

GREPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB DE BLIDA-1-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES ET AGROECOLOGIE



Mémoire fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme Master 2

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

THEME

**Caractérisation et criblage des *Pseudomonas*
spp. fluorescents bénéfiques isolées du
palmier dattier.**

Présenté par

LAHLAH Sabrina

CHEREF Malika

Soutenu devant le jury :

M^{me} AMMAD.F	M.C.A	USDB₁	Présidente
M^{me} BENOUSSAID.N	M.C.B	USDB₁	Promotrice
M^{me} BENKORTEBY.H	M.A.A	USDB₁	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2021/2022

Remerciements

Tous d'abord, nous remercions Allah le tout puissant pour nous avoir donné la santé et le courage et nous avoir guidé dans le bon chemin afin d'accomplir et de pouvoir présenter ce modeste travail.

On remercie les membres de jury, M^{me} AMMAD.F qui nous a fait l'honneur de le présider et M^{me} BENKORTEBY.H d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à notre promotrice M^{me} BENOUSSAID Nacera pour sa disponibilité et ses orientations.

Nos profonds remerciements à M^{me} SELMA. L'ingénieure et responsable de laboratoire de phytobactériologie pour son aide à réaliser ce travail.

Nos remerciements vont à tous nos enseignants.

Nous n'oublions pas de remercier les étudiants de notre promo 2021/2022 en biotechnologie microbienne.

Enfin, nous témoignons notre gratitude à toute personne qui a contribué de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

A mes parents

Qui ont toujours cru en moi

Qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras

A mon marie et ma deuxième famille

Qui m'ont poussé à continuer

**A mes chers frères, ma sœur et a tous les membres de ma
famille.**

**A ma copine et mon meilleur ami Sabrina pour son soutien et
son encouragement et tout ce qu'elle a fait pour moi.**

A mes amies sans exception

Pour leur soutien

A tous ceux qui ont contribué de près et de loin élaboration de ce travail.

Malika

A mes parents

Qui ont toujours cru en moi

Qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras

**A mes chers frères, mes sœurs et a tous les membres de ma
famille.**

Qui m'ont poussé à continuer

A mes amies sans exception

Pour leur soutien

A tous ceux qui ont contribué de près et de loin élaboration de ce travail.

Sabrina

Sommaire

I. Introduction	1
I. Généralité sur le palmier dattier	4
I.1.Taxonomie	5
I.2.Origine	5
I.3.Description morphologique	5
I.3.1.Les racines	5
I.3.2.Le tronc	6
I.3.3.Les palmes (les feuilles)	6
I.3.4.Le fruit (la datte)	6
I.4.Répartition géographique	7
I.4.1.Dans le monde	7
I.4.2. En Algérie	7
I.5. Importance économique du palmier dattier	8
I.6.Contrainte abiotiques du dattier	10
I.7.Agent causal et colonisation de l'arbre hôte	11
I.7.1.Les symptômes de la maladie du bayoud	12
I.7.2.La lutte biologique par utilisation des microorganismes	13
II. La rhizosphère et diversité de la flore microbienne du sol	14
II.1.Définition de la rhizosphère	14
II.2. Les rhizobactéries	15
II.3.PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)	15
II.3.1.Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère	16
II.3.2.Mécanismes impliqués dans l'activité des PGPR	16
II.3.3.PGPR en biotechnologie	17
III.<i>Pseudomonas spp.</i>Fluorescents bénéfiques	18
III.1.Caractérisation générale	18
III.2.Caractérisation métabolique	19
III.3.Caractérisation génotypique	19
III.4.Application des <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents	19
III.5.Mécanismes d'action	20
III.5.1.Actions directes	20

III.5.1.1.Induction de la résistance systémique (ISR)	20
III.5.1.2.Stimulation de la croissance	21
III.5.2.Action indirectes	21
III.5.2.1.Compétition trophique	21
III.5.2.2.L'antibiose	22
III.6.La résistance aux stress abiotiques	22
III.6.1.Effet de la salinité	23
III.6.2. Effet de stress hydrique	23
III.6.3.Effet de température	24
III.6.4.Effet du PH	24
III.6.5.La résistance aux antibiotiques	24
III.6.5.1.Résistance naturelle	24
III.6.5.2.Résistance acquise	24
Matériels et méthodes	
I. Matériels	26
I.1. Matériels non biologique	26
I.2.Matériels biologique	26
I.2.1.Le sol	26
I.2.2.Les souches fongiques	27
II. Méthodes	27
II.1. Isolement des bactéries à partir u sol	27
II.1.1.Purification des souches	28
II.1.2.conservation de souches	28
II.2.Identification et caractérisation	28
II.2.1.Caractérisation morphologique	28
II.2.2.Caractérisation physiologique et biochimique	28
II.3.Criblage des souches de pseudomonas spp. Fluorescents antagonistes	31
in vitro	
II.3.1.Purification des souches fongiques	31
II.3.2.Test de confrontation direct	32
II.4.Résistance des souches sélectionnées à quelques stress abiotiques	32
II.4.1.Effet du stress thermique et hydrique sur la croissance des souches	33
II.4.1.1.Stress thermique	33

II.4.1.2.Stress hydrique	33
II.4.2.Résistance au chlorure de sodium et aux antibiotiques	33
II.4.2.1.Résistance au chlorure de sodium	33
II.4.2.2.Résistance aux antibiotiques	34
III. Résultats et discussion	
III.1.Résultats de l'isolement et d'identification	36
III.1.1.Fréquence des souches isolées à partir du sol	36
III.1.2.Identification des souches <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	36
III.1.2.1.Caractérisation morphologiques	36
III.1.2.2.Test de la fluorescence	36
III.1.2.2.Identification biochimique et physiologique	37
III.2.Résultats de la sélection des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	41
III.3.Résultat de la résistance des souches sélectionnées à quelques stress abiotiques	45
III.3.1.Effet du stress thermique et hydrique sur la croissance des souches	45
Discussion	49
Conclusion	53
Les références bibliographiques	54
Annexe	

Listes des figures

Figure 01	Morphologie générale du palmier dattier	7
Figure 02	Distribution du genre phœnix	7
Figure 03	Distribution du palmier dattier en Algérie	9
Figure 04	Classement de dix plus grands producteurs de dattes au monde en tonnes	10
Figure 05	Evolution des superficies et production de la culture du palmier dattier	11
Figure 06	Premier symptôme typique de la maladie de bayoud	13
Figure 07	Schéma de la rhizosphère	15
Figure 08	Situation géographique de la région de Kenadsa	28
Figure 09	Etape de purification	30
Figure 10	Clé dichotomique d'identification des <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents proposé par Bossis.	31
Figure 11	La méthode en traits	32
Figure 12	Préparation des concentrations et les solutions d'antibiotiques.	35
Figure 13	Ensemencement de solution d'antibiotiques sur boîte de Pétri	35
Figure 14	La fréquence des souches fluorescentes et non fluorescentes isolées.	36
Figure 15	La fluorescence des isolats bactériens sous UV (350 nm)	37
Figure 16	Fréquence des souches Gram et Gram+.	37
Figure 17	Formation d'un filament mucoïde confirmant le Gram négatif par le test KOH.	37
Figure 18	Résultats du test catalase et d'oxydase	38
Figure 19	Résultats du test arginine et gélatinase oxydase.	38
Figure 20	Histogramme qui représente le taux d'inhibition des souches bactériennes dans le milieu PDA vis-à-vis des champignons <i>Foa</i> et <i>Fol</i> .	42
Figure 21	Activités antagonistes de KF5 contre <i>Foa</i>	43

Figure 22	Témoin <i>Foa</i> .	43
Figure 23	Activité antagoniste de KF4 avec <i>Foa</i>	43
Figure 24	Activité antagoniste de KF5 contre <i>Fol</i> .	43
Figure 25	Témoins <i>Fol</i> .	43
Figure 26	Histogramme qui représente les taux d'inhibition des souches bactériennes dans le milieu King B vis-à-vis de champignons <i>Foa</i> et <i>Fol</i> .	44
Figure 27	Activité antagoniste de KH4 avec <i>Foa</i> .	44
Figure 28	Témoin <i>Foa</i> .	44
Figure 29	Densité optique du stress hydrique.	45
Figure 30	Résultats de la résistance de quelques souches à la pénicilline.	46
Figure 31	Résistance et la sensibilité des souches au AF.	47
Figure 32	Résistance des souches à l'AZ	48

Liste des tableaux

Tableau 01	Caractéristiques des échantillons étudiés.	29
Tableau 02	Les caractères macroscopiques des 35 souches <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents isolées du palmier dattier.	Annexe4
Tableau 03	Quelques caractéristiques d'identification des souches <i>Pseudomonas spp</i> fluorescents isolées.	39
Tableau 04	Résultats de test d'activité antagoniste des souches vis-à-vis de <i>Foa</i> et <i>Fol</i> dans les deux milieux PDA et King B.	Annexe4
Tableau 05	Résultats du stress thermique.	Annexe4
Tableau 06	Résultats du stress hydrique.	Annexe4
Tableau 07	Résultats de la résistance au chlorure de sodium.	Annexe4
Tableau 08	Résultats du témoin (les souches sans antibiotique)	Annexe4
Tableau 09	Résultats de la résistance des souches à la pénicilline.	Annexe4
Tableau 10	Résultats de la résistance des souches au acide fusidique.	Annexe4
Tableau 11	Résultats de la résistance des souches à l'Aztreonam.	Annexe4
Tableau 12	Résultats du test d'antibiotique pénicilline (PEN).	Annexe4

Liste des abréviations

Fao:	<i>Fusarium oxysporum albedinis.</i>
Fol:	<i>Fusarium oxysporum lini.</i>
P:	<i>Pseudomonas.</i>
DAPG:	Diacetylphloroglucinol.
PCA:	Acide Phenazine Carboxilique.
PRN:	Pyrrrolnitrine.
PLT:	Pyoluteorine.
PGPB:	Plant Growth Promoting Bacteria
IAA:	Acide Indole Acétique.
HCN:	Cyanure D'hydrogène.
ISR:	Induction de la résistance systémique.
PGPR:	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.
KB:	King B.
PDA:	Potato Dextrose Agar.
MH:	Muller Hinton.
PEN :	Pénicilline.
AZ :	Aztreonam.
AF :	Acide Fusidique.

Résumé

Caractérisation et criblage des *Pseudomonas* spp fluorescents bénéfiques isolées du palmier dattier

Le présent travail a pour but d'isoler et sélectionner des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents à potentiel antagoniste et résistantes aux stress abiotique (salinité, température, stress hydrique, et la résistance aux antibiotiques). La sélection initiale sur la base de la production du pigment fluorescent sur milieu KB, a permis de retenir 35 isolats bactériens fluorescents isolés à partir de la rhizosphère de quatre variétés du palmier dattier (Hmira, Feggous, Hamriya, Tinaser) de la région de Bechar. Vingt-et-une souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents ont été sélectionnées sur trente-cinq après un processus d'identification. D'après les résultats d'identification (macroscopiques, microscopiques, biochimique), les souches ont été affiliées à l'espèce *Pseudomonas putida* ou au groupe intermédiaire de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*.

La sélection de ces souches par rapport à leurs activités antagoniste vis-à-vis de deux isolats de *Fusarium oxysporum* (*albedinis* et *lini*) par la technique de confrontation direct sur deux milieux KB et PDA, nous a permis d'obtenir six souches à fort pouvoir antagoniste. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur le milieu PDA par la souche KH13 avec des taux d'inhibition de la croissance mycélienne dépassant 55% vis-à-vis de deux isolats phytopathogènes. Les tests de la résistance au stress abiotique nous a permis de constater que la totalité de nos souches sont (100 %) résistantes aux concentrations de 0 M à 1M de Na Cl. Les résultats de la résistance au stress thermique montrent que toutes les souches ont pu reprendre une croissance normale à 30°C après un passage à la température de 42 ° C. Les résultats de stress hydrique montrent que toutes les souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents sont tolérantes au stress hydrique à différents concentrations de polyéthylène glycol (PEG) (0%,20%,40%,60%). Concernent la résistance aux antibiotiques 100 % des souches sont résistantes aux concentrations de 20 et 50 µg / ml des trois antibiotiques testés (Pénicilline, Acide Fusidique, Azeteronam). A la concentration de 100 µg / ml, les souches se sont avérées plus résistantes à la pénicilline et à l'Azeteronam par rapport à l'acide fusidique (85 %).

Mots clés : *Pseudomonas* spp. Fluorescents, stress biotique et abiotique, *Fusarium oxysporum*, PGPR, palmier dattier, activités antagonistes, rhizosphère.

Abstract

Characterization and Screening of Beneficial Fluorescent *Pseudomonas* spp isolated from date palm.

The present work aims to isolate and select strains of fluorescent *Pseudomonas* spp with antagonistic potential and resistant to abiotic stress (salinity, temperature, water stress, and resistance to antibiotics) The initial selection on the basis of the production of the pigment fluorescent on KB medium, made it possible to retain thirty-five fluorescent bacterial isolates isolated from the rhizosphere of four varieties of the date palm (Hmira, Feggous, Hamriya, Tinaser) from the Bechar region

Twenty-one strains of *Pseudomonas* spp. Fluorescents were selected out of thirty-five after an identification process. According to the identification results (macroscopic, microscopic, biochemical), the strains were affiliated to the species *Pseudomonas putida* or to the intermediate group of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*.

The selection of these strains by contribution to their antagonistic activities vis-à-vis two isolates of *Fusarium oxysporum* (*albedinis* and *lini*) by the technique of direct confrontation on two media KB and PDA, allowed us to obtain six strains with strong antagonistic power. The best results were obtained on the PDA medium with mycelial growth inhibition rates exceeding 55% with respect to two phytopathogenic isolates, strain KH13

The tests of resistance to abiotic stress allowed us to note that all of our strains are (100%) are resistant to concentrations of 0M to 1M of Na CL The results of resistance to thermal stress show that all strains were able to resume normal growth at 30°C after a temperature change of 42°C. The water stress results show that all strains of *Pseudomonas* spp. fluorescents are tolerant to water stress at different concentrations of polyethylene glycol (PEG) (0%, 20%, 40%, 60%). Regarding resistance to antibiotics 100% of the strains are resistant to concentrations of 20 and 50 µg/ml of the three antibiotics tested (penicillin, fusidic acid, and azeteronam). At the concentration of 100 µg/ml, the strains proved to be more resistant to penicillin and to Azeteronam compared to fusidic acid (85%)

Keywords: *Pseudomonas* spp. Fluorescents, biotic and abiotic stress, *Fusarium oxysporum*, PGPR, date palm, antagonistic activities, rhizosphere.

ملخص

توصيف و فحص الأنواع الزائفة الفلورية المعزولة عن النخلة الفلورية ذات الإمكانيات العدائية *Pseudomonas spp*

يهدف العمل الآتي إلى عزل و اختيار سلالات و مقاومة الإجهاد اللاأحيائي (الملوحة / درجة الحرارة / الإجهاد المائي/ و مقاومة المضادات الحيوية). الاختيار الأول جعل من الممكن الاحتفاظ ب 35 عزلة بكتيرية على أساس إنتاج الصبغة الفلورية على وسط KB متألقة معزولة من غلاف الجذور لأربعة أنواع من نخيل التمر (حميرة/فيجوس/حمرية و تيناسر) من منطقة بشار. تم اختيار 21 سلالة *Pseudomonas spp* من أصل 35 بعد عملية تحديد الهوية. و وفقا لنتائج التحديد (مجهرى و بيوكيميائى) كانت السلالات مرتبطة بالنوع *pseudomonas putida* أو المجموعة الوسيطة *pseudomonas fluorescens/pseudomonas putida*.

إن اختيار هذه السلالات من خلال المساهمة في أنشطتها العدائية مقابل اثنين من عزلات *Fusarium oxysporum(albedinis et lini)* سمح لنا من خلال تقنية المواجهة المباشرة على وسطين KB/PDA الحصول على 6 سلالات ذات قوة معادية قوية. تم الحصول على أفضل النتائج على وسط PDA عند السلالة KH13 مع معدلات لتثبيط نمو فطر تزيد عن 55 بالمائة ضد عزلتين ممرضتين للنبات. سمحت لنا اختبارات المقاومة للإجهاد اللاأحيائي أن نلاحظ أن جميع سلالاتنا 100 بالمائة مقاومة لتركيز من 0 إلى Na Cl من 1M. تظهر نتائج الإجهاد الحراري أن جميع السلالات قادرة لاستئناف النمو الطبيعي عند 30 درجة مئوية بعد تغيير درجة الحرارة بمقدار 42 درجة مئوية. تظهر نتائج الإجهاد المائي أن جميع السلالات الفلورية *Pseudomonas spp* تتحمل الإجهاد المائي بتركيزات مختلفة من البولي ايثيلين جلايكول (40/20/0 و 60 بالمائة). بخصوص مقاومة المضادات الحيوية 100 بالمائة من السلالات مقاومة لتركيزات 25 و 50 ميكروغرام/مل من المضادات) الحيوية الثلاثة المختبرة (البنسلين/ حمض الفوسيديك وازيترونام) أثبتت السلالات أنها أكثر مقاوم للبنسلين و الازيترونام بتركيز 100 ميكروغرام/مل مقارنة بحمض الفوسيديك.

الكلمات المفتاحية: PGPR/الجذور/ الأنشطة العدائية/ الإجهاد الحيوي و اللاأحيائي / نخيل التمر

Pseudomonas spp flurescents /Fusarium oxysporum



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Introduction

Le palmier dattier (*nix dactylifera L.*) est le pilier des écosystèmes oasiens. Il joue un rôle protecteur contre le rayonnement solaire intense pour les cultures sous-jacentes comme les arbres fruitiers, les cultures maraîchères et les céréales. En effet, par sa présence dans ces zones, les diverses formes de vies animales et végétales, indispensables pour le maintien et la survie des populations, sont possibles (**Bougedoura et al., 2010**). La production mondiale de dattes est estimée à près de 7.6 millions de tonnes répartis sur les cinq continents, mais les peuplements les plus importants se trouvent au Moyen-Orient et en Afrique du Nord (**Gros-Balthazard et al., 2013**). L'Algérie est un pays Phœnicicole classé au troisième rang mondial et au premier rang dans le Maghreb pour ses grandes étendues de culture avec 166900 hectares (**Sidabtech, 2017**).

La présence des agents phytopathogènes dans l'environnement tellurique peut causer des dommages sévères, qu'il s'agit des bactéries, champignons ou virus, les dégâts peuvent atteindre la destruction totale des cultures. Le Bayoud causé par *Fusarium oxysporum f.sp.albedinis*, est le pathogène majeur sur cette espèce fruitière, il représente une menace dans les régions productrices (**Benlarbi, 2019**). Actuellement, en Algérie, le Bayoud a atteint les régions de Ouargla, Oued Righ, le Souf et les Zibans, connues par l'omniprésence du cultivar Deglet Nour, réputé sensible à cette fusariose. L'ampleur de ce risque est accrue, ces dernières années, par l'orientation prononcée vers des plantations monovariétales basées sur ce cultivar (**Khene et al., 2015**). La lutte biologique par introduction des microorganismes antagonistes s'avère une voie très prometteuse dans le contrôle de plusieurs maladies de plantes d'origine tellurique (**Anitha et Andrés, 2011**).

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

Les rhizobactéries du groupe PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ont été utilisées pour lutter contre les maladies d'origine telluriques. Plusieurs études ont montré la capacité des PGPR d'améliorer la croissance des plantes et d'intervenir dans le biocontrôle des agents phytopathogènes telluriques (**Lemanceau, 1992**). En plus, ces rhizobactéries sont caractérisées par un arsenal métabolique, s'exprimant par la synthèse de divers métabolites secondaires impliqués dans les aspects trophiques. nutritionnels et de compétition avec les autres microorganismes (**Loper et al., 2011 ; Figueroa-Lopez et al., 2016**).

Une des particularités intéressantes des PGPR réside dans leur compétence rhizosphérique, qui correspond à leur capacité de colonisation de la rhizosphère, notamment

INTRODUCTION

sur les surfaces racinaires pendant une période considérable en présence ou non d'une microflore existante, la surface racinaire (rhizoplan) de leur hôte végétal où sont présentes des molécules exsudées par la plante (Sucres, acides aminés, acides organiques, vitamines et mucilage) nécessaires à leur développement (**Bais et al., 2006**). Les PGPR peuvent coloniser et se rencontrer au niveau de zones riches en ces macromolécules, principalement dans la zone d'émergence des racines secondaires, la zone pilifère, la zone d'élongation, l'apex racinaire et leurs portions de sols associés (**Humphris et al., 2005**).

Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants ou biopesticides offre un bon rendement et pourrait permettre de diminuer les apports d'engrais ou de pesticides chimiques, ainsi ces bactéries sont connues pour leur effet d'améliorer la santé et stimuler la croissance des plantes (**Rabhi, 2011**). Ces bactéries sont un bon outil de lutte biologique, car elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses grâce à leur activité antagoniste vis - à - vis des phytopathogènes par la production des métabolites secondaires à effet antimicrobien (lyse cellulaire, arrêt de pouvoir oxydant ... etc) (**Rai, 2017**).

La croissance des plantes est fortement influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Les microorganismes présents librement dans la rhizosphère peuvent avoir des effets bénéfiques sur la croissance de la plante en influençant la disponibilité des éléments nutritifs et sa protection contre les agressions biotiques et abiotiques (**Vander Heijden et al., 2008**).

Plusieurs paramètres biotiques et abiotiques interviennent pour modeler la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère tant en termes de diversité que d'effectifs (**Marschner et al., 2001**). Plusieurs études, ont permis d'identifier certains facteurs présentant une influence marquée sur la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère (Température, salinité, humidité et antibiotiques).

Dans ce sens, notre travail se propose sur l'isolement, caractérisation et criblage des *Pseudomonas spp* fluorescents bénéfiques isolées du palmier dattier.

Les objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont :

- Isolement et identification des souches isolées du palmier dattier.
- Criblage des souches de *Pseudomonas spp* fluorescents antagonistes in vitro.
- Etude de la résistance des souches *Pseudomonas spp* fluorescents aux stress abiotiques.



Chapitre I
Synthèse bibliographique

I. Généralité sur le palmier dattier

Le palmier dattier est une plante d'intérêt écologique, économique et social majeure pour de nombreux pays des zones arides qui comptent parmi les plus pauvres du globe. Cette plante est la troisième plus importante espèce de palmiers (après le cocotier et le palmier à huile) dans les industries agro-alimentaires en général (**Gómez Vidal et al., 2009**).

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L. ; $2n=36$), est une monocotylédonne pérenne dioïque qui se propage végétativement la plante mère. La propagation par noyaux est utilisée dans les projets d'amélioration et l'ornement vu que la pollinisation croisée, naturelle ou effectuée par l'homme, donne de nouveaux génotypes avec des caractéristiques non connues (**Al-Khayri, 2005; Rhouma et al., 2010 ; El-Hadrami et al., 2011**).

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est l'une des plus importantes cultures fruitières des régions arides et désertiques du Moyen-Orient, du sud d'Asie et de l'Afrique du Nord où les conditions agro-écologiques sont favorables à son développement. Au cours des trois derniers siècles, les dattes ont également été introduites dans de nouvelles zones de production en Australie, en Inde, en Pakistan, au Mexique, en Afrique australe, en Amérique du Sud et aux États-Unis (**Tchao et Krueger, 2007**).

Outre la classification en fonction des caractéristiques du fruit, par cultivar (dont le comportement est variable lorsqu'ils sont plantés en dehors de leur zone de culture traditionnelle) ou variété (liée essentiellement au phénotype en particulier les caractéristiques des fruits et désigne les pieds femelles) deux autres groupes de désignations de fruits pondérants sont généralement utilisés: la consistance (molle, demi-molle ou sèche) et le temps de maturation (précoce, de saison et tardif) (**Johnson, 2011**).

I.1. Taxonomie

Le palmier dattier est une plante angiosperme, monocotylédone, classé selon (**Dransfield et al., 2008**) dans:

Ordre : Arecales.

Famille : Arecaceae.

Sou-famille : Coryphoideae.

Tribu : Pheoniceae.

Genre : *Phoenix*.

Espèce : *P.dactylifera*.

I.2. Origine du palmier dattier

Le palmier dattier a une origine ancienne. Il est connu depuis l'antique : considéré par les Egyptiens comme un symbole de fertilité, il est représenté par les carthaginois sur les pièces de monnaies et monuments, et utilisé par les grecs et les latins comme ornement lors des célébrations triomphales (**Ouennoughi, 2004**). Originaire d'Afrique du Nord, le palmier dattier est abondamment cultivé de l'Arabie au Golfe Persique, où il forme la végétation caractéristique des oasis. Il est cultivé en outre aux Canaries, dans la Méditerranée septentrionale et dans la partie méridionale des Etats-Unis (**Benoit, 2005**).

I.3. Description morphologique

I.3.1. Les racines

Le système racinaire du palmier dattier à une profondeur de 8 à 10 m, il peut s'étendre latéralement plus de 7m du type fasciculé (**Elhoumaizi, 2002**).

Munier (1973) et Peyron (2000), subdivisent le système racinaire en quatre types en fonction des zones de profondeur dans le sol :

Les racines respiratoires : 0 à 20 cm.

Les racines de nutrition : 20 à 100cm.

Les racines d'absorption : 100 à 200 cm.

Les racines d'absorption de profondeur : plus de 200cm.

I.3.2. Le tronc (le stipe)

Le palmier dattier, en tant que Monocotylédones, ne s'accroît pas par genèse de tissus secondaires. Le tronc, perpétuellement en structure primaire quels que soient son âge et sa taille, est appelé stipe mais pas tronc comme la tige des Dicotylédones. Le stipe est généralement cylindrique sans ramification. Certains cultivars peuvent cependant avoir une forme tronconique. L'élongation du dattier se fait dans sa partie coronale par le bourgeon terminal ou phyllophore. Le tronc des jeunes palmiers est recouvert par les bases des pétioles des anciennes palmes mortes depuis 10-20 ans (**Bouna, 2002**).

I.3.3. Les palmes (les feuilles)

L'ensemble des palmes vertes forme la couronne du palmier. On dénombre de 50 à 200 palmes chez un arbre adulte (**Peyron, 2000**). Les palmes peuvent atteindre une longueur de 6m (**Khenfar, 2004**) et vivent de 3 à 7 ans, selon les variétés et le mode de culture. Elles

sont émises par le bourgeon terminal ou « Phyllophore » (**Peyron, 2000**).

Au cours de sa vie, un dattier issu de semis produit trois sortes de feuilles : juvéniles, semi-juvéniles et adultes (**Elhoumaizi, 2002**)

I.3.4. Le fruit (La datte)

Est une baie contenant un noyau (une graine) et peut avoir de différentes formes (**IPGRI, 2005**). La datte devient consommable, lorsque les conditions favorables sont réunies, en passant par plusieurs étapes de développement caractérisées par des changements assez remarquables (couleur, taille, poids, composition). Le rapport entre le poids du noyau et le poids de la datte permet d'apprécier sa qualité commerciale.

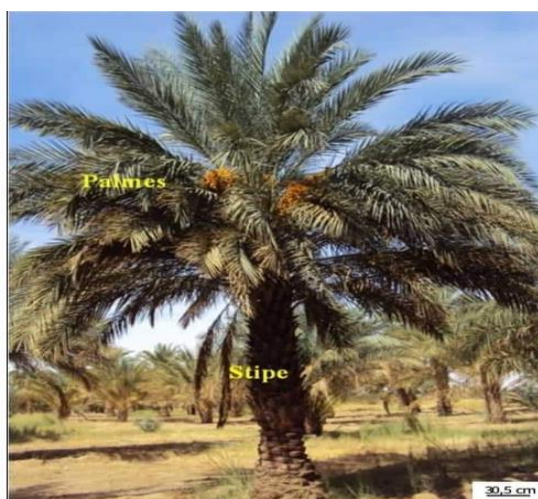


Figure 01 : Morphologie générale du palmier dattier (**Oasis de Zibans, Biskra, Selmani, 2012**).

I.4. Répartition géographique

I.4.1. Dans le monde

L'aire de production du palmier-dattier est principalement localisée dans les régions arides du nord de l'Afrique (Egypte, Algérie, Libye, Maroc, Tunisie, Soudan) et du sud-ouest de l'Asie (Iran, Arabie Saoudite, Iraq, Pakistan, Emirats Arabes Unis, Oman, Yémen, Qatar, Bahreïn, Jordanie) (**Benlarbi, 2019**) (Figure 2).

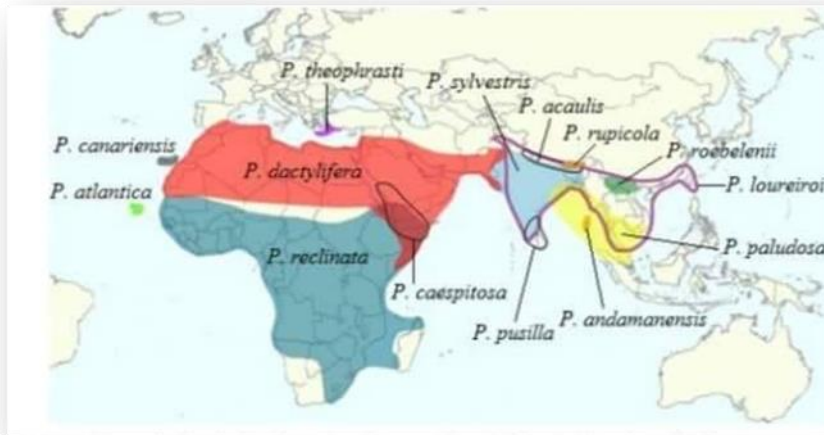


Figure 02 : Distribution du genre *phoenix* (Gros et al., 2013)

La production mondiale de dattes varie autour de 7 millions de tonnes par année, elle a plus que doublé depuis les années 1980. Ce qui place la datte au 5ème rang de fruits les plus produits dans les régions arides et semi-arides, après les agrumes, la mangue, la banane et l'ananas (Planet, 2012). L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche. Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (Mattalah, 2004). Les zones les plus favorables sont représentées principalement par le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, l'Egypte et l'Irak (Gros et al., 2013).

I.4.2. En Algérie

la culture du dattier est localisée dans les oasis situées au nord du Sahara, elle s'étend sous l'Atlas saharien, de l'Est depuis la frontière « Tuniso - Libyenne », à l'Ouest maroc «< frontière » > . Du Nord au Sud du pays, elle s'étend depuis la limite sud de l'Atlas saharien jusqu'à Djanet à l'est, Tamanrasset au centre, Regane à l'ouest, occupe une superficie de 167 de l'Agriculture et du Développement Rural, 2015) avec une production de 934377 tonnes de dattes (FAOSTAT, 2014).

Les principales régions phoenicoles sont localisées dans 9 wilayas sahariennes (Adrar, Bechar, Biskra, El Oued, Illizi, Ghardaïa, Ouargla, Tamanrasset et Tindouf) et 4 wilayas sub-sahariennes, (Tégébeat et al. 1998). Les trois quart du territoire phoenicole se localisent au Nord Est du Sahara algérien (Zibans, Oued Righ, cuvette de Ouargla) (Babahani, 2011) (figure03).

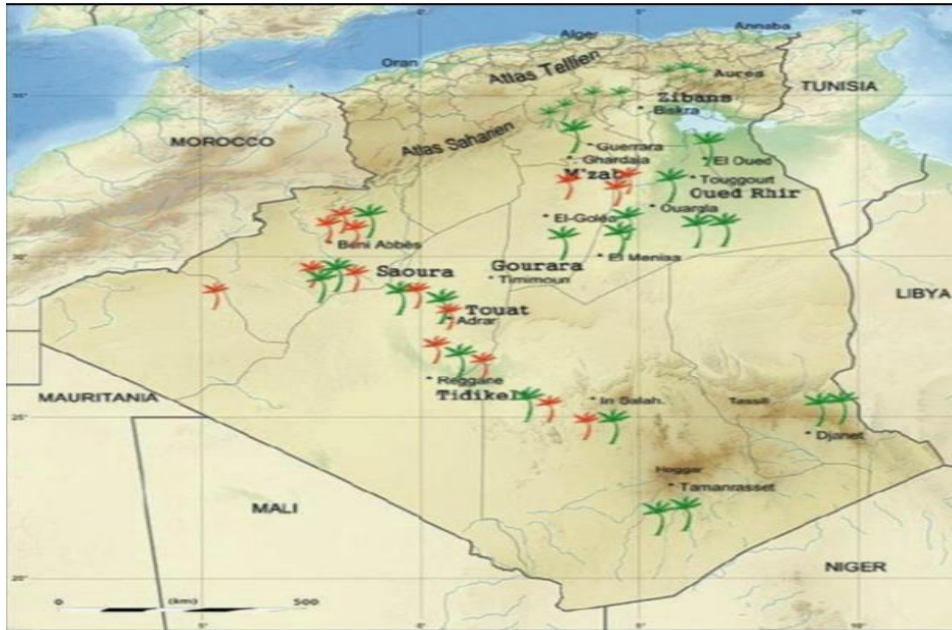


Figure 03:Distribution du palmier dattier en Algérie (**Bouguedoura et al., 2015**).

I.5. Importance économique du palmier dattier

Dans le monde, 800 000 ha seraient dédiés à la culture du dattier (**Elhoumaizi et al., 2002**) et le nombre de dattiers dans le monde est évalué à environ 100 millions (**Zaid, 2002**), effectif qui augmente chaque année (**FAOSTAT, 2020**).

A l'échelle mondiale, la superficie qu'occupe la culture du palmier dattier est passée de 7570764 ha en 1994 à 10353 159 ha en 2016, parallèlement et pour la même période, la production a augmenté de 4 569 532 tonnes à 8 460 443 tonnes (**FAOSTAT, 2018**).L'Algérie occupe la troisième place, après l'Egypte et l'Iran, en termes de production avec 1029596 tonnes (**FAOSTAT, 2018**)(figure 04).

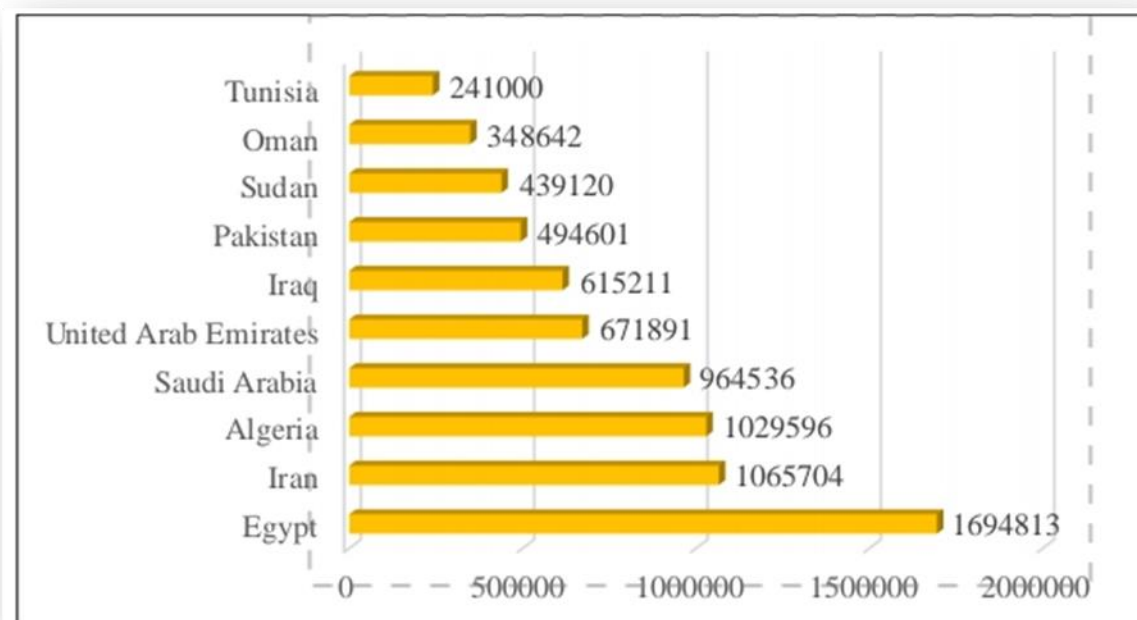


Figure 04: Classement des dix plus grands producteurs de dattes au monde en tonnes (FAOSTAT, 2018).

La plus grande aire de production de dattes en Algérie est située dans le Sud-est où se trouve Biskra. A l'échelle nationale, Biskra produit 4284890 tonnes soit 41.61% de la production nationale, couvre 43105 ha ce qui représente 27.7% de la superficie globale destinée à la culture du dattier du pays et contient 4336358 palmiers soit 23.2% du nombre total de pieds (figure 05). En termes d'exportation des dattes algériennes, un accroissement de 37% a été observé dans la période comprise entre 1961-2017. En 2016, la quantité exportée a été de 31109 tonnes rapportant au pays 37502 000 US\$ (FAOSTAT, 2018) (figure 05).

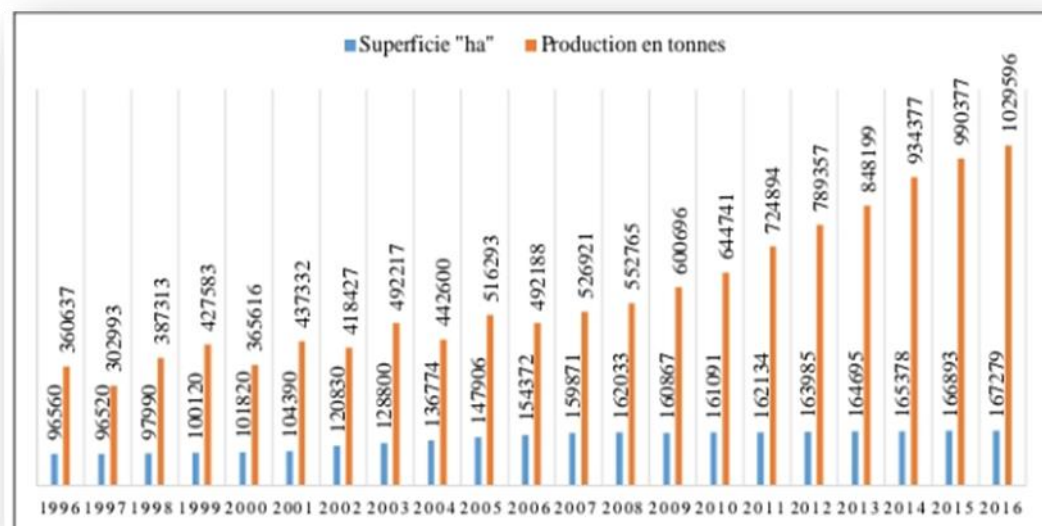


Figure 05 : Evolution des superficies et production de la culture du palmier dattier en Algérie (1996-2016) (FAOSTAT, 2018)

I.6. Contraintes abiotiques du palmier dattier

La désertification correspond à la dégradation des terres en zones arides, semi-arides et subhumides sèches, résultant de divers facteurs notamment, le changement climatique et l'activité humaine. Il y a une relation étroite entre la désertification, la sécheresse et la salinité. En termes de conditions de l'environnement, les zones arides sont caractérisées par des précipitations faibles, peu fréquentes, irrégulières et imprévisibles, de grandes variations entre les températures du jour et de la nuit, des sols contenant peu de matière organique et présentant un manque d'eau (Yukie et al., 2011).

Il existe plusieurs conséquences graves liées à la désertification sur les terres irriguées où l'eau provenant des réservoirs souterrains est souvent polluée. Aussi, l'évaporation transporte les sels minéraux à la surface du sol entraînant ainsi une salinité élevée, ce qui le rend inapproprié aux récoltes ne supportant pas des concentrations élevées en sel (Yukie et al., 2011).

La salinité des sols constitue un facteur limitant en agriculture, car elle inhibe la germination et le développement de la plante avec un impact sur son comportement biochimique (Hopkine, 2003).

En effet, à partir d'une certaine concentration en sels, la pression osmotique de la plante est égale à la pression osmotique du milieu, celle-ci ne pourra plus puiser l'eau, elle va se faner et se dessécher. Le temps qui s'écoule entre le moment où la plante ne puise plus l'eau et celui où elle se fane, constitue son état de résistance à la sécheresse (**Hopkine, 2003**).

La salinité accentue les effets de la sécheresse en limitant les prélèvements de l'eau par la plante, par la réduction de la différence des potentiels osmotiques entre la solution du sol et la plante. Par conséquent, l'énergie biologique des plantes utilisée dans la production de la biomasse va être consommée pour extraire l'eau de la solution saline du sol (**Daddi Bouhoun, 2010**). Ainsi, le plus grave problème causé par l'irrigation s'accroît et contribue à l'accumulation des sels dans les couches supérieures du sol, ce qui retarde ou empêche le développement du palmier dattier. Par ailleurs, dans le cas où les eaux phréatiques salées sont proches du niveau des racines, ces dernières puisent l'eau salée, ce qui diminue la croissance et le rendement du palmier dattier (**Daddi Bouhoun, 2013**).

I.7. fusariose vasculaire du palmier dattier

Depuis plus d'un siècle, un champignon tellurique, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (*Foa*) peut être en provenance du Maroc (**Boussalah et al., 2013**) constitue une grave menace pour les palmeraies de l'Afrique du Nord (Abohatem et al., 2011 ; Mechta et al., 2015). Il est l'agent de la maladie dite fusariose vasculaire ou Bayoud qui sévit actuellement au Maroc, au Sud et Sud-ouest Algérien (**Siala et al., 2016**) et constitue une menace sérieuse pour les plantations de palmier d'autres pays tels que la Mauritanie et l'Argentine (**Sedra et Zhar, 2010**).

Le *Foa* figure sur la liste des organismes de quarantaines, seul l'abattage du palmier infecté et leur incinération permet de lutter actuellement contre la propagation de l'infection. Face à une alarme croissante et devant l'état sanitaire de plus en plus dégradé des palmeraies, des recherches ont été entreprises pour la mise au point d'une méthode de lutte permettant de mieux cerner l'étendue des contaminations et d'éviter l'abattage (**Ait Kettout et Rahmania, 2013**).

I.7.1. Agent causal et colonisation de l'arbre hôte

L'organisme causal est un champignon microscopique qui appartient à la mycoflore du sol nommé *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (*Foa*) (**Sghir et al., 2015**), appartenant au phylum des Ascomycètes (champignon imparfait). Ces formes imparfaites sont caractérisées

par un mycélium septe et des conidies généralement unicellulaires situées sur des conidiphores : elles sont classées dans le groupe des Moniliales (**Lepoivre, 2003**).

La maladie affecte les différents stades de croissance du palmier dattier, en attaquant aussi bien les palmiers matures que les plus jeunes et même les rejets. Le Foa est très inégalement réparti dans le sol, il a été isolé entre 0 et 30 cm de profondeur dans les sols des palmeraies infectées mais parfois il peut descendre jusqu'à 1 m (**Sghir et al., 2016**).

La première phase est un contact entre le palmier dattier et le pathogène comprenant l'adhésion et la reconnaissance de surface, puis une deuxième phase consiste à la pénétration par les racines en cheminant la sève brute avec l'apparition des symptômes des maladies et enfin, quand des mycéliums envahissent le bourgeon terminal du palmier, provoquant la mort de cette dernière (**El Modafar, 2010**).

I.7.2. Les symptômes de la maladie du Bayoud

Les palmiers dattiers de tout âge peuvent être affectés, le premier symptôme externe de Bayoud s'observe sur les folioles ou les épines situées d'un côté d'une palme de la couronne moyenne, ces folioles se dessèchent progressivement et prennent une couleur blanchâtre (figure 06), selon un processus très particulier (symptômes typiques) du bas vers le haut jusqu'au sommet de cette palme. Après qu'un côté a été affecté, le blanchiment commence de l'autre côté, progressant cette fois dans la direction opposée du haut de la palme vers la base en sens inverse (**Benzohra et al., 2015**). Le Foa est également très prolifique soit par le repiquage de rejets apparemment sains, soit par l'irrigation, soit par les vents de sables qui peuvent transporter des éléments végétaux (**Bounaga et Djerbi, 2009**).



Figure 06: Premiers symptômes typiques de la maladie de Bayoud (**Boucenna et al., 2018**).

I.7.3. Lutte biologique par utilisation de microorganismes

L'utilisation de microorganismes fait partie des alternatives prometteuses à l'emploi des fongicides, de par l'ubiquité de ces microorganismes, leur grande diversité et leur dissémination dans les sols rhizosphériques (**Berg et al., 2005**) .

L'existence de sols suppressifs empêchant le développement de la maladie du Bayoud a été attribuée aux microorganismes antagonistes du *F.o.a*, notamment les genres *Pseudomonas*, *Bacillus* ou des champignons du genre *Aspergillus* et *Penicillium* (**Chakroune et al., 2008**) . Il a été montré que l'inoculation des racines de palmier dattier par des souches hypo agressives de *F.o.a* (**El Hassni et al., 2004**) ou leur mycorhization, améliore la résistance du palmier contre son pathogène (**Jaiti et al., 2008**) .

Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies d'origine tellurique, les *Pseudomonas spp.* Fluorescents (**Armstrong, 1981 et Benchabane, 2005**), Les rhizobactéries du groupe *Pseudomonas spp.* Fluorescents ont été largement utilisées dans le biocontrôle des pathologies végétales d'origine tellurique. Plusieurs souches de ce groupe bactérien ont été expérimentées avec succès contre de nombreuses formes spéciales de ce pathogène (**Benchabane et al., 2011**) . Elles exercent leur activité antagoniste au moyen de différents mécanismes incluant l'antibiose. Chez les *Pseudomonas*, l'antibiose implique plusieurs molécules antifongiques telles que la phenazine, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le 2,4 - diacétylphloroglucinol, pour ne citer que les plus importantes (**Haas et Defago, 2005**).

II. La rhizosphère et diversité de la flore microbienne du sol

II.1. Définition de la rhizosphère

C'est un micro écosystème abritant les microorganismes qui sont constitués principalement d'algues microscopiques, de protozoaires, de champignons et de bactéries ; certains groupes sont phytopathogènes d'autres sont bénéfiques à la plante (**Raaijmakers, 2009**).

La rhizosphère est la région de sol étroite adjacente au système racinaire de la plante C'est une zone très complexe et riche en nutriments, fortement peuplée par un grand nombre de microorganismes comprenant des bactéries, des champignons, invertébrés, nématodes et protistes (**Venturi et Keel, 2016**).

La rhizosphère se décompose en trois zones : l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'exorhizosphère (sol adhérent aux racines c'est - à - dire sol rhizosphérique) (**Lynch et Whipps, 1990 ; Hamza et al., 2018**). Les différents processus vitaux des micro-organismes du sol peuvent être des étapes très importantes dans les phénomènes d'assimilation par les plantes des macroéléments tels que l'azote (N), le phosphore (P) potassium, le fer (Fe) et le zinc (Zn) (**Bonkowski et al., 2001**). En plus des relations trophiques, les micro-organismes peuvent être impliqués dans la défense des plantes par la libération dans la rhizosphère de substances toxiques aux agents telluriques phytopathogènes (**Bais et al., 2004**) (figure07).

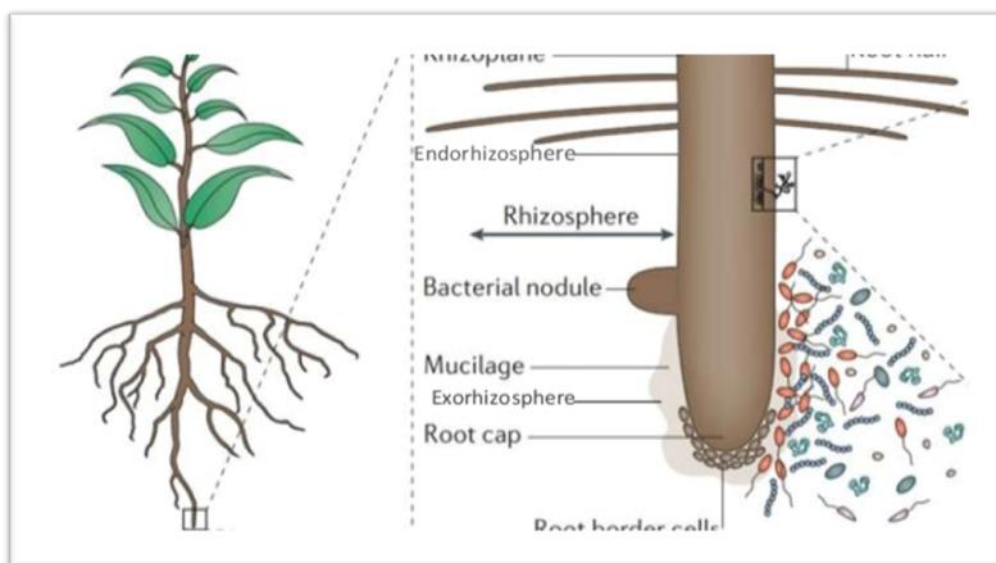


Figure 07:Schéma de la rhizosphère (**Philippot et al., 2013**)

II.2. Les rhizobactéries

Les rhizobactéries colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs. A la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (**Vacheron et al., 2013**). Par leur action enzymatique, elles solubilisent les éléments nutritifs présents dans les réserves organiques et minérales du sol tels que : le phosphate, l'azote et le fer, et les mettent à la disposition de la plante sous forme d'ions minéraux assimilables à des taux qui corresponde à ses besoins, et ce, aux différents stades de sa croissance. Les ions métalliques sont absorbés par les poils absorbants des racines, se marient au glucose qui remonte vers les organes aériens pour former de nouvelles cellules (**Gagnon, 2015**)

Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux. Elles peuvent induire la croissance des plantes par la promotion directe ou indirecte (**Verma et al., 2010**).

II.3. Les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)

Les PGPR ou «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » sont des bactéries qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont un effet positif sur la plante, pour ces effets on les considère comme rhizobactéries promotrice de la croissance végétale (**Dey et al., 2004 ; Herman et al., 2008**).

La plupart des souches bactériennes exploitées en tant que PGPR appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries car elles sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle de la croissance des plantes et des maladies liées au sol (**Adam, 2008**).

II.3.1. Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère

Les bactéries *Diazotrophes* (les bactéries libres fixatrices d'azote) sont préalablement utilisées pour la stimulation de la croissance des plantes. *Azoarcus* est une bactérie endophyte du riz et est considérée comme un modèle de bactéries endophytes fixatrices d'azote (**Ahmad et al., 2008**). Encore, les espèces d'*Azospirillum* initialement sélectionnées pour leur capacité fixatrice de l'azote atmosphérique représentent un bon candidat PGPR (**Antoun et Prévost, 2005**).

Les *Rhizobia* contribuent considérablement à l'amélioration de la disponibilité des phosphates pour la plante par mobilisation de formes organiques et inorganiques. Les *Bacillus* formant des endospores, qui leurs permettent de survivre des longues périodes dans des conditions environnementales défavorables (**Genin et Boucher, 2004**). *Azotobacter paspali* affecte positivement la germination des graines et leur développement. Les *Pseudomonas* et les *Pseudomonas* fluorescentes sont des bactéries ubiquistes, rencontrées souvent dans les sols, classés comme étant les meilleurs candidats PGPR (**Saharan et Nohra, 2011**).

II.3.2. Mécanismes impliqués dans l'activité des PGPR

Les microorganismes présentant des mécanismes qui facilitent l'assimilation des nutriments, et l'augmentation de la disponibilité des nutriments et la stimulation de la croissance des plantes sont considérés comme étant des biofertilisateurs. Ces derniers sont des compléments de fertilisants chimiques largement utilisés dans les systèmes agricoles pour l'amélioration de la production. Certains PGPR fixent l'azote atmosphérique, solubilisent les minéraux et minéralisent les composés organiques (**Martinez et al., 2010**).

La carence en phosphore dans les sols est une contrainte majeure qui limite la croissance des plantes due à sa faible solubilité. Les plantes absorbent les formes inorganiques de phosphore qui contribuent à leurs croissances et à leurs développement à un taux égal à 0.2% du poids sec de la plante (**Perasanna et al., 2011**). Les microorganismes bénéfiques solubilisant le phosphore convertissent les formes insolubles en formes directement assimilable par les plantes lors de sécrétion d'acides organiques qui diminuent considérablement la valeur du pH de la rhizosphère et entraîne la dissociation des liaisons dans les composés phosphorés insolubles tels que le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, contenu dans les sols calcaires (**Afzal et Bano, 2009**).

La production des phytohormones par les PGPR est un mécanisme essentiel, auquel plusieurs rhizobactéries approuvent la croissance des plantes (**Spaepen et al., 2007**). Les PGPR influencent positivement la croissance des plantes par la régulation des taux de l'éthylène produit chez les plantes dans des conditions de stress, conduisant à l'inhibition du développement des racines et une sénescence prématurée (**Li et al., 2005**).

La stratégie usuelle appliquée pour le contrôle des phytopathogènes est l'utilisation des pesticides chimiques qui peuvent causer des cancers chez les consommateurs ainsi que la pollution de l'environnement entraînant avec le temps une résistance des agents pathogènes aux

composés chimiques nécessitant ainsi le développement de nouveaux pesticides (**Fernando et al., 2006**)

II.3.3. les PGPR en biotechnologie

Utilisées comme outils pour améliorer la croissance des plantes, les PGPR ont plusieurs avantages pratiques elles sont répandues sur les sept continents, ils ne sont pas limités phylogénétiquement (au moins cinq phyla et 24 genres), et la plupart d'entre elles présentent une faible spécificité à l'hôte (**Rubin et al., 2017**). Les PGPR sont classées en fonction de leurs activités fonctionnelles (**Antoun et Prévost, 2005**) en:

- Biofertilisants** : en augmentant la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère.
- Phytestimulants**: par la promotion de la croissance des plantes généralement par les Phytohormones.
- Agents de biocontrôle et de bioremédiation** : en dégradant les polluants organiques et en Luttant contre les maladies et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques principalement par la production d'antibiotiques et de métabolites antifongiques et des facteurs abiotiques (**Ahemad et Kibret, 2013 ; Ngumbi et Kloepper, 2016**).

III *Pseudomonas* spp. Fluorescents bénéfiques

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonaceae, ordre des Pseudomonales (Migula, 1894 ; Moore et al., 2006).

Les différentes espèces de *Pseudomonas* sont divisées en cinq groupes selon leur ARNr. Le sous-groupe des *Pseudomonas* fluorescents, appartenant au premier groupe génomique, est certainement le plus étudié. La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine (Gao et al., 2012 ; Trögl et al., 2012). La plupart étant saprophytes (Bossis et al., 2000), principalement l'espèce *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. chlororaphis* (Höfte et Altier, 2010), sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaire, quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi et al., 2001).

III.1. Caractéristiques générales

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescentes sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5µm de long, asporulées (Bell et Lynch, 2002), fermentant le glucose mais pas le lactose, oxydase positive en forme de bâtonnet avec des flagelles polaires qui lui assurent la mobilité. Elles sont ubiquitaires rencontrées dans les sols, sur les racines des végétaux, sur les plantes, ainsi que dans les eaux douces et marines (Charan et al., 2011). Ce sont des aérobies obligatoires, à l'exception de certaines qui peuvent utiliser le NO₃⁻ comme accepteur d'électrons. Elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe oxydatif (Moore et al., 2006).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). 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).

III.2. Caractéristiques métaboliques

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

En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (Euzéby, 2008).

La plupart étant saprophytes, l'aptitude de certains isolats à dégrader des substances xénobiotiques a également retenu l'attention de différents chercheurs (Bossis et al., 2000).

III.3. Caractérisation génotypique

Le genre *Pseudomonas* englobe un groupe des bactéries très diversifié et représente un degré remarquable de capacité d'adaptation physiologique et génétique (Spiers et al., 2000). Le génome de *Pseudomonas* varie de taille entre 6 et 7 Mpb par rapport à plus d'une centaine de génomes bactériens séquencés, seulement une partie d'entre eux sont plus grands que les génomes de *Pseudomonas* (Jensen et al., 2004). Le pourcentage G + C compris entre 58 et 70 (Meliani, 2012). L'espèce *P. fluorescens* compte parmi les espèces qui présentent une forte hétérogénéité phénotypique et génotypique. En 2000, Bossis et al., ont rassemblé des informations concernant les différentes études taxonomiques entreprises au sein de l'espèce *P. fluorescens*. L'espèce comprend maintenant 7 biovars, dont l'appartenance repose sur l'assimilation de différents éléments carbonés, l'utilisation de clé dichotomique ainsi que le sidérotypage permettent de déterminer avec précision l'appartenance d'une souche bactérienne à un biovar donné.

III.4. Applications des *Pseudomonas* fluorescentes

De plus qu'elle est utilisée en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (Ongena et al., 2005 ; Anita et al., 2012 et Gao et al., 2012), *Pseudomonas* fluorescent a plusieurs d'autres applications. Elle est

également utilisée comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de *Jatropha* pour la production de biodiesel (Devanesan et al., 2007).

Pseudomonas fluorescens joue aussi un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (Moneke et al., 2010). Elle est actuellement étudiée en médecine car elle produit un antibiotique particulier (mupirocine) qui a prouvé son efficacité dans le traitement de certaines maladies de la peau, des troubles oculaires et auditifs (Mazereeuw, 2006).

III.5. Mécanismes d'action

Les modes d'action de *Pseudomonas fluorescens* dans la suppression des maladies des plantes sont multiples incluant la production de sidérophores (molécules de faibles poids moléculaires ayant une très forte affinité pour l'ion Fe^{3+}) pour la compétition du fer disponible, l'antibiose, et le Système de Résistance Induit (ISR) (Ongena et al., 2005). La grande variété des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas. spp* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires, habituellement, solubilisation de phosphate, acide indole acétique (IAA), ammoniac, cyanure d'hydrogène (HCN) et production des enzymes dégradant les parois cellulaires impliquée dans la suppression de l'agent pathogène comme la cellulase, la pectinase, la chitinase et la protéase (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Van Loon, 2007).

Dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques agissant directement sur l'agent pathogène (Charde et al., 2010).

III.5.1. Action directes

III.5.1.1. Induction de la résistance systémique (ISR)

La colonisation des plantes par les *Pseudomonas spp.* fluorescent peut conduire à une réaction d'immunisation permet à la plante une protection contre l'agent pathogènes. Cette «immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (Jourdan et al., 2008).

L'ISR est généré en réponse à un stimulus externe qui fournit aux plantes une capacité immunitaire défensive. Les mécanismes des ISR incluent : (1) la promotion de croissance, (2) la tolérance physiologique, (3) induction du renforcement des parois cellulaires, et (4) augmentation de la production de phytoalexines, enzymes de défense, antioxydants, proline,

protéines apparentées à la pathogénèse, dépôt de lignine et modulation des phénols aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Jain et al., 2012 ; Singh et al., 2014**).

III.5.1.2. Stimulation de la croissance

Certaines souches de genres *Pseudomonas*, ont été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (**Orhan et al., 2006**).

Les *Pseudomonas* fluorescents peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes tels que la fixation d'azote (N₂) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P) (**Cakmakci et al., 2006 ; Orhan et al., 2006**), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines (**Dobbelaere et al., 2003**), et en diminuant la toxicité des métaux lourds (**Burd et al., 1998 ; Whipps, 2001**).

La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (**Kim et al., 1998 ; Richardson, 2001**).

Les espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents comme *P. chlororaphis*, *P. putida* et *P. aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (**Cattelan et al., 1999 ; Bano et Musarat, 2003**).

Les *Pseudomonas* fluorescents sont connus pour produire des phytohormones comme l'acide indole-acétique (IAA), les cytokinines, les gibbérellines et les inhibiteurs de la production d'éthylène, ce qui peut augmenter la surface absorbante des racines des plantes pour absorber l'eau et les nutriments (**Nihorimbere et al., 2011**). Les espèces apparentées à *Pseudomonas* fluorescent peuvent influencer directement l'état physiologique et nutritionnel de la plante qu'elles colonisent avec l'activité d'ACC désaminase (**Blahe et al., 2006**).

III.5.2. Actions indirectes

III.5.2.1. Compétition trophique

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (**Reyes et al., 2004**).

Les rhizobactéries à croissance rapide tel que les *Pseudomonas* fluorescents pourraient éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie.

Pseudomonas fluorescent doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre et al., 2004).

Le fer est un micronutriment essentiel pour la majorité des organismes de la biosphère. Dans les sols, le fer est disponible souvent sous forme insoluble (ion ferrique ou Fe^{+3}). Les microorganismes ont développé des mécanismes pour l'assimilation du fer, y compris la production des molécules appelées sidérophores qui sont des molécules chélatrices du fer, ces derniers fixent le fer ferrique (Fe^{+3}) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe^{+2}). Les sidérophores sont impliquées à la fois par voie directe (la plante utilise le fer comme nutriment) et par voie indirecte (par compétition) (Gupta et al., 2015).

III.5.2.2.L'antibiose

L'antibiose c'est une interaction biologique dont l'un des aspects est l'antagonisme contre les phytopathogènes et la compétition pour les nutriments (Parray et al., 2015). 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 sont de différentes natures comme des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, des composés phénoliques, etc... (Fernando et coll., 2006).

La production d'antibiotiques est considérée comme un des mécanismes de lutte biologique les plus puissants contre les phytopathogènes les plus étudiés chez les plantes. Certaines souches sont capables de produire un antibiotique de nature volatile connu sous le nom de cyanhydrique d'hydrogène (HCN) ainsi que des enzymes telle que les chitinases, les glucanases, les protéases, et les lipases pour protéger les plantes du stress biotiques par suppression des pathogènes (Gupta et al., 2015).

De nombreux *Pseudomonas* fluorescents sont capable de produire différents métabolites à activité antibiotiques ou antifongiques, tels que le 2-4 diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG), la pyolutéorine, les phénazines, l'HCN et les butyro-lactines (Suty, 2010).

III.6. La résistance aux Stress abiotiques

Au niveau cellulaire, un stress est causé par la variation d'un paramètre environnemental qui entraîne la mise en place des mécanismes de régulation de

l'homéostasie. Les organismes sont généralement soumis à deux types de stress : les stress biotiques (dus à une agression par un autre organisme) et les stress abiotiques (qui sont dus principalement à des facteurs environnementaux) (**Bouزيد, 2010**).

Plusieurs facteurs influencent la croissance et l'activité des populations bactériennes dans le sol (**Smalla et al., 2001**) . Il s'agit essentiellement de la température, de l'humidité, de la taille des pores des particules de sol, de la qualité et de la disponibilité des nutriments et les types de stress (**Josephson et al., 2000**).

Les structures des communautés microbiennes de la rhizosphère sont variables et dépendent de nombreux facteurs abiotiques (**Noguez, 2005**). Plusieurs études suggèrent que les caractéristiques des sols (**Mcgahan et al., 2014**), sont les facteurs les plus importants dans le modelage des structures des communautés microbiennes de la rhizosphère . Par exemple, le pH est l'un des forts prédicateurs de la composition des communautés bactériennes et de la diversité mais suivant le type de sol et d'autres facteurs peuvent agir sur la structure des communautés comme la disponibilité des nutriments , la solubilité des métaux et le contenu en carbone(**Sul et al., 2013**) et en azote (**Fierer et al., 2003**) , l'humidité des sols , la salinité (**Buyer et al., 2010**) et les variations climatiques(**Lauber et al., 2009**) .

Au cours du temps, le sol subit des changements, qui augmentent la complexité globale de l'environnement de sol (**Zhou et al., 2014**) .

III.6.1. Effet de la salinité

Les effets du stress salin sur l'activité microbienne dans un sol donné sont complexes et imprévisibles du fait des interactions possibles entre les ions, les bactéries et les particules du sol. De façon générale, les taux élevés de salinité inhibent la croissance nombreuse bactéries du sol. Une corrélation négative existe entre le nombre de la flore microbienne et la concentration des sels solubles (**Rai, 2017**).

Selon (**Moradi et al., 2011**) , la salinité du sol est considérée un facteur de stress réduisant la diversité des microbes en affectant leurs fonctions et leurs activités.

III.6.2. Effet de stress hydrique

La sécheresse influence le mouvement des bactéries mobiles comme les rhizobiums et la distribution de la microflore du sol, ce facteur affecte également la diversité des populations Rhizobiales (**Hussain et al., 2010**). Les espèces fluorescentes de *Pseudomonas* sont dominantes dans les régions à faible concentration de sel, tandis que les régions salées sont

occupées par des espèces halotolérantes représentées par *Pseudomonas* alcaligènes et *Pseudomonas* pseudo alcaligènes (**Rangarajanetal, 2001**).

L'adaptation d'espèces de *Pseudomonas* à l'osmolarité du milieu extérieur passe, notamment, par l'accumulation des solutés compatibles à l'intérieur du cytosol (**Rabhi, 2011**).

III.6.3. Effet de la température

Les températures élevées peuvent donc affecter in situ les populations microbiennes et leurs activités physiologiques (**Benchabane, 2005**).

III.6.4. Effet du pH

L'acidité affecte la croissance et la survie des rhizobia à l'état libre dans le sol. Demême, leur multiplication dans la rhizosphère, l'infection de la racine, la formation des nodules ainsi que la croissance de la plante sont très touchées par l'acidité par les facteurs qui lui sont associés (**Zerhahi, 2000**).

III.6.5. La résistance aux antibiotiques

L'antibiorésistance est la capacité d'adaptation d'une bactérie dans un milieu contenant des concentrations élevées des agents chimiques néfastes pour elles (**Diallo Alpha, 2013**).

III.6.5.1. La résistance naturelle

Est un caractère stable, transmis à la descendance, et qui est du à la présence de gène chromosomique, qui touche toutes les cellules de la même souche, la résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (**Fauchère et Avil, 2002**).

III.6.5.2. La résistance acquise

La résistance acquise est un caractère moins stable qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce données (**Elmeskini, 2002**). Elle résulte d'une modification génétique permettant à une bactérie de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (**Fauchère et Avril, 2002**).



Chapitre II
Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de phytobactériologie, Université de BLIDA-1- sur une période allant du mois de mars jusqu'à la fin juin. Il a porté sur l'isolement et criblage des *Pseudomonas* spp. fluorescents bénéfiques isolés de la rhizosphère du palmier dattier.

I. Matériels

I.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté par, la verrerie (annexe01), l'appareillage (annexe 02) et les milieux de culture (annexe 03).

I.2. Matériel biologique :

I.2.1 le sol

Le sol utilisé pour l'isolement des *Pseudomonas* a été prélevé à partir de la rhizosphère de quatre cultivars de palmier dattier dans la région de Bechar (Kenadsa) (Tableau 1) situé à 749 Km de la capitale d'Alger, (Latitude : 31,559, Longitude : 2,42343) (Figure07).

Les échantillons de sol sont réceptionnés au laboratoire dans sachets en papier et conservés jusqu'à leur analyse.

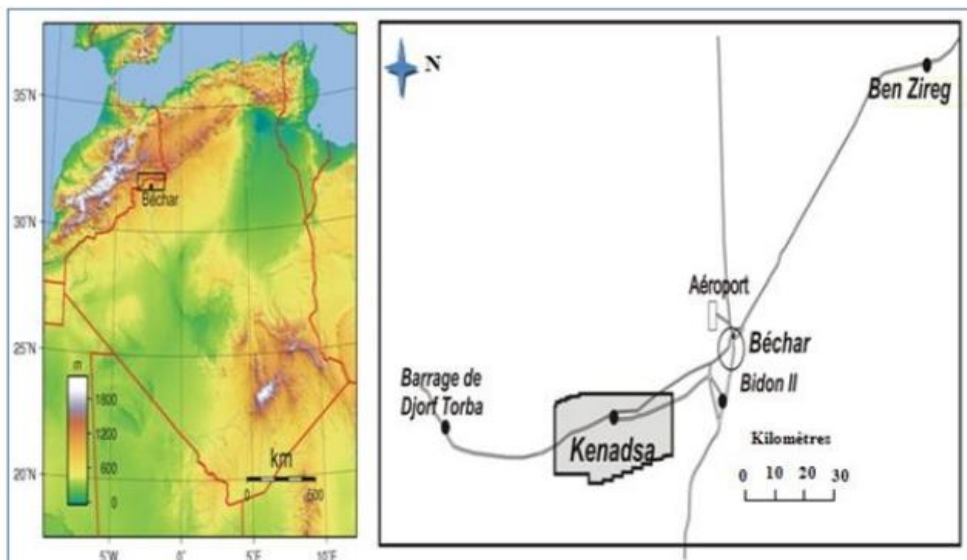


Figure 08: Situation géographique de la région de Kenadsa (Land SAT, 2013).

Origine	Cultivar	Age	Cordonnées
Kenadsa (Bechar)	Hmira	20 ans	KH
	Tinaser	20 ans	KT
	Feggous	19 ans	KF
	Hamriya	35 ans	KM

Tableau01 : Caractéristiques des échantillons étudiés.

I.2.2. Les souches fongiques

Pour évaluer l'activité antagoniste des souches bactériennes, nous avons utilisé deux formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*). Ces souches fongiques appartient à la collection du laboratoire de mycologie (département de biotechnologie l'université BLIDA-1-).

II. Méthode :

II.1. Isolement des bactéries à partir du sol

Dix (10) g de chaque échantillon de sol sont introduites dans des flacons contenant 90 ml d'eau distillée stérile. Une série de suspensions-dilutions allant jusqu'à 1/5ème est réalisée à partir de chaque échantillon. 500µl de chaque dilutions ont été étalées en boîtes de Pétri contenant du milieu KB (**King et al., 1954**). Chaque dilution est ensemencée en triplicate. Les boîtes de pétri portant les indications nécessaires (dilution, la date) ont été incubées à 28°C pendant 24 à 48h.

Après incubation, Les colonies bactériennes individualisées, fluorescentes sous lumière ultraviolette (350 nm), ont été sélectionnées, repiquées sur le même milieu KB (annexe 03) (**King et al., 1954**) puis désignées par un numéro de code.

II.1.1. Purification des souches :

La pureté des souches bactériennes fluorescentes a été vérifiée sur le milieu King B (King *et al.*, 1954) (annexe 03) en réalisant plusieurs repiquages successifs jusqu'à l'obtention des souches pures (Figures 09).

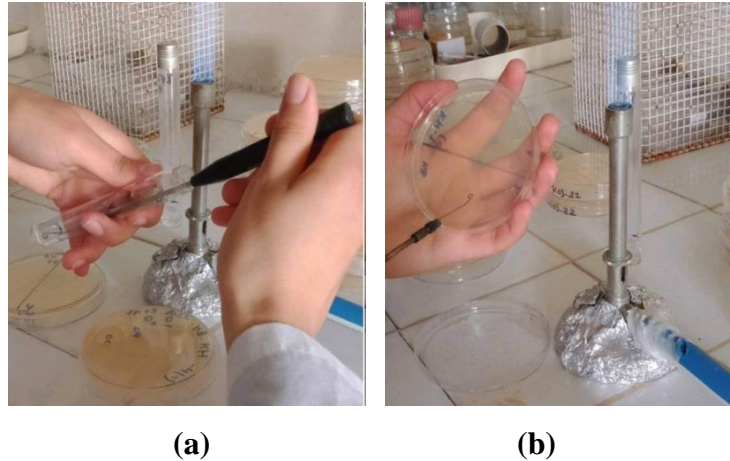


Figure09: Etapes de purification

(a) : Dilution des souches / (b) : Ensemencement par épaissement

II.1.2. Conservation des souches :

Après purification, les isolats sont conservés en milieux KB additionné de glycérol (25 %) (Annexe 03) sur des tubes inclinés à 4°C.

II.2. Identification et caractérisation

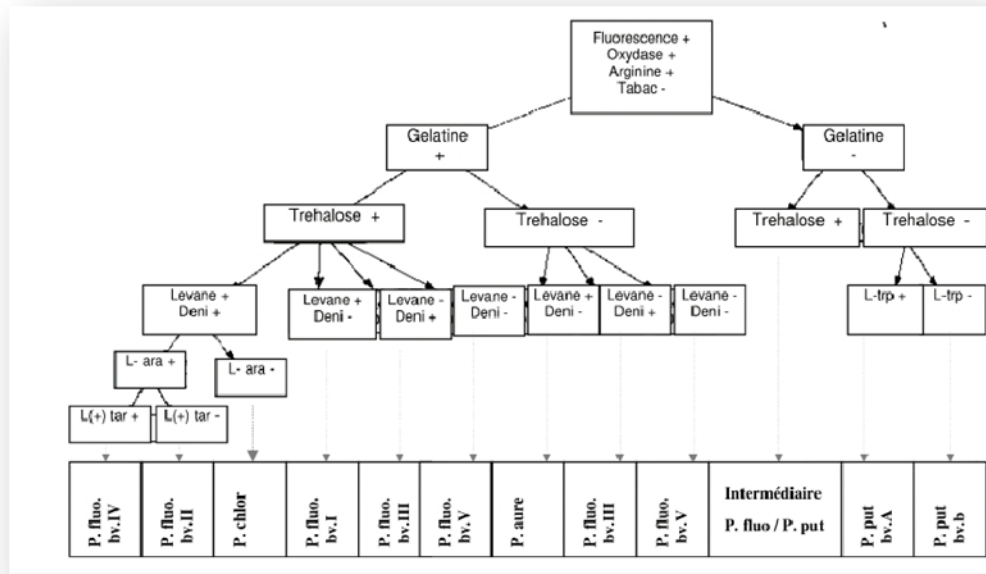
II.2.1 Caractérisation morphologique

La caractérisation morphologique de nos isolats a été effectuée sur milieu B de King après incubation à 30 ° C pendant 24 heures. Elle consiste à une observation à l'œil nu des caractères cultureux tels que la forme, la couleur, l'aspect ainsi que l'élévation et les dimensions des colonies.

II.2.2. Caractérisation physiologique et biochimique

La vérification préliminaire des caractères génériques a été effectuée selon les tests classiques décrits par Lelliot et Stead (1987) et Schaad (1988) : coloration de Gram, morphologie cellulaire, oxydase et la catalase. La caractérisation spécifique a été réalisée

selon la clé dichotomique d'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes proposée par Bossis (1995) (Figure 10).



F

figure 10: Clé dichotomique proposé par Bossis (1995).

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

➤ **Coloration de Gram**

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries Gram positif et Gram négatif, en fonction de la composition chimique de leur paroi, appelée aussi la double coloration à cause de l'utilisation de deux colorants, à savoir le violet de gentiane et la fuchsine. Son objectif est de classer les micro - organismes deux groupes (Gram + et Gram-) en fonction de la composition chimique de leur paroi et son affinité aux différents colorants (Perry et al ., 2004 ; Camille, 2007).

Préparation du frottis bactérien : On dépose au centre d'une lame une goutte d'eau distillé stérile, à l'aide d'une anse on étale de façon homogène une colonie bactérienne jeune (de 24 heures). Après on passe à la fixation à la chaleur (au bec Bunsen). Avant de procéder à la coloration du frottis ce dernier doit être parfaitement refroidi.

Coloration de base : on recouvre totalement la lame par le violet de gentiane, on laisse agir une minute et on rince à l'eau distillé.

Mordantage : on recouvre la lame par la solution de Lugol pendant 45 secondes, et on rince à l'eau distillé.

Décoloration rapide à l'alcool : on verse goutte à goutte l'alcool sur la lame incliné obliquement jusqu'à la décoloration (10 à 20 secondes) et on rince à l'eau distillé.

Contre coloration : on recouvre la lame avec de la Fuchsine et on laisse agir une minute, et on rince à l'eau distillé. On sèche la lame et on passe à l'observation sous microscope photonique à l'immersion.

- ❖ Une autre méthode, décrite par Suslow *et al.* (1982), a été utilisée et qui consiste à déposer sur une lame deux à trois gouttes d'une solution de KOH (3 %) et on dépose une crème bactérienne de 24h. La réponse positive corrélative au Gram négatif se traduit par l'obtention d'un filet visqueux.

➤ Test de fluorescence

Il est considéré selon **Olmar *et al.* (2001)**, comme premier test pour une sélection préliminaire des isolats. La mise en évidence de la production du pigment fluorescent est réalisée sur milieu KB (annexe 03), elle est révélée sous UV (350 nm après une incubation de 3 à 5 jours à 30 ° C (**Guiraud, 1998**)).

➤ Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à coloration de Gram négative. Le test de l'oxydase consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxydés un réactif incolore (NN-diméthyle - paraphylène diamine) en un dérivé rose violacée. Le test est réalisé par mise en contact d'une crème bactérienne jeune de 24h avec un disque d'oxydase, la réponse indique la présence de cytochrome oxydase se manifeste par l'apparition d'une coloration violette après 10 secondes. La réponse est positive tardive lorsque elle apparaît en retard (10 à 60 secondes) au-delà de 60 secondes la réponse est négative (**Hildebrand *et al.*, 1988**).

➤ Test du catalase

La catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'oxygène, très toxique, produits par des réactions cellulaires. Une colonie de bactéries est disposée sur une goutte de H₂O₂. Le Dégagement de bulles signifie une réaction catalase positive (**Raylomanantsoa, 2004**).

➤ **Test d'arginine di Hydrolase (ADH)**

Le système enzymatique di Hydrolase de l'arginine permet à certains *Pseudomonas* de se développer sous des conditions anaérobiques, selon deux réactions enzymatiques ; dégradation de l'arginine en citrulline +NH₃ par l'arginine desmidase et transformation de la citrulline en ornithine + CO₂+NH₃ par citrullineureidase. L'hydrolyse de l'arginine a été testé sur le milieu Moller Arginine (ADH5%), les tubes inoculés ont été recouverts par une légère couche de vaseline et incubés à 26°C pendant 5 jours. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette suite à l'alcanisation du milieu due à la présence de NH₃.

➤ **Test de gélatine**

L'hydrolyse de la gélatine sous l'action d'une enzyme extracellulaire conduit à la libération des acides aminés. Cette réaction se traduit par une transformation du milieu à l'état liquide (**Gardan et Luisetti, 1981**).

Dans des tubes à essai contenant le milieu gélatine, on ensemence par piqure centrale une crème bactérienne âgée de 24h. Les tubes à essai sont ensuite incubés à 25°C pendant 7 à 15 jours. Après incubation, les tubesensemencés ainsi que les témoins nonensemencés sont déposés au réfrigérateur à 4°C pendant 10 minutes pour favoriser la prise du gel. La gélatinolyse traduit par la liquéfaction du milieu.

II.3. Criblage des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents antagonistes *in vitro*

Le pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas spp* fluorescents a été déterminé par l'inhibition de la croissance mycélienne de deux formes spéciales de *Fusarium oxysporum*. (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*)(G1, G7). Cette activité antagoniste a été déterminé sur deux milieux différents (le milieu PDA (favorable au développement des champignons), le milieu KB (favorable au développement de *Pseudomonas*) par la méthode de confrontation direct.

II.3.1. Purification des souches fongiques

La vérification de la pureté des souches fongiques a été réalisé après plusieurs repiquages par transplantation successif des disques de champignons de 7 jours dans des boites de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (**Johnston et Booth, 1983**).

Ces derniers ont été incubés à 28°C pendant 7 jours. Les souches purifiées ont été conservées à 4°C.

II.3.2. Test de confrontation direct

L'activité antagonistes des souche isolées a été réalisé selon la méthode décrite par **vincent et al., (1991)**. Les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1.5 cm à partir des deux bords d'une boîte de Pétri contient du milieu gélosé (Figure 11). Après 24 h d'incubation à 28°C, un disque fongique de 6 mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Deux répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

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

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{R témoin} - \text{R test}) / \text{R témoin} \times 100$$

R témoin : Distance radicale max de la croissance du champignon.

R test : Distance radicale sur ligne en direction de l'antagoniste.

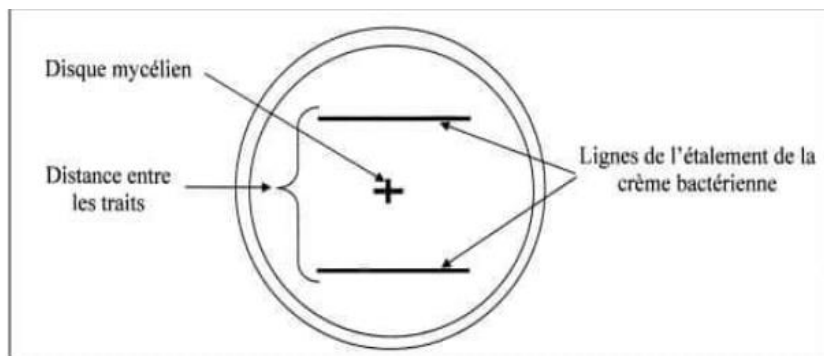


Figure 11: la méthode en traits

II.4. Résistance des souches sélectionnées à quelques stress abiotiques

Dans cette partie du travail, nous avons analysé *in vitro* certains caractères bactériens qui peuvent être déterminants dans l'adaptation et la compétence rhizosphérique de

Pseudomonas spp. fluorescents ; ces caractères sont la tolérance à la salinité, la résistance aux antibiotiques et la résistance aux stress thermique et hydrique.

II.4.1. Effet du stress thermique et hydrique sur la croissance des souches.

Le but des tests de stress thermique et hydrique est de mettre en évidence l'aptitude des souches bactériennes à réinitier une croissance normale dans les conditions optimales, après avoir subi un stress thermique ou hydrique.

II.4.1.1. Stress thermique

Le test de tolérance à une gamme de température a été entrepris dans le but de déterminer les types des bactéries thermophiles ou psychrophile. Dans ce cas chaque souches est ensemencés Luria Bertani (LB) en boites, l'incubation se fait à des températures croissantes, 4C°, 15C°, 30C°, 42C° et 45C° pendant 24 heures. Après l'incubation, la lecture des résultats est notée à l'œil nu.

II.4.1.2. Stress hydrique

Ce test a été réalisé en utilisant le polyéthylène glycol(PEG) (annexe 03) pour préparer les différents niveaux de stress hydrique osmotique. Un bouillon nutritif additionné de différentes concentrations de PEG à 800M (0%, 20%, 40% et 60%) a été utilisé pour étudier l'effet de stress osmotique sur les souches sélectionnées. Un volume de 100µl de suspension bactérienne des souches est inoculé dans 5 ml de bouillon nutritif avec une concentration de PEG préparé en tube à essai. Trois répétitions pour chaque souche.

Un témoin négatif correspond à l'inoculation de 100µl d'eau distillé stérile avec un bouillon nutritif à 0% de PEG. Les tubes ont été disposés sur un secoueur horizontal réglé à une vitesse moyenne à une température ambiante du laboratoire. Après 72h d'incubation, la croissance des souches sur différents concentrations de PEG a été déterminée en mesurons l'absorbance à une longueur d'onde de 300 nm en utilisant un spectrophotomètre (Manjunatha, 2017).

II.4.2. Résistance au chlorure de sodium et aux antibiotiques des souches sélectionnées

II.4.2.1. Résistance au chlorure de sodium

Le test de tolérance à la salinité chez les souches étudiées est réalisé à différentes concentrations de Na Cl pour la détection des bactéries les plus tolérantes à la salinité. Une

colonie bactérienne âgée de 24 heures à 48 heures pour chaque souche est ensemencée en stries dans différents milieux Luria Bertani (LB) contenant les concentrations croissantes de sel (Na Cl) : 0.3 M (17.58g/l), 0.5 M (29.3 g/l) ,0.8 M (46.88 g/l), et 1 M (58.6 g/l, des témoins sans Na Cl sont préparés pour comparer.

II.4.2.2. Résistance aux antibiotiques

A. Principe

Ce test consiste à tester la résistance ou la sensibilité des souches à trois antibiotiques (Pénicilline, Azeteronam et l'Acide fusidique) à différentes concentrations : 20, 50 et 100µg/ml sur milieu MH liquide et solide. La méthode utilisée est celle préconisée par **Courvalin et Leclercq (2012)**.

B. Mode opératoire

-Premier jour

A partir d'une culture bactérienne pure, 2 à 3 colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine et sont inoculées dans 5 ml d'un bouillon nutritif. L'incubation est de 18 à 24 heures à 26 à 28°C. C'est le bouillon incubé (BI).

-Deuxième jour

25 ml de Muller-Hinton liquide est ensemencé avec 0.1 ml de la culture bactérienne (BI), c'est le bouillon ensemencé (BE).

-Préparation des solutions d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques sont préalablement préparés aux concentrations désirées on va les découper si nécessaire à l'aide d'un bistouri stérile. On réalise la répartition à l'aide d'une pince stérile dans chaque tube (figure 12), 2 ml du BE sont distribués dans chaque tube contenant les ATB. Après agitation les tubes sont incubés à 18 à 24 h à 26°C.

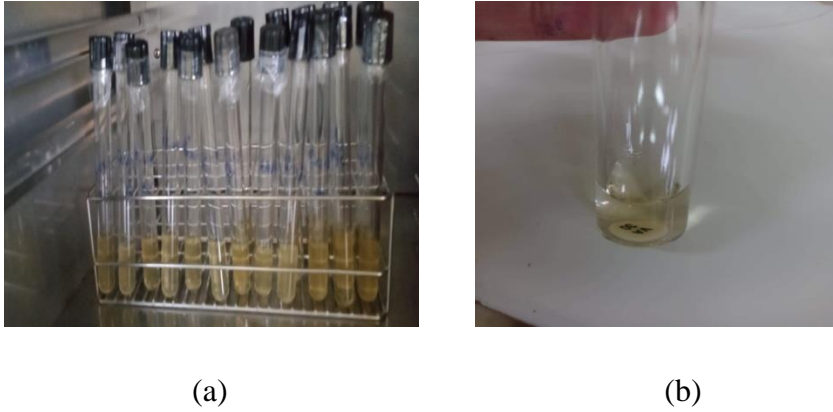


Figure 12 : Préparation des concentrations et les solutions d'antibiotiques (originale).

(a) : Ensemencement de MH liquide avec la culture bactérienne, (b) : Préparation des solutions d'antibiotiques.

-Troisième jour

Sur une boîte de MH, 3 stries parallèles de 5 cm sont tracés au verso (correspondant aux concentrations d'ATB). A l'aide d'une anse calibré à partir des bouillons contenant les disques d'antibiotique sont prélevés et ensemencés au niveau de stries tracées. L'incubation a été réalisée à 28°C pendant 24 heures.



Figure 13: Ensemencement de solution d'antibiotiques sur boit de pétri (originale).

-Quatrième jour

Lecture de la boîte ensemencée avec les bouillons contenant les antibiotiques. La lecture se fait par dénombrement des colonies au niveau de chaque strie.

III.1 Résultats de l'isolement et l'identification

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

L'isolement des bactéries à partir du sol saharien nous a permis d'isoler 45 souches à partir de la rhizosphère de quatre cultivars de palmier dattier, dont trente-cinq (77%) souches sur 45 sont des souches fluorescentes (figure 14), le reste est représenté par d'autres souches.

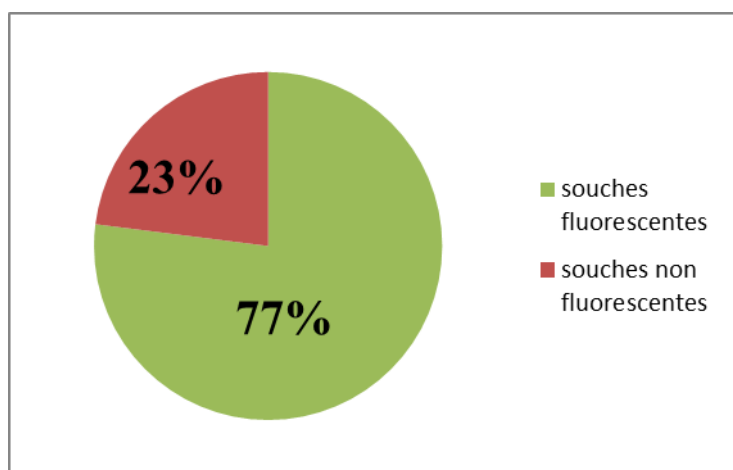


Figure 14: La fréquence de souches fluorescentes et non fluorescentes isolées.

III.1.2 Identification des souches de *Pseudomonas spp.* Fluorescents

L'identification des souches isolées a été réalisée essentiellement selon la clef de Bossis (1995).

III.1.2.1. Caractéristiques morphologiques

Après purification, les souches bactériennes ont montré sur le milieu KB des caractères culturels très rapprochés. D'une manière générale, les colonies présentent un contour régulier, la coloration est souvent crème et parfois beige. Pour toutes les souches, l'aspect des colonies est lisse et parfois rugueuse, leur élévation est convexe et le diamètre varie de 0.5 à 4 mm et cela en fonction de l'âge de la culture. Les résultats de la caractérisation physiologique sont représentés dans le (tableau 02) (annexe 4)

III.1.2.2 Test de la Fluorescence

Le test de la fluorescence réalisé sur les trente-cinq isolats a révélé la présence d'un pigment fluorescent traduisant par une couleur jaune verdâtre sous la lampe UV (350 nm) (Figure 15), dont l'intensité de la fluorescence varie d'une souche à une autre. Nous avons constaté que la fluorescence varie non seulement en fonction des souches mais aussi selon

l'âge de la culture. La coloration et l'intensité du pigment émis varie du vert jaune au jaune brun. Ces mêmes observations ont été signalées par **Digat et Gardan (1978)**.

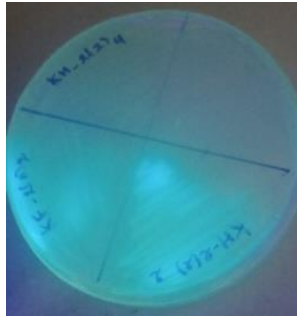


Figure 15:La fluorescence des isolats bactériens sous UV (350nm) (originale).

III.1.2.3 Identification biochimique et physiologique

❖ Coloration de Gram

La coloration de Gram a révélé que vingt-et-une sur trente-cinq isolats soit 60 % (Figure 16).sont des bacilles à Gram négatif Ce constat est vérifié par le test de potasse indicateur de Gram. L'augmentation de la viscosité du KOH et la formation d'un filament mucoïde confirme que ces bactéries sont à Gram négatif – (Tableau 03) et (Figure 17).

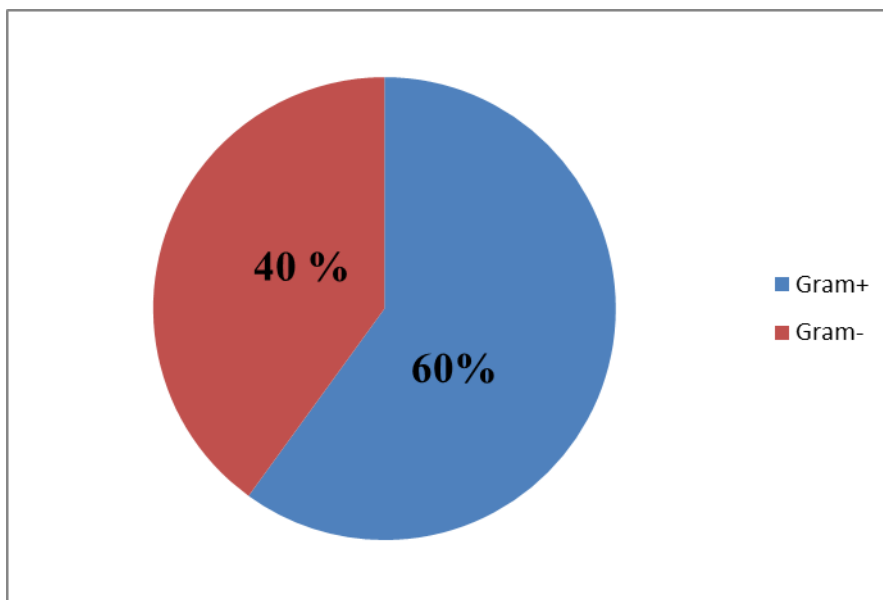


Figure 16:La fréquence des souches Gram – et Gram +

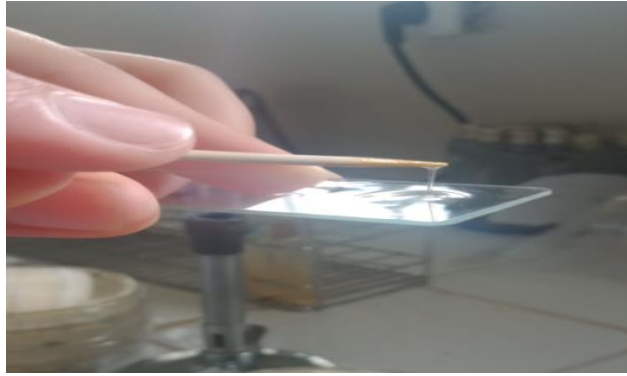


Figure 17:Formation d'un filament mucoïde confirmant le Gram négatif par le test de KOH (originale).

❖ Test d'Oxydase

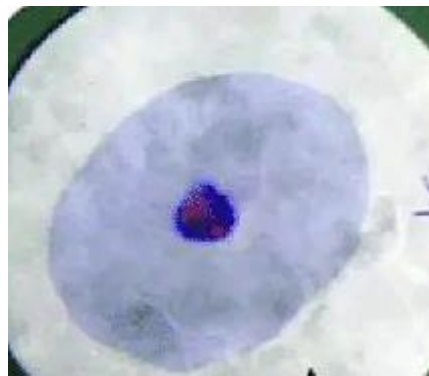
D'après les résultats, toutes les souches sont oxydase+, 100% des souches ont été retenue pour le test de catalase (Tableau 03) et (Figure 18).

❖ Test de Catalase

D'après les résultats, toutes les souches (100%) sont catalase positif (Tableau 03) (Figure 18).



(a)



(b)

Figure 18 : Résultats du test catalase et d'oxydase (originale)

(a) Test catalase/ (b) : test oxydase.

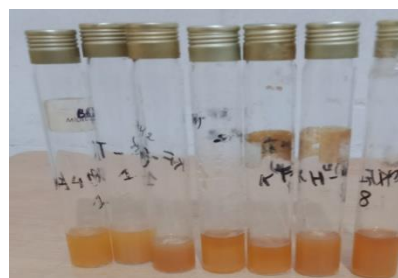
❖ Tests d'Hydrolyse de l'arginine ADH et Recherche de la gélatinase

D'après les résultats (Figures 19 et (Tableau 03), nous constatons que :

- ✓ La dégradation de l'arginine a été notée chez toutes les souches testées (100%). Le résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration violette suite à l'alcalinisation du milieu.
- ✓ L'absence de la production de la gélatinase a été révélée chez toutes les souches (100%) se traduisant par la solidification du milieu.



(a)



(b)

Figure 19 : Résultats du test d'arginine et de gélatinase.

(a):Test arginine/ (b) : test gélatinase

Tableau 03 : quelques caractéristiques d'identification des souches *Pseudomonas* spp fluorescentes isolées.

La souche	fluor	Gram	KOH	cata	oxy	arg.	gél	Identification des souches
KH 3	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe intermédiaire <i>P.putida-P.fluorecens</i>
KF 5	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe intermédiaire <i>P.putida-P.fluorecens</i>
KT 1	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe intermédiaire <i>P.putida-P.fluorecens</i>
KT 2	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> /groupe intermédiaire <i>P.putida-P.fluorecens</i>
KT	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> /groupe intermédiaire <i>P.putida-P.fluorecens</i>

4								
KF 4	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> /groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KF 3	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> /groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 4	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 13	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KF 1	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 10	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 2	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 5	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 7	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 9	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 11	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KH 15	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KT 3	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire
KT 6	+	-	+	+	+	+	-	<i>P.putida</i> / groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i> intermédiaire

KF 2	+	-		+	+	+	-	<i>P.putida</i> /groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i>	intermédiaire
KH 14	+	-		+	+	+	-	<i>P.putida</i> /groupe <i>P.putida-P.fluorecens</i>	intermédiaire

Fluor : fluorescence /**oxy** : oxydase/ **arg**: arginine/ **gél**: gélatine/ **cata**: catalase

Les méthodes de caractérisation ont permis une identification préliminaire des isolats issus du biotope étudié (rhizosphere de quatre variétés de palmier dattier). La sélection initiale ayant une cytochrome C oxydase (Stanier et al., 1966) et de la plupart des espèces phytopathogènes dépourvues de cette enzyme (Lelliot et al., 1966; Sands et al., 1967; Palleroni, 1984).

L'identification a permis de constituer une collection de 32 isolats fluorescents. Les tests de l'oxydase et de l'arginine-di hydrolase, considérés comme des tests déterminatifs dans l'identification des *Pseudomonas* spp. Fluorescents (Bossis, 1995), ont été pratiqués sur les 32 souches. L'étude des cytochromes respiratoires a permis de distinguer *P. aeruginosa* des autres espèces saprophytes

Les résultats ont permis de retenir 21 souches [oxydase (+), arginine (+)], apparentées à des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, soit un taux de 46.7 % du total des souches isolées.

Les caractères physiologiques et biochimiques des isolats bactériens, selon les réactions obtenues dans les tests discriminatifs proposés par Bossis (1995) [Arginine (+), gélatine (-)] ont permis de regrouper toutes les souches *Pseudomonas* spp fluorescents (100%) en : *Pseudomonas putida* ou au sein du groupe intermédiaire entre *P. putida* et *P. fluorescens* (Tableau 3).

III.2 Résultats de la sélection des souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents antagonistes

Parmi les vingt-et-une souches pré-identifiées, sept souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents (représentatif de chaque échantillon du sol) ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (Fol.) sur deux milieux (KB et PDA). Cette inhibition se traduit par la

réduction du diamètre des colonies de *Fusarium* par rapport au témoin. La lecture des résultats de l'activité antifongique :

- **Milieu PDA**

Sur le milieu PDA, six souches exercent une activité antagoniste vis-à-vis de deux champignons *Foa* et *Fol*. Le résultat se voit clairement sur les boîtes de Pétri lors de la comparaison avec le témoin. Ces souches sont considérées inhibitrices avec un taux d'inhibition >20%. Les résultats obtenus sur le milieu PDA sont illustrés, sur les (Figures 20) et (Tableau 04) (annexe 4).

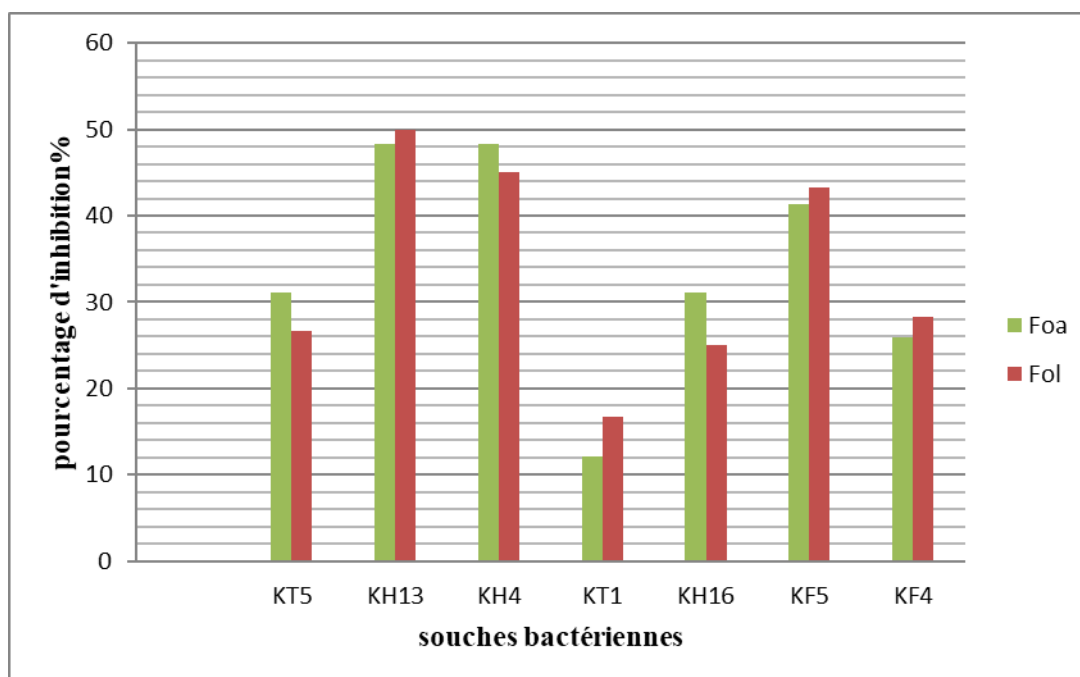


Figure 20 : Histogramme qui représente les taux d'inhibition des souches bactérienne dans le milieu PDA vis-vis les champignons *Foa* et *Fol*.

La lecture de la figure 20, nous indique que le taux d'inhibition est variable et important pour les souches vis-à-vis des deux champignons dans le milieu PDA.

Les résultats montrent une forte activité antifongique chez les souches KH13, KH4 et KF5 (figure 20) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* avec des taux d'inhibition de 48.27 % et 41.37 %, et vis-à-vis *Fusarium oxysporum f.sp. Lini* avec 50%, 45% et 43.33%. Pour la souche (KT1) (tableau aucun effet sur la croissance des souches fongiques *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* et *Fusarium oxysporum f.sp. lini* a été indiqué.

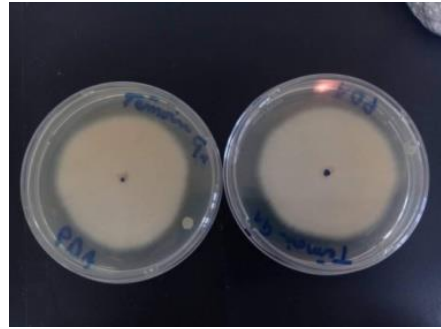
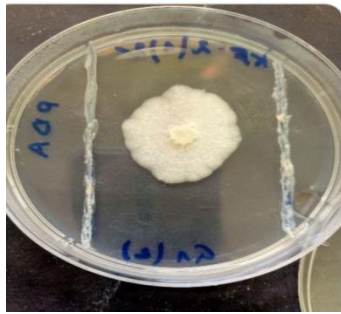


Figure 21: Activité antagoniste de KF5 contre *Foa*

Figure 22 : Témoin *Foa*

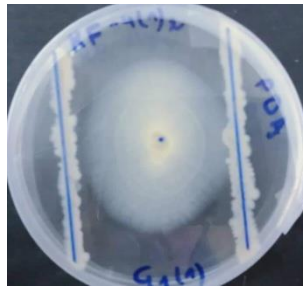


Figure23 : Activité antagoniste de KF4 avec *Foa*.

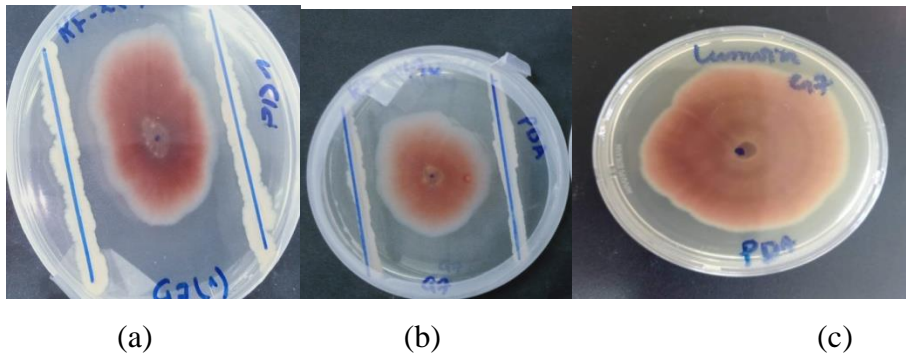


Figure 24: Activité antagoniste de KF5 contre *Fol* et le témoin

(a) : Activité antagoniste de KF4 avec *Fol*

(b) : Activité antagoniste de KF5 avec *Fol*

(c) : Témoin *Fol*

- King B :

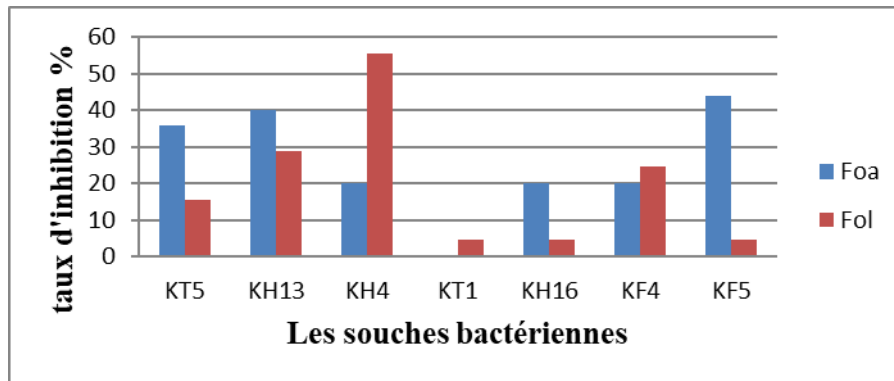


Figure 25 : histogramme qui représente les taux d'inhibition des souches bactérienne dans le milieu King B vis- a vis les champignons *Foa* et *Fol*.

Selon la (Figure 25) et (Tableau 04) (annexe4) qui représentent les résultats de l'effet antagoniste exercé par les souches bactériennes, nous remarquons que :

- Toutes les souches ont montré un pouvoir antifongique vis-à-vis du *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* sur le milieu King B avec un taux d'inhibition >20% sauf la souche KT1 qui ne représente pas une activité antagoniste avec un taux d'inhibition=0%.
- 3 souches (KH16, KF5, et KT1) n'ont pas exercés un pouvoir antifongique vis-à-vis le champignon *fusarium oxysporum f.sp. lini* avec un taux d'inhibition de 4.44% < 20 %.

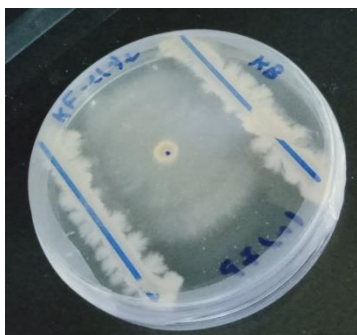


Figure 26: Activité antagoniste de KH4 avec *Foa*.

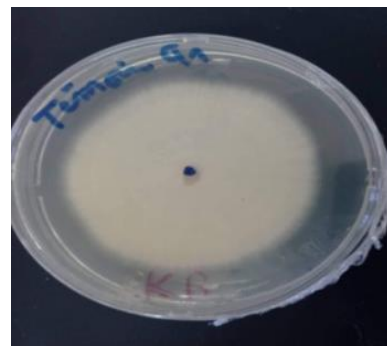


Figure 27: Témoin *Foa*.

III.3. Résultats de la résistance des souches sélectionnées à quelques stress abiotiques

III.3.1. Effet du stress thermique et hydrique sur la croissance des souches

➤ Stress thermique

La résistance au stress thermique a été évaluée par la capacité des souches à reprendre une croissance normale 30°C après un passage de 42 °C pendant 24 heures sur milieu LB

Toutes les souches ont résisté au stress thermique. Après un passage à la température de 42°C pendant 24 heures, les sept souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents testées ont pu reprendre une croissance normale à la température de 30 °C comparable à celle de leurs témoins respectifs non stressés (Tableau 05) (annexe4).

➤ Stress hydrique

L'utilisation de polyéthylène glycol (PEG) à des concentrations de 0%, 20%, 40% et 60% pour la préparation des différents niveaux de stress hydrique osmotique permet de étudier l'effet de stress osmotique sur les souches sélectionnées.

Les résultats illustrés dans le Tableau 06 (annexe 4) montrent que KF4 présente la valeur la plus élevée avec une densité optique (DO) de 0.432 à 20% de PEG, tandis que, la souche KF5 présente la valeur la plus élevée de 0.651 de DO à 40 % de PEG, et KT1 présente la plus valeur élevée pour une densité optique (DO) de 0.472 à 60% de PEG (figure 28).

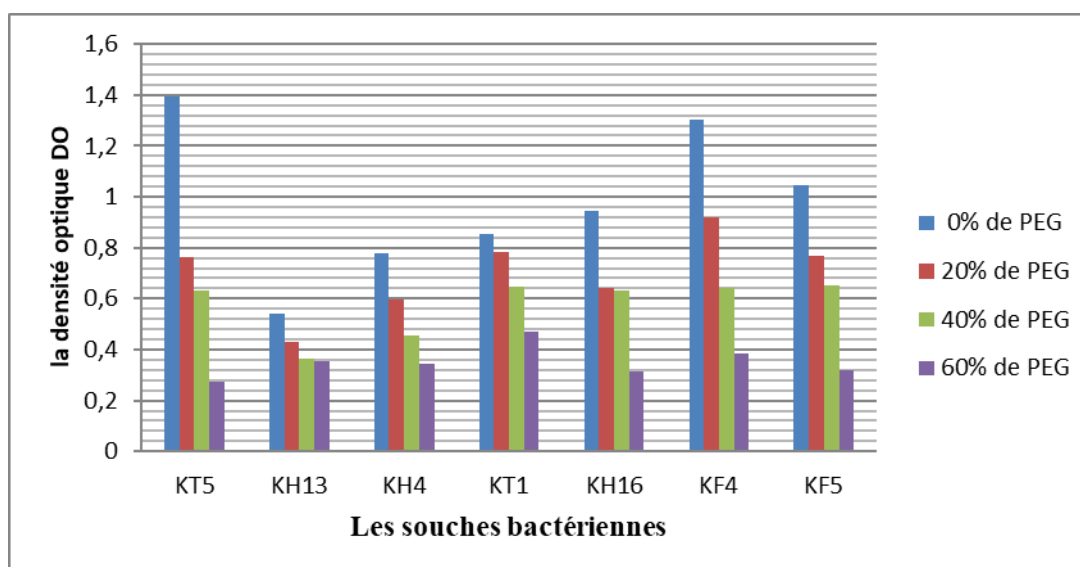


Figure 28: Densité optique du stress hydrique.

II.3.2. Résistance au chlorure de sodium et aux antibiotiques des souches sélectionnées

➤ Résistance au chlorure de sodium

Le test de tolérance de salinité chez les bactéries étudiées est réalisé par la préparation du milieu NGA contenant des différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) pour la détection des bactéries les plus tolérantes aux sels.

A partir des résultats du Tableau 07 (annexe 04), la totalité des sept souches testées se développent aux concentrations de 0M, 0.3M, 0.5M, 0.8M, et 1M en NaCl (les concentrations d'Na Cl sont tolérées par la totalité des souches).

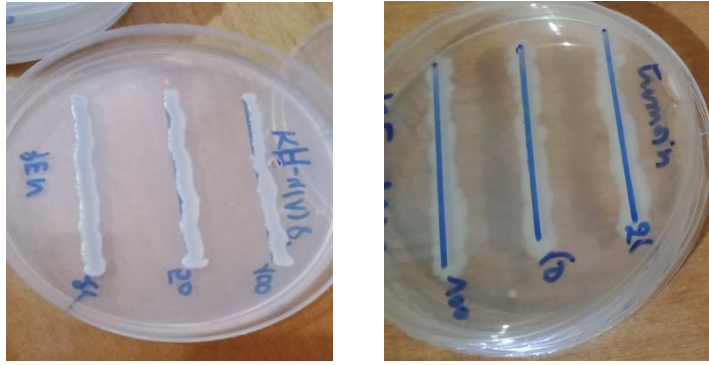
➤ Résistance aux antibiotiques

Globalement, la fréquence de résistance des sept souches aux trois antibiotiques était élevée aux concentrations de 100µg/ml à l'exception d'une seule souche KT1 qui est sensible l'acide fusidique à une concentration de 100 µg/ml. Les *Pseudomonas* sont avérés plus résistants à la pénicilline (figure 29) (Tableau09) (annexe4) et Aztreonam (100%) (figure31) (Tableau 11) (annexe 4) par rapport au l'acide fusidique (85%) (Tableau10) (Figure 30). Le choix de ces molécules d'antibiotiques est lié au fait que les souches de *Pseudomonas spp.* Fluorescents sont communément résistantes et elles sont représentatives de l'état de résistance globale de ces rhizobactéries aux substances antibactériennes.



(a)

(b)



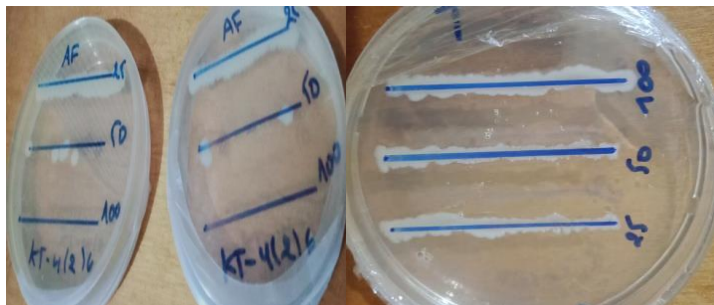
(c)

(d)

Figure 29: Résultats de la résistance de quelques souches à la pénicilline.

(a) : Résistance de KH4 à la pénicilline / (b) : Témoin de KH4.

(c) : Résistance de KH13 à la pénicilline/ (d) : Témoin de KH13.



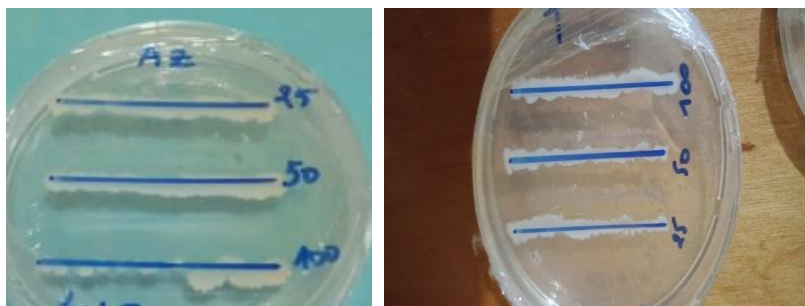
(a)

(b)

Figure 30 : La résistance et la sensibilité des souches au AF.

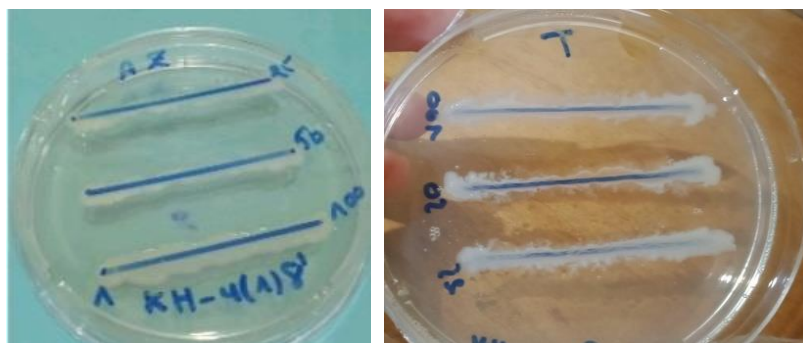
(a) : Souche KT1 sensible au AF

(b): Témoin de la souche KT1



(a)

(b)



(c)

(d)

Figure 31 : Résistance de quelques souches à l'AZ.

(a) : Résistance KH4 au AZ/ (b) : Témoin de KH4

(c) : Résistance de KH13 au AZ/ (d) : Témoin de KH13.

DISCUSSION

Discussion

Pseudomonas spp. Fluorescents sont parmi les espèces bactériennes les plus étudiées à l'échelle mondiale grâce à leur vaste distribution dans les niches écologiques et aux méthodes simples de culture. Ces bactéries sont présentes dans tous les écosystèmes mêmes les habitats extrêmes. Cette abondance reflète le caractère adaptatif de ces souches qui a été déjà mis en évidence par **Latour et al., (1996)** concernant les souches *P. fluorescens*.

Les isolements effectués ont permis d'isoler trente-cinq souches dont vingt-et-une sont des *Pseudomonas spp.* Fluorescents cette densité est probablement due aux différents facteurs qui influencent la croissance et la survie des microorganismes. La diversité microbienne dans différents biotopes dépend de plusieurs facteurs: la salinité, la solubilité de l'oxygène, la température, le pH, du potentiel hydrique et la disponibilité des éléments nutritifs (**Cacciari et al., 2003**). La présence des souches *Pseudomonas spp.* fluorescents dans le biotope étudié (sol saharien) qui est considéré comme un milieu extrême est due à leur caractère ubiquitaire et pouvoir d'adaptation (**Bossis et al., 2000; Moll et al., 2008; Anderson et al., 2018**). La distribution des populations de *Pseudomonas spp.* fluorescents telluriques est influencée par la plante et le sol (**Achouak et al., 2000; Delorme et al., 2002**)

L'identification et la classification des souches obtenue a été réalisée selon différents critères phénotypiques (morphologie, production des pigments, et coloration de gram, test oxydase et catalase). L'étude macroscopique réalisée sur milieu King B a permis d'observer des colonies de forme circulaire, opaque à semi translucide de couleur crème et une taille qui varier entre 0.3-0.5 cm. La pigmentation produite par ces souches est d'une couleur jaune verdâtre.

D'après nos résultats les souches sont gram-, catalase+, oxydase+. Nos résultats se concordent avec ceux de (**Latour et Lemanceau, 1997**). Les espèces saprophytes de *Pseudomonas spp.* fluorescents sont catalase positive, mésophile chimio-organotrophes puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Les souches obtenues sont arginine+ et gélatine- donc elles sont probablement *Pseudomonas putida* ou appartiennent au groupe intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida*, selon (**Bossis et coll., 2000 ; Chapalain et coll., 2007**). *P. putida* se distingue de *P. fluorescens* par son incapacité à liquéfier la gélatine

L'activité antagoniste est tester sur sept souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents vis-à-vis de deux champignons *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f. *lini* sur deux milieu de culture KB et PDA. Les résultats ont révélé que la majorité des souches

DISCUSSION

ont un pouvoir antagoniste vis-à-vis le *f.o.a* et vis-à-vis le *f.o.l* sur les deux milieux. Ces résultats témoignent sur l'effet bénéfique des *Pseudomonas spp.* fluorescents en tant qu'agent de biocontrôle contre les phytopathogènes telluriques (**Becher et Cook, 1988 ; Lemanceau, 1992**)

Une forte activité antagoniste est exercée par les souches KH13 à l'encontre des deux champignons sur le milieu PDA révèle la présence des zones d'inhibitions autour du pathogène fongique foa et fol. Ce résultat peut être expliqué par la présence des métabolites secondaires à effet antifongique synthétisés par les souches ayant manifesté une action inhibitrice contre le pathogène.

D'autres parts, le même essai sur le milieu KB révélée une activité antagonistes de souches KH4 l'encontre des deux champignons est probablement due à la production des sidérophores. La production en quantités importantes de ces molécules chélatrices permet aux *Pseudomonas spp.* fluorescents de s'approprier tout le fer nécessaire à leur croissance et de le rendre inaccessible aux autres microorganismes (**Viswanathan et Samiyappan, 2004**). Le fer est un facteur limitant pour le développement des microorganismes et leurs activités biologiques (**Loper et Buyer, 1991**). Les différences d'intensité du pouvoir inhibiteur de nos souches pourraient être liées à la nature et la quantité des substances sécrétées. (**Mishagi et al., 1982**), ont établi une corrélation entre la quantité de pigments fluorescents et le pouvoir antagoniste des *Pseudomonas*.

Sous des conditions de stress abiotique, les PGPR synthétise en accumulent certaines molécules dites «solutés compatibles», car compatibles avec le fonctionnement physiologique de la cellule entière. Ces molécules permettent à la cellule de s'adapter aux conditions sévères de stress salin, thermique, oxydatif etc.(**Oren,2003; Rai,2017**),de même, le stress abiotique active chez les PGPR la synthèse de biomolécules actives jouant un rôle dans le captage des nutriments et l'adaptation de ces microorganismes et des plantes co-environnantes aux conditions inhabituelles.

Les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents sélectionnées à la base de l'activité antagoniste ont été analysées pour leurs capacités à résister aux stress abiotique. Nos résultats montrent que la totalité des sept souches testées sont résistées au déférent paramètre abiotique.

La mise en évidence de la résistance au stress salin montre que toutes les souches se développent aux concentrations de 0 M à 1M d'NaCl. La totalité de nos souches ont montré une halotolérante appréciable aux concentrations de 0 M à 1M de NaCl. Cela se rapproche de

DISCUSSION

l'étude de **Benchabane, 2005 ; Diaw et al., (2018)**. Par contre, ces résultats sont contradictoires avec ceux de **Deshwal et Kumar, (2013)** qui ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* ont une tolérance au sel.

Les résultats de la résistance au stress thermique et hydrique montrent que nos souches ont été insensibles aux stress thermique et hydrique. La température est un facteur qui détermine la nature et les conséquences des interactions rhizobactéries–plantes (**Digat, 1994**). Ce qui concorde avec les travaux de plusieurs auteurs (**Digat, 1991 ; Benchabane, 2005**).

Les résultats obtenus par le test du stress hydrique montrent que tous les souches sont tolérantes au stress d'osmolarité, ce qui concorde avec les résultats de **Manjunatha et al.,(2017)**.

Par rapport la résistance au antibiotique, les résultats de nos études montrent que les souches sélectionnées possèdent une résistance de haut niveau aux trois antibiotiques testés (pénicilline, Azetronam, acide fusidique). Toutes les souches sont résistantes à la pénicilline (100%) alors que 85% sont résistantes à l'acide fusidique et 100% sont résistantes à l'Aztreonam, le choix de ces molécules d'antibiotiques est lié au fait que les *Pseudomonas spp.* fluorescents en sont communément résistants et elles sont représentatives de l'état de résistance globale de ces rhizobactéries aux substances antibactériennes.

Les résultats obtenus démontrent l'efficacité des souches de *Pseudomonas spp fluorescens* comme agents de biocontrôle, biofertilisant et phytostimulateurs. Ceci laisse envisager la possibilité de les exploiter comme des inoculants bactériens dans les prochaines études expérimentales en agriculture dans l'objectif de produire des biopesticides. Ce qui s'impose comme une alternative aux produits chimiques, tant nuisibles pour l'environnement.

DISCUSSION

Conclusion :

Dans le sol, les champignons phytopathogènes constituent la première barrière biotique pouvant affecter le rendement agricole. Ils sont capables de s'adapter très rapidement à des modifications de leur environnement. Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. L'étude du rôle de *Pseudomonas spp.* fluorescents dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales constituent à l'heure actuelle un enjeu majeur.

Ce travail a eu pour objectifs d'isoler et sélectionner des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents pour leurs propriétés de biocontrôle, biofertilisants et phytostimulations des maladies des plantes et leurs résistances au stress abiotique.

Les isolements réalisés à partir d'un échantillon de sol rhizosphérique de quatre variétés différentes de palmier dattier issue de la région de kenadsa nous a permis d'obtenir quarante-cinq souches dont trente-cinq sont fluorescents. La caractérisation (morphologique, microscopique et biochimique), a permis d'identifier vingt-et-une souches de *pseudomonas spp* fluorescents en basant sur les clés de Bossis (**Bossis et al., 1995**) on a constaté que les vingt-et-une souches appartient au groupe des *Pseudomonas putida* ou groupe intermédiaire *p. putida-p. fluorescens*.

La sélection que nous avons menée sur les sept souches nous a permis de retenir six souches de *Pseudomonas* antagoniste contre *F.oxysporum* sur deux milieux KB et PDA. Les résultats du test d'antagonisme in vitro, ont montré des effets antagonistes de toutes les souches testées à l'exception d'une souche. Ces dernières sont considérées inhibitrices des agents fongique *Fusarium oxysporum albedinis*, *Fusarium oxysporum lini* , Les bactéries antagonistes montrent une variabilité du taux d'inhibition vis à vis du champignon pathogène en enregistrant des taux d'inhibition supérieur ou égale 20 %. Nos résultats révèlent que la souche KH13 possède un pouvoir inhibiteur le plus élevé contre le champignon phytopathogènes de *Fusarium oxysporum albedinis* dans les deux milieux avec un taux d'inhibition varie entre 50% et la souche KH4 avec un taux d'inhibition 55,55% contre *Fusarium oxysporum lini*.

A travers nos résultats, il ressort que les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents ont capacité de s'adapter aux conditions environnementales. Nos résultats montrent que toute les

DISCUSSION

souches sont résistantes aux effets de salinité, température, stress hydrique et aux antibiotiques.

Les résultats obtenus jusque-là démontrent l'efficacité des souches de *Pseudomonas spp. fluorescens* comme de agents de biocontrôle, biofertilisant et phytostimulateurs. Ceci laisse envisager la possibilité de les exploiter comme des inoculas bactériens dans les prochaines études expérimentales en agriculture dans l'objectif de produire des biopesticides.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses et multiples :

- Effectuer une identification plus poussée et fiable par des moyens moléculaires tels que le PCR et le séquençage complet ou partiel pour mieux caractérisée les isolats les plus actifs.
- Identification phénotypique plus sophistiquée via la galerie api20NE et BIOLOG GEN III et génotypique

- _ L'introduction de ces souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* comme agent de biocontrôle dans de nouvelles rhizosphères à grande échèle

- _ Effectuer une identification plus poussée et fiable par des moyens moléculaires tels que le PCR et le séquençage complet ou partiel pour mieux caractérisée les isolats les plus actifs.

- La recherche d'autres métabolites secondaires à l' origine de ces effets bénéfiques.

- _L'extraction et la purification des métabolites secondaires responsables de l'activité inhibitrices des *Pseudomonas*.

- La recherche des gènes impliqués dans la production des métabolites secondaires.

- Etudier l'effet de la salinité sur les activités promotrices de la croissance végétale (solubilisation des phosphates, production d'HCN, activité antifongique,...).

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait Kettout, A. et Rahmania, F. (2013).** Contribution à l'étude de l'activité toxique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud.
- Aftab Afzal et Asghari Bano (2008).** *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). International Journal of Agriculture & Biology, 85-88.
- Ahemad, M. & Kibret, M. (2013).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King Saud University-Science 26(01): 1-20.
- Ahmad, I., Pichtel, J., & Hayat, S. (2008).** Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Al-Khayri J.M. (2005).** Date palm *Phoenix dactylifera* L. In: Jain SM, Gupta PK (eds.) Protocols of somatic embryogenesis in woody plants. Springer, Netherlands, pp 309–319.
- Asmussen C.B., Dransfield J., Deichmann V., Barfod A., Pintaud J.C. et Baker W.J. (2006).** A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae) : evidence from plastid DNA phylogeny. Botanical Journal of Linnean Society 151: 15-38.
- _Anita B. & Samiyappan R., (2012).** Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against microwave heat treatment. Korean J. Chem. Eng., 27, 1377-1383.
- Antoine Blanchard et Flora Limache (2005).** Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). DAA protection des plantes et environnement.
- _Antoun, H. & Prévost, D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization, Springer, Dordrecht 1-38.
- Babaei N. et Shabanimofrad M. (2018).** Genetic Diversity and Population structure of selected *Phoenix dactylifera* L. Genotypes in Iran. Adv. Biores., Vol 9 [2] :90-98.
- _Babahani, S. (2011).** Analyse biologique et agronomique de palmiers mâles et conduite de l'éclaircissage de fruits chez les cultivars Gharss et Deglet Nour. Thèse de Doctorat, ENSA, Alger.
- _Balthazard, M.G., Newton, C, Ivorra, S., Tengberg, M., Pintaud, J.C., Terral, J.F. (2013).** Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). État de l'art et perspectives d'étude. Revue d'ethnoécologie, 4 :1-15.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- _Blaha, D. Prigent-Combaret, C. Mirza, M. S. and MoenneLoccoz, Y. (2006).**“Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acd S* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography,” *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 56, no. 3, pp. 455–470.
- Bedjaoui, H. et Benbouza, H. (2018).**Assessment of phenotypic diversity of local Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Paper in press.
- _Benchabane M., 2005.** Caractérisation des effets d’antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents. Thèse Doctorat d’état, FSB-USTHB, Alger, 235 p.
- Benzohra, I.E., Megateli, M. et Berdja, R. (2015).**Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management. *African Journal of Biotechnology*, 14(7): 542 - 550.
- _Berendsen R.L., Pieterse C.M. et Bakker .A.H.M., 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*.V:17, NO.8:478-486.
- Benlarbi L., 2019.**Contribution à l’étude de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier et moyens de lutte. Thèse de doctorat .Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.175
- _Bloemberg, G. and B. Lugtenberg, (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.*, 4: 343-350-
- _Bossis E., Lemanceau P., Latour X. et Gardan L., 2000.**The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20, 51-63.
- Bouguedoura, N., Bennaceur, M., Babahani, S., Benziouche, S.E. (2015).** Date palm status and perspective in Algeria. In: Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. (eds). *Date Palm Genetic Resources and Utilization*, vol 1: Africa and the Americas Springer, Dordrecht, 1: 125-168.
- Bouguedoura, N. (1991).**Connaissance de la morphogenese du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Etude in situ et in vitro du developpement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur. Alger: USTHB.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Boussalah, N., Touzani, R., Souna, S., Himri, I., Bouakka, M., Hakkou, A., Ghalem, S. et El Kadiri, S. (2013).** Antifungal activities of amino acid ester functional pyrazolyl compounds against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Journal of Saudi Chemical Society, 17: 17 -21.
- _ **Bouzid S., 2010.** Étude de l'effet de la salinité et de la présence du molybdène Sur le comportement écophysiological de deux variétés de plantes de l'espèce *Phaseolus vulgaris* L. Université Mentouri Constantine FSNV N° d'ordre : 081/ mag/ 2010 N° de série : 004/ SN/ 2010.
- **Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R. (1998).** A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. Appl. Environ. Microbiol. 64(10):3663-3668.
- _ **Buyer J.S., Teasdale J.R., Roberts D.P., Zasada I.A. et Maul J.E., 2010.** Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems, Soil Biol. Biochem., 42: 831-841.
- _ **Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A. and Sahin, F. (2006).** Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil.
- **Charde A. & Dawande A.Y., (2010).** Purification and characterization of proteinaceous compound from *Pseudomonas fluorescens* (ATCC948). Asiatic J. Biotechnol. Resour., 1, 20-22.
- _ **Cook, R. et Baker, K. (1974).** Biological control of plant pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA. 380 pages.
- **COURVALIN P. LECLERCO R. (2012).** AntibioGramme. 3eme édition, Editions ESKA, P800
- **Daddi Bouhoun M., Saker M. L., Ould El-Hadj M. D. et Brinis L., 2013.** Impact of hydro-edaphic stress on rooting and productivity of "Deglet Nour" date palm of the Ouargla basin (Northern Algerian Sahara). First IS on Date Palm. Acta Horticultura. ISHS, 994: 93-97.
- **Daddi Bouhoun M., 2010.** Contribution à l'étude de l'impact de la nappe phréatique et des accumulations gypso salines sur l'enracinement et la nutrition du palmier dattier dans la cuvette d'Ouargla (Sud Est Algérien), Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar, Annaba.
- **Daddi Bouhoun M., Saker M. L., Ould El-Hadj M. D. et Brinis L., 2013.** Impact of hydro edaphic stress on rooting and productivity of "Deglet Nour" date palm of the Ouargla basin (Northern Algerian Sahara). First IS on Date Palm. Acta Horticultura. ISHS, 994: 93-97.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- _Devanesan M.G., Viruthagiri T. & Sugumar N., (2007).** Transesterification of Jatropha oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.*, 6, 24972501.
- Dransfield J., Uhl N.W., Asmussen C.B., Baker W.J., Harley M.M. et Lewis C.E. (2008).** *Genera Palmarum. The evolution and classification of palms.* Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, U.K, 732 p.
- Elhoumaizi M.A. 2002.** Modélisation de l'architecture du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et application à la simulation du bilan radiatif en oasis. Thèse de doctorat d'état Es-Science (Option : Biologie végétale). Université Cadi Ayyad. Marrakech.
- Elshurafa, M. Y. (2020).** Palmier dattier l'arbre entier. Agro Supplies & Development C Ouennoughi, M., & Dubost, D. (2005).Le voyage forcé des dattiers en Nouvelle-Calédonie. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 16(4), 241-246.o.
- El Modafar, C. (2010).** Mechanisms of date palm resistance to Bayoud disease:Current state of knowledge and research prospects. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 287-294.
- _Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S. and Sahin, F. (2002).** Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu 142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum* blight) of apricot. *Garten bauwissens chaft*. 67(4):139–142.
- _FAO. (2014).** Food and Agriculture Organization of the United Nation. (<http://www.faostat.fao.org>).
- _FAOSTAT. (2014).** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division, <http://www.fao.org/faostat/fr/#data> consulté en août 2017.
- _Ferchichi, A., Hamza, H. (2008).** Le patrimoine génétique phoenicoles des oasis continentales tunisiennes. Institut des Régions Arides, Médenine, 302p.
- Fernando, W., Nakkeeran, S. et Zhang, Y. (2006).** Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. Dans: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (Siddiqui, Z.A.), Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 67-109.
- _Fierer N., Schimel J.P., et Holden P.A., 2003.** Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.*, 35: 165-176.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gagnon, Y. (2015).** Le sol et les processus naturels de nutrition des plantes. Association Manger Santé Bio. [En ligne]. <http://www.mangersantebio.org/18623/le-sol-et-les-processus-naturels-de-nutrition-des-plantes>.
- Gao G.et al., (2012).** Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *Plos One*, 7, e31806, doi:10.1371/journal.pone.0031806.
- _Grover M.S., Ali k.Z., Sandhya V., Rasul A. et Venkateswarlu B., 2010.** Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol.Biotechnol.* Doi: 10.1007/s11274-010-0572-7.
- Gros Balthazard M.,Newton C.,IvorraS.,Teng berg M.,Pintau d J. C.,Terral J.F.,2013.** Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Revue d'ethnoécologie*(4):5-6
- _ Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol.* Volume 7(2), 96-102.
- Haas, D. and Defago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319.
- Haas, D., and Keel, C., 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*41: 117–153.
- Hamza K., Bouali H., Bouras N., Bouallala M., Badji B., Klenk H.P. eSabaouN., 2018.** Effets des monosaccharides sur la croissance et la production de chloramphénicol chez deux souches de *Saccharothorax longispora*. *African Review of Science, Technology and Development* V 03, N.01.pp.38-50
- _Hannachi, S., Benkhalifa, A., Khitri, D., Brac De La Perrière, R.A. (1998).** Inventaire variétal de la palmeraie Algérienne. Sélection et impression, Anep Rouiba Algérie, pp -225.
- Hopkine W., 2003.** *Physiologie végétale*. 1ère Ed. Deboeck. Larcier. S.A. Bruxelles.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

_Hussain N., Alghanim G. A. R., Ahmed M., El-Shariefet O. A. et Waheed R.,2010.

Salinity management in Oman and in the region. Proceeding of the international conference on soil and groundwater salinization in arid countries. 37-49.

-**INPV.** (2011). Institut National de la Protection des végétaux. Bulletin d'informations phytosanitaires n° 23. ISSN 1112-2536. P: 3.

_Jain, A. Singh, A. Singh, S. and Singh, H. B.(2013). “Microbial consortium-induced change in oxidative stress marker in pea plants challenged with *Sclerotinia sclerotiorum*,” *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 32, No.2, pp.388–398.

_Jain A, Singh, A. Singh, S. Sarma, B.K.and Singh, H.B. (2015). “Biocontrol agents mediated suppression of oxalic acid induced cell death during *Sclerotinia sclerotiorum*-pea interaction,” *Journal of Basic Microbiology*, vol. 55, no.5, pp.601–606.

_Jain, A. Singh, S. Kumar Sarma, B. and Singh, H. B. (2012). Bahadur Singh, “Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*.” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 112, no. 3, pp. 537–550.

_Jofre, E., Lagares, A. and Mori, G. (2004). Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 231(2):267-275.

-**Johnson, D. V. (2011).** Date palm biotechnology from theory to practice. In: S. M. Jain, J. M. Al-Khayri and D. V. Johnson (Eds.), pp. 1-11. *Date Palm Biotechnology*, Springer, Dordrecht.

_Josephson K. L., Gebra C. P. et Pepper I. L., 2000. Cultural methods.. In Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba (ed.), *Environmental microbiology*. Academic Press, London. pp: 213- 217.

- **Khenfar B. 2004** : contribution à l'étude de quelques caractéristiques morphologiques de quatre cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) dans la région Drah (Biskra). Mémoire d'ingénieur. Département d'agronomie. Université de Batna.

_Lauber C.L., Hamady M., Knight R., et Fierer N., 2009 .Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of soil bacterial community structure at the continental scale:, *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5111-5120.

-**Lepoivre, P. (2003).** *Phytopathologie: bases moléculaires de biologie des pathogènes et fondement des stratégies de lutte*. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, 149 - 167.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Lynch J.M., Wipps J.M., 1990 - Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. 129.

_Malek F,(2015). Interaction microbienne cours assuré aux Master II microbiologie et Magistère Maîtrise de la qualité et du développement microbien. Université de Tlemcen. P :17.

-Matallah, M. A. (2004). Contribution à l'étude de la conservation des dattes de la variété Deglet-Nour: Isotherme d'adsorption et de désorption. *INA El-Harrach* Alger.

-Matallah, M.,2004.Contribution à l'étude de la conservation des dattes de la variété Deglet-Nour.Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Agronomie. Spécialité Technologie Alimentaireà l'I.N.A.Alger

_Mazereeuw-Hautier J., (2006). Formation médicale continue : impétigo. *Ann. Dermatologie Vénérologie*, 133,194207.

_Mc Gahan D.G., Southard R.J., et Zasoski R.J., 2014. Rhizosphere effects on soil Solution composition and mineral stability, *Geoderma*, 226–227: 340–347.

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

-Mezaache S., 2012. Localisation des Déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. Thèse Doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif (Algérie). p.

_Moradi A., Tahmourespour A., Hoodaji M., Khorsandi F., 2011. Effect of salinity on free living-diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. *Afr. J. Microbiol. Res.* 05(2): 144-148.

_Ngumbi, E., Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology* 105(2016): 109-125
tropical deciduous forest, *Global. Ecol. Biogeog.*, 14: 241–248.

_Noguez A.M., Arita H.T., Escalante A.E., Forney L.J., Garcia-Oliva F. et Souza V., 2005. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a

_Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. and Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111(1):38-43.conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38(6):1482-1487.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ouennoughi, M. (2004).** *Maintien des pratiques de cultures phoenicicoles oasiennes.*
- Ongena M. et al., (2005).** Isolation of an N-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, 562-569. *ris: univ. Paris VIII.*
- Palleroni, N, 1986.** *Pseudomonas* bergey's of systematic Bacteriology. Krieg, N.R. and Hot.G.(editors) Baltimore: the Williams Co : 141-199;
- _Parray J., A., Jan S., Kamili A.,N., Qadri R., A., et al. (2015).** Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul* 121 : 325-334.
- Peyron G., 2000.** *Cultiver le palmier-dattier.* Editions Quae (France), 113 p.
- Peyron G. 2000.** *Cultiver le palmier-dattier.* Editions Quae. pp : 110.
- Philippot L., Raaijmakers J. M ., Lemanceau Wim P. H. et Putten V., 2013.** Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY.V:11.789-791.*
- Ploetz, C. R. (2003)** Diseases of tropical fruit crops. Chap. 9 diseases of date. Ed. Cabi. p-527.
- _RAI A., 2017.** Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin, Université Ferhat Abbas Sétif.
- _Rangarajan S., Saleena L.M. et Nair S., 2002.** Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants in coastal agri-ecosystems. *Microb. Ecol.*, 44: 271-277.
- Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. and Paull, R.E. (2004).** **Microbial** antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(2):193-203.
- _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
- Rubin, R.L., Groenigen, K.J.V. & Hungate, B.H. (2017).** Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011, USA, pp. 15.
- Saharan BS. et V. Nehra (2011).** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, Volume 2011: LSMR-21.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Haas, D. and Defago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319.
- Sedra, M.H. et Zhar, N. (2010).** Genetic Variability Analysis of Populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Causal Agent of Bayoud Disease of Date Palm and Other *Fusarium oxysporum* Using Molecular Techniques. *Acta Hort*, 882: 491 - 504.
- Sedra, My. H. (2006)** La maladie du Bayoud sur le palmier dattier, apparition; impact; propagation et conditions; méthodes de diagnostic et de lutte; recherches et perspectives. (en arabe) L'association arabe sur le développement agricole. AOAD. p- 77.
- Siala, R., Ben Chobba, I., Vallaey, T., Triki, M.A., Jrad, M., Ayedi, I., Elleuch, A., Nems, A., Cerqueira, F., Cheffi, M., Gdoura, R., Drira, N. et Gharsallah, N. (2016).** Analysis of the cultivable endophytic bacterial diversity in the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and evaluation of its antagonistic potential against pathogenic *Fusarium* species that cause date palm Bayoud disease. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 4(5): 93 - 104.
- _Singh, A. Jain, A. Sarma, B.K. Upadhyay, R.S. and Singh, H.B. (2014).** "Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfsii* infection," *Microbiological Research*, vol. 169, no. 5-6, pp. 353–360.
- Singh, S. R., D. Joshi, et al. (2017).** Plant Growth-Promoting Bacteria: An Emerging Tool for Sustainable Crop Production under Salt Stress. *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*, Springer: 101-131.
- Sghir, F., Touati, J., Mouria B., Touhami, A.O., Filali-Maltouf, A., El Modafar, C., Moukhli, A., Benkirane, R. et Douira, A. (2016).** Variation in pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* on two cultures associated with date palm of Moroccan oasis. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 2(3): 56 - 68.
- Sghir, F., Touati, J., Chliyeh, M., Mouria B., Touhami, A.O., Filali-Maltouf, A., El Modafar, C., Moukhli, A., Benkirane, R. et Douira, A. (2015).** Effect of *Trichoderma harzianum* and endomycorrhizae on the suppression of *Fusarium* wilt in plants of two date palm varieties: Majhoul and Boufeggous. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry (IJAPBC)*, 4: 378 -396.
- _Smalla K., Wieland G., Buchner A., Znock A., Parzy J., Kaiser S., Rooskot N., Heueret H., Berg G., 2001.** Bulk and rhizosphere soil bacteria communities studied by

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

denaturing gradient gel electrophoresis; plant- dependant enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 47442-4751.

_ **Spiers A.J., Buckling A. et Rainey P.B., 2000.** The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol.* 146: 2345–2350.

- **Stijn Spaepen, Sofie Dobbelaere, Anja Croonenborghs, Jos Vanderleyden (2008).** Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil*, 15–23.

- **Suty L., (2010).** La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques Sciences en partage. Editions Quae, Paris, 328 p.

- **Vacheron, J., Desbrosses, G & Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. et al. (2013).** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front Plant Sci.* 4(356): 1-19.

- **Van Loon, L.C., (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119: 243-254.

- **Venturi V., Keel C., 2016.** Signaling in the rhizosphere, *Trends Plant Sci* 21(3):187–198.

- **Weller, D. M. and L. S. Thomashow (1994).** "Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere." *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs:* 1-18.

_ **Whipps, J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.

- **Yukie H. C., Stuhlberger O. S., 2011.** Desertification. *CNULD, Zoi Environment Network.* 54

_ **Zhou X.G., Wu F.Z., et Xiang W.S., 2014** Syringic acid inhibited cucumber seedling growth and changed rhizosphere microbial communities, *Plant soil Environ.*, 60: 158–164.

ANNEXES

Annexe 01

I. Les accessoires et les verreries utilisées

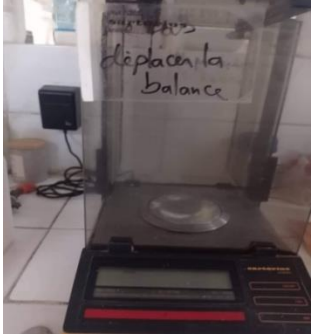



- ❖ Anse de platine.
- ❖ Barreau magnétique.
- ❖ Bistouri stérile
- ❖ Embout bleu
- ❖ Le nom d'accessoire et de verreries
- ❖ Becher graduée de 100ml et 500ml.
- ❖ Embout jaune.
- ❖ Eprouvette graduée de 10ml, 20ml et 250ml
- ❖ Erlenmeyer de 1000ml et 2000ml.
- ❖ Fiole conique graduée de 250ml.
- ❖ Flacons stérile de 250ml.
- ❖ Lame en verre.
- ❖ Entonnoir.
- ❖ Lamelle en verre.
- ❖ Portoir.
- ❖ Papier Wattman.
- ❖ Pipette Pasteur.
- ❖ Spatule.
- ❖ Tubes à essaie
- ❖ Seringue stérile.









ANNEXES

Annexe 02

I. Appareillages

<p>Balance</p>	 A photograph of an analytical balance. The balance is black and silver, with a weighing pan on top. A handwritten label on the glass enclosure reads "déplacement balance".
<p>Etuve</p>	 A photograph of a white laboratory oven. It has a digital display on the top left and a handle on the right side.
<p>Spectrophotomètre</p>	 A photograph of a UV-1601 spectrophotometer. The device is white and yellow, with a digital display showing "0000" and "0.000 ABS". The model number "UV-1601" is visible on the front panel.
<p>Microscope optique</p>	 A photograph of an optical microscope. It is a compound microscope with a white base and black eyepieces and objective lenses.

ANNEXES

<p>Lampe UV</p>	
<p>Bec bunsen</p>	
<p>Micropipette</p>	
<p>Agitateur magnétique</p>	
<p>Réfrigérateur</p>	
<p>Autoclavage</p>	

ANNEXES

Annexe 03

I. Les milieux de culture

Le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes, à une température d'environ 120°C. Ces ingrédients sont pour 1 litre d'eau distillée. Il est ensuite placé à température ambiante afin de le refroidir pour le manipuler plus facilement et surtout afin d'éviter la condensation sur les couvercles des boîtes de Pétri.

Milieu King B (KB) (King et al., 1954) Peptone: 20g Glycerol: 15ml K ₂ HPO ₄ : 1,5g MgSO ₄ : 1,5g Agar: 20g pH=7,2	Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthorpe et Booth, 1983) Pomme de terre : 200g Dextrose : 20g Agar : 20g pH=7
Milieu gélatine (Lelliot et Stead, 1987) Extrait de levure : 3g Peptone : 5g Gélatine : 120g pH=7	Bouillon Mueller-Hinton Peptone.....17.5g Extrait de viande....2g Amidon.....1.5g pH=7.3
Milieu LBT (Luria Bertani enrichi du tryptophane) (Gardan et Luisetti, 1981) Bactotryptone : 10g Extrait de levure : 5g NaCl: 5g Agar: 20g L-tryptophane: 5g pH=7	Bouillon nutritif Tryptone : 10g Extrait de viande : 5g NaCl : 5g

ANNEXES

Annexe 04

Les tableaux des résultats

Tableau 02 : les caractères macroscopiques des trente-cinq souches *pseudomonas spp* fluorescents isolées du palmier dattier

La souche	Taille	Aspect	Forme	Bord	Opacité	Pigment
KH1	0.3	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH2	0.3	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH3	0.3	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH4	0.5	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KH5	0.4	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH6	0.2	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH7	0.2	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH8	0.6	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH9	0.2	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH10	0.2	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH11	0.3	Rugueuse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH12	0.3	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH13	0.5	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH14	0.4	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KH15	0.3	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KH16	0.2	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KT1	0.1	Rugueuse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KT2	0.3	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KT3	0.4	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KT4	0.5	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KT5	0.3	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KT6	0.1	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KT7	0.6	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KT8	0.6	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KT9	0.5	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert

ANNEXES

KT10	0.2	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KT11	0.5	Rugueuse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KF1	0.3	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KF2	0.4	Rugueuse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KF3	0.4	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KF4	0.3	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KF5	0.2	Lisse	Circulaire	Ondulé	Opaque	Jaune vert
KF6	0.5	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KM1	0.4	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert
KM2	0.2	Lisse	Circulaire	Régulière	Opaque	Jaune vert

Tableau 04 : Les résultats de test de l'Activité antagoniste des souches vis-vis le *Foa* et *Fol* dans deux milieu PDA et King B.

Milieu	Milieu PDA				Milieu King B			
	Diamètre de FOA en cm	Taux d'inhibition de FOA (%)	Diamètre de FOL en cm	Taux d'inhibition de FOL (%)	Diamètre de FOA en cm	Diamètre de FOA en cm	Diamètre de FOL en cm	Taux d'inhibition de FOL (%)
KT5	4	31.03	4.4	26.66	3.2	36	3.8	15.55
KH13	3	48.27	3	50	3	40	3.2	28.88
KH4	3	48.27	3.3	45	4	20	2	55.55
KT1	6.5	12.06	5	16.66	5	0	4.3	4.44
KH16	4.5	31.03	4.5	25	4	20	4.3	4.44
KF4	4.3	25.86	4.3	28.33	4	20	3.4	24.44
KF5	3.4	41.37	3.4	43.33	2	44	4.3	4.44

ANNEXES

Tableau 05 : résultats du stress thermique :

La souche	La température en C°				
	4 C°	15 C°	30 C°	42 C°	45 C°
KT5	-	+	+	+	+
KH13	-	+	+	+	+
KH4	-	+	+	+	+
KT1	-	+	+	+	+
KH16	+	+	+	+	+
KF4	+	+	+	+	+
KF5	+	+	+	+	+

Tableau 06 : résultats du stress hydrique.

La souche	La concentration de PEG (%)			
	0%	20%	40%	60%
KT5	1.395	0.765	0.630	0.273
KH13	0.540	0.432	0.365	0.354
KH4	0.777	0.594	0.453	0.344
KT1	0.854	0.783	0.646	0.472
KH16	0.944	0.644	0.634	0.316
KF4	1.304	0.920	0.640	0.386
KF5	1.044	0.769	0.651	0.318

Tableau 07 : résultats de la résistance au chlorure de sodium

La souche	La concentration de Na Cl				
	0M	0.3M	0.5M	0.8M	1M
KT5	+	+	+	+	+
KH13	+	+	+	+	+
KH4	+	+	+	+	+
KT1	+	+	+	+	+
KH16	+	+	+	+	+
KF4	+	+	+	+	+
KF5	+	+	+	+	+

ANNEXES

Tableau 08 : les résultats du témoin (les souches sans antibiotique)

La souche	Concentration sans antibiotique		
	25%	50%	100%
KT5	Crème	Crème	Crème
KH13	Crème	Crème	Crème
KH4	Crème	Crème	Crème
KT1	Crème	Crème	Crème
KH16	Crème	Crème	Crème
KF4	Crème	Crème	Crème
KF5	Crème	Crème	Crème

Tableau 09: résultats de la résistance des souches à la pénicilline

La souche	Concentration de la pénicilline		
	25%	50%	100%
KT5	Crème	Crème	Crème
KH13	Crème	Crème	Crème
KH4	Crème	Crème	Crème
KT1	Crème	Crème	Crème
KH16	Crème	Crème	Crème
KF4	Crème	Crème	Crème
KF5	Crème	Crème	Crème

Tableau 10 : résultats de la résistance des souches au acide fusidique

La souche	Concentration d'acide fusidique		
	25%	50%	100%
KT5	Crème	Crème	Crème
KH13	Crème	Crème	Crème
KH4	Crème	Crème	Crème
KT1	Crème	4 colonies	sensible
KH16	27 colonies	36 colonies	Crème
KF4	Crème	Crème	Crème
KF5	Crème	Crème	Crème

ANNEXES

Tableau 11 : résultats de la résistance des souches à l’Aztreonam

La souche	La concentration d’Aztreonam		
	25%	50%	100%
KT5	Crème	Crème	Crème
KH13	Crème	Crème	Crème
KH4	45 colonies	69 colonies	Crème
KT1	Crème	Crème	Crème
KH16	Crème	Crème	Crème
KF4	Crème	Crème	Crème
KF5	Crème	Crème	Crème