

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

Université BLIDA-1



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue d'obtention Du diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Option : Microbiologie

## Thème

**Isolement et caractérisation de quelques souches de  
*Pseudomonas* spp. fluorescents productrices d'antibiotiques de  
nature phenazinique**

Réalisé par : *M<sup>lle</sup>*. Ouargui Hassina

*M<sup>lle</sup>*. Chaalal Roufaïda

Date de soutenance : **08/07/2019**

Devant les membre de jury :

Mme Zerouti K.	MAA	UB1	Présidente
Mme Matmoura A.	MAA	UB1	Examinatrice
Mme Ait Saadi N.	MAA	UB1	Promotrice

Promotion 2019-2020

## *Remerciement*

*Nous tenons tout d'abord à remercier sincèrement notre promotrice Mme Ait Saadi pour avoir bien voulu diriger ce travail en nous faisant part de ses connaissances, ses remarques et ses conseils.*

*Nous n'oublions pas de remercier les membres du jury Mme Zerrouti , et Mme Matmoura qui ont accepté d'examiner ce travail.*

*Nos sincères remerciements à tous ceux et celles que nous avons rencontré et qui nous ont aidé durant nos 5 ans des études universitaires. Nos vifs remerciements s'adressent à la directrice du groupe Saïdal madame Mechwek.D Ainsi que tous les travailleurs de Saïdal grâce à leurs sympathie ,leurs générosité , leurs patience qu'on a pu effectuer notre partie expérimentale dans de bonnes conditions .*

*Merci*

## *Dédicace*

*Bien que ce mémoire représente une très grande satisfaction personnelle, il demeure avant tout important pour moi d'exprimer mes sincères dédicaces à toutes celles et ceux qui, de façon directe ou indirecte, m'ont aidée à réaliser ce projet. Tout d'abord je dédie ce mémoire, À mes **Parents** qui ont tout fait pour moi, Pour m'avoir soutenue tout au long de mes Etudes, pour leurs encouragements, conseils, soutiens et leurs sacrifices, mes sœurs et mon petit frère. mes grand mères , mon grand père que son âme repose en paix et que j'aimerais bien qu'il soit présent à ma soutenance, mes oncles , mes cousins , mes cousines, ainsi que toute ma famille . et mes amis en particulier **Walid** , **Chahinez** , **Meriem** , **Ilhem** ,et **Ines** qui m'ont consacré une partie de leur temps Cette réussite n'aurais jamais vu le jour, sans l'appui moral et intellectuel des membres de ma familles et mes amis.*

*Hassina.*

# *Dédicace*

*C'est grâce à Dieu «الله» le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie*

*:*

*A mes très chères parents " Mohammed et Saida " que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.*

*A mes chères sœurs : Selma, Kholoud, Ikram.*

*A mon chère Frère : Lokman.*

*A mon fiancé Mohammed Amine.*

*A ma meilleur amie d'enfance : Rumeysa.*

*Sans que j'oublie ma tante Ouahiba.*

*Roufaida*

## Résumé

Notre étude qui porte sur l'isolement et la caractérisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents a été réalisée à partir de deux échantillons de sol rhizosphérique d'une plante médicinale *Zygophyllum album* (Aggaya) du sud Algérien (Adrar) qui est un exemple typique d'un milieu extrême qui abritent des microorganismes résistants à des températures élevées, leurs conférant ainsi des caractéristiques révélant un véritable atout biotechnologique. 10 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été retenues sur 25 à partir des sols rhizosphériques. D'après les résultats de l'identification (macroscopiques, microscopiques, biochimique et galerie Api 20NE), les souches ont été affiliées aux espèces, *P.fluorescens* (5souches) et *P.putida* (5 souches). Les souches retenues ont été criblées *in vitro* pour leur activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* avec deux formats spéciales F.sp. *lini* et f.sp. *lycopercisi* par la technique de confrontation directe. Les souches de *Pseudomonas* Pf1, Pf2 et Pf7 ont montré une inhibition importante de la croissance mycélienne avec un pourcentage d'inhibition de 50%, 57% et 56 % respectivement. Un métabolite de nature phénazinique a été extrait à partir de la culture de la souche Pf2. Ce dernier a été purifié par l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM). Les valeurs de rapport frontal « Rf » obtenus variaient de 0,73 à 0,84 pour les deux solvants (chloroforme acétone et l'hexane) testés. Les extraits obtenues ont montré une activité inhibitrice des trois pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi*) testés. A la fin cet extrait de surnageant a été identifié par HPLC avec un temps de rétention de 8.604 presque identique de celui de standard (8.646 min).

**Mots clés :** sol, *Pseudomonas* spp.fluorecents , antagoniste , *fusarium oxysporum*

Phenazine

## Abstract

Our study, which deals with the isolation and characterization of *Pseudomonas* spp. fluorescents was made from two soil samples from rhizospheric soil of medical plant *Zygophyllum album* (Aggaya) from southern Algeria (Adrar) which is a typical example of an extreme environment that harbor microorganisms resistant to high temperatures, giving them characteristics that reveal a true biotechnological asset. 10 strains of *Pseudomonas* spp. Fluorescents of 25 were isolated from rhizospheric soils. According to the results of the identification (macroscopic, microscopic, biochemical and Api 20NE gallery), the strains were affiliated with the species, *P.fluorescens* (5souches) and *P.putida* (5 strains). The strains retained were screened in vitro for their antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* with two special sizes *f.sp lini* and *f.sp lycopersici* by the direct confrontation technique. The strains of *Pseudomonas* Pf1, Pf2 and Pf7 showed significant inhibition of mycelial growth with a percent inhibition of 50%, 57% and 56% respectively. A phenazine metabolite was extracted from the culture of strain Pf2. The latter has been purified by the use of thin layer chromatography (TLC). The "Rf" frontal ratio values obtained ranged from 0.73 to 0.84 for the two solvents (chloroform acetone and hexane) tested. The extracts obtained showed an inhibitory activity of the three pathogens (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*) tested. At the end, this supernatant extract was identified by HPLC with a retention time of 8.604 almost identical to that of standard (8.646 min).

**Key words:** soil, *Pseudomonas* spp. Fluorescents, *Fusarium oxysporum*, Phenazine

## الملخص

تناولت دراستنا عزل وتوصيف بكتيريا ال fluorescent *Pseudomonas* spp من عيني من تربة جنوب الجزائر(ادرار) ، والتي تعد مثلاً نموذجياً للبيئة القاسية التي تحتوي على الكائنات الحية الدقيقة المقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة. وبالتالي فهي تمنح مميزات مذهشة تكشف حقائق التكنولوجيا الحيوية. تم عزل 10 سلالات *Pseudomonas* spp. fluorescent من 25 من جذور نبتة طبية *Zygophyllum album* (اغايا) بولاية أدرار. وفقاً لنتائج الكشف العياني و المجهرى و البيوكيميائي ، كانت السلالات مرتبطة بالأنواع ، *P.putida* و *P.fluorescens*. تمت دراسة جميع العزلات بسبب فاعليتها ضد فطر *F. muropyxio* *f.sp. lycopersici* et *f.sp. lini* باستخدام تقنية المواجهة في المخبر، حيث أظهرت السلالات Pf1 و Pf2 و Pf7 تثبيطاً كبيراً على نمو الفطر بنسبة 50% و 57% و 56% على التوالي. واستخراج المضاد الحيوي الفينازين من سلالة Pf2 ، وتم تصفيته باستخدام تقنية كروماتو جرافيا الطبقة الرقيقة (CCM). تراوحت قيم Rf التي تم الحصول عليها بواسطة المذيبين ( acetate d'ethyl, hexane ) من 0.73 إلى 0.84 أظهرت المستخلصات التي تم الحصول عليها نشاطاً مثبطاً على نمو ثلاثة بكتيريا ممرضة (الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية والسلمونيلا التيفية). في النهاية ، تم تحديد هذا المستخلص من بواسطة تقنية ال HPLC مع وقت الاحتفاظ 8.604 مطابق تقريباً لمعيار الفينازين (8.646 دقيقة)،

لكلمات المفتاحية : التربة, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas* spp fluorecents, الفينازين

## Liste des abréviations

**AE** : Acétate d'éthyle

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BGN** : Bacille a gram négatif

**CCM** : chromatographie sur couche mine

**DAPG** : 2,4-diacetylphloroglucinol.

**G+C**: guanine + cytosine (coefficient de Chargaff)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: eau oxygénée.

**HCN**: cyanure d'hydrogène

**HPLC**: high performance liquid chromatography.

**MH** : Muller Hinton (milieu de culture)

**NBY**: nutrient broth yeast extract.

**PCA**: phénazine-1-carboxylate.

**PDA**: potato dextrose agar.

**PGPR**: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

**PH** : potentiel d'hydrogène

**QS**: Quorum Sensing.

**Rf**: rapport frontal

**rpm**: Rotation par minute.

**UV** : ultraviolet

**V/V** : volume par volume



## Liste des tableaux

<b>Tableau I. Les pigments de Pseudomonas spp. fluorescents (Weller et cook., 1983).....</b>	<b>5</b>
<b>Tableau II. Antibiotiques produits par les agents de biocontrôle bactériens(Raaijmakers et al.,2002).....</b>	<b>12</b>
<b>Tableau III. Quelques Caracteristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées .....</b>	<b>29</b>
<b>Tableau IV. Résultats de l'identification par Api20NE (Originale 2019) .....</b>	<b>30</b>
<b>Tableau V . diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur KINGB .....</b>	<b>59</b>
<b>Tableau VI. diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur PDA .....</b>	<b>59</b>
<b>Tableau VII . Diamètre d'inhibitions pour les deux solvants après une antibiographie ...</b>	<b>60</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : schéma général de caractérisation du groupe <i>Pseudomonas fluorescens-putida</i> .....	7
<b>Figure 2.</b> Colonisation des racines par des <i>Pseudomonas fluorescents</i> .....	8
<b>Figure 3.</b> Schéma récapitulatif des principales activités phytobénéfiques .....	11
<b>Figure 4:</b> Les composés antibiotiques produits par les <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> .....	13
<b>Figure 5.</b> Schéma simplifié de la régulation par le système GacA/GacS chez les <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> .....	14
<b>Figure 6.</b> Méthode de confrontation directe entre les souches de <i>Pseudomonas spp fluorescents</i> et le champignon <i>Fusarium oxysporum</i> .....	22
<b>Figure 7.</b> protocole de production et d'extraction des phénazines par la souche .....	24
<b>Figure 8.</b> Réalisation de La plaque CCM .....	25
<b>Figure 9.</b> Principe de fonctionnement de HPLC .....	27
<b>Figure 10.</b> La fréquence des souches de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> dans le .....	28
<b>Figure 11.</b> : Résultat de l'isolement des souches de <i>Pseudomonas spp. fluorecents</i> ...	29
<b>Figure 12.</b> Caractéristiques morphologique et biochimique des souches de <i>Pseudomonas spp. fluorescent</i> .....	30
<b>Figure 13.</b> Identification de <i>Pseudomonas fluorescents</i> par Api20NE .....	30
<b>Figure 14.</b> Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu KingB.....	33
<b>Figure 15.</b> Essai de test antifongique sur milieu King B .....	34
<b>Figure 16</b> . Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu PDA .....	34
<b>Figure 17.</b> Essai de test antifongique sur le milieu PDA.....	34
<b>Figure 18.</b> Extraction d'extrait d'antibiotique par des solvants organiques.....	35
<b>Figure 19.</b> L'antibiographie des extraits obtenus .....	36
<b>Figure 20.</b> Le diamètre des zones d'inhibitions dans le cas de solvant (AE).....	37
<b>Figure 21.</b> Le diamètre des zones d'inhibition dans le cas de solvant l'hexane.....	37
<b>Figure 22.</b> La moyenne des zones d'inhibition en (mm) obtenus par l'acétate d'éthyle .....	37
<b>Figure23</b> : Resultat de la chromatographie sur couche mince (Originale ,2019)...	38
<b>Figure 24.</b> Interpretation de la plaque CCM (Originale2019).....	39
<b>Figure 25.</b> Le rapport frontal de l'extrait de surnageant PF2 et le standard de phénazine obtenu par l'hexane-méthanol (AM).....	40
<b>Figure 26.</b> Le rapport frontal de l'extrait Pf2et le standard de phenazine obtenu par ..	40
<b>Figure 27.</b> Le chromatogramme du standard PCA (phenazine carboxlic acide).....	41
<b>Figure 28.</b> Le chromatogramme de l'essai de l'extrait de Pf2 .....	41

# Sommaire

## Chapitre I : Synthèses bibliographique

I. Généralités sur les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	3
I.1. DEFINITION PGPR.....	3
I.2. Forme des PGPR.....	3
I.3. La diversité des PGPR .....	3
II. <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents .....	4
II.1 GENERALITE .....	4
II.2 Taxonomie .....	5
II.3. Caractéristiques généraux de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents .....	6
II.3.1. Caractéristiques phénotypiques .....	6
III. Effet bénéfique de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	8
III.1 INTERACTION PLANTE – BACTERIE.....	8
III.2 Stimulation de la croissance .....	9
III.3 Induction systémique de la résistance des plantes.....	10
III.4 La compétition trophique.....	10
IV. Molécules antimicrobiennes connues chez les <i>Pseudomonas</i> spp . fluorescents.....	11
IV.1 ANTIBIOTIQUES DE NATURES PHENAZINIQUE .....	12
IV.1.1 Régulation de la production des antibiotiques par le genre <i>Pseudomonas</i> .....	14
IV.1.2 Rôle .....	14
IV.1.3. Mode d'action .....	15
VI. Applications de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	16

## Chapitre II: Matériel et méthodes

I. Matériel .....	17
I.1.1. MATERIEL NON BIOLOGIQUE .....	17
I.1.2. Matériel biologique .....	17
II.1.2.1 le sol.....	17
II.1.2.2. Souches pathogènes .....	17
II.2. Methodes.....	18
II.2.1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES .....	18
II.2.1.1 Préparation des dilutions.....	18
II.2.1.2.Mise en culture.....	18
II.2.1.3. Purification.....	19

II.2.2. Identification phenotypique des isolats de <i>Pseudomonas</i> .....	19
II.2.2.1. PRODUCTION DU PIGMENT FLUORESCENT .....	19
II.2.2.2. Etude microscopique.....	19
II.2.2.3. Recherche de la catalase .....	19
II.2.2.4. Recherche de l'oxydase .....	20
II.2.3. Test d'activite antagoniste in vitro des souches de pseudomonas spp. fluorescents .....	21
II.2.3.1. PURIFICATION DES SOUCHES FONGIQUES .....	21
II.2.3.2. Sélection des souches antagonistes in vitro .....	21
II.2.4. Recherche des composes a effet antibiotique de nature phenazinique .....	22
II.2.4.1. EXTRACTION DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE .....	23
II.2.4.2. Analyse des composes a effet antibiotique phenaziniques .....	25

### **Chapitre III: Résultats et discussion**

III.1 Fréquence des souches isolées à partir du sol .....	28
III.2. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES.....	29
III. 3 Résultats de la sélection des souches de Pseudomonas spp. fluorescents antagonistes ..	32
III.4 Résultats d'extraction d'antibiotique.....	35
III.4.1 Resultats de purification et identification d'antibiotique .....	38
III5.1 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	38
III.5.2 Chromatographie liquide a haute performance HPLC .....	40

# *Introduction*

Le sol, symbole de la production agricole, est le support de la biodiversité. C'est le réacteur biologique qui assure de nombreuses fonctions environnementales. Il offre un habitat pour un très grand nombre de microorganismes y compris les bactéries, et les champignons (**Thomashow et Weller, 1988 ; Voisard et al., 1989**).

Les maladies des plantes sont devenues une menace majeure pour la production agricole et la stabilité des écosystèmes naturels, les pertes économiques sont énormes. En effet les maladies phytopathogènes réduisent de 20% à 35% la production agricole mondiale (**Trivedi et al, 2017**).

Actuellement, les pesticides de synthèse chimique sont largement utilisés dans la lutte contre les ravageurs (**Kouassi, 2001 ; Thakore, 2006**). En plus, l'utilisation de ces produits sous forme des fertilisants et des pesticides, sont à la base de l'amélioration des rendements des diverses cultures (**Kirdi, 2011**).

Cependant, L'utilisation abusive des pesticides chimiques a soulevé de grands problèmes écologiques (**Corbaz, 1990 ; Nakkeeran et al .,2005**). Ces derniers présentent des effets néfastes sur l'environnement en favorisant le développement de la résistance aux matières actives utilisées et peuvent être à l'origine de grands problèmes de santé, liés aux résidus de pesticides dans les denrées alimentaires (**El Guilli et al., 2009**).

Ces contraintes ont obligé la communauté scientifique à chercher des alternatives pour assurer la durabilité de l'agriculture par l'utilisation des microorganismes bénéfiques (**Vessey 2003**) en augmentant le rendement et en sauvegardant les ressources naturelles et la santé des plantes (**Kirdi, 2011**).

Le contrôle biologique de maladies des plantes considéré, dans son sens le plus large, est tout moyen de contrôler la maladie ou de réduire la quantité ou effet des agents pathogènes qui repose sur des mécanismes biologiques (**Campbell, 1989**). L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes, en tant que biopesticides, est une technologie émergente et écologiquement compatible, considérée comme alternative prometteuse aux pesticides et engrais de synthèse (**Mahanty et al., 2017**).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents se trouvent librement dans la rhizosphère peuvent avoir des effets bénéfiques sur la croissance des plantes. (**Van der Heiden et al., 2008**).ces dernières ont

une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes (**Höfte et de Vos, 2006**).

Elles sont largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites. (**Bloemberg et Lugtenberg, 2001**).

Les phénazines et ses dérivés sont des métabolites secondaires très importants produits par *Pseudomonas* spp. fluorescents et présentent des activités antifongiques et antibactériennes à large spectre. Ils sont connus pour leurs différentes fonctions biologiques notamment dans la virulence de la bactérie (**Mahajan Mikloset al.,1999; Mazzola et al., 1992; Wang et al., 2011**).

L'objectif de ce présent travail est de faire une caractérisation de quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir d'un milieu extrême, ainsi que l'étude de leurs effet antagonistes vis-à-vis des agents phytopathogènes fongiques et leur capacité à synthétiser des molécules antimicrobienne de nature phenaziniques (antibiotique –antifongique), impliqués dans le biocontrôle des agents phytopathogènes.

Pour cela, une synthèse bibliographique relative aux *Pseudomonas* spp. fluorescents a été réalisée, et plusieurs approches expérimentales ont ensuite été retenues.

*Recherche*

*Bibliographique*



## I. Généralités sur les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

La microflore du sol est complexe et variée. Elle comprend des bactéries, des champignons des protozoaires et des virus. La distribution des micro-organismes du sol est hétérogène et dépend des facteurs nutritionnels et des facteurs physico chimiques mais les plus important se trouve au niveau de la rhizosphère (**Prescott et al., 2003**). Dont une grande partie est considérée comme PGPR, partagent le même environnement que les racines des cultures. Elles sont donc exposées aux mêmes contraintes environnementales que ces dernières, telles que la sécheresse, la salinité, les températures extrêmes (**Rai, 2017**).

### I.1. Définition des PGPR

Parmi la communauté microbienne de la rhizosphère, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) sont les plus connues (95 %) et les plus importantes. Abondantes en raison de leur taux de croissance élevé et de leur capacité à utiliser différentes sources de carbone et d'azote (**Glick, 2012**). Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) ont été définies pour la première fois par **Kloepper et Schroth, (1978)** comme étant les bactéries qui colonisent le sol (**Dorjey, Dolkar et al., 2017**).

### I.2. Forme des PGPR

Les rhizobactéries promotrices de la croissance peuvent interagir avec les racines des plantes par différents types d'association, selon différents degrés de proximité avec les racines et selon le sol qui les entoure. Ces bactéries peuvent être classées en : PGPR extracellulaires (ePGPR) et PGPR intracellulaires (iPGPR) (**Martínez-Viveros et al., 2010**).

### I.3. La diversité des PGPR

La région rhizosphérique des plantes abrite divers types de PGPR. En effet les exsudats sécrétés par les racines des plantes c'est un facteur important, responsable de la grande diversité microbienne dans la région rhizosphérique. Selon **Tilak et al (2005)**, les souches de PGPR appartiennent largement à cinq principaux taxons : Actinobactéries, Bacteroidetes, Cyanobactéries, Firmicutes, et Protéobactéries. Il est rapporté que les PGPR de ces taxons les plus couramment étudiés sont *Azospirillum* , *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia* (**Bhattacharyya et Jha 2012 ; Arora 2015**).

Les *Bacillus* sont reconnus pour leurs diversités ayant de nombreux caractères physiologiques pour survivre dans des conditions environnementales extrêmes (**Shafi et al., 2017**).

Les *actinomycètes* sont également connus comme un groupe potentiel de PGPRs et principalement signalés comme étant des agents de biocontrôle contre divers phytopathogènes (Merzaeva et Shirokikh , 2006 ; Franco-Correa et al.,2010). Les actinobactéries sont bien connues pour leur capacité à produire des métabolites secondaires et des régulateurs de croissance des plantes (Sathya et al., 2017).

Parmi les bactéries d'intérêt agricole (PGPR) les *Pseudomonas* spp. fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants et biopesticide offre un bon rendement même dans des conditions sévères (Ali et al., 2009 ; Bano et Fatima, 2009).

## II. *Pseudomonas* spp. fluorescents

### II.1 Généralité

Le genre *Pseudomonas* est un large groupe qui englobe plus de 60 espèces colonisant le sol, les plantes, les eaux douces et marines (Gross et Loeper, 2009). Cette adaptation à diverse niches écologiques reflète la capacité de ce genre à produire de nombreux métabolites, qui sont connus par leurs importances pour les plantes, les maladies humaines et potentiellement dans le domaine de la biotechnologie (Silby et al., 2011). Il existe dans ce groupe des espèces fluorescentes et non fluorescentes. Dans le groupe des espèces fluorescentes, *Pseudomonas* spp. fluorescents est le plus étudié (Shanmugam et al., 2008). Il est composé de bactéries qui, dans des conditions de carence en fer, produisent des pigments jaune-vert fluorescents. Huit espèces différentes appartiennent à ce groupe : *Pseudomonas Aeruginosa*, espèce pathogène de l'homme. *P. syringae*, *P. viridiflava* et *P. cichorii*, espèces phytopathogènes et enfin *P. fluorecens*, *P. putida*, *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis*, qui rassembles des organismes saprophytes (Weller et cook., 1983) (Tableau I). Alors que les non fluorescents sont : *P.alcaligenes*, *P.fragi*, *P.fulva* , *P.mendocina* , *P.pseudoalcaligenes* et *P.stutzeri*.

Tableau I. Les pigments de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Weller et cook., 1983)

<i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	La couleur de pigmentation
<i>P. Alcaligenes</i>	Jaune orangé
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>Aureofaciens</i>	Orange
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>Chlororaphis</i>	Verte
<i>P. corrugata</i>	Jaune orangé
<i>P. flavescens</i>	Jaune
<i>P. fluorescens</i> biovar IV	Bleu
<i>P. mendocina</i>	Jaune orangé
<i>P. oryzihabitans</i>	Jaune orangé
<i>P. luteola</i>	Jaune orangé

## II.2 Taxonomie

Le terme *Pseudomonas* signifie fausse unité et provient du grec pseudo (faux) et monas (unité). À l'origine, ce groupe comprenait tous les germes que l'on ne savait pas classer (**Haas et Defago, 2005**).

Aujourd'hui, l'identification et la classification du *Pseudomonas fluorescens* est due grâce aux avancées des méthodes phénotypiques et génotypiques (**Donelli et al., 2013**). Dans ce contexte le séquençage de l'ADNr 16S est admis comme une méthode réalisée anciennement pour attribuer une position taxonomique à une souche bactérienne (**chakravorty et al., 2007 ; Palleroni, 2010**). En effet, la séquence d'ADN codant pour ARN 16S est constituée de domaines hautement conservés (subissant très peu de mutation) qui sont la cible d'amorces pour l'amplification de l'ADNr 16 S (**Clarridge, 2004**). Ceci apporte à la détermination du contenu en guanine plus cytosine (GC%) compris entre 58 et 72% chez les *Pseudomonas* (**Colwell et al., 1964**).

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

-Règne : Bacteria

-Division : Proteobacteria

-Classe : Gammaproteobacteria

-Ordre : Pseudomonadales

-Famille : Pseudomonadaceae

-Genre : *Pseudomonas*

### II.3. Caractéristiques généraux de *Pseudomonas* spp. fluorescents

#### II.3.1. Caractéristiques phénotypiques

Le groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents est capable d'utiliser une large gamme de composés organiques et inorganiques. Ce sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, généralement mobiles grâce à des flagelles en position polaire (monotriche ou multitriche), incapable de sporuler, Chimio-organotrophes (**Palleroni, 2009**), utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons à l'exception de certaines souches pouvant utiliser le NO<sub>3</sub> comme accepteur d'électrons en anaérobiose (**Palleroni, 1984**), à métabolisme oxydatif, catalase positive et oxydase positive, non exigeantes, se développent entre -1°C (**Yumoto et al., 2001**) et +55°C et ph neutre (**Manaia et Moore, 2002**). De ce fait *P. fluorescens* peut être facilement distingué de *P. putida* par sa croissance à +4° et une gélatinase positive (**Montell et Harf-monteil, 2002**) (**figure 1**).

Les *Pseudomonas* sont dépourvues des enzymes de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof), le glucose en aérobiose est catabolisé par la voie d'Entner Doudoroff. Ces espèces peuvent aussi tirer leurs énergies en anaérobiose par hydrolyse de l'arginine (**Palleroni et al., 1974**).

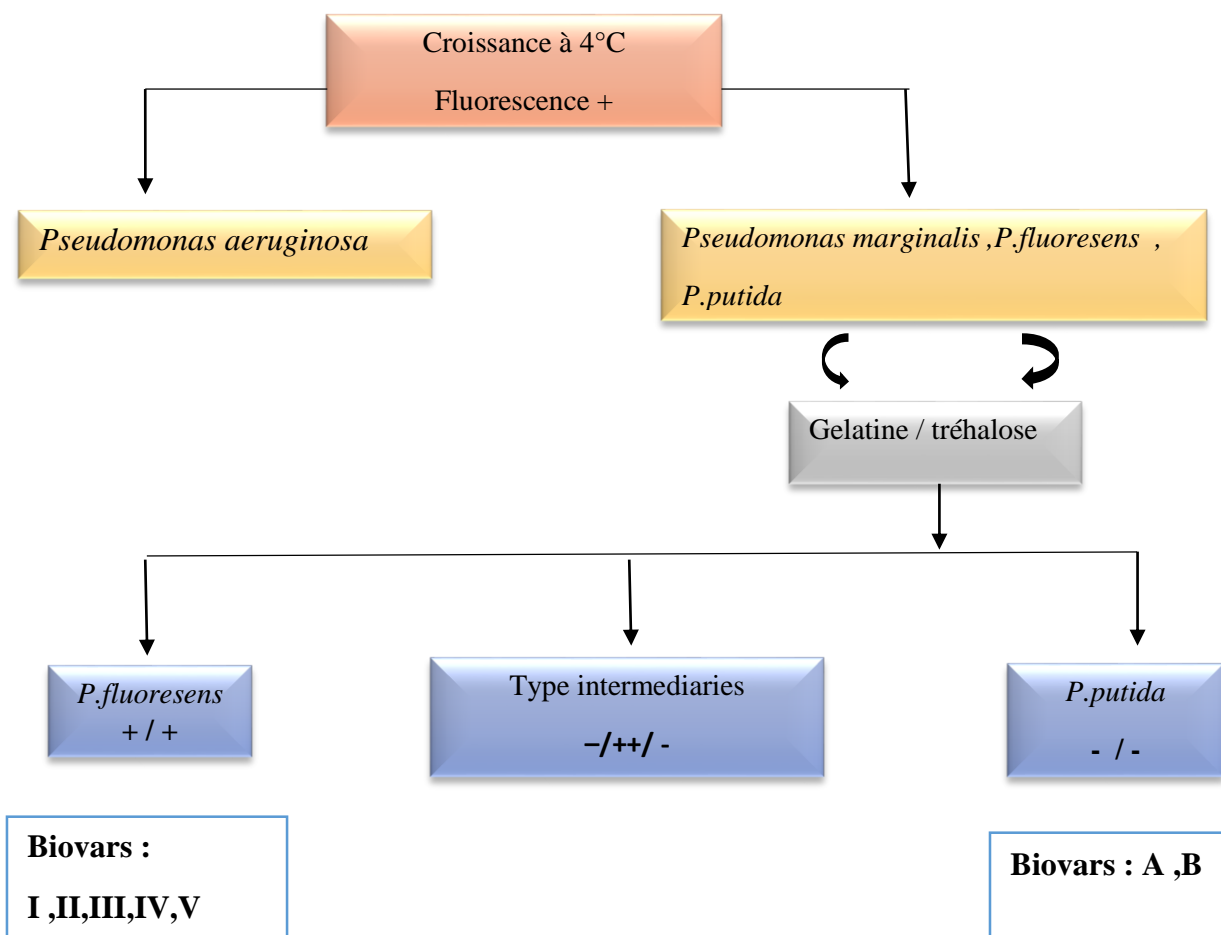


Figure 1. Schéma général de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens-putida* proposé par Digat et Gardan (1987)

### II.3.2 Caractéristiques génétiques

Comme tous les procaryotes, les *Pseudomonas* sont représentés par un ADN compacté dans un seul chromosome haploïde circulaire. Ils peuvent avoir de l'ADN extra-chromosomique sous la forme des plasmides ou transposons (Stover et al., 2000; Nelson et al., 2002; Paulsen et al., 2005; Kung et al., 2010; Klockgether et al., 2011; Silby et al., 2011; Wu et al., 2011; Ozer et al., 2014).

Différents gènes ont été employés pour tracer le statut phylogénétique des espèces dans le genre de *Pseudomonas*. L'ADNr 16S est utilisé comme un marqueur universel permet la description des espèces dans ce genre, ainsi un outil de comparaison entre les bactéries très divergentes (**Santos et Ochman, 2004**). Parfois l'analyse du gène ARNr16S ne permet pas la différenciation entre des espèces très proches. D'autres gènes ayant démontré leur importance pour la différenciation entre les espèces ont été analysés. Ces gènes nommés gènes de ménage, ont permis la différenciation des espèces de *Pseudomonas* (**Hilario et al., 2004**).

Une méthode prometteuse pour l'identification des microorganismes, et qui peut analyser jusqu'à 300 échantillons en une seule fois est le MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry), par l'analyse des protéines ribosomiques (**Pineda et al., 2003**). En effet, les résultats d'identification des isolats de *Pseudomonas* sont excellents, jusqu'à 100% de résultats corrects (**Dieckmann et al., 2005; Degand et al., 2008**).

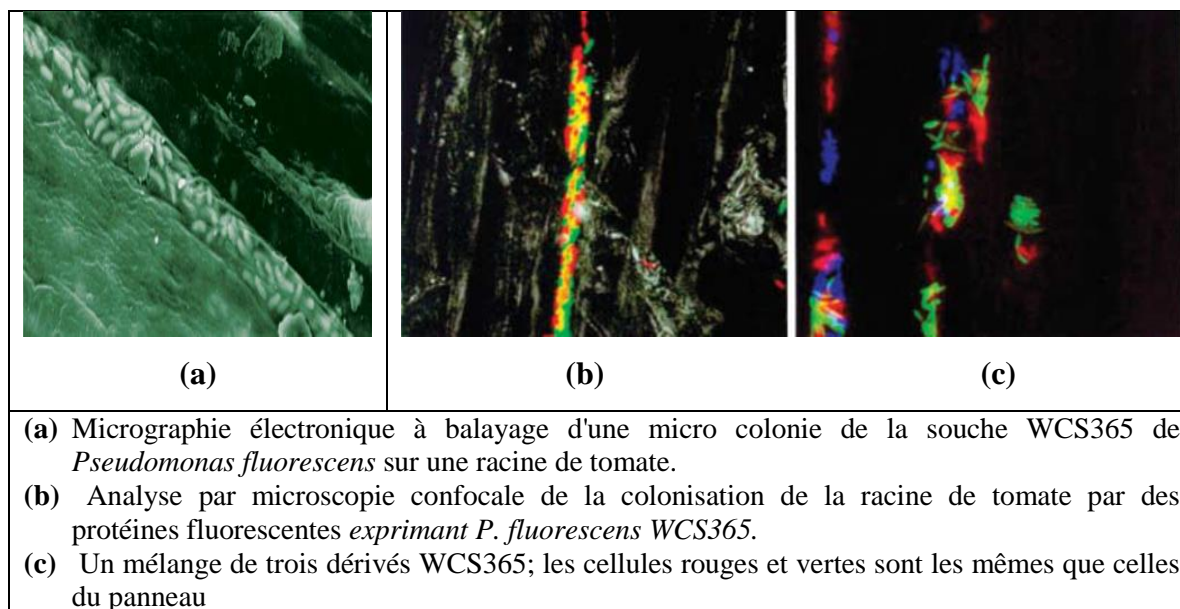
### III. Effet bénéfique de *Pseudomonas* spp. fluorescents

L'efficacité de certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la protection biologique des plantes vis-à-vis de divers agents phytopathogènes, notamment ceux d'origine tellurique, a été démontrée dans de nombreux travaux (**Lugtenberget al., 2001 ;Ran et al.,2005**), comme une application biotechnologique dans l'amélioration de la production des plantes cultivées et augmentent ainsi le rendement des cultures grâce à la production de biomolécules d'importance agricole (**Rekadwad, 2018**). Ainsi, ils jouent un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (**Moneke et al., 2010**). Récemment, *Pseudomonas* spp. fluorescents a été rapporté dans la répression des champignons qui infectent les racines : *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, et *Fusarium solani* (**Noreen et al., 2015**).

#### III.1 Interaction plante – bactérie

La rhizosphère des plantes est la zone qui est immédiatement proche de la surface des racines et qui est affectée par les exsudats des racines et la plus prédominante pour les microbes (**Kennedy ,1999**). L'interaction est due aux exsudats chimiques sécrétés par les racines. Ces derniers contiennent des polysaccharides, des lipides et des acides aminés, directement impliqués dans l'interaction microbienne avec la plante (**Kumar et al., 2015**). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents, considérées comme PGPRs non symbiotiques, ont été largement étudiées et expérimentées, surtout par rapport à leur capacité de colonisation racinaire, à la synthèse de phytohormones (**Ahmad et**

*al.*,2013) et la croissance des plantes par la production de sidérophores (Glick, 2014; Kumar *et al.*, 2016). Ainsi à la solubilisation des phosphates (Hussein et Joo, 2015) et la production d'enzymes et de métabolites (Figure 2).



**Figure 2.** Colonisation des racines par des *Pseudomonas* fluorescents (Haas *et al.*, 2005)

### III.2 Stimulation de la croissance

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

La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Richardson,2001). Les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P.chlororaphis* ,*P.putida* et *P.aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Bano et Musarat, 2003).

### III.3 Induction systémique de la résistance des plantes

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

### III.4 La compétition trophique

La compétition consiste en « la consommation ou le contrôle de l'accès à une ressource comme les nutriments, l'espace ou tout autre facteur dont la disponibilité est limitée » (**Widden, 1994**). Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (**Kamilova et al., 2005**). La compétition trophique instaurée par les *Pseudomonas* spp. fluorescents porte particulièrement sur la compétition pour le fer (**Loper et Buyer, 1991**), par la synthèse des sidérophores et de protéines membranaires réceptrices (**Dujiff et al., 1999**). Les sidérophores ce sont des substances de faible poids moléculaire et servant de transporteur de l'ion ferrique  $Fe^{+3}$  à l'intérieur de la cellule microbienne (**Jacques et al., 1993**). Les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autres microorganismes (**Mercado-Blanco et Bakker, 2007**).

### III.5 Antibiose

La capacité des rhizobactéries à produire des sidérophores et des métabolites contribuant à l'antibiose a fait l'objet de nombreuses études consacrées à la recherche sur les PGPR (**Maksimov et al., 2011**). L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques.

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliquées dans le biocontrôle, comme l'acide cyanhydrique (HCN) (**Defago, 1993 ; de Souza et al., 2003 ; Haas et Defago 2005**). De même la production d'enzymes hydrolytiques tels  $\beta$ -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases, contribuant à la dégradation des parois cellulaires fongiques (**Whippes, 2001**). (figure 3)



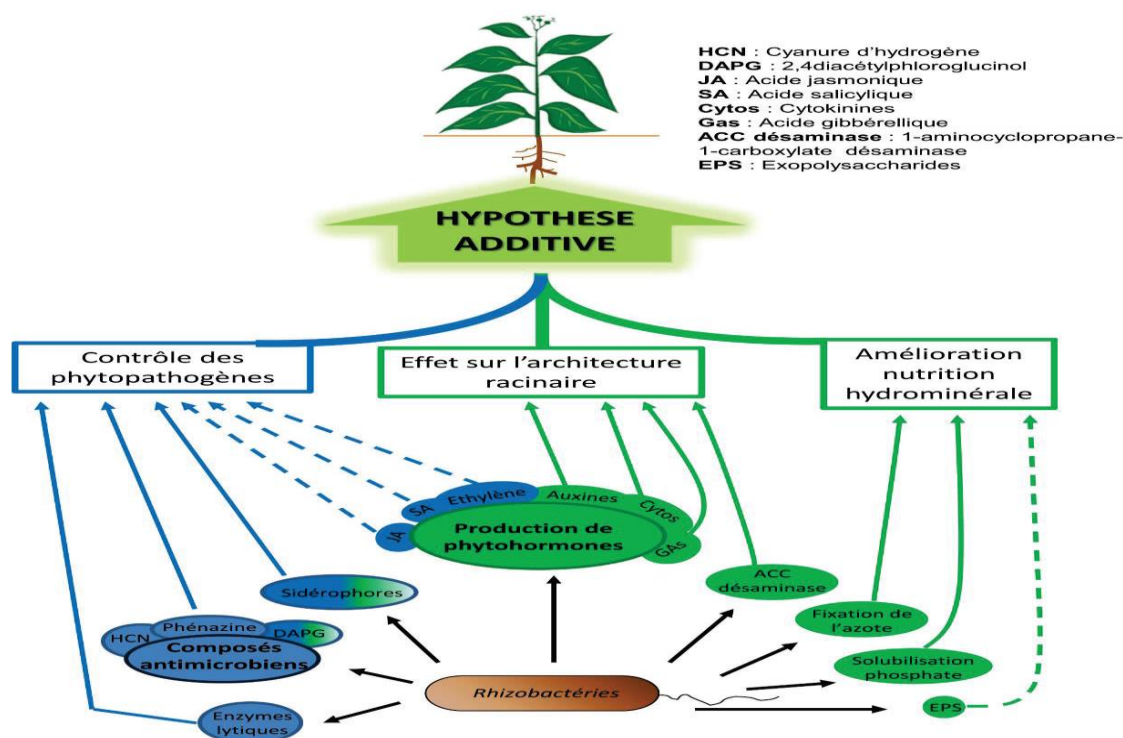


Figure 3. Schéma récapitulatif des principales activités phytobénéfiques (Bashan, 2010)

La couleur bleue correspond aux activités phytoprotectrices et la couleur verte aux activités phytostimulatrices. Les traits pleins indiquent un effet direct et les traits en pointillés caractérisent un effet indirect

#### IV. Molécules antimicrobiennes connues chez les *Pseudomonas* spp . fluorescents

Les antibiotiques sont des molécules organiques d'origine naturelle de faible masse moléculaire, qui ont été isolées en vertu de leur capacité à inhiber ou tuer les micro- organismes vivants (Galet et al., 2014).

De ce fait les recherches réalisées à ce jour ont permis l'isolation de plusieurs molécules antibiotiques (Raaijmakers , 2002). Dont la première molécule isolées d'une souche (Pf-5) de *P. fluorescens* et identifiées en 1979 est la Pyrrolnitrine (Howell et Stipanovic, 1979). Puis la pyolutéorine (Howell et Stipanovic, 1980). Par la suite, d'autres composés ont été isolés comme la

phénazine (Thomashow et Weller, 1988), le DAPG (Vincent, 1991). La pyocyanine et la viscosamide (Nielsen, 1999). Leur spectre d'action varie grandement d'une molécule à l'autre (Tableau II).

**Tableau II. Antibiotiques produits par les agents de biocontrôle bactériens (Raaijmakers et al., 2002).**

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

#### IV.1 Antibiotiques de natures phénazinique

La famille de composés phénazinique comprend plus de 80 molécules naturelles qui possèdent une activité soit antibactérienne, antifongique, antivirale ou antitumorale et sont principalement produites par des espèces des genres *Pseudomonas* et *Streptomyces* (MacDonald, 1967). Les phénazines sont typiquement pigmentées avec un spectre d'absorption incluant deux maxima dans l'ultraviolet et au moins un dans le visible. L'absorption dans le visible et l'activité biologique dépendent de la nature et de la position des substitutions présentes sur l'anneau hétérocyclique (Britton, 1983).

De nombreuses souches fluorescentes sont connus pour produire plusieurs métabolites secondaires, tels que les phénazines, la pyrrolnitrine. Ces métabolites secondaires ou antibiotiques ont été impliqués dans le contrôle des maladies des plantes permettant à la souche productrice, de servir

d'agent de lutte biologique (Mavrodi *et al.*, 1998 ; Maddula *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Selin *et al.*, 2010). (Figure 4)

Les souches dites phénazines positives synthétisent habituellement plusieurs de ces composés à l'exception de *P. fluorescens* qui produit uniquement l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA). La grande diversité de cette famille de composés provient de modifications sur l'acide phénazine-1,6-dicarboxylique et le PCA, principaux produits de cette voie de biosynthèse. Chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, la PCA peut être modifiée par méthylation, par transamidation, par hydroxylation ou par décarboxylation (Mavrodi *et al.*, 2001 ; Delaney *et al.*, 2001).

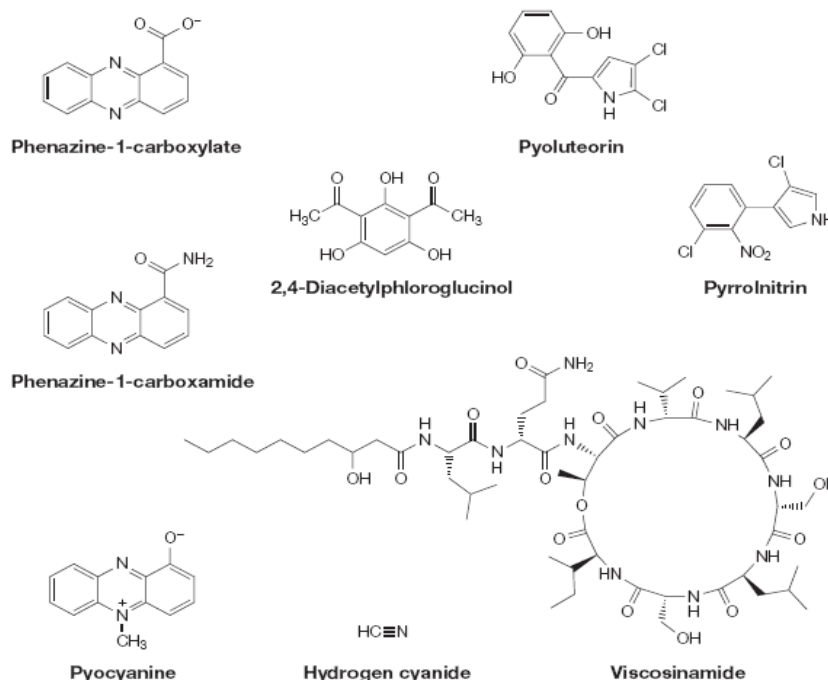
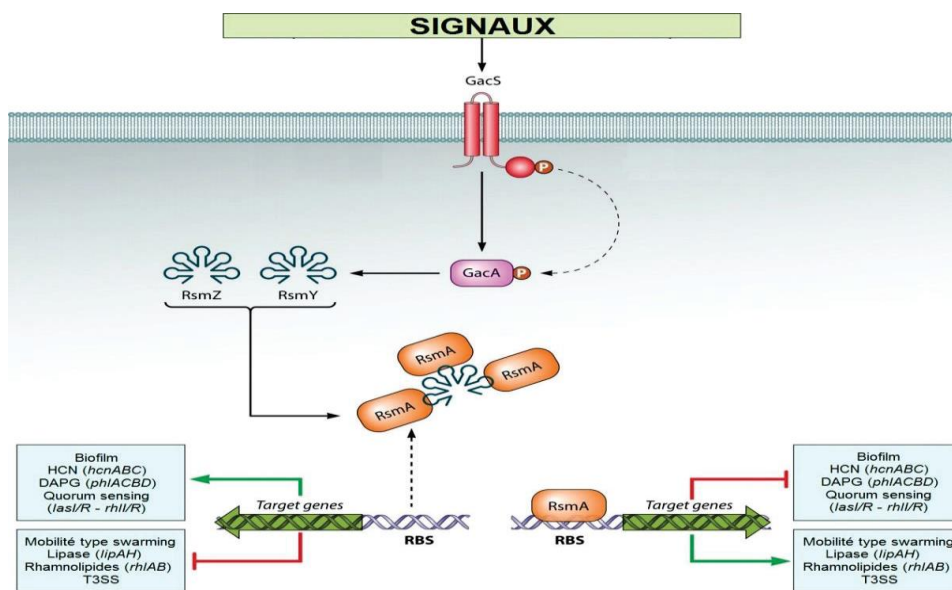


Figure 4. Les composés antibiotiques produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Haas et Défago, 2005).

#### IV.1.1 Régulation de la production des antibiotiques par le genre *Pseudomonas*

Les bactéries sont capables de communiquer entre elles afin de coordonner certaines activités (**Grandclément et al., 2015**), via le système de régulation par quorum sensing et le système à deux composants GacA/GacS dont ils sont dépendant (**Venturi et al. 2005**).

Ce complexe, nommé GacS/GacA, est impliqué dans le phénomène de QS (Quorum Sensing). Il est très conservé au sein des *Pseudomonas* (**Bejerrano-Sagie et Xavier, 2007**). Chez les *P. fluorescens*, la protéine régulatrice *RsmA* se fixe sur la région promotrice de gènes multiples dont elle induit (flèche verte) ou réprime la transcription (flèche rouge). La phosphorylation de *GacA* via *GacS* stimule la production des petits ARNs *RsmY* et *RsmZ* qui se fixent sur la protéine régulatrice *RsmA*, levant la répression de l'expression des gènes que cette protéine inhibe. (**Figure 5**).



**Figure 5.** Schéma simplifié de la régulation par le système GacA/GacS chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Nadal et al. 2012**).

#### IV.1.2 Rôle

L'avantage de la production de phénazine pour la colonisation et la survie dans la rhizosphère a été démontré par **Thomashow** et **Weller**, utilisant pour la première fois une approche génétique pour affirmer l'implication d'un antibiotique produit par une souche de *Pseudomonas fluorescens* dans la

suppression d'un agent phytopathogène. Ces chercheurs ont pu prouver que le champignon parasite *Gaeumannomyces graminis* est inhibé par une phénazine élaborée par une *Pseudomonas fluorescens* présente sur les racines du blé. Cette inhibition a été mise en évidence au champ et elle est suffisamment intense pour protéger les blés qui hébergent cette bactérie (**Thomashow et Weller, 1988 et 1990**).

L'effet d'une phénazine lors de l'interaction plante-bactérie-agent pathogène a pu être visualisé par une étude en microscopie confocale utilisant *P. chlororaphis* (producteur de PCN) et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* tous deux marqués avec différentes molécules autofluorescentes (**Bolwerk et al., 2003**). Durant les 3 premiers jours d'interaction, la croissance et l'attachement des hyphes au système racinaire n'étaient pas affectés par la présence de la bactérie. Cependant, après 7 jours, la densité du réseau d'hyphes était considérablement réduite en présence de *P. chlororaphis*. De plus, aucune pénétration des racines n'était observée à proximité des cellules du *Pseudomonas* (**Bolwerk et al., 2003**).

En revanche l'étude des phénazines s'est principalement penchée sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents, notamment *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. aeruginosa* pour examiner leur rôle dans la virulence ainsi que dans le but d'évaluer leur utilisation potentielle comme biopesticides (**Mavrodi et al., 2006**).

#### IV.1.3. Mode d'action

Le spectre d'action étonnamment large des phénazines, ainsi que le mécanisme de cette action au niveau cellulaire ne sont pas à ce jour bien compris. On peut cependant croire, en se référant à la structure de ces molécules, que suite à leur diffusion à travers la membrane de la cellule cible, elle pourrait agir comme accepteur d'électron et court-circuiter la chaîne respiratoire. Cette interférence dans le transport normal des électrons aurait pour effet de produire une grande quantité de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et d'ions superoxyde O<sub>2</sub>. La quantité de ces deux molécules cytotoxiques serait alors suffisante pour surcharger la superoxyde dismutase et mener directement à la mort de la cellule (**Delaney et al., 2001**).

## VI. Applications de *Pseudomonas* spp. fluorescents

En raison de simples exigences en termes de conditions de croissance et de composition moyenne, de capacité à produire et à dégrader un certain nombre de composés, les espèces de *Pseudomonas* sont considérées comme des microorganismes prometteurs dans diverses applications biotechnologiques (Novik, 2015). Les plus connues concernent l'agriculture où elle est utilisée en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (Ongena et al., 2005 ; Anita et al., 2012 ; Gao et al., 2012).

*Pseudomonas fluorescens* est également utilisée comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de *Jatropha* pour la production de biodiesel (Devanesan et al., 2007). *Pseudomonas fluorescens* joue aussi un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (Moneke et al., 2010).

Elle est actuellement étudiée en médecine car elle produit un antibiotique particulier (mupirocine) qui a prouvé son efficacité dans le traitement de certaines maladies de la peau, des troubles oculaires et auditifs (Mazereeuw-Hautier, 2006). De plus les enzymes produites par les espèces de *Pseudomonas* peuvent être utilisées dans le traitement du cuir pour épiler les peaux (Dayanandan et al., 2003 ; Boopathy et al., 2013).

# *Matériel et méthodes*

Notre travail qui consiste à faire une caractérisation de quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ainsi qu'à la production de composés à effet antibiotiques de nature phenazinique par les mêmes souches a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie et physicochimie du groupe pharmaceutique Sidal durant une période allant du mois de mars- jusqu'au mois de mai 2019.

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique représenté par les verreries et appareillages sont consignés en (**Annexe I**), les milieux de cultures (**Annexe II**), les produits chimiques (**Annexe III**).

### II.1.2. Matériel biologique

#### II.1.2.1 le sol

Les isollements bactériens ont été réalisés à partir de deux échantillons de sols rhizosphériques, provenant d'une plante médicinale (*zygophyllum album*) de la wilaya d'Adrar. Cette région a été choisie sur la base des conditions climatiques (température élevée pouvant atteindre 50°C). Au niveau de la plante choisie aléatoirement, la partie supérieure du système racinaire a été déterrée (profondeur de 50 à 80 cm) et le sol adhérent aux racines est récupéré, à raison de 200 à 250 g par échantillon. Les échantillons de sols, prélevés en respectant les exigences de l'asepsie microbiologique avec des outils désinfectés et stériles, sont déposés dans des sachets en papier et conservés au froid (4 °C).

#### II.1.2.2. Souches pathogènes

Pour le test de l'activité antimicrobienne des souches isolées, nous avons utilisé trois isolats bactériens (*Escherichia coli* **ATCC8739**, *Staphylococcus aureus* **ATCC9027** et *Salmonella typhi* **ATCC1402**) provenant du laboratoire de Microbiologie de la boîte pharmaceutique **Sidal**. Les activités antifongiques ont été réalisées avec deux forma spéciales de *Fusarium oxysporum* : **G2** (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* agent causale de la fusariose vasculaire de la tomate et **F2** (*F. oxysporum* f.sp. *lini* agent causal de la fusariose vasculaire du lin) fournis par le Professeur Declerck de l'université catholique de Louvain (Belgique).



### II.1.2.3 Les Antibiotiques

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

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Isolement et purification des souches

#### II.2.1.1 Préparation des dilutions

Après élimination des éléments racinaires grossiers, 1g de sol fortement adhérent aux racines a été récupéré par rinçage dans des tubes, contenant 9 ml d'une solution d'eau physiologique, laissées 10 minutes en agitation continue avant de préparer des dilutions de  $10^{-1}$  jusqu'au  $10^{-9}$ , pour chaque échantillon servant aux opérations d'ensemencement sur le milieu King B (KB) (**King et al., 1954**) (**Benchabane, 2005**).

L'incubation a été réalisée à 25 °C pendant 24 à 48h. Les colonies bactériennes individualisées, fluorescentes sous lumière ultraviolette (350 nm), ont été sélectionnées, repiquées sur le même milieu KB additionné de glycérol (25 %) et conservées à -20 °C. Deux échantillons du sol ont été prélevés aléatoirement.

#### II.2.1.2. Mise en culture

100µl de chaque dilution ont été prélevés puis étalés sur le milieu King B (Annexe II). Chaque dilution est ensemencée en triplicate. Les boîtes de Pétri portant les indications nécessaires (dilution, la date) ont été incubées à 30°C pendant 24 à 48h.

Après incubation, les colonies d'aspects différents, fluorescentes sous UV (365nm), ont fait l'objet d'une purification sur le milieu King B (**King et al., 1954**) (annexe II) puis désignées par un numéro de code.

### II.2.1.3 Purification

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

## II.2.2 Identification phénotypique des isolats de *Pseudomonas*

La vérification préliminaire des caractères génériques a été effectuée selon les tests classiques décrits par Lelliot et Stead (1987) et Schaad (1988) : Fluorescence, coloration de Gram, morphologie cellulaire, oxydase, catalase et la voie d'utilisation du glucose. La caractérisation spécifique des isolats a été réalisée par la galerie Api 20NE.

### II.2.2.1 Production du pigment fluorescent

La production du pigment fluorescent diffusible a été recherchée sur milieu KB ensemencé avec des cultures pures. Après incubation de 24 à 96 h à 26° C, la fluorescence est révélée sous UV (350 - 400 nm).

### II.2.2.2 Etude microscopique

La coloration de Gram a pour but d'observer la forme, le mode de regroupement et de distinguer entre les bactéries les Gram positif des Gram négatif

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique sur des cultures jeunes de moins de 24h. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame propre et fixé à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène. Après fixation, des solutions de violet de Gentiane et de lugol ont été respectivement appliquées sur le frottis, qui ensuite a été traité avec, la fushine pendant 30 secondes. Le frottis a été observé sous microscopique avec l'ajout de l'huile a immersion au grossissement X100. Les isolats ayants une coloration violette sont Gram positifs (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram négatifs (-).

### II.2.2.3 Recherche de la catalase

Ce test est effectué simplement par la mise en contact d'une colonie avec quelques gouttes d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un important dégagement gazeux traduit la présence d'une catalase.

#### II.2.2.4. Recherche de l'oxydase

Une crème bactérienne de 24h est étalée sur le disque d'oxydase. Le cytochrome oxydase se manifestant par l'apparition d'une coloration violette après 10 secondes. La réponse est positive tardive lorsqu'elle apparaît en retard (10 à 60 secondes) ; après ce temps la réponse est négative.

#### II.2.2.5. La galerie API20NE

Le système API 20NE comporte 20 microtubes combine entre 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne d'eau physiologique. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture des résultats est faite suivant le catalogue API20NE. L'identification est réalisée par le logiciel **API WEB**.

##### ➤ Technique

- **Préparation de la galerie** : Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et remplir les alvéoles avec de l'eau distillée pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation
- **Préparation de l'inoculum** : Prélever quelque colonie bien isolée identique sur milieu gélosé et la mettre dans un tube d'eau distillée stérile pour réaliser une suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland.

Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85% Medium et y transférer environ 200µl de la suspension précédente et homogénéiser.

- **Inoculation de la galerie** : Introduire la suspension bactérienne dans les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension bactérienne précédente à l'aide d'une pipette stérile.  
Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC avec la suspension bactérienne NaCl 0,85% Medium.
- Pour les tests : GLU, ADH et URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de vaseline. - Refermer la boîte d'inoculation et l'incuber à 30°C pendant 24h ensuite à 48h.

➤ **Lecture**

- Test NO<sub>3</sub> : Rajouter les deux réactifs Nit 1et Nit2

Après 5 minutes, si elle devient rouge indique une réaction positive , une réaction négative signalée par la présence de microbulles .ajouter le réactif Zn

Après 5min si la cupule restée incolore indique une réaction positive, si la cupule devient rouge donc c'est une réaction négative

- Test TRP : Rajouter le réactif James, une couleur rose apparait indique que TRP positif Si incolore TRP négatif.
- Test d'assimilation : Une cupule trouble donc c'est positif, si elle reste transparente donc négatif

### II.2.3 Test d'activité antagoniste *in vitro* des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Le pouvoir antagoniste des isolats de *Pseudomonas* spp fluorescents a été déterminé par l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes. La détermination d'activité antagoniste *in vitro* des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de deux souches fongiques de *Fusarium oxysporum* ( G1 et F2) a été réalisée sur deux milieux différents ( PDA et King B) ( Annexe II ) par la méthode de confrontation directe dans le but de déterminer le meilleur milieu d'activité antagoniste .

#### II.2.3.1 Purification des souches fongiques

La vérification de la pureté des souches fongiques a été réalisée après plusieurs repiquages par transplantation successive des disques de champignons de 7 jours dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Johnston et Booth, 1983). Ces derniers ont été incubés à 28°C pendant 7 jours. Les souches purifiées ont été conservées à 4°C.

#### II.2.3.2 Sélection des souches antagonistes *in vitro*

Le test d'antagonisme fongique a été réalisé selon la méthode décrite par Vincent *et al.*, (1991). Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1.5 cm à partir des deux bords d'une boite de Pétri contenant le milieu gélosé. Après 24 h d'incubation à 28°C, un disque fongique de 6mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boite. Les boites sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque interaction (Figure 6).

Les résultats sont observées quand la croissance des champignons dans les boîtes des témoins atteint les points d'inoculation des souches bactériennes (Hariprasad *et al.*, 2009).

La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents comparé au témoin non inoculé indique la présence d'une activité antagoniste.

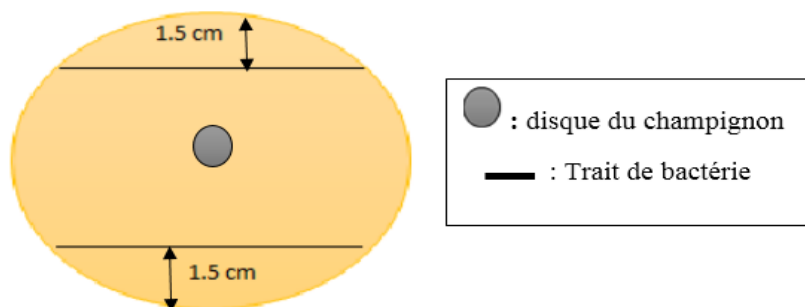
Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

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

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

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

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



**Figure 6. Méthode de confrontation directe entre les souches de *Pseudomonas* spp .fluorescents et le champignon *Fusarium oxysporum* .**

#### II.2.4 Recherche des composés à effet antibiotique de nature phénazinique

La recherche de métabolites à effet antibiotique a été effectuée chez la souche de *Pseudomonas fluorescens* (Pf2) sélectionnée à la base de son fort pouvoir antagoniste vis-à-vis des deux isolats fongiques de « *Fusarium oxysporum* ». Cette recherche a été basée sur l'extraction et l'identification de composés à effet antibiotique par solvant (Thomashow et Weller 1988).

### II.2.4.1 Extraction des composés à effet antibiotique

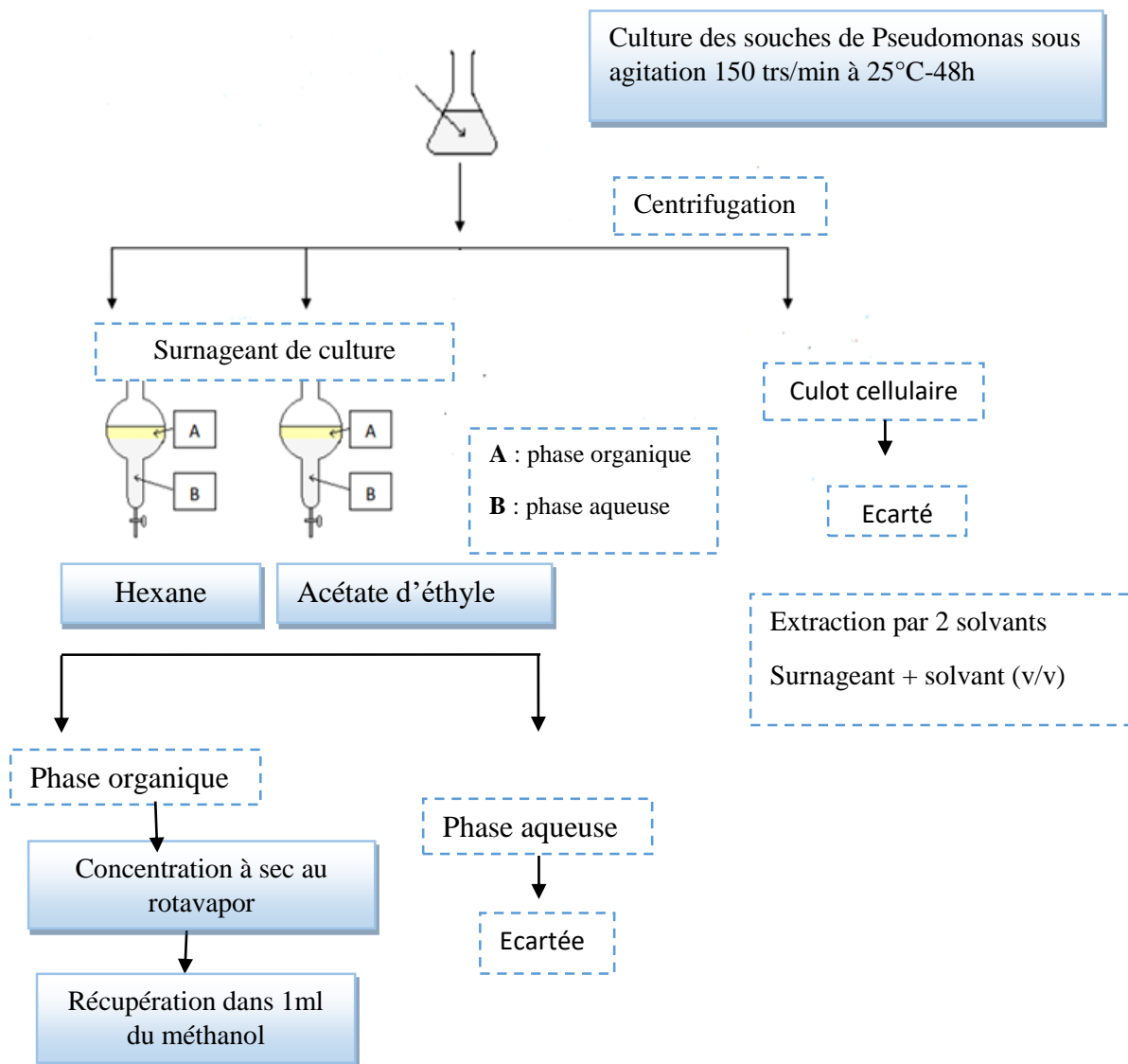
#### ➤ Préparation de culture de production

Pour la préparation de la culture, la souche Pf2 a été cultivée dans 100 ml de milieu King B à l'état liquide ensemencés avec 3 ml d'une préculture de 24 h. Ensuite l'incubation a été faite à 25 °C sous agitation continue (150 rpm) pendant 48h. La culture obtenue a été centrifugée (5000 tour / 15 min à la température ambiante).

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

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

Après agitation et décantation, la phase aqueuse a été éliminée et la phase organique a été récupérée et filtrée sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau. Le filtrat a été évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 55 °C pour l'hexane et de 60 °C pour l'acétate d'éthyle. Les extraits secs obtenus ont été récupérés dans 1 ml de méthanol (**figure 7**).



**Figure 7. Protocole de production et d'extraction des phénazines par la souche *Pseudomonas spp. fluorescentis*.**

### ➤ Antibiographie

Les extraits obtenus à partir des surnageant de culture ont fait l'objet d'une confrontation avec quelques bactéries pathogènes (*E.coli*, *S.aureus* et *S.typhi*) dans le but de déterminer le meilleur solvant d'extraction.

Des disques de papier whatman (n°3) de 6 mm de diamètre ont été imprégnés avec 30 µl d'extrait organique, puis séchés totalement à l'aide d'un séchoir à froid. Les disques ont été ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 30 min avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu

Muller Hinton, préalablement ensemencé par les microorganismes-tests par la technique d'écouvillonnage. Les boîtes sont d'abord mises à 4°C pendant 2 h pour une meilleure diffusion des éventuels composés antibiotiques et ensuite incubées 24 h à 28 °C.

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

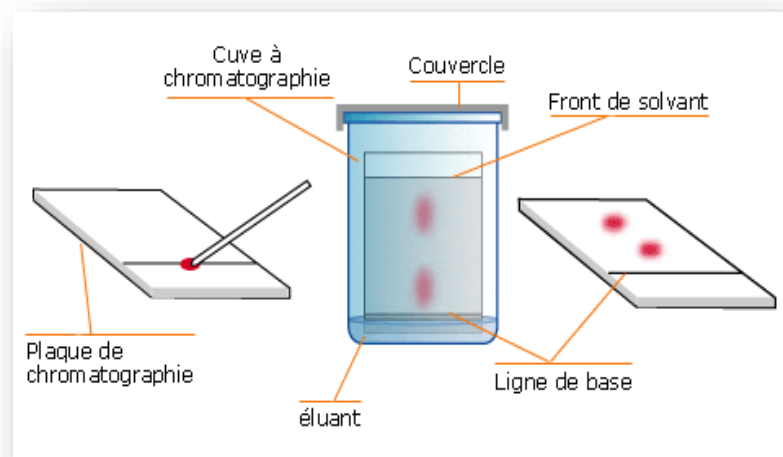
#### II.2.4.2 Analyse des composés à effet antibiotique phénaziniques

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

La purification des substances actives des souches de *Pseudomonas* a été réalisée par CCM

#### ➤ Chromatographie sur couche mince

Le fractionnement de l'extrait a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice (0.25 mm d'épaisseur) (figure8).



**Figure 8.** Réalisation de La plaque chromatographie sur couche mince (CCM)



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

Deux associations de solvants ont été appliquées : le solvant H-M (Hexane-méthanol ; 100/15) et le solvant C-A (chloroforme-acétone ; 9/1). Les plaques ont été placées dans les cuves en position verticale, lorsque le front du solvant se trouve à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque ; la plaque a été retirée et séchée à l'air libre, la position du front de solvant doit être marquée.

❖ La révélation chimique

La révélation chimique a été réalisée par le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (révélateur de composés aromatiques polycycliques). Une fois les spots apparaissent on mesure le rapport frontal par la loi suivante :

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

$$\mathbf{Rf} = \text{distance parcourue par un composant} / \text{distance parcourue par un solvant}$$

➤ **Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Après avoir fragmenté et purifié l'extrait de la souche Pf2, ensuite son identification a été réalisée en comparant avec le standard « PCA » en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

L'appareil utilisée est de type (Waters), comprend une pompe 600 à 4 voies, un détecteur UV 2487 et un enregistreur Linéaire et une colonne C18. (**figure 9**).

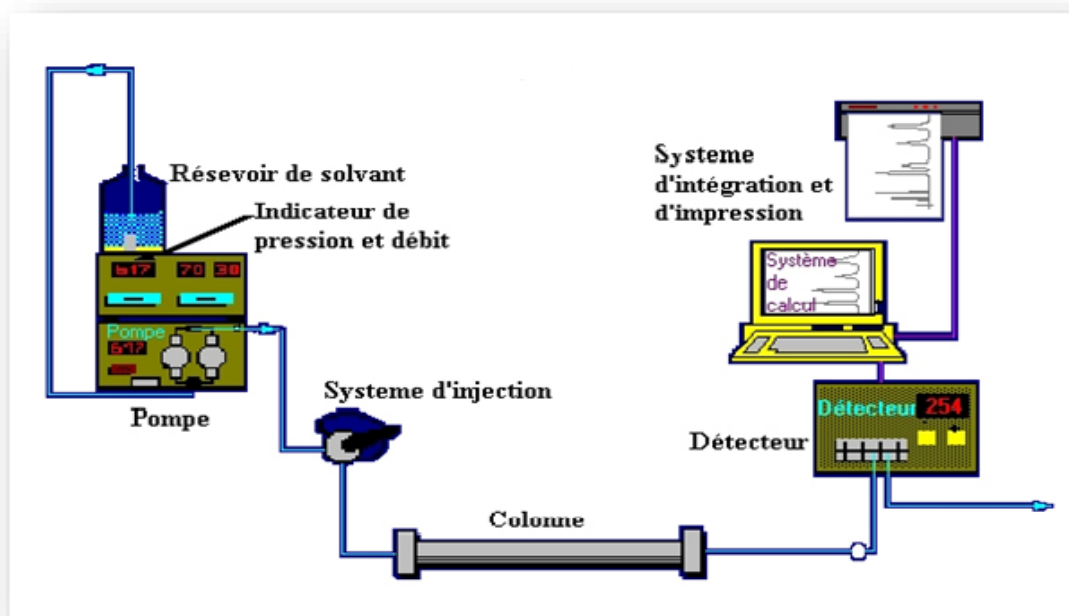


Figure 9. Principe de fonctionnement de HPLC

Les expérimentations ont été réalisées en phase inverse, la phase mobile est polaire constituée de 100ml de méthanol et 400ml de l'eau purifiée (gradient continue 20 % -80 %) et la phase stationnaire de la colonne C18 est une silice greffée avec des groupements organiques apolaires. Certaines conditions sont fixées comme : Le débit du solvant dans ce cas est fixé 1ml/min et la longueur d'onde de détection est de 220nm, la température ambiante et la pression qui est variable. Une fois tout est équilibrée on injecte notre échantillon dans des vials spécialisée, avec un volume de 20ul, les résultats obtenue seront donné sous forme des pics ou chromatogramme.

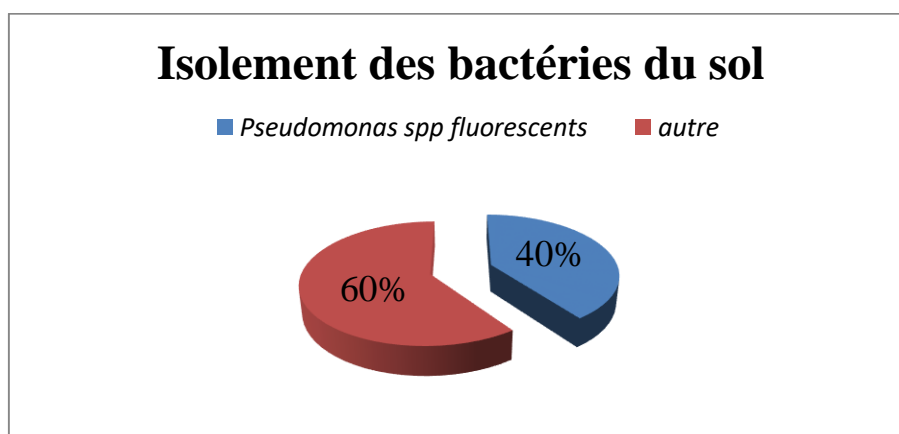
# *Résultats et discussion*

Au cours de cette étude, nous avons analysé 2 échantillons de sol saharien au niveau de Sidal d'une période de deux mois. Après culture, isolement, identification des souches isolées, le test d'antagonisme, l'extraction, la purification et l'identification de l'antifongique nous avons obtenu les résultats suivants ci-après.

### III. Résultats de l'isolement et l'identification

#### III.1 Fréquence des souches isolées à partir du sol

L'isolement des bactéries à partir du sol saharien nous a permis d'isoler 25 souches dont 40 % (10 souches sur 25) sont des *Pseudomonas* spp. fluorescents le reste est représenté par d'autres bactéries (**figure10**). Cette fréquence de la présence de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol saharien est faible dans ce biotope ceci peut être expliqué par l'influence des conditions hostile de ce sol rhizosphérique.



**Figure 10.** La fréquence des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol Saharien .

Les isolats ont été retenus sur la base de leur production des pigments fluorescents visible à l'œil nu sur le milieu King B et sous le lompe ultra-violet (**figure 11**).

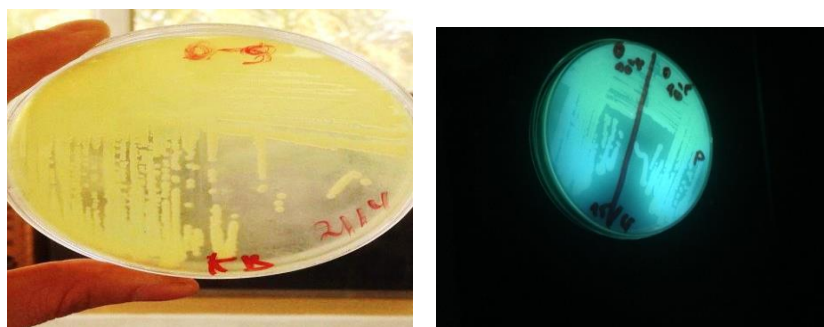


Figure 11. Résultat de l'isolement des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents  
(Originale 2019)

### III.2 Caractéristiques morphologiques et biochimiques

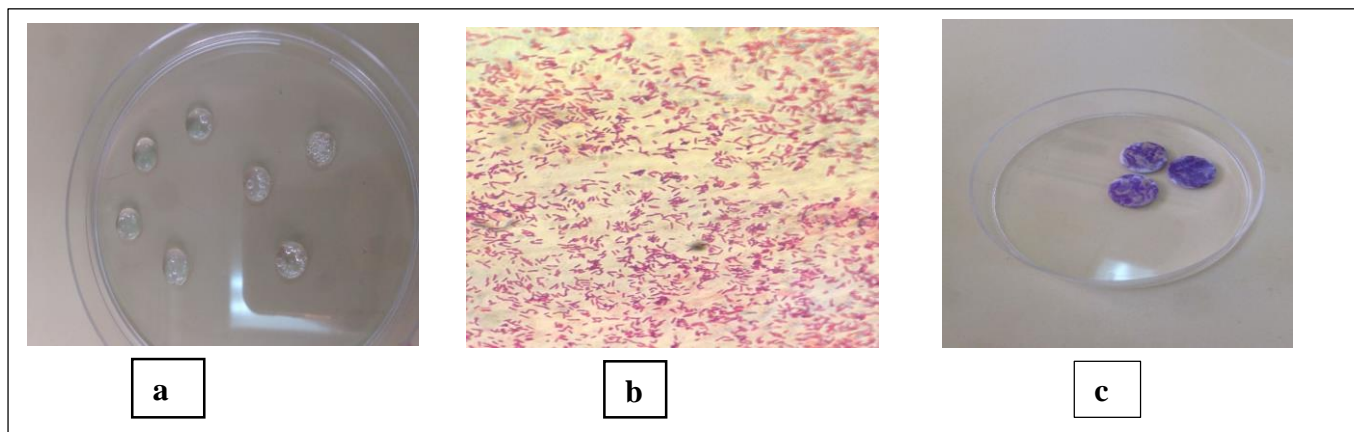
L'identification des souches isolées a été réalisée essentiellement selon les clefs de **Bossis (1995)**. La caractérisation macroscopique, microscopique, et la production des pigments des 10 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents retenues montre que ces derniers présentant un pigment jaune verdâtre sur King B, donnant des colonies circulaire, lisse, oxydase+, catalase+, et sont des bacilles Gram – (**Tableau III**) (**figure 12**).

**Tableau III. Quelques Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées**

Souches / Caractères	Aspect	Forme	Coloration de Gram	Oxydase	Catalase	Pigment
PF1	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF2	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF3	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF4	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF5	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-Vert
PF6	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF7	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF8	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF9	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
PF10	jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert

**+:Positif**

**BGN: Bacille a gram negatif**



**a** : la catalase

**b** : observation microscopique avec grossissement X100

**c** :L'oxydase

**Figure12. Caractéristiques morphologique et biochimique des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Originale ,2019)**

➤ **Identification de *Pseudomonas* spp . fluorescent par la galerie Api 20NE**

L'identification phénotypique a été complétée par l'utilisation des galeries API20 NE (**figure 13**) qui ont permis de regrouper nos souches à part égale (5/5) au sein de deux espèces principales des *Pseudomonas* spp. fluorescents : *P.fluorescens* (pf1 pf2 pf9 pf5 pf7) et *P. putida* (pf3 ,pf4,pf8 pf6 pf10).



**Figure 13. Identification de *Pseudomonas* fluorescents par Api20NE (Originale 2019)**

Le tableau montre que les souches isolées elles donnent une réponse négative aux TRP, GLU, ADH, URE PAC, par ailleurs elles sont capables d'assimiler, L-arabinose, D-mannose, D-maltose,

on a observé aussi que les souches de *P. putida* sont gélatine (-) et *P.fluorescens* gélatine (+) (tableau IV).

**Tableau IV. Résultats de l'identification par Api20NE**

Souches / Tests	5 souche de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	5 souches de <i>Pseudomonas putida</i>
Potassium nitrate (NO <sub>3</sub> )	+	+
L-tryptophane (TRP)	-	-
D-glucose (GLU)	-	-
L-arginine (ADH)	-	-
Urée (URE)	-	-
Esculine (ESC)	-	-
Gélatine (GEL)	+	-
Nitrophenyl galactopyranoside (PNPG)	+	+
D-glucose (GLU)	-	-
L-arabinose (ARA)	+	+
D-mannose (MAN)	+	+
N acétyl glucosamine (NAG)	+	+
D-maltose (MAL)	+	+
Potassium gluconate (GNT)	+	+
Acide caprique (CAP)	+	+
Acide adipique (ADA)	+	+
Acide malique (MLT)	+	+
Trizodium Citrate (CIT)	+	+
Acide phenylacetique (PAC)	-	-

**+ : Résultat positif / - : Résultat négatif**

### III. 4 Résultats de la sélection des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes

Les dix souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (F2) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (G2). Cette inhibition se traduit par la réduction du diamètre des colonies de *Fusarium*, par rapport au témoin.

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de *Pseudomonas* révèlent une activité inhibitrice sauf 3 souches (Pf4, Pf9, Pf10) qui ne montrent aucun effet sur la croissance des souches fongiques

- **Sur le milieu King B :**

Les résultats de l'effet antagoniste exercé par les champignons ont montré que Pf1 a provoqué l'inhibition des deux isolats fongiques avec un même taux d'inhibition (48%), Pf3 est faiblement antagoniste contre G2 avec un pourcentage d'inhibition (25 %), Pf5 et pf6 sont antagonistes avec un même taux d'inhibition comparativement à G2 (40.66 %). La souche Pf8 montre une inhibition contre G2 avec un taux de 48.33%. (Figure 14)

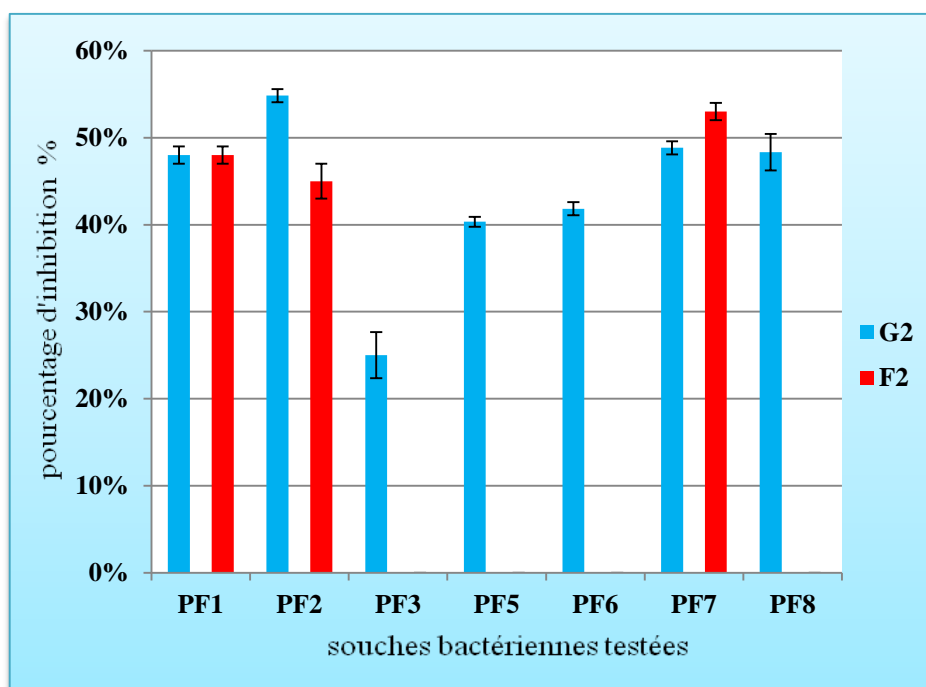
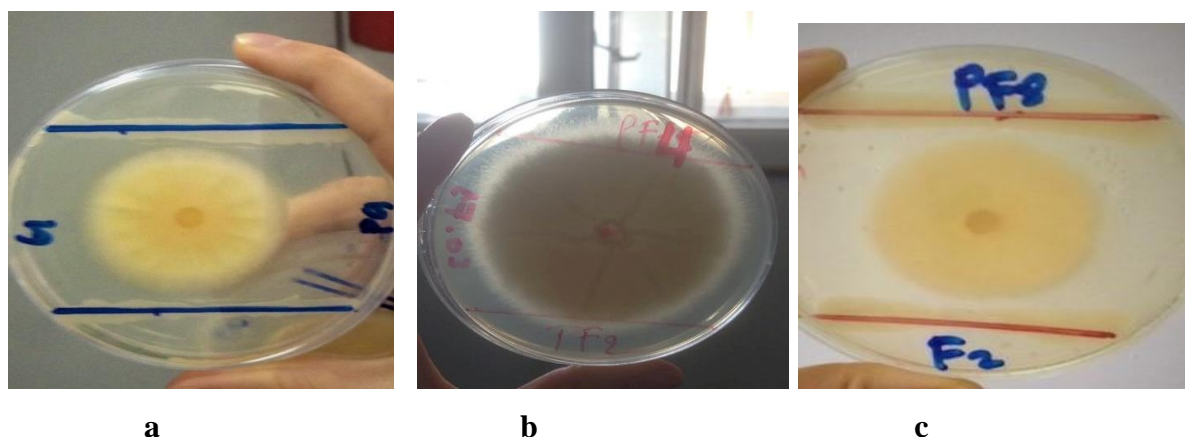


Figure14. Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu de culture King B



L'effet inhibiteur le plus élevé est noté pour les souches Pf2 (54.43 %) pour G2 et 47% (**figure 15**) pour F2 et Pf7 a montré une activité antagoniste importante également avec un taux d'inhibition égale à 48.83% et 53 % contre le G2 et F2 respectivement (**tableau annexe III**).



a

b

c

a : Activité antagoniste contre G2

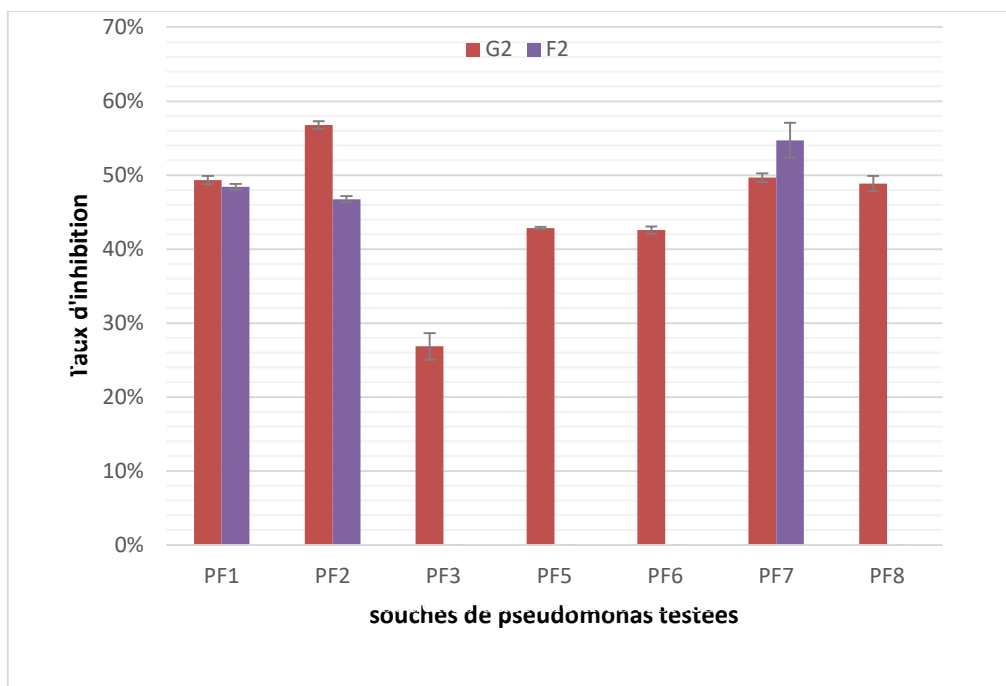
b : Témoin

c : Activité antagoniste contre le F2

**Figure15.Essai de test antifongique sur milieu King B (originale ,2019)**

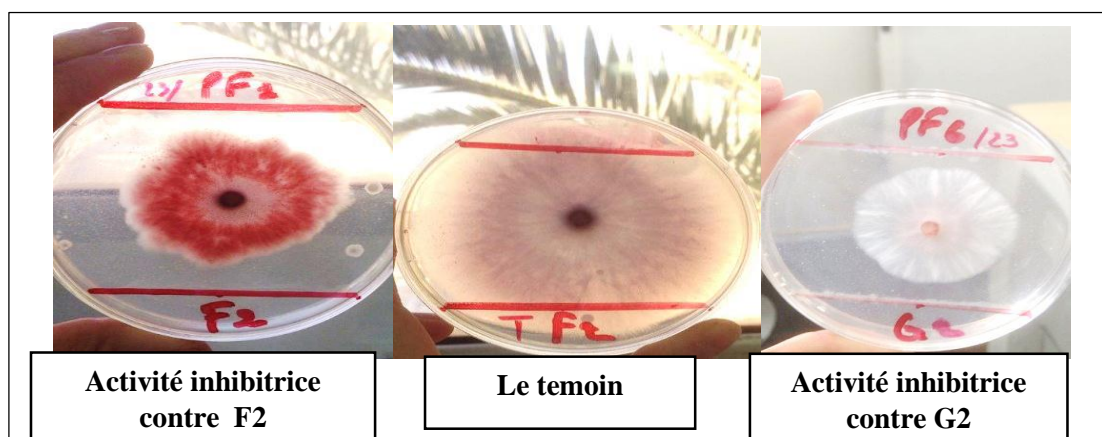
- **Sur milieu PDA**

Les résultats de l'activité antagoniste sur le milieu PDA, montre une forte activité antifongique chez les souches PF1, PF2 PF7, PF8 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (G2) avec des taux d'inhibition de 49%, 57% 50% et 49% et contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* ( F2) de 48%, 47% et 55% respectivement.



**Figure16. Résultats de l’activité antifongique des différentes souches sur milieu de culture PDA.**

Les résultats de l’activité antagoniste sur le milieu PDA (**figure 17**), montre une forte activité antifongique chez les souches PF1, PF2 PF7, PF8 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (G2) avec des taux d’inhibition de 49%, 57% 50% et 49% et contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (F2) de 48%, 47% et 55% respectivement. Par contre une faible activité a été remarquée chez les souches PF3, PF5 et PF6 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* avec des taux d’inhibition de 27%, 43% et 42% et les souches (PF4, PF9, PF10) ne montrent aucun effet négatif sur la croissance des souches fongiques (**Tableau Annexe IV**).

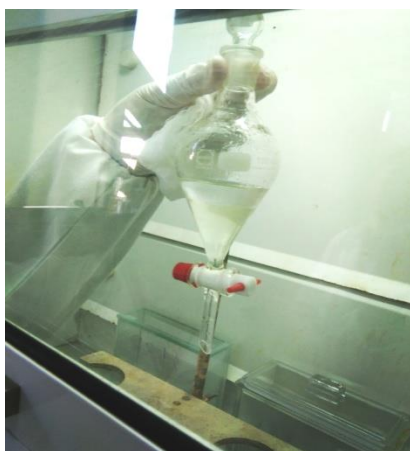


**Figure 17 .Essai de test antifongique sur le milieu PDA (Originale, 2019)**

D'après les résultats du test d'antagonisme, nous remarquons que les souches de *Pseudomonas* ont noté un taux d'inhibition sur King B presque le même que celui du milieu PDA . Sur la base de leurs caractéristiques métaboliques et de leur potentiel de lutte biologique, elles sont antagonistes sur les deux milieux de culture différents.

### III.5 Résultats d'extraction d'antibiotique

L'extraction de l'antibiotique (**figure 18**) a été réalisée à partir de la souche *P.fluorescens* (Pf2). Les extraits obtenus ont été testés par antibiographie afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction et pour évaluer la meilleure action inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes.



Extraction par l'hexane



Extraction par l'acétate d'éthyle

Figure18.Extraction d'extrait d'antibiotique par des solvants organiques

(Originale ,2019)

#### ❖ Résultat de l'antibiographie

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence l'effet de notre extrait et de déterminer le meilleur solvant d'extraction.

Cette étude est basée sur la mesure de diamètre des halos d'inhibition de l'extrait obtenu. L'effet antimicrobien de cet extrait suspecté de nature phenazinique sécrété par *Pseudomonas fluorescens* (Pf2) a montré une inhibition variable contre les souches bactériennes pathogènes. Les résultats du pouvoir antimicrobien sur les souches étudiées sont représentés dans les **figures 19, 20, 21,22.**

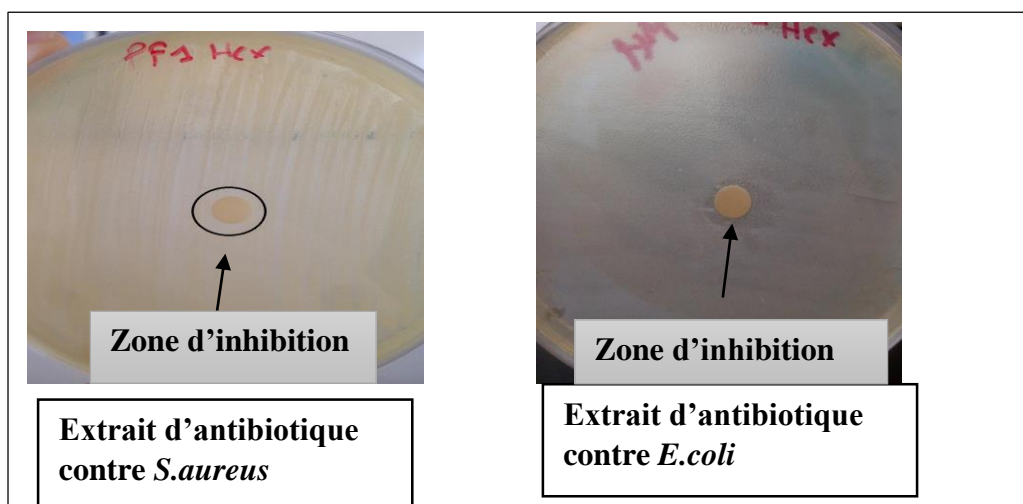


Figure19. L’antibiographie des extraits obtenus (Originale 2019)

Les résultats mentionnés dans les figures ci-dessous , montrent que les diamètres des zones d’inhibitions varient d’un solvant à un autre. L’extrait obtenu par l’hexane montre une haute activité contre, *Escherichia coli*ATCC8739 avec un diamètre d’inhibition de 11.68 mm, par contre la plus faible valeur a été enregistré chez *Staphylococcus aureus*ATCC9027 et *Salmonella typhi*ATCC1402 avec des zones d’inhibition de 9.34 à 6.14 mm. (Figure 20)

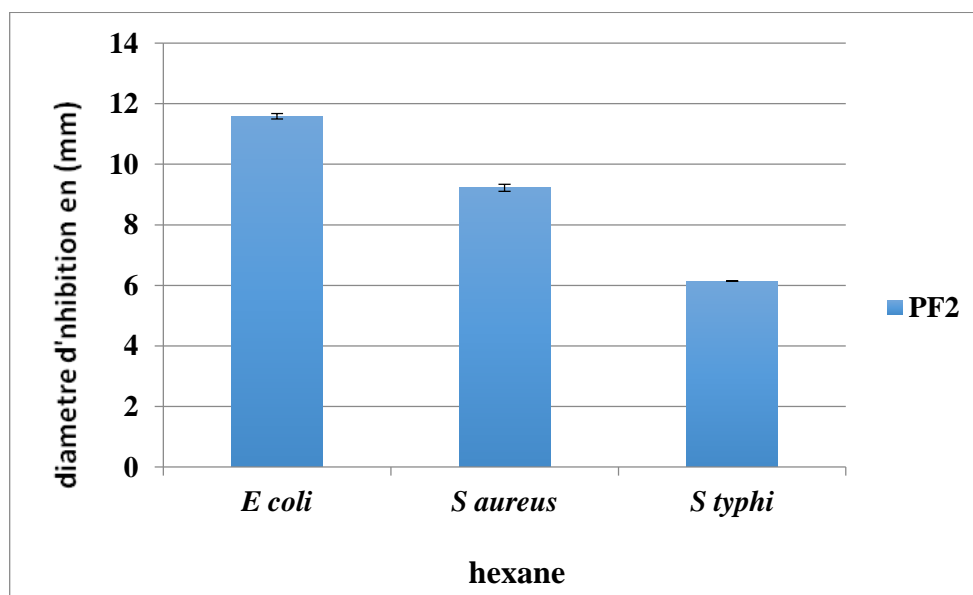
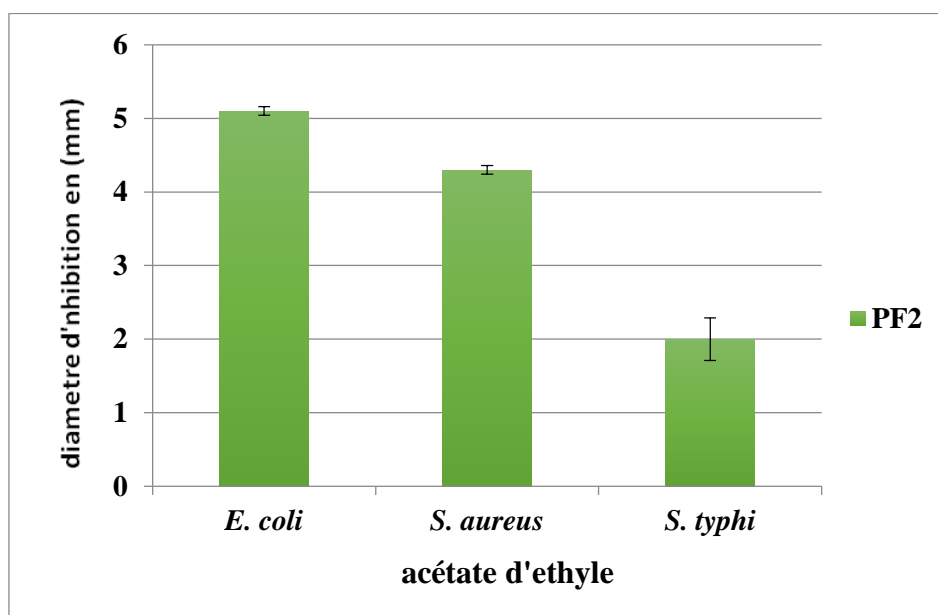


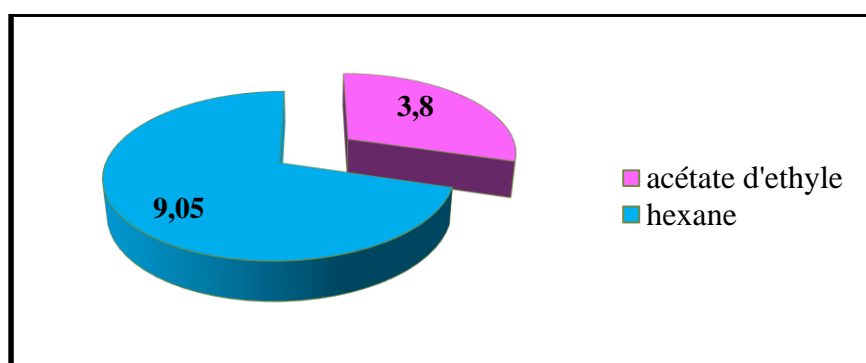
Figure 20. Le diamètre des zones d’inhibition dans le cas de solvant l’hexane

Concernant, l'acétate d'éthyle s'est montrée efficace contre *Escherichia coli* ATCC8739 avec une zone d'inhibition qui s'étend de 5.1 mm, contre *Staphylococcus aureus* ATCC9027 est de 4.3 et contre *Salmonella typhi* ATCC1402 est de 2 mm (tableau Annexe IV)(Figure 21).



**Figure 21.** Le diamètre des zones d'inhibitions dans le cas de solvant (AE)

A travers nos résultats nous remarquons que notre extrait obtenue, par l'hexane a empêché la croissance de la plupart des germes pathogènes examinés, par rapport à celui obtenue par de l'acétate d'éthyle. Ceci atteste que le meilleur solvant d'extraction était l'hexane (figure 22).



**Figure22.** La moyenne des zones d'inhibition en (mm) obtenus par L'acétate d'éthyle et l'hexane

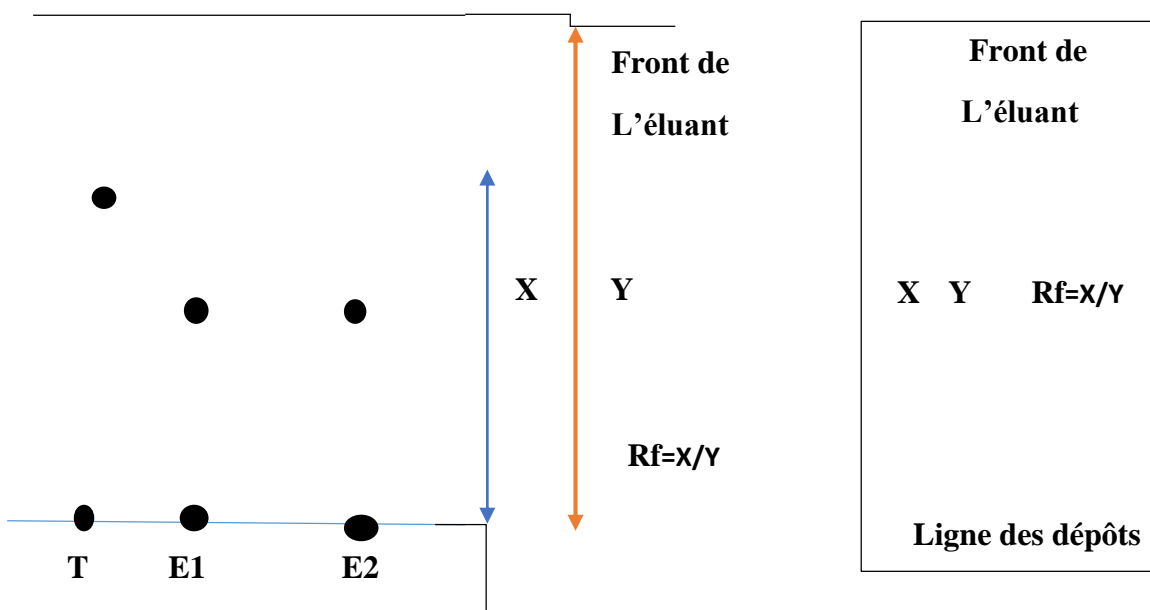
III.5 Résultats de purification et identification d'antibiotique

III.5.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a été établie dont le but de la purification de l'extrait. Ce dernier obtenu par le meilleur solvant d'extraction a été déposé. au bord inférieur de la plaque, après migration du solvant et après la révélation de formaldéhyde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> . les spots ont été visualisé sous UV ( 356nm) les résultats ont été noté et illustré dans les figures (23)



Figure23 : Resultat de la chromatographie sur couche mince (Originale ,2019)



**Figure24. Interpretation de la plaque CCM (Originale2019)**

**T :Temoin, E1 :essai 1 de Pf2 E2 :Essai 2 de Pf2**

D'après la mesure de rapport frontal de la CCM :

**Rf= distance parcourue par un composant / distance parcourue par un solvant**

- Dans le cas de l'hexane - méthanol :

**Rf du standard =0.89**

**Rf de l'extrait=0.84**

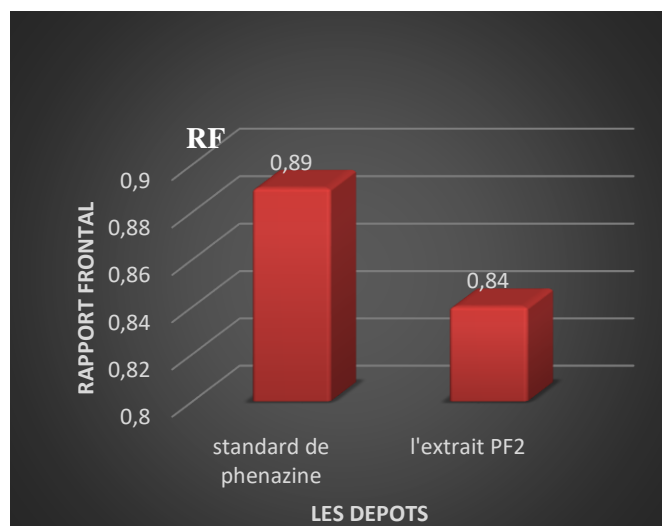
- Dans le cas du Chloroforme –acétone :

**Rf du standard =0.78**

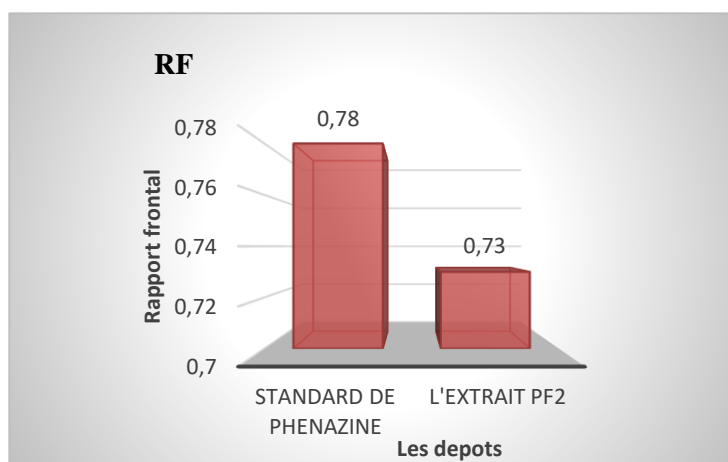
**Rf de l'extrait =0.73**

La phase mobile (Hexane-Méthanol) a permis d'obtenir une bonne séparation des différents composés contenus dans les extraits de la souche Pf2 que celle de la phase mobile (Chloroforme – Acétate) ou la séparation elle est un peu faible (**Figures 25-26**)

Selon les résultats de chromatographie sur couche mince, les valeurs du rapport frontal dans le cas de l'hexane –méthanol, montrent que l'essai ou bien l'extrait de la souche Pf2 ressemble au standard PCA avec des valeurs RF presque identiques de 0.89 pour l'essai et de 0.84 pour le témoin. Dans le cas du deuxième solvant (Chloroforme –Acétone ), la valeur obtenue 0.73 est différente de celle du standard (0.78).



**Figure25. Le rapport frontal de l'extrait de surnageant PF2 et le standard de phénazine obtenu par l'hexane-méthanol (AM)**



**Figure26. Le rapport frontal de l'extrait Pf2et le standard de phenazine obtenu par chloroforme-acétone (CA)**

### III.5.2 Chromatographie liquide à haute performance HPLC

L'identification de notre extrait a été réalisée après une purification partielle par chromatographie sur gel de silice. Ensuite, l'analyse par HPLC à confirmer la nature de ce composé présent dans l'échantillon, en fonction de l'affinité vis-à-vis de la colonne chromatographique et les conditions expérimentales.

Après avoir injecter la solution du temoin. Nous avons obtenu un chromatogramme avec des pics représentés sur les **figures (27-28)**



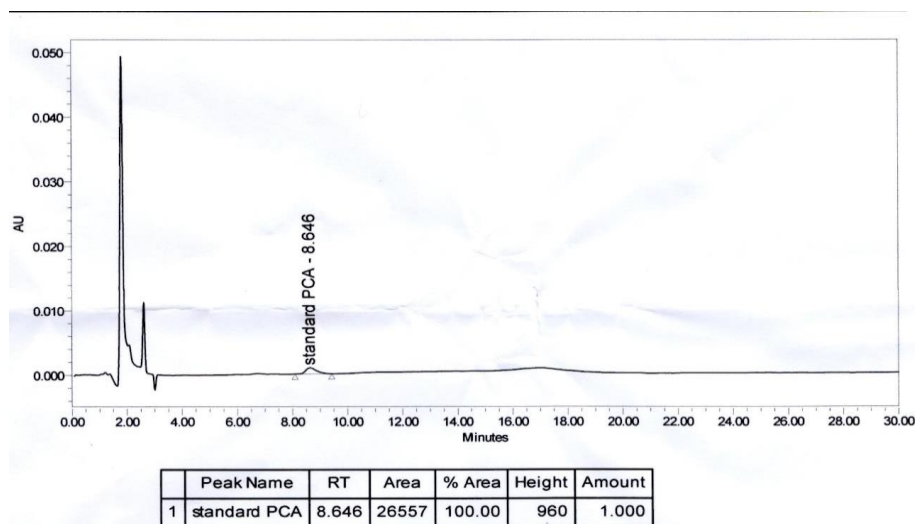


Figure27. Le chromatogramme du standard PCA (Originale, 2019)

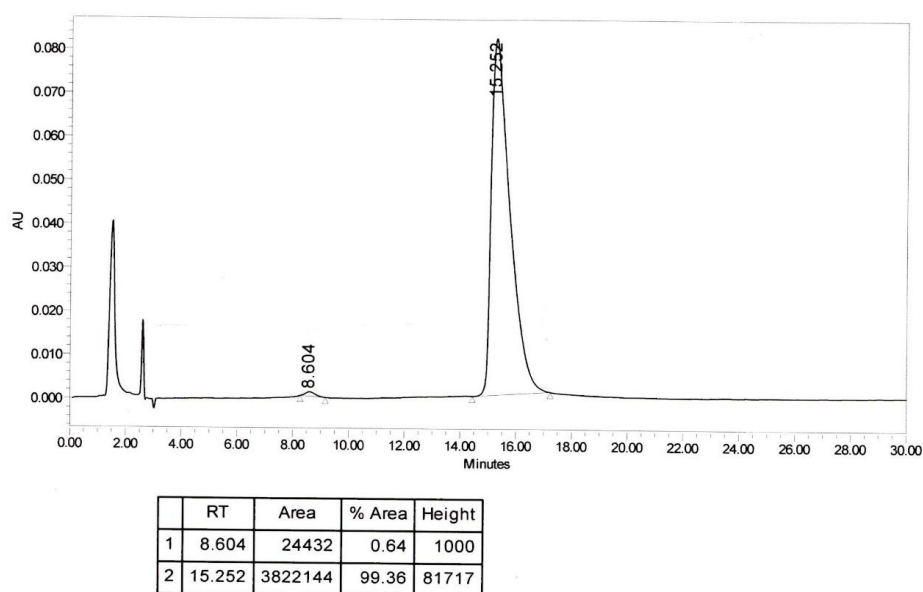


Figure28. Le chromatogramme de l'essai de l'extrait de Pf2 (Originale 2019)

Les résultats obtenus du standard de phénazine (**Fig27**) montrent la présence d'un pic avec un temps de rétention égal à 8.646 min. Alors que l'extrait purifié de Pf2 (**Fig 28**) a révélé la présence de deux pics le premier est presque comme le standard avec un temps de rétention de 8.604 min, il s'agit de molécule de nature phénazinique. Le second pic (15.252 min) différent du témoin il s'agit alors d'un autre composé à effet antimicrobien. Ceci démontre la capacité de *Pseudomonas* à produire beaucoup de dérivés phénaziniques et autres métabolites.

### Discussion

Les isollements effectués ont permis d'isoler 25 souches dont 10 isolats comme étant des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Cette faible densité est due probablement aux nombreux facteurs interagissant susceptibles de réduire la croissance et la capacité de survie des organismes. Selon **Cacciari et al., (2003)**, la diversité des microorganismes vivants dans ces biotopes dépend de la salinité, de la solubilité de l'oxygène, de la température, du pH, du potentiel hydrique et la disponibilité des éléments nutritifs. Les souches doivent donc posséder les caractéristiques requises pour s'adapter aux diverses contraintes de l'environnement. La température du sol représente aussi dans les zones arides un facteur écologique très important qui régit la multiplication des microorganismes (**Dari, 2013**).

Selon le biotope étudié qui présente des caractéristiques importantes (sol saharien extrême , rhisosphérique , plante médicinale ), nous notons la présence de populations appréciables de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Le caractère ubiquiste et le pouvoir d'adaptation à des conditions écologiques variées de ces rhizobactéries a été mentionné dans de nombreux travaux (**Holloway, 1992 ; Lemanceau, 1992; Schroth et al.,1992 ; Latour, 1996; Digat et Gardan, 1987; Latour et Lemanceau, 1997**).

Les *Pseudomonas* sont abondants dans le sol, particulièrement au voisinage du système racinaire des plantes dans différentes régions, et leur colonisation efficace des parties souterraines des plantes, signe de leur potentiel d'adaptation (**Lugtomberg et al., 2001; Benchabane,2005**). Elles se caractérisent aussi par un meilleur développement dans la rhizosphère par rapport au sol nu (**Latour et Lemanceau, 1997, Benchabane, 2005**).

La caractérisation phénotypique a été utilisée pour identifier et classer les isolats selon certains critères, morphologiques, pigmentaires, test d'oxydase, la catalase et la galerie API20NE. Nos résultats sont en concordance avec ceux de **Palleroni et al., ( 1984 ) ; Jacques( 1994 ) et Bossis (1995)**. Les colonies ont des formes bombées et opaques, de diamètre d'environ 2mm, circulaires, régulières, brillantes et muqueuses.

Les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant le cytochrome oxydase positive sont des microorganismes hétérotrophes et aérobies strictes. Nos résultats se concordent avec ceux de **Latour ; Lemanceau., (1997)** et se rapprochent de ceux de **Marchall (1982)** pour *Pseudomonas fluorescens*

elle hydrolyse la gélatine alors que *Pseudomonas Putida* ne l'hydrolyse pas d'après **Carney (1989)** et **Gilardi (1985)** également .

L'utilisation de l'arginine est une voie caractéristique des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Cette dernière a un rôle physiologique important pour générer des substrats à haut niveau d'énergie sous forme d'ATP en absence d'oxygène. Cette voie est considérée comme la seule voie anaérobie chez les *Pseudomonas* (**Latour et Lemanceau, 1997**).

En plus de l'Api 20NE qui nous a permis d'identifier les espèces de groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *P.fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars (**Bossis et al., 2000**) .Pour cela d'autres méthodes qui ont été utilisées pour l'identification des *Pseudomonas* notamment systèmee biolog Gen III qui permet de vérifier simultanément diverses réactions métaboliques : 94 réactions phénotypiques ; 71 sources de carbone et 23 tests de sensibilité aux inhibiteurs chimiques. En plus, il détermine d'autres propriétés physiologiques importantes : le pH, la tolérance au sel et à l'acide lactique, le pouvoir réducteur et la sensibilité chimique.

**Dieckmann et al., (2005)** et **Degand et al., (2008)** Rapportent que les méthodes génotypiques tels que le séquençage de l'ADNr16S et la technique de MALDI TOFF sont efficaces pour l'identification des *Pseudomonas*.

La recherche de l'activité antagoniste *in vitro* a été testée sur 10 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et sur deux milieux différents (King B et PDA). La forte activité antagoniste exercée par les souches Pf1, Pf2 et Pf7 à l'encontre de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* sur le milieu KB d'une part, pourrait associer à l'implication de siderophores. La diffusion de ses molécules a accentué le déficit en fer au voisinage de la colonie bactérienne, en conduisant à l'inhibition de la croissance mycélienne à sa proximité. Les mêmes constatations sont signalées par **Albouvette et al., (1998)**. D'autres part, le même essai sur le milieu PDA révèle la présence des zones d'inhibitions autour du pathogène fongique. Ce résultat peut être expliqué par la présence de métabolites secondaires à effet antifongique synthétisés par les souches ayant manifestés une action inhibitrice contre le pathogène. Ceci pourrait suggérer la présence chez une même souche de nombreux métabolites variables selon le milieu de culture utilisé.

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

La variété du métabolisme des *Pseudomonas* spp. fluorescents est basée sur la production des métabolites antibactériens et antifongiques comme l'acide phenazine carboxilique (PCA), le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyoluteorine (PLT) (**Meliani, 2012**), ainsi que la production d'une large gamme de sidérophores. Ces métabolites confèrent à ces bactéries une plasticité importante dans leur adaptation à des environnements variés tels que la rhizosphère et le sol. Certains PGPR produisent des antibiotiques volatiles, dont le plus important est l'HCN (**Voisard et al., 1989**).

La synthèse des antibiotiques est étroitement liée au métabolisme cellulaire, qui est à son tour liée à la disponibilité des éléments nutritifs ainsi que d'autres stimuli environnementaux (**Thomashow, 1996**), tels que les différents minéraux, les sources de carbone, le pH, la température ainsi que d'autres paramètres de l'environnement (**Bender et al., 1999**). En général, la production d'antibiotiques spécifiques *in vitro* est étroitement liée à leur antagonisme et à leur efficacité de contrôle des maladies *in vivo* (**Lee et al., 2003** )

Le composé à effet antibiotique phenazinique secrété par la souche pf2 a fait l'objet d'une extraction par deux solvants de polarité différents : acétate d'éthyle, l'hexane. D'après les résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques on a remarqué une faible zone d'inhibition. Cela a permis de dire que les métabolites qui se trouvent dans surnagent n'ont pas exercé un effet remarquable sur les souches testés. Le diamètre d'inhibition des souches pathogènes dépend de la souche de *Pseudomonas* productrice ainsi que la capacité de l'extrait phenazinique de diffuser dans le milieu. Le pouvoir inhibiteur des composés phenazinique est due à la capacité oxydo-réductrice de ces métabolites qui induise l'accumulation de peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres qui entraînent la mort de la cellule en attaquant les membranes et le matériel génétique (**Mavrodi, Blankenfeldt et al. 2006**).

L'activité antimicrobienne d'extrait de la souche PF2 obtenue par l'hexane a montré une grande activité contre, *Escherichia coli* ATCC8739. Ce résultat est en concordance avec les études de plusieurs auteurs, qui ont montré que les substances phénaziniques ont la capacité d'inhiber la croissance des souches pathogènes telle que *Escherichia coli* (Saosong *et al.*, 2009) et *Staphylococcus aureus* (veselova *et al.*, 2008).

Nos résultats se divergent avec ceux de Gurusiddiah *et al.*, (1986) par rapport au solvants utilisés. L'efficacité de ces solvants a été déjà rapportée dans l'extraction de phénazines. Parmi ces solvants l'acétate d'éthyle a permis l'obtention de meilleurs résultats.

L'extrait phénaziniques obtenue par l'extraction avec l'hexane de la souche pf2 a été séparé par CCM et identifiée par HPLC. La comparaison des résultats de différents techniques chromatographiques CCM et HPLC du standard PCA avec celui de composé produit par la souche pf2 en plus de leur activité antimicrobienne a pu mettre en évidence la capacité de la souche pf2 de produire des métabolites secondaires à effet antifongique de nature phénazinique. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Budzikiewiez (1993), Chin-A-Woeng *et al.* (2003) et Liu *et al.* (2008).

Dans les travaux réalisés par Sharma (2017), les métabolites secondaires antibiotiques ou antifongiques ne sont pas nécessaires ni pour la croissance ni pour la multiplication cellulaire, contrairement aux métabolites primaires mais ils peuvent jouer un rôle très important dans la stimulation de la croissance des plantes le biocontrôle ,et la lutte biologique contre les agents phytopathogènes (Benmati, 2014).

En comparant nos résultats avec ceux de Bakker *et al.*, (2008) que la capacité des souches de *pseudomonas* spp. fluorescents isolées ont pu inhiber l'isolat fongique ainsi que la production des métabolites , qui a démontré que la production de l'antifongique « acide phénazine-1-carboxylique » Par *Pseudomonas fluorescens –putida* avec une capacité accrue d'inhiber la croissance des deux champignons *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (G2) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lini* (F2). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines avec un grand spectre d'activité contre les bactéries et champignons (Faille, 2010).

Les phénazines sont des métabolites secondaires bactériens reconnus depuis longtemps pour leur activité antibiotique à large spectre et largement utilisés dans la lutte biologique contre les agents pathogènes bactériens et fongiques ( Pierson , 2010 ).

Les phénazines jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique, incluant la survie et la compétence des bactéries productrices (**Mazzola et al., 1992**). Les antibiotiques de type PCA et autres phénazines sont les déterminants majeurs dans le contrôle biologique des phytopathogènes telluriques par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Thomashow et Weller, 1996**).

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

# *Conclusion et perspectives*

Les sols de sud algérien représentent des écosystèmes particuliers. Leur exploration a permis de mettre en évidence leur richesse et leur biodiversité. De nombreux travaux ont été réalisés dans le but de rechercher des souches productrices d'antibiotiques.

Notre objectif était de faire un isolement et une identification de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir d'un milieu extrême, suivi d'une étude de leur effet antagoniste vis-à-vis des agents phytopathogènes fongiques et de prouver leur capacité à produire des antibiotiques ou antifongique de nature phenazinique.

L'isolement nous a permis de retenir 10 souches bactérienne appartenant au groupe de *Pseudomonas* spp fluorescents. Une identification macroscopique et microscopique tels que la coloration de Gram, et biochimiquement (test d'oxydase, catalase, et la galerie API20NE), nous a permis de sélectionner 5 souches de *Pseudomonas fluorescens* et 5 souches de *P.putida*.

Les dix souches de *Pseudomonas* ont été testée pour leur activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersci et *Fusarium oxysporom* f .sp. *lini* , nos résultats révèlent que la souche Pf2 » possède un pouvoir inhibiteur le plus élevé contre les champignons phytopathogene de *Fusarium oxysporum* avec un taux d'inhibition égale à 57% contre *f.oxysporum* f.sp. lycopersici (*G2*) et 47% contre *f.oxysporum* f.sp. lini.

L'extraction de composés à effet antibiotique de la souche PF2 par solvant, nous a permis de choisir l'hexane comme le meilleur solvant d'extraction. La purification par chromatographie sur couche mince de l'extrait brut de PF2 a donné un spot révélé sous UV de 356 nm de couleur bleu proche de celui du standard avec un rapport frontal (Rf) de 0.89.

Les résultats de l'HPLC montrent une similarité de temps de rétention entre le standard et l'essai avec des temps de rétention 8.646,8.604 respectivement ceci indique que l'antibiotique est de nature phenazinique .

Cependant, à l'issue de notre travail, il est souhaitable d'effectuer une identification phénotypique plus sophistiquée via le BIOLOG Gen III et génotypique de *Pseudomonas* spp. fluorescents par des moyens moléculaires tels que PCR, électrophorèse, western blot, le polymorphisme des fragments de restrictions (RFLP) et la Spectrométrie de masse.



Il serait aussi nécessaire d'étudier et identifier d'autres métabolites secondaires produites par les *Pseudomonas* à effet antimicrobien et de poursuivre les études sur les propriétés biologiques de ces composés et comprendre leurs mécanismes d'action comme les DAPG, sidérophores, phytohormones, et HCN.





Il est préférable d'augmenter la gamme des souches pour avoir des variétés d'espèces de *pseudomonas* spp. fluorescents ainsi que plusieurs métabolites .

Il est souhaitable d'effectuer une recherche sur les gènes impliqués dans la synthèse des phenazines et d'autres .La formulation de ses souches performantes sous forme lyophilisées dans le but de les conserver et de les stocker.Application in vivo des biopesticides dans le domaine industriel et biologique.

# *Annexes*

**Annexe I : Le matériel utilise au laboratoire**

Nom de l'appareil	Photo (Originale)	Nom de l'appareil	Photo (Originale)
<p>Hotte microbiologique TEI STAR</p>		<p>Hotte chimique</p>	
<p>Etuve de 30</p>		<p>Etuve de 44</p>	

<p>HPLC (Waters )</p>		<p>Evaporateur rotatif Heidolph</p>	
<p>Plaque chauffante (BIBBY)</p>		<p>Microscope optique (Olympus)</p>	

Four poupinel



Lampe Ultra violette



Centrifugeuse (Centrifuge 4225)



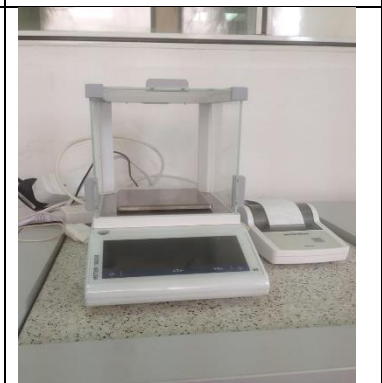
Etuve de 25



Bain-marie (memmert)



Balance analytique (Mettler Toledo)



Réfrigérateur  
4°C ( Labco)



Autoclave  
(Systec)



PH-mètre



Vortex



<b>Petit matériel et consommable</b>	
Ampoules à décanter avec des supports adéquats	Micropipettes réglables
Anse en platine	Papier aluminium
Bec Bunsen	Para-film
Boite Pétri en plastique 90 mm	Papier whatman n°1
Poire	Pinces
Cuve	Pipettes Pasteur
Spatule	Règle graduée
Disques en papier	Seringue en plastique
Embouts 50 ml	Seringue en verre
Entonnoirs en verre	Portoir
Eppendorfs 1,5 ml et 2 ml	Ecouvillons stériles
Eprouvettes graduées 100 ml	La gaze, Ciseaux
Erlenmeyers 100 ml et 250 ml	Scalpel
Flacons 250 ml	Tubes à essai 20 ml

**Colorants :**

- ❖ Fushine
- ❖ Lugol
- ❖ Violet de gentiane
- ❖ Réactif de KOVACS
- ❖ Huile de vaseline

**Les produits chimiques utilisés :**

- ❖ Ethanol (70%)
  - ❖ Sulfate de Sodium anhydre :  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en poudre (SIGMA-ALDRICH)
  - ❖ Méthanol  $\text{CH}_3\text{OH}$
  - ❖ Acétate d'éthyle  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$
  - ❖ Hexane  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
  - ❖ Sulfate de sodium
  - ❖ Acide sulfurique
  - ❖ Formaldéhyde

**Annexe II: Composition des milieux de culture et préparation des milieux de culture**

Les principales étapes de la préparation d'un milieu de culture sont :

- La pesée des différents ingrédients :Les ingrédients constituant les milieux King B, PDA sont pesés à l'aide d'une balance de précision en prenant soin de mettre en place les équipements de protection individuelle (gants, masque,...etc.).
- La dissolution : Elle doit se faire à chaud dans un erlenmeyer contenant de l'eau distillée dont le volume est de 1L fermé par un papier d'aluminium et déposé sur un agitateur. Une fois la préparation commence à bouillir on éteint l'agitateur.
- La répartition du milieu :Les milieux préparés sont répartis en flacons .
- La stérilisation : Elle est effectuée à l'aide de l'autoclave à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15 min.



Après l'étape de stérilisation le milieu doit être manipulé dans des conditions aseptiques afin de le protéger contre les contaminations extérieures.

<p style="text-align: center;"><b><u>king B :</u></b></p> <p>Peptone : 20g Glycérol : 15ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.5g MgSO<sub>4</sub> : 1.5g Eau Distillé : 1000ml PH=7.2</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>Milieu PDA (Potato Dextrose Agar):</u></b></p> <p>Pomme de terre : 200g Dextrose : 20g Agar : 15g Eau distillé : 1000 ml pH=7</p>
<p style="text-align: center;"><b><u>Gélose nutritive :</u></b></p> <p>Glucose : 28g Agar : 14g Eau distillée : 1000g PH=7</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>Milieu Muller Hinton :</u></b></p> <p>Extrait de viande : 2g Hydrolysate de caséine : 17.5g Amidon : 1.5g Agar : 12g Eau distillée : 1000ml PH=7.1</p>

### Annexe III : Tableaux de quelques résultats

**Tableau V : diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur KINGB**

KingB Souches de <i>Pseudomonas</i>	La moyenne de diamètres d'inhibition	Ecartype
<b>PF1</b>	G2=48% F2=48%	G2= 0,01 F2=0.01
<b>PF2</b>	G2=55% F2=45%	G2=0,00763763 F2=0,02
<b>PF3</b>	G2=25% F2=0%	G2=0,02645751 F2=0
<b>PF5</b>	G2=40% F2=0%	G2=0,0057735 F2=0
<b>PF6</b>	G2=42% F2=0%	G2=0,00763763 F2=0
<b>PF7</b>	G2=49% F2=53%	G2=0,00763763 F2=0,01
<b>PF8</b>	G2=48% F2=0%	G2=0,0208166 F2=0

**Tableau VI: diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur PDA**

Milieu PDA Souches de <i>Pseudomonas</i>	La moyenne de diamètres d'inhibition		L'ecartype	
<b>Pf1</b>	F2= 48%	G2=49%	G2=0.0057	F2=0.00381
<b>Pf2</b>	F2 = 47%	G2=57%	G2=0.0050	F2=0.0043
<b>Pf3</b>	F2 = 0 %	G2=27%	G2=0.0178	F2=0
<b>Pf5</b>	F2 = 0%	G2=43%	G2=0.0015	F2=0
<b>Pf6</b>	F2 =0%	G2=43%	G20.0048	F2=0
<b>PF7</b>	F2 = 55%	G2=50%	G2=0.0057	F2=0.0235
<b>Pf8</b>	F2 = 0%	G2=49%	G2=0.0103	F2=0

**Tableau VII : Diamètre d'inhibitions pour les deux solvants après une antibiographie**

Souche	Hexane			acétate d'ethyle		
	E coli	S aureus	S typhi	E coli	S aureus	S typhi
PF2	11,68	9,34	6,14	5,1	4,3	2
	11,5	9,11	6,14	5,2	4,2	2,5
	11,6	9,2	6,15	5,1	4,3	2
Moyenne	11,59	9,22	6,14	5,13	4,27	2,17
Ecartype	0,090184995	0,11590226	0,005773503	0,057735027	0,05773503	0,28867513

**A**

- Ahmad E., Khan M.S. and Zaidi A. (2013).** ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils. *Symbiosis*.61: 93–104
- Ali S. Z., Sandhya V., Grover M., Kishore N., Rao L. V., and Venkateswarlu B. (2009).** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biology and fertility of soils*. 46 (1): 45-55.
- Alabouvette. , 2004.**Effet de PGPR (*Pseudomonas* spp. fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire .thèse doctorale 2012.
- Anita B. and Samiyappan R. (2012).** Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *J. Biopesticides*. 5: 53-59.
- Arora N. K. (2015).** Plant microbe symbiosis: Applied facets. New Delhi: Springer. p. 381.

**B**

- Bano N., and Musarrat J. (2003).** Isolation and characterization of phorate degrading soil bacteria of environmental and agronomic significance. *Letters in applied microbiology*. 36(6): 349-353.
- Bashan Y., and De-Bashan L. E. (2010).** How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In *Advances in agronomy*. Academic Press. 108:77-136.
- Bakker ., (2008).** Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Thèse 2011
- Bejerano-Sagie M., and Xavier K. B. (2007).** The role of small RNAs in quorum sensing. *Current opinion in microbiology*. 10(2):189-198.
- Benmati.,M, (2014).** PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) Aspects moléculaires et génétiques, thèse de doctorat, Constantine, p17.
- Benchabane M. (2005).** Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents .thèse de doctorat. Université USTHB. Alger

- Bender C.L., Alarcón-Chaidez F., et Gross D.C (1999).** Phytotoxines de *Pseudomonas syringae*: mode d'action, régulation et biosynthèse par les peptides et les polycétides synthétases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*63 (2):266-292.
- Bhattacharyya P. N., and Jha D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 28:1327–1350.
- Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology.*4(4).343-350.
- Bolwerk A., Lagopodi A. L., Wijfjes A. H. M., Lamers G. E. M., Chin-A-Woeng T. F. C., Lugtenberg B. J. J., and Bloemberg G. V. (2003).** Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*16:983–993
- Boopathy NR., Indhuja D., Srinivasan K., Uthirappan M., Gupta R., Ramudu KN., Chel- lan R. (2013).**Statistical medium optimization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10501, its characterization and application in leather processing. *Indian Journal of Experimental Biology.*51 (4): 336-342.
- Bossis E. (1995).** Les *Pseudomonas* fluorescents de la rhizosphère: étude taxonomique et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée. These de doctorat. France.
- Britton G. (1983).** The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press.
- Budzikiewiez., (1993); Chin-A-Woeng ., (2003) ; Liu.,(2008).** Secondary metabolites from fluorescent *pseudomonads*. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 209–228.

## C

- Campbell R. (1989).** Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge university press.
- Cacciari C., Bragaglia A., Rossetti E., Pecci F. F., Mulas G., Carretta E., ... et Pasquini L. (2004).** Mass motions and chromospheres of RGB stars in the globular cluster NGC 2808. *Astronomy & Astrophysics.*413(1).343-362.

**Carney., (1989) ; Gilardi., (1985).** Etude des Propriétés suppressives d'une souche de *Pseudomonas* isolée de la rhizosphère de la pomme de terre sur la croissance de deux bactéries et de deux champignons phytopathogènes.Thèse doctorale Tlemcen

**Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., and Alland D. (2007).** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*.69 (2):330-339.

**Clarridge J. E. (2004).** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*. 17(4): 840-862.

**Colwell R.R. and Mandel M. (1964).** Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 87: 1412–1422.

**Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Ait Barka E. (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*.71:4951–4959

**Corbaz R. (1990).** Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques.

**Costa R., Van Aarle I. M., Mendes R., and Van Elsas J. D. (2009).** Genomics of pyrrolnitrin biosynthetic loci: evidence for conservation and whole-operon mobility within Gram-negative bacteria. *Environmental microbiology*.11(1):159-175.

**Cohen A. C., Bottini R., and Piccoli P. N. (2008).** *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regul.* 54: 97–103.

## D

**Dayanandan A., Kanagaraj J., Sounderraj L., Govindaraju R., Rajkumar GS. (2003).** Application of an alkaline protease in leather processing: an eco-friendly approach. *Journal of Cleaner Production*.11 (5): 533-536.

**Dari., (2013).** Évaluation de la biodiversité bactérienne d'un sol dunaire du sud Algérien (Région de Biskra).Thèse de doctorat Constantine.

- De Souza J. T., De Boer M., DeWaard P., Van Beek T.A., and Raaijmakers J.M. (2003).** Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7161-7172.
- Defago G. (1993).** 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312.
- Degand N., Carbonnelle E., Dauphin B., Beretti J. L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus I., and Ferroni A. (2008).** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology.* 46(10): 3361-3367.
- Delaney S.M., Mavrodi D.V., Bonsall R.F. and Thomashow L.S. (2001).** phzO, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *J. Bacteriol.* 183:318-327.
- Devanesan M. G., Viruthagiri T., & Sugumar N. (2007).** Transesterification of Jatropha oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of biotechnology.* 6 (21).
- Dieckmann R., Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U. and von Dohren H. (2005).** Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICMMS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 539–548.
- Digat B. et Gardan L. (1987).** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP.* 17: 559-568.
- Donelli G., Vuotto C., and Mastromarino P. (2013).** Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial ecology in health and disease.* 24(1).20105.
- Dorjey S., Dolkar D., and Sharma R. (2017).** Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 6(7).1335-1344.
- Dowling D.N., O’Gara F. (1994).** Metabolites of *pseudomonas* involved in the bio control of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12:133–141
- Duijff B. J., Recorbet G., Bakker P. A., Loper J. E., and Lemanceau P. (1999).** Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of

nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology*, 89(11) :1073-1079.

**El Guilli M., Achbani E., Fahad, K. et Jijakli H. (2009).** Biopesticides : Alternatives à la lutte chimique. Symposium Internationa 'Agriculture durable en régions méditerranéennes (AGDUMED)' Rabat.266-280 p.

## F

**Faille A. (2010).** Identification de composés naturels contre *Saprolegnia sp.*, un champignon pathogène en aquaculture.

**Franco-Correa M., Quintana A., Duque C., Suarez, C., Rodríguez M. X., and Barea J. M. (2010).** Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*.45(3).209-217.

## G

**Gao G., Yin D., Chen S., Xia F., Yang J., Li Q., and Wang W. (2012).** Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *PloS one*.7(2).e31806.

**Glick B. R. (2014).** Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*.169(1):30-39.

**Glick B.R., Penrose D.M. and Jiping L. (1998).** A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190(1):63–68.

**Grandclément C., Tannières M., Moréra S., Dessaux Y., and Faure D. (2015).** Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS microbiology reviews*. 40(1):86-116.

**Gross H., Loper J.E. (2009).** Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26:1408-1446.

**Grimont F., Chevrier D., Grimont P. A. D., Lefevre M., and Guesdon J. L. (1989).** Acetylaminofluorene-labelled ribosomal RNA for use in molecular epidemiology and taxonomy. *Research in microbiology*.140(6): 447-454.



**Gurusiddaiah S., Weller D.M., Sarkar A. and Cook R. J. (1986).** Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:488-495.

## H

**Haas D., and Défago G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology.* 3(4): 307.

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

**Hassett D. J., Woodruff W. A., Wozniak D. J., Vasil M. L., Cohen M. S., and Ohman D. E. (1993).** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *Journal of Bacteriology.* 175(23):7658-7665.

**Hilario E., Buckley T. and Young J. (2004).** Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA. *Antonie van Leeuwenhoek.* 86: 51–64.

**Höfte M., de Vos P. (2006).** Plant pathogenic pseudomonas species. In: Gnanamanickam S S, ed., *Plant-Associated Bacteria.* Springer, The Netherlands. pp. 507–533.

**Howell C. R., and Stipanovic R. D. (1980).** Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology.* 70(8):712-715.

**Howell C.R and Stipanovic R.D. (1979).** Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69: 480–482.

**Holloway., 1992 ; Lemanceau., 1992; Schroth ,1992 ; Latour., 1996; Digat et Gardan, 1987; Latour et Lemanceau, 1997.,** localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse doctorale Setif.

**Hussein K.A. and Joo J.H. (2015).** Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*.58: 847-855.

## J

**Jacques P., Delfosse P., Ongena M., Lepoivre P., Cornélis P., Koedam N., Thonart P. (1993).** Les mécanismes biochimiques développés par les" *Pseudomonas*" fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agricultures*.2(5) :301-307.

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

**Joffin J. N., and Leyral G. (2006).** Microbiologie technique, Tome 2: Documentation Technique, Collection Biologie Technique. Ed. Doin, CRDP Aquitaine. 363p.

**Johnston A., and Booth C. (1983).** Mycological media and methods. Plant Pathologist's Pocket Book.397p.

## K

**Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., and Lugtenberg B. (2005).** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*.7(11):1809-1817.

**Kennedy A.C. (1999).**Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ*. 74:65–76

**King E. O., Ward M. K., and Raney D. E. (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Translational Research*.44(2).301-307.

**Kirdi B. (2011).** Rôle des PGPR «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites. Thèse de doctorat.

**Klockgether J., Cramer N., Wielmann L., Davenport C.F., Tummler B. (2011)** *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol Cell Infect Microbiol*.2:150.

**Kouassi M.D (2001).** Les possibilités de la lutte microbiologique. Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo-la revue électronique en sciences de l'environnement* . 2(2).

**Kumar A., Singh V., Singh M., Singh P.P., Singh S.K., Singh P.K., Pandey K.D. (2016).** Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 8:1–7.

**Kumar V., Kumar A., Pandey K.D., Roy B.K. (2015).** Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora* L. *Ann. Microbiol.* 65: 139–1399

**Kung V.L., Ozer E.A., Hauser A.R. (2010).** The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:621–641.

## L

**Latour ., Lemanceau., 1997; Benchabane., 2005.** caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse de doctorat .

**Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., ... et Kim V.N (2003).** La RNase nucléaire III Drosha initie le traitement des microARN. *Nature* , 425 (6956):415.

**Lelliot R. A., and Stead D. E. (1987).** Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. *Methods in Plant Pathology.* 2:216.

**Loper J.E., Buyer J.S. (1991).** Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol Plant-Microbe Interact.* 4:5–13.

**Lugtenberg B., Kamilova F. (2009).** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556.

## M

**MacDonald J. C. (1967).** Phenazines. *Antibiotics and Biosynthesis.* Springer verlage. New york.2:52-65.

**Maddula V. S. R. K., Pierson E. A., and Pierson L. S. (2008).** Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strain 30-84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *Journal of bacteriology.*190(8):2759-2766.

**Mahajan-Miklos S., Tan M. W., Rahme L. G., Ausubel F. M. (1999).** Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*–*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.*96(1):47-56.

**Mahanty T., Bhattacharjee S., Goswami M., Bhattacharyya P., Das B., Ghosh A., Tribedi P. (2017).** Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(4).3315-3335.

**Maksimov I. V., Abizgil'Dina R. R., and Pusenkova L. I. (2011).** Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens. *Applied Biochemistry and Microbiology*.47(4).333-345.

**Manaia C. M., and Moore E. R. (2002).** *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.52(6):2203-2209.

**Martínez-Viveros O., Jorquera M. A., Crowley D. E., Gajardo G. M. L. M., and Mora M. L. (2010).** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*.10(3):293-319.

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

**Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Delaney S. M., Soule M. J., Phillips G. and Thomashow L. S. (2001).** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1 carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*.183:6454-6465.

**Mavrodi D.V., Ksenzenko V.N., Bonsall R.F., Cook,R.J., Boronin A.M. and Thomashow L.S.(1998).** A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J. Bacteriol*. 180: 2541–2548.

**Mazereeuw-Hautier J. (2006).** Formation médicale continue : impétigo. *Ann. Dermatologie Vénérologie*.133:194-207.

**Mazzola M., Cook R. J., Thomashow, L. S., Weller D. M., and Pierson L. S. (1992).** Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*.58(8).2616-2624.

**Mercado-Blanco J., and Bakker P. A. (2007).** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*.92(4):367-389.

**Meliani., (2012).**Contribution à l'étude de la biodiversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens* .Thèse de magister Oran.

**Moneke A.N., Okpala G.N. & Anyanwu C.U. (2010).** Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol.*9:4067-4074.

## N

**Nadal Jimenez P., Koch G., Thompson J. A., Xavier K. B., Cool R. H., and Quax W. J. (2012).** The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*76(1):46-65.

**Nakkeeran S., Fernando W. D., and Siddiqui Z. A. (2005).** Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization* Springer, Dordrecht. 257-296p.

**Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., and Brinkac L. (2002).** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology.*4(12):799-808.

**Nielsen M.N., Sorensen J., Fels J and Pedersen H.C. (1998)** Secondary metabolite-and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563–3569

**Noreen R., Ali S.A., Hasan K.A., Sultana V. (2015).** Evaluation of biocontrol potential of fluorescent *Pseudomonas* associated with root nodules of mungbean. *Crop Prot.* 75:18–24.

**Novik G., Savich V., and Kiseleva E. (2015).** An insight into beneficial *Pseudomonas* bacteria. In *Microbiology in Agriculture and Human Health*. IntechOpen.

## O

**Ongena, M., Jourdan, E., Schäfer, M., Kech, C., Budzikiewicz, H., Luxen, A., & Thonart, P. (2005).** Isolation of an N-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Molecular plant-microbe interactions.*18(6):562-569.

**Ozer E. A., Allen J. P., and Hauser A. R. (2014).** Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGent. *BMC genomics.*15(1):737.

P

**Palleroni J., Kunisawa R., Comopoulou R., Doudoroff M. (1974).** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol.*23:333–339.

**Palleroni N. J. (2010).** The *Pseudomonas* story. *Environmental microbiology.* 12(6): 1377-1383.

**Palleroni N.J. (1984).** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.

**Palleroni, N.J. (2009).** The genus *Pseudomonas*. Dans "Practical handbook of microbiology", 2ème édition, Goldman, E. et Green, L.H. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Etats-Unis.231- 242p.

**Parmer N., Dadarwal K.R. (1999).** Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid like compounds by rhizobacteria. *J Appl Microbiol.* 86:36–44

**Paulsen I.T., Press C.M, Ravel J., Kobayashi D.Y., Myers G.S.A. (2005).** Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol.*23:873–878.

**Pieterse C. M. J., Van Wees S. C. M., Ton J., Van Pelt J. A., and Van Loon L. C. (2002).** Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology.*4(05): 535-544.

**Pineda F.J., Antoine M.D., Demirev P.A., Feldman A.B., Jackman J., Longenecker M., and Lin J.S.(2003).** Microorganism identification by matrix- assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Ann. Chem.* 75: 3817–3822.

**Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (2003).** *Microbiologie.* De Boeck : Bruxelles. 2eme édition.1164p.

**Prescott L. M., Willey J. M., Sherwood L. M., & Woolverton C. J. (2018).** *Microbiologie. De Boeck Supérieur.*

R

**Raaijmakers J. M., Vlami M., and De Souza J. T. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek.*81(1-4): 537.

**Rai A. (2017).** Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin. These de doctorat.Université Ferhat Abbas Sétif.

**Ran L.X., Li Z.N., Wu G.J., Bakker L.C., Van Loon P.A.H.M. (2005a)** Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Eur. J. Plant Pathol.*113:59–70.

**Rekadwad B. And Ghosh P. K. (2018).** *Pseudomonas*: a quorum sensing system for improved crop production. In *Quorum Sensing and its Biotechnological Applications* . Springer.Singapore. 181-191.

**Richardson A. E. (2001).** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology.*28(9):897-906.

## S

**Santos S. R., and Ochman H. (2004).** Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environmental Microbiology.*6(7) : 754-759.

**Saosoong ., 2009 ; veselova ., 2008.**Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires secrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Thèse doctorale 2017

**Sathya A., Vijayabharathi R., and Gopalakrishnan S. (2017).** Plant growth-promoting actinobacteria: A new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech.*7:102.

**Selin C., Habibian R., Poritsanos N., Athukorala S. N., Fernando D., and De Kievit T. R. (2009).** Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. *FEMS microbiology ecology.*71(1):73-83.

**Shafi J., Tian H., and Ji M. (2017).** *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment.*31:1–14.

**Shanmugam V., Ajit N. S., Verma R., and Sharma V. (2008).** Diversity and differentiation among fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres with whole-cell protein profiles. *Microbiological research.*163(5).571-578.

**Sharma P.V. P., Kaur M (2017).** "Identification of secondary metabolites produced by fluorescent Pseudomonads for controlling fungal pathogens of apple." *Indian Phytopathological Society* .70 (4): 452-456

**Silby M.W., Winstanley C., Godfrey S.A.C., Levy S.B., Jackson R.W. (2011).** *Pseudomonas* genomes:diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35(4):652– 680.

**Soylu S., Baysal Ö., and Soylu E. M. (2003).** Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science*. 165(5): 1069-1075.

**Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J. and Garber R. L. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*.406: 959-964

**Sturz A. V., and Christie B. R. (2003).** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and Tillage Research*. 72(2):107-123.

## T

**Thakore Y. (2006).** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208.

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

**Thomashow M. (1996).** *Ecological identity: Becoming a reflective environmentalist*. Mit Press.

**Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K., De R., Saxena A. K., Nautiyal C. S., Mittal S., Tripathi A. K., and Johri B. N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*.89:136–150.

**Trivedi P., Delgado-Baquerizo M., Trivedi C., Hamonts K., Anderson I. C., et Singh B. K. (2017).** Keystone microbial taxa regulate the invasion of a fungal pathogen in agro-ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*.111:10-14.



V

**Venturi M. L., Attinger C. E., Mesbahi A. N., Hess C. L., and Graw K. S. (2005).** Mechanisms and clinical applications of the vacuum-assisted closure (VAC) device. *American journal of clinical dermatology*.6(3):185-194.

**Vessey J. K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*. 255(2), 571-586.

**Vincent M. N., Harrison L. (1991).** "Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain." *Appl Environ Microbiol* .57(10): 2928-2934.

**Voisard C., Keel C., Haas D., et Dèfago G. (1989).** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal*.8(2).351-358.

W

**Wang Y., Wilks, J. C., Danhorn T., Ramos I., Croal L., and Newman D. K. (2011).** Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *Journal of bacteriology*.193(14).3606-3617.

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

**Whipps J. M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*. 52(1):487-511.

**Widden P. (1994).** Competition and the fungal community. In: Esser K, Wicklow D T et Svderstrvm B E. *The mycota IV. Environmental and Microbiological* (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Allemagne. pp. 135-147.

**Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W, Ramos J., van der Lelie D. (2011).** Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev*. 35:299–323.

**Y**

**Yumoto I., Yamazaki K., Hishinuma M., Nodasaka Y., Suemori A., Nakajima K., and Kawasaki K. (2001).** *Pseudomonas alcaliphila* sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.51(2):349-355.

