

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

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

Option : Microbiologie-bactériologie

Thème

**La Mise En Evidence De Quelques Métabolites
Secondaires Impliqués Dans Le Biocontrôle Et La
Phyostimulation Chez *Pseudomonas*
spp.fluorescents**

Soutenu le : 15 /09/2015

Présenté par : **MIRAD Sara**

Devant le jury composé de :

Mme Boudjema. N.	M.C.B	USDB 1	Présidente
Mme Zerkaoui. A	M.A.A	USDB 1	Examinatrice
Mme Ait Saadi. N.	M.A.A	USDB 1	Promotrice
Mr Degaïchia. H	Magister	USDB 1	Invité

Année universitaire 2014-2015

Résumé

L'objectif de notre travail est d'évaluer la capacité de dix-neuf(19) souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents issues de quelque sols rhizosphériques du sud Algérien de produire quelques métabolites secondaires *in vitro* impliqués dans les processus de biocontrôle et de phytostimulation (Acide indole acétique (AIA), phosphatase, les enzymes dégradant les paroi cellulaires ...).

Les résultats ont révélé que 100% des souches ont le pouvoir de produire les chitinasés, 94,44% produisent les phosphatases, 63,15% sont aptes à synthétiser les enzymes protéolytiques, 31,57% produisent l'acide indole-3-acétique (AIA) avec un taux maximum de 18,3 µg/ml enregistrée par la souche F48, par contre nous avons marqué une absence totale de production de pectinase, cellulase, et lipase.

L'application de ces rhizobactéries a permis de mettre en évidence des potentialités antagonistes inhibant *in vitro* la croissance de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* agent causale de la fusariose vasculaire du la tomate sur trois milieux de cultures (PDA, King B, CAA). Le meilleur résultat a été obtenue sur le milieu CAA avec un taux d'inhibition de la croissance mycélienne de 49,41% enregistré par la souche F21 .Nous avons constaté que l'activité antagoniste dépend non seulement des souches mais aussi du milieu de culture.

Les résultats de l'application de certaines de ces souches antagonistes sélectionnées sur la base de la production de quelques métabolites secondaires sur la stimulation de la germination des semences de tomate ont permis d'obtenir des effets bénéfiques sur la longueur des racines et des pousses, ainsi que sur l'indice de la vigueur par apport ou témoin non inoculé .

Mots clés : Biocontrôle, phytostimulation, *Pseudomonas* spp. fluorescents ,*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Tomate

Abstract

The objective of our work is to evaluate the capacity of nineteen (19) strains of *Pseudomonas* spp. fluorescent isolated from the rhizosphere of different soil of the south Algerian to produce some secondary metabolites *in vitro* implied in the processes of biocontrôle and phytostimulation (Acide indole acétique (AIA), phosphatase, enzymes degrading the wall cellular...).

The results revealed that 100% of the strains have the power to produce the chitinases, 94.44% produce phosphatases, 63.15% are ready to synthesize the proteolytic enzymes, 31.57% produce the indol-3-acetic acid (AIA) with a highest rate of 18.3 µg/ml recorded by the F48 stock, on the other hand, we have marked a complete lack of production of pectinase, cellulase, and lipase.

The application of these rhizobacteries made it possible to highlight antagonistic potentialities *in vitro* inhibiting the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of the vascular fusariose of tomato on three culture media (PDA, King B, CAA). The best result was got on medium CAA with a rate of inhibition of the mycelial growth of 49.41% recorded by the strain F21. We noted that the antagonistic activity depend not only of the strains but also of the culture medium.

The results of the application of some of these antagonistic strains selected on the basis of production of some secondary metabolites on the stimulation of the germination of the tomato seeds made it possible to obtain beneficial effects over the length of the roots and the growths, like on the index of strength by contribution or witness non inoculated.

Keywords: Biocontrôle, phytostimulation, *Pseudomonas* spp. fluorescent, *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici*, Tomato.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم قدرة بعض سلالات *Pseudomonas spp* المشعة المنتقاة من بعض تربة الجذور في الجنوب الجزائري ,على إنتاج بعض المركبات الأيضية الثانوية في المختبر, المتدخلة في عملية الحماية البيولوجية ,و تحفيز نمو النباتات (*Phosphatase, (AIA)l'acide indole acétique* , الأنزيمات المحللة لجدار الخلية..).

كشفت النتائج أن 100% من السلالات لها القدرة على إنتاج *chitinases* , 94,44% قادرة على إذابة الفسفور, 63.15% هي قادرة على إنتاج الأنزيمات البروتينية, 31,57% قادرة على إنتاج *AIA* , حيث قدرت قيمة أقصى كمية بمعدل 18.3 غرام / مل التي سجلتها سلالة F48, في حين تم تسجيل انعدام تام للإنتاج *lipase, cellulase* , *pectinase*.

ساعد تطبيق هذه السلالات الجذرية على تحديد تأثيراتها المثبطة لنمو الفطري *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* المسبب لمرض الذبول الفوزاري للطماطم على ثلاثة أوساط معيشية (*CAA, King B, PDA*). تم الحصول على أفضل نتيجة في الوسط المعيشي (*CAA*) مع معدل تثبيط النمو الفطري ب 49.41% المسجل من قبل سلالة F21. حيث توصلنا بأن نشاط تثبيط النمو الفطري ليس تحت تأثير السلالات فقط انما الوسط المعيشي أيضا.

نتائج تطبيق بعض هذه السلالات المختارة على أساس إنتاج بعض المركبات الثانوية على تحفيز إنبات بذور الطماطم قد سمح على الحصول على آثار إيجابية على طول الجذور والبراعم, وكذلك معدل الإنبات و مؤشر القوة.

الكلمات المفتاحية : الحماية البيولوجية ,التحفيز النباتي, *Pseudomonas spp. fluorescents*, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, ,نبات الطماطم.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Humblement **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la volonté pour bien mener ce travail.

Mes très vifs remerciements s'adressent à ma promotrice **AIT SAADI .N.** de m'avoir fait profiter de ses connaissances et pour son soutien précieux qu'elle m'a accordée pour faire avancer ce travail. je la remercie pour ses bons conseils et engagements.

Merci aux membres du jury, Madame **ZARKAOUI.A** et Madame **BOUDJEMA .N** chargé de cour a l'université de Blida d'avoir accepté de juger mon travail.

Un Enorme merci à Mme **MOHAMED MAHMOUD.F** enseignante à l'université de SAAD DAHLEB BLIDA pour son aide et sa générosité.

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé, m'ont conseillé, m'ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, particulièrement ingénieur de laboratoire de microbiologie Mme **KESRI Samia**, et ingénieur de laboratoire de bactériologie Mme **Selma**, également ingénieur de laboratoire de chimie Mlle **Nadjia**.

Un grand merci est réservé à Mr. **Housseem Degaïchia**, ça ne sera pas suffisant pour lui exprimer toute ma grande reconnaissance pour son grand soutien lors de ce travail.

Je ne saurai oublier de remercier tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail, et toute personne qui m'a éclairé le chemin.

Dédicaces

*Je dédie ce travail, à mes chers Parents, les mots expressifs
soient-ils restent faibles pour énoncer ma gratitude hautement
profonde.*

A mes sœurs Amel, Karima, Roumaïssa. Ma belle-sœur Ouafia

A mes frères Imad et Yasser.

A mes Beaux-frères Mounir et Mourad.

A mes nièces Oumayma, Maram, Maroua, Yasmine.

Mes cousines Ihsene et Hadjer, Hassiba

Mes Amies SARA, Amina, Ahlem

A une personne Unique M. Mohamed

A tout ma promotion.

Sara

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
1. Les biopesticides microbiens	3
2. Les rhizobactéries en tant qu'agents de lutte biologique	5
3. Communauté rhizosphérique.....	5
3.1 Notion de La rhizosphère	5
3.1. Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).....	6
3.2.1. Rhizobactéries bénéfiques non symbiotiques.....	6
4. Le Genre <i>Pseudomonas</i>	7
4.1 Les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	8
4.2 Intérêt agro-écologique des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	9
5. Mécanismes d'action de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescent.....	11
5.1. Action direct.....	11
5.2. Action indirect.....	12
Chapitre II: Matériel et Méthodes	
I. Matériel	
1. Matériel non biologique	22
2. Matériel biologique	22
II .Méthodes	
1. Purification des souches.....	23
2. Production de métabolites secondaires.....	23
3. Evaluation de l'effet antagoniste <i>in vitro</i>	26
4. Effet des PGPR sur la stimulation <i>in vitro</i> de la germination et la croissance des plants de tomate.....	27
5. Analyse statistique.....	30
Chapitre III : Résultats et interprétation	31
Chapitre IV : Discussion	45
Conclusion	51
Référence bibliographique	53
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	16
Tableau 2 : caractéristiques des souches antagonistes utilisées.....	22
Tableau 3: Nombre et taux des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents productrices de métabolites secondaires.....	31
Tableau 4: Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA).....	33
Tableau 5 : les résultats de production des enzymes protéolytiques par 19 souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	36
Tableau 6: résultats de confrontation de <i>Fusarium oxysporium</i> f.sp. <i>lycopersici</i> et 19 souches de <i>Pseudomonas</i> spp luorescents sur trois milieux de culture (PDA, King B, CAA).....	38
Tableau 7: Effet de milieu et des souches sur le taux et le diamètre d'inhibition.....	40
Tableau 8 : Effet de milieu sur le diamètre	40
Tableau 9 : Effet de milieu sur le Taux d'inhibition	40
Tableau 10: Effet des souches sur le taux d'inhibition et le diamètre.....	40
Tableau 11: effet des souches sur le taux de germination et l'indice de la vigueur (test ANOVA à 1 facteur, p=0,05).....	42
Tableau 12 : Effet des souches sur le taux de germination	43
Tableau 13 : les résultats de bactérisation des semences de tomate.....	43
Tableau 14 : Effet des souches sur l'indice de la vigueur.....	44

Liste des figures

Figure 1 : Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005.....	5
Figure 2: Les principaux mécanismes d'action des PGPR.....	11
Figure 3 : Conidies de <i>Fusarium</i>	18
Figure 4 : les symptômes de la fusariose de la tomate	19
Figure 5 : Cycle biologique de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	20
Figure 6: semences de Tomate (a) variété de semence utilisée (b) graines de tomate.....	23
Figure 7: Méthode de confrontation directe en boîte pétri entre les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents et le champignon <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	27
Figure 8 : Production de l'acide-indole-acétique par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	32
Figure 9: Production de autre type de l'acide-indole-acétique par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	32
Figure 10 : Production de phosphatase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	34
Figure 11 : résultats de test de Pectinase (négative).....	35
Figure 12 : Absence de production de lipase.....	35
Figure 13: Production des enzymes protéolytiques par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	36
Figure 14: Production de chitinase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	37
Figure 15: production d'NH ₃ par les souches <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	37
Figure16: Croissance de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> sur les trois milieux.....	38
Figure 17 : confrontation champignon <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sur le milieu PDA.....	39
Figure 18: confrontation champignon <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sur le milieu King B.....	39
Figure 19: confrontation champignon <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents sur le milieu CAA.....	40
Figure 20 : La longueur moyenne des racines et des pousses chez les isolats étudiés.....	41
Figure 21 : Le taux de germination chez les semences traité et le témoin.....	42
Figure 22: l'indice de la vigueur chez les isolats étudiés.....	43

Liste des figures

Figure 1 : Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005.....	5
Figure 2: Les principaux mécanismes d'action des PGPR.....	11
Figure 3 : Conidies de <i>Fusarium</i>	18
Figure 4 : les symptômes de la fusariose de la tomate	19
Figure 5 : Cycle biologique de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	20
Figure 6: semences de Tomate (a) variété de semence utilisée (b) graines de tomate.....	23
Figure 7: Méthode de confrontation directe en boîte pétri entre les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents et le champignon <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	27
Figure 8 : Production de l'acide-indole-acétique par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	32
Figure 9: Production de autre type de l'acide-indole-acétique par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	32
Figure 10 : Production de phosphatase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	34
Figure 11 : résultats de test de Pectinase (négative).....	35
Figure 12 : Absence de production de lipase.....	35
Figure 13: Production des enzymes protéolytiques par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	36
Figure 14: Production de chitinase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	37
Figure 15: production d'NH ₃ par les souches <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	37
Figure16: Croissance de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> sur les trois milieux.....	38
Figure 17 : confrontation champignon <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sur le milieu PDA.....	39
Figure 18: confrontation champignon <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents sur le milieu King B.....	39
Figure 19: confrontation champignon <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents sur le milieu CAA.....	40
Figure 20 : La longueur moyenne des racines et des pousses chez les isolats étudiés.....	41
Figure 21 : Le taux de germination chez les semences traité et le témoin.....	42
Figure 22: l'indice de la vigueur chez les isolats étudiés.....	43

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole Acétique.

C⁰ : Degré Celsius.

CAA: Casamino-Acide.

CHAO: *P. fluorescens* CHAO.

CMC: carboxyl-methylcellulose.

CWDE: cell wall degrading enzymes.

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

HCN : Acide cyanhydrique.

IV: Indice de la vigueur.

ISR: induced systemic resistance.

LBT : Luria Bertani enrichi du tryptophane.

P: Phosphore .

PDA: Potato dextrose agar.

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PVK: Pikovskaya.

Rpm: Rotation par minute.

TG : Taux de germination.

TSA: Tryptic-soy-agar.

UV: Ultra-Violet

Introduction

Introduction

Introduction

La lutte contre les maladies des plantes cultivées, notamment celles causées par les champignons phytopathogènes, se base essentiellement sur les techniques de lutte chimique. L'augmentation irrationnelle de l'utilisation d'intrants chimiques a mené à des problèmes de santé humaine, de développement de résistances chez les phytopathogènes et de pollution de l'environnement (Avis et *al*, 2008).

En plus de ces problèmes suscités, globalement la lutte chimique est sans efficacité, ne donne pas de réussite dans le cas des maladies vasculaires, et pose encore plus de difficultés lorsque l'agent pathogène est tellurique (Guillaumin et *al*, 1998). Dans le même contexte, les fusarioses vasculaires, en plus de leur action systémique, le champignon a la capacité de s'héberger et de se conserver pour de longues périodes dans le sol (Agrios, 2005) sous forme de macroconidies, microconidies et chlamydospores. La survie du champignon semble dépendre de la matière organique provenant des débris des végétaux (Beckman, 1989).

Vis-à-vis de ce genre de pathologies végétales, la considération d'autres méthodes alternatives, notamment celles qui se basent sur l'exploitation des potentialités microbiennes antagonistes s'imposent. Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies d'origine tellurique, les rhizobactéries appartenant au groupe *Pseudomonas fluorescens –putida* font l'objet d'une attention particulière et ont suscité l'intérêt de plusieurs travaux de recherches et de nombreuses publications.

L'utilisation des bactéries pour l'amélioration du rendement et la protection des cultures est initiée depuis le début de ce siècle. Dès le milieu des années 60, plusieurs applications expérimentales ont été rapportées (Weller, 1988), elles tirent profit des propriétés bénéfiques des bactéries envers les plantes et/ou des capacités antagonistes des micro-organismes contre les pathogènes.

Les *Pseudomonas* spp fluorescents, sont largement retrouvés 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 vis-à-vis des agents phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires comme la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques, la réduction de fer disponible pour les

phytopathogènes, et à induire l'ISR chez les plantes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Whipps, 2001; Van loon, 2007; Weller *et al.*, 2002).

En plus de leur rôle protecteur, de nombreux travaux (Lemanceau.,1992 ;Gagné et *al.*,1993 ;Latour et *al.*,2003 ;Benchabane,2005) ont mis en évidence le rôle potentiel phytostimulateur de plusieurs souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans des conditions expérimentales contrôlées.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connues pour leur rôle promoteur de la nutrition et la croissance des plantes (Leong., 1986), par production de nombreux métabolites secondaires telle que les régulateurs de croissance comme l'acide indole acétique (AIA) (Vessey., 2003), la solubilisation de minéraux comme le phosphore (Kim et *al.*, 1998; Richardson, 2001) et la production de sidérophores (Lemanceau., 1992).

Nos objectifs découlent de ces principes. Nous avons mis la lumière sur la capacité de 19 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents de produire, *in vitro*, quelques métabolites secondaires décrites comme essentiels (AIA, Phosphatase, enzymes protéolytique, cellulase, pectinase et chitinase), ainsi que l'implication de ces métabolites dans :

- l'antagonisme *in vitro*, vis-à-vis d'un champignon phytopathogène, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. responsable de la fusariose vasculaire de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).
- la stimulation de la germination *in vitro* de la tomate, et cela en mesurant des paramètres propres à ce processus (la longueur des pousses et des racines, le taux de germination et l'indice de la vigueur).

Chapitre I

Revue

Bibliographique

1. Les biopesticides d'origine microbienne

Les agents biotiques (ravageurs et parasites) sont responsables, chaque année, de la perte de 20 à 40% du rendement des cultures avant récolte et entre 1 et 20% après récolte aux USA (Wojcieh et Lise, 2002). Actuellement, ce sont essentiellement des pesticides de synthèse qui sont utilisés pour lutter contre ces ravageurs. Les produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace pour faire face à ces problèmes, mais ces substances ont des conséquences néfastes sur (Kouassi, 2001; Thakore, 2006) :

- l'environnement : comme l'accumulation de résidus et la pollution des sols.
- l'apparition et la généralisation des mécanismes de résistance chez les pathogènes.

Le déséquilibre écologique, dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant, non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème. Au regard de ces inconvénients, il est important de trouver des solutions alternatives permettant de continuer à lutter contre les phytopathogènes tout en diminuant l'emploi de produits chimiques. Celles-ci peuvent faire appel à la rationalisation des pratiques agricoles (fumigation-stérilisation en horticulture, désinfection des graines, rotation des cultures, contrôle du/des vecteur(s) de la maladie...), à l'utilisation de variétés végétales résistantes (croisements sélectifs, insertion de gènes de résistances ...) ou au développement des biopesticides (Kouassi, 2001)

Ces biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis d'agents phytopathogènes, mais aussi de substances d'origine naturelle telles que des extraits végétaux, phéromones, etc... (Thakore, 2006).

Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits

chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes. De plus, les biopesticides sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples et déclenchent donc rarement des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection. En outre, ils peuvent compléter les pesticides conventionnels une fois utilisés dans les programmes intégrés de la gestion des parasites (IPM) (Fravel, 2005; Thakore, 2006).

Les biopesticides peuvent donc être complémentaires au traitement chimique, mais peuvent aussi être utilisés dans des situations pour lesquelles aucune solution de contrôle utilisant des produits de synthèse n'est actuellement disponible. Ces agents microbiens sont utilisés à travers le monde dans les champs et dans les serres (Ji et *al*, 2006; Lee et *al*, 2006; Minuto et *al*, 2006), pour combattre un grand nombre de maladies causées par des pathogènes du sol, foliaires ou de post-récoltes (Paulitz et Bélanger, 2001; Fravel, 2005).

Le marché des pesticides synthétiques avait diminué au cours des 5 dernières années grâce au développement des biopesticides et des récoltes génétiquement modifiées. Les biopesticides représentent 2.5% (672 millions \$ en 2005) des ventes de produits phytosanitaires (26 milliards \$) alors qu'il était seulement de 0.2% en 2000. En dépit de sa petite taille comparée aux pesticides synthétiques, le marché des biopesticides se développe donc et on prédit qu'il atteindra plus d'un milliard de dollars en 2010 (Thakore, 2006)

Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74% du marché mondial (Thakore, 2006) (Fig.1).

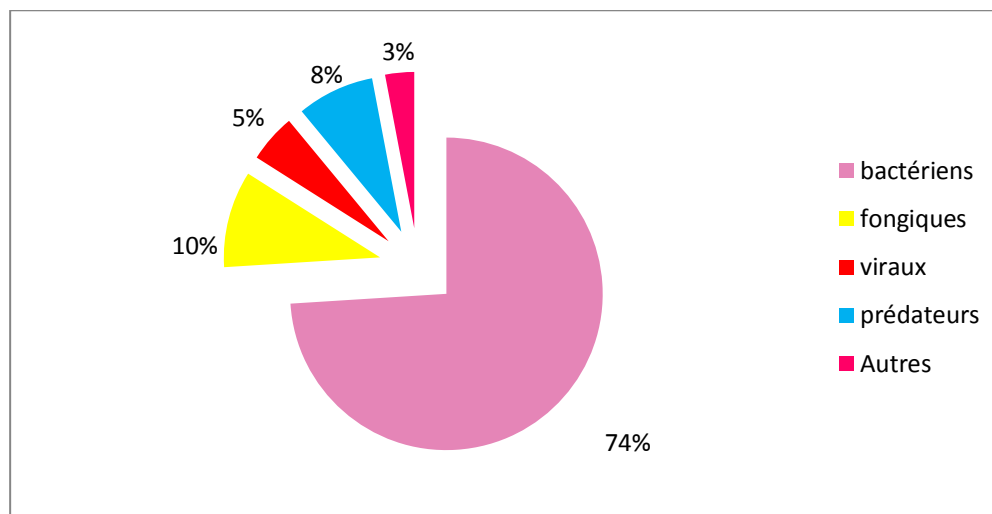


Figure 1 : Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005 (Thakore, 2006).

La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago, 2005). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler en laboratoire. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu (Raaijmakers et al, 2002; Cavaglieri et al, 2005).

2. Les rhizobactéries en tant qu'agents de lutte biologique

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones...etc. Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (kloepper et al, 1978).

3. Communauté rhizosphérique

3.1. Notion de La rhizosphère

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

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002) Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004).

Les interactions entre les microorganismes et la plante dans la rhizosphère sont nombreuses et variées. La plante libère des exsudats racinaires qui sont constitués de substances organiques carbonées et azotées : polysaccharides, acides organiques et protéines (Lemanceau 1992) ; la disponibilité de ces exsudats racinaires et leur acquisition par les micro-organismes sont essentiels à la multiplication microbienne dans la rhizosphère (Oksinska et *al*, 2011).

Plusieurs mécanismes sont réputés jouer un rôle essentiel dans la croissance des plantes. Les plus fondamentaux sont, bien sûr, l'accès aux nutriments minéraux et organiques de base en quantité suffisante pour répondre aux besoins de la plante, et l'absorption effective de ces nutriments grâce à leur transformation, leur solubilisation et leur transport du sol vers la plante (Robin, 2012).

3.2. Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Le terme PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) désignant ces bactéries a été introduit par Kloepper et Schroth (1978).

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

Certaines PGPR sont utilisées en tant qu'inoculant pour améliorer le développement des racines via la production de certaines phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg., 2001),

telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (Vessey, 2003). Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore et par la production de sidérophores (Lemanceau, 1992).

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des microorganismes phytopathogènes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Whipps, 2001) par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau *et al*, 2009).

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

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

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

3.2.1 Rhizobactéries bénéfiques non symbiotiques

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Gray et Smith, 2005) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (Rabhi, 2011). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol (Raaijmakers *et al*, 2002).

4. Le Genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula. C'est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe des γ protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al*, 2000) :

Phylum.....	<i>Proteobacteria</i>
Classe.....	<i>Gammaproteobacteria</i>
Famille.....	<i>Pseudomonaceae</i>
Ordre.....	<i>Pseudomonales</i>

Le genre *Pseudomonas* est communément divisé en deux groupes :

1. **les *Pseudomonas* spp. fluorescents** : (par exemple *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ou *P. syringae*).
2. **les *Pseudomonas* spp. non-fluorescents** : (par exemple *P. alcaligenes*, *P. fragi* ou *P. stutzeri*) (Gaëlle rossignol, 2007).

Les *Pseudomonas* spp fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui promouvaient la croissance des plantes (Mezaach, 2012).

4.1 Les *Pseudomonas* spp. fluorescents

Ce sont des bacilles à gram négatif, chimiohétérotrophes mobiles avec un flagelle polaire (Palleroni *et al.*, 1973).Elles peuvent se développer dans un milieu de base riche en éléments organiques ; à pH neutre et à une température comprise entre 4 et 43 °C (Palleroni, 1984). Ces bactéries non sporulantes sont aérobies obligatoires. (Bossis *et al*, 2000).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat et Gardan, 1987).D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Sands et Rovira, 1971).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents forment un groupe diversifié de bactéries qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur

aptitude à produire un pigment jaune vert soluble (Palleroni *et al*, 1973) qui sont les pyoverdines produites dans des milieux pauvres en fer (Palleroni, 1984)

Les cellules de *Pseudomonas* spp fluorescents se divisent en moyenne toutes les 5 h dans la rhizosphère de *Pinus radiata* et uniquement toutes les 77 h dans le sol non rhizosphérique (Bowen et Rovira, 1976). Cette différence conduit à un développement des *Pseudomonas* spp. fluorescents significativement plus élevé dans la rhizosphère que dans le sol nu. Ces microorganismes sont donc considérés comme des rhizobactéries (Schroth *et al*, 1992).

Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, et sont responsable de la suppression des maladies fongiques dans les cultures. Ces *Pseudomonas* diminuent la sévérité de la maladie et stimulent la croissance des plantes (Mezaache, 2012). Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries, et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Moore *et al*, 2006).

Le groupe de *Pseudomonas* fluorescent représente selon Botelho et Mendonça (2006) :

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

4.2 Intérêt agro-écologique des *Pseudomonas* spp. fluorescents:

La plupart des substances chimiques utilisées pour combattre les maladies en plus d'être dangereux pour l'homme, les animaux et les organismes bénéfiques, persistent dans les écosystèmes naturels. En plus ces substances ont des conséquences néfastes (Kouassi., 2001; Thakore., 2006) sur l'environnement comme l'accumulation de résidus et la pollution des sols.

Durant les trois dernières décennies, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été identifiés comme agents potentiels de biocontrôle, à l'encontre des phytopathogène, mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale (Garbeva et al, 2004).

L'inoculation des plantes à l'aide de certaines souches de *Pseudomonas* spp s'accompagne en effet d'une augmentation significative du rendement des cultures en exerçant des actions directes et/ou indirectes sur le développement de la plante (Mezaache, 2012)

Les mécanismes directs sont ceux agissant à l'intérieur des plantes et affectent directement leur métabolisme tandis que les mécanismes indirects, en général, sont ceux qui se produisent en dehors des plantes.

Les mécanismes directs comprennent les processus de biofertilisation (solubilisation des phosphates) et de biostimulation (production des phytohormones : l'acide indole acétique...); Les processus de biocontrôle (production des métabolites antifongiques ...) constituent des mécanismes indirects (Silini, 2013) (fig.2).

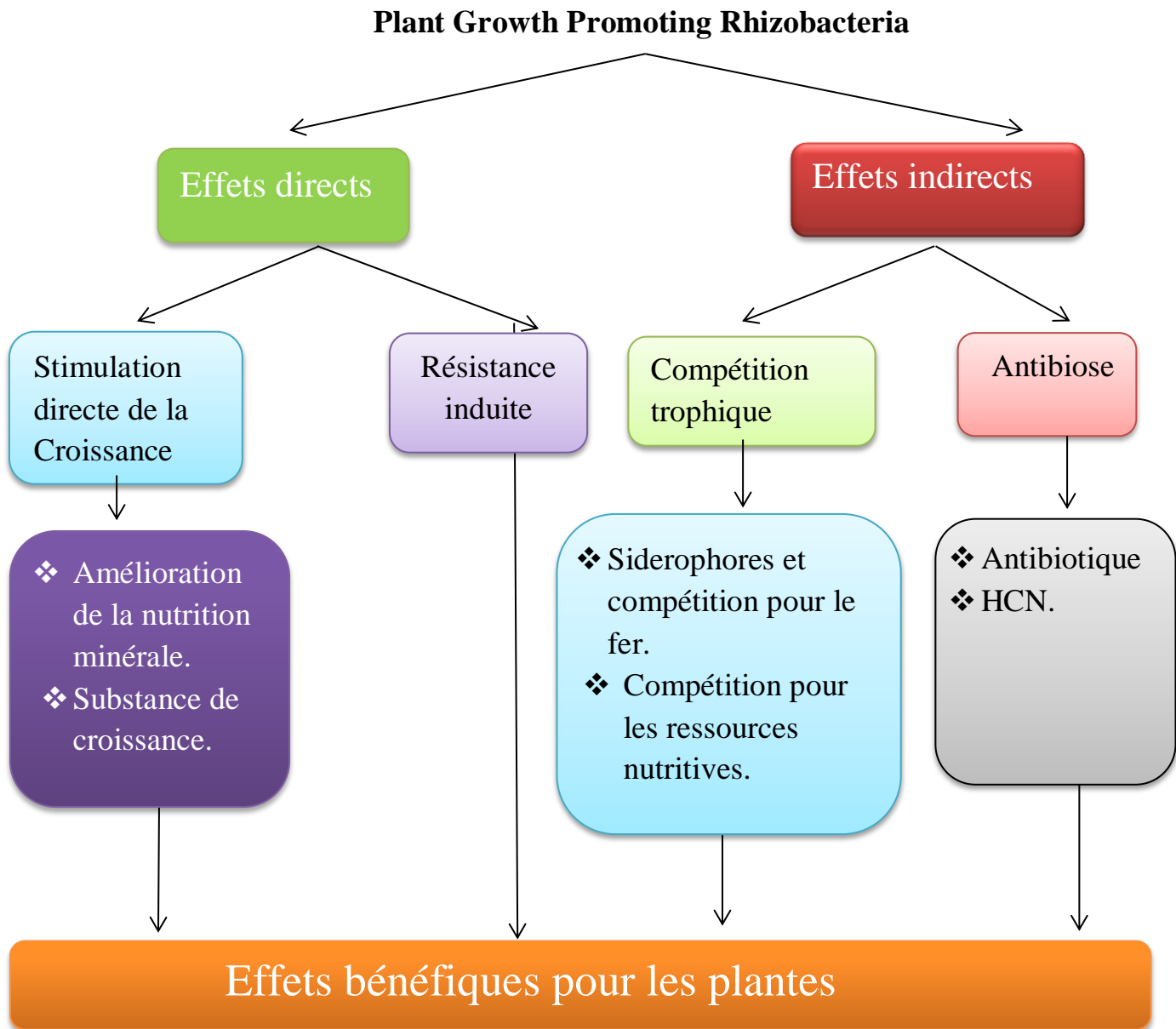


Figure 2: Les principaux mécanismes d'action des PGPR (Mattar, 1993)

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

5.1. Action direct

5.1.1 Stimulation de la croissance des plantes

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines (Lemanceau, 1992).

a. Solubilisation des phosphates :

Après l'azote le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) (Kenei et al, 2010). Le phosphate est présent dans le sol à la fois sous forme organique (esters phosphoriques) et inorganique (composés minéraux insolubles). Malgré son abondance dans le sol il n'est assimilable par les plantes qu'une fois solubilisé. La solubilisation des phosphates est la capacité des microorganismes de convertir le phosphate insoluble à une forme accessible. (Chaiharn et Lumyong, 2009).

Les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents tel que *Pseudomonas cissicola*, *P. fluorescens*, *P. pinophilum*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*, *P. putrefaciens* et *P. stutzeri* isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, du maïs, du soja et d'autres céréales (Tilak et al, 2005), ont été identifiées comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Cattelan et al, 1999) par la sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Richardson et al, 2001).

Ce processus permet de réduire l'utilisation d'engrais phosphatés (Chaiharn et Lumyong, 2009). Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient donc constituer une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture (Sharma et al, 2007).

b. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA) :

Cette phytohormone joue un rôle majeur dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes. Elle est impliquée dans l'initiation de la division des cellules au niveau des racines, et de leurs élargissements (Salisbury, 1994). Communément produite par les rhizobactéries (Barazani et Friedman, 1999), l'AIA joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al*, 2007). Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante.

la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) par *Pseudomonas putida* GR12-2 améliore le rendement du colza (Patten et Glick, 2002), ainsi, plusieurs auteurs signalent que des auxines produites par les rhizobactéries pouvaient être assimilées par différentes plantes (maïs pois concombre) (lemanceau,1992 ;Gobat *et al* ,2003).

5.1.2 Induction de la résistance systémique des plantes (ISR)

Certaines bactéries peuvent avoir un effet protecteur en induisant elles aussi, des mécanismes de défense des plantes via la résistance systémique induite (ISR) permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes (Van loon, 2007).

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).

5.2. Action indirect

Elle concerne la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère (Kloepper et Schroth, 1981). Les *Pseudomonas* fluorescents produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste de ces microorganismes dans le sol. Comprennent la réduction de fer disponible pour les phytopathogène présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982), la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques (CWDE : enzymes ayant une activité protéolytique et chitinases, cellulase), et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante.

5.2.1. La compétition trophique

Le premier type d'interaction mis en jeu entre les micro-organismes est le phénomène de compétition aussi bien pour l'espace que pour les éléments nutritifs.

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 s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer. En effet, ce dernier élément bien qu'abondant dans le sol, s'y trouve essentiellement sous forme oxydée (Fe_{3+}) non assimilable par les micro-organismes telluriques. Certains ont développé des stratégies d'acquisition (d'assimilation) du fer en synthétisant des sidérophores (Kloepper *et al*, 1980).

Les sidérophores 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). Ils sont définis comme des chélateurs organiques ayant une très forte affinité pour le fer (Hider et Kong, 2010)

Ces synthèses se déroulent en conditions aérobies et de carence en fer. Leur capacité à solubiliser le fer assure la biodisponibilité de l'élément pour la cellule (Claire Ferret *et al*, 2012).

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

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

5.2.2 L'antibiose

L'antibiose est définie comme « l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme » (Cook et Baker, 1974).

Les produits métaboliques aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (De Souza *et al*, 2003), sont de différentes natures comme des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, l'acide cyanhydrique (HCN), les phénazines..., (Defago, 1993)

Ces métabolites produits à faibles concentrations peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes (Montesinos *et al*, 2009).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs phytopathogènes (Haas et Defago, 2005).

a) Enzymes dégradant les parois fongiques :

L'excrétion d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliqué dans les attaques des champignons phytopathogènes (Picard *et al*, 2000).

La lyse des parois cellulaires, par les enzymes dégradatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue, la Chitinase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives des composés des parois cellulaires tels que : la chitine, et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981).

Les microorganismes excrétant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (Ordentlich *et al*, 1988).

Le contrôle biologique de *Fusarium solani*, se fait essentiellement via l'activité de chitinase chez *P. stutzeri* YPL-1 (Lim *et al*, 1991).

Nielsen *et al*. (1998) ont rapporté que dans la rhizosphère de la betterave à sucre, les *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibaient *R. solani* par production d'endochitinase

L'activité chitinolytique de *Pseudomonas* spp de souche PUP6 (Naik et Sakthivel, 2006), et des souches de *Pseudomonas* spp. (Verma *et al*, 2007) a été rapportée comme activité antifongique.

Tableau 1 : Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Amkraz, 2013).

Agent de contrôle	Plante	Pathogènes à contrôler	Références
<i>P. fluorescens</i> PSR21	Tomate	<i>C. m. subsp. Michiganensis</i>	Ślusarski (2004)
<i>P. fluorescens</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>	Mercado-Blanco <i>et al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aubergine	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ramesh <i>et al.</i> 2009
<i>P. putida</i> PCL1760	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Validov <i>et al.</i> (2009)
<i>P. putida</i> strain P9	Pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>	Andreote <i>et al.</i> (2009)
<i>P. fluorescens</i>	Tomate	<i>C. m. subsp. Michiganensis</i>	Xu <i>et al.</i> (2010) <i>P. fluorescens</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	Plusieurs plantes	Divers champignons	Verma <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas</i> RFP 36	Fève	<i>R. solani</i> et <i>M. phaseolina</i>	Devi <i>et al.</i> 2011
<i>P. fluorescens</i>	Concombre	Phytophthora drechsleri	Maleki <i>et al.</i> (2011)
<i>P. fluorescens</i>	Riz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Anitha et Arun-Das (2011)

6. La fusariose vasculaire du la Tomate

La place importance prise par la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) du point de vue économique et ses caractéristiques biologiques ont induit un intérêt marqué pour ce végétal de la part de nombreux chercheurs s'intéressant à diverses disciplines (génétique, agronomie, physiologie (Bressoud , 2010).

La tomate est une plante herbacée de la famille des solanacées, cultivée pour son fruit. Le terme désigne à la fois la plante et le fruit charnu bien qu'il soit biologiquement un fruit, est considéré comme un des légumes les plus importants dans l'alimentation humaine. En termes de quantité produite en 2007, il s'agit de la douzième culture au niveau mondial), La tomate cultivée dans presque tous les pays de monde, en Algérie, les cultures maraichères occupent une superficie très importante, estimée à 363 030 ha en 2005, et à 372 096 ha en 2006 avec un bilan de 2,5% du rendement. La tomate représente 5,62% de la production maraichère nationale (Chougar, 2011).

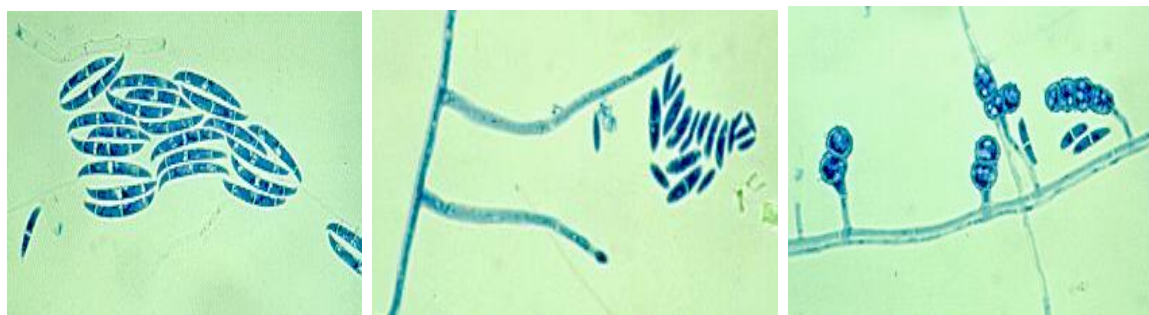
d'autre part la plante est sujette à l'attaque par une multitude de microorganismes pathogènes (bactéries, champignons, mycoplasmes, virus), insectes et nématodes qui entraînent une réduction importante de la qualité et du rendement de cette culture (Gartemann et *al*, 2003).

Les fusarioses vasculaires sont parmi les maladies les plus graves et les plus fréquentes, dont les symptômes sont divers et peuvent toucher l'ensemble de la plante à n'importe quel stade de sa croissance. Elles sont caractérisées par un flétrissement des plantes dû à l'envahissement des vaisseaux du xylème par le pathogène

Fusarium oxysporum est un agent fongique ubiquiste bien représenté au sein de la communauté microbienne tellurique, notamment dans la microflore rhizosphérique. Cette espèce présente des formes phytopathogène hautement spécifiques sur des hôtes variables induisant des flétrissements, unilatéralement ou généralisés, causant ainsi la mortalité des plants.

Le genre *Fusarium*, se caractérise par une production asexuée, en produisant trois types de spores : les macroconidies, les microconidies et les chlamydospores (fig.3) (Ohara et *al.*, 2004).les microconidies sont les plus abondantes et produites par champignon dans toutes les conditions, c'est aussi le type spore le plus fréquemment présentes sur la surface

des plantes tuées par cet agent pathogène, et les chlamydo-spores sont moins produites comparées aux autres(Rheinberg,1988).



(A)

(B)

(C)

Figure 3 : Conidies de *Fusarium* (Nadales, 2010).

(A) : Macroconidies

(B) : Microconidies

(C) : Chlamydo-spores

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* est l'agent responsable du flétrissement vasculaire des cultures de tomate à travers le monde (Snyder et Hansen., 1940). La première description de la fusariose vasculaire des plantes de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill., date de 1886 (Jacques Gabriel, 1993).

Selon Agrios,(1988), la Taxonomie de l'agent causal de la fusariose vasculaire de la tomate est comme suit :

Règne : *Mycota*

Division : *Eumycota*

Sub-division : *Deuteromycota*

Classe : *Hyphale*

Famille : *Tuberculariaceae*

Genre : *Fusarium*

Espèce : *Fusarium oxysporum*

Forme spaciale : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

6.1 Symptomatologie

L'évolution des symptômes ainsi que leur gravité diffèrent selon les stades phénologiques de la plante (Beckman, 1989).

Chez les jeunes plantes infectées nous observons :

- Un arrêt de la croissance.
- Base de la tige plus ou moins élargie.
- Coloration des tissus vasculaires en brun foncé.
- Quelques feuilles deviennent jaunâtre et peuvent se courber vers le bas et se détacher.
- Flétrissement partiel ou total
- Mortalité des plantes

Chez les plantes âgées nous observons particulièrement (fig.4):

- Coloration des tissus vasculaire en brun foncé.
- Jaunissement souvent unilatéral des feuilles pouvant se généralisé, suivi d'un flétrissement puis un dessèchement complet de la plante et sa mort.



Figure 4 : les symptômes de la fusariose de la tomate (D. Blancard 2013).

6.2 Cycle biologique

Suivant la présence ou l'absence de la plante hôte (tomate), le pathogène au cours de son cycle de vie présente une phase saprophyte et une phase parasitaire (Nelson,1981 ;Beckman,1989) :

- **-la phase saprophyte** : elle est caractérisée par la conservation du champignon au niveau du sol sous forme de Macroconidies, Microconidies et chlamydo-spores, il survit sur la matière organique provenant des débris des végétaux (Beckman, 1989).
- **-la phase parasitaire** : en présence de plante hôte, les formes de conservation germent grâce à la stimulation d'exsudats racinaire, (Nelson, 1981), le filament mycélien pénètre dans la racine et se développe dans le système vasculaire. Cette pénétration est facilitée par les blessures ou par des ouvertures naturelles du système racinaire. (Bounoua, 2008).

La prolifération du champignon augmente dans les tissus vasculaires et provoque des altérations, tel que le blocage de circulation de la sève. Cette phase se termine par la mort de la plante saprophyte recommence avec la dissémination du champignon (Nelson, 1981).

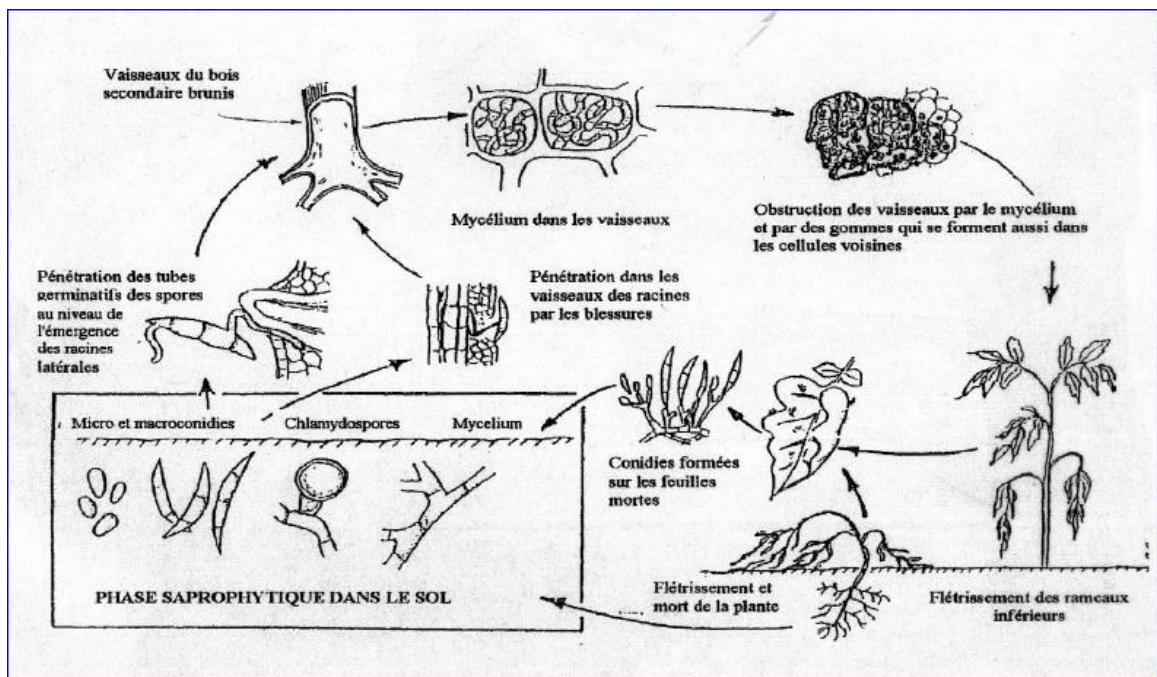


Figure 5 : Cycle biologique de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Agrios, 1970)

6.3 Lutte contre la fusariose vasculaire

Comme toutes les autres maladies fongiques, la lutte contre la fusariose vasculaire s'articule principalement sur les méthodes de lutte chimique et l'amélioration des variétés sensibles. En plus de ces méthodes il y a lieu de signaler l'importance de certaines méthodes telles que le choix adéquat d'une conduite culturale défavorisant l'installation et le développement de champignon.

La désinfection du sol à la vapeur ou à l'aide de fumigeant est difficile; son effet en est de relativement courte durée, car le champignon colonise le sol jusqu'à une profondeur de 90 centimètres, et peut recoloniser le sol à partir des couches inférieures (Marois et al, 1983).

D'une manière générale, l'ensemble des moyens de lutte utilisés contre les fusarioses vasculaires ne font que ralentir la progression de la maladie (Alabouvette et Lemanceau, 1988).

En raison de la forte potentialité de conservation de pathogène dans le sol et ces mécanismes d'envahissement et d'évolution dans la plante, la quasi-totalité de ces méthodes de lutte ne permettent pas de contrôler de manière efficace ce genre d'où le recours aux techniques de lutte biologique qui s'est imposé ces dernières années comme une autre alternative, ou pour compléter les autres méthodes.

Les techniques de lutte biologique via l'utilisation des bactéries PGPR peut être une alternative pour le contrôle de ces agents pathogènes. Le genre *Pseudomonas*, a fait l'objet de nombreuses recherches comme antagoniste en vue d'une éventuelle utilisation comme agent de contrôle biologique de certaines maladies phytopathogènes (Dekkers et al, 2000 ;David Weller et al, 2002). La lutte biologique vis-à-vis des champignons telluriques phytopathogènes, pourrait être réalisée par l'application de certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ou *Fusarium oxysporum* non pathogènes (Alabouvette et Lemanceau, 1991).

Chapitre II

Matériel et

Méthodes

Notre travail qui porte sur l'étude de quelques métabolites secondaire impliqués dans la biocontrôle et la phytostimulation chez quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de département de biotechnologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Saad Dahleb Blida1 sur une période de 05 mois.

I. Matériel

1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique représenté par la verrerie, l'appareillage, les milieux de culture est consigné en annexe 1.

2. Matériel biologique

2.1. Souches bactériennes antagonistes

Dix-neuf souches bactériennes de PGPR d'une espèce fluorescente du genre *Pseudomonas* ont été utilisées dans notre étude. Les souches bactériennes ont été isolées de quelques arbres fruitiers du sud Algérien (Tableau 2) et font partie de la collection des souches PGPR du laboratoire de Phytopathologie du département des Biotechnologies de l'Université de Blida 1

Tableau 2 : Caractéristiques des souches antagonistes utilisées

Souches	sidérophores	HCN	Phénazines	Souches	Sidérophore	HCN	Phénazines
<i>BB2</i>	+	-	-	<i>F21</i>	+	+	+
<i>BB6</i>	+	++	-	<i>F27</i>	+	+	-
<i>BB9</i>	+	+	+	<i>F48</i>	+	+	-
<i>BB10</i>	+	++	-	<i>F23</i>	+	++	-
<i>BT3</i>	+	++	-	<i>PI9</i>	+	++	+
<i>BT7</i>	+	++	-	<i>PI11</i>	+	++	-
<i>BS4</i>	+	++	-	<i>GP4</i>	+	+	-
<i>F8</i>	+	++	-	<i>B445</i>	+	++	+
<i>F19</i>	+	++	-	<i>B447</i>	+	++	+
<i>F20</i>	+	+	-				

+ : production moyenne ++ : forte production - : absence de production

2.2. Souche pathogène

Une souche fongique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (Fol) agent causal de la fusariose vasculaire de la tomate a été utilisée pour le test d'antagonisme. Elle a été fournie gracieusement par le Professeur Declerck de l'université catholique de Louvain (Belgique).

2.3. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des semences de tomate variété FEIZA (origine : china, pureté :99%,Germ :98%) Les graines ont été fournies par l'Institut Technique des Grandes Culture d'Alger (ITGC,Alger) (fig 6).

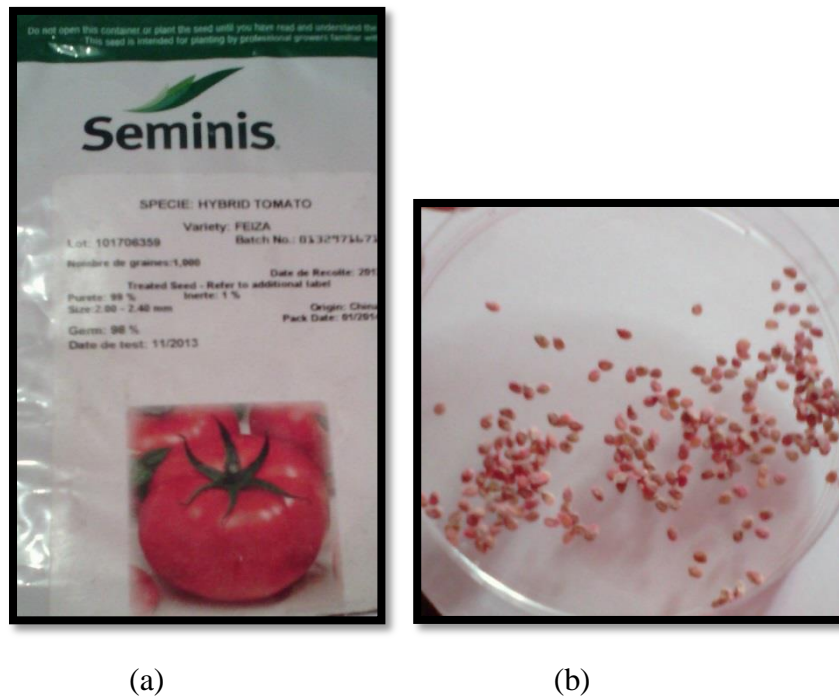


Figure 6: Semences de tomate.

(a) variété de semence utilisée (b) graines de tomate.

II Méthodes**1. Purification des souches**

La pureté des souches bactériennes de *Pseudomonas* a été vérifiée sur le milieu B de King (King et al, 1954) (Annexe 02) en réalisant plusieurs repiquages successifs. Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents purifiées ont été conservées à une température de 4°C, sur le milieu cétrimide incliné.

La purification de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a été obtenu après plusieurs repiquages, par transplantation successive des disques mycéliens dans les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Annexe 02) (Jhonston et Booth 1983). L'incubation de cultures fongique a été effectuée à 25 °C pendant 07 jours.

2. Production de métabolites secondaires**2.1 Production de l'acide indole acétique (AIA)****A. Estimation qualitative de la production d'AIA**

La production d'IAA a été déterminée selon la méthode standard de Bric et al.,(1991). Une colonie isoléea été étalée sur gélose Luria-Bertani enrichi du tryptophane (Annexe 02). La gélose a été recouverte de papier Whatman n° 1 (80mm de diamètre), puis incubée à 28°C/48h. Le papier a été récupéré, puis traité avec le réactif de Salkowski (2% de FeCl₃ à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique). Les disques de papier filtre ont été saturés dans une boîte de Pétri en les plongeant directement dans le réactif, après 10 à 30 min. La production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose à rouge autour des colonies, et pour les souches productrices d'autres types d'indoles la coloration est jaune à jaune brune (Naik et Sakthivel, 2006).

B. Estimation quantitative de la production d'AIA

La quantification de la production de AIA a été testé sur le milieu de Winogradsky (Annexe 02) (Holt *et al*, 1994) additionné de tryptophane (5g /l).le milieu a étéensemencé par 100 µl des cultures bactériennes incubées à 30⁰ C/96 h. le dosage colorimétrique a été réalisé selon la méthode de Loper et scroth (1986). Les cultures ont été centrifugées à 5000 rpm /20min. Un millilitre (1ml) du surnageant a été additionné de 2ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorique 35% et 1 ml de FeCl₃ à 0,5M) et quelque gouttes d'acide orthophosphorique.

Les densités optique ont été mesurée à 530nm après 30 mn d'incubation, les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle 0 à 10⁻³ M d'AIA (Annexe 03).

2.2 Production d'enzymes**2.2.1 Phosphatase**

La solubilisation des phosphates a été évaluée qualitativement sur milieu de Pikovskaya (Annexe 02) (Ahmad *et al*, 2008), selon la méthode décrite par Mehta et Nautiyal (2001). Cette méthode est basée sur la décoloration du Bromo-Phenol-Bleu (BPB) suite à un abaissement du pH du milieu par production de phosphatases. Des aliquotes de 100µl de cultures fraîches sont déposées sur la gélose de Pikovskaya, soit :

Par méthode d'ensemencement de la culture sur la boîte de Pétri. La réaction positive se traduit par la décoloration du milieu de culture,

Par la méthode de spot. Cependant l'apparition d'un halo autour de spot indique la réaction positive après 96h d'incubation à 28°C .Trois répétitions ont été effectuées.

2.2.2 Pectinase

La production de pectinase a été déterminée selon la méthode décrite par Cattelan *et al*. (1999). La gélose M9 (Annexe 02) (Miller, 1974) supplémentée de 4,8g/l de pectine, et 1.2g d'extrait de levures, a été utilisée pour tester le pouvoir hydrolytique par production de pectinase. Après 02 jours d'incubation, les boîtes de Pétri ont été traitées avec quelques gouttes d'HCl (73g/l). L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive.

2.2.3 Lipases

La recherche de lipases a été effectuée par la mise en culture des isolats sur le milieu TSA additionné de 1% d'acide oléique (Annexe 02). Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo autour des colonies après 07 jours d'incubation à 28°C (Degroot *et al*, 1991).

2.2.4 Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

A. Enzymes protéolytiques

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode de Smibert et Krieg (1994), par la mise en culture pendant deux jours d'incubation à 28°C des isolats sur gélose au lait écrémé (Annexe 02). Le développement d'un halo transparent autour des colonies indique une réaction positive (Naik et Sakthivel, 2006).

B. Chitinase

L'activité chitinolytique a été estimée selon la méthode décrite par Renwick *et al*, (1991) sur gélose à la chitine sans glucose (Annexe 02). Le développement des colonies après 5 jours d'incubation à 30° c indique une chitinase positive (Naik et Sakthivel, 2006).

C. Cellulase

La production de cellulases a été déterminée selon la méthode décrite par Cattelan *et al*. (1999). La gélose M9 (Annexe 02) (Miller, 1974) supplémentée de 10g de cellulose et 1.2g d'extrait de levures, a été utilisée pour tester le pouvoir hydrolytique par production de cellulases. Les isolats ont été étalés puis incubés pendant 8 jours à 28°C. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Verma *et al*, 2007).

2.4. Production d'ammoniac (NH₃)

Ce test qualitatif a été réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il consiste à inoculer 100µl de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau peptonée (EP) (Annexe 02). Après incubation à 30°C pendant 96h, 500µl du réactif de Nessler (Prolabo) ont été ajoutés dans chaque tube. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH₃ par les souches testées.

3. Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro*

3.1. Essai d'antagonisme

Le pouvoir antagoniste des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été déterminé par l'inhibition de la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, responsable de la fusariose vasculaire de la tomate.

Le test d'antagonisme fongique a été réalisé sur trois milieux de culture différents (PDA, King B, et CAA) (Annexe 02) selon la méthode décrite par Vincent *et al.* (1991). Les isolats sélectionnés sont étalés sur un axe de 1,5 cm de la bordure d'une boîte gélosée, alors qu'un disque fongique de 8 mm provenant d'une culture d'au moins cinq jours est déposé au centre de la boîte (fig.7). Cette confrontation des bactéries avec le champignon est suivie pendant une semaine à température ambiante. La distance entre l'extrémité des colonies et celle du mycélium a été alors mesurée, et comparée au témoin ne contenant que le mycélium fongique.

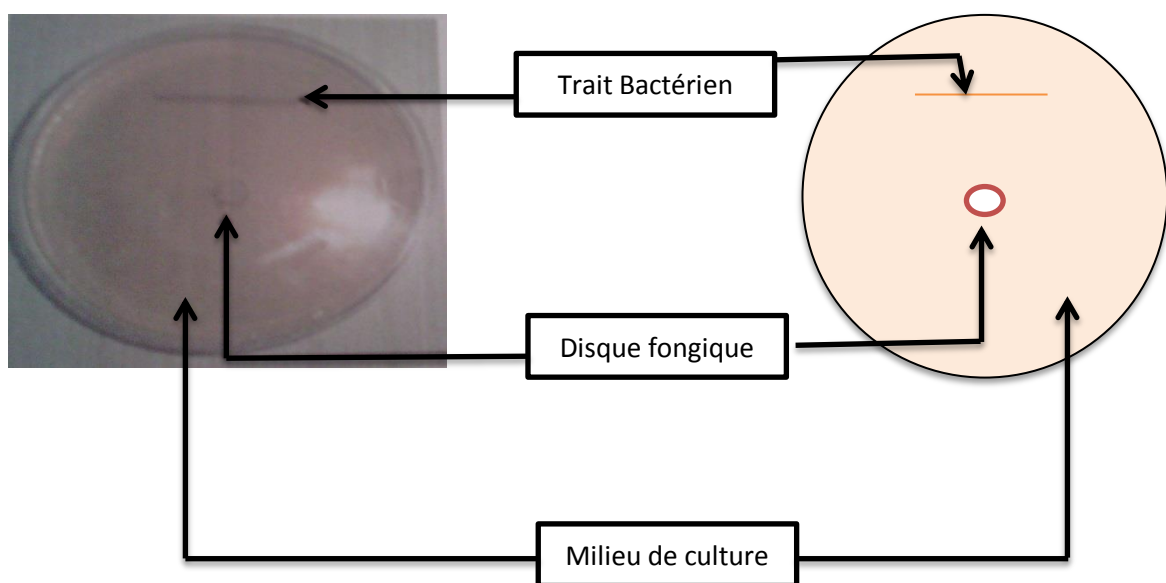


Figure 7: Méthode de confrontation directe en boîte Pétri entre les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et le champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

3.2. Expression des résultats

Les résultats sont notés lorsque la croissance des mycéliums dans les boîtes témoins atteint les points d'inoculation des souches bactériennes (Hariprasad et al, 2009). La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas* comparé au témoin non inoculé indique la présence d'une activité antagoniste. Le pourcentage d'inhibition (I%) a été calculé selon la formule suivante :

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

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

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

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

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

4. Effet des PGPR sur la stimulation *in vitro* de la germination et la croissance des plants de tomate

L'étude de l'effet des souches bactériennes sur la stimulation de la germination et la croissance des plants de tomate a été évaluée sur la base de l'indice de vigueur par la méthode de serviette de rouleau standard (Bellishree et al, 2014) (ISTA, 1993).

4.1. Préparation des inocula

Les isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été cultivés dans des flacons coniques (250 ml) contenant 100 ml de bouillon de King B (Annexe 02), pendant 48 h sur un agitateur rotatif (150 rpm) à $28 \pm 2^\circ\text{C}$

4.2. Bactérisation des semences de Tomate

Les graines de tomate ont été stérilisées en surface avec de l'hypochlorite de sodium de deux pour cent pendant 30 sec. Rincées avec de l'eau distillée stérile et séchées pendant une nuit. Un gramme de graines a été trempé pendant 2 h dans dix ml d'inoculum antagoniste et additionné avec 100 mg de carboxyméthylcellulose (CMC).

4.3. Méthode de rouleau de serviette

Vingt-cinq semences de tomate traitées avec les antagonistes ont été maintenues sur le papier de germination pré-trempé. Les graines ont été maintenues en position en plaçant une autre bande de papier de germination pré-trempé en dessus et en appliquant une légère pression. Par la suite, les graines ont été laminées et incubées dans une chambre de croissance : le phytotron qui est une installation permettant de faire pousser des plantes et de contrôler les conditions environnementales. La photopériode est contrôlée grâce à six néons de 60 watts : 16 h de jour, 8 h de nuit. L'humidité relative et la température sont fixées, respectivement, à 50% et à 24°C (Benoit et *al*, 2014) pendant 10 jours. Trois répliques ont été effectuées pour chaque traitement.

Pour évaluer l'effet phytostimulateur des souches étudiées, l'indice de vigueur (VI) des plantules a été calculé en utilisant la formule telle que décrite par Abdul Baki et Anderson (1973).

$$\text{Indice Vigueur (VI)} = (\text{longueur moyenne des racines (cm)} + \text{longueur moyenne des pousses (cm)}) \times \text{TG}(\%).$$

Le taux de germination (TG%) des graines a été déterminé en utilisant la formule si dessous.

$$\text{TG}\% = \left(\frac{n}{N}\right) \cdot 100$$

n : nombre de graines germées ; **N** : nombre total de graines mises en germination.

5. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS© version 20.0.0 pour Windows™

L'analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de Tukey pour la comparaison des moyennes (nous permis de classé les souches dans différents sous-groupes homogènes), a été effectuée au seuil 5% et cela pour les essais d'antagonisme, l'étude de l'influence des souches sur la longueur des racines et des pousses et enfin pour l'effet de l'inoculation des souches sur le taux de germination et l'indice de vigueur.

Chapitre III

Résultats et

Discussion

I. Résultats et interprétations

I.1. Métabolites secondaires

Les résultats de la recherche de la production de métabolites secondaires testés sur les 19 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents issus de la rhizosphère de quelques arbres fruitiers sont illustrés dans le tableau (3).

Tableau 3: Nombre et taux des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents productrices de métabolites secondaires.

Métabolites secondaires	AIA	phosphatase	protéases	cellulase	pectinase	chitinase	lipase
Nombre de souches	6	18	12	0	0	19	0
Pourcentage*	31,57	94,44	63,15	0	0	100	0

AIA : Acide-indole-acétique, (+) : réaction positive * : le pourcentage par rapport aux 19 souches testées.

Selon le Tableau (3), 100% des souches ont le pouvoir de produire les chitinases, 94,44% produisent les phosphatases, 63,15% sont aptes à synthétiser les enzymes protéolytiques, 31,57% produisent l'acide indole-3-acétique (AIA), par contre ont marqué une absence totale de production de pectinase, cellulase, et lipase.

A. Production de l'acide indole-acétique (AIA) :

La production qualitative de l'acide indole acétique et/ou ses analogues a été observée chez les isolats testés. Toutefois six (6) de ces derniers (BB2, BB10, F8, F21, F48, GP4) ont développés une coloration rose à rouge après 10 à 30 min d'addition du réactif révélateur (réactif de Salkowski) (fig.8). Pour les souches productrices d'autres types d'indoles, la

coloration est jaune à jaune brune dont l'intensité varie d'un isolat à un autre (fig.9) et seulement 1 cas s'est révélé négative (BT₇).

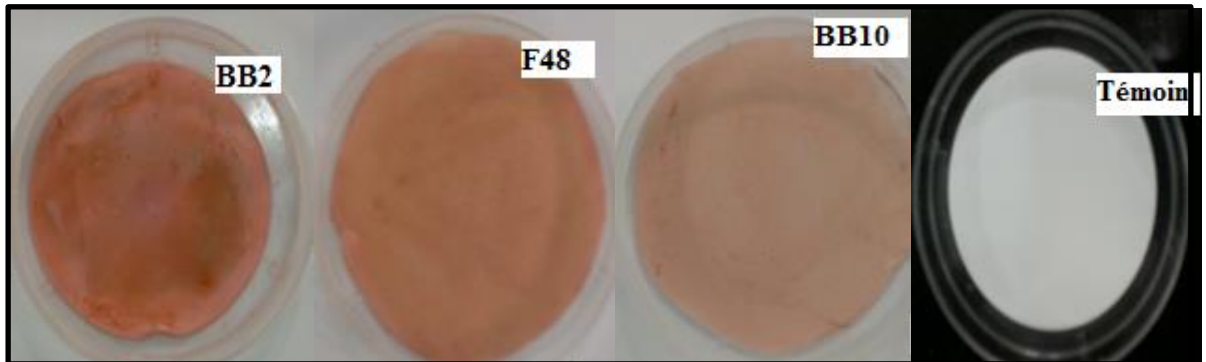


Figure 8 : Production de de l'acide-indole-acétique par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

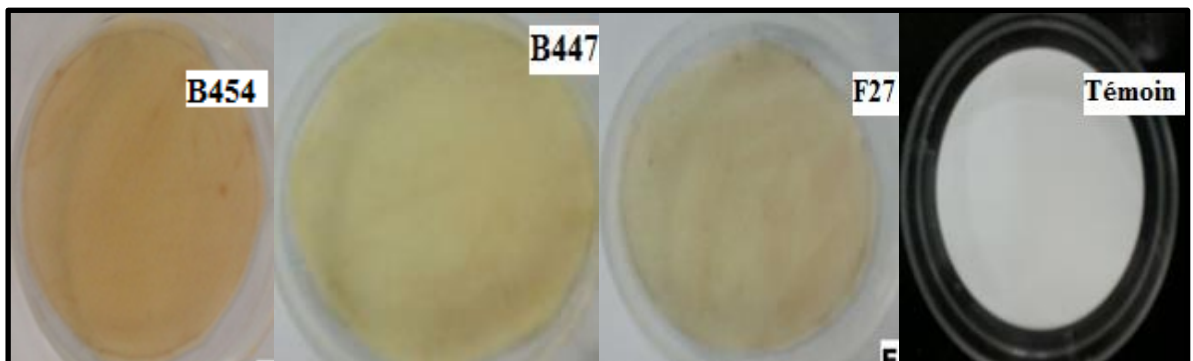


Figure 9: Production d'autres types d'acide-indole-acétique par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

L'apparition d'une couleur rose indique la présence d'I'AIA. La quantité de ce dernier est déterminée, d'après la courbe d'étalonnage (annexe 03) par lecture de l'absorbance à 530 nm par rapport au témoin (1 ml de milieu non-inoculé + 2 ml de réactif de Salkowski). La concentration varie d'un isolat à un autre (Tableau 4).

Tableau 4: Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA)

Souches	Production Qualitative	Production Quantitative en µg/ml
F ₈	++	3,8
F ₁₉	(+)*	Nd
F ₂₀	(+)*	Nd
F ₂₁	+	1,8
F ₂₃	(+)*	Nd
F ₂₇	(+)*	Nd
F ₄₈	+++	18,3
BB ₂	+++	7,6
BB ₆	(+)*	Nd
BB ₉	(+)*	Nd
BB ₁₀	+++	5,9
BB ₄₄₇	(+)*	Nd
BB ₄₅₄	(+)*	Nd
Bs ₄	(+)*	Nd
Gp ₄	+	1,7
PI ₉	(+)*	Nd
PI ₁₁	(+)*	Nd
BT ₃	(+)*	Nd
BT ₇	-	Nd

(-) : absence de coloration rose, (+) : légèrement rose, (++) : rose, (+++) : rose virant vers le rouge,

Nd : non détectable (+)* : Analogue d'AIA

B. Production d'enzymes

Les tests qualitatifs permettent de démontrer la production ou non d'enzymes extracellulaire : la phosphatase, pectinase, lipase, et les enzymes dégradants les parois cellulaires sont illustres par les figures : 10, 11, 12, 13, 14:

1-Phosphatases :

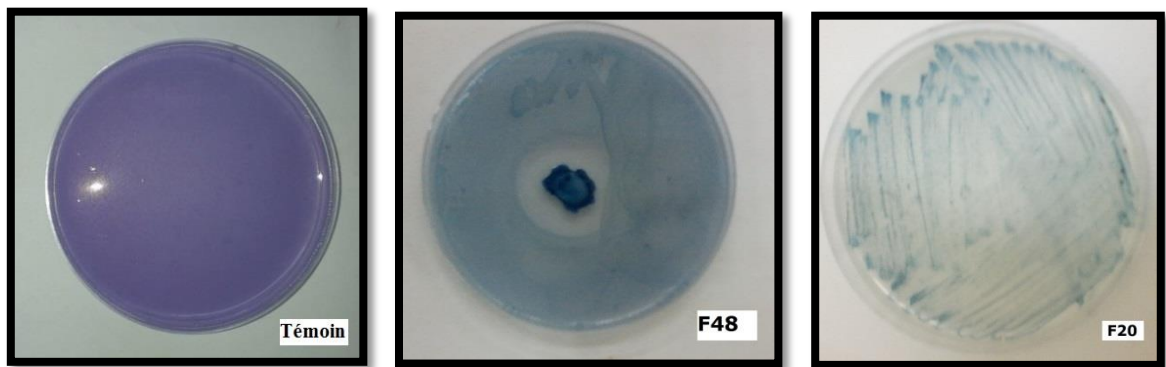


Figure 10 : Production de phosphatase par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Le test de solubilisation du phosphate indique que 94,44% des souches testées synthétisent la phosphatase pour solubiliser le phosphore inorganique sous forme bicalcique. Le présent test indique également que la souche B₄₅₄ ne produit pas la phosphatase.

La décoloration du milieu de culture et/ou le développement d'un halo clair autour les spots (fig.10) (phosphatases positives), n'est devenu net qu'après 96h d'incubation. L'intensité de la couleur du milieu de culture et le diamètre des halos sont variable selon les souches, ce qui montre une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphore entre les isolats testés.

2-Pectinase :

La production de pectinase a été révélée par l'inondation par quelques gouttes de HCL des cultures bactériennes ensemencées sur le milieu M9 additionné de 4,8 g/l de pectine et incubées pendant 2 jours. Les résultats montrent qu'aucune réaction positive n'est observée (absence d'halos autour des spots)(fig.11).

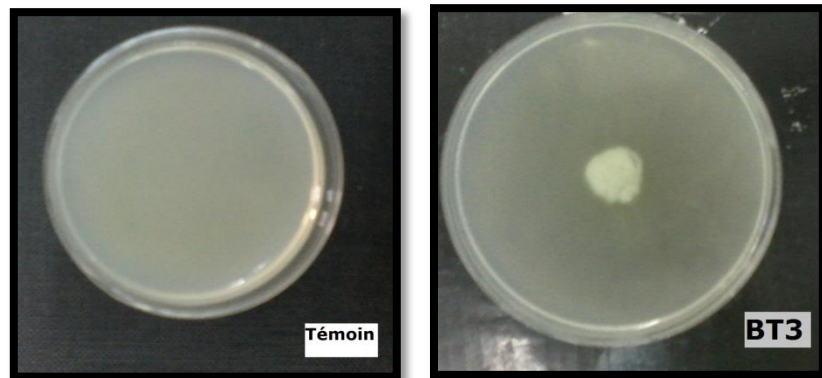


Figure 11 : résultats de test de Pectinase (négative).

3-Lipase :

Une réaction négative pour l'ensemble des souches testées est marquée lors de la mise en évidence de la production de lipases dans le milieu TSA additionné de 1% d'acide oléique après 7 jours d'incubation à 28⁰C. (fig.12)



Figure 12 : Absence de production de lipase.

4-Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

1-Enzymes protéolytiques :

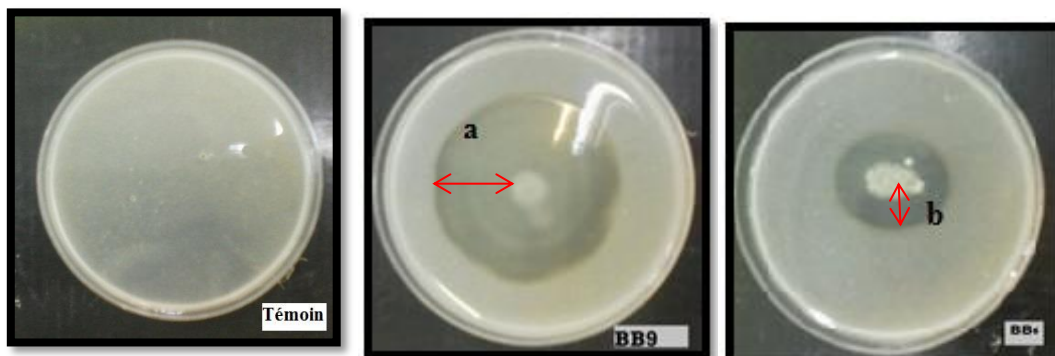


Figure 13: Production des enzymes protéolytiques par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

a = 2,3 cm , b = 0,9 cm

L'activité protéolytique a été testée sur un milieu au lait écrémé. 12 souches bactériennes ont montré une réaction positive dans la dégradation des protéines par production de protéases. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive après 48h d'incubation à 28⁰C (fig.13). La variation dans le diamètre des halos (a et b) dépend des souches testées. Le meilleur résultat est observé chez la souche BS4 diamètre de 3 cm, tandis que la souche BT3 a marqué un faible résultat de diamètre de 0,6cm.(tableau5, annexe 03).

2-Chitinase :

L'activité chitinolytique des 19 souches bactériennes a été testée sur un milieu gélose nutritif sans glucose additionné de 2 g de chitine. La chitinase est produite par la totalité des souches étudiées (100%). (fig.14).

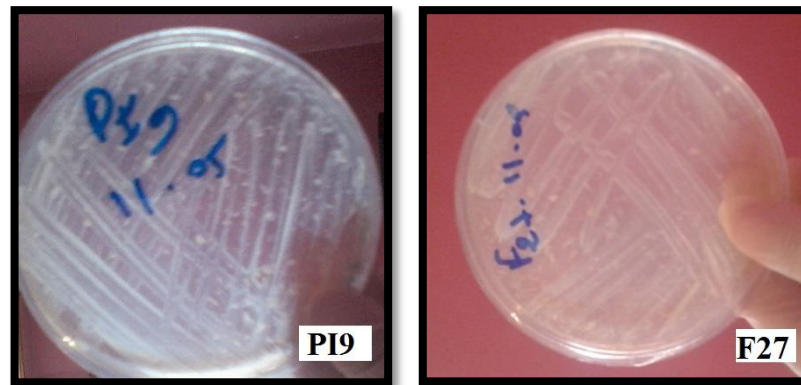


Figure 14 : Production de chitinase par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

3-Cellulase :

Sur le milieu M9 supplémentée de CMC, les 19 souches bactériennes se sont montrées incapables de produire la cellulase, après 8 jours d'incubation aucun halo indiquant le pouvoir hydrolytique n'est observé autour des colonies bactériennes.

c. Production d'ammoniaque :

La production de l'ammoniaque est révélée chez toutes les bactéries par l'addition de réactif de Nessler à une culture bactérienne ensemencée et incubé pendant 96h à 30°C dans de l'eau peptonée. Le résultat positive se traduit par le virage de la couleur du milieu vers le jaune ou orange. La souche BB6 montre une production d'ammoniaque très importante (orange ++) (fig.18).

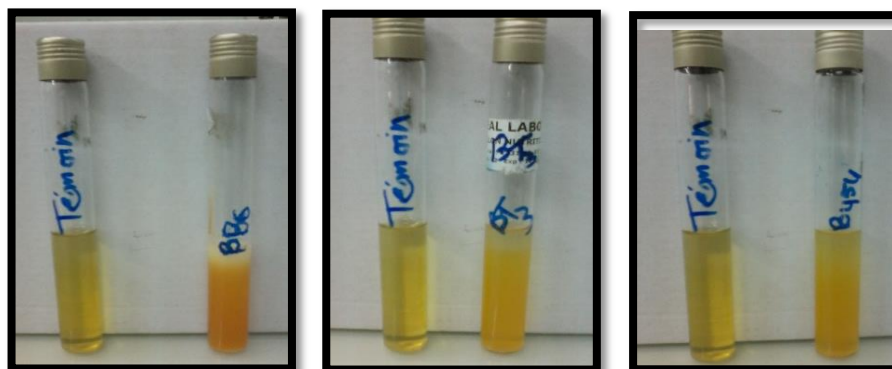
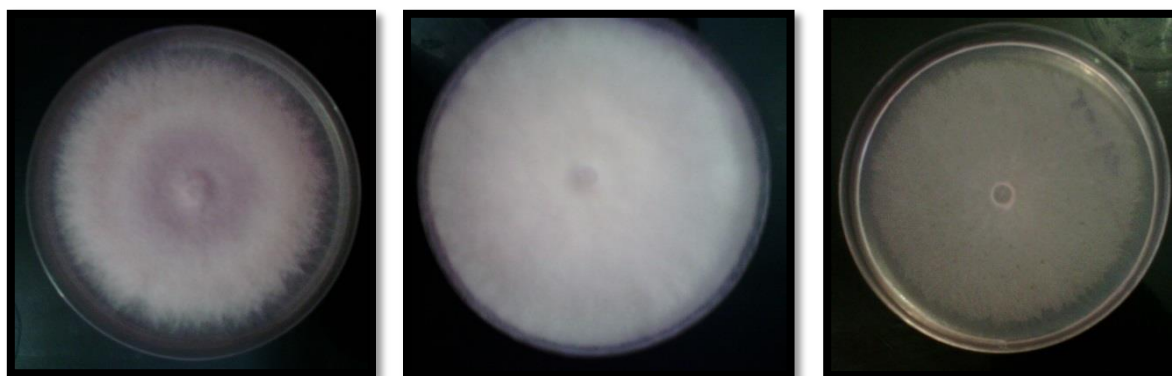


Figure 15: production d' NH_3 par les souches *Pseudomonas* spp. fluorescents.

2-Evaluation de l'effet antagoniste *in vitro*

Comparé au témoin non inoculé, nous notons que dans les trois milieux de culture (PDA, King B et CAA), la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycoprsici* a subi une réduction en présence des souches antagonistes de *Pseudomonas* spp. fluorescents figures : 16, 17, 18, 19.



(a)

(b)

(c)

Figure 16: Croissance de *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* sur les trois milieux

a) PDA , b)King B , c)CAA

Selon les résultats obtenus (tableau 6 Annexe 03), nous remarquons que seulement les souches B454 et PI9 ont pu exercer un effet antagoniste sur les trois milieux de culture par rapport aux autres souches étudiées.

La souche PI9 a montré des taux d'inhibition variables de 15,29% sur PDA, 17,64% sur King B et de 36,47% sur le Milieu CAA, comparativement à la souche B454 qui a marqué des taux d'inhibition de l'ordre de 15,29, 18,82 et 34,11% sur les milieux PDA, King B, CAA successivement.

Sur le milieu PDA, seulement 3 souches parmi les 19 souches ont marqué une action antagoniste (F27, PI9, B454), la souche F27 a enregistré une activité antagoniste avec un meilleur taux d'inhibition de 25,88%. Chez les autres souches, nous notons une absence d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène (fig.17).

Sur le milieu King B, 13 souches parmi les 19 étudiées ont montré une activité antagoniste qui se traduit par des taux d'inhibition variables. Le meilleur taux d'inhibition a

été marqué par la souche F21 de 28,23%, ainsi que le faible taux d'inhibition de 17,64% a été observé par 5 souches sur 19 (F8, F20, F23, BT7, B454), (fig.18).

Sur le milieu CAA, l'action antagoniste s'est révélée chez toutes les souches étudiées avec une variabilité dans l'expression de l'activité antagoniste. Nous avons remarqué que la plupart des souches induisent une réduction de la croissance mycélienne (fig.19). Le taux d'inhibition le plus élevé (49,41%) a été observé chez la souche F21, et le faible taux d'inhibition a été enregistré par la souche BT7 (27,05%).



Figure 17 : Confrontation champignon *Pseudomonas* spp. fluorescents sur le milieu PDA

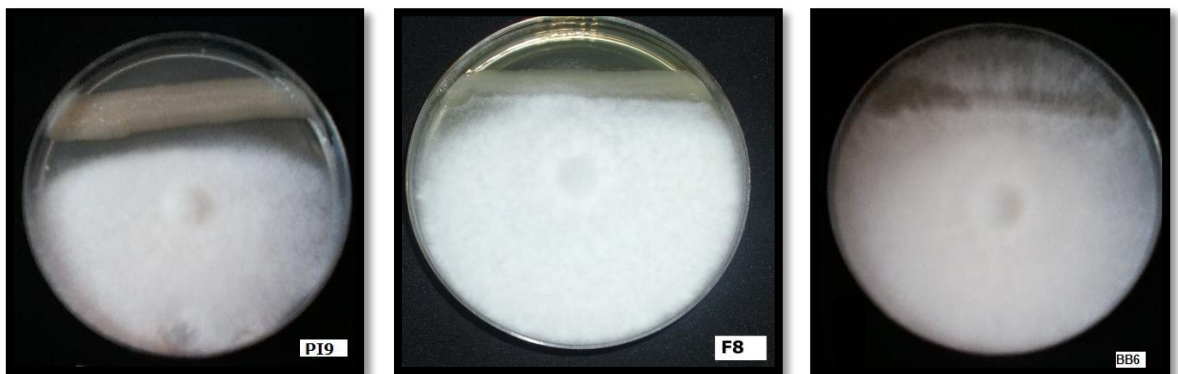


Figure 18: Confrontation champignon *Pseudomonas* spp. fluorescents sur le milieu King B

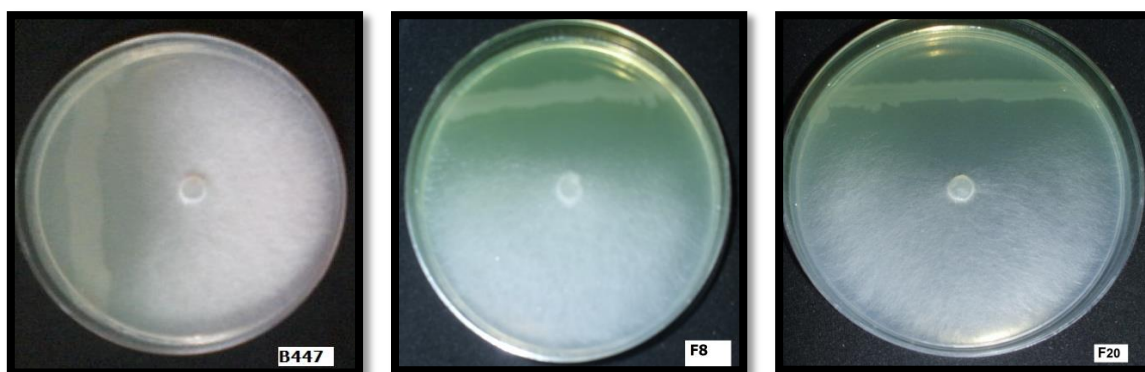


Figure 19: Confrontation champignon *Pseudomonas* spp. fluorescents sur le milieu CAA

L'influence des milieux de cultures et des souches sur le taux d'inhibition est confirmée avec l'étude statistique.

En effet, l'analyse multi-variée de la variance (MANOVA) révèle que le milieu exerce un effet statistiquement significatif sur le diamètre ($p=0,000$ ($< 5\%$)) et sur le taux d'inhibition ($p = 0,000$). Il est de même pour les souches ($p=0,000$) ($< 5\%$) (Tableau 7, annexe 03)

Selon Le test de Tukey, pour la comparaison des moyennes (tableau 08,09 annexe 03), nous remarquons que les milieux de culture appartiennent à différents sous-ensembles homogènes. Ce qui indique que l'effet des 3 milieux (PDA, King B et CAA) sur le taux d'inhibition et sur le diamètre de la croissance de *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* est statistiquement différent.

Selon le tableau 10, annexe 03, la majorité des souches entraînent des réactions statistiquement différentes mis à part les souches B474, PI11 et BB10 où nous notons qu'ils appartiennent au même sous-ensemble (sous-ensemble 9). Il est de même pour les souches BB9 et F8 qui appartenant au même sous-ensemble (sous-ensemble 11).

3. Évaluation de la promotion de la croissance *in vitro* des semences de tomate

Les résultats de l'effet de la bacterisation des semences sur la longueur des racines et des pousses après 10 jours d'incubation sont consignés dans la figure 20.

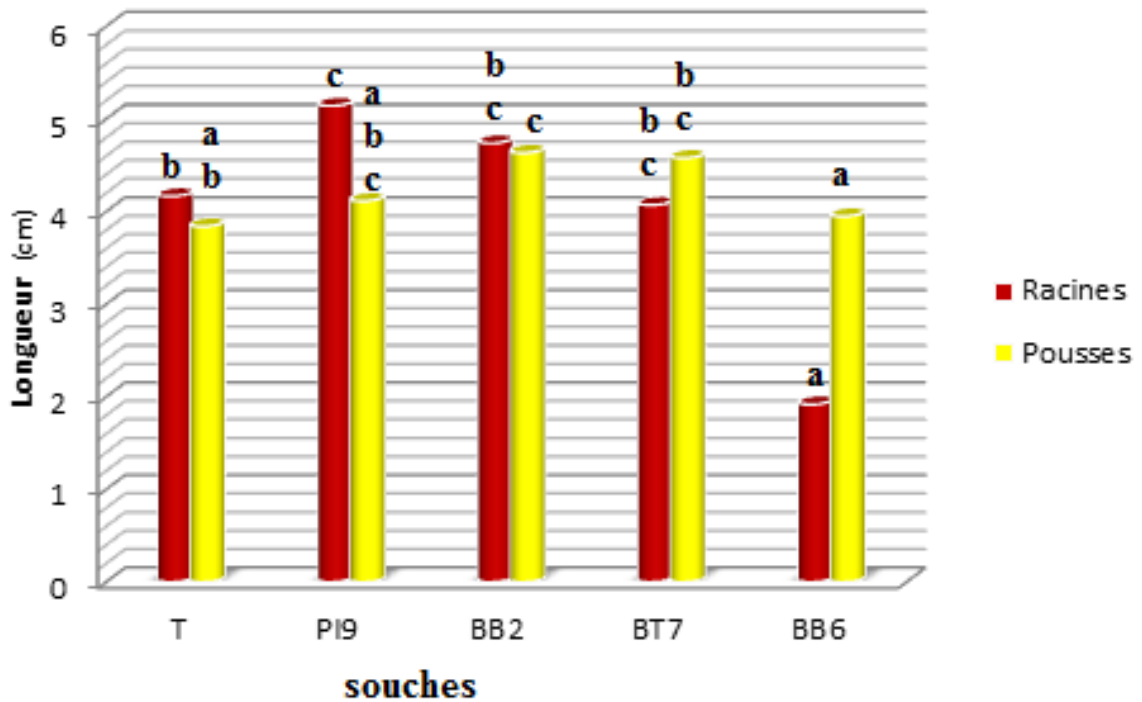


Figure 20 : La longueur moyenne des racines et des pousses chez les isolats étudiés (test de Tukey, Alpha = ,05). a : sous-groupe 1, b : sous-groupe 2. c : sous-groupe 3

3.1 Racines :

D'après ces résultats, nous remarquons que la longueur moyenne la plus élevée des racines (5,14 cm) a été obtenue par les semences bactériées avec la souche PI9, suivie par Les semences bactériées par la souche BB2 avec une longueur moyenne des racines de 4,74 cm par rapport au témoin non bacterisé (4,16 cm). Pour les semences bactériées avec Les souches BT7 et BB6, la longueur moyenne des racines est inférieure à celles du témoin.

Le test de Tukey pour la comparaison des moyennes, nous a permis de classer les souches dans différents sous-groupes homogènes. Selon ces résultats (figure 20) :

- La souche BB6 appartient au sous-groupe a
- Témoin + BT7 + BB2 : appartiennent au sous-groupe b
- BT7+BB2+PI9 : appartiennent au sous-groupe c

3.2 Les pousse :

Selon les valeurs de la longueur des pousses représentées dans la même figure, le meilleur résultat a été signalée chez les semences traitées par la souche BB2 (4,635cm), suivie par BT7 (4,57 cm) et par la souche PI9 (4,11 cm), alors que les semences traitées par la souche BB6, la longueur moyenne des pousse est de 3,95cm proches de celle obtenue par le témoin (3,84 cm).

L’analyse statistique par le test de tukey, nous a permis de classer les souches en 3 sous-groupes selon la longueur moyenne des pousses :

- BB6, Témoin, PI9 : appartiennent au sous-groupe a
- Témoin, PI9, BT7 : appartiennent au sous-groupe b
- PI9, BT7, BB2 : appartiennent au sous-groupe c

3.3 Le taux de germination et l’indice de vigueur

D’après les résultats mentionnés dans le tableau 11 (annexe 03), les souches ont pu avoir un effet significatif sur le taux de germination (TG) (p=0,000) et sur l’indice de vigueur (IV) (p=0,000)

a) Le taux de germination

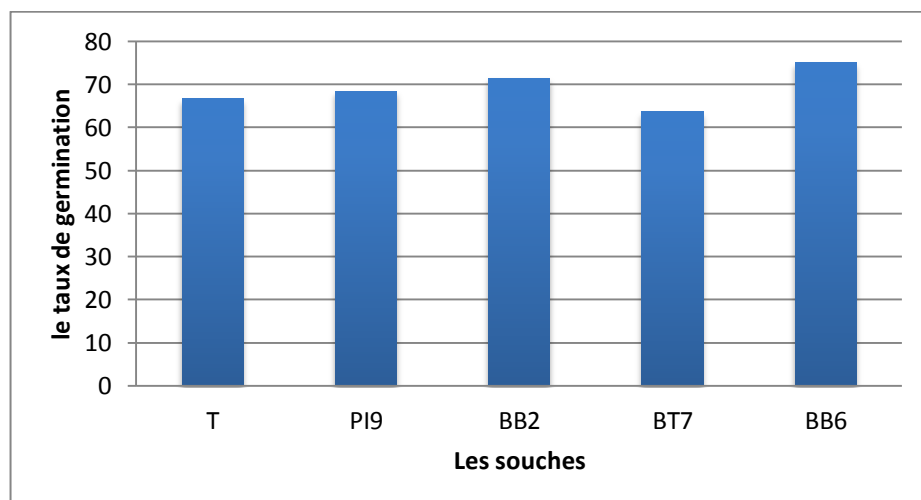


Figure 21 : Le taux de germination.

D'après les résultats illustrés par la figure (21), la souche BB6 a donné un meilleur taux de germination (75%), suivie par le traitement BB2 (71,42). Alors que les semences traitées par la souche BT7, le taux de germination est de 63,63% inférieur à celui du témoin (66,66%).

Selon le test de tukey pour la comparaison des moyennes (tableau 12, annexe03), nous a permis de classer les souches en 4 sous-groupes selon le taux de germination :

- BT7 : appartient au sous-groupe 1
- Témoin, PI9 : appartiennent au sous-groupe 2
- BB6 : appartient au sous-groupe 3
- BB2 : appartiennent au sous-groupe 4

b) Indice Vigueur (VI) :

L'activité de promotion de la croissance *in vitro* des semences de tomate a été évaluée sur la base de l'indice de la vigueur.

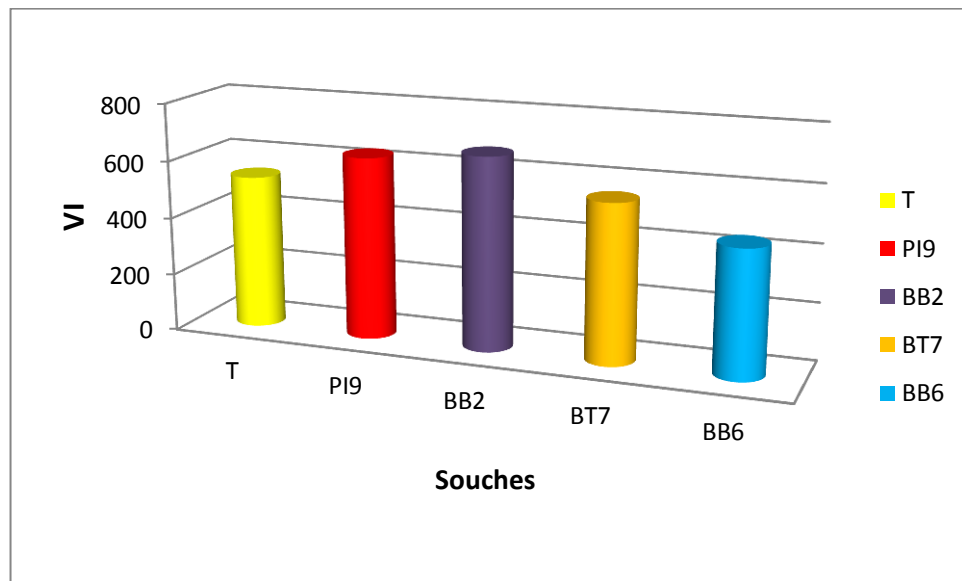


Figure 22: Indice de la vigueur

Selon La figure 22, le meilleur indice de la vigueur a été enregistré par les semences traitées par la souche BB2 (669,565), suivi par les semences traitées avec les souches PI9 et BT7 avec des indices de vigueur de (633,373) et (550,399) successivement supérieur à celui de témoin (533,835) (tableau 13, annexe 03).

D'après les résultats de test de tukey, (tableau 14, annexe 03) nous avons remarqué que les souches sont classées en 5 sous-groupes selon l'indice de vigueur

- BB6 : appartient au sous-groupe 1
- Témoin : appartient au sous-groupe 2
- BT7 : appartient au sous-groupe 3
- PI97 : appartiennent au sous-groupe 4
- BB2 : appartiennent au sous-groupe 5

Discussion

II. Discussion

La rhizosphère ainsi que les racines renferment une collection de microorganismes qui peuvent avoir un impact positif sur la croissance et la santé des plantes (Ahmed *et al.*, 2008).

La synthèse d'AIA est largement réponde chez les rhizobactéries (Forlani *et al.*, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003), environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'AIA (Sandhya *et al.*, 2009). La production de cette phytohormone par *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance et le développement végétal.

La réalisation du test *in vitro* de la production d'AIA par les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents nous a permis de constater que seulement six souches sur dix-neuf sont capable de synthétiser cette phytohormone en présence du tryptophane, avec des quantités qui varient entre 1,7 et 18,3 à µg/ml. La variation des quantités d'AIA est significativement différente chez les souches GP4 (1,7 µg/ml), F21 (1,8 µg/ml), F8 (3,2 µg/ml), BB10 (5,9 µg/ml), BB2 (7,6 µg/ml), F48 (18,3 µg/ml).

La fluctuation de la quantité d'AIA produite par les souches de *Pseudomonas*, dans les conditions optimales, est probablement due à la variabilité génétique entre eux (Rabhi., 2012). L'absence de production chez certaines souches serait liée donc à la perte de l'information génétique et du mécanisme physiologique de la biosynthèse de l'AIA (Mishra *et al.*, 2010),

Le tryptophane est naturellement secrété dans les exsudats racinaires (Kamilova *et al.*, 2006). L'incorporation du tryptophane dans la rhizosphère peut stimuler la croissance de certaines plantes, l'effet a été relié à la conversion du tryptophane en AIA par les bactéries rhizosphériques (Oberhansli *et al.*, 1991).

L'amélioration de l'alimentation minérale de la plante en phosphore a été la première hypothèse proposée pour expliquer l'effet bénéfique enregistré à la suite de la bactérisation de plantes (Lemanceau., 1992). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents, augmenteraient la concentration en phosphore soluble soit par minéralisation des phosphates organiques, grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques, sous l'effet d'acides (Krasilnikov, 1961).

Le test *in vitro* de la solubilisation du phosphore a révélé que toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à l'exception de la souche B454, ont la capacité de solubilisé

le phosphore, cette solubilisation est indiquée par soit la formation d'un halo de solubilisation ou par changement de la couleur du milieu de culture. Plusieurs chercheurs ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (Hedley *et al.*, 1990; Hinsinger, 2001).

Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation concordent avec plusieurs travaux précédents qui ont démontré la capacité des bactéries rhizosphériques à solubiliser les phosphates (Rodriguez et Fraga, 1999; Verma *et al.*, 2001). Ainsi un bon nombre de souches de *Pseudomonas* solubilisent modérément les phosphates organiques et inorganiques (Chabot *et al.*, 1993 ; Rodriguez et Fraga, 1999).

La production *in vitro* de chitinase par 19 souches de *Pseudomonas spp fluorescentes* montre une totalité de production de cette enzyme par ces derniers. Plusieurs études corroborent nos résultats ; Maurhofer *et al.*,(1994) ont signalé la présence de diverses protéines d'endochitinase et glucanases dans le liquide intercellulaire des feuilles du tabac cultivé en présence de la souche de *Pseudomonas fluorescentes* CHAO.

Les chitinases, sont des enzymes hydrolytiques d'importance primordiale, car la chitine est le constituant majeure de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Kishore *et al.*, 2005).

Nos résultats montrent un pourcentage de 63,15% des souches qui ont la capacité de produire des enzymes protéolytiques, ce qui concorde avec les résultats obtenus par différents auteurs. D'après Stanier *et al.*, 1966, la production de protéases extracellulaires, est une propriété de *P. aeruginosa*, elle est présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P. putida*. qui joue un rôle dans la dégradation des composés des parois cellulaires fongiques.

Les résultats obtenus par le test *in vitro* de la production de cellulase montrent une absence totale de production de cet enzyme. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la dégradation de la cellulose est complexe (Mandels, 1981). Elle nécessite l'action synergique de trois catégories d'enzymes, chacun ne contenant qu'une seule action limitée sur l'activité cellulosique.

En effet, seuls quelques organismes ont la capacité de produire de grandes quantités d'enzymes capables d'une dégradation de la cellulose insoluble en sucres solubles *in vitro*. Les

trois groupes enzymatiques du complexe de cellulase sont respectivement appelés endo- β (1-4) glucanases, exo- β (1-4) glucanases et β -glucosidases.

Il semble qu'une petite proportion des dérivés de la CMC ne sont pas entièrement réticulé et sont donc présents sous la forme soluble. Le même auteur confirme que la totalité de la chaîne de cellulose substituée est complètement réticulé et que jusqu'à 10% peuvent être sous une forme soluble. Ceci suggère que l'importante fraction insoluble de CMC est la cause de cette activité limitée qui a été observée.

Les résultats obtenus par le teste d'antagonisme *in vitro*, concordent avec ceux déjà obtenus par plusieurs auteurs. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs organismes phytopathogènes (Haas et Defago, 2005).

D'après nos résultats, nous notons que le milieu de culture influence sur l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. La variabilité dans l'expression de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents dans les trois milieux de culture suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le biocontrôle.

Le milieu de culture le moins performant pour l'activité antifongique est le milieu PDA, qui est un milieu favorable au développement de champignons. L'inhibition de la croissance mycélienne par les souches F27, PI9, B454 observée sur milieu PDA suggère qu'elle n'est pas due à l'action des sidérophores, (le milieu PDA ne favorise pas la production des pigments fluorescents). Ceci peut être expliqué par l'implication d'autres mécanismes d'action, telle que les métabolites à effet inhibiteur ou la synthèse des antibiotiques, (phenaz et HCN).

La plupart des *Pseudomonas* spp. fluorescents dont l'efficacité a été prouvée dans le biocontrôle des maladies de plantes, produisent un ou plusieurs antibiotiques autre que les sidérophores. La production d'HCN, *in vitro* sur milieu solide inhibe la croissance de plusieurs agents phytopathogène fongiques tel que *Tielaviopsis basicola* (Benchabane., 2005). En plus d'après Thomashow et Weller (1988), les phénazines chez *Pseudomonas* jouent un rôle important dans la lutte biologique contre les maladies des plantes. La souche P6 appartenir au groupe des phénazines s'est révélée apte à diminuer de manière très sensible la fusariose de la tomate (Benchabane.,2005)

Cependant les trois souches ayants montré un effet inhibiteur sur le milieu PDA, produisent HCN et seulement la souche PI9 a la capacité de produire les antibiotiques de nature phenazénique (tableau 2 en matériel et méthode) La plupart des *Pseudomonas* spp. fluorescents dont l'efficacité a été prouvée dans le biocontrôle des maladies de plantes, produisent un ou plusieurs antibiotiques autre que les sidérophores (Haas et Défago, 2005).

L'inhibition de la croissance mycélienne sur le milieu King B, qui est considéré comme sélectif pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents (King *et al.*, 1954), peut être liée à la synthèse des sidérophores, ou d'autre métabolites secondaire. Weller et Cook (1983) avaient auparavant rapporté, que malgré l'importance de la production de sidérophores dans le biocontrôle, ce n'est probablement pas le seul mécanisme impliqué dans l'antagonisme ,

La production des enzymes qui dégradent les parois fongiques peuvent inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*. Nos résultats ont prouvé que la totalité des souches étudiées ont la capacité de synthétiser des enzymes chitinolytique ce qui est en accord avec quelques études, qui ont présenté une corrélation entre la production d'enzymes chitinolytiques par des bactéries de genre *Pseudomonas* sp et la capacité de ces souches à inhiber la croissance de champignons telluriques, tels que *Fusarium oxysporum* (Lim *et al.*, 1991; Palumbo *et al.*, 2005). L'absence de l'inhibition chez certaines souches peut être expliquée par la production de quantités insuffisante pour l'activité inhibitrice.

D'après les résultats obtenus, le teste de production des enzymes protéolytique *in vitro* montre que 63,15% des souches étudiés sont protéase positive. La protéase est considérée comme une enzyme dégradant la paroi cellulaire fongique. Ceci concorde avec les résultats de Naik et Sakyhivel,(2006) qui stipulent que la souche PUP6 produirait des protéases ayant une activité CWDE (Cell Wall degrading enzymes).

A ces métabolites secondaire, il convient d'ajouter l'ammoniaque (NH₃) qui est par l'alcalinisation du milieu qu'il provoque, peut avoir un effet inhibiteur, principalement sur la croissance d'espèces fongiques phytopathogène (Bounoua., 2008). selon Howell *et al.* (1988) ont remarqué l'inhibition de *Pythium* par *Enterobacter cloacae* dans des boites de pétri cloisonnées et ont suspecté l'implication de substances volatiles. L'ammoniac est l'agent inhibiteur identifié.

La forte activité antifongique exercée par les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents à l'encontre de *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* sur le milieu CAA (Totalité des souches sont antagonistes), pourrait s'associer à l'implication de sidérophore.

Le fer est un élément indispensable à la germination conidienne. Le CAA est concéderez comme milieu carencé en fer. Il est à noter que les sidérophores ne sont produit qu'en conditions de carence en fer (Meyer et Abdallah., 1978). La compétition pour le fer par la production de sidérophore par *Pseudomonas* spp fluorescents est responsable de la réduction de la croissance *in vitro* et dans le sol de *Fusarium* spp. (Elad et Baker, 1985).

De ce fait, les *Pseudomonas* sp. fluorescents sont plus aptes à mobiliser le fer que les *Fusarium* (Lemanceau, 1988). Les mêmes constatations sont signalées par Albouvette et al. (1998) ; la suppression de la croissance radiale de *F. oxysporum* est induite par une compétition du fer par les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Rsche & Eabrak, (1982) ont signalé des relations de compétition pour le fer entre *F. oxysporum* pathogène et la population de *Pseudomonas* fluorescents abondants dans la rhizosphère.

Nos résultats mettent en avant l'influence positive des souches PI9, BB2 et BT7 de *Pseudomonas* spp fluorescents sur la croissance des semences de tomate. Ceci concorde avec les résultats obtenus par Digat et al (1990) et Haddad et col. (2013), qui indiquent que la bactérisation des plantes de tomate par des bactéries *Pseudomonas* spp fluorescents, stimule d'une façon significative la germination et la croissance végétale *in vitro* et *in situ*.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet bénéfique d'AIA (acide indole acétique), et le phosphore, métabolites caractérisant les souches utilisées, ou par l'implication d'autres métabolites telle que les cytokinines et des gibbérellines (Vessey, 2003).

Certains PGPR dont *Pseudomonas putida* synthétisent et secrètent des régulateurs de croissance telle que l'AIA qui stimule la croissance racinaire en augmentant la longueur de 35-50% (Patten et Glick, 2002). L'augmentation de la concentration en phosphore soluble par les *Pseudomonas* fluorescents induit un bon développement du système racinaire, le phosphore étant souvent immobilisé sous forme de phosphates insolubles (phosphates de calcium, de fer ou d'aluminium...). Des expériences réalisées ont prouvé leur importance en tant qu'une source pour la croissance des plantes (Joergensen and Castillo 2001). Il joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des végétaux. (Silini., 2013)

Le traitement avec la souche BT7 (AIA négatif), a induit une longueur moyenne de racines inférieure à celle du témoin non inoculé. D'autre part elle enregistre des longueurs moyennes des pousses et un indice de la vigueur supérieur à celui du témoin. Ceci est dû probablement à l'effet positif de phosphore sur la croissance végétale (phosphatase positif).

D'après nos résultats, la souche BB6 a pu provoquer la suppression de la germination des semences. Plusieurs études ont montrés que certains isolats bactériens n'ont aucun effet apparent sur la germination des semences, tandis que d'autres, une fois appliqués, causent la suppression de la germination des semences (Van Peer et *al.* 1990 ;Ozaktan et *al.* ,2013).

Conclusion

Conclusion

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité des 19 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à produire quelques métabolites secondaire *in vitro* impliqués dans la lutte biologique, ainsi que dans la stimulation et le développement du semence de Tomate.

Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production de quelques métabolites secondaire chez 19 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les souches étudiées sont capables de produire *in vitro* des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance, telle que l'AIA ou ces produits apparentés synthétisés par 31,57% des souches étudiées. La capacité de solubilisation des phosphates est observée chez la plupart des souches (94,44%).

La production des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire, est parmi les métabolites les plus importants dans le contrôle biologique. D'après nos résultats, la chitinase est synthétisé par la totalité des souches étudiées (100%), certaines souches ont la capacité de produire les enzymes protéolytiques (63,15%), alors que nous avons enregistré une absence totale de production de cellulase , pectinase et lypase.

Les isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont montré une activité antagoniste appréciable *in vitro* sur la croissance du *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Les meilleurs résultats d'antagonisme ont été obtenus sur le milieu CAA, par rapport aux deux autres milieux de cultures (PDA, King B). Cet antagonisme a été moins spécifique pour les souches PI9, et B454, dont l'activité s'est exprimée sur les trois milieux de culture utilisés.

Les bactéries antagonistes montrent une variabilité du taux d'inhibition vis-à-vis du champignon cryptogamique. Nous avons constaté que la variation de l'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des souches antagonistes, mais aussi du milieu de culture utilisé.

Conclusion

La bactérisation des semences de la tomate en conditions contrôlées, a permis de mettre en évidence l'effet stimulateur des souches sur la germination des semences de tomate.

Pour la même variété de semence de tomate, les souches testées ont engendré une augmentation de la longueur des racines et/ou des pousses chez certains, en taux de germination chez d'autres, ainsi que sur l'indice de la vigueur par rapport au témoin non inoculé.

Comme dans tout travail de recherche, des questions subsistent et de nouvelles perspectives s'ouvrent afin de compléter les connaissances sur l'implication des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents comme agent biofertilisant et biopesticides.

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

Des expériences sur une plus large gamme de plantes sont nécessaires. De même, l'élargissement du spectre d'efficacité contre d'autres pathogènes. Il serait intéressant également d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes déclenchés par l'application des bactéries dans la lutte biologique.

Une expérimentation plus large en plein champs, serre de ces souches, serait souhaitable.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abdul – Baki, A.A., J.D., Anderson. 1973.** Vigor Determination In Soybean By Multiple Criteria. *Crop Sci.*, 13: 630-633.
- Agrios, G.N . 2005.** Plant Pathology, 5th Edn, Elsevier Academic Press, Burlington, Mass, P 952.
- Agrios, G.N. 1988.** Plant Pathology, 3rd Edition. Academic Press, Inc: San Diego. P 803.
- Agrios, G. 1970.** Plant Pathology. Ed. Academic Press. New York, P 529.
- Ahmad, F., Ahmad, I. And Khan, M.S. 2008.** Screening Of Free-Living Rhizospheric Bacteria For Their Multiple Plant Growth Promoting Activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.
- Alabouvette. C., B. Schippers. P. Lemanceau., P.A.H.M. Bakker. 1998.** Biological Control of Fusarium Wilts: Towards the Development of Commercial Products. In: Plant Microbe Interaction and Biological Control, Boland, G.J. and R. Kuykendall (Eds.). Marcel Dekker, New York, Pp 15-36.
- Alabouvette, C., Lemanceau P. 1991.** Biological Control of Fusarium Diseases By Fluorescent Pseudomonas And Non-Pathogenic Fusarium. *Crop Protec* 10, 279-286.
- Alabouvette ,C., Lemanceau, P., Couteaudier, Y. 1988.** Recherches Sur Le Résistance Des Sols Aux Maladies. XIV. Modification Du Niveau De Réceptivité d'un Sol Résistant Et d'un Sol Sensible Aux Fusarioses Vasculaires En Réponse A Des Apports De Fer Et De Glucose. *Agronomie* 8, 155-162.
- Amkraz Nadiya. 2013.** Utilisation Des *Pseudomonas* Spp. Fluorescents Et Des Plantes Aromatiques Et Médicinales Contre *Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Michiganensis*, Agent Du Chancre Bactérien De La Tomate, Thèse Doctorat , Faculté Des Sciences, Agadir.
- Avis T.J., Gravel V ., Antoun H., et Taweddell R.J. 2008.** Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1733-1740.
- Barazani, O., And Friedman, J. 1999.** Is IAA The Major Root Growth Factor Secreted From Plant-Growth-Mediating Bacteria? *J. Chem. Ecol.* 25:2397-2406.
- Berthelin, J., Leyval ,C., Laheurte, F., De Guidici, P. 1991.** Some consideration on the relation between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization pp 359-364 in: plant Growth-promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel, B., Koller , and G Défago, eds. *Int. org. biol. Control Noxions Anim. Plants/West. Palaerctic Reg. Sec. Bull.* 1418.
- Beckman, C.H. 1989.** Clonisation Of The Vascular System Of Plants By Fungal Wilt Pathogens: A Basis For Modifying The Interaction Between Host And Parasite In Time And Space, In *Vascular Wilt Diseases Of Plants.* (Tjamos, E.C. Et Beckman C.H. Fds) Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, Pp. 19-322.

Références Bibliographiques

- Bellishree, K., Girija., Ganeshan., Ramachandra, Y.L., Archana, S. Rao., And Chethana, B.S. 2014.** Effect Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr) On Germination, Seedling Growth And Yield Of Tomato, 1division Of Plant Pathology, Indian Institute of Horticulture Research, Bangalore, Karnataka, India Department Of Biotechnology, Kuvempu University, Shankaraghatta, Karnataka, India ZARS, VC Farm, Mandya, International Journal Of Recent Scientific Research Research Vol. 5, Issue, 8, Pp.1437-1443,
- Bell-Perkins, L. J., Et J.M. Lynch.2002.** Rhizosphere Microbiology,. *In* G. Bitton (Ed.), Encyclopedia Of Environmental Microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada. P. 2713-2728.
- Benchabane, M. 2005.** Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, Thèse Doctorat d'état.FSB-UTHB,Alger.P 235.
- Bloemberg ,G.V., Lugtenberg, B.J. 2001.** Molecular Basis of Plant Growth Promotiona Nd Biocontrolb Y Rhizobacteriac. *Urrenot Pinionsin Plant Biology4* : 343-350.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L.2000.** The Taxonomy Of *Pseudomonas Fluorescens* And *Pseudomonas Putida*: Current Status And Need For Revision. *Agronomie, 20*(1): 51-63.
- Botelho, G. R., And Mendonça-Hagler, L. C. 2006.** Fluorescent Pseudomonads Associated With The Rhizosphere Of Crops - An Overview. *Braz. J. Microbiol. 37*: (4):401- 416.
- Bounoua Mohammed Djelle. 2008.** Essais D'utilisation Des *Pseudomonas* Spp Et *Bacillus* Spp Dans Le Biocontrôle De *Fusarium Oxysporum* f.Sp. *lycopersici* Sur Tomate Et Verticillium Dahliae Sur L'olivier. Thèse de Doctorat Université d'Oran – Sénia.
- Bowen, G.D. ,And Rovira, A.D.1976.** Microbial Colonization of Plant Roots. *Annuel. Revue. Phytopathol 14*: 121-144.
- Bressoud F.2010.** Systèmes De Culture Et Qualité De La Tomate.Unité Expérimentale INRA SAD Perpignan-Roussillon, Domaine Du Mas Blanc, 66200 Alénya, Innovations Agronomiques 9 (2010), 107-114.
- Bric, J. M., Bostock, R. M., And Silverstone, S. E. 1991.** Rapid In Situ Assay For Indoleacetic Acid Production By Bacteria Immobilized On Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol. 57*: 535–538.
- Cattelan, A. J., P.G. Hartel Et J.J. Fuhrmann. 1999.** Screening For Plant Growth Promoting Rhizobacteria To Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J. 63*:1670-1680.
- Cappuccino, J. C., et N. Sherman .1992.** Microbiology: A Laboratory Manuel, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M.I., Chulze, S. And Etcheverry, M. 2005.** Biocontrol of *Bacillus Subtilis* Against *Fusarium Verticillioides* In Vitro And At The Maize Root Level. *Res. Microbiol, 156* (5-6):748-754.

Références Bibliographiques

- Chabot, R., H. Antoun ., M.P. Cescas. 1993.** Stimulation of growth of maize and lettuce by inorganic phosphorus solubilizing microorganisms. *Canadian J. Microbiol.*, 39: 941–47.
- Chaiharn, M., And S, Lumyong. 2009.** Phosphate Solubilization Potential And Stress Tolerance Of Rhizobacteria From Rice Soil In Northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 305-314.
- Claire Ferret. 2012.** Rôle Des *Pseudomonas* fluorescents Dans La Biodisponibilité Des Métaux Contaminant Les Minéraux Du Sol : Application A La Phytoremédiation , Ecole Doctorale Des Sciences De La Vie Et De La Sante Biotechnologies Et Signalisation Cellulaire - Umr 7242 .
- Cook, R., Baker, K. 1974.** Biological Control Of Plant Pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA. P 380.
- D. Blancard. (Inra). 2013.** Fusarium Oxysporum F. Sp. Lycopersici (Fusariose). [Http://Ephytia.Inra.Fr/Fr/C/5118/Tomate-Fusarium-Oxysporum-F-Sp-Lycopersici](http://Ephytia.Inra.Fr/Fr/C/5118/Tomate-Fusarium-Oxysporum-F-Sp-Lycopersici).
- De Souza, J. T., And Raaijmakers, J. M. 2003.** Polymorphism Within The Prnd And Pltc Genes From Pyrrolnitrin And Pyoluteorin-Producing *Pseudomonas* And *Burkholderia* Spp. *FEMS Microbio. Ecol.* 43. 21-34.
- Defago, G. 1993.** 2,4-Diacetylphloroglucinol, A Promising Compound In Biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312.
- Degroot, A., Filloux, A. and Tommassen, J.1991.** Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 229: 278-284.
- Dekkers, L.C., Mulders, I.H.M., Phoelich, C.C., Chin A-Woeng, T.F.C., Wijfjes, A.H.M., And Lugtenberg, B.J.J. 2000.** The Sss Colonization Gene Of The Tomato-Fusarium Oxysporum F. Sp. Radicis-Lycopersici Biocontrol Strain *Pseudomonas Fluorescens* WCS365 Can Improve Root Colonization Of Other Wild-Type *Pseudomonas* Spp. *Bacteria. Mol Plant Microbe Interact* 13: 1177–1183.
- Digat, B.1992.** Controle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. *Phytoma. Défense des Végétaux.* 441,34-38.
- Digat, B., Gaudillat, M., Labadie, J.M. 1990.** Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes to plantgrowth- promoting *Pseudomonas*, *Symbiosis* 9,295-303.
- Digat, B. And Gardan, L. 1987.** Caractérisation, Variabilité Et Sélection Des Souches Bénéfiques De *Pseudomonas Fluorescens* Et *Pseudomonas Putida*. *Bull OEPP*, 17: 559-568.
- Elad, Y., Baker, R. 1985.** The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydo spores germination of *Fusarium* spp. B y *Pseudomonas* spp *Phytopathology* N 75 1051-1059.

Références Bibliographiques

Forlani, G., Pastorelli, R., Branzoni, M. And Favilli, F.1995. Root Colonization Efficiency, Plant Growth Promoting Activity And Potentially Related Properties In Plant Associated Bacteria. *J. Gen. Breeding.* 49: 343–352.

Fravel, D. R. 2005., Commercialization And Implementation Of Biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol*,43: 337-359.

Gaëlle Rossignol. 2007. Contribution A L'étude de facteurs de virulence d'une Souche Hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité Hémolitique Et Variation Phénotypique, Université De Rouen Ecole Doctorale Normande De Chimie – Biologie.

Gagné, S., Dehbi, L., Le Quéré, D., Cayer, F., Morin, J, L., Lemay, R., Fournier,N.,1993. Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR) inoculated into the peat-based growing media. *Soil Biology and Biochemistry* 25(2),269-272.

Garbeva ,P., Van Veen ,J.A., Van Elsas ,J.D. 2004. Microbial Diversity In Soil: Selection of Microbial Populations By Plant And Soil Type And Implications For Disease Suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* .42:243–270.

Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., Burger, A. 2003. *Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Michiganensis*: First Steps In The Understanding Of Virulence Of A Gram-Positive Phytopathogenic Bacterium. *J. Of Biotech.* 106:179–191.

Gerretsen .F.C. 1948. The Influence Of Microorganisms On The Phosphate Intake By The Plant., *Plant Soil* 1, 51-81.

Gnanamanickam, Samuel S. 2007. *Plant-Associated Bacteria*, University Of Madras, Chennai, India, 712 P, (ISBN 9781402045370), P. 423.

Gobat ,J.M.,Aragno, M., Matthey,W. 2003. *Le Sol Vivant: Bases De Pédologie,Biologie Des Sols.* Edition2, Presses Polytechniques Et Universitaires Romandes, Lausanne, France.P 568.

Gray, E.J., Smith ,D.L. 2005. Intracellular And Extracellular PGPR: Commonalities And Distinctions In The Plant-Bacterium Signaling Processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 395-412.

Grayston,S.J., Stphens, J.H., Nelson,L.M. 1991.Field and grennhouse studies on growth promotion of spring wheat inoculated with co existent rhizobacteria pp 11-16 in: palnt Growth-promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel , B. Koller, and G Défago, eds.Int. org.biol. Control Noxions Anim. Plants/West. Palaerctic Reg.Sec.Bull.1418.

Guillaumin,J.J ., Chillali,M., Ighili-Idder ,H., Mohammed, C., Escarmant , B ,L.,Botton. 1998. Variation in thr ITS ans IGS refigions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycol. Res.*,10 (2):533-540.

Haas, D. And Defago, G. 2005. Biological Control Of Soil-Borne Pathogens By *Fluorescent Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology* 3(4):307-319.

Références Bibliographiques

- Haddad,N ., Krimi,Z., Raio,A. 2013.** Endophytic bacteria from weeds promote growth of tomato plants in vitro and in greenhouse. In: Schneider C, Leifert C, Feldmann F (Eds), Endophytes for plant protection: the state of the art, pp.27-32.
- Hariprasad, P., H.M. Navya, S. Chandranayaka, et S.R. Niranjana. 2009.** Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biol. Control.* 50: 307-316.
- Hayat .R, Safdar Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. 2010.** Soil Beneficial Bacteria And Their Role In Plant Growth Promotion: A Review. *Ann Microbiol* 60:579–598.
- Hedley, M. J., Hussin, A, Bolan, N. S. 1990.** New Approaches To Phosphorus Fertilisation. Phosphorus Requirements For Sustainable Agricultura In Asia And Oceania. Proceedings of A Symposium, 6-10 March 1989. 125-142.
- Hider RC, Kong X. 2010.** Chemistry And Biology Of Siderophores. *Natural Product Reports*27: 637-657.
- Hinsinger, P. 2001.** Bioavailability Of Soil Inorganic P In The Rhizosphere As Affected By Root Induced Chemical Changes: A Review. *Plant and Soil.* 237: 173-195.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 1994.** Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. Ninth Edition.
- Howell, C. R., R. C. Beier ., R. D. Stipanovic. 1988.** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence darnping-off by the bacterium. *Phytopathologia*, 78:1075- 1078.
- ISTA., 1993.** International Seed Testing Association,(Association Internationale D'essais De Semences).Zurich.Seed Sci.Technol.,21,Supplément,P 322.
- Jacques Gabriel FUCHS., 1993.** Paramètres Influençant La Lutte Biologique Contre La Fusariose Vasculaire De La Tomate Et La Pourriture Noire Des Racines De Concombre. Zürich., Diss. Techn. Wiss. ETH Zürich, Ref.: M. S. Wolfe ; Korref.: G. Défago. Nr 10379, 1993.
- Jacques, P. P., Delfosse, M., Ongena, P., Lepoivre, P., Cornélis, N., Koedam, L., Neirinckx., Et P. Thonart. 1993.** Les Mécanismes Biochimiques Développés Par Les *Pseudomonas Fluorescents* Dans La Lutte Biologique Contre Les Maladies Des Plantes Transmises Par Le Sol. *Cahiers Agric.* 2: 301-307.
- Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V. And Wilson, M. 2006.** Integrated Biological Control Of Bacterial Speck And Spot Of Tomato Under Field Conditions Using Foliar Biological Control Agents And Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biol. Control*,36(3):358-367.
- Joergensen , R. G., Castillo, X .2001.**Interrelationships between microbial and soil properties in young volcanic ash soils of Nicaragua. *Soil Biol Biochem* 33:1581-1589.

Références Bibliographiques

Jonsthor,A., and Booth, C .1982. Plant pathologist's pocket book.2 ed Commonwealth. Mycological Institute, Kew surrey, England.P 439.

Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. And Lugtenberg, B.2005. Enrichment For Enhanced Competitive Plant Root Tip Colonizers Selects For A New Class Of Biocontrol Bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809-1817.

Keneni, A. F., Assefa, Et P.C. ,Prabu. 2010. Isolation Of Phosphate Solubilizing Bacteria From The Rhizosphere Of Faba Bean Of Ethiopia And Their Abilities On Solubilization Insoluble Phosphates. *J, Agr. Sci.Tech.,* 12: 79-89.

Kennedy, A. C., Et L.Z. De Luna. 2004. Rhizospher, P. 399-409. *In* D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (Ed.), *Encyclopedia Of Soil In The Environment*, Vol03,Columbia University, USA.

Khan M.S., Zaidi .A. 2005. Interactive Effect Of Rhizospheric Microorganisms On Growth, Yield And Nutrient Uptake Of Wheat. *J Plant Nutrition,* 28:2079–2092.

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

King, E.D., Ward, M.K., Raney, D.E. 1954. Two Simple Media For The Demonstration Of Pyocyanin And Fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.

Kishore, G.K., Pande, S., Podile, A.R. 2005.Chitin-supplemented foliar application of *Serratia marcescens* GPS 5 improves control of late leaf spot disease of groundnut by activating defense-related enzymes. *J Phytopathol* 153: 169–173.

Kloepper, J. W., And Schroth, M. N., 1981. Development Of A Powder Formulation Of Rhizobacteria For Inoculation Of Potato Seed Pieces. *Phytopathology* 71: 590-592.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. And Schroth, M.N., 1980. Enhancing Plant Growth By Siderophores Produced By Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Nature,* 286: 885–886.

Kloepper, JW., Schroth, M.N. 1978. Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Radishes. in : *Proc Int Conf Plant Pathol Bact. Angers,* 379-382.

Kouassi, M., 2001. La Lutte Biologique: Une Alternative Viable A L'Utilisation Des Pesticides ?,*Vertigo.*2(2).

Krasilnikov M. 1961. On The Role Of Soil Bacteria In Plant Nutrition.,*J Gen Appl Microbiol* 7, 128-144.

Latour,X., Delorme,S., Mirleau,P., Lemanceau,P.2003. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescens *Pseudomonas*; description of strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* 23,397-405.

Références Bibliographiques

- Lee, J.P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jung, S.J. And Moon, B.J., 2006.** Evaluation Of Formulations Of *Bacillus Licheniformis* For The Biological Control Of Tomato Gray Mold Caused By *Botrytis Cinerea*. *Biol. Control*, 37(3):329-337.
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M. And Briat, J.F.2009.** Role Of Iron In Plant–Microbe Interactions. *Adv. Bot. Res*, 51: 491-549.
- Lemanceau, P. 1992.** Effets Bénéfiques De Rhizobactéries Sur Les Plantes : Exemple Des *Pseudomonas Spp. Fluorescents*. *Agronomie*,12: 413-437.
- Lemanceau, P. Et Heulin, T.1998.** La Rhizosphère. Dans "Sol : Interface Fragile", Stengel, P. Et Gelin, S. (Eds). INRA, Paris, France, P. 93-106.
- Leong ,L., 1986.** Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens, *Annu Rev Phtopathol* 24,187-208.
- Lim, H.S., Kim, Y.S., Kim, S.D. 1991.** *Pseudomonas Stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation And Antifungal Mechanism Against *Fusarium Solani*, An Agent Of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 510-516.
- Loper, J.E., And Schroth, M.N. 1986.** Importance of Siderophores In Microbial Interactions In The Rhizosphere. In *Iron, Siderophores And Plant Diseases*. (Ed). Swinburne, T.R.Plenum Publishing Company.
- Mantelin, S., and Bruno Touraine, B. 2004.** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake *Journal of Experimental Botany*,.55(394),27-34.
- Marois, J.J., Munkvold, G.P. 1993.** Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa dieback*. *Phytopathology* 83 : 624-629.
- Mattar, J., 1993.** Les *Pseudomonas Fluorescents* De La Rhizosphère: Caractérisation, Incidence De La Température Et De La Microflore Autochtone Sur La Colonisation Racinaire, Thèse Doc .Université' De Lyon I, France. P 130.
- Maurhofer .M., Hase. C., Meuwly. P., Metraux .J. P., Defago G .1994.** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84, 139–146.
- Mandels ,M.1981.** Cellulases, In D. Perlman (ed.), *Annual reports on fermentation processes*, vol. 5. Academic Press, Inc., New York. p. 35-78.
- Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P., and Raaijmakers, J. M. 2009.** Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium wil* . *ISME J.* 3: 977–991.

Références Bibliographiques

- Mehta, S., And Nautiyal, C. S. 2001.** An Efficient Method For Qualitative Screening Of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 51-56.
- Mercado-Blanco, J., Et P.A.H.M. Bakker. 2007.** Interactions Between Plants And Beneficial *Pseudomonas* Spp.: Exploiting Bacterial Traits For Crop Protection. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 92: 367-389.
- Mercado-Blanco, J., Van Der Drift, K. M.G.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., Van Loon, L.C. And Bakker, P.A.H.M. 2001.** Analysis Of The Pmsceab Gene Cluster Involved In Biosynthesis Of Salicylic Acid And The Siderophore Pseudomonine In The Biocontrol Strain *Pseudomonas Fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* 183:1909–1920.
- Meyer, J.M., Abdallah., M.A. 1978.** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- Mezaache Samia .2012.** Localisation Des Déterminants De La Suppression De Quelques Souches De *Pseudomonas* Isolées De La Rhizosphère De La Pomme De Terre. Thèse Doctorat, Université Ferhat ABBAS Sétif Faculté Des Sciences De Nature Et De La Vie.
- Miller, J.H.1974.** Experiments In Molecular Genetics. Second Ed. Cold Spring Harbor, New York, P. 31-36.
- Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. And Gullino, M.L. 2006.** Control Of Soilborne Pathogens Of Tomato Using A Commercial Formulation Of *Streptomyces Griseoviridis* And Solarization. *Crop Protect.*,25(5):468-475.
- Mishra, M., U. Kumar, P.K. Mishra, Et V. Prakas .2010.** Efficiency Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria For The Enhancement Of *Cicer Arietinum* L. Growth And Germination. *Adv. Bacterial. Research.* 4: 92-96.
- Montesinos, E., Bonaterra, A. Et Moselio, S. 2009.** Pesticides, Microbial. Dans: Encyclopedia Of Microbiology (Moselio, S.), Academic Press, Oxford, UK. Pp. 110-120.
- Moore, E.R.B., B.J., Tindall, V.A.P., Martins Dos Santos, D.H., Pieper, J.L., Ramos, Et N.J. Palleroni. 2006.** Nonmedical: *Pseudomonas*., In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, Et E. Stackebrandt (Ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA. Pp 646-703.
- Nadales E.P. 2010.** Msb2, A Mucin-Like Membrane Protein Functioning In Signaling And Pathogenesis Of *Fusarium Oxysporum*, Doctoral Thesis, Córdoba, P 201.
- Naik, P. R., Sakthivel, N. 2006.** Functional Characterization of A Novel Hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* Sp.Strain PUP6 With Plant-Growth-Promoting Traits And Antifungal Potential. *Res. Microbiol.* 157: 538–546.
- Nelson, P.E. 1981** Life Cycle And Epidemiology Of F.O In Fungal Wilt Diseases Of Plants (Mace ME.,Bell AA., Et Backman CH. Eds) Academic Press, New York. Pp51-80.

Références Bibliographiques

Nielsen, M.N., Sørensen, J., Fels, J., 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.

Ohara T., Inoue I., Namiki F., Kunoh H. And Tsuge T. 2004. RENI Is Required For Development Of Microconidia And Macroconidia, But Not Of Chlamydoconidia, In The Plant Pathogenic Fungus *Fusarium Oxysporum*. *Genetics Society Of America*, 166, Pp 113-124.

Oksinska, M.P., S.A.I. Wright, S.J. Pietr. 2011. Colonization Of Wheat Seedlings (*Triticum Aestivum* L.) By Strains Of *Pseudomonas* Spp. With Respect To Their Nutrient Utilization Profiles. *Euro J Soil Biol*, 47, 364-373.

Ordentlich, A., Elad, Y., And Chet, L. 1988., The Role Of Chitinase Of *Serratia Marcescens* In Biocontrol Of *Sclerotium Rolfsii*. *Phytopathol.* 78: 84-88.

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., Kunisawa.R., Contopolou, R., Doudoroff, M. 1973. Nucleic Acid Homologies In The Genus *Pseudomonas*, *Int. J. Syst. Bacterio*, 23, 333-339.

Palumbo, J. D., Yuen, G. Y., Jochum, C. C., Tatum, K., and Kobayashi, D. Y. 2005. Mutagenesis of beta-1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward *Bipolaris* leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* 95: 701-707.

Patten, C.L. And Glick, B.R., 2002. Regulation Of Indoleacetic Acid Production In *Pseudomonas Putida* GR12-2 By Tryptophan And The Stationary Phase Sigma Factor Rpos. *Can. J. Microbiol.* 48: 635-642.

Paulitz, T.C, And Bélanger, R.R., 2001. Biological Control In Greenhouse Systems. *Annual. Revue. Phytopathol*, 39:103-133.

Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., And Robaglia, C. 2003. Tales From The Underground: Molecular Plant–Rhizobacteria Interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189–199.

Picard, C, Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. And Guckert, A. 2000. Frequency And Biodiversity Of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Bacteria Isolated From The Maize Rhizosphere At Different Stages Of Plant Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948–955.

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Van Pelt, J.A. And Van Loon, L.C. 2002. Signaling In Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance In *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Biol.* 4(5):535-544.

Raaijmakers JM, Vlami M, De Souza JT. 2002. Antibiotic Production By Bacterial Biocontrol Agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 537-547.

Références Bibliographiques

- Rabhi Nour El Houda . 2011.** Isolement De *Pseudomonas* Spp. fluorescents d'un Sol Salé. Effet D'osmoprotecteurs Naturels., Thèse Magister, Université Ferhat Abbas Sétif.
- Renwick, A., Campbell, R. and Coe, S. 1991.** Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathol.* 40: 523-532.
- Rheinberg, F.1988.** Motivation And Learning Activities : How Research Could Proceed. *International Journal Of Education Research*,12,299-306.
- Richardson, A.E. 2001.** Prospects For Using Soil Microorganisms To Improve The Acquisition Of Phosphorus By Plants *Aus. J. Plant Physiol.* 28(9): 897–906.
- Robin Roland. 2012.** Stimuler La Croissance Des Plantes Pour Mieux Valoriser Les Ressources Agricoles : Les Engrais Minéraux Comme Hôtes De Microorganismes Stimulant La Croissance Des Plantes ,Congrès Sucrier ARTAS / AFCAS.
- Rodriguez .H., Fraga .R .1999.**Phosphate Solubilizing Bacteria And Their Role In Plant Growth Promotion. *Biotechnology Advances*, 17:319-339.
- Salisbury, F.B. 1994.** The Role Of Plant Hormones. In: *Plant-Environment Interactions*. Wilkinson, R.E. (Ed.). Marcel Dekker, New York, USA., Pp. 39-81.
- Sandhya, V., S.K.Z. Ali, M. Grover, G. Reddy, B. Venkateswarlu. 2009.** Alleviation of Drought Stress Effects In Sunflower Seedlings By The Exopolysaccharides Producing *Pseudomonas Putida* Strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils.* 46: 17-26.
- Sands , D.C., And Rovira, A.D.1 971.** fluorescent *Pseudomonads* A Residual Component In The Soil Microflora ? *J. Appl. Microbiol*,34(1): 253–259.
- Scher, F.M. And Baker, R., 1982.** Effect Of *Pseudomonas Putida* And A Synthetic Iron Chelator On Induction Of Soil Suppressiveness To *Fusarium* Wilt Pathogens. *Phytopathol.* 72:1567–1573.
- Schroth, M.N., Hildebrand,D.C. And Panopoulos, N. 1992.** Phytopathogenic Pseudomonads And Related Plant-Associated Pseudomonads. In: *The Prokaryotes* (MP Balows, Ed), Springer-Verlag, New York, Pp. 3104-3131.
- Schroth, M.N., And Hancock, J.G. 1981.** Selected Topics In Biological Control. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:453-476.
- Sharma, K., G. Dak, A. Agrawal, M. Bhatnagar Et R. Sharma., 2007.** Effect Of Phosphate Solubilizing Bacteria On The Germination Of Cicer Arietinum Seed Sand Seedling Growth. *J. Herb. Med. Toxicol.*, 1: 61-63.
- Silini, Allaoua.2013.** Effets Des Molecules Osmoprotectrices Sur La Survie Et L'activité De Azotobacter Et Sur La Croissance Du Ble Dur En Milieu Salin, thèse Doctorat Université Ferhat ABBAS Sétif.

Références Bibliographiques

- Smibert, R.M. And Krieg, N.R. 1994.** Phenotypic Characterization. In: Methods For General And Molecular Bacteriology. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, And N. R. Krieg(Ed.), American Society Formicrobiology, Washington, D.C. Pp.607–654.
- Snyder W. C., Hansen H.N. 1940.** The Species Concept in Fusarium. American .Journal .Of Botany.27, Pp 64-67 .
- Soylu, S., Bennett, M.H., And Mansfield, J.W. 2002.** Induction Of Phytoalexin Accumulation In Broad Bean (*Vicia Faba L.*) Cotyledons Following Treatments With Biotic And Abiotic Elicitors. Turk J. Agric. For. 26:343-348.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden Et R. Remans .2007.** Indole-3-Acetic Acid In Microbial And Microorganism-Plant Signalling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31 (4): 425-448.
- Stanier ,R.Y., Palleroni ,N.J., Doudoroff, M. 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. J Gen Microbio. 43 , 159-271.
- Thakore, Y. 2006.** ,The Biopesticides Market For Global Agricultural Use. *Industrial Biotechnology*,2(3):294-208.
- Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki1, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, Shilpi Mittal, A.K. Tripathi, Et B.N. Johri. 2005.** Diversity Of Plant Growth And Soil Health Supporting Bacteria. Curr. Sci,89: 136-150.
- Van Loon LC. 2007.** Plant Responses To Plant-Growth Promoting Bacteria. Eur J Plant Pathol 119:243–254.
- Van Loon, L, C., Bakker, PAHM., Pieterse, C,M,J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu Rev Phytopathol, 36:453-483.
- Verma ,S.C., Ladha JK., Tripathi .A.K .2001.** Evaluation of Plant Growth Promoting And Colonization Ability Of Endophytic Diazotrophs From Deep Water Rice. Journal Biotechnology, 91:127-141.
- Verma, M., Satinder, K. Brar, R.D., Tyagi, R.Y., Surampalli, J., Valero R. 2007.** Antagonistic Fungi, Trichoderma Spp.: Panoply Of Biological Control. Biochem. Eng. J. 37: 1–20.
- Vessey, J. K., 2003.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria As Biofertilizers. Plant And Soil, 255(2): 571-586.
- Vincent, M.N., Harrison, L.A., Brackin, J.M., Kovacevich, P.A., Mukerji, P. And Weller, D.M. 1991.** Genetic Analysis Of The Antifungal Activity Of A Soilborne *Pseudomonas Aureofaciens* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2928–2934.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B., Thomashow, L.S. 2002.** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 40, 309e348.

Références Bibliographiques

Weller D. M., howie W. J. Cook R.J. 1988. Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by Fluorescent Pseudomonads. *Phytopathology* 78(8): 1094-1100.

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

Whipps, J.M., Turnbull, G.A., Morgan, J.A.W., Saunders, J.R. 2001. The Role Of Bacterial Motility In The Survival And Spread Of *Pseudomonas Fluorescens* In Soil And In The Attachment And Colonization Of Wheat Roots. *FEMS Microbiol Ecol*,36:21-31.

Wojcieh, J. J., Lise, K. 2002. Biological Control Of Postharvest Diseases Of Fruits. *Annu. Rev. Phytopatol*, 40:411-441.

Annexes

Annexe 01

Appareillage, verreries, réactifs



Etuve



Autoclave



Phytotron



La Hotte



La balance



Anse de platine



Agitateur



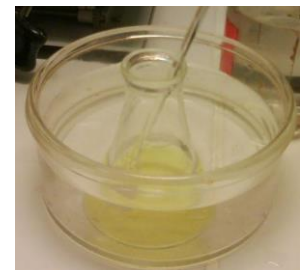
Bec Bunsen



Plaque chauffante



Boites Pétri



Réactif de Salkowski

Annexes 02

Milieux de culture (composition en g/l)

<p><u>King B : (King et al., 1954):</u> K₂HPO₄ 1,5 g MgSO₄.7H₂O1,5 g Glycérol15ml Peptone 20g Agar 20g pH 7,2</p>	<p><u>Milieu LBT(luria Bertani enrichi du tryptophane) :</u> Tryptone 10g Extrait de levure..... 5g NaCl 5g L-tryptophane 1,02g Gélose 20g Agar 20g Ph =7,5</p>
<p><u>Milieu Winogradsky :</u> Solution de stock.....5ml D-Glucose.....0,5ml CaCo₃.....0,1g Eau distillée q.s.p 1000 ml PH 6,2 ajusté avec du H₂SO₄ Composition de solution de stock : KH₂PO₄50.0g MgSo₄,7H₂O.....25g NaCl25g FeSO₄,7H₂O.....1.0g MnSO₄,4H₂O.....1,0g Eau distillée q.s.p 1000 ml PH 7,2 ajusté avec NaOH</p>	<p><u>Milieu Pikovskaya (PVK) :</u> (NH₂)₂SO₄ 0.5g Extrait de levure..... 0,5g Phosphate bicalcique5g KCL 0,2g MgSo₄, 7H₂O0,1g Glucose10g Agar 17g Mnso₄..... trace FeSo₄ trace Bleu bromophénol 4ml/l Ph=6,7</p>
<p><u>Milieu M9</u> Na₂HPO₄6g KH₂PO₄3g NH₄CL 1g NaCl 0,5g Agar17g Autoclavage à 120°C puis additionner par infiltration de : 20ml d'une solution D-Glucose 20% 2ml d'une solution MgSO₄ 1.0 M 0,1 ml d'une solution CaCl₂ 1.0M</p>	<p><u>Milieu Tryptic-soy-agar (TSA) :</u> TSA (Difco)...4g Agar12g H₂O distillée qsp.....1000ml</p>

Annexes 02

Milieux de culture (composition en g/l)

<p><u>Lait écrémé agar :</u> Caséine5g Extrait de levure.....2,5g Glucose.....1g Solution de 7% de lait écrémé100ml Eau distillé q.s .p 1000ml PH 7,5</p>	<p><u>Gélose a la chitine :</u> Extrait De Viande..... 1,0g/L Extrait De Levure2.5g/L Peptone5,0g/L Chlorure De Sodium5,0g/L La Chitine2g Agar15,0g/L Ph = 7,0</p>
<p><u>Milieu de PDA (potato dextrose agar) :</u> Extrait de pomme de terre200g Glucose20g Agar-agar.....15g Eau distillée q.s.p 1000ml PH final 5, 2</p>	<p><u>Milieu au CAA :</u> CAA5 K2HP040,9 MgSO₄-7H₂O..... 0,25</p>

Annexe 03

Tableau 5 : les résultats de production des enzymes protéolytiques par 19 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents.

	Réaction	Ø de halo (cm)		Réaction	Ø de halo (cm)
F₈	Négative	/	BB₂	Négative	/
F₁₉	Négative	/	BB₆	Positive	0,9
F₂₀	Positive	1 ,1	BB₉	Positive	2,3
F₂₁	Positive	1	BB₁₀	Négative	/
F₂₃	Positive	1,5	BB₄₄₇	Positive	1 ,8
F₂₇	Négative	/	BB₄₅₄	Positive	1
F₄₈	Négative	/	Bs₄	Positive	3
Gp₄	Négative	/	PI₁₁	Positive	0,7
PI₉	Positive	2,1	BT₃	Positive	0,6
BT₇	Positive	1,1			

Tableau 6: résultats de confrontation de *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* et 19 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents sur trois milieux de culture (PDA, King B, CAA).

Souches	PDA			King B			CAA		
	Diamètre (cm)	Taux d'inhibition	Inhibition	Diamètre (cm)	Taux d'inhibition	Inhibition	Diamètre (cm)	Taux d'inhibition	Inhibition
F₈	0	/	-	1,5	17,64%	++	3,4	40%	+
F₁₉	0	/	-	0	/	-	3,3	38,82%	+
F₂₀	0	/	-	1,5	17,64	++	3,6	42,35%	+
F₂₁	0	/	-	2,4	28,23%	++	4,2	49,41%	+
F₂₃	0	/	-	1,5	17,64%	+	2,6	30,58%	+
F₂₇	2,2	25,88%	+	0	/	-	2,6	30,58%	
F₄₈	0	/	-	0	/	-	2,8	32,94%	+
BB₂	0	/	-	0	/	-	2,4	28,23%	+
BB₆	0	/	-	0	/	-	2,7	31,76%	+
BB₉	0	/	-	1,6	18,82%	++	3,3	38,82%	+
BB₁₀	0	/	-	1,6	18,82%	++	3	35,29%	+
BT₃	0	/	-	2,1	24,70%	++	2,4	28,23%	+
BT₇	0	/	-	1,5	17,64%	++	2,3	27,05%	
B₄₅₄	1,3	15,29%	+++	1,5	17,64%	++	3,1	36,47%	+
B₄₄₇	0	/	++	1,7	20%	++	2,9	34,11%	+
BS₄	0	/	-	1,9	22,35%	+++	3,3	38,82%	+
PI₉	1,3	15,29%	+++	1,6	18,82%	+++	2,9	34,11%	++
PI₁₁	0	/	-	1,7	20%	++	2,9	34,11%	+
GP₄	0	/	-	/	-	-	3	35,29%	+

Tableau 7: Effet de milieu et des souches sur le taux et le diamètre d'inhibition.

Tests des effets inter-sujets						
Source		Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	Diamètre	291,680 ^a	56	5,209	1,14852E+31	0,000
	T_I	9033231,328 ^a	56	161307,702	5,46974E+32	0,000
Ordonnée à l'origine	Diamètre	367,840	1	367,840	8,1111E+32	0,000
	T_I	392180,309	1	392180,309	1,32983E+33	0,000
Milieu	Diametre	220,529	2	110,265	2,43141E+32	0,000
	T_I	314126,491	2	157063,246	5,32581E+32	0,000
Souche	Diametre	24,040	18	1,336	2,94498E+30	0,000
	T_I	2921343,227	18	162296,846	5,50328E+32	0,000
Erreur	Diametre	5,170E-29	114	4,535E-31		
	T_I	3,362E-26	114	2,949E-28		
Total	Diametre	659,520	171			
	T_I	9425411,637	171			
Total corrigé	Diametre	291,680	170			
	T_I	9033231,328	170			

Tableau 8 : Effet de milieu sur le diamètre.

Milieu	Sous-ensemble		
	1	2	3
PDA	,252632		
King B		1,163158	
CAA			2,984211
Sig.	1,000	1,000	1,000

Tableau 9 : Effet de milieu sur le taux d'inhibition.

Milieu	Sous-ensemble		
	1	2	3
PDA	2,971579		
CAA		35,103684	
King B			105,594737
Sig.	1,000	1,000	1,000

Tableau 11: effet des souches sur le taux de germination et l'indice de la vigueur

ANOVA à 1 facteur						
		Somme des carrés	Ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
TG	Inter-groupes	822,000	4	205,500	205,500	0,000
	Intra-groupes	10,000	10	1,000		
	Total	832,000	14			
IV	Inter-groupes	130507,569	4	32626,892	470,253	0,000
	Intra-groupes	693,816	10	69,382		
	Total	131201,385	14			

Tableau 12 : Effet des souches sur le taux de germination.

Test de Tukey

Souche	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
	1	2	3	4
BT7	64,00000			
Témoin		67,00000		
PI9		68,00000		
BB6			77,00000	
BB2				84,00000
Signification	1,000	,738	1,000	1,000

Tableau 13 : les résultats de bactérisation des semences de tomate.

Souches	Longueur moyenne des racines (cm)	Longueur moyenne des pousses (cm)	Taux de germination %	Indice de la vigueur
Témoin	4,16666667	3,84166667	66,66	533,8355
PI9	5,14285714	4,11428571	68,42	633,373714
BB2	4,07142857	4,635	71,42	669,5625
BT7	4,74	4,57857143	63,63	550,3995
BB6	1,91875	3,95	75	440,15625

Tableau 14 : Effet des souches sur l'indice de la vigueur.

Test de Tukey

Souche	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
	1	2	3	4	5
BB6	451,893750				
Témoin		536,558334			
BT7			596,388572		
PI9				629,485714	
BB2					731,340000
Signification	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

La courbe d'étalonnage de l'AIA : (Rabhi., 2012)

A partir d'une solution de l'AIA (10^{-3} M), les dilutions 2- 3- 4- 5- 10- 15- 20- 50- 100 sont effectuées . 1ml de chaque dilution préparée est mélangé à 2 ml de réactif de Salkowski. Après 30 min, la concentration de l'AIA est mesurée par spectrophotométrie à 530nm.

