  | 3,2892 | 3,9074 |
| Rejeter?                | Non     | Non     | Non     | Non    | Non    |
| Khi-Carré               |         |         |         |        |        |
| Degrés de liberté       | 1       |         |         |        |        |
| Statistique             | 0,04554 |         |         |        |        |
| Valeur de P             | 0,83102 |         |         |        |        |
| Rang                    | 4       |         |         |        |        |
| $\alpha$                | 0,2     | 0,1     | 0,05    | 0,02   | 0,01   |
| Valeur critique         | 1,6424  | 2,7055  | 3,8415  | 5,4119 | 6,6349 |
| Rejeter?                | Non     | Non     | Non     | Non    | Non    |

L'application d'un test d'homogénéité (ANOVA 1 FACTEUR) aux résultats issus du dénombrement bactérien, associé à un test Post Hoc de *Bonferroni* au seuil de signification de 5%, ayant pour but de mettre en évidence les différents sous ensembles homogènes constituant les échantillons de petite taille. Ces tests ont donné des résultats hautement significatifs (Appendice (C) Tableau. 1), pour l'effet des deux souches bactériennes qui ont été classées en deux groupes homogènes (1 et 2) (Appendice (C) Tableau 3.3).

Ainsi, les interactions «*Pseudomonas putida* (PP) X Tomate, Orge, Blé dur et Haricot », formant le groupe homogène (1), ont montré les niveaux de colonisation les plus élevés, avec des concentrations atteignant un maximum avoisinant les  $4 \times 10^{13}$  CFU/ g de sol avec une moyenne de rang de 13.38. Tableau 3.3.

Le groupe homogène (2), regroupe les traitements effectués par la souche «*Pseudomonas fluorescens* (C7R12) X Tomate, Orge, Blé dur et Haricot », ont montré à leurs tour des concentrations bactérienne variant entre  $10^{12}$  à  $10^{13}$  CFU/g de sol correspondant a des moyennes de rang d'environ 13.1. (Appendice (C) Tableau. 2).

L'essai de détermination d'un éventuel effet variétale sur les concentrations finale des souches bactériennes inoculées a donné deux effets non significatifs avec des niveaux de signification respective de l'ordre de 0.234 et 0.904. (Appendice (C) Tableaux 3.4).

Ces résultats indiquent l'absence d'effet inter ou intra spécifique entre les 4 genres végétaux étudiés et les 11 génotypes expérimentés, en fonction des résultats logarithmiques des densités microbiennes finales.

### 3.2. DISCUSSION

Au cours de notre expérimentation, les effets des deux souches bactériennes en interaction avec onze génotypes, appartenant à 4 genres végétaux différents ont été étudiés. Les dénombrements effectués sur microcosmes ont révélé une bonne colonisation des systèmes racinaires, se traduisant par une compétence rhizosphérique appréciable des deux souches bactériennes *Pseudomonas putida* D2 et *Pseudomonas fluorescens* C7R12, initialement inoculés à une concentration de  $10^8$  CFU/g de sol dans les microcosmes. Les deux bactéries testées ont montré une grande capacité de colonisation du système racinaire, avec des densités moyennes de colonisation de l'ordre de  $10^{13}$  CFU / g de sol, traduisant une activité microbienne très intense en "microcosme" et dans les micro-agrégats du sol.

Selon les concentrations finales obtenus, nous pouvons conclure de la réussite de la colonisation vu que selon Scher et al, [187] un seuil de  $5.10^3$  CFU / g de sol constitue un bon indice de la réussite de la colonisation racinaire. La comparaison des niveaux de colonisation des deux souches bactériennes étudiés a montré, l'existence de différences significatives dans le potentiel de colonisation des deux souches. Ainsi nous avons d'une manière générale

observée une meilleure colonisation des microcosmes inoculés par la souche *Pseudomonas putida* D2 en comparaison avec la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (Appendice (C) C, tableau. 2) Ces différences sont considérés comme étant normales, étant donné que d'après Lemenceau [8], la compétence rhizosphérique des *Pseudomonas* spp. fluorescents varie d'une souche à l'autre, du fait de l'existence de certaines différences dans le potentiel de colonisation des racines et dans leurs capacité de maintenir les populations en forte densités dans le sol [188].

Les résultats des tests d'homogénéité ont indiqués l'existence d'un effet "souche" significatif, indiquant une différence entre les deux souches pouvant être expliqués par l'existence de traits génétiques, biochimiques et physiologiques intrinsèques aux souches, leurs conférant différents niveaux de rhizocompétence. L'influence de l'origine écologique sur l'expression et la stabilité des effets bénéfiques des souches bactériennes a été signalée par plusieurs auteurs [189, 190]. Ainsi, les travaux menés par Chennaoui, [191] et Ousrir, [192] en conditions d'expérimentation contrôlées, ont soulevé le problème de l'origine géographique, en démontrant des différences de performances vis-à-vis la promotion de certains paramètres de croissance et de rendement se traduisant par des densités de populations différentes chez diverses plantes cultivées en réponse à l'inoculation avec des souches bactériennes d'origines diverses [CHAO "Suisse"], [P64 (Mitidja) et S20 (ghardaïa), "Algérie"]. [193, 194, 195].

Les deux souches *Pseudomonas putida* D2 et *Pseudomonas fluorescens* C7R12 ; originaire de France, ont été respectivement isolés a partir d'un sol suppressif à vocation vitivinicole "Châteaurenard", et d'un sol abritant une culture de lin [9]. Les fluctuations de densité de populations observées dans notre expérimentation entre les différentes interactions étudiées, peuvent être expliqués par la capacité d'accueil de la rhizosphère ; qui selon le couple (sol X végétale) peuvent avoir un effet sur la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents [196,197].

La variation de la nature qualitative et quantitative de la matière organique exsudée varie donc, en fonction des espèces végétales considérées et

dépendent en partie des racines (phénologie, anatomie, morphologie, composition chimique, environnement et état sanitaire de la plante). Les analyses statistiques, n'ont montré aucun effet variétal significatif à l'issue du test de la variance à un facteur calculé au seuil de signification de 5%, indiquant un effet mineur des rhizodépôts sur la densité bactérienne finale estimée pour les 11 génotypes étudiés.

Un autre facteur pouvant expliquer ces densités de population élevée, est la composition des milieux de culture utilisés en laboratoire pour préparer les inocula qui selon Fuchs et al. [198], ont des effets significatifs sur le potentiel des souches de *P. fluorescens*. Ainsi, l'exposition des souches bactériennes au stress oxydatif en boîtes Pétri, est similaire à l'action qu'exerce les anions super oxyde et peroxyde d'hydrogène générés par la peroxydase membranaire des racines sur les parois bactériennes. De ce fait, il a été démontré l'existence d'une relation entre le potentiel de colonisation des souches bactériennes cultivés *in vitro*, et l'osmotolérance qui confère aux bactéries colonisatrices du système racinaire la capacité de persister et de coloniser efficacement le rhizoplan [69]. Étant donné que nous n'avons pas utilisé des d'antioxydants et autres pièges à radicaux libres dans nos milieux de culture, il se pourrait que nos inocula ait été positivement stimulé en faisant en sorte d'adapter leurs physiologie à leurs nouvel environnement, sans pour autant perdre leurs capacité de former des colonies qui est considéré comme étant un fait extrême causé par l'exposition de ces souches à un stress oxydatif violent et extrême en boîtes de Pétri [199, 70].

D'une manière générale, la synthèse de lipopolysaccharides, d'acides amines, de vitamines, d'acides organiques, l'AIA, l'HCN, les antibiotiques, les sidérophores, et les métabolites volatiles signal (HSL) rentrant dans le conditionnement du quorum sensing qui est un système de détection et de régulation des différents traits cités ci-dessus, permettant aux souches bactériennes de se reproduire et de se maintenir à des taux de croissance. Par conséquent une augmentation de l'activité métabolique de plusieurs types de rhizodépôts riches en hydrates de carbone [200, 201, 202]

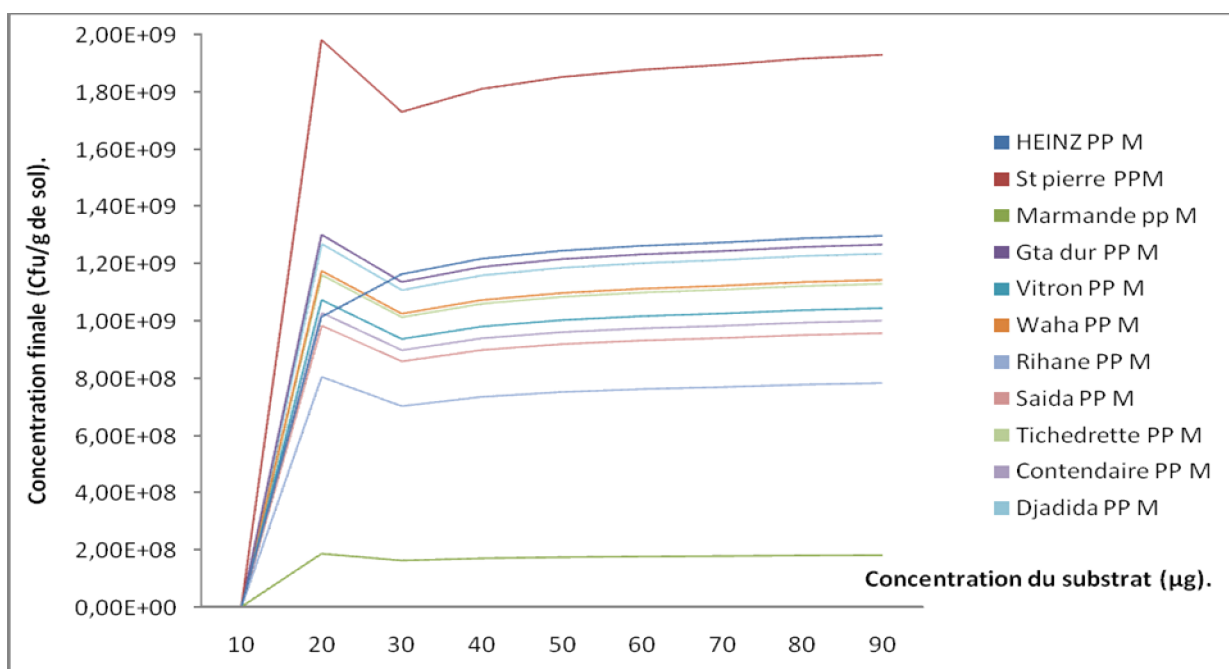
### 3.3. Modélisation de la biomasse en fonction du substrat et du temps

#### 3.3.1. Estimation de la concentration bactérienne en fonction du substrat

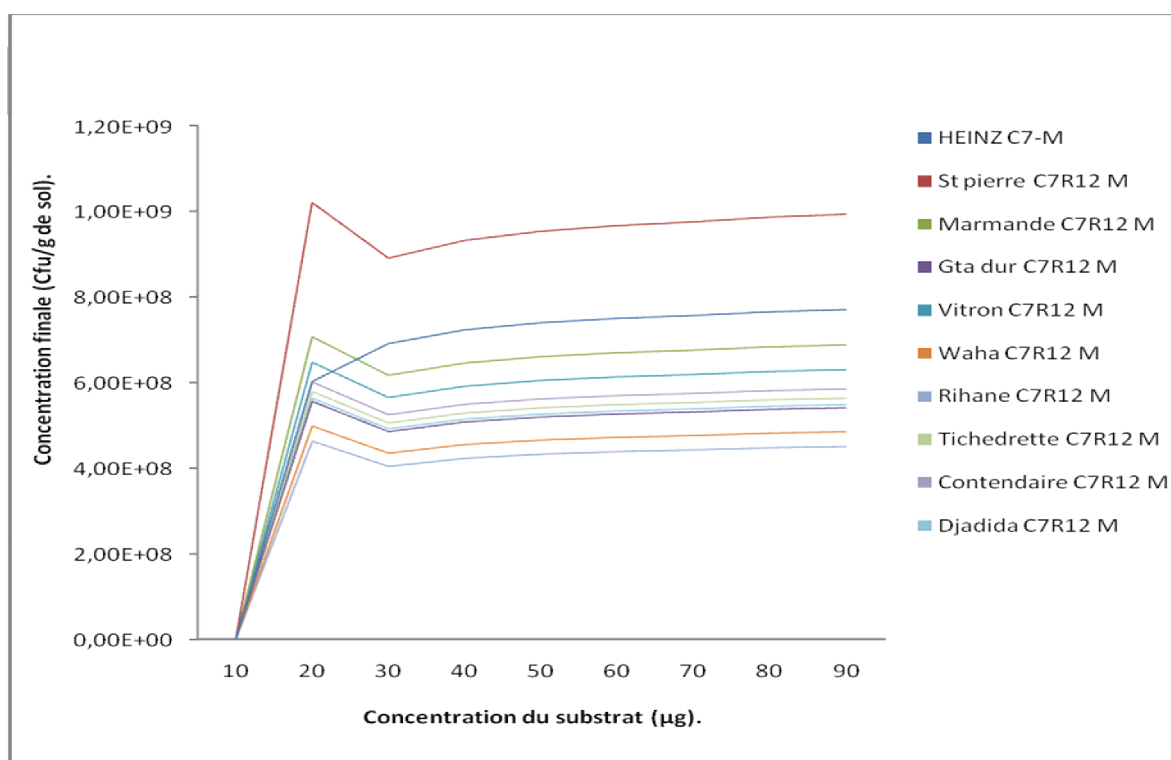
La modélisation de la croissance bactérienne en fonction de la composition du substrat (sol), indique à un niveau interspécifique l'existence d'un schéma d'évolution caractérisant les deux souches bactériennes étudiés. Ainsi, les sorties du model montrent clairement que la souche *Pseudomonas putida* D2 et *Pseudomoas fluorescens* C7R12 se comportent de manière similaire, reflétant la modélisation mathématique de la croissance bactérienne en terme absolu.

Selon l'équation (1) (c.f, P. 39), utilisé dans le modèle pour estimer la dynamique des populations microbiennes, nous avons observé quelques légères fluctuations tout au long de l'axe de l'abscisse (10 à 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ). Le modèle a prédit pour les deux souches (D2) et (C7R12), un grand pic de croissance aux alentours de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de substrat correspondant à des tailles de populations respectives de l'ordre de :

- (1,01E+09, 1,98E+09, 1,86E+08) et (1,01E+09, 1,98E+09, 1,86E+08) CFU/g de sol, pour les variétés de tomate Heinz, s<sup>t</sup> pierre et Marmande
- (1,30E+09, 1,07E+09, 1,17E+09) et (1,30E+09, 1,07E+09, 1,17E+09) CFU/g de sol, pour les variétés de blé dur, Gta, Vitron , Waha
- (8,03E+08, 9,83E+08, 1,16E+09) et (8,03E+08, 9,83E+08, 1,16E+09) CFU/g de sol pour les différentes variétés d'orge, Rihane, Saida, Tichedrette.
- (1,03E+09, 1,27E+09) et (1,03E+09, 1,27E+09) CFU/g de sol, pour les variétés d'haricot Contender et Djadida. (Figure. 3.8 ; 3.9).



**Figure. 3.8.** Estimation de la dynamique de croissance de *Pseudomonas putida* D2 en interaction avec les différentes variétés végétales étudiées en fonction de la concentration du substrat dans le sol.



**Figure. 3.9.** Estimation de la dynamique de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 en interaction avec les différentes variétés végétales étudiées en fonction de la concentration du substrat dans le sol.

Passé le pic de  $20\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , nous observons une tendance générale à la diminution des tailles des populations bactériennes qui atteignant pour la souche (D2) et (C7R12) des minimums respectives de l'ordre de :

- ( $1,16\text{E}+09$ ,  $1,16\text{E}+09$ ,  $1,73\text{E}+09$ ,  $1,62\text{E}+08$ ,  $1,14\text{E}+09$ ,  $9,36\text{E}+08$ ,  $1,02\text{E}+09$ ,  $7,01\text{E}+08$ ,  $8,57\text{E}+08$  CFU/g de sol), pour les précédentes variétés citées dans l'ordre (Figure : 3.8).
- ( $6,91\text{E}+08$ ,  $8,91\text{E}+08$ ,  $6,17\text{E}+08$ ,  $4,85\text{E}+08$ ,  $5,65\text{E}+08$ ,  $4,35\text{E}+08$ ,  $4,04\text{E}+08$ ,  $5,05\text{E}+08$ ,  $5,25\text{E}+08$  CFU/g de sol), pour les variétés précédentes citées dans l'ordre (Figure. 3.9).

Notons en fin, qu'à partir de  $30\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , nous observons pour les deux souches (D2) et (C7R12), une augmentation progressive pour toutes les variétés étudiées, qui à partir de  $40^{\text{e}}$  et  $50\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de concentration de substrat, se stabilisent à des tailles de populations moyennes de l'ordre de :

- ( $1,26\text{E}+09$ .  $1,88\text{E}+09$ .  $1,76\text{E}+08$ .  $1,23\text{E}+09$ .  $1,02\text{E}+09$ .  $1,11\text{E}+09$ .  $7,62\text{E}+08$ .  $9,32\text{E}+08$ .  $1,10\text{E}+09$ .  $9,74\text{E}+08$ .  $1,20\text{E}+09$  CFU/g de sol) pour les précédentes variétés citées dans l'ordre (Figure : 3.8).
- ( $7,51\text{E}+08$ .  $9,68\text{E}+08$ .  $6,70\text{E}+08$ .  $5,27\text{E}+08$ .  $6,14\text{E}+08$ .  $4,72\text{E}+08$ .  $4,39\text{E}+08$ .  $1,26\text{E}+10$ .  $5,49\text{E}+08$ .  $5,34\text{E}+08$  CFU/g de sol) pour les variétés précédentes citées dans l'ordre (Figure : 3.9).

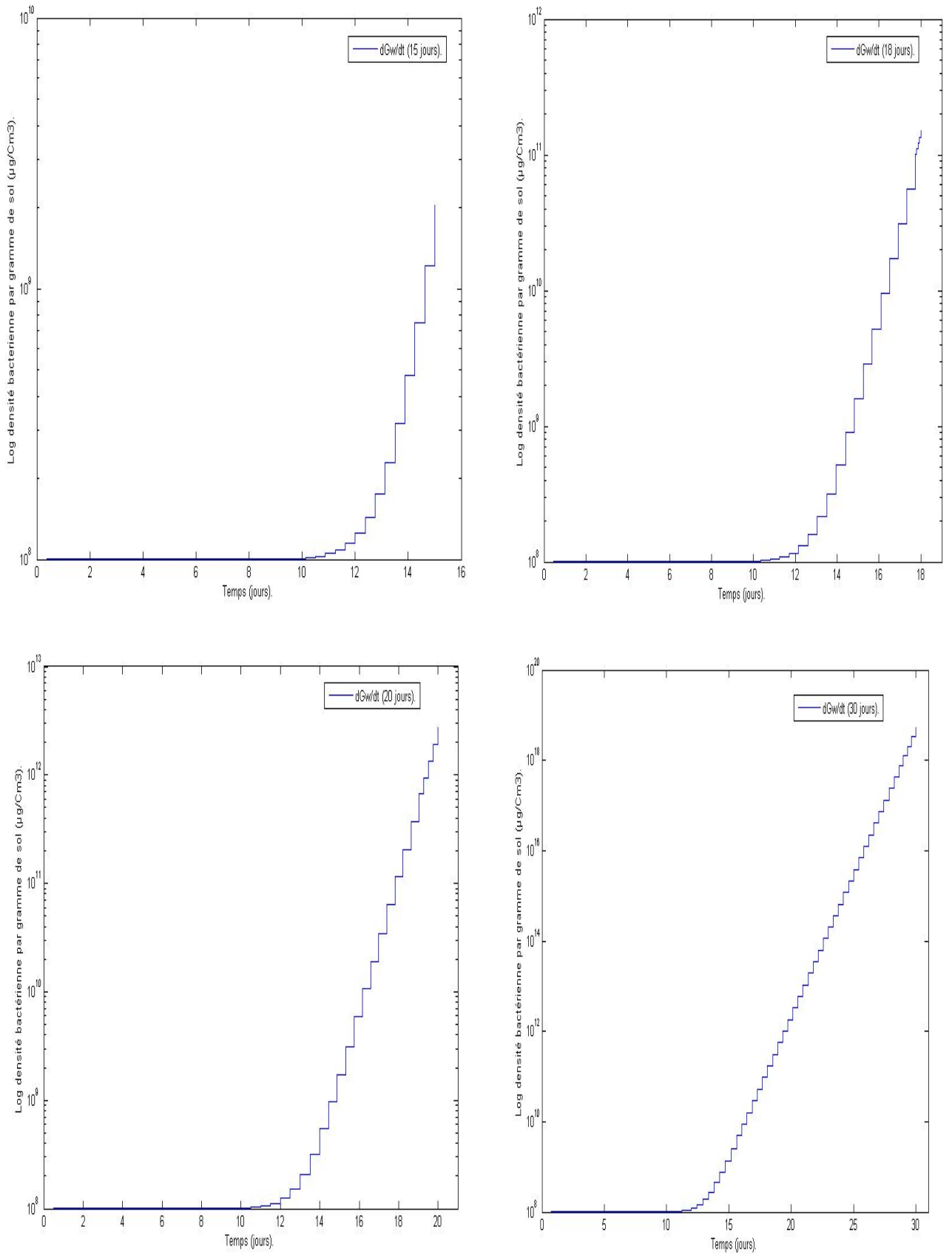
### 3.3.2. Modélisation de la taille de la population bactérienne en fonction du temps

Sur un l'intervalle de 30 jours distribués sur en 4 phases de [0, 15], [0, 18], [0, 20], et [0, 30] jours, l'intégration de l'équation (1) a estimé des tailles de populations bactériennes finales respectives de  $2,02 \cdot 10^9$ ,  $1,5 \cdot 10^{10}$ ,  $2,71 \cdot 10^{12}$  et,  $5,37 \cdot 10^{18} \mu\text{g}/\text{cm}^3$  (Figure. 3.10).

Ces valeurs ont été sous estimés pour la prédiction faite pour 15 jours de croissance et sur estimés pour les intervalles de [0,18], [0,20] et [0,30]. Ainsi les résultats obtenus expérimentalement en croissance dans microcosme, ont donné pour les précédent intervalles des valeurs de densités de population respectives de l'ordre de :

- ( $4,82 \cdot 10^{10}$  ,  $5,36 \cdot 10^{10}$  ,  $3,32 \cdot 10^{10}$  ,  $8,22 \cdot 10^{10} \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) pour la souche *Pseudomonas putida* D2
- ( $2,72 \cdot 10^{10}$  ,  $2,66 \cdot 10^{10}$  ,  $1,73 \cdot 10^{10}$  ,  $3,98 \cdot 10^{10} \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) pour la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12.





**Figure. 3.10.** Estimation de concentration bactérienne par gramme de sol en fonction du temps (15,18, 20 et 30 jours).

La qualité d'ajustement entre les données expérimentales et les probabilités de prédiction des valeurs établis par le modèle, indiquent une bonne qualité d'ajustement par rapport a la distribution normale (Figure. 3.11), indiquant que les valeurs prédites par le modèle suivent une distribution linéaire expliquant 83% de la variance globale pour les valeurs variant entre 0 et  $2 \cdot 10^{12}$ . (Appendice (C) C, Tableau. 5).Dépassé ce seuil, les valeurs prédites suivent une distribution autre que normale. Vu que les valeurs de densité de population prédite suivent un schéma spécifique indiquant la probable existence d'une relation hautement significative (Quadratique) (Appendice (C) C, Tableau. 6), pouvant mieux rendre compte de la variabilité globale comparée à la relation linéaire (Figure. 3.12 ; Figure. 3.13 annexe).

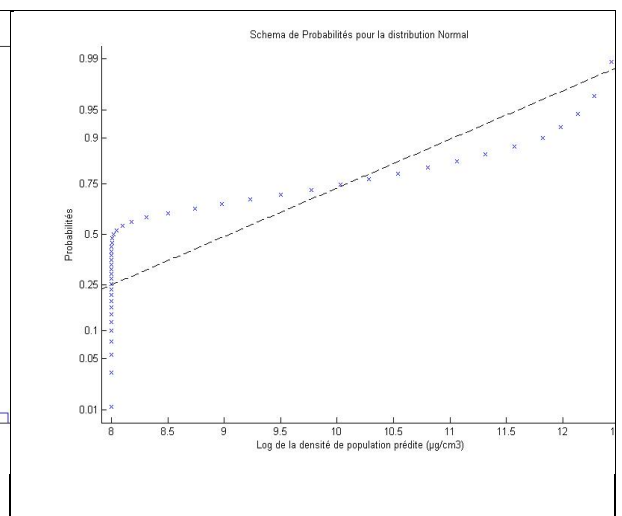
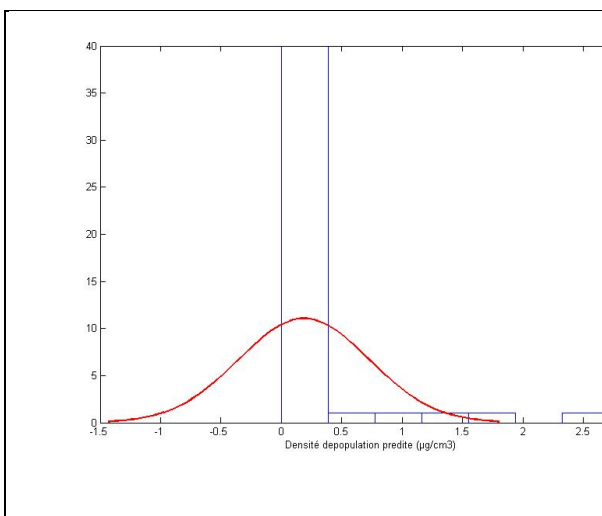


Figure. 3.11 . Distribution et qualité d'ajustement des données prédites par rapport au temps en distribution normale.

Figure. 3.12 . Qualité d'ajustement des probabilités de réalisation des données prédites par rapport au temps vis-à-vis des données expérimentales.

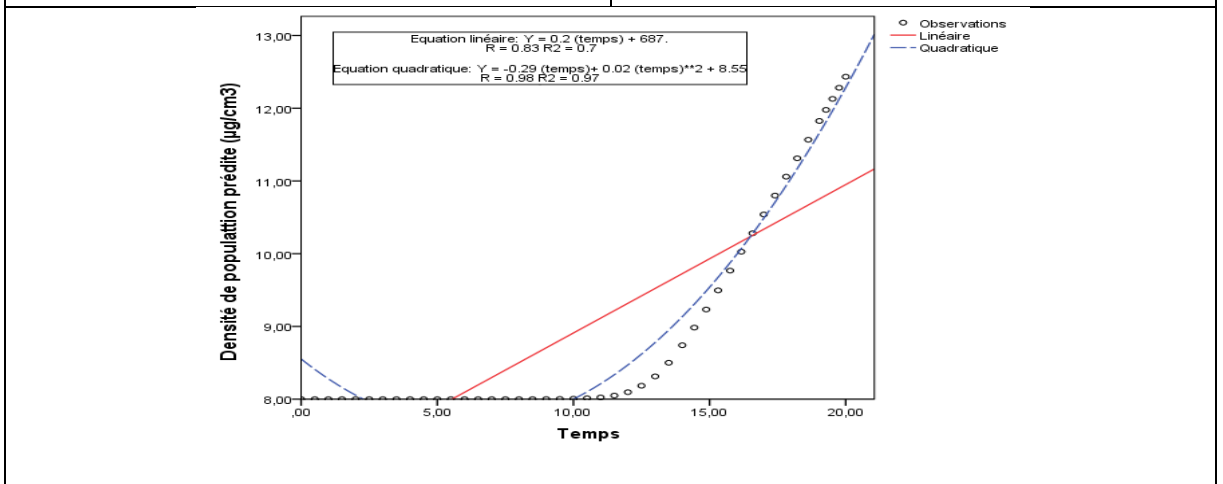
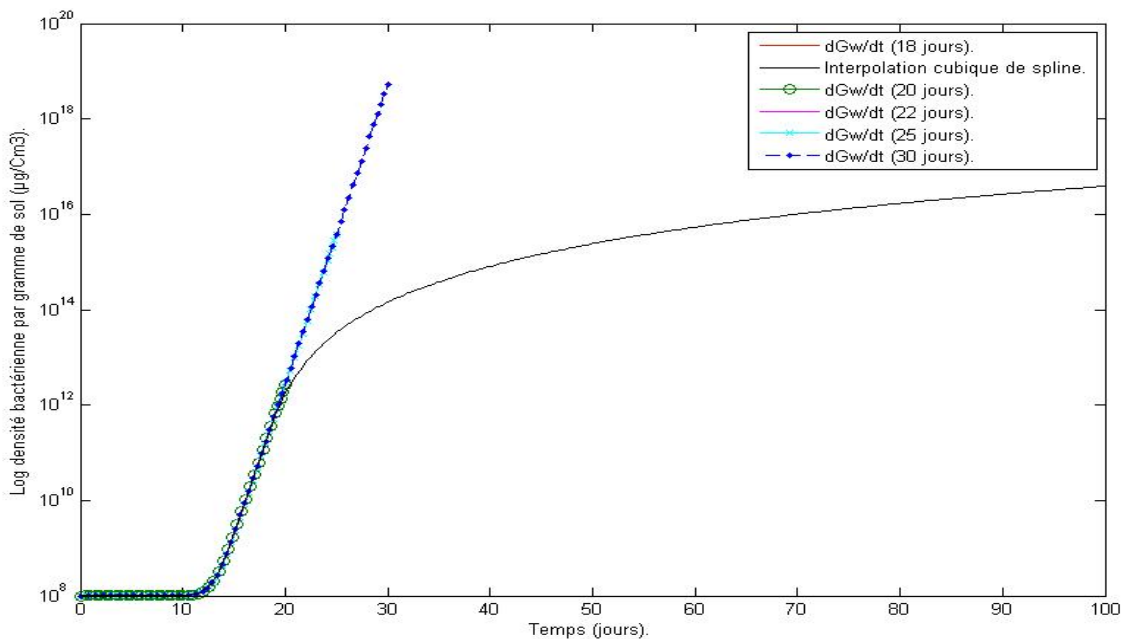


Figure. 3.13. Courbes d'ajustement des fonctions linéaire et quadratique de l'interaction liant la densité des populations prédites par rapport au temps

Concernant les valeurs de densité en populations prédites sur des intervalles de 0 à 30 jours, nous observons une tendance générale à l'augmentation progressive qui progresse pour atteindre des valeurs de plus en plus éloignées de la réalité biologique, (ex :  $5.37 \cdot 10^{18} \mu\text{g}/\text{cm}^3$ / 30 jours) (Figure. 3.10).

L'application d'une interpolation cubique de spline pour les valeurs prédites par le modèle sur une durée de 20 jours correspondant a des densités de population maximale de  $1,5 \cdot 10^{13}$  CFU/g de sol, illustre une courbe sigmoïde, modélisant la croissance bactérienne sur un intervalle étendu de 100 jours montrant des tailles de populations prédites n'excédant pas le seuil maximal de  $10^{15} \mu\text{g}/\text{Cm}^3$ .(Figure. 3.13)



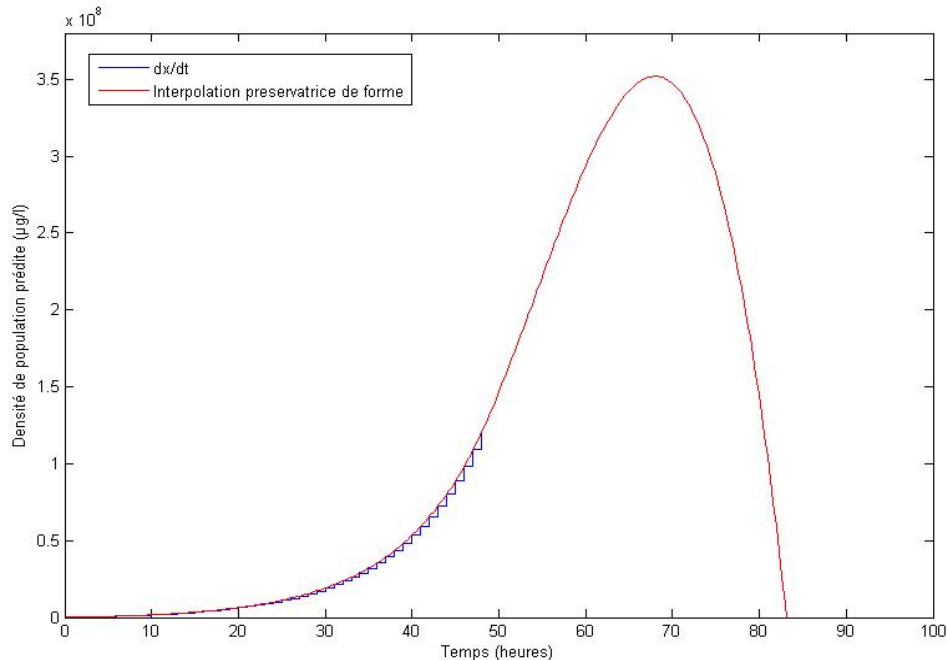
**Figure 3.14.** Divergence des valeurs prédites entre le model initial et la courbe d'interpolation cubique obtenue par interpolation des 20 premiers points prédits par ce même modèle.

### 3.3.3. Modélisation de la taille de la population bactérienne en fonction du temps sur milieu de culture liquide

L'intégration de l'équation modélisant la croissance bactérienne sur milieu de culture liquide (1' : Cf. p-40) donne comme pour l'équation de modélisation de la croissance sur microcosme (1) une courbe continuellement croissante qui dépasse le seuil d'intégration, donnant des valeurs prédictives relativement éloignées de la réalité biologique

L'application d'une interpolation conservatrice de formes aux données obtenues, après intégration sur un intervalle de 48 heures, donne une courbe sigmoïde rendant compte de la dynamique de la croissance bactérienne. Cette courbe peut être divisée en trois phases représentant : (Figure. 3.14)

- une période de latence s'étendant sur un intervalle de 0 à 10 heures.
- une phase de croissance exponentielle qui atteint son maximum aux environs de 70 heures de croissance.
- une phase de déclin qui modélise un arrêt de la croissance et une altération des structures biologiques en croissance dans le même milieu de culture.



**Figure. 3.15.** Estimation de la quantité de biomasse produite par litre de milieu de culture ( $\mu\text{g/l}$ ).

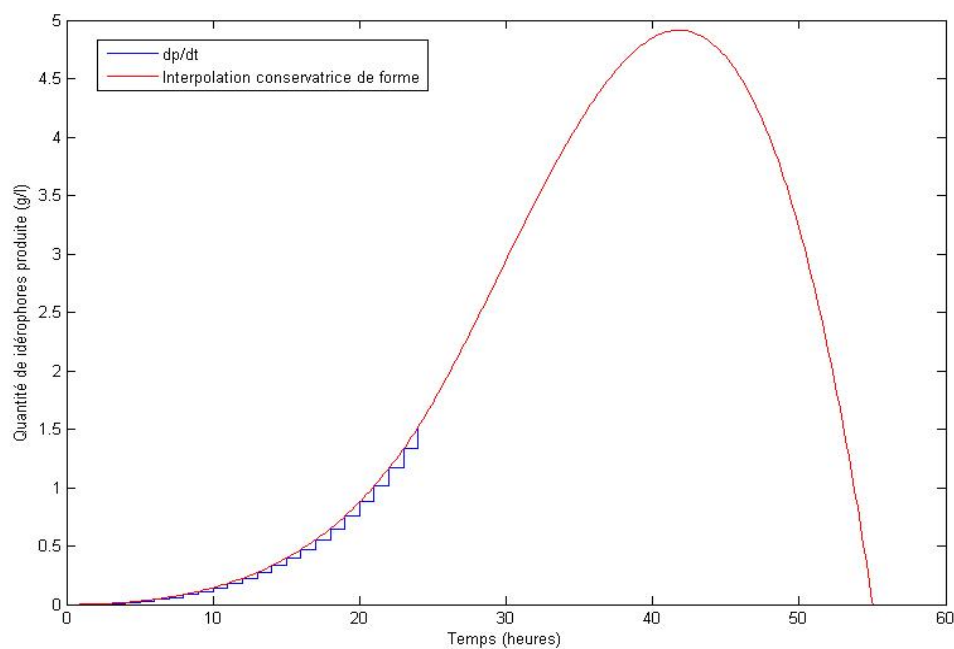
La qualité d'ajustement entre les données expérimentales et les probabilités de prédiction des valeurs sorties par le modèle, indiquent une bonne qualité d'ajustement par rapport à la distribution normale (Figure. 3.15).

A des densités de populations dépassant  $3.21 \cdot 10^7 \mu\text{g/l}$ , nous observons une déviation des valeurs prédites par rapport à la droite normale, (Figure. 3.16). Cette déviation indique l'existence d'un autre schéma de croissance hautement significative (Appendice (C) C, Tableau. 7), pouvant mieux rendre compte de la variabilité globale comparé à la relation linéaire (Figure. 3.17)

### 3.3.4. Modélisation de la production de sidérophores en fonction du temps

La modélisation de la production de sidérophores sur milieux de culture liquides et l'application d'une interpolation conservatrice de forme à données obtenues après intégration de l'équation (4') sur un intervalle de 48 heures, donne une courbe sigmoïde rendant compte de la dynamique de synthèse. Cette courbe sigmoïde peut être divisée en trois phases représentant : (Figure. 3.18)

- une période de latence s'étendant sur un intervalle de 0 à 5 heures.
- une phase de croissance exponentielle qui atteint son maximum aux environs de 40 heures de croissance.
- une phase de déclin qui modélise un arrêt de la production et une altération des molécules biochimiques produites dans le même milieu réactionnel.



**Figure. 3.19.** Estimation de la production de sidérophores sur milieu de culture liquide (g/l).

Par rapport à la distribution normale, la qualité d'ajustement entre les données expérimentales et les probabilités de prédiction des valeurs estimées par le modèle, indiquent une très bonne qualité d'ajustement (Figure. 3.19). Cependant, vu que les valeurs de production de sidérophores semblent suivre un schéma spécifique (Figure. 3.20), suggérant la probable existence d'une relation autre que normale

(Cubique) (Appendice (C) C, Tableau. 8), pouvant mieux rendre compte de la variabilité globale (Figure : 3.20 ; Figure 3.21 annexe R).

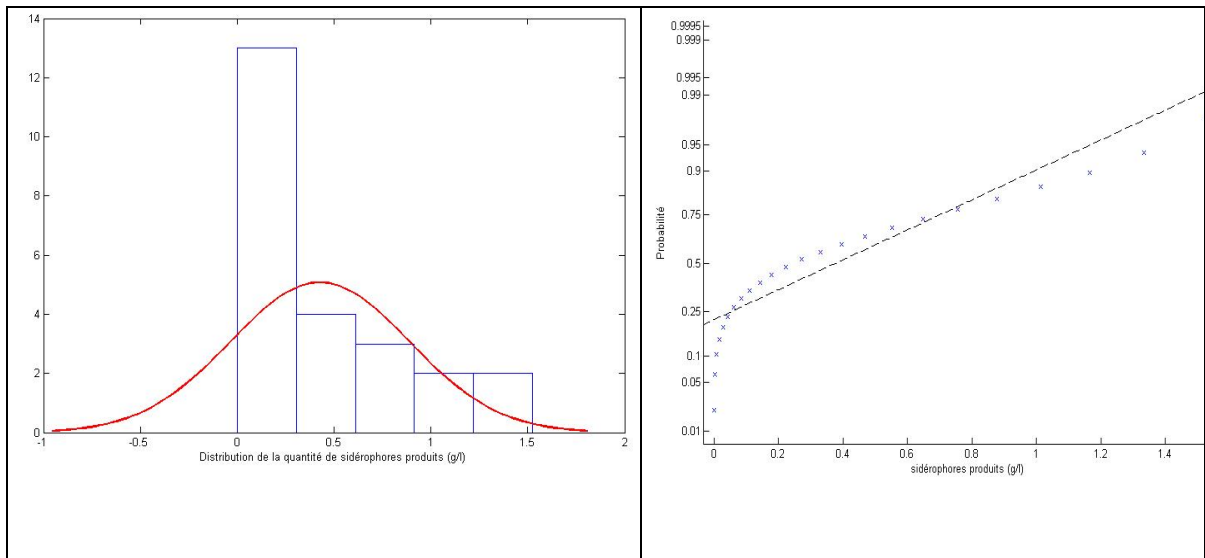


Figure. 3.20. Distribution et qualité d'ajustement des données prédites par rapport au temps vis à vis de la distribution normale pour la production de sidérophores sur milieu de culture liquide (g/l).

Figure. 3.21. Qualité d'ajustement des probabilités de réalisation des données prédites par rapport au temps vis-à-vis des données expérimentales obtenu pour la production de sidérophores sur milieu de culture liquide (g/l).

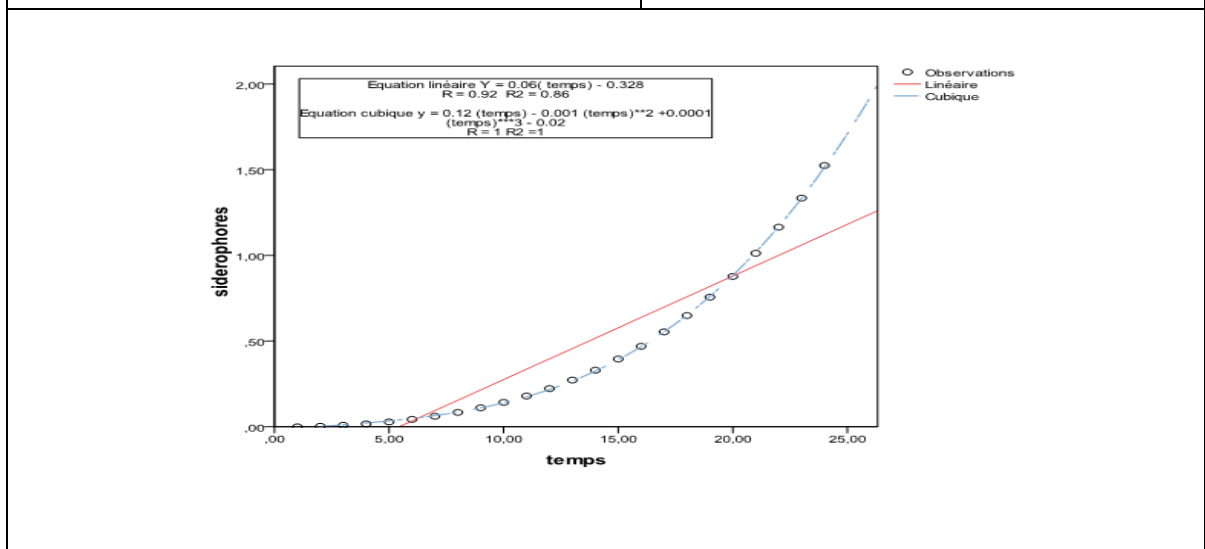


Figure 3.22 : Courbe d'ajustement de fonctions linéaires et cubique de l'interaction liant la production de sidérophores par rapport au temps sur milieu de culture liquide.

### 3.4. DISCUSSION ET CRITIQUE DES MODELES

Le model mathématique proposé quantifie deux mécanismes importants qui sont l'effet du substrat présent dans la solution du sol, et la dynamique de la croissance de ces bactéries à travers le temps. Pour un niveau fixe d'exsudations, ce modèle démontre l'influence du potentiel hydrique sur la diffusion et l'utilisation du substrat sur la croissance et la cinétique de mortalité des cellules bactériennes. La simulation du modèle met en évidence la relation existante entre la diffusion et l'ajout de substrat sur la croissance bactérienne étant donné qu'au delà d'une concentration de  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  de substrat, la taille des populations bactériennes restent relativement stables malgré l'ajout de substrat dans le milieu. Cette information permet donc d'acquérir de meilleurs connaissances sur les déterminants qui régissent le processus de la croissance bactérienne, et permettent de minimiser les apports superflus en éléments minéraux lors du processus de production industriel, évitant ainsi, d'influencer négativement la stabilité du pH. [139]

L'optimisation des apports et de la concentration des éléments minéraux composant la solution du sol, permettent à ces derniers d'atteindre une maturité précoce, stimulant leurs métabolismes primaire et secondaire qui leurs confèrent une aptitude de compétence quasi immédiate lors de leurs introduction en tant qu'agents de bio contrôle dans le sol. Une telle situation va épargner d'éventuelles applications massives de fertilisants et de pesticides, pouvant ultérieurement causer des phénomènes de phytotoxicité et engendrer des effets négatifs sur l'environnement. [203]

Le modèle prend en considération le niveau de saturation qui a des effets biologiques différents, permettant dans un temps la diffusion du substrat et limitant dans un autre temps le mouvement des bactéries et les phénomènes de prédation ayant lieu dans le sol. Selon que l'on soit en présence d'un sol saturé ou sec, les effets sont différentiels sur la croissance bactérienne par l'intermédiaire de la réduction du niveau de diffusion dans le réseau des micropores du sol [203]. Cependant, le modèle ne prend pas en considération la présence de plusieurs populations bactériennes indigènes, en compétition



avec la population introduite pour l'espace et le substrat du sol. A cet effet ce modèle minimise l'effet de la flore indigène en l'éliminant de l'équation. A fin de complaire à cette condition nous avons stérilisé le sol et les semences avant de les inoculer avec les deux souches de *Pseudomonas*.

Les paramètres utilisés dans le model mettent en évidence l'importance de la croissance bactérienne en fonction de la quantité du substrat produit par les racines. Le changement dans la concentration des cellules viables influençant la variation du taux de croissance spécifique, et le taux de mortalité cellulaire ainsi que le niveau maximale de saturation de la croissance [203].

Les modèles utilisé ne prennent pas en considération la variation de plusieurs paramètres et impliquent la variation d'un seul paramètre à la fois.

Ainsi, certaines valeurs des paramètres utilisés dans la simulation du modèle mathématique on été expérimentalement mesurés, et d'autres ont été prises d'études antérieures précédemment publiés sur le même sujet. Cette démarche est fréquemment nécessaire dans ce genre d'études portant sur la modélisation des microorganismes vivants, et ce même pour des modèles à structure relativement simple, à faible niveau de confiance impliquant des valeurs prédites significativement différentes des réalisations expérimentales caractérisées par une applicabilité et une répétabilité moyenne voir médiocre [203].

Le but de notre étude, n'est pas de produire un modèle générale prédictive de la dispersion et de la croissance bactérienne, en fonction de la concentration de substrat disponible dans le sol, mais le test de l'applicabilité de ce modèle en comparant les données prédites à celles obtenus en laboratoire sur microcosmes et sur milieux de culture liquides. Plusieurs paramètres doivent être calculés et mesurés pour chaque une de nos souches bactériennes à fin d'optimiser les sorties du modèle. Ceci est possible en l'utilisant avec des systèmes expérimentaux obéissant aux différentes assomptions simplificatrices, excluant quelques paramètres, particulièrement les facteurs environnementaux majeurs à savoir la température, le pH, la salinité, et le potentiel hydrique [203]. Ces paramètres sont supposés être constants dans le modèle et doivent être maintenus stables au cours de nos prochaines expérimentations. De plus, les

conditions d'échantillonnage doivent être menées de manière à optimiser l'uniformité dans et entre les différentes unités expérimentales "microcosmes" à fin de minimiser les gradients de variabilité [203].

Les écarts d'ajustement observés précédemment (Figures. 3.14 ; 3.15), sont probablement dues à des imperfections liées au model lui-même et sont le résultat de simplifications d'assomption de départ fixées par le concepteur du modèle. Ces écarts peuvent être rectifiés en ajoutant de nouveaux paramètres explicatifs impliquant ainsi, le calcul d'un nombre élevé de paramètres rendant difficile la mise en exécution du modèle pour des études et/ou des applications routinières. Cette divergence et ces grandes tailles de population prédites pour des périodes supérieur à 20 jours, montrent une des limites du model étudié, qui suggère que ce dernier est plus efficace pour modéliser l'évolution temporaire de populations bactériennes dont les charges microbiennes initiales soient inférieures à  $10^8$  CFU/g de sol. Ceci est directement applicable dans la conception des inocula initiaux, ajoutés de leurs interpolations.

Notons en fin que, l'application d'interpolations mathématiques aux valeurs prédites par les différents modèles donne des résultats biologiquement significatifs. Ces résultats simulent une courbe sigmoïde composée de plusieurs phases qui sont : (Figures : 3.17 ; 3.8 ; 3.9). [204]

- (i) Une phase de latence initiale (lag-phase), pendant laquelle les enzymes nécessaires à la croissance sont induites représentée par la phase allant de [0,10 jours],
- (ii) Une phase de croissance exponentielle appelée (log-phase) [10, 22 jours], débute après une première phase de transitions I qui évolue selon une cinétique d'une réaction de premier ordre [22, 30 jours].
- (iii) Une phase de transition II est atteinte lorsqu'un substrat devient limitant ou la concentration d'un produit devient inhibiteur [205,206].
- (iv) Une phase de croissance ralenti avec une faible pente de croissance correspondant a la phase stationnaire qui apparait normalement lorsque une limitation de substrat, une forte densité de population, est atteint au contact

d'une faible pression en O<sub>2</sub> ou une accumulation de produits toxiques du métabolisme

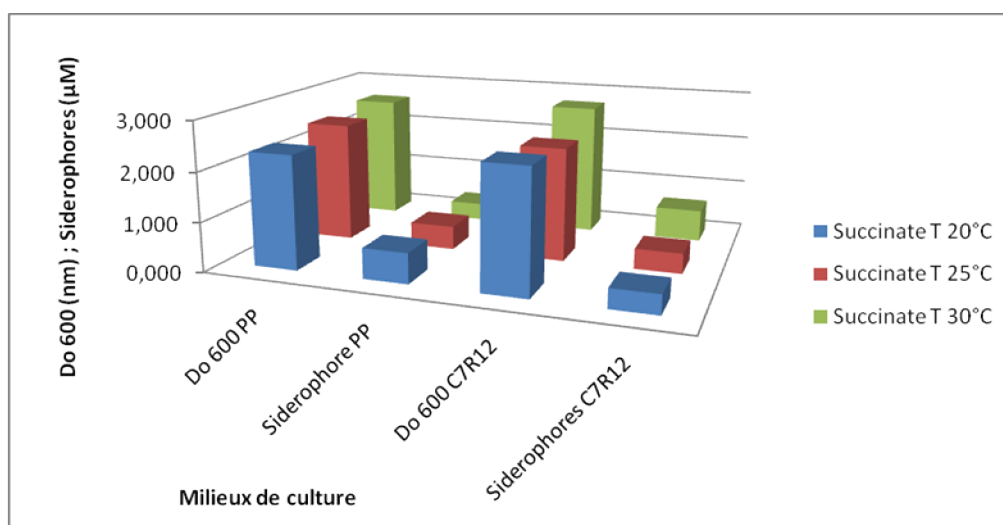
### 3.5. Effet de la température sur la croissance et la production de sidérophores

La production de sidérophores la plus importante a été relevée dans le milieu de culture Succinate où nous avons observé une variation parallèle de la production de sidérophores en fonction de la fluctuation du taux d'absorbance ( $\lambda = 600$  nm) qui représente le taux de croissance atteint par les deux souches étudiés *Pseudomonas putida* D2 et *Pseudomonas fluorescens* C7R12. Ces deux souches ont à des températures de 20 et 30°C, atteint des taux de production en sidérophores de l'ordre de 0.62  $\mu$ g et 0.65  $\mu$ g pour des masses cellulaires totales produites de 0.044  $\mu$ g et 0.025  $\mu$ g de poids sec (Figure : 3.22)

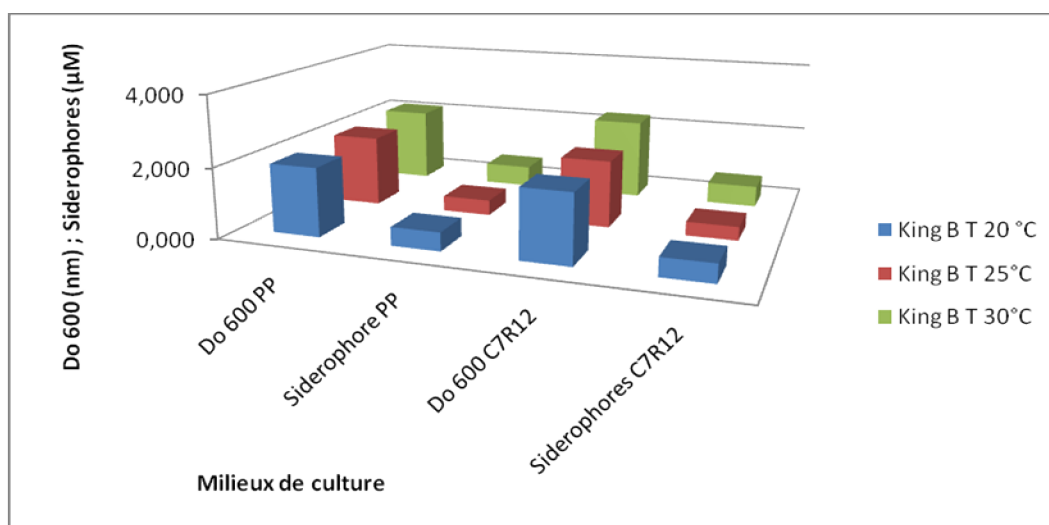
Sur milieu de culture B de king (Figure. 3.23), et Minimum Rhizobium Media (RM) (Figure. 3.24), nous n'avons pas observé de différences significatives, entre le taux de production de sidérophores et la quantité de biomasse cellulaire produite comparée au milieu de culture Succinate.

La production optimum de sidérophores a été obtenu a température de 30 et 20°C pour la souche D2 qui a respectivement produit 0.42  $\mu$ g et 0.5  $\mu$ g de sidérophores dans les deux milieux de culture king B (Figure : 3.23) et minimum rhizobium (Figure : 3.24), pour des masses cellulaires respectives de l'ordre de 0.067  $\mu$ g et de 0.143  $\mu$ g.

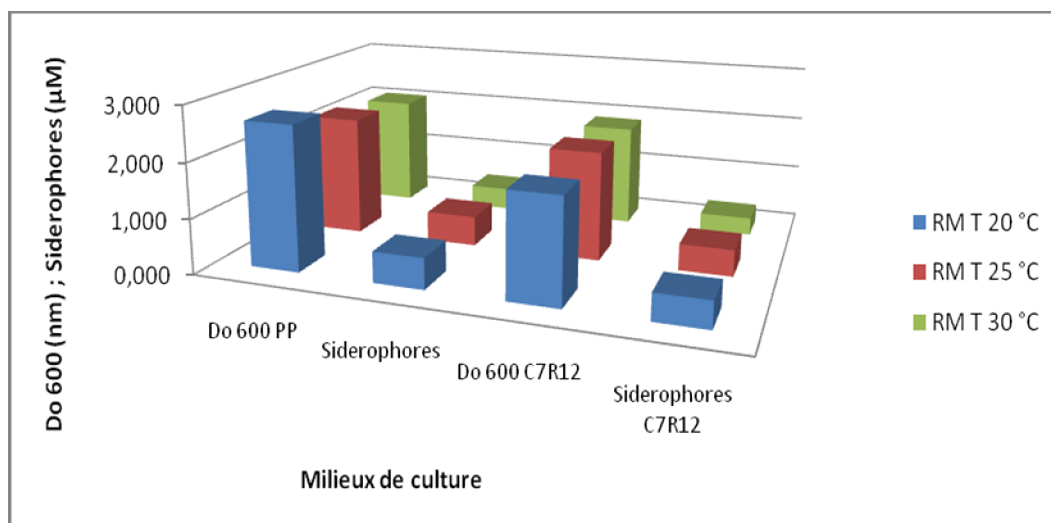
Pour la souche C7R12, la production moyenne de sidérophores a été légèrement la même dans les trois milieux de culture avec un taux de production moyen de sidérophores de (0.47  $\mu$ g), pour une masse cellulaire moyenne de 0.6  $\mu$ g. Notons cependant, l'existence de quelques différences qui se traduisent par une production optimale de sidérophores aux températures de 30 et 20°C sur king B et RM, contrairement au milieu de culture Succinate où la production de sidérophores reste stable aux températures de 20°, 25° et 30°C pour C7R12. Notons également que pour cette même souche, une tendance générale à la baisse progressive dans la production de sidérophores est observée à travers les différents niveaux de température (20°, 25° et 30°C)



**Figure 3.23.** Production de sidérophores des deux souches de *Pesudomonas putida* D2 et *P.fluorescens* C7R12, sur milieu de culture Succinate en fonction de la température.



**Figure 3.24.** Production de sidérophores des deux souches de *Pesudomonas putida* D2 et *P.fluorescens* C7R12, sur milieu de culture king B en fonction de la température.



**Figure 3.25.** Production de sidérophores des deux souches de *Pseudomonas putida* D2 et *P. fluorescens* C7R12, sur milieu de culture Minimum Rhizobial "RM" en fonction de la température.

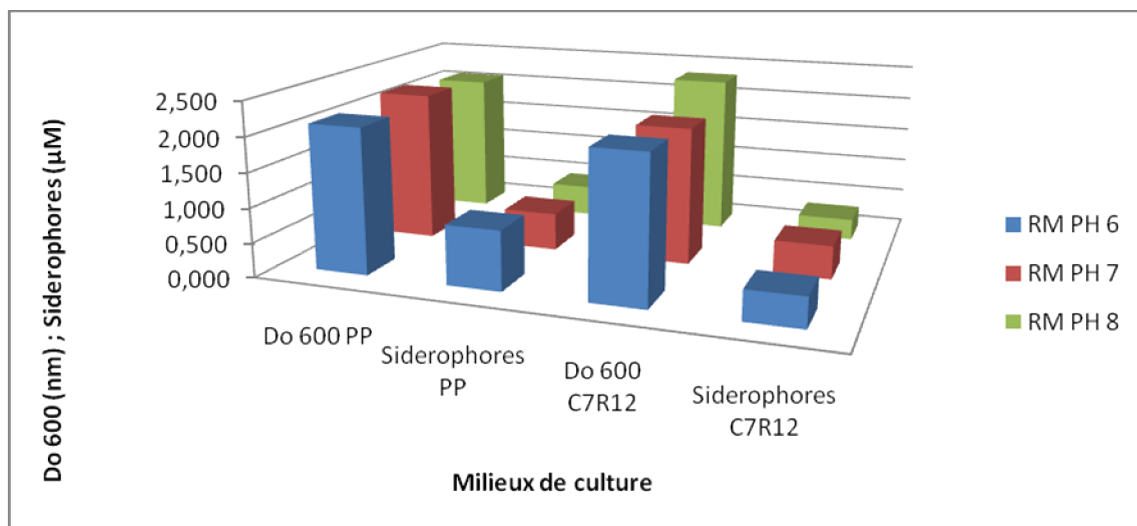
### 3.6. Effet du pH sur la croissance et la production de sidérophores

Sur milieu de culture Minimum Rhizobium l'essai de production de sidérophores en fonction du pH du milieu, a révélé une baisse graduelle de la production de sidérophores en fonction de l'augmentation du gradient du pH pour la souche D2. La plus grande quantité de masse cellulaire bactérienne et de sidérophores produit a été obtenue au pH 6 avec les quantités respectives, de 2.11 et de 0.861 µg ; au pH 7, nous avons observé une stimulation de la croissance bactérienne au détriment de la production de sidérophores.

Pour la souche C7R12, nous avons observé une production de sidérophores moyenne, comparée à la souche D2. La production maximale de sidérophores a été de l'ordre de 0.48 µg au pH 7. Cette production a été accompagnée d'une faible croissance bactérienne (2.13 µg) comparée aux masses cellulaires produites.

Aux pH 6 et 8, la masse cellulaire produite a été de 2.32 µg pour une production totale de sidérophores de 0.3 µg. Ainsi, les résultats obtenus après 48 heures d'incubation, indiquent que pour la souche D2, le pH optimum de croissance et de production de sidérophores se situe respectivement aux

alentour de 7 et 6, et que pour la souche C7R12 il se situe vers 8 et 7.( Figure. 3.25)



**Figure. 3.26 :** Production de sidérophores des deux souches de *Pseudomonas putida* D2 et *P. fluorescens* C7R12, sur milieu de culture minimum rhizobial "RM" en fonction du pH.

### 3.7. Rapport biomasse sidérophores

La comparaison entre les rapports de production en biomasse et en sidérophores, illustre un classement hiérarchique, selon les grandeurs des valeurs sans tenir compte des interactions biologiques (Tableau. 3.9). Dans ce paramétrage, la prise en considération de la température et du pH reste à élucider pour mieux situer les origines des variations constatés.

Ces rendements montrent que le plus grand rendement a été obtenu pour la souche *Pseudomonas putida* Y (x/s) dans le milieu de culture succinate mis en culture respectivement à température de 30°C et 25°C, et que le plus grand rendement pour la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12 Y (c/s) a été obtenu dans le milieu de culture RM mis en culture à pH 8, suivie directement par le milieu de culture Succinate mis en culture à une température de 20°C.

**Tableau. 3.2.** Rapports de production de biomasse sur sidérophores dans les différents milieux de culture utilisés.

| Rangs | Milieux de culture +(D2) | Rapport<br>Y (X/S) | Milieux de culture | Rapport<br>Y (C/S) |
|-------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1     | Succinate T 30°C         | 7,25               | RM PH 8            | 7,56               |
| 2     | Succinate T 25°C         | 5,12               | Succinate T 20°C   | 6,27               |
| 3     | RM T 30 °C               | 5,00               | RM T 30 °C         | 5,79               |
| 4     | RM T 20 °C               | 4,68               | Succinate T 25°C   | 5,58               |
| 5     | King B T 25°C            | 4,63               | King B T 25°C      | 4,89               |
| 6     | RM PH 8                  | 4,61               | RM PH 6            | 4,83               |
| 7     | RM T 25 °C               | 4,03               | Succinate T 30°C   | 4,17               |
| 8     | RM PH 7                  | 4,03               | RM T 25 °C         | 4,12               |
| 9     | Succinate T 20°C         | 3,74               | RM PH 7            | 4,12               |
| 10    | King B T 20 °C           | 3,73               | RM T 20 °C         | 3,91               |
| 11    | King B T 30°C            | 3,54               | King B T 30°C      | 3,82               |
| 12    | RM PH 6                  | 2,45               | King B T 20 °C     | 3,73               |

C7R12: Souche de *Pseudomonas fluorescens* ; D2: Souche de *Pseudomonas putida* Y: Rapport biomasse/sidérophores; X: Biomasse *Pseudomonas putida* D2; C: Biomasse *Pseudomonas fluorescens* C7R12; S: Sidérophores; T: Température; pH: Potentiel hydrogène

### 3.8. DISCUSSION

Pour l'effet de la température sur la croissance et la production de sidérophores les différences observés sont vraisemblablement liés au fait que le Succinate qui est considéré comme un substrat chromogénique favorisant la production de sidérophores, ait été a des niveaux différents efficacement métabolisé par les deux souches de *Pseudomonas*, pour la synthèse de sidérophores au détriment de la croissance bactérienne. Ainsi, le Succinate qui rentre dans la structuration des sidérophores (pyoverdine) où la fraction 3-amine du chromophore est substituée par différents groupements acyle dérivés du Succinate et du malate o  $\alpha$ -ketoglutarate [207, 208].

Pour les effets du potentiel hydrogène sur la croissance et la production de sidérophores, le milieu RM contenant le glucose et l'urée qui sont des les premières heures de croissance préférentiellement métabolisés en tant que source de carbone et d'azote en les intégrant avec leurs dérivés dans les différents processus de biosynthèses. Néanmoins, la dégradation de ces molécules (organiques et inorganiques), induit une libération de protons hydrogénés et de radicaux actives en oxygène qui sont intrinsèquement néfastes et délétères pour les cellules bactériennes. Ces déchets métaboliques créent de manière passive les conditions nécessaires à l'acidification du milieu réactionnel qui voit son pH baisser de un a deux points et les sidérophores jusqu'à là produit dégradés vu leurs forte labilité a pH acide (ex : pyoverdines) [139]. Ces conditions astringentes induisent l'arrêt immédiat de la croissance bactérienne se traduisant par une première phase stationnaire suivie d'un courte période de latence qui permet aux bactéries en présence de s'adapter à leurs nouveau milieu en activant les voies de biosynthèse alternatives capables de synthétiser d'autres enzymes capables de métaboliser d'autres source de carbone.

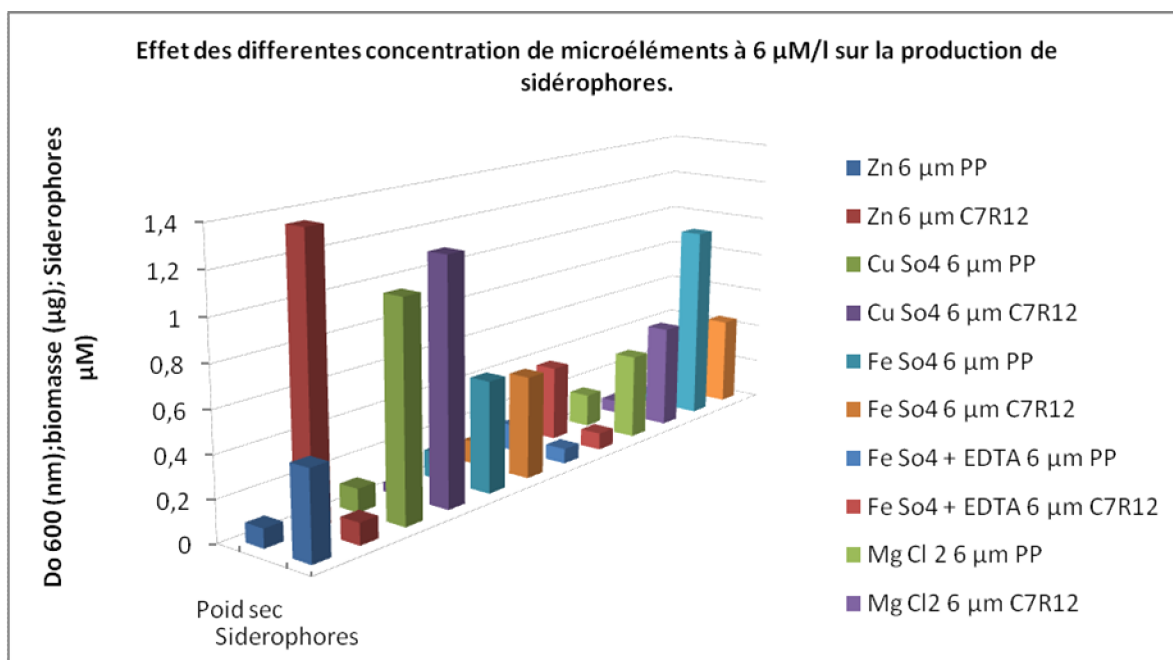
Notons également, que dans le cas du milieu RM, l'extrait de levure qui est un mélange complexe de peptides, acides aminés, vitamines, bases azotées (puriques et pyrimidiques) et sels minéraux, contribue au rétablissement d'un pH normale voir légèrement alcalin qui favorise la conservation et la protection des sidérophores. [139]

En fin, pour les rapports (biomasse/sidérophores) les différents niveaux de rendements observés ont probablement eut pour origine la présence du Succinate et de la peptone dans le milieu de culture Succinate, ainsi que le glucose et l'extrait de levure qui rentrent dans la composition du milieu de culture RM. Qui induisent une meilleure croissance et un meilleur taux de production de sidérophores. Par rapport au milieu B de king [209].



### 3.9. Effet des microéléments additionnés à 6µg/l sur la production de biomasse et de sidérophores

Les résultats de l'addition des microéléments additionnés, montre que leurs nature influence la croissance bactérienne et la production de biomasse ainsi que l'expression synthétique des sidérophores (Figure. 3.26). Ces résultats indiquent différents niveaux de production de biomasse et de sidérophores, pour les quels nous observons différents schémas de réponse pour les deux souches bactériennes étudiées, qui sont fonction des milieux de culture utilisés. Il est à souligner que chaque milieu est réceptif à une catégorie d'éléments minéraux, en termes de composition et de balance nutritionnelle.



**Figure. 3.27.** Effet des microéléments additionnés à 6µg/l sur la production de biomasse et de sidérophores pour les deux souches bactériennes étudiés.

Les résultats de la régression ordinale modélisant les effets des différents microéléments, constituant les milieux de culture utilisés dans notre expérimentation, sur la croissance et la production de biomasse et de sidérophores ont montré des résultats hautement significatifs pour les deux souches étudiés avec des tests d'ajustement et des coefficients de pseudo corrélation de cox et snell expliquant 99% de l'interaction existante entre les différents facteurs étudiés (Tableaux. 3.10 ; 3.11 ; 3.12).

**Tableaux. 3.3; 3.4.** Qualité d'ajustement et coefficients de pseudo-corrélation  $R^2$  du modèle.

| Tableau. 3.3.                |                         |                |     |       | Tableau. 3.4.                |       |
|------------------------------|-------------------------|----------------|-----|-------|------------------------------|-------|
| Modèle                       | -2log-<br>vraisemblance | Chi-<br>Square | ddl | Sig.  | Cox et Snell                 | 0,993 |
| Seulement<br>constante       | 59,638                  |                |     |       | Nagelkerke                   | 1,000 |
| Final                        | 0,000                   | 59,638         | 11  | 0,000 | McFadden                     | 1,000 |
| Fonction de liaison : Logit. |                         |                |     |       | Fonction de liaison : Logit. |       |

**Tableau 3.5.** Estimation de la signification des différents micros éléments constitutifs des milieux de culture étudiés.

| Eléments minéraux 6 $\mu$ m | Estimation | Erreur<br>std. | Wald  | ddl | Sig.  | IC 95 %          |                  |
|-----------------------------|------------|----------------|-------|-----|-------|------------------|------------------|
|                             |            |                |       |     |       | Borne inférieure | Borne supérieure |
| [Cu So4 +C7R12]             | 32,617     | 16,09          | 4,109 | 1   | 0,043 | 1,081            | 64,153           |
| [Cu So4 + PP]               | 24,614     | 10,12          | 5,912 | 1   | 0,015 | 4,774            | 44,454           |
| [EDTA + PP]                 | 19,477     | 8,644          | 5,077 | 1   | 0,024 | 2,534            | 36,420           |
| [EDTA + C7R12]              | 3,779      | 4,090          | 0,854 | 1   | 0,355 | -4,237           | 11,794           |
| [Fe So4 + EDTA + C7R12]     | -13,314    | 7,925          | 2,822 | 1   | 0,093 | -28,847          | 2,219            |
| [Fe So4 + EDTA + PP]        | -21,317    | 14,80          | 2,073 | 1   | 0,150 | -50,337          | 7,703            |
| [Fe So4 + C7R12]            | 7,521      | 5,453          | 1,903 | 1   | 0,168 | -3,166           | 18,209           |
| [Fe So4 + PP]               | 15,215     | 7,574          | 4,035 | 1   | 0,045 | ,370             | 30,060           |
| [Mg Cl 2 + PP]              | -3,915     | 4,210          | 0,865 | 1   | 0,352 | -12,167          | 4,336            |
| [Mg Cl2 + C7R12]            | 11,300     | 6,559          | 2,968 | 1   | 0,085 | -1,555           | 24,155           |
| [Zn + C7R12]                | -8,177     | 5,922          | 1,907 | 1   | 0,167 | -19,783          | 3,429            |

Fonction de liaison : Logit.

### 3.10. Production de biomasse et de sidérophores par les souches D2 et C7R12

Les résultats obtenus pour la production de sidérophores en fonction de la croissance et de la quantité de biomasse produite par la souche *D2*, montrent l'existence d'un faible coefficient de corrélation au seuil de signification de 5%.

Les coefficients de corrélations d'ordre zéro, sont hautement significatifs et montrent des niveaux de corrélation négatif pour les interactions liant le niveau de croissance et la quantité de sidérophores produite, (- 0.91). Ceci indique l'existence d'une forte relation négative entre les deux variables explicatives ;

Au contraire non significatives pour l'interaction liant la production de biomasse et de sidérophores (- 0.28 et - 0.14), Ceci indique une faible relation entre les deux variables qui suggère la possibilité d'existence d'une relation non linéaire (Tableau 3.13).

**Tableau. 3.6.** Corrélations simple et partielle du niveau de croissance en fonction de la production de sidérophores et de biomasse pour la souche *D2*.

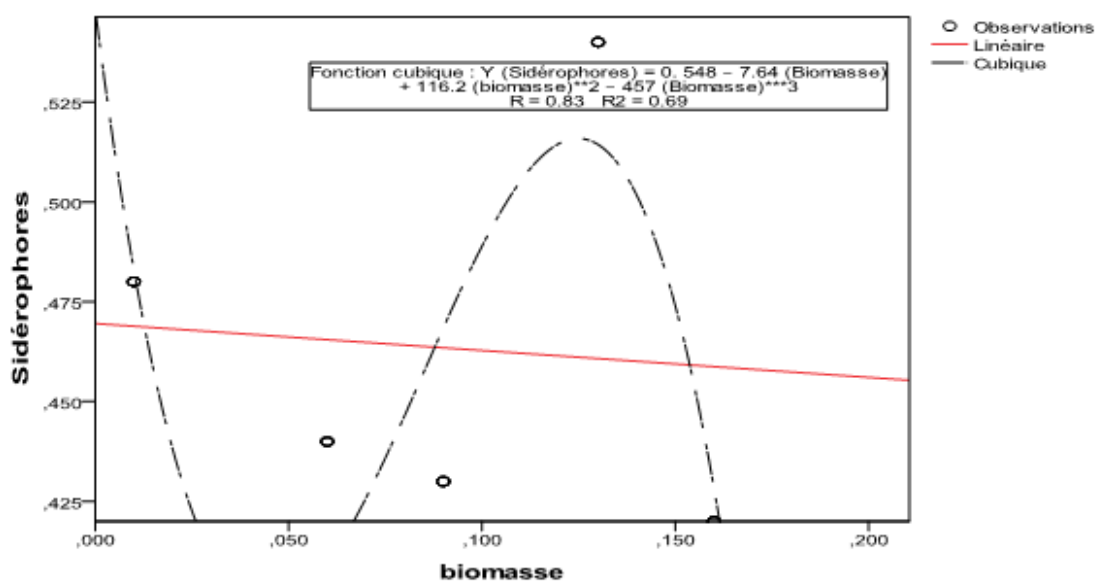
#### Corrélations

| Variables de contrôle |             |                            | biomasse | sidérophore | do600  |
|-----------------------|-------------|----------------------------|----------|-------------|--------|
| -aucun- <sup>a</sup>  | biomasse    | Corrélation                | 1,000    | -0,284      | 0,250  |
|                       |             | Signification (bilatérale) | .        | 0,128       | 0,183  |
|                       |             | ddl                        | 0        | 28          | 28     |
|                       | sidérophore | Corrélation                | -0,284   | 1,000       | -0,914 |
|                       |             | Signification (bilatérale) | 0,128    | .           | 0,000  |
|                       |             | ddl                        | 28       | 0           | 28     |
|                       | do600       | Corrélation                | 0,250    | -0,914      | 1,000  |
|                       |             | Signification (bilatérale) | 0,183    | 0,000       | .      |
|                       |             | ddl                        | 28       | 28          | 0      |
| Do600                 | biomasse    | Corrélation                | 1,000    | -0,142      |        |
|                       |             | Signification (bilatérale) | .        | 0,463       |        |
|                       |             | ddl                        | 0        | 27          |        |
|                       | sidérophore | Corrélation                | -0,142   | 1,000       |        |
|                       |             | Signification (bilatérale) | 0,463    | .           |        |
|                       |             | ddl                        | 27       | 0           |        |

a. Les cellules contiennent des corrélations simples (Pearson).

La réalisation d'une régression d'ajustement de fonction liant la production de sidérophores au taux de croissance et à la quantité de biomasse produite, après 48h de croissance, a montré l'existence de relations significatives au seuil de signification de 5% (Appendice (C) C, Tableaux. 9, [A1, A2]).

Ainsi, les meilleurs coefficients de détermination rendant compte de la variabilité globale, ont été prédits par des fonctions cubiques pour les deux paires d'interaction avec des coefficients de détermination de l'ordre de 0.83 et 0.69 (Figure. 3.27).



**Figure. 3.28.** Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et cubique de l'interaction liant la quantité de Biomasse et de sidérophores produit par la souche *Pseudomonas putida D2*.

Pour la souche *C7R12*, nous avons observé, la présence de coefficients de corrélation négatifs pour l'ensemble des paires avec des niveaux de significations très hautement significatives pour l'interaction entre la biomasse et la quantité de sidérophores produit. Un niveau de signification bas pour l'interaction entre niveau de croissance et la production de biomasse a été souligné.

La corrélation du premier ordre de la biomasse et de la quantité de sidérophores produits, en fonction du niveau de croissance, a montré une corrélation très hautement significative au seuil de signification de 5%, avec un

coefficient de corrélation négatif (- 0.85) synonyme d'une forte liaison entre ces variables étudiées (Tableau. 3.14).

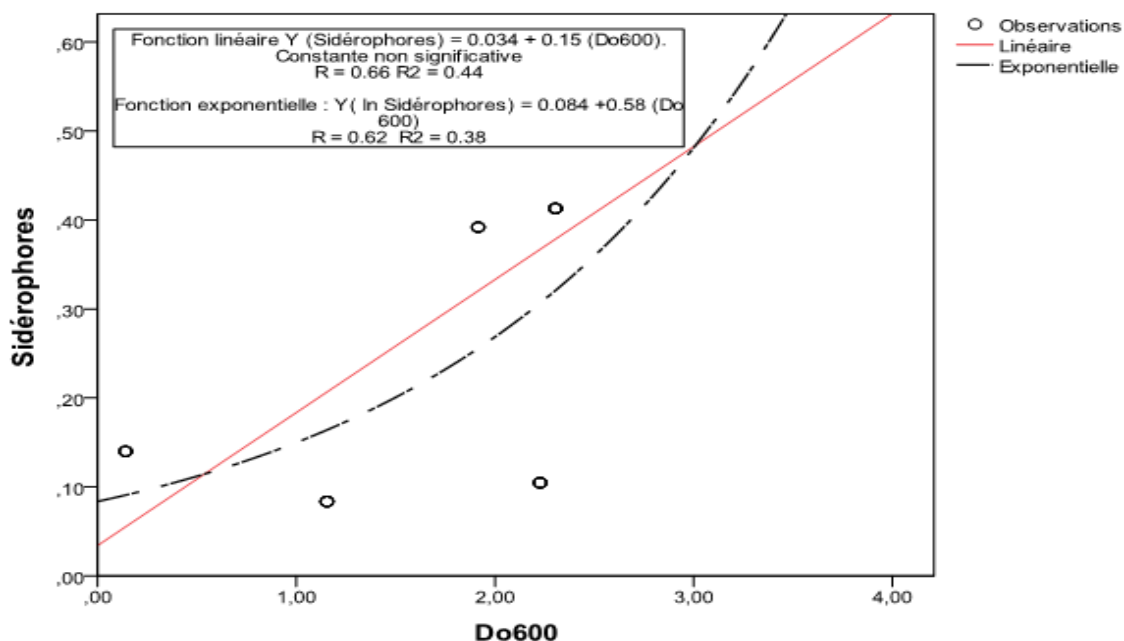
**Tableau. 3.7.** Corrélations simple et partielle du niveau de croissance en fonction de la production de sidérophores et de biomasse pour la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12.

### Corrélations

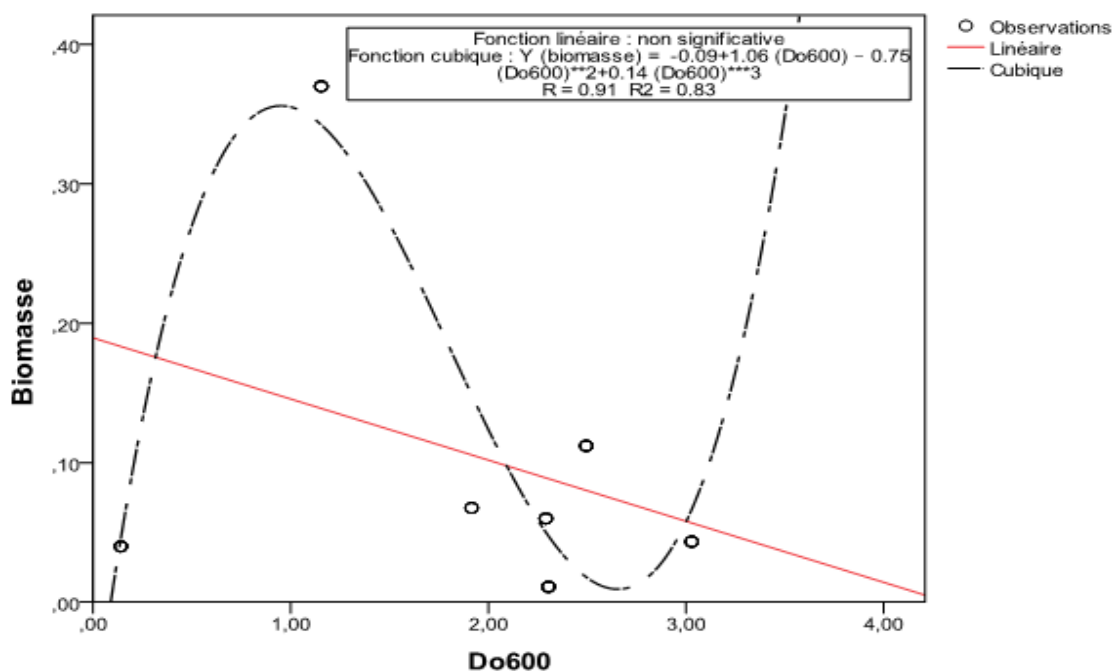
| Variables de contrôle |             |               | Biomasse | Sidérophore | Do600  |
|-----------------------|-------------|---------------|----------|-------------|--------|
| -aucun- <sup>a</sup>  | Biomasse    | Corrélation   | 1,000    | -0,621      | -0,257 |
|                       |             | Signification | .        | 0,000       | 0,163  |
|                       |             | Ddl           | 0        | 29          | 29     |
|                       | Sidérophore | Corrélation   | -0,621   | 1,000       | 0,877  |
|                       |             | Signification | 0,000    | .           | 0,000  |
|                       |             | Ddl           | 29       | 0           | 29     |
|                       | Do600       | Corrélation   | -0,257   | 0,877       | 1,000  |
|                       |             | Signification | 0,163    | 0,000       | .      |
|                       |             | Ddl           | 29       | 29          | 0      |
| Do600                 | Biomasse    | Corrélation   | 1,000    | -0,852      |        |
|                       |             | Signification | .        | 0,000       |        |
|                       |             | Ddl           | 0        | 28          |        |
|                       | Sidérophore | Corrélation   | -0,852   | 1,000       |        |
|                       |             | Signification | 0,000    | .           |        |
|                       |             | Ddl           | 28       | 0           |        |

a. Les cellules contiennent des corrélations simples (Pearson).

Les tests de régression d'ajustement de fonction ont montré que les meilleurs équations d'ajustements de la distribution des résultats de la production de sidérophores en fonction du niveau de croissance et de biomasse produite suivait un modèle exponentielle et cubique très hautement significatif au seuil de signification de 5% (Appendice (C) C, Tableaux. 10 ; 11). Cette situation explique le plus de variation avec des coefficients de corrélation et de détermination respectif de ( $R = 0.62$  ;  $R^2 = 0.38$ .  $R = 0.91$  ;  $R^2 = 0.83$ ) (Figure. 3.28, 3.29).

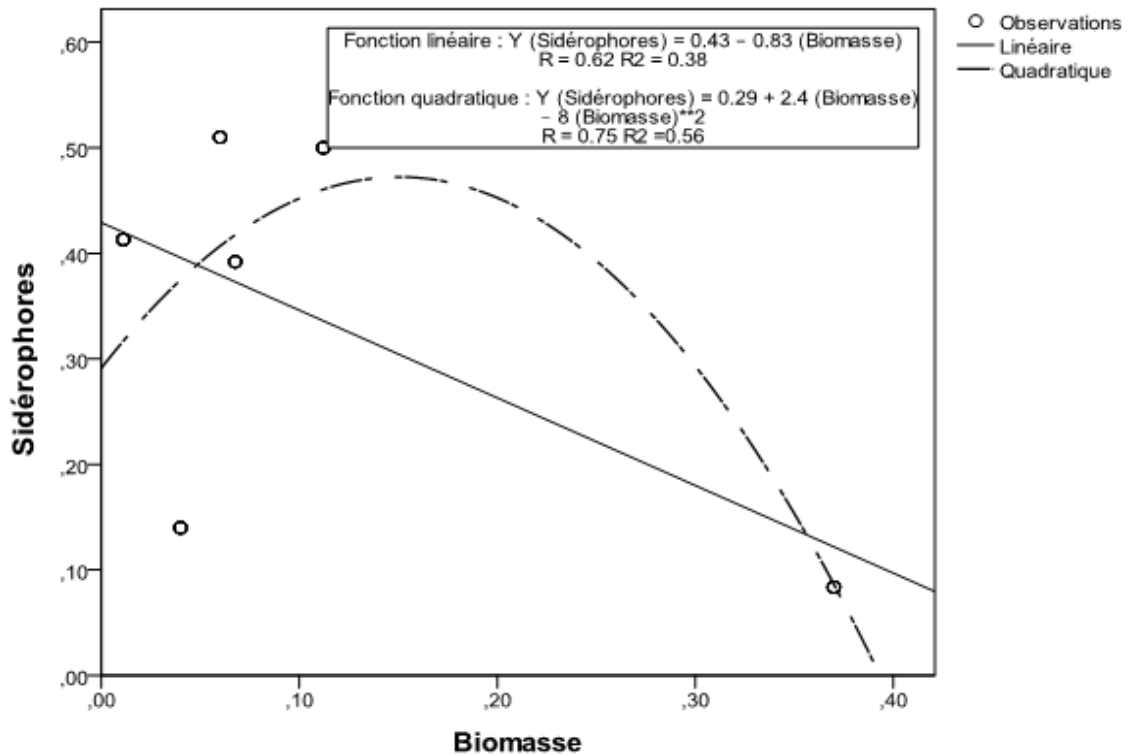


**Figure. 3.29 :** Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et exponentielle de l'interaction liant le niveau de croissance bactérienne à la quantité de sidérophores produit par la souche *Pseudomonas fluorescens C7R12*.



**Figure. 3.30 :** Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et cubique de l'interaction liant le niveau de croissance et la quantité de Biomasse produit par la souche *Pseudomonas fluorescens C7R12*.

Pour l'interaction entre la biomasse produite et la quantité de sidérophores, l'équation linéaire est hautement significative et rend compte de plus d'un tiers de la variance. Cependant, le modèle quadratique a montré une meilleure estimation des réalisations obtenus avec un coefficient de corrélation et de détermination de l'ordre de ( $R = 0.75$ ,  $R^2 = 0.56$ ) (Figure. 3.30).



**Figure. 3.31** : Courbes d'ajustement de la fonction linéaire et quadratique de l'interaction liant la quantité de Biomasse et de sidérophores produit par la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12.

### 3.11. DISCUSSION

La biosynthèse de sidérophores est dépendante de la biodisponibilité du fer dans le milieu et non pas par la croissance bactérienne. Ainsi, la présence d'autres métaux tel que le Cu, Cr, Cd, Ni, et Al n'interfèrent en aucun cas sur leurs processus de biosynthèse [8,9]. Cependant, les sidérophores forment des complexes forts et sélectifs avec le Fe, Cu, Al, Ga, et Cr [210]

Les sidérophores qui sont des chélateurs sélectifs du fer, sont secrètes sous conditions de stress sous l'effet de différents facteurs environnementaux, ainsi, les milieux de culture qui ont produit le plus de sidérophores sont les milieux de culture RM supplémentés de sulfate de cuivre et d'EDTA pour la souche D2 suivi par les milieux additionnées de sulfate de fer qui ont eu en moyenne le même niveau de production de biomasse que la souche C7R12 mise en culture en présence d'EDTA et de zinc avec une moyenne de produit « Sidérophores» de 0.5 µg. Cette quantité de sidérophores produite sans agitation des tubes à essai de faible contenance utilisés lors de notre expérimentation, est proportionnellement faible comparé aux niveaux de production atteint dans d'autres études utilisant d'autres souches de *Pseudomonas spp. fluorescentes* cultivés dans des flacons d'agitation d'1l de contenance, où des niveaux de production élevé ont été atteint avec des taux de production variant respectivement entre 0.08 et 0.4 g/l [211, 212]. Notons en fin, que le taux de production moyen obtenu dans notre expérimentation est égal à celui obtenu dans un essai de production mené par Silva et al [213], sur une souche de *Pseudomonas fluorescens* cultivé dans un bioréacteur de 50 l de contenance.

Pour l'interaction entre le niveau de croissance et les différents constituants des milieux de culture, il a été montré que Fe So<sub>4</sub> et Cu So<sub>4</sub> avaient un effet significatif sur le niveau de croissance de la souche *Pseudomonas putida* D2. L'ajout du complexe, [(EDTA + FeSo<sub>4</sub>), Zinc] ; et Mg So<sub>4</sub>, avait respectivement des effets significatifs sur la production de la biomasse bactérienne avec les deux souches C7R12 et D2 (Tableau. 3.9).

Pour la production de sidérophores, il a été révélé que l'addition de CuSo<sub>4</sub>, Fe SO<sub>4</sub>, et d'EDTA induisait un effet sur la production de sidérophores



chez la souche D2, alors que le  $\text{CuSO}_4$  influençait celle de la souche C7R12 (Tableau. 3.9). Ainsi, nous observons que les productions de biomasse et de sidérophores sont inversement proportionnelles et que selon Meyer et Abdallah [212]. La quantité de pigments synthétisés par unité de masse cellulaire était inversement proportionnelle à la concentration des facteurs limitant de la croissance. Dans ce cas, la situation peut être considérée comme étant les différents microéléments qui n'ont eu aucune action significative sur la croissance et la production de biomasse et de sidérophores chez les deux souches bactériennes. Les minéraux cités ci dessus conditionnent l'intégrité des membranes cellulaires et la stabilité génétique des inoculas et sont essentiels pour la croissance bactérienne. Ils ont une action en qualité de déterminants majeurs et/ou catalyseur de la synthèse de plus de 300 enzymes et autres protéines [20 ; 140].

Chez les *Pseudomonas*, ces minéraux répriment ou stimulent la synthèse des antibiotiques, agissent sur la transcription et la promotion des gènes biosynthétiques, et peuvent indirectement affecter la biodisponibilité des éléments minéraux essentiels et la régulation du pH [210, 188, 214].

Le fer est un élément essentiel pour les bactéries en raison de sa participation dans le cycle de Krebs, le transport des électrons, des acides aminés la biosynthèse des pyrimidines, la synthèse de l'ADN, et d'autres fonctions essentiel [215]. L'absorption du fer doit également être réglementée en raison de son effet létal par la réaction de Fenton [216]. Deux études ont montré que la production de phytotoxines, syringomycine et syringotoxine par *P. syringae* était réceptive à la supplémentation en fer [217, 218]. Bien que le fer soit le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, sa disponibilité est très faible en raison de sa faible solubilité en solution aqueuse ( $[\text{Fe}^{3+}]$  à pH 7,  $10^{-18} \mu\text{M}$ ) [219].

Le fer et le zinc qui sont tout deux des stimulateurs de la production d'une grande variété de métabolites antifongiques (zwitermycin A, kanosamine, phénazine, et cyanide); ont également un rôle dans la synthèse et la répression de la production sidérophores. Ainsi, contrairement au fer, le zinc

stimule la production de sidérophores en cas de carence en fer, les sidérophores produits auront, par la suite des effets significatifs sur les interactions biochimiques, survenant en cas de rétablissement des concentrations normale en fer dans l'environnement [6]. Comme indique précédemment, la production de sidérophores est négativement corrélée avec la croissance bactérienne. Ainsi, dans les milieux de culture amendés en fer, nous observons une baisse de la production de sidérophore à la faveur de la croissance, quand au contraire nous observons l'effet inverse dans des milieux de culture pauvres en fer. Cet état indique que la production de sidérophores est régulée par la biodisponibilité du fer dans l'environnement [220, 221, 222].

D'autres éléments minéraux inorganiques tel que le phosphate  $K_2HPO_4$ , n'ont démontré aucun effet sur la production de sidérophores ; mais, en revanche, ont montré une action sur la répression de la production de certains antibiotiques tels que la PHL et la PLT produites par la souche CHA0. Cet information peut être utile pour la modulation de la production de métabolites antimicrobiennes durant la phase de croissance, pour améliorer la qualité des inoculas produits et éviter les problèmes éventuels de phytotoxicité, lorsque au même moment nous pouvons avoir une augmentation de la croissance bactérienne [6, 10, 71]. D'un autre côté, l'augmentation de la concentration des antibiotiques et la stimulation de la synthèse des sidérophores *in vitro*, par la régulation de la concentration des milieux de culture en fer et/ou EDTA, zinc et autres éléments minéraux indispensables; peut procurer une protection précoce et quasiment instantanée lors de leurs inoculation vis avis des pathogènes à croissance rapide (*Pythium* ou *Goenamomyces*), qui ont tendance à occuper l'espace rhizosphérique très rapidement.

La présence du  $CuSO_4$  n'interfère pas avec la production de sidérophores en cas de conditions de carence en fer. L'addition du  $CuSO_4$  aux milieux de culture induit une baisse de l'absorbance à 400nm du fait de la réduction des sidérophores libres et la formation du complexe cuivre-sidérophore. Ce dernier à un rôle important dans la nutrition sous conditions de carences en cuivre dans le milieu.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION GENERALE

Devant le problème de la pollution des écosystèmes terrestre et l'exploitation massive des sols agricoles arables, il apparait clairement que l'utilisation excessive des molécules chimiques dans la fertilisation et la protection des cultures soit aujourd'hui considérée comme une menace sérieuse pour l'environnement et la santé humaine et animale. Ainsi, depuis près d'un demi-siècle un intérêt grandissant s'est porté sur l'exploitation des ressources microbiennes bénéfiques qui semblent offrir des avantages considérables dans le domaine de la phytostimulation et la bioprotection des cultures.

Les *Pseudomonas spp fluorescentes* appartenant au groupe des rhizobactéries bénéfiques du sol, connaissent actuellement un intérêt grandissant du fait de leurs polyvalences nutritionnelles et de leurs grandes compétitivités dans les sols [91, 92]. D'énormes progrès dans la compréhension des processus régissant la colonisation des racines et de caractérisation des facteurs biotiques et abiotiques affectant la colonisation et la compétence de ces souches ont été obtenus au cours des 30 dernières années. Divers mécanismes de suppression des maladies telluriques ont été élucidés et de nombreuses associations entre différents agents de lutte ont été testées afin de satisfaire aux exigences d'une agriculture durable menée sous serre ou en plein champ [223].

Les résultats obtenus au terme des essais de la compétence rhizosphérique menés avec deux souches de *Pseudomonas*, montrent un haut potentiel de colonisation rhizosphérique. Ainsi, nous avons obtenu des niveaux de colonisation de l'ordre de  $10^{13}$  CFU / g de sol, seuil largement supérieur à l'inoculum initial. Ces résultats sont encourageants et constituent une première étape dans le processus de sélection des souches à haut potentiel colonisateur, pré requis pour une bonne compétence rhizosphérique.

La capacité des *Pseudomonas* à croître et à produire des métabolites secondaires qui solubilisent plusieurs éléments minéraux, tels que le fer, le phosphore et le manganèse, via l'action d'agents chélateurs sous conditions stressantes de faible teneur en fer, est dû à la synthèse de sidérophores qui s'attachent préférentiellement au fer. Ces métabolites sont considérés comme étant les déterminants majeurs qui confèrent l'aptitude d'une colonisation intense des racines et des sols.

La synthèse de ces métabolites est dépendante de plusieurs facteurs qui peuvent varier en intensité et en significativité selon que l'on soit dans la phase de recherche ou de production à grande échelle, ainsi pour réussir dans le processus de formulation d'inoculum destinés à d'éventuels utilisations agronomiques, il est nécessaire de prévoir une modification d'échelle (scale up) qui peut varier selon le procédé, matériel biologique utilisé, et volume de production envisagés.

Le développement de mesures de contrôle et de régulation des échanges thermodynamiques survenant lors du processus de production est d'une importance capitale car il permet d'obtenir des données concrètes sur les paramètres physiques (température, pression, viscosité, taux de flux d'air, ajout de substrat, turbidité), chimiques (pH, O<sub>2</sub> dissout, O<sub>2</sub> et Co<sub>2</sub> rejetés, concentration en substrat, ions et produit), et biologiques (activité enzymatique, teneur en ATP, NADH et Protéines influant la production de mousse), ayant des actions sur la production de ces métabolites secondaires [204].

Etant donné le grand nombre de facteurs à prendre en considération variant en fonction d'un paramètre ou plus, et étant donné la complexité des interactions inter et intra spécifiques, conditionnant les processus biologique (compétence rhizosphérique et formulation de molécules et d'agents de biocontrol), il est nécessaire de développer des modèles mathématiques qui diminuent de la complexité des problèmes posés aux praticiens et aux chercheurs, en simplifiant les problèmes et les modèles existant, en imposant

des contraintes aux modèles sur la base de suppositions et de postulats bien définis.

Ces modifications peuvent déboucher sur des différences significatives comparées aux résultats obtenus en solutionnant les modèles originaux. Ces incohérences de prédiction vis-à-vis des résultats obtenus à l'issue de l'application de l'approche réaliste, est fonction de la pertinence de la technique d'optimisation utilisée et de l'efficacité de l'approche adoptée, qui varie selon la catégorie du problème à résoudre ou à modéliser.

De nos jours la modélisation revêt une importance capitale, en raison de sa contribution effective dans les processus de prise de décision, statuant sur des problèmes biotechnologiques multidimensionnels comportant plusieurs optima adaptés et spécifiques selon la complexité et la nature des paramètres biologiques à étudier.

Ainsi après avoir utilisé des méthodes d'analyse conventionnelles de type statistiques ou stochastiques, voir quelques modèles mathématiques (Programmation Linéaire, programmation non linéaire, modèles multi-objectif), qui se sont avérés incapables de fournir des représentations satisfaisantes des phénomènes biologiques et technologiques contemporains. Des techniques appartenant à une génération de modèles plus évolués basés sur des approches heuristiques, telle que les algorithmes génétiques et les algorithmes mimétiques dans le domaine biologique ont été développés [224].

Ces techniques sont plus appropriées pour rendre compte des problèmes d'optimisation à objectifs multimodal, liés à la croissance et la formulation des milieux de fermentation et autres essais de biosynthèse de métabolites secondaires (sidérophores, enzymes, antibiotiques). Contrairement aux premiers tests, ces derniers sont plus à même de fournir des réponses concrètes aux problèmes d'optimisation des rendements étant donné leur grande capacité de prise en charge d'un nombre important de facteurs pouvant dans le cas de notre étude être représentés par les différents composés chimiques à effets significatifs sur la croissance et la synthèse de sidérophores,

généralement dissociés et traités séparément par les modèles statistiques usuels [225].

À court terme, les méthodes technologiques d'investigation à haut débit existent déjà pour identifier directement [223]:

- (i) Les agents de biocontrôle actifs contre différents pathogènes cibles.
- (ii) Sélectionner des souches ayant une affinité particulière pour des génotypes végétaux.
- (iii) Développer et exploiter les sols naturellement suppressifs aux pathogènes telluriques.
- (iv) La reconnaissance de l'impact du processus de production sur la qualité des produits de biocontrôle.
- (v) Développement de méthodes d'identification à haut débit des facteurs influençant l'efficacité et la durée de vie.
- (vi) L'ingénierie des souches pour une plus grande efficacité et stabilité dans le sol. obtenu au terme du séquençage complet de la souche Pf-5 de *P. fluorescens*, qui a révélé l'existence d'une multitude de voies de biosynthèse et de métabolites à activité antifongiques qui jusqu'à la restait inconnues.

## CONCLUSION

Les applications de souches de *Pseudomonas fluorescens* dans les différents essais réalisés dans ce travail, ont mis en évidence leurs potentialités de croissance et de maintien en microcosmes. Les taux de croissance ont atteint des seuils remarquables qui confirment le potentiel de biocontrôle des souches bactériennes étudiés, en interaction avec les différentes plantes herbacées testées.

La première partie de notre travail expérimental, relative à la mise en évidence de la compétence rhizosphérique des souches de *Pseudomonas fluorescens*, a révélé une interaction positive des souches (D2 et C7R12) avec les espèces végétales (tomate, Orge, blé et haricot), caractérisée par une nette évolution des populations bactériennes dans les différentes rhizosphères, estimée en moyenne à  $10^{13}$ CFU /g de sol. Un tel seuil de colonisation témoigne d'une bonne adaptation des souches bactériennes dans les rhizosphères de ces différents génotypes végétaux.

Les résultats de notre étude montrent que la réussite de la colonisation racinaire est liée à la souche bactérienne et non pas à son origine géographique ou au type de la plante hôte étudiée. Cependant, d'autres facteurs non contrôlés, à l'exemple de paramètres abiotiques pouvant avoir une influence sur la croissance et la survie des bactéries inoculés dans les rhizosphères des plantes cultivés, ou conditionnées en microcosmes.

Cette étude donne, un aperçu sur la probable diversité des mécanismes que possédant les deux souches de *Pseudomonas fluorescens* étudiés, qui sont dites compétentes dans leurs pouvoir de colonisation des racines, et suggèrent une possible utilisation de ces souches en tant qu'agents de lutte biologique, en raison de leurs stabilité et de leur fort taux de reproductibilité dans le sol.

Dans la deuxième partie de notre travail, des aspects de production de biomasse bactérienne en relation avec la synthèse de sidérophores, ont été traités de façon quantitative suivie d'une modélisation. A l'issue de cette expérimentation, il apparaît que la croissance et la production de sidérophores, varie en fonction des souches bactériennes mises en culture sous différentes conditions de température et pH. Aussi, il apparaît que certains éléments minéraux rentrant dans la constitution des différents milieux de culture (CuSo<sub>4</sub>, l'EDTA, FeSo<sub>4</sub>), ont des actions significatives sur le métabolisme des souches bactériennes étudiés.

Des corrélations négatives entre la production de biomasse et la production de sidérophores des deux souches D2 et C7R12, ont également été mis en évidence, Ainsi de meilleurs ajustements de fonction expliquant plus de 50% de la variance globale ont été avec des équations cubique et quadratique.

Pour la troisième partie de notre travail, la modélisation mathématique de plusieurs équations quantifiant (i) l'effet du substrat présent dans la solution du sol et la dynamique de croissance bactérienne sur microcosmes, et sur (ii) milieu de culture liquide. (iii) ainsi que la formation de produit « sidérophores » en fonction du temps, ont permis d'obtenir des prédictions des tailles des populations qui nous ont permis d'apporter certaines critiques, après qu'on les ait comparés à nos données expérimentales. Les équations testés, peuvent être utilisés comme outils permettant de simuler différents scénarios biologiques en faisant varier les différents paramètres constitutifs des équations, dans le but d'épargner du temps et d'éventuelles ressources matériel et humaines liés a la mise en place de dispositifs expérimentaux compliqués et superflus.

Au terme de notre travail, nous signalons la nécessité d'étudier le potentiel de colonisation de toutes les souches dites rhizocompétentes afin d'identifier directement les agents de biocontrôle actif, compatibles avec des cultures ou des cultivars particuliers. Ainsi, l'étape de sélection est cruciale pour déterminer la vocation des souches candidates à d'éventuelles utilisations en



lutte biologique ou en tant qu'agents et de phytostimulation ou de bioremédiation des toxiques accumulés dans l'environnement.

De ce fait, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances génétiques biochimiques et physiologiques, pour mieux comprendre les différentes interactions qui lient la plante aux microorganismes du sol, ainsi que l'effet que peuvent avoir les différents facteurs environnementaux sur le dialogue inter et intra communautaire, s'exprimant par le biais de l'atténuation « Quorum quensing » et/ou de l'elicitation « Quorum sensing » des signaux moléculaires qui se répercutent directement sur l'expression du métabolisme secondaire ( ex: synthèse d'antibiotiques et de sidérophores). [67, 105].

Notons en fin, que face au déficit de l'incompétence de certaines souches de biocontrôle à efficacement coloniser certain milieux oligotrophes naturel et synthétiques. Il serait utile d'impliquer les firmes privés, dans le processus de (recherche – développement), afin d'élaborer et perfectionner les ressources biologiques existantes pour leurs conférer la capacité d'efficacement persister dans l'environnement et d'assurer une couverture phytosanitaire appréciable durant les différents saisons de culture. Aussi, le développement de nouveaux procédés technologiques et autres modèles prédictives de gestion et d'aide a la décision traitant du criblage des agents de lutte biologique, de la formulation, conditionnement, stockage et acheminement de ces produits, reste un enjeu majeur pour vulgariser l'utilisation de ces moyens de lutte auprès des agriculteurs, et ainsi réduire la part des molécules chimiques dans les différents programmes de lutte appliqués annuellement à travers le monde.

## APPENDICE (A)

Tableau des caractéristiques physico chimiques du sol utilisé. [191].

| Caractéristiques  | Taux (%) |
|---|----------|
| pH <sub>eau</sub>   | 6.9      |
| pH <sub>KCL</sub>   | 6.7      |
| K <sup>+</sup>  | 0.63 %   |
| Na <sup>+</sup>   | 2.63 %   |
| Ca <sup>+2</sup> + Mg <sup>+2</sup>                         | 6.36 %   |
| S <sup>+</sup>  | 9.65 %   |
| C.E   | 0.44     |
| C.E.C capacité d'échange cationique (meq /100g de sol)      | 12.5     |
| V (taux de saturation)                                      | 77.2     |
| P <sup>2</sup> O <sup>5</sup> Phosphore assimilable (ppm)   | 189.33   |
| Ca CO <sub>3</sub>  | 0        |
| Matière organique   | 1.89     |
| H <sub>cc</sub> (humidité pondérale à la capacité au champ) | 10.45    |
| Argile  | 16.36 %  |
| L (limon)   | 24.12 %  |
| LG (limon grossier)   | 16.26 %  |
| SF (sable fin)  | 14.28 %  |
| SG (sable grossier)   | 28.98 %  |

## APPENDICE (B)

### Les milieux de culture

#### **Milieu B de King (KB) King *et al.*, [357]**

|   |         |
|---|---------|
| Peptone (Difco)                         | 20 g    |
| Glycerol (Prolabo)                      | 15 ml   |
| K <sub>2</sub> Hpo <sub>4</sub> (Sigma) | 1,5 g   |
| MgSO <sub>4</sub> (Sigma)               | 1,5 g   |
| Agar (Sigma)                            | 15 g    |
| Eau distillée                           | 1000 ml |

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

#### **Milieu de culture succinate**

|   |       |
|---|-------|
| Agar  | 15.0g |
| Peptone   | 5.0g  |
| acide Succinique                                | 1.68g |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 1.0g  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.0g  |
| FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O            | 2.0mg |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O             | 2.0mg |

pH 7.0 ± 0.2 a 25°C

#### **Milieu de culture minimum rhizobium media "RM"**

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| Glucose                         | 20 g |
| Extrait de levures              | 10g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4g   |

pH 7.0 ± 0.2 a 25°C.

## APPENDICE (C)

### Les tableaux des tests statistiques

**Tableau. 1 : Test de la variance de la densité des populations en fonction des deux souches bactériennes utilisées.**

#### ANOVA

|               | Somme des carrés | ddl | Moyenne des | F      | Signification |
|---------------|------------------|-----|-------------|--------|---------------|
| Intergroupes  | ,451             | 1   | ,451        | 43,179 | ,000          |
| Intra-groupes | ,209             | 20  | ,010        |        |               |
| Total         | ,660             | 21  |             |        |               |

**Tableau. 2 : Statistiques descriptives des deux groupes homogènes 1 et 2 au seuil de signification de 5%.**

#### Descriptives

|       | N  | Moyenne | Ecart-type | Erreur standard | Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne |                  |
|-------|----|---------|------------|-----------------|---|------------------|
|       |    |         |            |                 | Borne inférieure                              | Borne supérieure |
| 1     | 11 | 13,3873 | ,10928     | ,03295          | 13,3139                                       | 13,4607          |
| 2     | 11 | 13,1009 | ,09460     | ,02852          | 13,0374                                       | 13,1645          |
| Total | 22 | 13,2441 | ,17727     | ,03779          | 13,1655                                       | 13,3227          |

**Tableau. 3 : ANOVA à 1 facteur pour l'interaction entre le genre végétale et la densité bactérienne finale.**

#### ANOVA (I).

|               | Somme | ddl | Moyenne | F     | Signification |
|---------------|-------|-----|---------|-------|---------------|
| Intergroupes  | ,136  | 3   | ,045    | 1,560 | ,234          |
| Intra-groupes | ,524  | 18  | ,029    |       |               |
| Total         | ,660  | 21  |         |       |               |

Seuil de signification = 5%.

**Tableau. 4 : ANOVA à 1 facteur pour l'interaction entre génotype végétale et densité bactérienne finale.**

#### ANOVA (I)

|               | Somme des | ddl | Moyenne des carrés | F    | Signification |
|---------------|-----------|-----|--------------------|------|---------------|
| Inter groupes | ,185      | 10  | ,018               | ,428 | ,904          |
| Intra-groupes | ,475      | 11  | ,043               |      |               |
| Total         | ,660      | 21  |                    |      |               |

Seuil de signification = 5%.

**Tableau. 5 :** Analyse de la variance des données prédites par un modèle linéaire en fonction du temps.

ANOVA

|            | Somme des | ddl | Carré  | F       | Sig. |
|------------|-----------|-----|--------|---------|------|
| Régression | 70,361    | 1   | 70,361 | 100,497 | ,000 |
| Résidu     | 30,106    | 43  | ,700   |         |      |
| Total      | 100,467   | 44  |        |         |      |

La variable indépendante est le temps.

**Tableau. 6 :** Analyse de la variance des données prédites par le modèle quadratique en fonction du temps.

ANOVA

|            | Somme des | ddl | Carré  | F       | Sig. |
|------------|-----------|-----|--------|---------|------|
| Régression | 97,385    | 2   | 48,693 | 663,592 | ,000 |
| Résidu     | 3,082     | 42  | ,073   |         |      |
| Total      | 100,467   | 44  |        |         |      |

La variable indépendante est le temps.

**Tableau.7 :** Analyse de la variance des données prédites par le modèle suivant une modèle quadratique en fonction du temps.

ANOVA

|            | Somme des | ddl | Carré  | F        | Sig. |
|------------|-----------|-----|--------|----------|------|
| Régression | 28,104    | 2   | 14,052 | 1761,510 | ,000 |
| Résidu     | ,359      | 45  | ,008   |          |      |
| Total      | 28,463    | 47  |        |          |      |

La variable indépendante est le temps.

**Tableau. 8 :** Analyse de la variance des données prédites par le modèle suivant une modèle quadratique en fonction du temps.

ANOVA

|            | Somme des | ddl | Carré | F         | Sig. |
|------------|-----------|-----|-------|-----------|------|
| Régression | 4,876     | 3   | 1,625 | 58651,728 | ,000 |
| Résidu     | ,001      | 20  | ,000  |           |      |
| Total      | 4,877     | 23  |       |           |      |

La variable indépendante est le temps.

**Tableau. 9 (A1) :** Tableau de l'analyse de la variance pour l'interaction cubique entre le niveau de croissance et de sidérophores produit par la souche *Pseudomonas Putida*.

## ANOVA (A1)

|            | Somme des | ddl | Carré | F        | Sig. |
|------------|-----------|-----|-------|----------|------|
| Régression | 1,122     | 2   | ,561  | 2163,343 | ,000 |
| Résidu     | ,007      | 27  | ,000  |          |      |
| Total      | 1,129     | 29  |       |          |      |

La variable indépendante est do600.

**Tableau : 9 (A2) :** Tableau de l'analyse de la variance pour l'interaction cubique entre la quantité de biomasse et de sidérophores produit par la souche *Pseudomonas Putida*.

## ANOVA (A2)

|            | Somme des | ddl | Carré | F      | Sig. |
|------------|-----------|-----|-------|--------|------|
| Régression | ,033      | 3   | ,011  | 15,738 | ,000 |
| Résidu     | ,015      | 21  | ,001  |        |      |
| Total      | ,048      | 24  |       |        |      |

La variable indépendante est biomasse.

**Tableau. 10 :** Tableau de l'analyse de la variance pour l'interaction exponentielle entre le niveau de croissance bactérienne et de sidérophores produit par la souche *Pseudomonas fluorescens C7R12*.

## ANOVA

|            | Somme des | ddl | Carré moyen | F      | Sig. |
|------------|-----------|-----|-------------|--------|------|
| Régression | 7,606     | 1   | 7,606       | 21,206 | ,000 |
| Résidu     | 12,195    | 34  | ,359        |        |      |
| Total      | 19,801    | 35  |             |        |      |

La variable indépendante est Do600.

**Tableau. 11 :** Tableau de l'analyse de la variance pour l'interaction cubique liant le niveau de croissance et la quantité de Biomasse produit par la souche *Pseudomonas fluorescens C7R12*.

## ANOVA

|            | Somme des | ddl | Carré moyen | F      | Sig. |
|------------|-----------|-----|-------------|--------|------|
| Régression | ,444      | 3   | ,148        | 54,701 | ,000 |
| Résidu     | ,087      | 32  | ,003        |        |      |
| Total      | ,530      | 35  |             |        |      |

La variable indépendante est Do600.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Fravel, D.R., "Commercialization and implementation of biocontrol", *Annu. Rev. Phytopathol*, n°43, (2005), 337-359.
2. Kloepper, J.W., et Schroth, M.N., "Plant growth– promoting rhizobacteria on radishes", In: *Proc int Conf Plant Pathol Bact Angers*, n°1978, 379 - 382.
3. Kloepper, JW., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., "Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria", *Nature*, n°286,(1980a), 885-886.
4. Fravel, DR ., " Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases", *Annu Rev Phytopatho.* n° 26,(1988), 75-91
5. Keel, C, Haas. D, Laville. J, Maurhofer. M, Oberhansli. Th, Schnider. U, Voisard. C et Défago. G., "Suppression of soil- borne pathogens by *Pseudomona fluorescens*-A Multifactorial mechanism, in: *plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects.* C. Keel , B. Koller , and G. Défago , eds. *Int. Org. Biol. Control Noxions Anim. plants/West. palaerctic Reg. Sec. Bull.* 1418. (1991), 195-196
6. Kloepper, J.W, Leong. J, Teintze. M, Schroth. M.N., "*Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils", *Curr Microbiol*, n°4, (1980b), 317-320.
7. Digat, B., GARDAN., "Caractérisation, variabilité et selection des souches bénéfiques de *pseudomonas fluorescens* et *putida*",. *Bull. OEPP/EPPO*, n° 17, (1987), 559 –568.
8. Lemanceau. P., "Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: Exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents", *Agronomie*, n° 12, (1992), 413 - 437.
9. Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., et Pieterse, C.M.J., "Prospects and challenges for practical application of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance. In: *Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases*", (A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds), *IOBC/wprs Bulletin* vol 25, n°6, (2002), 75-82.
10. Van Loon, L.C., Bakker, P. et Pieterse, C. M.J., "Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria", *Annu. Rev. Phytopatho.*, n°36, (1998), 453-483.
11. Bloemberg. G.V., et Lugtenberg. B.J.J., "Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria", *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol 4,n°4, (2001), 343-350.
12. Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. et Gardan, L. "The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision", *Agronomie.* n° 20, (2000), 51-63.
13. Mirleau, P., "Rôle de la pyoverdine et de la nitrate réductase dans la compétence rhizosphérique et tellurique de la souche *Pseudomonas*

- fluorescens* C7R12", Thèse de Doctorat-Université de Bourgogne, .France, (2000), 88.
14. Timmis, K.N, "*Pseudomonas putida*: A cosmopolitan opportunist par excellence", *Environ Microbiol*, n°4, (2002), 779–781.
  15. Leahy, J.G., Tracy, K.D., Eley, M.H., "Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon- degrading bacteria", *FEMS Microbiol Ecol*, n°43, (2003), 271–276.
  16. Guo, H., et Ecker, J. R., "The ethylene signalling pathway: new insights", *Curr. Opin. Plant Biol.* n° 7, (2004), 40-49.
  17. De La Fuente, L., Thomashow, L., Weller, D., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L., Arias, A., "Pseudomonas fluorescens UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity", *Eur. J. Plant Pathol*, n°110, (2004), 671-681.
  18. Thomashow, L.S., Weller, D.M., "Current Concepts in the Use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites", In: Stacey, G., Keen, N. (Eds.), *Plant Microbe Interactions*, vol. 1. Chapman and Hall Ltd., London, (1996), 187-236.
  19. Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. et Thomashow L.S., "Role of 2,4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots", *Plant Biology*, n°9, (2007), 4-20.
  20. Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., de Kock, M.J.D., "Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation", *Mol. Plant Microbe Interact*, n° 19, (2006), 699-710.
  21. Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., Lugtenberg, B., "Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria". *Environ. Microbio*", n° 7, (2005), 1809-1817.
  22. Barea, J.M. Pozo. M.J, Azcon. R and Azcon-Aguilar. C., "Microbial cooperation in the rhizosphere", *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, n°417, (2005), 1761-1778.
  23. Steenhoudt. O, Vanderleyden. J., "Azopirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects", *FEMS microbial Rev*, n°24, (2000), 487-506.
  24. Vessey. J.K., "Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers". *Plant and Soil*", n° 255, (2003), 571-586.
  25. Palleroni, N.J. The genus *Pseudomonas*. Dans "Practical handbook of microbiology", 2ème édition, Goldman, E. et Green, L.H. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Etats-Unis, (2009). p. 231- 242.
  26. Bossis E, Lemanceau P, Latour X & Gardan L (2000) Taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20: 51-63.



27. Palleroni, N.J. et Moore, E.R.B. Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. Dans "*Pseudomonas*", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, (2004). p. 3-44.
28. Migula, W. Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe*, 1 (1894) 235-238.
29. Palleroni, N.J. Genus I *Pseudomonas*. Dans "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The proteobacteria", 2ème édition, vol. 2, part. B, Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. et Garrity, G.M. (Eds). Springer, New-York, Etats-Unis, (2005). p. 323-379.
30. Höfte, M. et de Vos, P. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. Dans "Plant-associated bacteria", part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Pays-Bas, (2006). p 507-533.
31. Dubuis, C., Keel, C. et Haas, D. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. Dans "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research", Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas, (2007). p 311-328.
32. Suslow.T.V and Schrouth. M.N, "rhizobacteria of sugar beet : effects of seed application and root colonization on yield", *Phytopathology* N° 72, 1982, pp.199 - 206.
33. Xu. G.W and Gross. D.C, "Field evaluations of the interactions among fluorescent *Pseudomonas*, *Erwinia carotovora*, and potato yield", *Phytopathology*, N° 76 , 1986, pp. 423 - 430.
34. Kloepper. J.W, Hume. D.J, Scher. F.M, Singleton. C, Tipping. B, Laliberte. M, Frauley. K, Kutchaw. T, Simouson. C, Lifshitz. R, Zaleska. I and Lee. L, "plant growth promoting rhizobacteria. On. Canola (rapeseed)", *plant .Dis*, N° 72, 1988, pp. 42 - 46.
35. Van peer. R and Shippers. B, "plant growth Reponses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. Strains and rhizosphere microbial development in hyroponic cultures", *Can. J. Microbiol*, N° 35 1989, pp. 456 - 463.
36. Kloepper. J.W, Leong. J, Teintze. M, and Schroth. M.N, "*Pseudomonas*Siderophores: a mechanism explaining disease suppression soils", *Curr. Microbiol*, N° 4, (1980), pp. 317 - 320.
37. Scher. F.M, Baker. R, "Effect of *pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *fusarium* wilt pathogens", *Phytopathology*, N° 72, (1982), pp. 1567 - 1573.
38. Cook. R.J, and Baker. K.F, "The natural and Practices of biological control of plant pathogens", *American phytopathological Society*, St Paul, (1983), pp. 539.
39. Waxlin. F, "Contribution à l'étude de l'action des *Pseudomonas* fluorescents : action sur la croissance et le développement de plantes horticoles", *Mémoire ENITH*, Angers, (1982), pp. 195.
40. Mordukhova. E.A, Skvortsova. N.P, Kochetkov. V.V, Dubeikovskii. A.N, Boronin. A.M, "Synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid by

- rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas* ", Mikrobiologiya, N°60,(1991), pp. 494 - 500.
41. Mahmoud. S.A.Z, Ramadan. E.M, Thabet. F.M, Khater. T, "Production of plant growth promoting substances by rhizosphere microorganisms", Zbl. Mikrobiol, N° 139, (1984), pp. 227 - 232.
  42. Glick. B.R, "The enhancement of plant growth by freeliving bacteria", Canadian Journal of Microbiology, N° 41, (1995), pp. 109 - 117.
  43. Grayston. S.J, Stphens. J.H, Nelson. L.M, "Field and grennhouse studies on growth promotion of spring wheat inoculated with co existent rhizobacteria", plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects, Keel, C., Koller, B and Défago, G, eds, Int. Org. Biol. Control Noxions Anim, plants/West, palaerctic Reg Sec Bull, vol. 1418, (1991), pp. 11-16.
  44. Rodelas. B, Salmeron. V, Martinz – Toledo. M. V, Loper. G.J, "Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically defined media", Plant Soil, vol. 153, (1993), pp. 97 - 101.
  45. Van Loon, L.C, "Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria", *Eur. J. Plant Pathol.* N°119, (2007), pp243-254.
  46. Leigh, G.J. "Nitrogen fixation at the millennium". London: Elsevier Science ,(2002).
  47. Chennoui, N. "Actions des rhizobacteries benifiqueq sur l'amélioration de la stimulation de la croissance des plantes. Importance de la compence rhizosphérique chez *Pseudomonas* spp. fluorescents ".Thèse Magistère. Univ Blida, (2008), p -161.
  48. Grimes, H.D., Mount, M.S. p Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Polus vulgaris* p, *Soil Biot Biochem*, N° 6,(1987),pp 27-30.
  49. Howell. "Recent results of greenhouse and field trials on bacterial induced plant growth promotion with no obvious sytoms of plant disease". In :Proc int Workshop P.G.P.R. Ontario, Canada, (1987), pp 27- 33.
  50. Marschner. H, "Mineral nutrition of higher plants", London: Academic Press, (1997), pp. 889.
  51. Welle. D.M, Raaijmakers. J.M, Gardener. M, and Thomashow. L.S, "Microhial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens", *Annu Rev Phytopathol*, vol. 40, (2002), pp. 309-348.
  52. Remans R, Croonenborghs A, Torres Gutierrez R, Michiels J, Vanderleyden J "Effects of plant growth promoting rhizobacteria on nodulation of *Polus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition". *Eur J Plant Pathol* , 119.(2007),pp:341–351.
  53. Schroth, M.N., and hancock, J.G., "Diseases suppressive soil and root colonizing bacteria", *Science*, N° 216, (1982), pp. 1376 - 1381.
  54. Leong. J, "Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens", *Annu Rev Phytopathol*, N° 24, (1986), pp. 187 - 208.
  55. Neilands.J.B, and Leong. S.A, "Siderophores in relation to plant growth and disease", *Ann. Rev plant. Physiol*, N° 37, (1986), pp. 187 - 208.

56. Hassanjadeh. N, "Role of rhizobacteria in promoting cow pea seed growth", Bulletin SROP, (1991), pp. 14-98.
57. Parmar. N and Dadarwal. K.R, "Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria". Journal of applied microbiology N°86, (1999), pp. 36-44.
58. Becker. J.O, and Cook. R.J, "role of siderophores on suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent *Pseudomonads*", Phytopathology, N° 78, (1988), pp. 778 - 782.
59. De Freitas. J.R, et Germida. J.J, "*Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonad putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *rhizoctonia solani*", Can J Microbiol, N° 37, (1991), pp. 78 - 804.
60. Kraus. J., and Loper. J.E, "Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in Biological control of *Pythium* damping-off of cucumber", Phytopathology, N° 82, (1992), pp. 264 - 271.
61. Sneh. B, Dupler. M, and Elad. Y, Baker. R, "Chlamydo spores germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* Suppressive soil", Phytopathology, N° 74, (1984), pp.1115 - 1124.
62. Lemanceau. P, and Alabouvette. C, "Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent *Pseudomonads*: mechanism and applications", Biocontrol sciences and Technology, N° 3, 1993, pp. 219 - 234.
63. Benchabane. M, Bakour. R, Toua. D, and Boutekrabet. A, "Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate", Bulletin OEPP/EPPO, Bulletin, N° 30, (2000), pp. 243 - 246.
64. Benchabane. M, "Caractérisation des effets d'antagonisme microbienne et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents", Thèse Doctorat d'état, FSB-UTHB, Alger, (2005), pp. 235.
65. Gu, Y. H., et Mazzola, M., "Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8", Soil Biol. Biochem, n° 33, (2001), 1155-1162.
66. Howie, W. J., Gutterson, N. I., et Suslow, T. V., "Osmotolerant mutants of *Pseudomonas putida* strain MK280 are not impaired in cotton rhizosphere and rhizosphere colonization", Soil. Biol. Biochem, n°22, (1990), 839-844.
67. Katsuwon, J., et Anderson, A. J., "Characterization of catalase activities in a root-colonizing isolate of *Pseudomonas putida*", Can. J. Microbiol, n° 38, (1992), 1026-1032.
68. Kuiper, I., Bloemberg, G. V., Noreen, S., Thomas-Oates, J. E., et Lugtenberg, B. J. J., "Increased uptake of putrescine in the rhizosphere inhibits competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365", Mol. Plant-Microbe Interact, n° 14, (2001), 1096-1104.

69. Loper, J. E., Haack, C., et Schroth, M. N., "Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.) ", *Appl. Environ. Microbiol*, n° 49, (1985), 416-422.
70. Mascher, F., Hase, C., Moëgne-Loccoz, Y., et Défago, G., "The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil", *Appl. Environ. Microbiol*, n° 66, (2000), 1662-1667.
71. Sarniguet, A., Kraus, J., Henkels, M. D., Muehlchen, A. M., et Loper, J.E., "The sigma factor sigmaS affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n° 92, (1995), 12255-12259
72. Anraku, Y., et Gennis, R. B., "The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* ", *Trends Biochem. Sci*, n° 12, (1987), 262-266.
73. Weidner, U., Nehls, U., Schneider, R., Fecke, W., Leif, H., Schmiede, A., Friedrich, T., Zensen, R., Schulte, U., Ohnishi, T., et Weiss, H., "Molecular genetic studies of complex I in *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* and *Escherichia coli*", *Biochim, Biophys, Acta*, n° 1101, (1992), 177-180
74. Young, I. G., Jaworowski, A., et Poulis, M. I., "Amplification of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* by gene cloning", *Gene* n° 4, (1978), 25-36.
75. Young, I. G., Rogers, B. L., Campbell, H. D., Jaworowski, A., et Shaw, D. C., "Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* ", *FEBS Lett.* 116, (1981), 165-170.
76. Jaworowski, A., Campbell, H. D., Poulis, M. I., and Young, I. G., Genetic identification and purification of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* ", *Biochemistry* n° 20, (1981a), 2041-2047.
77. Jaworowski, A., Mayo, G., Shaw, D. C., Campbell, H. D, et Young, I. G., "Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in *ndh* mutant membrane vesicles ", *Biochemistry* n° 20, (1981b), 3621-3628.
78. Calhoun, M. W., et Gennis, R. B., "Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane bound respiratory NADH dehydrogenases in *Escherichia coli* ", *J. Bacteriol* n° 175, (1993a), 3013-3019.
79. Calhoun, M. W., Oden, K. L., Gennis, R. B., Teixeira de Mattos, M. J., et Neijssel, O. M., "Energetic efficiency of *Escherichia coli*: Effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain", *J. Bacteriol*, n° 175, (1993b), 3020-3025.
80. Margarita M. Camacho Carvajal, André H. M. Wijffjes, Ine H. M. Mulders, Ben J. J. Lugtenberg, et Guido V. Bloemberg., "Characterization of NADH Dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 and Their Role in Competitive Root Colonization", *MPMI* Vol. 15, n° 7, (2002), 662-671.
81. Stewart, V., "Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria", *Microbiol. Rev* n° 52, (1988), 190-232.

82. Ghiglione, J.-F., Gourbiere .F., Potier .P., L. Philippot, et Lensi, R., "Role of respiratory nitrate reductase in ability of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to colonize the rhizosphere of maize", *Appl. Environ. Microbiol*, n° 66, (2000), 4012–4016.
83. Philippot, L., A. Clays-Josserand, and R. Lensi., "Use of Tn5 mutants to assess the role of dissimilatory nitrite reductase in the competitive abilities of two *Pseudomonas* strains in soil", *Appl. Environ. Microbiol*, n° 61, (1995) ,1426–1430.
84. Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J.-M. Meyer, S. Mazurier, et P. Lemanceau. "Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and Uptake", *FEMS Microbiol. Ecol* n° 34, (2000), 35–44.
85. Bystrova, O.V., Lindner, B., Moll, H., Kocharova, N.A., Knirel, Y.A., Zahringer, U., Pier. G.B., "Structure of the biological repeating unit of the O-antigen of *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 4 containing both 2-acetamido- 2,6-dideoxy-D-glucose and 2-acetamido-2,6-dideoxy-D-galactose", *Carbohydrate Research*, n° 338, (2003), 1801-1806.
86. De Weger, L. A., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B., van Loosdrecht, M. C. M., et Lugtenberg, B. J. J., "Pseudomonas spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize potato roots , in: *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*", NATO ASI Series, Vol. H36. B. J. J. Lugtenberg, ed. Springer-Verlag, Berlin, (1989), 197- 202.
87. Dekkers, I.c., Claartje, c. Phoelich., Van der fits, I, et Lugtenberg b .J. J., "A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365", *Microbiology*, Vol. 95, (1998), 7051–7056.
88. Raaijmakers. J.M, Vlami. M, De Souza. J.T., "Antibiotic production by bacterial biocontrol agents", *Antonie Leeuwenhoek*, N° 81, (2002), 537 – 547.
89. Thomson, N.R., McGowan, S.J., Barnard, A.M.L., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J.L., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. et Salmond, G.P.C., "Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway", *Mol. Microbiol.* Vol 55, N°2, (2005), 526-545.
90. Corbell, N., et Loper, J. E., "A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5", *J. Bacteriol.* N°177, (1995), 6230 – 6236.
91. Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G., et Haas, D., "Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* n° 89, (1992), 1562–1566.
92. Gaffney, T. D., Lam, S. T. Ligon, J., Gates, K., Frazelle, A., Di Maio, J., Hill, S., Goodwin, S., Torkewitz, N., Allshouse, A. M., Kempf, H. J., et Becker, J. O., "Global regulation of expression of anti-fungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain", *Mol. Plant-Microbe Interact*, n°7, (1994), 455– 463.

93. Schnider, U., Keel, C., Blumer, C., Troxler, J., Défago, G., et Haas, D., "Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities", *J. Bacteriol*, n° 177, (1995), 5387–5392.
94. Sarniguet, A., J. Kraus, M. D. Henkels, A. M. Muehlchen, et J. E. Loper., "The sigma factor  $\sigma^S$  affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 ", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n°92, (1995), 12255–12259.
95. Pierson, L. S., Wood, D. W., Pierson, E. A., et Chancey, S. T., "N-Acyl-homoserine lactone-mediated gene regulation in biological control by fluorescent pseudomonads: current knowledge and future work", *Eur. J. Plant Pathol* n° 104, (1998), 1–9.
96. Shipton, P. J., "Take-all decline during cereal monoculture, In G. W. Bruehl (ed.), *Biology and control of soil-borne plant pathogens*", American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., (1975), 137-144.
97. Smiley, R. W., "Wheat-rhizoplane pseudomonads as antagonists of *Gaeumannomyces graminis*", *Soil Biol. Biochem*, n° 11, (1979), 371-376.
98. De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K.N., "Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria", *J. Bacteriol*, n° 172, (1990), 6568–6572.
99. Timms-Wilson, T.M., Ellis, R.J., Renwick, A., Rhodes, D.J., Mavrodi, D.V., Weller, D.M., Thomashow, L.S. and Bailey, M.J, "Chromosomal insertion of phenazine-1-carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*", *Mol. Plant–Microbe Interact*, n° 13, (2000), 1293–1300.
100. Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G. and Thomashow, L.S., "Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1", *J. Bacteriol*, n° 183, (2001), 6454–6465.
101. Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., Reimann, C., Notz, R., Défago, G., Haas, D. et Keel, C., "Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolite salicylate and pyoluteorin", *J. Bacteriol*, n° 182, (2000), 1215– 1225.
102. Pierson, L. S., III, Gaffney, T., Lam, S. et Gong, F., *FEMS Microbiol. Lett*, n° 134, (1995), 299–307.
103. Chin-A-Woeng, T. F. C., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J. et Bloemberg, G. V., *Mol. Plant–Microbe Interac*, n°. 14, (2001), 1006–1015.
104. McDonald, M., Mavrodi, D. V., Thomashow, L. S. & Floss, H. G., *J. Am. Chem. Soc*, n° 123, (2001), 9459–9460.
105. Blankenfeldt, W., Kuzin, A.P., Skarina, T., Korniyenko, Y., Tong, L., Bayer, P., Janning, P., Thomashow, L.S., et Mavrodi, D.V., "Structure and function

- of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*", *biochemistry*. vol. 101, n° 47, (2004), 16431–16436.
106. Shanahan, P., J. D. Glennon, J. J. Crowley, D. F. Donnelly, and F. O'Gara., "Liquid chromatographic assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics for establishing the biosynthetic route to production, and the factors affecting their regulation", *Anal. Chim. Acta*, n° 272, (1993), 271–277.
  107. Hopwood, D. A., et Sherman. D. H., "Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis", *Annu. Rev. Genet*, n° 24, (1990), 37–66.
  108. Hutchinson, C. R., et Fujii., I., "Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics", *Annu. Rev. Microbiol*, n° 49, (1995), 201–238.
  109. Lugtenberg B.J.J., Kravchenko, L.V., Simons, M., "Tomato seed and root exudates sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization", *Environ Microbiol*, n°1, (1999), 439-446.
  110. Simons, M., van der Bij, A. J., Brand, I., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., et Lugtenberg, B. J. J., "Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact*, n° 9, (1996), 600-607.
  111. Vilchez, S., Molina, L., Ramos, C., and Ramos, J. L., "Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: Cloning, characterization, and expression of the *put* genes in the presence of root exudates. *J. Bacteriol*, n° 182, (2000), 91-99.
  112. Wang, S. S., et Brandriss, M. C., "Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence, regulation, and mitochondrial localization of the *PUT1* gene product", *Mol. Cell. Biol*, n° 7, (1987), 4431–4440.
  113. Maloy, S., et Stewart, V., "Autogenous regulation of gene expression", *J. Bacteriol*, n° 175, (1993), 307–316.
  114. Hayward, D. C., S. J. Delaney, H. D. Campbell, A. Ghysen, S. Benzer, A. B. Kasprzak, J. N. Cotsell, I. G. Young, et G. L. Gabor Miklos., "The sluggish-A gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrial enzyme involved in glutamate biosynthesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n° 90, (1993), 2979–2983.
  115. Gallegos, M. T., Williams, P. A., et Ramos, J. L., "Transcriptional control of the multiple catabolic pathways encoded on the TOL plasmid pWW53 of *Pseudomonas putida* MT53", *J. Bacteriol*, n° 179, (1997), 5024–5029.
  116. Von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M., et Bremer, E., "Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma b", *Mol. Microbiol*, n° 25, (1997), 175–187.
  117. Coates, C.J., Kaminski, Summers, J.M., Segal, J.B., Miller, D.J., Kolb, A.D, "Site-directed genome modification: derivatives of DNA-modifying enzymes as targeting tools". *Trends in Biotechnology* 23 vol 8, (2005), 407–19.
  118. Harrison, M.J., Signalling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, n° 59, (2005), 19-42.

119. Viollet, A., Mazurier, S., "Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. Fluorescents non pathogènes", INRA-Université de Bourgogne-Unité Mixte de Recherche 1229 Microbiologie des Sols et de l'Environnement. 2010.
120. Warmink, J.A. et van Elsas, J.D., Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved", *ISME Journal*, n°2, (2008), 887-900.
121. Gamalero, E., Martinotti, M.G., Trotta, A., Lemanceau, P. et Berta, G., "Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to the plant growth conditions", *New Phytologist*, n° 155, (2002), 293-300.
122. Mazurier, S., Lemunier, M., Siblot, S., Mougel, C. et Lemanceau, P., "Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads", *FEMS Microbiology Ecology*, n° 49, (2004), 455-467.
123. Preston, G.M., Bertrand, N. et Rainey, B. "Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25", *Molecular Microbiology*, n° 41, (2001), 999-1014.
124. Viollet, A., Mazurier, S., "Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. Fluorescents non pathogènes", INRA-Université de Bourgogne-Unité Mixte de Recherche 1229 Microbiologie des Sols et de l'Environnement. 2010.
125. Stephen P. Diggle, Shanika A. Cruz et Miguel Cámara, "Quorum sensing", *Current Biology*", Vol 17, n° 21, R908.
126. Saitou, N., et Nei, M., "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol*, n° 4, (1987), 406– 425.
127. Pierson, E.A., Wood, D.W., Cannon, J.A., Blachere, F.M., et Pierson, L.S., "Interpopulation signaling via N-acyl-homoserine lactones among bacteria in the wheat rhizosphere", *Mol. Plant- Microbe Interact*, n° 11, (1998), 1078–1084.
128. Subramoni, S., et Venturi, V., "LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules", *Microbiology*, n° 155, (2009), 1377– 1385.
129. Von Rad, U., I. Klein, P.I. Dobrev, J. Kottova, E. Zazimalova, A. Fekete, A. Hartmann, P. Schmitt-Kopplin, and J. Durner., "Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserinylactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere", *Planta*, n° 229, (2008), 73–85.
130. Yoshida, S., L.L. Kinkel, H. Shinohara, N. Numajiri, S. Hiradate, M. Koitabashi, K. Suyama, H. Negishi, et S. Tsushima., "Production of quorum-sensing-related signal molecules by epiphytic bacteria inhabiting wheat heads", *Can. J. Microbiol*, n° 52, (2006), 411–418.
131. Venturi, V., "Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*", *FEMS Microbiol. Rev*, n° 30, (2006), 274–291.
132. Gonzalez. J.E, Marketon. M.M., "Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia", *Microbiology and molecular biology reviews*, Vol. 67, N°4, (Decembre 2003), 574-592,



133. March. J. C et Bentley. W.E, "Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology", *Curr. Opin. Biotechnol.* N°15, (2004), 495-502.
134. Jafra, S., J. Przynsowa, R. Czajkowski, A. Michta, P. Garbeva, et J.M. Van der Wolf., "Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone", *Can. J. Microbiol.*, n° 52, (2006), 1006–1015.
135. Morohoshi, T., A. Ebata, S. Nakazawa, N. Kato, and T. Ikeda., "N-acyl homoserine lactone-producing or -degrading bacteria isolated from the intestinal microbial flora of ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) ", *Microbes Environ.*, n° 20, (2005), 264–268.
136. Morohoshi, T., Someya, N., et Ikeda, T., "Novel N-acyl homoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, n° 73, (2009.), 2124–2127.
137. Folschweiller, N et al., "The pyoverdine receptor FpvA, a TonB dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa*", *Mol. Membr. Biol.*, n° 17, (2000), 123–133.
138. Fuchs, R. et al., "Siderotyping – a powerful tool for the characterization of pyoverdines", *Curr. Top. Med. Chem.*, n°1, (2001), 31–57.
139. Budzikiewicz, H., "Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp)", *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, n° 87, (2004), 81–237.
140. Haas, D. et Defago, G., "Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads", *Nat. Rev. Microbiol.* Vol 3, n°4, (2005), 307-319.
141. Compant, S. et al., "Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects", *Appl. Environ. Microbiol.*, n° 71, (2005), 4951–4959.
142. Faraldo-Gomez, J.D. et Sansom, M.S., "Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, n° 4, (2003), 105–116.
143. Postle, K., et Kadner, R.J., "Touch and go: tying TonB to transport. *Mol.*, *Microbiol.*, n° 49, (2003), 869–882.
144. Braun, V., et Mahren, S., "Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the *Escherichia coli* Fec type", *FEMS Microbiol. Rev.*, n° 29, (2005), 673–684.
145. Lamont, I.L. et al., "Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, n° 99, (2002), 7072–7077.
146. Beare, P.A. et al., "Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis", *Mol. Microbiol.*, n° 47, (2003), 195–207.
147. Visca, P. Francesco Imperi et Iain L. Lamont., "Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance", *Trends in Microbiology*, Vol, 15, n°1, (2006).
148. Marschner, H., "Mineral Nutrition of Higher Plants", Academic Press, London, (1995).

149. Neilands, J.B., "Siderophores of bacteria and fungi. Microbiological Sciences", n°1, (1984).9-14.
150. Takagi, S., "Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings", Soil Science and Plant Nutrition, n° 22, (1976), 423-433.
151. Fan, T.W.M., Lane, A.N., Pedler, J., Crowley, D., Higashi, R.M., "Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectroscopy", Analytical Biochemistry, n° 251, (1997), 57-68.
152. Von Wiren, N., Roemheld, V., Morel, J.L., Guckert, A., Marschner, H., "Influence of microorganisms on iron acquisition in maize", Soil Biology & Biochemistry, n° 25, (1993), 371-376.
153. Dybvig, K., (1993), *Mol. Microbiol.*, n° 10, 465-471.
154. Sauer, B., Schlake, T., Iber, M., Schübeler, D., Seibler, J., Snezhkov, E., Nikolaev, L., "The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes". Biological Chemistry n° 381, vol 9-10, (2000), 801-13.
155. Sauer, B., "Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem". Methods vol, 14, n° 4, (1998), 381-92.
156. Kolb, A.F., "Genome Engineering Using Site-Specific Recombinases", *Cloning & Stem Cells* n°4, (2002), 65-80.
157. Nash, H. "Site-specific recombination: Integration, excision, resolution, and inversion of defined DNA segments. In *Escherichia Coli and Salmonella*", Vol 1, (1996).
158. Zeig, J., Silverman, H., Hilmen, H. & Simon, M. (1977) *Science* 196, 170-175.
159. Latour X., et Lemanceau, P., "Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophytes à oxydase positive", *Agronomie*. n° 17,(1997), 427-443.
160. Jann, A., Cavard, D., Martin, C., Cami, B. & Patte, J.-C. (1990) *Mol. Microbiol.* 4, 667-682.
161. France, J., Thornley, J.H.M., "Mathematical Models in Agriculture".(1984). Butterworths, London.
162. Baranyi, J., Roberts, T.A., "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food". *Int. J. Food Microbiol.* 23, (1994). 277- 294.
163. Baranyi, J., Roberts, T.A., "Mathematics of predictive food microbiology". *Int. J. Food Microbiol* n°26, (1995). 199- 218.
164. Paustian, K., "Modelling soil biology and biochemical processes for sustainable agricultural research". In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, R. (Eds.), *Soil. Biota. Management in Sustainable Farming Systems*, CSIRO Information Services, Melbourne, (1994). pp. 182-193.
165. Jenkinson, D.S., "The turnover of organic carbon and nitrogen in soil". *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 329, (1990). 361-368.
166. Parton, W.J., Stewart, J.W.B., Cole, C.V., "Dynamics of C, N, P, and S in grassland soils: a model". *Biogeochem* n° 5, (1988). 109-131.

167. Turner, B.G., Ramakrishna, D., Jansen, N.B., "Cybernetic modeling of bacterial cultures at low growth rates: singlesubstrate systems". *Biotech. Bioeng* n° 34, (1989). 252-261.
168. Jason, A.C., "A deterministic model for monophasic growth of batch cultures of bacteria". *Antonie Van Leeuwenhoek* n° 49, (1983).513– 536.
169. Hunt, H.W., Coleman, D.C., Ingham, E.R., Ingham, R.E., Elliott, E.T., Moore, J.C., Rose, J., Reid, C., Morely, C.R., "The detrital food web in a shortgrass prairie". *Biol. Fert. Soils* 3, (1987). 57- 68.
170. Schepers, A.W., Thibault, J., Lacroix, C. "Comparison of simple neural networks and nonlinear regression models for descriptive modeling of *Lactobacillus helveticus* growth in pH-controlled batch cultures". *Enzyme Microb. Technol.*n° 26, (2000), 431– 445.
171. Dalgaard, P., Koutsoumanis, K., "Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models". *J. Microbiol. Methods* n°43, (2001). 183– 196.
172. Lopez, S., Prieto M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J. "Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth".*International Journal of Food Microbiology* ,n° 96, (2004), 289– 300.
173. Darrah P. R. (1991) "Models of the rhizosphere. 1. Microbial population dynamics around a root releasing soluble and insoluble carbon". *Plant and Soil* n°133.(1991), 187-199.
174. Darrah P. R. "Models of the rhizosphere. 2. Quasi three dimensional simulation of the microbial population dynamics around a root releasing soluble exudates". *Plant and Soil* n° 138, (1991) . 147-158.
175. Baranyi, J., "Simple is good as long as it is enough". *Food Microbiol* n°14, (1997). 391– 394.
176. Panikov, N.S. ," Understanding and prediction of soil microbial community dynamics under global change"*Applied Soil Ecology*n° 11, (1999) 161-176.
177. McMeekin, T.A., Ross, T., "Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management". *Int. J. Food Microbiol* n°78, (2002). 133– 153.
178. Schaffner, D.W., 1998. "Predictive food microbiology Gedanken experiment: why do microbial growth data require a transformation? " *Food Microbiol* n°15, 185– 189.
179. Bensaid.F, "Etude de l'effet des *Pseudomonas* spp. fluorescents et de l'isolat FO47 de *Fusarium oxysporum* non pathogene dans la lutte biologique vis-à-vis des fusariose vasculaires", Thèse magister agro Blida. (2006), 135.
180. King. E.O, Wark. M.K et Raney.D.E, "Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and chemical medicine*", n°44, (1954), 301-307.
181. Latour. X, Corberand.T, Laguerre. G, Allard. F, Lemanceau. P, "The composition of fluorescent *Pseudomonads* associated with roots is

- influenced by plant soil type", Applied and environmental microbiology, Vol.62, n°7, (1996), 2449-2456.
182. Dagenelie. P, "Théories et méthodes statistiques. Les méthodes de l'interférence statistique", Les presses agronomiques de Gem blouse. (1975), 463.
  183. Meyer, J.M., Abdallah, M.A., "The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physiochemical properties", J. Gen. Microbiol, n° 107, (1978), 319–328.
  184. Snow, G.A., "Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*: II. Degradation and identification of fragments", J. Chem. Soc, (1954), 2588–2596.
  185. Newman E. I. and Watson A. G., "Microbial abundance in the rhizosphere: a computer model. Plant and Soil, n° 48, (1977), 17-56.
  186. Luedeking, R., Piret, E.L., "A kinetic study of the lactic acid fermentation: Batch process at controlled pH", J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng, n° 1, (1959) 363–394.
  187. Scher. F.M, Leigle. J.S, Kloepper. W, "a Methode for assessing the root colonizing capacity of bacteria on maize». Can.J.Microbiol, n°44, (1984), 156-161.
  188. Anjaiah, V., Koedam, N., Nowak-Thompson, B., Loper, J.E., Ho"fte, M., Tambong, J.T., Cornelis, P., "Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp", Mol. Plant Microbe Interact, n° 11, (1998), 847-854.
  189. Hinsinger. P, "Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. Plant and soil. n°237, (2001), 173-195.
  190. Wang. E. T, Tan. Z. Y, Willems. A, Fernández-López. M, Reinhold-Hurek. B, and Martínez-Romero. E, "*Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics» International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 52, n°5, (2002), 1687-1693.
  191. Chennaoui. N, "actions des rhizobacteries bénéfiques sur l'amélioration de la stimulation de la croissance des plantes : Importance de la compétence rhizosphérique chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents». Thèse Magister. USD. Blida. (2008), 161.
  192. Ousrir. S, "étude des effets de la co-inoculation des rhizobacteries (*pseudomonas* spp. fluorescents et *rhizobium* spp.) sur la phytostimulation et la nodulation chez la feve. thèse magister. usd. blida. (2009).
  193. Singh. C. P, Amberger. A, «Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate». Biorource Technology. N°68, (1998), pp. 13-16.
  194. Pierson. L.S, Weller. D.M, «Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat». *Phytopathology*, N°84, (1994), pp. 940-947.

195. Young. S, Pharis. R.P, Reid. D, Reddy. M.S, Lifshitz. R and Brown. G, «PGPR: is there a relationship between plant growth regulators and the stimulation of plant growth or biological activity». In «plant growth promoting rhizobacteria». Progress and prospects. (Keel, C., Koller, B., and Défago, G. eds), IOB/WPRS Bulletin XIV / N°8, (1991), pp. 182-186.
196. Di Battista-Leboeuf. C, Benzili. E, Corbel. G, Puitti. S and Guckert. A, 2003. «Distribution of *Pseudomonas* sp. populations in relation to maize root location and growth stage». Agronomie, n°23, (2003), 441–446.
197. Botelho. G.R and Mendonça-Hagler. L.C, «Fluorescent *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of crops – An overview», N° 37, (March 2006), 401 – 416.
198. Fuchs, J.-G., MoeËne-Loccoz, Y., DeÂfago, G., “The laboratory medium used to grow bicontrol *Pseudomonas* sp. Pf153 influences its subsequent ability to protect cucumber black root rot. “ Soil Biol. Biochem. 32, (2000), 421-424.
199. Bogosian, G., N. D. Aardema, E. V. Bourneuf, P. J. L. Morris, and J. P. O’Neil. “Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. J. Bacteriol. 182, (2000), 5070–5075.
200. Chin-A-Woeng. T.F, Bloemberg. G.V, Mulders. I.H, Dekkers. L.C et Lugtenberg, B. J., “Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot». Mol Plant Microbe Interact", n°13, (2000), 1340-1345.
201. Fonseca. M.C.C, «Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)», Seropédica RJ, (PhD. Thesis. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). 2003. 136.
202. Fonseca. M.C.C, Rumjanek. N.G, Xavier. G.R, “Quorum sensing: um nova interpretação da incidência e controle de doenças de plantas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia». (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 170). (2004), 37.
203. Elizabeth m. Scott, Elizabeth a. s. Rattray, j. i. Prosser,) k. Killham, l. a. Glover, j. m. Lynch and m. j. Bazin. “A mathematical model for dispersal of bacterial inoculants colonizing the wheat rhizosphere“.soil biol. biochem. vol. 27, no. 10, 1995. 1307-1318,
204. Schmid, R.D., “Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique. Medecine-science.flammarion, (2002).
205. Fahy, A., Lethbridge, G., Earle, R., Ball, A.S., Timmis, K.N., McGenity, T.J., “Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater”, Environ Microbiol, n°7, (2005), 1192–1199.
206. Digat, B., GARDAN., «Caractérisation, variabilité et selection des souches bénéfiques de *pseudomonas fluorescens* et *putida*“, . Bull. OEPP/EPPO, n° 17, (1987), 559 –568.
207. Linget, C., Slylianou, D.G., Dell, A., Wolff, R.E., Piémont, Y., et Abdallah, M.A., “Bacterial siderophores: The structure of a desferriabactin produced by *Pseudomonas fluorescens* ATTC 13525”, Tetrahedron Letters 33, (1992), 3851-3854.

208. Demange, P., Wenderbaum, S., Bateman, A., Dell, A., et Abdallah, M.A., "Bacterial siderophores: structure and physicochemical properties of pyoverdins and related compounds", In G. Winkelman, D.v.d. Helm y J.B. Neilands (Eds). Iron Transport in Microbes, (1987), 167-187.
209. Casida, L.E. J.R., 1992. Competitive ability and survival in soil of *Pseudomonas* strain 679-2 a dominant, nonobligate bacterial predator of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58:32-37.
210. Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., et Pieterse, C.M.J., "Prospects and challenges for practical application of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance. In: Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases", (A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds), IOBC/wprs Bulletin vol 25, n°6, (2002), 75-82.
211. Sharma, A. Johri, B.N. "Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiate* L.Wilzeck), Microbiol. Res. 158 (2003) 77–81.
212. Meyer, J.M., Abdallah, M.A., "The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties", J. Gen. Microbiol, n° 107, (1978), 319–328.
213. Silva, G.A. Almeida, E.A. "Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*", Braz. Arch. Biol. Technol. 49 (2006) 411–419.
214. Janisiewicz, W.J., Marchi, A., "Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. Plant", Dis, n° 76, (1992), 555-560.
215. Earhart, C. F., "Uptake and metabolism of iron and molybdenum", In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), "Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology", 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, DC, (1996), 1075-1090.
216. Byers, B. R., et Arceneaux, J. E. L., "Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms, In A. Sigel and H. Sigel (ed.), Metal ions in biological systems: iron transport and storage in microorganisms", plants, and animals, vol. 35. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, (1998), 37-66.
217. Gross, D. C., "Regulation of syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production", J. Appl. Bacteriol, n° 58,( 1985),167-174.
218. Morgan, M. K., et Chatterjee, A. K., "Genetic organization and regulation of proteins associated with production of syringotoxin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*", J. Bacteriol,n° 170, (1988), 5689-5697.
219. Vasil, M. L., et Ochsner, U. A., "The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence", Mol. Microbiol,° 34, (1999), 399-413.
220. Neilands, J. B., "Iron absorption and transport in microorganisms", Annu. Rev. Nutr,n° 1,(1981), 27-46.

221. Neilands, J. B., " Methodology of siderophores", Struct. Bonding, n° 58,(1984), 1-24.
222. Barclay, R., "The role of iron in infection", Med. Lab. Scin° 42,( 1985), 166-177.
223. Weller. D. M. " *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years ".U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Root Disease and Biological Control Research Unit, Washington State University, Pullman , (2007), 99164-6430.
224. Sarker. Ruhul, A ; Newton. Charles, S." Optimization Modelling A Practical Approach". (2008). CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.
225. Sarma, M.V.R.K.. Sahai, Vikram, Bisaria, V.S.." Genetic algorithm-based medium optimization for enhanced production of fluorescent pseudomonad R81 and siderophore". Biochemical Engineering Journal, n°47, (2009), 100–108.

