

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

Présentée pour l'obtention du Diplôme de
DOCTORAT D'ETAT

En Sciences de la Nature
Spécialité : Microbiologie

Par

BENCHABANE Messaoud

**CARACTERISATION DES EFFETS D'ANTAGONISME MICROBIEN ET DE
PROMOTION DE LA CROISSANCE VEGETALE DE SOUCHES DE
Pseudomonas spp. FLUORESCENTS**

Soutenue publiquement le 21 Juin 2005 devant le jury:

M ^{me}	Nadia BOUGUEDOURA	Professeur (USTHB)	Président
M.	Rabah BAKOUR	Professeur (USTHB)	Directeur de Thèse
M.	Hocine HACENE	Professeur (USTHB)	Examineur
M.	Nassr Eddine SABAOU	Professeur (ENS, KOUBA)	Examineur
M ^{me}	Fatiha AID	Professeur (USTHB)	Examinatrice
M.	Philippe LEMANCEAU	Directeur de Recherche (INRA - DIJON)	Examineur
M.	Ammar BOUTEKRAFT	Professeur (Université de BLIDA)	Examineur

REMERCIEMENTS

Mes vifs remerciements vont d'abord à mon Directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Rabah BAKOUR**, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Je lui suis également reconnaissant pour sa disponibilité même dans les périodes difficiles, ses qualités humaines, pédagogiques et scientifiques. Ses remarques pertinentes et éclairées m'ont permis de mieux structurer mes idées et, je l'espère, de mieux les décrire. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse toute ma gratitude et mon plus profond respect. Je le remercie enfin de m'avoir appris de nombreuses expressions qui resteront à jamais dans ma mémoire.

Un grand merci pour **Philippe LEMANCEAU**, qui a rendu possible la réalisation de cette thèse; pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé au sein de son équipe et de mettre à jour mes connaissances dans le domaine. J'ai apprécié sa disponibilité, l'autonomie et la confiance qu'il m'a accordées; je le remercie pour m'avoir permis de participer aux activités de recherche du laboratoire. Un grand merci pour son aide scientifique et ses orientations qui m'ont permis de progresser dans la réalisation de cette étude, sa patience, ses encouragements et son amitié. Je ne pourrai oublier ses qualités humaines, en se privant les week-ends, et même et chez lui, pour finaliser ce travail.

Je suis très honoré que **Pr. BOUGUEDOURA Nadia**, a accepté de présider le jury; je lui adresse ma profonde gratitude.

Que les membres du jury qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps, en cette période chargée, pour examiner ce travail trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude, leur participation constitue pour moi un honneur:

Pr. Fatiha AID; Pr. Nassr Eddine SABAOU; Pr. HACENE Hocine; Pr. Philippe LEMANCEAU et Pr. Ammar BOUTEKRABT,

Madame Thérèse CORBERAND qui a contribué à l'accomplissement de cette recherche; je la remercie tout particulièrement pour ses encouragements, pour les manipulations de biologie moléculaire au laboratoire, de l'UMR-MGS (INRA.Dijon). Je ne saurai oublier sa disponibilité et sa bonne humeur, ce qui est fort appréciable. Un grand merci pour ton aide, ton amitié et tes encouragements sans cesse. Merci Thérèse pour ton amitié.

Mes remerciements pour **Pr. SABAOU NE**, pour son aide et ses précieux conseils dans la partie d'extraction des composés phénaziniques, réalisée au sein de son laboratoire (ENS, Kouba).

Mes vifs remerciements s'adressent en particulier à **Mme SYLVIE LEMANCEAU**, qui durant mes séjours à DIJON m'a toujours réservé un accueil chaleureux et familial, et comment peut-on oublier les balades avec la charmante **LEILA**, sans oublier sa **Mamie**. Que toute **la famille LEMANCEAU** trouve ici mon profond respect.

Un grand merci pour **Bernard DIGAT**, pour avoir accepté une de nos ingénieurs dans son laboratoire et pour toute l'aide et les services rendus.

J'adresse mes remerciements à l'équipe de recherche, dirigé par **Pr. LEMANCEAU**, particulièrement **Sandrine DELORME**, qui m'a énormément encouragé et pour son travail de recherche qui m'a aidé et éclairé dans la structuration de ce travail.

Je remercie tous les chercheurs du centre INRA (Dijon) qui ont consacré un peu de leur précieux temps pour leur disponibilité; J'ai eu le grand plaisir de participer aux discussions scientifiques avec **C. ALABOUVETTE, C. STEINBERG, V. EDEL, S. GIANIANZI**. Mes remerciements, s'adressent à **JANISZ** qui m'a facilité les séjours à l'INRA (Dijon). Merci **Nadine GAUTERON** pour ton aide au laboratoire.

Mes vifs remerciements s'adressent au **Pr. CHRISTOPHE KEEL**, du Laboratoire de Biologie microbienne, Université de Lausanne (SUISSE) de pour la souche modèle CHA0 et ses mutants, ainsi que **Pr THONART** (Université de Belgique) pour avoir accepté une de mes stagiaires dans son laboratoire.

Une partie de ce travail a été réalisée grâce au concours de **I'ANDRU**, dans le cadre du projet de recherche **N° AU 39902**.

Une thèse, tant nominative soit elle, est avant tout un travail de réflexion collectif et c'est avec un grand plaisir que je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé, sous ma direction, à ce travail : **Larbaoui A** et **Ainouz N**, (Ingéniorat et Magistère) **BENSAID F** (Magistère) **Abdelmoumen A**, **Ameur Dj** et **Hadadi F**, **Zahra H** et **Chennaoui N**. (Ingéniorat).

Un grand Merci pour la formidable et sympathique équipe du laboratoire de génétique (FSB-USTHB), particulièrement **Y. MESSAI**, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Que **KARIMA** trouve ici mes vifs remerciements, sans oublier le dynamique **HASSEN**.

Mme BAKOUR N, qu'elle trouve ici mes remerciements et mon profond respect, pour son accueil chaleureux et sa disponibilité et pour les désagréments causés en privant la famille, même les week-ends, de M. BAKOUR.

Je tiens à remercier par ces quelques lignes toutes les personnes grâce auxquels cette thèse a abouti. **Je remercie tous les collègues** pour les encouragements et leur aide, particulièrement **Djamila** et **Samia**.

Je ne pourrai oublier d'adresser mes remerciements aux amis **GUETARNI D** et **KHALI M**.

Un grand merci pour **Ali RABHI** et **BENDAR Hocine** pour leurs encouragements sans limite.

Comment peut-on oublier **DALILA**, durant toutes ces années tu as subi et accepté (sans trop protester) mes horaires, mes contraintes ainsi que tous le temps passé pour réaliser ce travail. Merci pour ton soutien quotidien, pour tes encouragements, ta compréhension et ton aide; je te suis reconnaissant. Je suis heureux de partager cette thèse avec toi. Je te dédie ce travail qui a vu le jour grâce à tes encouragements interminables.

Ce travail je le dédie particulièrement à mes parents et à ma famille.

A ma Mère

A mes Enfants (mes chandelles) :

KATIA, KENZA ET GHILES.

A la mémoire d'El Hadja.

LIST DES TABLEAUX

CHAPITRE I :

Tableau I.1 :	Phylogénie et classification des <i>Pseudomonas</i>
Tableau I.2 :	Exemples d'induction de la résistance systémique chez quelques plantes vis-à-vis de différents agents pathogènes par des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.
Tableau I.3 :	Exemples de métabolites spécifiques impliqués dans le biocontrôle de maladies de plantes

CHAPITRE II

Tableau II- 1 :	Nombre et Origine des souches bactériennes retenues
Tableau II- 2 :	Souches de référence
Tableau II-3 :	Répartition des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents selon les biotopes
Tableau II-4 :	Identification spécifique des souches sélectionnées
Tableau II.5 :	Spectres de réponses aux tests spécifique et infraspécifique selon les clés dichotomiques (A) et (B)
Tableau II.6 :	Répartition spécifique et infraspécifique des souches sélectionnées
Tableau II.7 :	Effectif et souche des différentes classes du dendrogramme
Tableau II.8 :	Résultats des caractères en pourcentages
Tableau II.9 :	Coordonnées du dendrogramme
Tableau II.10 :	Caractères trophiques discriminants entre les huit classes du biotope viticole (%).
Tableau II.11 :	Caractères trophiques discriminants entre les trois classes du biotope palmeraies (%).
Tableau II.12 :	Coordonnées du dendrogramme des souches du biotope de palmeraies
Tableau II.13 :	Coordonnées du dendrogramme des souches du biotope sol non cultivé
Tableau II. 14 :	Caractères discriminants entre les trois classes du biotope son non cultivé (pourcentages)

CHAPITRE III

Tableau III.1 :	Nombre et taux des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents productrices de métabolites secondaires
Tableau III.2 :	Influence des milieux de culture sur la production de sidérophores ($\mu\text{g/l}$)
Tableau III.3 :	Influence du pH sur la production de sidérophores ($\mu\text{g/l}$)
Tableau III.4 :	Influence de Cu^{+2} et de Fe^{2+} sur la synthèse de sidérophores ($\mu\text{g/l}$) et la croissance bactérienne
Tableau III.5 :	Activités antagonistes <i>in vitro</i>
Tableau III.6 :	Activités d'antagonisme des souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> contre les micro-organismes – test sur quatre milieux de culture.
Tableau III.7 :	Caractéristiques des extraits des filtrats de souches P6, D2 A6 et CHA0 de <i>Pseudomonas</i> spp.
Tableau III.8 :	Résultats des révélations chimiques des composés à effet antibiotique des souches de <i>Pseudomonas</i> .
Tableau III.9 :	Révélation microbiologiques des différents extraits méthanoliques des cellules des <i>Pseudomonas</i> .

CHAPITRE IV

Tableau IV.1 :	Fréquences * (%) des souches résistantes aux antibiotiques
Tableau IV.2 :	Taux de croissance <i>in vitro</i>
Tableau IV.3 :	Taux de survie des inoculums bactériens (%)

CHAPITRE V

Tableau V.1 :	Origine des souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> testées
Tableau V.2 :	Origine des Isolats fongiques phytopathogènes
Figure V.2.1 :	Exemple d'un traitement conduit en Split
Figure V.2.2 :	Dispositif expérimental de l'essai de l'induction systémique de la résistance (ISR)
Tableau V.3.1 :	Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne sur le milieu PDA.
Tableau V.3.2 :	Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne sur le milieu KB.
Tableau V.3.3 :	Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne sur le milieu (PDA + KB)
Tableau V.4 :	Inhibition (%) de la germination conidienne
Tableau V.5 :	Inhibition (%) de l'élongation du tube germinatif
Tableau V. 6 :	Effet de la bactérisation sur l'induction systémique de la résistance.
Tableau V.7 :	Effet de la bactérisation par les souches de <i>Pseudomonas</i> sur l'activité PAL des plants infectés

CHAPITRE VI

Tableau V .1 :	Souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Tableau V.2 :	Gains (%) en poids frais de la partie aérienne et des tubercules par rapport aux témoins
Tableau V.3 :	Effet de la bactérisation sur les paramètres de croissance du blé gains (%) obtenus
Tableau V.4 :	Gains (%) en croissance chez le haricot par rapport aux témoins non bactérisés
Tableau V.5 :	Gains (%) en croissance chez la tomate par rapport aux témoins non bactérisés

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

- Figure I.1 : Phylogénie des Proteobactéries
Figure I.2 : Description des effets bénéfiques des rhizobactéries PGPR sur les plantes
Figure I.3 : Catabolisme des hexoses et des polyols (A), des acides organiques et des acides aminés (B) chez les *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes à oxydase positive.
Figure I.4 : Métabolites secondaires et autres composés produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents.
Figure I.5 : Structures de quelques métabolites bactériens impliqués en lutte biologique
Figure I.6 : Régulation de l'assimilation du fer par la synthèse de sidérophores chez les microorganismes
Figure I.7 : Mécanismes de formation du complexe récepteurs membranaires- ferrisidérophores
Figure I.8 : Différentes structures des homosérine lactone.
-

CHAPITRE II

- Figure II.1 : Schéma général de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens-putida*
Figure II.2 : Clés dichotomiques d'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents :
Figure II.3: Répartition spécifique et infraspécifique des souches de *Pseudomonas* spp. isolées des sept biotopes.
Figure II.4 : Dendrogramme des 90 souches.
Figure II.5 : Dendrogramme des souches issues du biotope viticole
Figure II.6 : Dendrogramme de dix souches issues du palmier dattier
Figure II.7 : Dendrogramme de dix souches issues du sol non cultivé réparties en 33 classes
-

CHAPITRE III

- Figure III-1 : Antibiographie des extraits des surnageants et cellulaires des souches des différents solvants.
Figure III.2 : Bioautographie des extraits des surnageants de culture des souches P6 (A) et CHAO (B)
Figure III.3 : Bioautographie des extraits méthanoliques cellulaires des souches P6 et CHAO
Figure III.4 : Profil d'élution en HPLC du composé A1 semipur de la souche P. fluorescens P6.
Figure III.5 : Amplification par PCR d'une séquence génomique impliquée dans la synthèse des phénazines (phz).
Figure III-6 : Hybridation sur colonies avec sonde phz 2.79 (Pour chaque souche 3 spots).
-

CHAPITRE IV

- Figure IV.1 : Les différents constituants du microcosme.
Figure IV.2 : Développement des plantes dans les microcosmes.
Figure IV.3 : Effet du stress hydrique sur les populations bactériennes
Figure IV.4 : Densités bactériennes de colonisation des tubercules de pomme de terre
Figure IV.5 : Accroissement des densités bactériennes 30 et 70 jours après la bactérisation
Figure IV.6 : Effet de la plante sur la densité de colonisation rhizosphérique
Figure IV.7 : Comparaison des taux d'accroissement de la densité de colonisation à J15 et J30
Figure IV.8 : Effet de la disponibilité du fer sur la densité bactérienne
Figure IV.9 : Accroissements des densités bactériennes selon la disponibilité du fer dans les microcosmes
Figure IV.10 : Survie des souches bactériennes dans les préparations d'inoculum à base de tourbe ou de méthyle cellulose.
-

CHAPITRE V

- Figure V.1 : Schéma de la réalisation du système split sur un plant de tomate
Figure V.2 : Exemple de plants de tomate conduits en système split (séparation des racines en deux parties)
Figure V.3 : Exemples d'inhibition *in vitro* de *F. oxysporum* par les souches de *Pseudomonas fluorescens*
Figure V.4.1 : Evolution du taux d'infection causée par *Pythium*.
Figure V.4.2 : Taux d'inhibition de l'infection (I %) et de la sévérité de la maladie (S %) causée par *Pythium*.
Figure V.5 : Evolution du taux d'infection de la fusariose de la tomate
Figure V.6 : Evolution du taux d'infection de la fusariose du lin.
Figure V.7 : Protection biologique (%) vis à vis des fusarioses vasculaires de la tomate et du lin.
Figure V.8 : Protection assurée par les souches de *Pseudomonas* en sol naturel et en sol désinfecté
Figure V.9 : Exemple de résultats de détection de *F.o* f.sp *albedinis* selon la technique de coupes série .
Figure V.10 : Taux d'infection et de protection des plantules de palmier dattier.
Figure V.11: Evolution des maladies causées par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *Clavibacter*
Figure V. 12: Effet de la bactérisation sur le développement de la maladie sur les plants de tomate
Figure V.13 : Effet de la bactérisation sur l'induction de la résistance systémique sur les plants bactérisés et infestés
Figure V.14.1 : Effet de la bactérisation sur le développement des racines des plants bactérisés (Split)
Figure V.14.2 : Effet de la bactérisation sur les racinaires des plants bactérisés (non split):
Figure V.14.3 : Effet de la bactérisation sur des plants bactérisés (non split):
Figure V. 15: Corrélation entre le taux d'infection avec la densité de l'inoculum fongique
-

CHAPITRE VI

- Figure VI.1 : Taux de levée (%) en sol naturel cultivé en pomme de terre (A), en sol naturel cultivé
Figure VI.2 : Poids frais de la partie aérienne (g) en sol naturel cultivé en pomme de terre (A), en sol naturel cultivé
Figure VI.3 : Poids frais des tubercules (g) en sol naturel cultivé en pomme de terre (A), en sol naturel cultivé
Figure VI.4 : Taux de levée (%) du blé dur : (V1) Mohamed ben bachir,(V2) Oued Znati et (V3) Vitron.
-

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
 CHAPITRE I : LES PSEUDOMONAS SPP. FLUORESCENTS ET LEUR INTERET AGROECOLOGIQUE	
I-1. INTRODUCTION	4
I-2. INTRODUCTION AU GENRE <i>PSEUDOMONAS</i>	5
I-3. LES <i>PSEUDOMONAS SPP.</i> FLUORESCENTS SAPROPHYTES	8
I-4. INTERET AGROECOLOGIQUE DES <i>PSEUDOMONAS SPP</i> FLUORESCENTS	9
I-5. EFFETS BENEFIQUES DES <i>PSEUDOMONAS SPP.</i> FLUORESCENTS	13
I-5.1. EFFETS DIRECTS	13
I-5.1.1. STIMULATION DE LA CROISSANCE VEGETALE	13
I-5.1.2. INDUCTION SYSTEMIQUE DE LA RESISTANCE DES PLANTES	15
I-5.2. EFFETS INDIRECTS	18
I-5.2.1. MODIFICATION DES EQUILIBRES MICROBIENS	18
I-5.2.2. LES SOLS RESISTANTS	19
I-6. METABOLISME DES <i>PSEUDOMONAS SPP.</i> FLUORESCENTS	21
I-6.1. METABOLISME BASAL	22
I-6.2. METABOLISME SECONDAIRE	22
I-6.2.1. PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES	24
I-6.2.2. ROLE DES METABOLITES SECONDAIRES DANS LE CONTROLE BIOLOGIQUE	25
I-6.2.2.1. LES SIDEROPHORES	27
I-6.2.2.2. LES COMPOSES A EFFET ANTIMICROBIEN	28
I-6.2.2.3. LES COMPOSES VOLATILS	30
I-6.3. QUORUM SENSING ET REGULATION DE L'ACTIVITE MICROBIENNE	31
I-7. EFFET RHIZOSPHERE	34
I-7.1. EFFET DE LA PLANTE	35
I-7.2. EFFET DU SOL	36
 CHAPITRE II : DIVERSITE TAXONOMIQUE DES PSEUDOMONAS SPP. FLUORESCENTS	
II-1. INTRODUCTION	38
II-2. MATERIELS ET METHODES	40
II-2.1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE SOL	40
II-2.2. ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES	41
II-2.3. IDENTIFICATION TAXONOMIQUE	41
II-2.4. ETUDE DES PROFILS PLASMIDIQUES	46
II-2.5. CARACTERISATION DES PROFILS TROPHIQUES	46
II-2.6. TAXONOMIE NUMERIQUE	48
II-3. RESULTATS	49
II-3.1. ISOLEMENT DES <i>PSEUDOMONAS SPP.</i> FLUORESCENTS	49
II-3.2. IDENTIFICATION SPECIFIQUE	50
II-3.3. IDENTIFICATION INFRASPECIFIQUE	51
II-3.4. DISTRIBUTION DES SOUCHES SELON LES BIOTOPES	53
II-3.5. PROFILS PLASMIDIQUES	55
II-3.6. TAXONOMIE NUMERIQUE	56
II-4. DISCUSSION	70
II.5 CONCLUSION	78

CHAPITRE III : PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES

III-1. INTRODUCTION	79
III-2. MATERIELS ET METHODES	81
III-2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	81
III-2.2 PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES	81
III-2.1.1. SYNTHÈSE DE SIDEROPHORES	81
III-2.1.2. CYANOGENÈSE	82
III-2.1.3. SYNTHÈSE DE L'ACIDE INDOLE ACÉTIQUE (AIA) ET/OU ANALOGUES D'AIA	82
III-2.1.3. SOLUBILISATION DES PHOSPHATES	82
III-2.1.4. PRODUCTION DE L'ACIDE SALICYLIQUE	83
III-2.3. RECHERCHE DES COMPOSÉS À EFFET ANTIBIOTIQUE	83
III-2.3.1. SÉLECTION DE SOUCHES ANTAGONISTES <i>IN VITRO</i>	83
III-2.3.2. SYNTHÈSE DE PHÉNAZINES <i>IN VITRO</i>	84
III-2.3.3. EXTRACTION DES COMPOSÉS À EFFET ANTIBIOTIQUE	85
III-2.3.4. PURIFICATION DES COMPOSÉS À EFFET ANTIBIOTIQUE PAR HPLC	86
III-2.3.5. DÉTECTION DE LA SÉQUENCE DU GÈNE PHÉNAZINE (PHZ) PAR PCR	87
III-2.3.6. DÉTECTION DU GÈNE PHÉNAZINE PAR HYBRIDATION MOLÉCULAIRE <i>IN SITU</i>	89
III-3. RESULTATS	91
III-3.1. PRODUCTION DE SIDEROPHORES	91
III-3.2. CYANOGENÈSE	93
III-3.3. PRODUCTION DE L'AIA, DE L'AS ET DES PHOSPHATASES	93
III-3.4. PRODUCTION DES COMPOSÉS À EFFET ANTIBIOTIQUE	93
III-3.4.1. ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE	93
III-3.4.2. CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS À EFFET ANTIBIOTIQUE	96
III-3.4.2.1. Extraction	96
III-3.4.2.2. BIOAUTOGRAPHIE ET RÉVÉLATION CHIMIQUE	97
III-3.4.2.3. Spectres UV – visible	102
III-3.4.2.4. Purification du composé actif A1 par HPLC	103
III-3.5. AMPLIFICATION PAR PCR ET HYBRIDATION DU GÈNE PHÉNAZINE	105
III-4. DISCUSSION	107
III-5. CONCLUSION	114

Chapitre IV : COMPETITIVITE RHIZOSPHERIQUE

IV-1. INTRODUCTION	115
IV-2. MATERIEL ET METHODES	117
IV-2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	117
IV-2.2. RÉSISTANCE AU CHLORURE DE SODIUM ET AUX ANTIBIOTIQUES	117
IV-2.3 TAUX DE CROISSANCE	118
IV-2.4. STRESS THERMIQUE ET HYDRIQUE	118
IV-2.5 COMPETITIVITE RHIZOSPHERIQUE	119
IV-2.5.1- COLONISATION DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE	119
IV-2.5.2. ESSAIS EN MICROCOSMES	120
IV-2.6. CONSERVATION DES INOCULUMS BACTÉRIENS	123
IV-2.7. ANALYSE DES DONNÉES	123
IV-3 RESULTATS	124
IV-3.1. RÉSISTANCE AU NaCl ET AUX ANTIBIOTIQUES	124
IV-3.2. TAUX DE CROISSANCE	124
IV-3.3. STRESS THERMIQUE ET HYDRIQUE	125
IV-3.4. COMPETITIVITE RHIZOSPHERIQUE	126
IV-3.4.1. COLONISATION DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE	126
IV-3.4.2. EFFET DE LA PLANTE	128
IV-3.4.3. EFFET DE PRODUCTION DE PYOVERDINES	129
IV-3.5. CONSERVATION DES INOCULUMS BACTÉRIENS	132
IV-4. DISCUSSION	134
IV-5. CONCLUSION	139

Chapitre VI : ACTIVITE DE BIOCONTROLE

V-1. INTRODUCTION	140
V-2. MATERIELS ET METHODES	142
V-2.1. PRESENTATION DES ESSAIS	142
V-2.2. ANTAGONISME <i>in vitro</i>	143
V.2.2.1. INHIBITION DE LA CROISSANCE MYCELIENNE	143
V.2.2.2. INHIBITION DE LA GERMINATION CONIDIENNE ET DE L'ELONGATION DU TUBE GERMINATIF	144
V-2.3. ANTAGONISME <i>in planta</i>	144
V.2.3.1. FONTE DE SEMIS SUR BLE DUR	145
V.2.3.2. FUSARIOSES VASCULAIRES DE LA TOMATE ET DU LIN	145
V.2.3.1.1. Conditions gnotobiotiques	145
V.2.3.1.1. Conditions non gnotobiotiques	146
V.2.3.1.1. Paramètres analysés	147
V.2.3.3. FUSARIOSE VASCULAIRE PALMIER DATTIER	148
V-2.4. INDUCTION SYSTEMIQUE DE LA RESISTANCE "ISR"	149
V-2.4. 1. PARAMETRES ANALYSES	152
V-2.4.1.1. Préparation des extraits foliaires	152
V-2.4.1.2. CONCENTRATION DES PROTEINES	152
V-2.4.1.3. ACTIVITE PAL (PHENYLALANINE AMMONIA LYASE)	152
V-2.4.1.4. Détection de l'agent pathogène	152
V-2.5. RECEPTIVITE DU SOL A <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	153
V-2.6. ANALYSE DE DONNEES	153
V-3. RESULTATS	154
V-3.1. ANTAGONISME <i>IN VITRO</i>	154
V-3.2. ANTAGONISME <i>IN PLANTA</i>	158
V-3.2.1. INHIBITION DE <i>Pythium ultimum</i>	158
V-3.2.2. INHIBITION DE <i>Fusarium oxysporum</i>	160
V-3.3. EFFET ISR	165
V-3.4. RECEPTIVITE DU SOL A <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	170
V-4. DISCUSSION	172
V-5. CONCLUSION	177

Chapitre VI : BIOSTIMULATION DE LA CROISSANCE VEGETALE

V-1. INTRODUCTION	179
V-2. MATERIELS ET METHODES	180
V-2.1. SOUCHES BACTERIENNES	180
V-2.2. PRESENTATION DES ESSAIS	180
V-2.1.1. CONDUITE DES ESSAIS ET BACTERISATION	181
V-2.1.2. PARAMETRES DE CROISSANCE	182
V-2.1.3. ANALYSE DES DONNEES	182
VI-3. RESULTATS	182
VI-3.1. EFFET SUR LA CROISSANCE DE LA POMME DE TERRE	182
VI-3.2. STIMULATION DE LA CROISSANCE DU BLE DUR	196
VI-3.3. STIMULATION DE LA CROISSANCE EN CULTURES HYDROPONIQUES	189
VI-4. DISCUSSION	191
VI-5. CONCLUSION	195

DISCUSSION GENERALE	196
---------------------	-----

CONCLUSION GENERALE	205
---------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	206
-----------------------------	-----

ANNEXES	I - xxvi
---------	----------

Résumés

INTRODUCTION GENERALE

Des avancées spectaculaires ont été réalisées ces dernières décennies dans les différentes disciplines de la recherche agronomique, notamment dans le développement des pratiques et des techniques de conduite culturale, ainsi que l'amélioration des géotypes végétaux ; la finalité étant la quête des hauts rendements (quantité et qualité) et l'accroissement des aptitudes des plantes à mieux résister aux stress abiotiques et aux attaques des bioagresseurs.

Dans cette recherche de la performance agronomique, les systèmes agricoles intensifiés se caractérisent par une homogénéité des cultures (base génétique végétale étroite), la monoculture sur des espaces de plus en plus étendus, une technicité de plus en plus automatisée et l'injection excessive d'intrants chimiques (fertilisants et pesticides).

Pour concrétiser cette conception productiviste, la préservation de l'équilibre biologique du sol, la restauration de sa fertilité et l'accumulation des résidus chimiques dans les produits récoltables n'ont pas reçu leur part de considérations. Les méthodes de lutte contre les maladies des plantes se caractérisent par la prévalence de la lutte chimique utilisant des matières actives spécifiques et de longue rémanence sur le végétal. Cette forte pression sélective a engendré l'apparition et le développement de formes de bioagresseurs de plus en plus résistantes et le contrôle des maladies reste relativement insuffisant par rapport au niveau de développement agricole atteint.

Ces dernières années, le souci de préserver l'environnement et les méfaits des molécules chimiques ont pris une place importante dans l'opinion publique qui est devenue plus alertée par les risques de pollution et la qualité des produits agricoles. Face à ces contraintes écologiques et sanitaires, de nouvelles orientations en matière d'exploitation agricole ont commencé à s'imposer (agriculture durable, agriculture biologique, traçabilité, biofertilisants, biopesticides, produits bio....). En matière de biotechnologie végétale, l'exploitation des ressources microbiennes occupe une place de choix dans les applications de préservation et de restauration de la fertilité des sols, par leur participation active dans les cycles géochimiques et dans la lutte biologique.

L'efficacité de certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la protection biologique des plantes vis à vis de divers agents phytopathogènes, notamment ceux d'origine tellurique, a été démontrée dans de nombreux travaux (Kloepper et Schroth, 1981; Digat et Gardan, 1987; Lemanceau, 1992; Lemanceau *et al.*, 1995; Keel *et al.*, 1991; Lugtenberg *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2002a; Nelson, 2004; Ran *et al.*, 2005). Même si leur utilisation reste limitée, des formulations à base de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été mises sur le

marché des biopesticides, malgré la difficulté de leur application et d'une législation contraignante.

Les caractères bénéfiques de ces rhizobactéries se manifestent à plusieurs niveaux du développement de la plante, depuis la germination des semences (spermosphère), la levée et la croissance, jusqu'à l'amélioration des rendements. Les effets bénéfiques des *Pseudomonas* saprophytes rhizosphériques sont associés à leurs activités antagonistes à l'encontre des agents pathogènes et/ou délétères évoluant à proximité des racines, leur participation dans l'amélioration de l'alimentation de la plante, notamment en fer et en phosphore, leur aptitude à produire des composés analogues aux phytohormones et leur capacité d'induction systémique de mécanismes de résistance chez la plante (Lemanceau, 1992; Voisard *et al.*, 1994; Delorme, 2002; Latour *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 2003; Van Lonn et Bakker, 2004; Pozo *et al.*, 2005)

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent un intérêt scientifique majeur, ils se caractérisent par une diversité génétique et phénotypique en relation avec leur impact positif sur le fonctionnement de la rhizosphère, en exerçant des actions directes et/ou indirectes sur le développement de la plante; de plus ils représentent un modèle d'étude pour la compréhension des interactions avec les microorganismes d'une part (*Pseudomonas* – champignons et bactéries pathogènes), et avec la plante (eucaryote – procaryote) d'autre part.

La compréhension des mécanismes d'action et des conditions permettant l'optimisation de des effets bénéfiques de ces rhizobactéries constitue une voie indispensable pour leur exploitation dans les pratiques agronomiques comme biopesticides et/ou biofertilisants, afin de diminuer la dépendance excessive des intrants chimiques dont les effets négatifs sur la santé et l'environnement ne sont plus à démontrer.

Ces rhizobactéries peuvent devenir un complément ou même une réelle alternative pour les techniques de lutte et de fertilisation chimiques, particulièrement pour les maladies telluriques qui sont souvent mal maîtrisées par les techniques conventionnelles (lutttes chimique et génétique). Ces maladies, affectant les racines et/ou les systèmes conducteurs des plantes, sont souvent causées par des agents fongiques se caractérisant par des formes de persistance et de conservation durables et un pouvoir infectieux épidémique destructif des cultures. Le recours de plus en plus aux pesticides spécifiques, surtout les fongicides monocible ou dirigés vis à vis d'un type restreint de phytopathogènes, a augmenté le risque de développement de résistance chez les cibles et par conséquent l'inefficacité de ces produits.

Cependant, l'utilisation des *Pseudomonas* dans les pratiques agricoles se heurte à des problèmes inhérents à la reproductibilité des effets bénéfiques, la formulation des inoculums

bactériens et leur stabilité. Ces aspects sont fortement reliés à la survie de ces rhizobactéries dans la rhizosphère et à leur capacité de colonisation rhizosphérique, donc à leur adaptation à cette niche écologique fortement convoitée par une multitude de phytopathogènes à large spectre d'agression.

La complexité de l'interaction de ces rhizobactéries avec les plantes, la flore indigène et les agents phytopathogènes commence à être élucidée, l'optimisation des effets positifs recherchés ne peut se réaliser sans une connaissance approfondie des processus biotiques et abiotiques régissant leur adaptation et leur compétitivité rhizosphérique. Notre travail s'inscrit dans ce contexte et vise à apporter une contribution dans l'identification et la caractérisation de propriétés microbiennes, chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, impliquées dans la protection des plantes vis à vis des agents pathogènes et délétères et la promotion de la croissance végétale. Dans ce sens, les aspects de cette problématique qui ont été étudiés et investigués dans ce travail sont :

- L'effet rhizosphérique sur les populations bactériennes, perçu à travers une analyse taxonomique et métabolique d'une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolée de sept biotopes. La définition du biotope est basée sur les caractéristiques pédoclimatiques de la région et le génotype végétal cultivé.
- La détection *in vitro* de la synthèse de métabolites secondaires, reconnus comme étant impliqués dans l'antagonisme et la biostimulation, chez un ensemble de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents provenant des différents biotopes.
- L'analyse *in vitro* de caractères bactériens pouvant être déterminants dans l'adaptation et la compétence rhizosphérique de *Pseudomonas* spp. fluorescents.
- Le pouvoir antagoniste de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de trois formes spéciales de *F. oxysporum* (*lycopersici*, *lini* et *albedinis*) et de *Pythium ultimum*, *in vitro* et *in situ*. Nous avons testé aussi la capacité de deux souches de *Pseudomonas fluorescens* d'induire une résistance systémique (ISR) chez la tomate vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Le troisième type d'expérimentations a consisté en l'évaluation de la réceptivité d'un sol à la fusariose du lin causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* en présence de deux souches de *Pseudomonas fluorescens*, en d'autres termes l'aptitude du sol à développer une résistance à cette maladie.
- La capacité de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnées à promouvoir la croissance végétale, dans des conditions expérimentales excluant l'intervention de l'effet de biocontrôle.

I-1. INTRODUCTION

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent des aptitudes élevées à la colonisation des racines des plantes et à l'adaptation à l'environnement rhizosphérique. Les espèces *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. chlororaphis* se rencontrent dans divers biotopes à des densités élevées (Holloway, 1992; Schroth *et al.*, 1992). Dans le sol, les semences après germination et les racines des plantes créent des environnements spécifiques qui sont, respectivement, la spermosphère et la rhizosphère, où leurs exsudats sont des sources potentielles de matières organiques. Ces dernières sont fortement convoitées par les populations microbiennes actives autour des racines, créant ainsi l'effet rhizosphère (Whipps, 2001; Morgan et Whipps, 2001). La stimulation de l'activité microbienne est un processus dirigé en général vers les agents saprophytes ; cependant, elle peut être sélective en faveur des populations microbiennes phytopathogènes ou antagonistes (Whipps, 2001). Dans la spermosphère et la rhizosphère, les interactions microbiennes sont intenses et leur équilibre conditionne le devenir de la plante. En effet, si la dominance revient aux microorganismes phytopathogènes et/ou délétères, la plante en sera une cible privilégiée ; tandis que si elle revient aux germes antagonistes (bénéfiques), il y a induction d'une amélioration de l'état physiologique général de la plante.

Compte tenu de leur intérêt biotechnologique, pour leurs effets bénéfiques en agriculture et leur impact sur l'environnement, les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont l'objet de nombreux travaux ; des souches présentant de capacités de stimulation de la croissance végétale et/ou de protection de l'état sanitaire des plantes ont été décrites (Lemanceau, 1992). Outre le métabolisme basal ou primaire de ces rhizobactéries, nécessaire à leur fonctionnement physiologique, leur métabolisme secondaire joue un rôle de première importance dans les mécanismes associés à leurs effets bénéfiques sur la plante. Cette production de métabolites secondaires doit être associée à un pouvoir de colonisation rhizosphérique et d'adaptation aux variations physico-chimiques et biologiques de la rhizosphère, la compétitivité rhizosphérique, critère indispensable dans le choix de souches utilisables comme biopesticides et/ou biofertilisants.

Dans ce chapitre, nous présentons une synthèse bibliographique relative aux caractéristiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents, leurs effets sur la santé et la croissance des plantes et les caractères bactériens associés à leur dynamique dans la rhizosphère.

I-2. INTRODUCTION AU GENRE *PSEUDOMONAS*

Le genre *Pseudomonas* représente un large groupe de microorganismes ubiquitaires et hétérogènes désignés par les *Pseudomonas* (pseudomonads). Depuis sa première description par Migula en 1894 (Annexe I.1), de nombreuses espèces de ce genre bactérien ont été retrouvées en populations adaptées aux principaux écosystèmes naturels terrestres et aquatiques (Spires *et al.*, 2000), cette large distribution suggère un degré d'adaptabilité physiologique et génétique remarquable.

Les études réalisées depuis plus d'un siècle sur ce genre bactérien ont mis en évidence une complexité dans ses caractéristiques taxonomiques. Dès les premiers travaux, réalisés en 1926 par Deudooren et par Jensen, des variations taxonomiques ont été rapportées (Holloway, 1992), et Stanier *et al.*, (1966) ont initié l'ébauche d'une étude taxonomique mettant en évidence la diversité des *Pseudomonas*.

Palleroni *et al.*, (1973) ont montré par des études d'hybridation ADN-ARNr que le genre *Pseudomonas* renfermait des espèces très diversifiées dont les similarités sont parfois faibles. Sur la base de ce critère moléculaire, le genre "*Pseudomonas*" a été subdivisé par Palleroni (1984) en cinq groupes d'homologie (I, II, III, IV et V). Les techniques de phylogénie moléculaire ont permis de modifier la classification des Proteobactéries renfermant les *Pseudomonas* (Kerstens *et al.*, 1996) ; désormais, le genre *Pseudomonas sensu stricto* est limité aux espèces appartenant au groupe I d'homologie ADN-ARN de Palleroni (1984) qui fait partie de la sous-classe γ des Proteobactéries (Figure I.1, Tableau I.1).

Selon Bossis *et al.*, (2000), le genre *Pseudomonas* contient

- (i) Des *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes à cytochrome oxydase C₅₅₂ positive à l'exemple de *P. cichorii*, *P. marginalis* et *P. tolaasii* (Young *et al.*, 1992) et des agents non phytopathogènes et non nécrogéniques, à l'exemple de *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* et l'espèce type *P. aeruginosa*,
- (ii) Des *Pseudomonas* spp. fluorescents phytopathogènes nécrogéniques sans cytochrome oxydase tels que *P. syringae* et *P. viridiflava*,
- (iii) Des *Pseudomonas* spp. non fluorescents, tels que *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* et *P. pseudoalcaligenes*.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents constituent un groupe bactérien du genre *Pseudomonas sensu stricto* et du groupe "ARN I" *sensu* Palleroni, qui se caractérise par une coloration Gram négative et des cellules sous forme de bacilles droits ou légèrement incurvés de dimensions de 1,5 - 4,0 μm x 0,5 – 1,0 μm munis d'un ou plusieurs flagelles (Palleroni, 1984). Les membres de ce groupe se caractérisent par leur aptitude à synthétiser, en situation de carence en fer, des sidérophores présentant un groupe chromatophore jaune – vert fluorescent sous rayonnement ultraviolet (UV- 230 nm) (Palleroni, 1984; 1992a; 1992b). L'espèce type de ce groupe est *P. aeruginosa*, considérée comme pathogène opportuniste des animaux, capable de se développer à des températures égales ou supérieures à 41 °C et produit des pyocyanines (Annexe I.1).

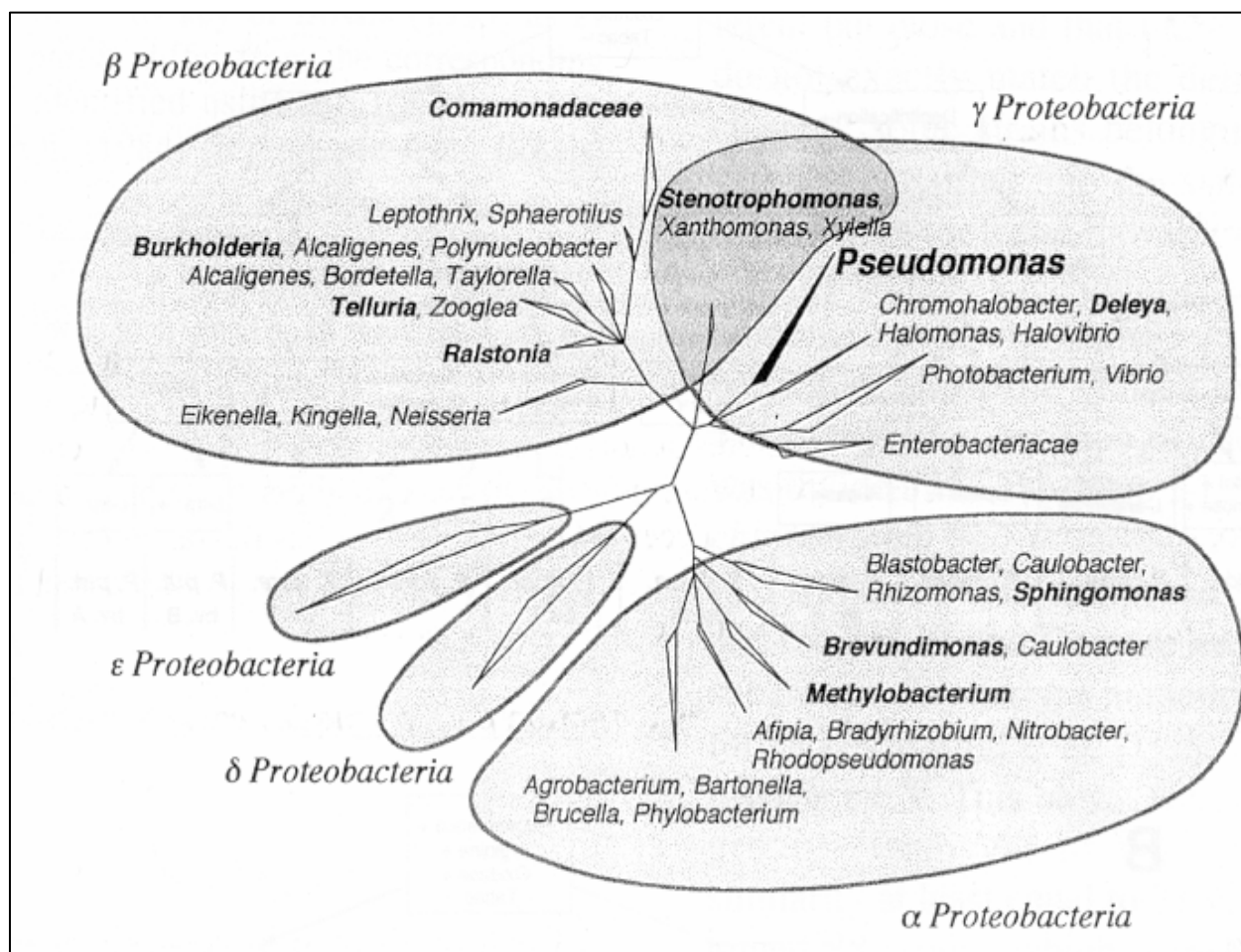


Figure I.1 : Phylogénie des Proteobactéries (Kresters *et al.*, 1996; Bossis *et al.*, 2000)

I-3. LES *PSEUDOMONAS* spp. FLUORESCENTS SAPROPHYTES

Dans le groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents, les espèces saprophytes sont à cytochrome oxydase positive, possèdent une arginine dihydrolase et ne provoquent pas de réaction d'hypersensibilité sur tabac (*P. chlororaphis*, *P. fluorescens* et *P. putida*). Ce groupe renferme également des espèces phytopathogènes strictes ou opportunistes (*P. cichorii*, *P. fusicovaginae*, *P. syringae*, *P. tolaasi* etc...) (Stanier *et al.*, 1966; Palleroni, 1984 et 1992a) (Tableau I.1, Annexe I.1).

Initialement, les *Pseudomonas* spp. fluorescents renfermaient les trois espèces citées précédemment et *P. aureofaciens* rattachée par la suite à *P. chlororaphis* (Johnson et Palleroni, 1989). Les espèces *P. fluorescens* et *P. putida* ont été subdivisées sur la base de tests phénotypiques, respectivement, en cinq et deux biovars (Stanier *et al.*, 1966 ; Palleroni, 1984), elles se caractérisent par une grande hétérogénéité phénotypique et génotypique (Bossis *et al.*, 2000).

Selon Holloway et Morgan (1986), le chromosome des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes contient environ 3000 gènes. La taille du chromosome de *P. putida* est de 3820 kb avec un pourcentage en G/C d'ADN de 61 à 62 %, alors que chez *P. fluorescens* ces paramètres sont de 4107 kb avec un pourcentage de G/C de 59 à 63 %. Rainey et Bailey (1996) ont rapporté une taille de 6630 kb pour le chromosome de *P. fluorescens*. Pour cerner cette forte hétérogénéité, il a été proposé la notion de «continuum» de souches bactériennes par Hildebrand *et al.*, (1983) et Janse *et al.*, (1992), qui ont rapporté l'existence d'un large «continuum» de *Pseudomonas* spp. fluorescents qui engloberait, en plus de *P. tolaasi*, l'ensemble des biovars des deux espèces précédentes.

Dans une étude phénotypique réalisée par Stanier *et al.*, (1966) sur une collection de souches saprophytes issues d'origines diverses, il a été mis en évidence une forte hétérogénéité chez les deux espèces *P. fluorescens* et *P. putida*:

- *P. fluorescens* a été subdivisé en sept biotypes qui ont été par la suite regroupés en cinq biovars (I à V), deux biotypes ayant évolué en *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* (Palleroni, 1984), pour ensuite être fondus dans une même espèce (*P. chlororaphis*).
- *P. putida* a été subdivisé en biotypes A et B renommés par la suite biovars A et B (Johnson et Palleroni, 1989).

Dans les sols nus (non cultivés), ces rhizobactéries peuvent se rencontrer à des densités de 10^3 à 10^5 ufc/ g de sol sec, associées particulièrement aux constituants organiques (Vancura, 1980); alors que dans les sols cultivés, elles peuvent atteindre des proportions élevées, associées aux surfaces racinaires des plantes (10^6 à 10^8 ufc/ g de racines) (Schroth *et al.*, 1992a), ou à l'état endophyte en colonisant les tissus du système racinaire (Van Peer *et al.*, 1990a et 1990b). De nombreuses études ont mis en évidence l'importance de ces rhizobactéries dans l'amélioration de la croissance et la santé des plantes, par leur participation à la réduction des oxydes d'azote et à la dégradation de composés xénobiotiques (Digat et Gardan, 1987; Bossis *et al.*, 2000).

I-4. INTERET AGROECOLOGIQUE DES *PSEUDOMONAS* spp. FLUORESCENTS

De nombreuses études ont mis en évidence les aptitudes de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans l'amélioration de la croissance et la protection sanitaire des plantes (Kloepper *et al.*, 1980a; Kloepper *et al.*, 1980b; Suslow, 1982; Weller, 1988; Reddy *et al.*, 1991; Lemanceau, 1992; Reddy, 1992; Beniziri *et al.*, 2001; Beniziri *et al.*, 2002; Pieterse *et al.*, 2002; Ran *et al.*, 2003; Pieterse *et al.*, 2004; Meziane *et al.*, 2005; Ton *et al.*, 2005; Viebahn *et al.*, 2005). Ces rhizobactéries jouent aussi un rôle dans la préservation de l'environnement par la dissimilation des nitrates et la dégradation des composés xénobiotiques (Lemanceau, 1992; Latour et Lemanceau, 1997; Mirleau, 2000).

Ces bactéries hétérotrophes ont l'aptitude à utiliser une large gamme de composés organiques et différents accepteurs d'électrons. Ces caractéristiques métaboliques confèrent un avantage compétitif aux *Pseudomonas* spp. fluorescents dans l'environnement rhizosphérique, se traduisant par une croissance intense et plus prononcée que dans les sols nus (Schroth et Hancock, 1981 et 1982; Latour et Lemanceau, 1997).

Ce groupe bactérien est assigné aux rhizobactéries dites **PGPR** "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (Kloepper *et al.*, 1980a). Elles peuvent contribuer en tant que moyen de lutte biologique contre les agents phytopathogènes et dans la biofertilisation des sols dans les pratiques de l'agriculture durable et intégrée prônant la limitation de l'utilisation des intrants chimiques. Les effets positifs des PGPR s'expliquent en partie par le contrôle des agents phytopathogènes (Kloepper *et al.*, 1980b; Van Loon *et al.*, 1998a; Van Loon *et al.*, 1998b; Beyeler *et al.*, 1999; Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Van Loon *et al.*, 2002) et la stimulation de la croissance des plantes (Kloepper *et al.*, 1980a; Digat et Gardan, 1987; Lemanceau et Samson, 1983; Lemanceau, 1992).

En premier lieu, les PGPR ont été utilisées pour améliorer la fertilité des sols par l'augmentation de la disponibilité de l'azote pour les plantes (Cooper, 1959). Ensuite, elles ont été employées comme agents de lutte biologique. Ces aptitudes d'amélioration de la croissance des plantes se traduisent par un accroissement de la biomasse aérienne, même en conditions axéniques et une augmentation du rendement en produits récoltables (Gonzalez et Bashan, 2000; Steenhoudt et Vanderleyden, 2000). Les effets bénéfiques de ces rhizobactéries s'opèrent à travers des actions directes et indirectes sur la plante (Figure I.2), qui peuvent se conjuguer pour assurer la stimulation de la croissance des cultures et leur protection vis à vis des agents pathogènes (Reddy et Rahe, 1989).

- **Action directe** : Il s'agit de la modification du métabolisme et de la physiologie de la plante. Les rhizobactéries sécrètent des substances qui stimulent directement la croissance végétale (Lifshitz *et al.*, 1987) et améliorent la résistance des plantes (Wei *et al.*, 1991; Van Loon et Pennings, 1993; Van Loon, 1996; Van Loon *et al.*, 1998a; Van Loon *et al.*, 1998b; Ton, 2001; Ton *et al.*, 2001a; Ton *et al.*, 2001b; Van Loon *et al.*, 2002; Van Loon et Bakker, 2004).
- **Action indirecte** : Elle concerne la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère. Les populations pathogènes et délétères sont réduites par déplacement après introduction des rhizobactéries via les semences, le sol ou par bactérisation racinaire (Kloepper et Schroth, 1981 ; Suslow, 1982; Suslow et Schroth, 1982a; Suslow et Schroth, 1982b; Kloepper, 1993).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent des propriétés prometteuses dans la lutte contre les agents phytopathogènes et la préservation de l'environnement tellurique, ils peuvent même être une source de gènes d'intérêt dans la transgénèse végétale. (Défago et Haas 1990; Walsh *et al.*, 2001; Pozo *et al.*, 2004; Van Loon et Glick, 2004).

Parmi les caractéristiques renforçant l'intérêt potentiel de ces rhizobactéries, on distingue :

- Leur abondance dans le sol naturel, particulièrement au voisinage des systèmes racinaires des plantes et leur colonisation efficace des parties souterraines des plantes, signe de leur potentiel d'adaptation (Bowen et Rovira, 1976; Weller, 1988; Lugtenberg *et al.*, 1999; Lugtenberg *et al.*, 2001). Elles se caractérisent aussi par un meilleur développement dans la rhizosphère par rapport au sol nu (Latour et Lemanceau, 1997). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent présenter une rapidité de croissance par

rapport aux autres bactéries dans les milieux riches en matières organiques, leur permettant de compenser leur handicap lié à l'absence de formes de résistance retrouvées chez d'autres groupes bactériens tels que les *Bacillus*.

- Les *Pseudomonas* spp. fluorescents utilisent une gamme étendue de substrats organiques communément rencontrés dans les exsudats racinaires (Sands et Rovira, 1971 ; Loper et Schroth, 1986 ; Latour, 1996 ; Latour et Lemanceau, 1997).
- Elles possèdent divers mécanismes d'action pour stimuler la croissance des plantes et les protéger des attaques d'agents phytopathogènes et/ou délétères (Handelsman et Stabb, 1996).
- Elles assurent une protection efficace des plantes grâce à leurs propriétés suppressives de diverses maladies (Weller, 1983; Weller *et al.*, 2002).
- Elles sont de culture facile pour la préparation d' inoculums bactériens. Elles peuvent être introduites directement dans le sol (formulations liquides, granulés, poudres ... etc.) ou par bactérisation des semences et grains (encapsulation, enrobage), des plants (racines, tubercules, boutures) et/ou des substrats de culture (Défago *et al.*, 1987; Digat, 1994).
- Globalement, elles sont compatibles avec l'utilisation des pesticides (Elad et Chet, 1987) et en association avec d'autres agents de lutte biologique (Alabouvette, 1986; Kwok *et al.*, 1987; Polonenko *et al.*, 1987; Chang-Senk *et al.*, 1988).
- Elles sont facilement manipulables par les techniques classiques de génétique et modernes de biologie moléculaire (Bakker *et al.*, 1995; Glandorf *et al.*, 1997; Leeftang *et al.*, 2002; Viebahn, 2005).

Pour assurer ces effets protecteurs et stimulateurs, les **PGPR** développent plusieurs mécanismes d'actions fonctionnels dans la rhizosphère et le rhizoplan (Figure I.2).

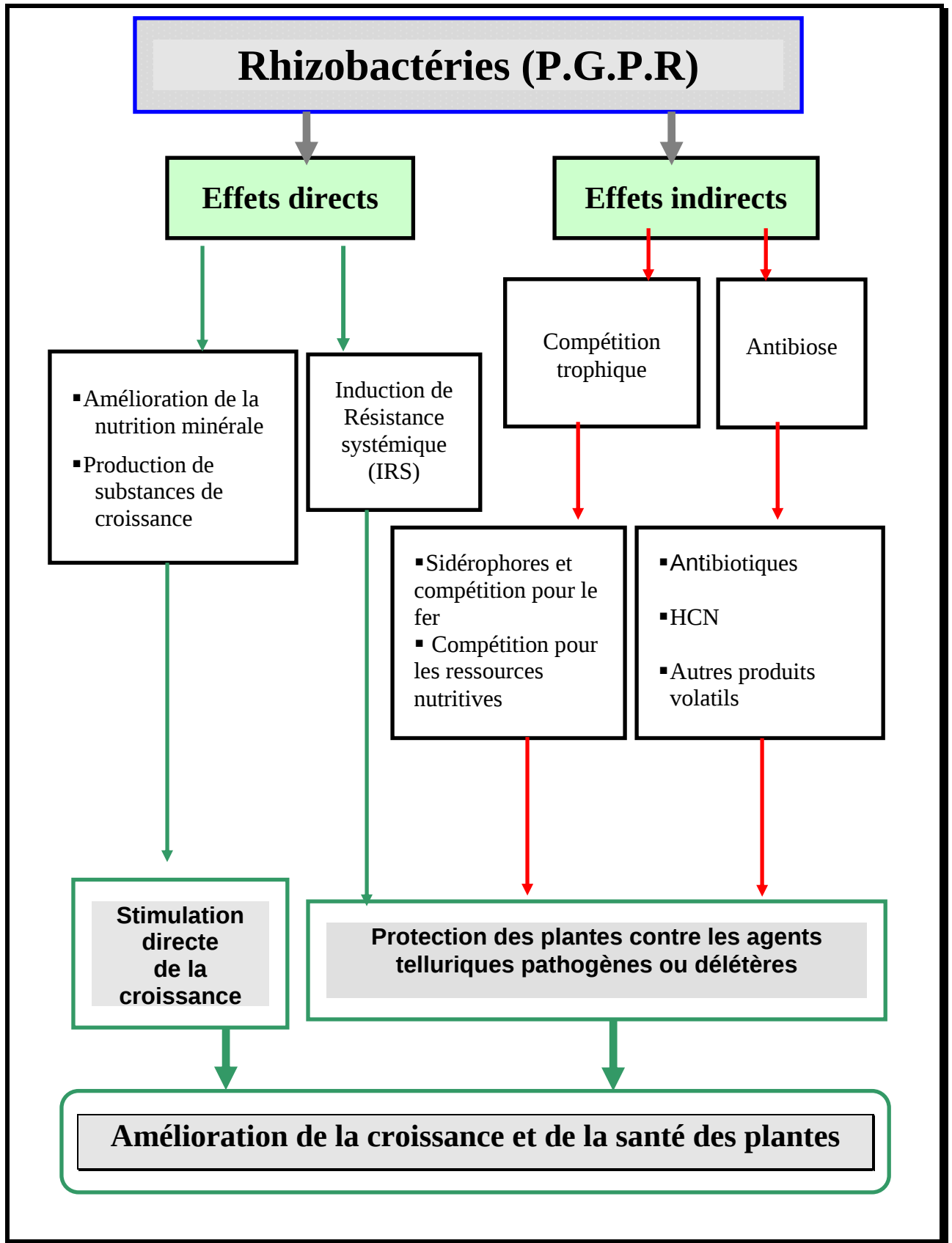


Figure I.2 : Description des effets bénéfiques des rhizobactéries PGPR sur les plantes

Adapté de Mattar (1993)

I-5. EFFETS BENEFIQUES DES *PSEUDOMONAS* spp. FLUORESCENTS

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique dans l'interface sol – racine ; en effet, le rhizoplan et la rhizosphère sont le siège d'intenses échanges entre la plante et le milieu environnant (Curl, 1982). Ces bactéries peuvent exercer une action directe sur la plante en améliorant son métabolisme et sa physiologie générale; également, elles agissent sur l'environnement de la plante, permettant d'assurer une protection du système racinaire contre les agents pathogènes (Digat et Gardan, 1987; Lemanceau, 1992; Digat, 1994).

I-5.1. EFFETS DIRECTS

I-5.1.1. STIMULATION DE LA CROISSANCE VEGETALE

Bien que ces microorganismes soient généralement ubiquitaires dans le sol, c'est surtout au niveau de la rhizosphère que leur activité est la plus élevée ; en effet, les exsudats racinaires, tels que les acides organiques, constituent d'excellentes sources d'éléments nutritifs pouvant favoriser la croissance des microorganismes, ce qui explique leur densité plus forte dans le sol rhizosphérique par rapport au sol non cultivé. De nombreux travaux font état de la stimulation de la croissance des plantes de diverses origines botaniques et de l'amélioration de leur rendement, après leur bactérisation par des rhizobactéries bénéfiques (Geels et Schippers, 1983; Yuen et Schroth, 1986; Van Peer et Schippers, 1989, Digat *et al.*, 1990). Les effets de la stimulation peuvent intervenir directement dans les différents stades de la croissance du végétal, se traduisant par des gains au niveau de la germination et de la levée, du fonctionnement et de la croissance du système racinaire et du bilan global en nutrition hydrominérale de la plante (Lemanceau, 1992; Digat, 1994).

Des souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents semblent améliorer la germination des graines, particulièrement lorsque les conditions de l'environnement sont défavorables. Digat *et al.*, (1990) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* peuvent stimuler significativement la germination de graines de tomate en conditions favorables dans des conditions contrôlées.

Il a été montré que la stimulation de la croissance des plantes bactérisées est due à la synthèse microbienne de substances de croissance (Brown, 1974; Glick, 1995; Garcia de Slamone *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2002), telles que les auxines, les gibbérellines, les cytokinines et l'éthylène (Frankenberger et Arshad, 1991), l'acide succinique et certaines vitamines (Rodelas

et al., 1993) ; comme aussi les bactéries rhizosphériques peuvent participer à l'activation de la synthèse de ces substances par la plante.

La question si les phytohormones ou leurs analogues synthétisées par l'association racines – bactéries activent la croissance végétale a été déjà posée dans de nombreux travaux d'interactions plantes-bactéries symbiotiques ou non symbiotiques (Glick, 1995). L'incorporation du tryptophane dans la rhizosphère peut stimuler la croissance de certaines plantes, à l'exemple du maïs, et l'effet a été relié à la conversion du tryptophane en AIA par les bactéries rhizosphériques (Oberhänsli *et al.*, 1991; Beyeler *et al.*, 1999).

Les sidérophores microbiens spécifiques aux *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent être une source de fer pour les plantes. En effet, le fer ferrique chélaté par les sidérophores peut être assimilé directement par le système racinaire surtout que cet élément est indispensable à une grande partie des activités physiologiques de la plante (Crowley *et al.*, 1987).

Dans les sols agricoles, la dissolution des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol (Richardson, 2001; Sundara *et al.*, 2002). Lifshitz *et al.*, (1987) ont associé l'effet bénéfique de la souche *Pseudomonas putida* G12-2 à l'amélioration de l'alimentation en phosphore des plants de colza . Les rhizobactéries peuvent augmenter la disponibilité en phosphore soluble soit par minéralisation des phosphates organiques grâce à des phosphatases, soit par solubilisation des phosphates inorganiques sous l'effet des acides libérés (Krasilnikov, 1961); une partie des phosphates est alors reprise par le système racinaire des plantes (Digat, 1994). L'amélioration de l'alimentation minérale de la plante en phosphore a été parmi les premières hypothèses proposées pour expliquer l'effet bénéfique enregistré à la suite de la bactérisation de plantes (Gerretsen, 1990).

Les microorganismes dissolvant le phosphore sont de deux groupes, ceux qui vivent à l'état libre non loin des racines et souvent à même sur la racine cependant sans y être liés, à l'exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents et ceux qui vivent en symbiose avec les plantes (Briat *et al.*, 1999; Briat et Vert, 2004). Le phosphore n'est pas toujours assimilable par les microorganismes dans le sol, son indisponibilité réduit la survie des *Pseudomonas* dans le sol et peut représenter un réel stress pour ces communautés microbiennes. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents en conditions de limitation des phosphates expriment des gènes codant pour des métabolites secondaires capable de se complexer avec cet élément (Goldstein, 1986).

Par ailleurs, des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, adhérentes aux racines de légumineuses, stimulent le processus de nodulation conduit par *Rhizobium* spp. (Lemanceau,

1992). Grimes et Mount (1987) ont montré que des souches de *P. putida* augmentent de façon significative la nodulation du haricot par des espèces de *Rhizobium*. De même, Polonenko *et al.*, (1987) ont montré que certaines rhizobactéries pouvaient améliorer la nodulation par *Bradyrhizobium* sur des plants de soja, ces souches ont été nommées les rhizobactéries promotrices de la nodulation (NPR) "Nodulating Promoting Rhizobacteria".

L'effet bénéfique mycorhizien sur les plantes pourrait être potentialisé par des rhizobactéries productrices de substances de croissance (Linderman et Paulitz, 1990) et solubilisant les phosphates du sol (Raj *et al.*, 1981) ; ainsi, l'association d'endomycorhizes et de *Pseudomonas* spp. fluorescents a conduit à une meilleure promotion de la croissance végétale que dans le cas de l'agent mycorhizien seul (Meyer et Lindeman, 1986 ; Oliveira *et al.*, 1987).

I-5.1.2. INDUCTION SYSTEMIQUE DE LA RESISTANCE DES PLANTES

Certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent intervenir dans l'induction systémique de la résistance des plantes (IRS) (Tableau I.2) (Induced Systemic Resistance, ISR) (Kloepper *et al.*, 1992; Pieterse *et al.*, 1996; Van Loon, 1997).

Des travaux récents portant sur différents modèles d'études ont mis en évidence l'implication de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans l'induction chez les plantes d'une résistance contre différents agents pathogènes fongiques, bactériens et viraux (De Meyere et Höfte, 1997; Van Loon, 1998; Van Loon *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2003). Une induction systémique de la résistance chez les plantes vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* (Van Peer *et al.*, 1991) et de *Colletotrichum orbiculare* (Wei *et al.*, 1991) a été rapportée. Dans les travaux réalisés par Lemanceau et Alabouvette (1993), le contrôle biologique du flétrissement fusarien du lin a été attribué à l'antagonisme microbien exercé à la phase saprophyte du pathogène et à l'induction de la résistance de la plante hôte à la phase parasite du pathogène.

De nombreuses études ont démontré que la bactérisation des plantes par des souches de *Pseudomonas* améliore leur capacité naturelle à se défendre de façon active contre les attaques des pathogènes (Kloepper, 1993 ; Hoffland *et al.*, 1995; De Meyer et Hofte, 1997; Van Loon *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 1998; Van Wees *et al.*, 1999; an Wees *et al.*, 2000; Heil, 2001; Pieterse *et al.*, 2002b; Pieterse *et al.*, 2002c) ; comme il a été également démontré que ces bactéries peuvent jouer le rôle d'éliciteurs efficaces dans l'activation des gènes de défense de la plante (Tuzun et Kloepper, 1995) ; Ainsi, la plante sensibilisée répond fortement et rapidement à l'attaque microbienne sans perte importante d'énergie (M'Piga *et al.*, 1997).

L'induction chez l'œillet de la résistance à la fusariose vasculaire par la souche *Pseudomonas fluorescens* WCS417r a été clairement établie par Van Peer *et al.*, (1991). L'intervention d'un antagonisme direct entre *Pseudomonas fluorescens* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* dans cette protection biologique a été exclue expérimentalement par la bactérisation des racines avec la souche bactérienne, alors que l'inoculation du parasite a été effectuée au niveau de la tige, une semaine après. Une réduction significative du nombre de plants malades de l'œillet a été constatée et la souche WCS417r a été facilement réisolée des racines mais jamais de la tige ; ce qui démontre bien que le contrôle de la maladie n'est pas lié à l'antagonisme direct, mais plutôt à l'induction d'une résistance, et cela d'autant plus que le pathogène est quasiment vasculaire.

L'induction de la résistance peut se traduire par des modifications structurales des parois végétales, tels que la lignification des parois cellulaires (Anderson et Guerra, 1985) et le dépôt de callose (Kloepper *et al.*, 1992).

La présence des rhizobactéries dans la rhizosphère ou sur les racines des plantes peut entraîner également des changements physiologiques et biochimiques aboutissant à la synthèse et à l'accumulation chez la plante d'une panoplie de substances : les phytoalexines (Van Peer *et al.*, 1991), les composés phénoliques (M'Piga *et al.*, 1997), les lypopolysaccharides (Van Peer et Schippers, 1992; Leeman *et al.*, 1995), l'augmentation de l'activité des protéines PR "Related Proteins", les chitinases, les β -1.3-glucanases (Hynes et Lazarovits, 1989, Van Loon, 1997), les peroxydases, l'activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (Silva *et al.*, 2004), la chalcone synthase (Zdor et Anderson, 1992) et les antigènes O (Reitz *et al.*, 2002).

Maurhofer *et al.*, (1994) ont signalé la présence de diverses protéines, d'endochitinases et de glucanases dans le liquide intercellulaire des feuilles du tabac cultivé en présence de la souche de *Pseudomonas fluorescens* CHA0.

Selon M'Piga *et al.*, (1997), les barrières mécaniques et les substances toxiques comme les phytoalexines et les composés phénoliques constituent les premiers moyens de défense qui devancent l'accumulation des chitinases et autres enzymes lytiques, à l'exemple de β -1.3-glucanase, qui complètent la désintégration des cellules fongiques.

D'autres travaux ont également signalé que certaines souches de PGPR présentent la capacité d'antagonisme et d'inhibition, via l'induction de la résistance systémique, de plusieurs agents pathogènes fongiques et bactériens inféodés au feuillage, (Liu *et al.*, 1992; Hoffland *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Fodor *et al.*, 1997; Audenaret *et al.*, 2002).

La bactérisation des feuilles de riz par la souche de *P. fluorescens* Pf1 quatre jours avant son inoculation par *Pyricularia oryzae* a provoqué une réduction significative de l'intensité de la maladie (Vidhyasekaran *et al.*, 1997 ; Meena *et al.*, 1999).

Hoffland *et al.*, (1996a) ont montré qu'un prétraitement des radis (*Raphanus sativus*) avec *P. fluorescens* induit une résistance systémique non seulement vis-à-vis du champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*, mais aussi vis-à-vis de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* associée au feuillage, ainsi que vis à vis d'autres agents fongiques (*Alternaria basicola* et *Fusarium oxysporum*).

Tableau I.2 : exemples d'induction de la résistance systémique chez quelques plantes vis-à-vis de différents agents pathogènes par des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Plante hôte	Agents phytopathogène	Références
Concombre	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Wei <i>et al.</i> , 1991
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Wei <i>et al.</i> , 1991
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Zhou et Paulit, 1994
	<i>Erwinia tracheiphila</i>	Zehnder <i>et al.</i> , 2001
	Virus de la mosaïque du concombre (CMV)	Liu <i>et al.</i> , 1992
Haricot	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Alström, 1991
	<i>Fusarium solani</i>	Anderson et Guerra, 1985
Radis	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	Leeman <i>et al.</i> , 1995a; Leeman <i>et al.</i> , 1995b
Riz	<i>Pyricularia oryzae</i>	Vildhyasekaran <i>et al.</i> , 1997 Meena <i>et al.</i> , 1999
Tabac	Virus de la nécrose sur tabac (TNV)	Maurhofer <i>et al.</i> , 1994
Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i>	M'Piga <i>et al.</i> , 1997
		Duijff <i>et al.</i> , 1998
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Zehnder <i>et al.</i> , 2001
	Virus de la moucheture de la tomate (T.M.V)	
Oeillet	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	Duijff <i>et al.</i> , 1999 Van Peer <i>et al.</i> , 1991.

I-5.2. EFFETS INDIRECTS

Dans le sol, l'activité microbienne est intense, en particulier dans la zone soumise à l'influence des racines, la rhizosphère. Les microorganismes trouvent dans ce milieu des substrats énergétiques, libérés par les racines, rapidement assimilable. Dans cet environnement complexe, les interactions entre les microorganismes et la plante sont complexes et interviennent sur plusieurs plans.

Un des mécanismes des effets bénéfiques de certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents repose sur l'activité antagoniste qu'ils exercent à l'encontre de microorganismes pathogènes responsables de maladies et d'altération de la physiologie et de la croissance végétale.

I-5.2.1. MODIFICATION DES EQUILIBRES MICROBIENS

L'utilisation de bactéries antagonistes pour lutter contre les maladies d'origine tellurique a fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques (Schroth et Hancock, 1982; Suslow, 1982; Burr et Caesar, 1984; Leong, 1986; Neilands et Leong, 1986; Weller et Cook, 1986; Cook et Weller, 1987; Schippers *et al.*, 1987; Fravel, 1988; Weller, 1988; Kloepper *et al.*, 1988; Lemanceau, 1992; Jacques *et al.*, 1993; Schippers, 1993; Benizri *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2002; Bakker *et al.*, 2003; Liyan et Wilhelm, 2004; Nelson, 2004).

Parmi les modes d'action antagoniste des *Pseudomonas* fluorescents, la compétition et l'antibiose ont été particulièrement étudiées. La compétition peut s'instaurer pour l'espace et pour les nutriments; ainsi, Suslow (1982) suggère que les PGPR seraient capables d'exclure les rhizobactéries délétères (DRB: Deleterious Rhizobacteria) de certaines niches écologiques où la production et l'utilisation d'exsudats racinaires est un fait majeur et décisif.

Même si le rôle de la compétition pour l'espace ne peut pas être complètement exclue, l'essentiel des travaux relatifs à la compétition exercée par les *Pseudomonas* spp. fluorescents porte en particulier sur la compétition trophique pour le fer (Heming, 1986; Leong, 1986; Loper et Buyer, 1991). Celle-ci s'exerce principalement par le biais des sidérophores qui peuvent stimuler directement la croissance des plantes directement par l'augmentation de la disponibilité du fer aux environs des racines ou indirectement en privant les phytopathogènes de ces ions indispensables à leur activité biologique; privés de fer, ils voient leur croissance inhibée (Leong, 1986; Seong et Shin, 1996; Guetterson, 1990; Cook *et al.*, 1995).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont considérés comme agents potentiels de biocontrôle des maladies d'origine tellurique, plusieurs études ont montré leur efficacité sous forme d'inoculums bactériens (Thomashow et Weller, 1988; Haas *et al.*, 1991; Lemanceau et

Alabouvette, 1991; Cook *et al.*, 1995; Schippers *et al.*, 1995; Moulin *et al.*, 1996). Ces souches bénéfiques peuvent coloniser la graine, la surface des racines et autres parties souterraines des plantes aux mêmes positions que les phytopathogènes qu'ils contrôlent (Lugtenberg *et al.*, 1999; Tombolini *et al.*, 1999).

Des résultats intéressants en matière de biocontrôle ont été obtenus dans le cas de *Thielaviopsis basicola* chez le tabac (Voisard *et al.*, 1989), du piétin échaudage des céréales (Weller et Cook, 1983), des fontes de semis du concombre et du blé (Becker et Cook, 1988; Defreitas et Germida, 1991; Kraus et Lopper, 1991) et des fusarioses (Scher et Baker, 1980).

La plupart des *Pseudomonas* spp. fluorescents exercent des actions d'antibiose contre les agents pathogènes en synthétisant des composés antibiotiques tels que les phénazines, la pyrrolnitrine, le 2,4- diacétylphloroglucinol et le cyanure d'hydrogène. Certaines souches produisent des enzymes lytiques telles que les chitinases et la β -1.3-glucanase, capables d'altérer la paroi des champignons (O'Sullivan et O'Gara, 1992).

I-5.2.2. LES SOLS RESISTANTS

Mis en évidence depuis longtemps (Atkinson *et al.*, 1975), le phénomène de résistance des sols aux fusarioses vasculaires a été largement étudié (Toussoun, 1975; Alabouvette, 1986; Alabouvette et Lemanceau, 1996). Les sols résistants sont des sols défavorables au développement de maladies, bien que les agents pathogènes sont pourtant présents. Ils sont aussi nommés sols suppressifs par opposition aux sols permissifs où les maladies se développent rapidement, on a décrit des sols résistants aux maladies causées par *Pythium* spp., *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et *Fusarium oxysporum* (Schneider, 1982 ; Cook et Baker, 1983; Alabouvette, 1986; Alabouvette *et al.*, 1998).

Un sol résistant à la maladie est un sol dans lequel la sévérité de la maladie reste limitée malgré la forte densité de l'inoculum de l'agent causal, la susceptibilité de la plante et les conditions environnementales favorables à son développement; alors que le sol sensible favorise une sévérité importante de la maladie même en présence d'une faible densité d'inoculum (Alabouvette, 1986). La réceptivité du sol aux agents pathogènes telluriques reflète sa prédisposition à permettre à un pathogène de se développer, de persister et d'exprimer sa pathogénicité chez la plante (Alabouvette *et al.*, 1982; Alabouvette, 1986).

Plusieurs sols à caractère suppressif vis-à-vis de différentes formes spéciales de *Fusarium oxysporum* ont été étudiés et exploités dans des activités agronomiques, notamment les sols de la

région de Châteaurenard (France) (Louvet *et al.*, 1976 ; Alabouvette, 1986), et les sols de Salinas Valley (Californie) (Scher et Baker, 1980).

La microflore naturelle du sol a un effet prépondérant sur les propriétés de résistance des sols au développement des fusarioses (Scher et Baker, 1980; Cook et Baker, 1983). Dans des essais sur des sols résistants, le pouvoir suppressif a été inhibé suite à leur traitement physique par la chaleur humide et les rayons γ , et chimique par incorporation de bromure de méthyle. Ces différents types d'actions létales sur les activités biologiques indiquent clairement l'implication des activités microbiennes dans le caractère suppressif ou conducteur de la maladie (Alabouvette *et al.*, 1980; Rouxel *et al.*, 1977; Scher et Baker, 1980). L'effet suppressif peut être restauré par l'addition d'une petite quantité de sol suppressif à un sol rendu conducteur par traitement à la chaleur (Louvet *et al.*, 1976; Schneider, 1984).

Les sols résistants aux fusarioses vasculaires limitent l'incidence et la sévérité des maladies sur de nombreuses cultures (bananier, œillet, concombre, coton, lin ...etc.). Malgré la diversité des cultures concernées, cette résistance a un spectre d'action spécifique, elle n'est développée que contre une pathologie particulière, comme les flétrissements fusariens; elle est donc exprimée contre toutes les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* et pas à l'encontre d'autres agents pathogènes telluriques, même les espèces de *Fusarium* non vasculaires (Smith et Snyder, 1971; Toussoun, 1975; Alabouvette *et al.*, 1980).

Cette action spécifique démontre l'existence d'un mécanisme précis qui n'affecte que l'activité de *Fusarium oxysporum*. La suppression spécifique (Cook et Baker, 1983) est la propriété d'un groupe particulier de microorganismes antagonistes, comme *Fusarium oxysporum* non pathogène (Rouxel *et al.*, 1977; Lemanceau et Alabouvette, 1991; Larkin *et al.*, 1993) ou *Pseudomonas* spp. fluorescents (Scher et Baker, 1982; Larkin *et al.*, 1993).

Beaucoup d'expérimentations ont montré que l'introduction de souches sélectionnées de *Fusarium oxysporum* non pathogènes ou de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les sols conducteurs ou dans les substrats de culture augmentent leur niveau de résistance (Kloepper *et al.*, 1980a; Kloepper *et al.*, 1980b; Van Peer *et al.*, 1990a; Van Peer *et al.*, 1990b).

La compétition pour le fer par la production de sidérophores par les *Pseudomonas* spp. fluorescents est responsable de la réduction de la croissance *in vitro* et dans le sol de *Fusarium* spp. (Elad et Baker, 1985a). De même, Loper et Lindow (1994) ont montré que les pyoverdines produites par la souche *Pseudomonas fluorescens* JL3551 sont responsables de la suppression de 95% des effets de la maladie causée par *Pythium ultimum* sur le coton.

Le métabolisme microbien dans la rhizosphère dépend des sources de carbone disponibles (Loper et Schroth, 1986). La compétition pour l'énergie conditionne également le niveau de réceptivité des sols aux fusarioses. Un enrichissement des sols avec le glucose provoque une augmentation de la maladie (Lemanceau, 1988; Lemanceau *et al.*, 1988).

Compte tenu de la diversité et de la complexité des interactions entre la microflore du sol et la plante, plus les mécanismes mis en œuvre par le microorganisme antagoniste sont nombreux et diversifiés, plus son efficacité sera assurée. Cet objectif peut donc être atteint par l'utilisation de souches microbiennes au pouvoir métabolique performant ou d'association de souches à effets complémentaires (Lemanceau, 1992).

L'inoculation combinée du sol par différentes souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a permis de mieux protéger le blé contre le piétin que lorsque l'inoculation a été réalisée avec chacune des souches séparément (Weller et Cook, 1983; Pierson et Weller, 1994). De même, la protection contre la fusariose de la tomate assurée par l'association de souches de *Fusarium* non pathogène et *Pseudomonas fluorescens* est plus effective que celle obtenue par chacune de ces souches (Lemanceau et Alabouvette, 1991).

I-6. METABOLISME DES *PSEUDOMONAS* SPP. FLUORESCENTS

Les études écologiques sur ce groupe bactérien ont révélé leur forte adaptation aux conditions rhizosphériques en association avec plusieurs espèces végétales, ces aptitudes permettent de les classer parmi les rhizobactéries colonisatrices. En plus de leur compétence rhizosphérique, ces bactéries présentent des profils métaboliques leur conférant une compétitivité par rapport aux autres microorganismes telluriques. Les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont associés à la production de métabolites secondaires (antibiotiques, sidérophores, phytohormones...etc.) dont la synthèse est néanmoins influencée par le métabolisme primaire (Latour et Lemanceau, 1997).

I-6.1. METABOLISME BASAL

Les travaux sur les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur les plantes indiquent clairement qu'ils reposent sur la nature de leur métabolisme carboné et énergétique (Latour, 1996; Latour et Lemanceau, 1997). Les métabolites secondaires impliqués dans la stimulation de la croissance et la protection des plantes dépendent du métabolisme basal régissant les capacités nutritionnelles (Stephens *et al.*, 1993; Voisard *et al.*, 1994), il intervient activement dans les processus de dégradation de nombreuses substances xénobiotiques

(Harayama *et al.*, 1992) et les électrons échangés dans les voies respiratoires sont sous l'effet du type de composés organiques utilisés (Beauchamp *et al.*, 1989).

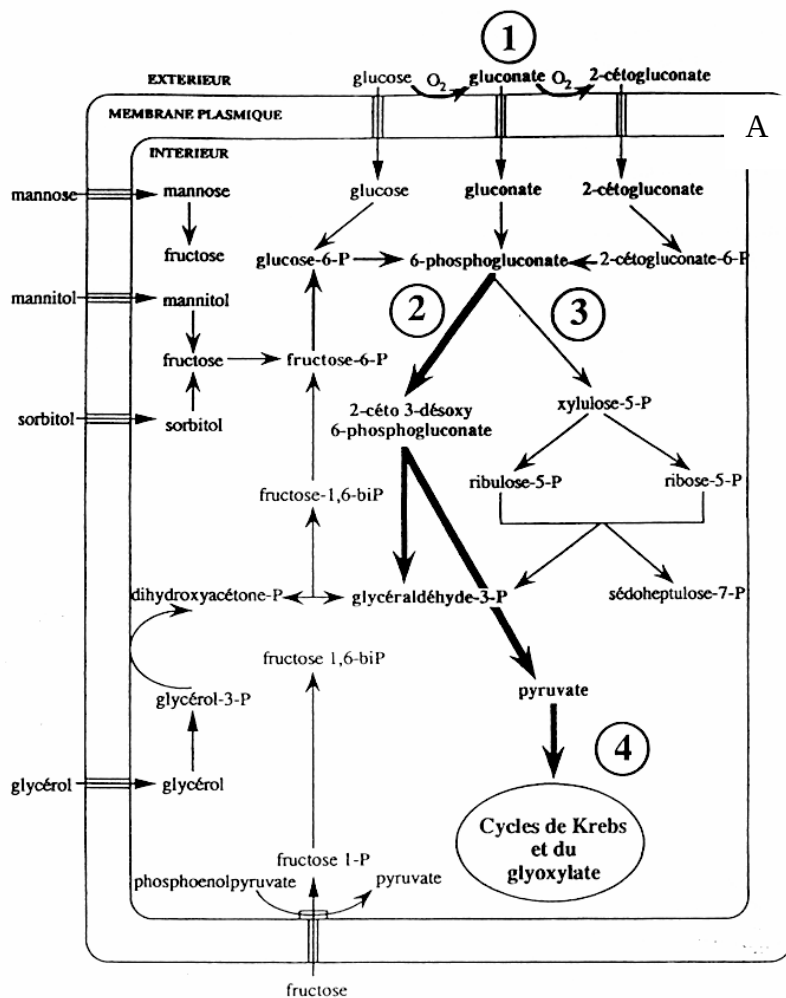
Habituellement, le métabolisme carboné conduit à la formation de coenzymes réduits à partir de substrats organiques et le métabolisme énergétique aboutit à la formation d'ATP à partir de molécules donneuses d'électrons. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents, à cytochrome oxydase positive, sont des microorganismes hétérotrophes qui présentent un métabolisme carboné et énergétique construit autour des cycles de Krebs et du glyoxylate auxquels aboutissent la majorité des voies dégradatives (Figure I.3).

Ces rhizobactéries utilisent préférentiellement les acides organiques plutôt que les oses et leurs dérivés. La plupart des acides aminés sont assimilés par les *Pseudomonas* spp. fluorescents par des voies variées qui sont reliées au cycle de Krebs. Les produits des cycles de Krebs et du glyoxylate alimentent une chaîne respiratoire préférentiellement aérobie au rendement énergétique élevé. Selon la pression partielle en oxygène de l'environnement, la chaîne respiratoire utilise comme accepteurs d'électrons l'oxygène ou les oxydes d'azote.

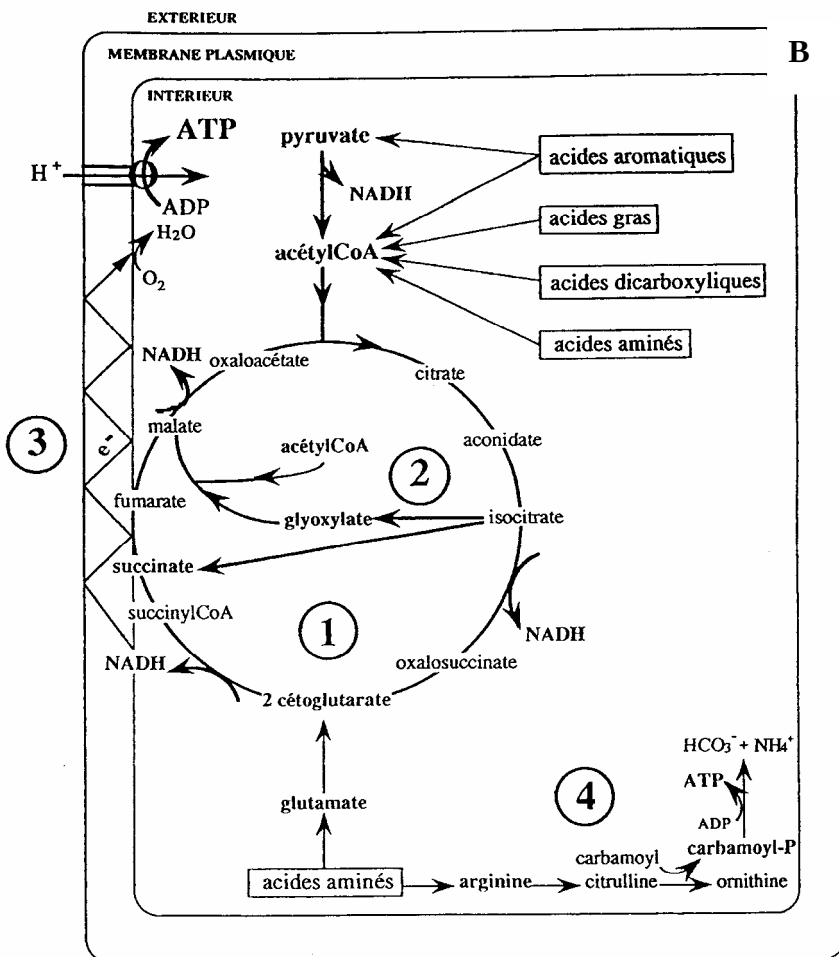
Le métabolisme basal conditionne donc directement l'adaptabilité (propagation et colonisation) des *Pseudomonas* spp. à la rhizosphère (division cellulaire, synthèse de métabolites secondaires).

I-6.2. METABOLISME SECONDAIRE

De nombreux travaux ont mis en évidence la diversité et la variabilité des métabolites secondaires synthétisés par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et leur implication directe ou indirecte dans la stimulation de la croissance des plantes et leur protection biologique (biocontrôle). Certains de ces métabolites se caractérisent par des activités antimicrobiennes et jouent un rôle majeur dans l'inhibition des phytopathogènes (Tableau I.3).



L'énergie extraite de ce catabolisme provient, en grande partie, des cycles de Krebs et du glyoxylate alimentés par le pyruvate originaire de la voie d'Etner-Doudoroff (4).



En anaérobiose et sous conditions non dénitrifiantes, la fermentation de l'arginine peut également produire de l'ATP (4).

Figure I.3 : Catabolisme des hexoses et des polyols (A), des acides organiques et des acides aminés (B) chez les *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes à oxydase positive (Latour et Lemanceau, 1997).

Tableau I.3 : Exemples de métabolites spécifiques aux *Pseudomonas* spp. fluorescents impliqués dans le biocontrôle de phytopathogènes (Dowling et O’Gara, 1994).

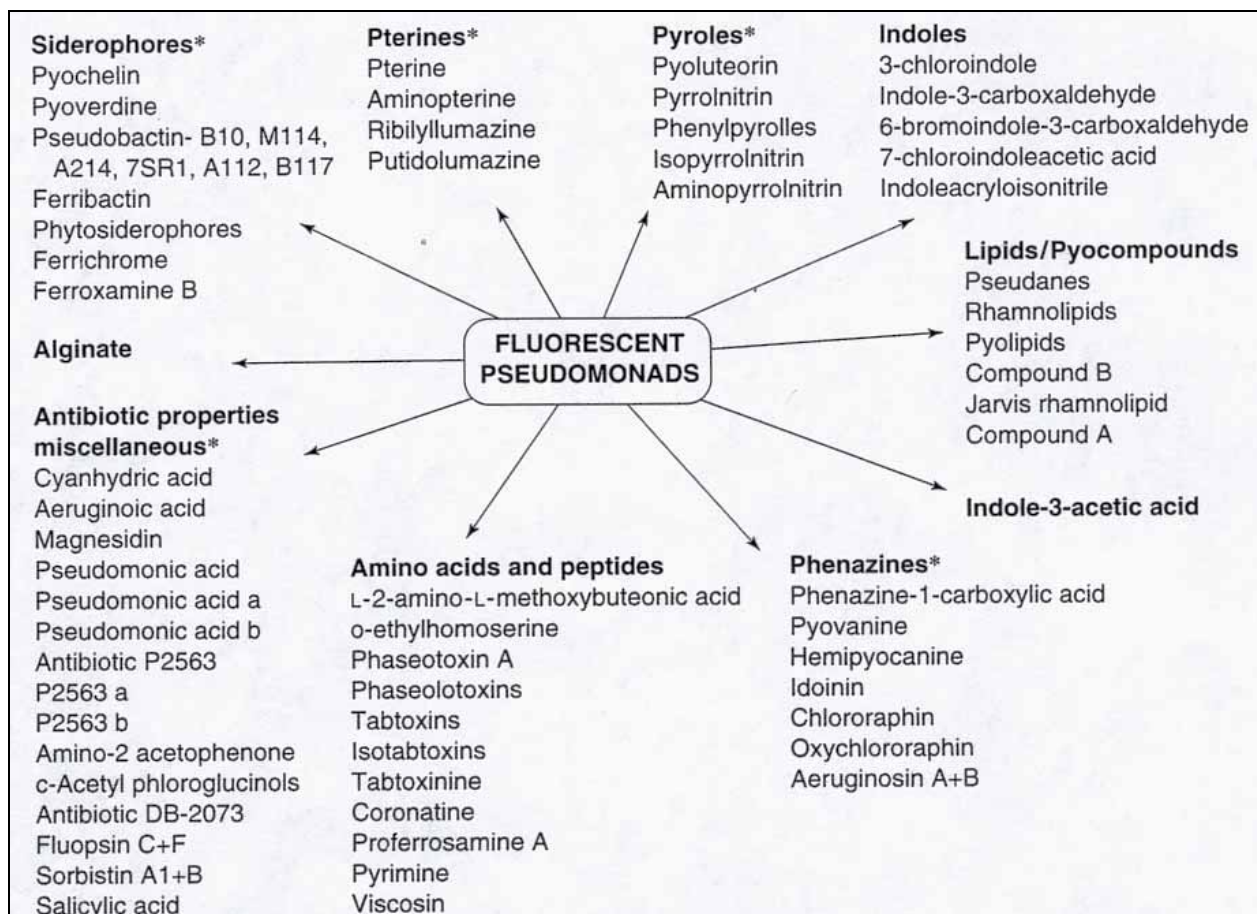
Métabolites	Pathogènes
Phénazines C - Acétyl phloroglucinols	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>
Pyrrolnitrine	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>
Oomycine A Ammonium	<i>Pythium</i> spp.
Pyoluteorine	<i>Pythium ultimum</i>
2,4-Diacetylphloroglucinol	<i>Thielaviopsis basicola</i>
Cyanide d'hydrogène (HCN) 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) Pseudobactine B10	<i>Fusarium oxysporum</i>

I-6.2.1. PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES

Différents types de métabolites secondaires ont été répertoriés chez la flore rhizosphérique et ceux produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents occupent une place prépondérante, par leur sécrétion au niveau de la rhizosphère et l’étendue de leur spectre d’action. Ces rhizobactéries synthétisent une gamme variée de métabolites secondaires (Figure I.4), certains inhibent le développement de microorganismes phytopathogènes et d’autres interviennent dans la phytostimulation.

La détermination d’une corrélation entre le ou (les) métabolite (s) et les effets bénéfiques relatifs à la suppression des maladies a fait l’objet de nombreux études *in vitro* et *in situ* (Chain et Mellowes, 1977; Chanaway et Nelson, 1990; Duijff *et al.*, 1994c; Glandorf *et al.*, 1995; Folders *et al.*, 1996; De Boer *et al.*, 1999) ; selon Dowling et O’Gara (1994), parmi les critères déterminant l’implication d’un ou de métabolites dans le biocontrôle, on a :

- L’utilisation de mutants déficients en la synthèse du métabolite en question n’inhibant pas *in vitro* le pathogène ciblé, contrairement à la souche sauvage.
- Le pouvoir de biocontrôle diminue chez ces mutants dans des essais réalisés *in situ*.
- Les métabolites purifiés doivent exhiber des activités antimicrobiennes.
- La possibilité de détection de ces métabolites *in situ* (dans la rhizosphère).



* : désigne les composés impliqués dans les activités de biocontrôle.

Figure I.4 : Métabolites secondaires et autres composés produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Dowling et O'Gara, 1994).

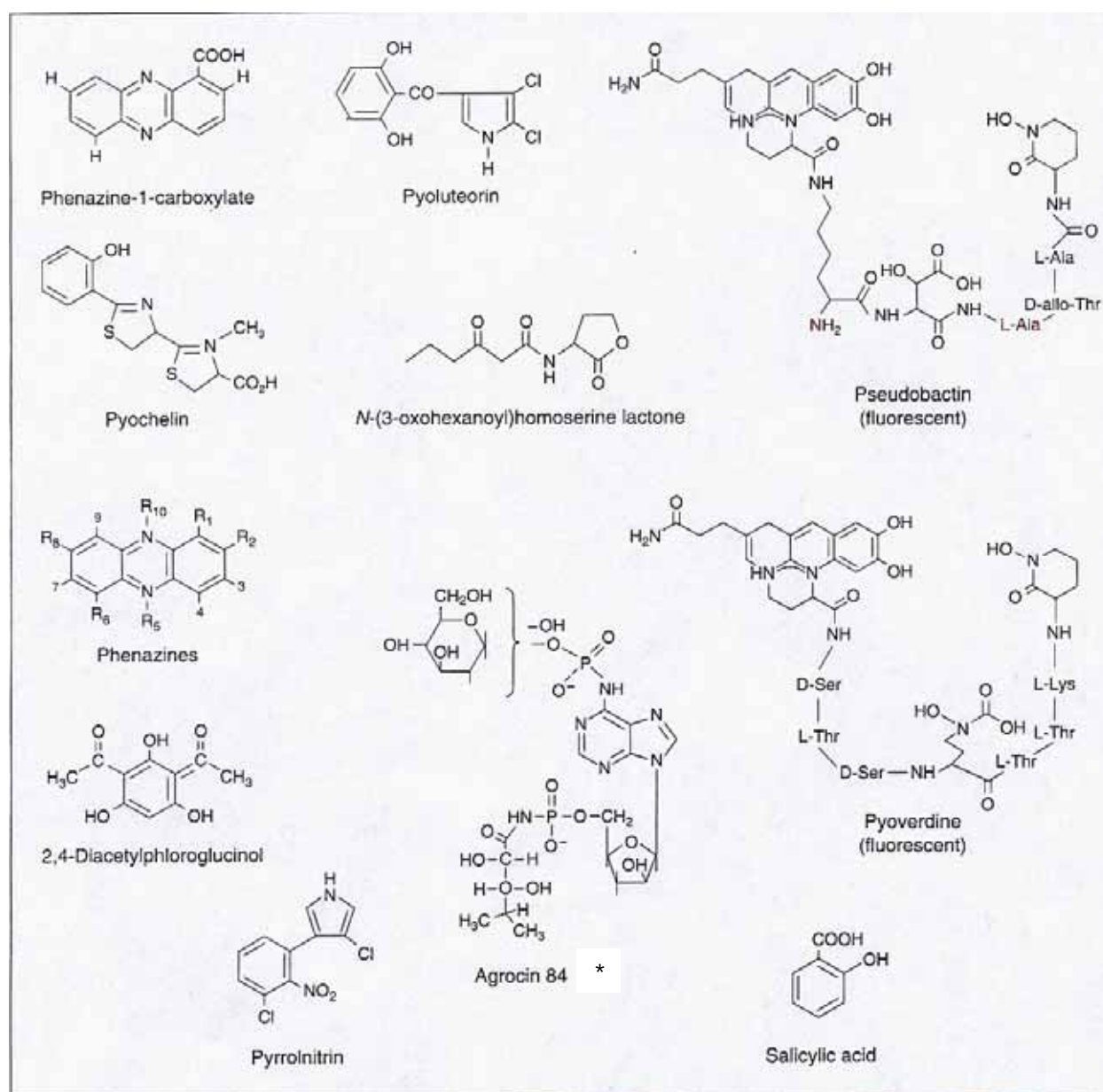
I-6.2.2. RÔLE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DANS LE CONTRÔLE BIOLOGIQUE

Une grande partie des métabolites secondaires synthétisés par les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent un large spectre d'action vis à vis d'agents phytopathogènes telluriques fongiques et bactériens, ils sont caractérisés par des structures particulières (Figure I.5) nécessaires à leur action par complexation avec des composés organiques rhizosphériques.

La compétition pour les éléments nutritifs joue un rôle primordial dans les mécanismes de la résistance des sols; cependant, on ne peut pas écarter l'implication d'autres modes d'action comme l'antibiose, par la production de d'antimicrobiens tels que les antibiotiques, les enzymes lytiques, les bactériocines et les composés volatils (Alabouvette et *al.*, 1998).

La production de métabolites secondaires est considérée comme l'un des moyens favorisant la compétence écologique des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les composés synthétisés confèrent aux souches productrices un avantage sélectif au niveau de la rhizosphère. Des essais *in situ* ont démontré le rôle actif de certains métabolites secondaires dans

les activités de biocontrôle. Les antibiotiques phénaziniques (Phz) (Tomashow et Weller, 1988), les cyanures d'hydrogène (HCN) (Voisard *et al.*, 1989), le 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl), les pyoluteorines (Plt) et les pyrrolnitrines (Prn) participent activement dans la suppression de maladies (Tomashow *et al.*, 1990 ; Keel *et al.*, 1992 ; Maurhofer *et al.*, 1994 ; Kraus et Loper, 1991). Les sidérophores exhibent à la fois des effets bactériostatique et fongistatique, particulièrement dans les conditions de carence en fer.



* : métabolite spécifique à *Agrobacterium radiobacter* K84

Figure I.5 : structures de quelques métabolites bactériens impliqués en lutte biologique (Dowling et O'Gara, 1994).

I-6.2.2.1. LES SIDÉROPHORES

Le terme sidérophore, du grec «sideros», signifie «porteur de fer». Ces métabolites de faible poids moléculaire (500 - 1500 Daltons) sont des chélateurs des ions ferriques et assurent leur transport à l'intérieur de la cellule microbienne (Neilands et Leong, 1986). La production de sidérophores est un mécanisme hautement spécifique développé par la plupart des microorganismes (Meyer et Abdallah, 1978 ; Jacques *et al.*, 1993; Guerinot, 1994), avec une diversité structurale considérable (O'Sullivan et O'Gara, 1992). La synthèse de sidérophores n'a lieu qu'en situation de carence en fer (Meyer et Abdallah, 1978 ; De Weger *et al.*, 1986), comme c'est le cas en aérobiose et à pH neutre où le fer se trouve sous des formes oxydées et polymérisées d'hydroxyde de fer $[\text{Fe}(\text{OH})_3]$ totalement insoluble, rendant difficile son assimilation par les bactéries (Barach, 1990).

La synthèse de sidérophores par les *Pseudomonas* spp. fluorescents et la description des différentes structures y afférentes ont été rapportées dans plusieurs études (Neilands, 1973; Meyer et Abdallah, 1978 ; Teintze *et al.*, 1981; Yang et Leong, 1984; Buyer *et al.*, 1986; Van der Hofstad *et al.*, 1986; Meyer *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Meyer, 2000; Schalk *et al.*, 2002).

Selon la nature chimique des groupes chélateurs du fer, les sidérophores peuvent être classés en hydroxamates ou en catéchols (Neilands, 1995). Une autre structure intermédiaire comportant les deux types de groupement a été identifiée dans les sidérophores des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Ces rhizobactéries produisent des sidérophores appelés pyoverdine (Meyer et Abdallah, 1978) ou pseudobactine (Teintze *et al.*, 1981). Cette dernière est constituée d'une chaîne peptidique d'acides aminés liée à un chromophore fluorescent responsable de la fluorescence jaune-vert caractéristique de ce pigment (Demange *et al.*, 1987). En outre, certaines souches produisent un composé appelé ferribactine qui pourrait être un produit de dégradation ou un précurseur de la pyoverdine (Taraz *et al.*, 1991). Un autre sidérophore dérivé de l'acide salicylique est le pseudomonine produit par certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Anthony *et al.*, 1995 ; Mercado-Blanco *et al.*, 2001). Des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, à l'exemple de la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA0 aux propriétés antagonistes reconnues (Duffy et Defago, 2000), produisent un sidérophore non fluorescent, la pyocheline présentant une faible affinité pour le fer (Cox *et al.*, 1981).

La production de sidérophores par les *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère est dépendante de la température, du pH du sol, du carbone, de l'azote et de la concentration en oligo-éléments, notamment en fer (Elad et Baker, 1985b; Loper et Schroth, 1986; Joyce *et al.*,

1991;). En plus de ces facteurs, certains métaux lourds tels que le zinc et le cadmium semblent stimuler la production des pyoverdines (Höfte *et al.*, 1993; Rossbach *et al.*, 2000; Dao *et al.*, 2001), tandis que le vanadium se présente comme un inhibiteur de leur production (Baysse *et al.*, 2000). *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* ont une capacité remarquable d'utiliser un large spectre de pyoverdines secrétés par d'autres micro-organismes, tandis que leurs pyoverdines ne peuvent pas être utilisés par ces derniers (Raaijmakers *et al.*, 1995; Mirleau *et al.*, 2000; Mossialos *et al.*, 2000; Ongena *et al.*, 2001).

La production de pyoverdines n'est pas dépendante seulement de la présence ou de l'absence du fer, elle est régulée par la production d'autres métabolites secondaires (Duffy et Défago, 2000; Kinscherf et Willis, 2002; Sanchez-Contreras *et al.*, 2002). Une fois les sidérophores sont émis dans le milieu extérieur, ils chélatent les ions (Fe^{3+}) les rendant inaccessible aux autres microorganismes qui ne possèdent pas de système de chélation du fer de forte affinité de (Jacques *et al.*, 1993). Le complexe formé, ferripyoverdine ou ferripseudobactine, s'attache à des récepteurs membranaires spécifiques (Marugg *et al.*, 1989; Bakker *et al.*, 1990; Bitter *et al.*, 1991) pour qu'il soit transporté dans le cytoplasme sans dissociation (Hohnadel et Meyer, 1988, Schalk *et al.*, 2002) et où il est réduit (Leong, 1986). Les récepteurs membranaires présentent des molécules spécifiques «apo-sidérophore» augmentant le niveau de cette spécificité (Figure I.6).

I-6.2.2.2. LES COMPOSES A EFFET ANTIMICROBIEN

Le genre *Pseudomonas* renferme des microorganismes non filamenteux et non sporogènes producteurs d'antibiotiques (Leisinger et Margraff, 1979). La production de composés antimicrobiens par les *Pseudomonas* a été reconnue comme un facteur majeur dans la suppression de maladies d'origine tellurique (O'sullivan et O'gara 1992). Le rôle des antibiotiques a été mis en évidence grâce à l'utilisation de mutants déficients en leur production ; néanmoins, la démonstration du rôle des antibiotiques, pour être entièrement satisfaisante, nécessite la mise en évidence de leur synthèse *in situ* (Lemanceau, 1992).

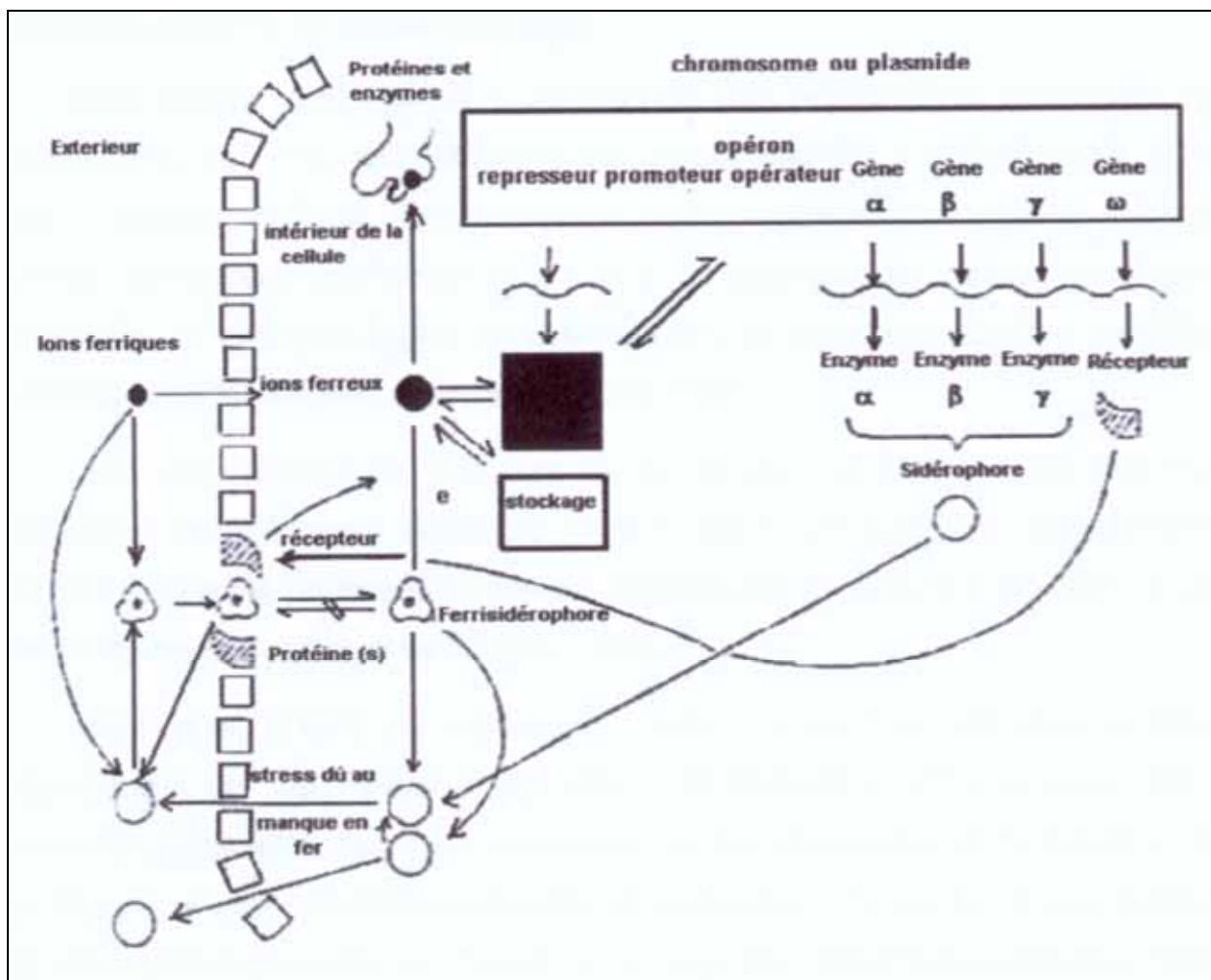


Figure I.6 : Régulation de l'assimilation du fer par la synthèse de sidérophores chez les microorganismes aérobies et aéro-anaérobies facultatifs (Neilands, 1984)

Les composés antimicrobiens clefs chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont les phénazines et le 2,4 – diacetylphloroglucinol (Keel *et al.*, 1989; Shanahau *et al.*, 1992). L'acide phénazine-1-carboxylique synthétisé par la souche *P. fluorescens* 2–79 est en partie responsable de l'activité antagoniste à l'encontre de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Thomashow et Weller, 1988). Cet antibiotique produit également par d'autres souches de *Pseudomonas* est efficace contre divers champignons (Brisbane et Rovira, 1988; Brisbane *et al.*, 1989). La présence de Be^{2+} augmente la production d'acide 2,9 dihydroxy et 2,3,9 trihydrophenazine 1-carboxylique (Budzikiewicz, 1993).

Keel *et al.*, (1992) ont montré que le 2,4 – diacetylphloroglucinol (DAPG) synthétisé par la souche *P. fluorescens* CHA0 est en partie responsable de la protection du blé contre *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* et du tabac contre *Thielaviopsis basicola*. Plusieurs autres souches de *Pseudomonas* ont été signalées comme productrices de phloroglucinol (Keel *et al.*,

1990; Keel *et al.*, 1991; Keel *et al.*, 1992). Ce composé n'est pas seulement toxique pour les champignons et les bactéries, il a montré aussi une activité antivirale (Tada *et al.*, 1990). Lampis *et al.*, (1996) ont caractérisé une souche de *P. fluorescence* biovar V produisant un nouveau composé, la karalicine ayant des propriétés antivirales.

Deux composés antimicrobiens ont été mis en évidence par Howell et Stipanovic (1979 et 1980), la pyolutéorine et la pyrrolnitrine synthétisés par la souche *P. fluorescens* pf 5; ces substances inhibent respectivement la croissance *in vitro* de *Pythium ultimum* et de *Rhizoctonia solani*, ainsi que d'autres espèces fongiques. Linberg (1981) a établi un spectre d'activité d'un antimicrobien, la tropolone, synthétisé par une souche de *Pseudomonas fluorescens* qui manifeste des propriétés antagonistes à l'encontre de différents genres fongiques : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* ...etc.

Selon, Howie et Suslow (1986), la souche *Pseudomonas fluorescens* HV37 produit un composé, l'oomycine A, responsable d'environ 70% de la capacité de cette souche à réduire l'infection racinaire due à *Pythium* spp.

D'autres composés, moins étudiés, ayant des activités antifongiques ont été rapportés chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents tels que la viscosinamide (Neilsen *et al.*, 1999), l'acide dihydroaeruginosique (Carmi *et al.*, 1994 ; Reimann *et al.*, 1998) et les butyrolactones (Gamard *et al.*, 1997).

I-6.2.2.3. LES COMPOSES VOLATILS

La production d'acide cyanhydrique (cyanogénèse) par certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents peut jouer un rôle aussi dans l'inhibition de pathogènes des racines des plantes (O'Sullivan et O'Gara, 1992). Défago *et al.*, (1990) suggèrent que la production d'HCN par la souche CHA0 provoquerait sur la plante un stress auquel elle réagirait par une augmentation de son système racinaire et la stimulation de sa résistance naturelle.

Les exsudats racinaires contiennent de la glycine (Rovira et Davey, 1971) connu pour être un précurseur de la synthèse bactérienne d'acide cyanhydrique (Voisard *et al.*, 1989). En effet la stimulation de la production d'acide cyanhydrique et de phénazines améliore l'efficacité des bactéries dans la réduction de la gravité des maladies (Voisard *et al.*, 1989; Thomashow, 1991). La protection du tabac et du blé vis à vis de quelques pathogènes telluriques a été assurée par la souche CHA0 productrice d'HCN (Voisard *et al.*, 1989).

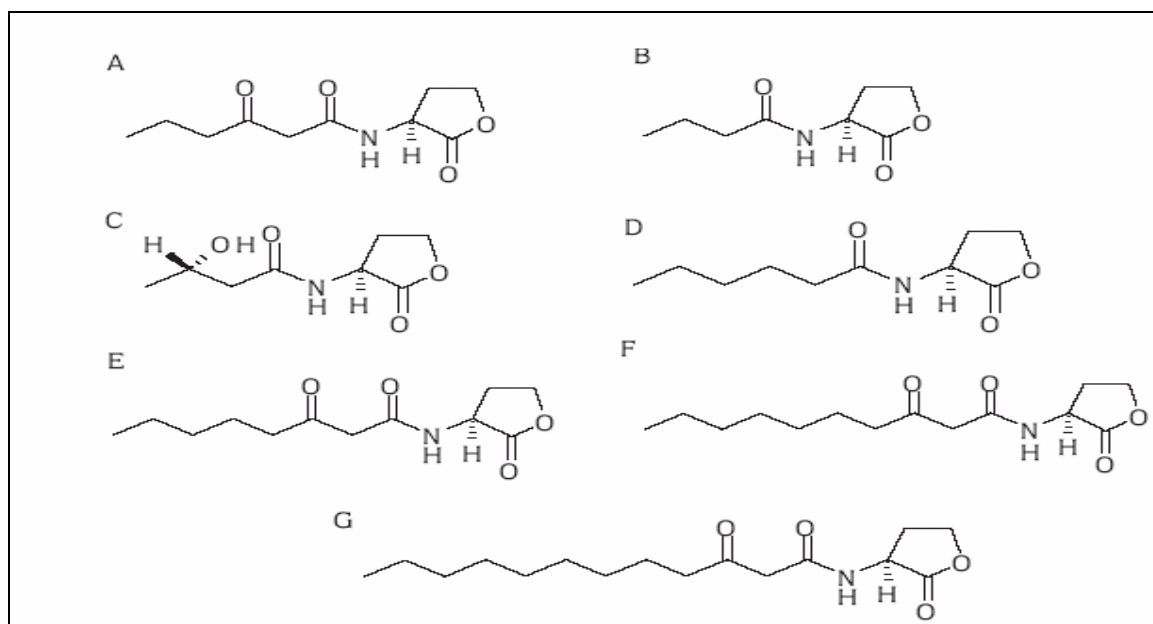
Contrairement aux sidérophores, l'excrétion de cyanides d'hydrogène ne se rencontre que chez une gamme étroite d'espèces bactériennes. Ce métabolite est un inhibiteur potentiel des cytochromes oxydases et de plusieurs autres métalloenzymes. L'HCN n'apparaît pas impliqué dans le métabolisme basal, généralement il est considéré comme un métabolite secondaire. La synthèse d'HCN par les protéobactéries, particulièrement par les *Pseudomonas* spp. fluorescents, est sous l'effet d'une flavoenzyme membranaire, qui, après oxydation de la glycine, produit de l'HCN. Ce dernier forme des complexes stables avec des ions de métaux de transition, ce qui permet aux bactéries cyanogéniques de mobiliser ces ions. Dans les sols argileux, les complexes ferrocyanides ($K_4Fe(CN)_6$) et ferricyanides $K_3Fe(CN)_6$ ne se forment pas facilement, en raison de la faiblesse de diffusion de l'oxygène (Blumer et Haas, 2000).

I-6.3. QUORUM SENSING ET REGULATION DE L'ACTIVITE MICROBIENNE

Au cours de ces dernières années, un mode de régulation remarquable a été mis en évidence chez les bactéries, qui correspond à un mode de communication entre bactéries d'une même espèce. Ce système, dit *quorum sensing*, est considéré comme un mécanisme de régulation clé dans l'adaptation écologique et la pathogénicité des bactéries. Il permet aux bactéries de la même espèce d'initier un ou plusieurs processus physiologiques constitutifs et adaptatifs ou physiopathologiques quand la densité bactérienne est suffisante (quorum), permettant à ces microorganismes unicellulaires de coordonner et de synchroniser leur comportement au niveau de la population (Fuqua *et al.*, 1994; Whitehead, 2001). Ce système est fondé, chez les bactéries à Gram négatif, sur la production de phéromones diffusibles, des acyl-homosérine lactones (acyl-HSL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Les HSL produits par une bactérie donnée diffèrent par la longueur et les substitutions de leurs chaînes d'acides gras (Bosgelmez, 2003) (Figure I.8).

Ces HSL sont synthétisés par une HSL-synthase qui est codée par un gène de type « I » et elles sont sécrétées en permanence par les bactéries. Ces molécules diffusent librement dans le milieu et peuvent passer à travers la paroi et la membrane bactériennes. Lorsque leur concentration atteint un certain seuil, elles forment un complexe actif avec un facteur ou régulateur de transcription de type « R » présent normalement dans la bactérie, qui va déclencher l'expression de gènes cibles. Ceci induit la production d'un signal qui confère à la population bactérienne de nouvelles propriétés, qui varient selon l'espèce de bactéries, la nature de l'inducteur, le gène activé... Le gène de type « I » est un de ces gènes cibles et les molécules d'HSL sont appelées auto-inducteurs.

La régulation de la communication par les HSL peut se réaliser à différents niveaux : la production du signal (gènes de synthèse des HSL), la perception du signal (gènes de réception des HSL) et la durée de vie du signal (gènes de dégradation des HSL) (Delorme, 2002).



(A) *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL); (B) *N*-(4-oxobutanoyl)-L-homoserine lactone (BHL); (C) *N*-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone (HBHL); (D) *N*-(6-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (HHL); (E) *N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (OOHL); (F) *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone (ODHL); (G) *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL).

Figure 1.8 : Différentes structures des homosérines lactone (Bosgelmez, 2003)

Le quorum sensing a été découvert pour la première fois chez la bactérie marine *Vibrio fischeri*, Hastings et ses collaborateurs ont été les premiers à proposer l'hypothèse du quorum sensing en observant l'émission de luminescence par cette bactérie lorsqu'elle atteint une forte densité. Cette hypothèse a rencontré un grand scepticisme ou un désintérêt de la part de la communauté scientifique ; ensuite, les molécules et les gènes impliqués dans ce mécanisme ont été caractérisés et le modèle du quorum sensing a ainsi pu être confirmé. Deux gènes principaux, *luxR* et *luxI* sont impliqués dans ce mécanisme. Le gène *luxI* code pour une enzyme qui participe à la synthèse d'un auto-inducteur de la famille des HSL. Ces auto-inducteurs diffusent librement dans le milieu et de bactéries à bactéries. Lorsque la concentration en HSL atteint un seuil

critique, elles se lient aux protéines LuxR codées par le gène *luxR*. Le complexe LuxR/HSL devient activateur de la transcription de gènes impliqués dans la synthèse de la luminescence et de *luxI* qui synthétise alors plus d'auto-inducteur.

La communication par les HSL chez les rhizobactéries conditionne l'expression des fonctions métaboliques et physiologiques impliquées dans leurs interactions rhizosphériques (Robson *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 1998; Stintzi *et al.*, 1998; Rodelas *et al.*, 1993; Elasri *et al.*, 2001; Delorme, 2002). De plus, l'activité des rhizobactéries peut être modulée par des molécules signal émises par les plantes et la flore indigène, ces molécules peuvent être analogues, sur les plans structurales et fonctionnels, avec les HSL ; les mécanismes d'action invoqués pour ces molécules peuvent être un blocage du signal au niveau de la cible par mimétisme et/ou carrément une destruction des HSL (Michiko *et al.* 2003 ; Sullivan, 2004).

Les propriétés antagoniste et phytostimulatrice des *Pseudomonas* spp. fluorescents par l'intermédiaire de métabolites secondaires, de la compétence rhizosphérique, de l'induction systémique de la résistance chez la plante... est sous le contrôle génétique du quorum sensing ; dans ce sens, Derek *et al.*, (1997) et Blummer et Haas (2000), ont rapporté le rôle du quorum sensing dans la synthèse des phénazines et des cyanures d'hydrogène.

I-7. EFFET RHIZOSPHERE

La rhizosphère des plantes représente la partie du sol en contact direct avec les racines, elle est riche en exsudats racinaires libérés par la plante. Ces derniers sont composés de substances organiques carbonées et azotées, des polysaccharidiques, des acides organiques et des protéines (Mench, 1985). La quantité et la composition des exsudats racinaires conditionnent la nature des activités bactériennes (Loper et Schroth, 1986) ; ainsi, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que loin des racines, c'est l'effet rhizosphère (Foster et Rovira, 1978). Ces conditions rhizosphériques favorisent une colonisation par des bactéries non symbiotiques appartenant à de nombreux genres et espèces, elles s'adaptent à l'environnement rhizosphérique et sont dénommées rhizobactéries (Schroth et Hancock, 1981 et 1982).

Les caractéristiques métaboliques des rhizobactéries (assimilation de composés organiques, de l'azote et du phosphate) jouent un rôle très important dans leur compétence rhizosphérique (Latour *et al.*, 2003; Clays -Josserand *et al.* , 1995 ; Lifshitz *et al.* , 1987), qui varie chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents en fonction des souches. Cette compétence définit l'aptitude d'une souche à se distribuer le long des racines des plantes hôtes, à se multiplier et à

survivre pendant plusieurs semaines en présence de la microflore rhizosphérique indigène (Bahme et Schroth, 1987 ; Weller, 1988).

Les caractéristiques qui conditionnent la compétence rhizosphérique des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont relativement méconnues. Selon Lemanceau (1992), ces caractéristiques semblent liées à l'aptitude des souches à s'attacher à la racine, se déplacer le long des racines et entrer en compétition de façon efficace avec la microflore résidente. En effet la colonisation racinaire s'effectue en deux temps : Les bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive, puis elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère (Howie *et al.*, 1987).

L'attachement des bactéries à la racine résulte d'interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine. L'adhésion de la bactérie à la racine est d'autant plus efficace que sa surface est hydrophobe (Van Loosdrecht *et al.*, 1987). Cette adhésion est aussi conditionnée par des phénomènes électrostatiques mettant en jeu, en particulier, les charges de surface de la cellule bactérienne (James *et al.*, 1985 ; Dickson et Koohmaraie, 1989) ; cependant, les travaux de De Weger *et al.*, (1996) tendent à minimiser l'importance du paramètre physico-chimique dans l'adhésion des rhizobactéries.

L'adhésion des *Pseudomonas* spp. fluorescents à la racine dépend plutôt de leurs aptitudes à l'agglutination avec des glycoprotéines, appelées agglutinines, produites par la plante (Jasalavich et Anderson, 1981 ; Anderson, 1983). L'aptitude de certaines souches à coloniser l'endorhizosphère a été corrélée à leur aptitude à s'agglutiner sous l'effet d'agglutinines racinaires. Ces souches se caractérisent également par la nature de leur lypopolysaccharides et de leurs protéines membranaires (Van Peer *et al.*, 1990a). Les pili et fimbriaire présents sur certaines bactéries sont également responsables de l'adhésion des bactéries à la racine (Korhonen *et al.*, 1983).

L'attraction des *Pseudomonas* spp. fluorescents vers la racine sous l'effet d'un chimiotactisme et leur mobilité dans la rhizosphère sont conditionnés par les composants de la colonisation racinaire, dont les exsudats. Leur importance est sujette à discussions parfois contradictoires sur leur rôle précis dans l'adhésion racinaire. En effet, même si Scher *et al.*, (1985 et 1988) ont mis en évidence le chimiotactisme exercé par les exsudats de graines de Soja à l'égard de *Pseudomonas* fluorescens, cette attraction n'a pas pu être corrélée avec une meilleure colonisation racinaire.

Le maintien et le développement de la souche bactérienne introduite sont conditionnés par la capacité d'accueil de la rhizosphère. Certaines souches bactériennes présentent une aptitude compétitrice supérieure à d'autres (Lemanceau., 1992).

La colonisation chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents est également influencée par leur localisation au niveau de la racine. Ainsi les bactéries endophytes ou endorhizosphériques (McInroy et Kloepper, 1991 ; Van Peer *et al.*, 1990a) seraient moins sujettes à la compétition que celles localisées à la surface de la racine.

Il est bien connu que la colonisation racinaire est une étape critique dans l'utilisation des rhizobactéries dans la lutte biologique ; pour que la protection soit efficace, il faut que la bactérie PGPR soit capable de coloniser efficacement la rhizosphère de la plante inoculée et de persister (Benizri *et al.*, 2001). La compréhension de la colonisation est indispensable pour sélectionner des souches ou construire des mutants performants en biocontrôle dans les conditions environnementales.

La connaissance des mécanismes responsables des effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents permet de préciser les conditions favorables à leur expression, en rapport avec les caractéristiques génotypiques des souches mais également avec l'environnement dans lequel l'inoculation bactérienne est pratiquée (Lemanceau, 1992).

I-7.1. EFFET DE LA PLANTE

L'espèce végétale hôte joue un rôle non négligeable dans l'activité des rhizobactéries; la disponibilité et la nature des exsudats racinaires peuvent varier d'un sol à un autre selon le type de sol et la plante. La rhizosphère est le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (Curl, 1982), il est admis que le métabolisme des rhizobactéries est influencé par les nutriments mis à leur disposition (Leisinger et Margraff, 1979). Le succès de la lutte biologique avec des *Pseudomonas* spp. fluorescents était souvent aléatoire (Weller, 1988; Lemanceau et Alabouvette, 1993), cette fluctuation a été en partie associée à la colonisation inefficace des racines par les bactéries (Schippers *et al.*, 1987 ; Bull *et al.*, 1991; Weller et Thomashow, 1993).

Les caractéristiques des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents liées aux racines de deux espèces végétales, le lin et la tomate, ont été comparées à celles des populations de *Pseudomonas* spp fluorescents issues d'un sol non cultivé, le type de sol et le génotype végétal (plante hôte) ont un effet sur la nature des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Clays Josserand *et al* ; 1995; Latour *et al.*, 1996). La distribution des isolats bactériens en fonction de leur origine a fourni l'évidence que la plante a une influence sélective sur les populations des

Pseudomonas spp. fluorescents, ces dernières diffèrent d'un sol non cultivé à l'autre et d'une rhizosphère à l'autre selon l'espèce végétale (Latour *et al.*, 1996).

La capacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents à utiliser des substrats organiques spécifiques peut être un caractère important dans le développement de populations bactériennes sous l'influence de la plante (Latour *et al.*, 1999). La diversité des isolats endophytiques a été moindre par rapport à celle des isolats issus des rhizosphères et des rhizoplane, ceci suggère que la pression sélective trophique imposée par la plante est plus forte pour les premiers que pour les seconds (Latour, 1996 et 2003).

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol-racine ; en effet, l'apport trophique des racines à la rhizosphère résulte des processus suivants : (Lemanceau et Heulin, 1998)

L'exsudation : ce terme est souvent employé abusivement comme synonyme de rhizodéposition. L'exsudation désigne en fait la diffusion passive hors des cellules de composés solubles de faible poids moléculaire (sucres ou acides aminés) (Curl, 1982).

La sécrétion et l'excrétion : la sécrétion est un processus actif, qui consomme de l'énergie. Elle concerne généralement des composés de poids moléculaire élevé, tels que les enzymes ou les mucilages. Les cellules peuvent aussi excréter activement des acides organiques pour maintenir leurs équilibres ioniques (Curl, 1982).

La quantité et la composition des exsudats racinaires peuvent changer d'une espèce à l'autre et même d'un cultivar à l'autre de la même espèce végétal (Van Overbeek et Van Elsas, 1995).

La plante libère des exsudats racinaires qui sont constitués de substances organiques carbonées et azotées, polysaccharides, acides organiques et protéines (Mench, 1985). Ces exsudats favorisent le développement de la microflore pathogène et non pathogène. Ainsi, en réponse à l'apport énergétique représenté par les exsudats racinaires, des propagules fongiques se développent de façon saprophytique jusqu'à la racine qu'elles peuvent infecter et éventuellement parasiter (Schroth et Hildebrand, 1964).

Les exsudats racinaires de certaines plantes peuvent influencer la composition et l'activité de la microflore se développant à proximité de racines ; ainsi, les exsudats d'*Ambrosia psilostrachya*, *Bromus japonicus*, et *Helianthus annuus*, plantes pionnières dans la recolonisation des cultures abandonnées dans Oklahoma, inhibent les *Rhizobium* et réduisent considérablement le nombre de nodules formés sur diverses légumineuses (Rovira et Davey, 1971).

Les rhizodépôts représentent la principale source de carbone dans la rhizosphère et peuvent jouer un rôle important pour l'établissement bactérien et l'efficacité des rhizobactéries (Beniziri *et al.*, 2002).

I-7.2. EFFET DU SOL

Le sol n'est pas un milieu neutre et sans effet sur les communautés microbiennes telluriques et leurs interactions réciproques et avec la plante.

Les caractéristiques microbiologiques du sol influencent directement la survie des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents inoculées, elle est d'autant meilleure que la biomasse microbienne est limitée (Compeau *et al.*, 1988; Davies et Whiterbread, 1989 ; Morel *et al.* ; 1989) et la quantité de nutriments est importante (Wessendorf et Lingens, 1989).

Rosenweïg et Stotzky (1979 et 1980) ont montré que l'antagonisme exercé dans le sol par des bactéries à l'encontre de champignons est influencé par les caractéristiques physico-chimiques du sol. La survie d'une souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère dépend également de la plante hôte (Atkinson *et al.*, 1975 ; Weller, 1986; Bahme et Schroth, 1987). Plusieurs auteurs ont montré que l'humidité du sol est un facteur déterminant dans la colonisation racinaire (Dupler et Baker, 1984; Howie *et al.*, 1987).

La colonisation bactérienne est influencée par la texture et la structure du sol qui peuvent contribuer dans la qualité de protection des bactéries vis-à-vis des stress hydrique et thermique et de la prédation par les protozoaires (Dupler et Baker, 1984).

Depuis le travail historique, remontant à 1904, de "Lorenz Hiltner" qui a mis en évidence l'abondance des microorganismes autour des racines des plantes, les travaux sur la rhizosphère ont souvent relaté d'une part, les associations microorganismes – plantes et une description des caractéristiques de la plante, et d'autre part, l'effet de la plante sur le sol et son impact sur l'activité et la croissance microbiennes. Même dans les travaux les plus récents, cette orientation reste valable et il reste encore que peu d'études ont été menées sur la dynamique et le maintien des nutriments dans la rhizosphère, ainsi que sur l'écologie microbienne de cette niche écologique (Van Veen, 2004).

II-1. INTRODUCTION

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes renferment diverses espèces non pathogènes à cytochrome oxydase C₅₅₂ positive, possèdent l'arginine dihydrolase et ne provoquent pas de réaction d'hypersensibilité sur le tabac. Ce groupe a été représenté initialement par les espèces *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. aureofaciens* (Johnson et Palleroni, 1989). Les espèces *P. fluorescens* et *P. putida* sont subdivisées, respectivement, en cinq biovars (I, II, III, IV et V) et en deux biovars (A et B).

Récemment d'autres espèces ont été décrites à l'exemple de *P. jessenii* (Verhille *et al.*, 1999a et 199b), *P. lini* (Delorme *et al.*, 2001; Delorme, 2002) et *Pseudomonas rhizosphaerae* (Peix *et al.*, 2003).

De nombreuses études taxonomiques ont souligné la forte hétérogénéité phénotypique et génotypique chez ces espèces et plus particulièrement chez *P. fluorescens*. Stanier *et al.*, (1966) ont subdivisé *P. fluorescens* en sept biotypes A, B, C, D et E renommés ultérieurement biovars I à V, tandis que les deux biotypes restants deviennent deux espèces indépendantes *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens*. Cette dernière a été rattachée par la suite à l'espèce *P. chlororaphis* (Palleroni, 1984).

Le biovar V de *P. fluorescens* est un taxon hétérogène renfermant des souches souvent difficiles à classer en raison de la faiblesse des caractères phénotypiques utilisés pour leur différenciation des autres biovars (Palleroni, 1984).

Bien que la classification multivars révèle une forte hétérogénéité phénotypique qui peut refléter une hétérogénéité génomique, elle demeure cependant comme le système le plus utilisé dans la classification de ce groupe bactérien. Différents facteurs écologiques et biologiques peuvent être à l'origine de la diversité et de l'adaptation de ces rhizobactéries.

De nombreuses études réalisées sur ce groupe bactérien ont révélé une forte diversité spécifique et infraspécifique. La distribution des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents telluriques est influencée par la plante et le sol. En effet, la sélection de taxons particuliers sous l'effet du génotype végétal a été déjà évoquée (Lemanceau *et al.*, 1995; Latour, 1996 ; Latour *et al.*, 1996).

La plante modifie les caractères physico-chimiques du rhizoplan induisant une modulation de la densité et de l'activité microbienne. Les conditions particulières de la rhizosphère exercent des actions spécifiques et favorisent certains groupes microbiens (Rovira, 1965; Colbert *et al.*, 1993 ; Latour, 1996).

Le sol influence les interactions plante - microorganismes (Latour, 1996; Delorme, 2002). De nombreux travaux ont montré une différence entre les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents associées à la rhizosphère de la tomate dans deux sols différents (Latour, 1996). Clays – Josserand *et al.*, (1999) ont mis en évidence l'influence de la plante et du sol sur la sélection des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Il est admis qu'il existe une très grande diversité chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents rhizosphériques et que les méthodes phénotypiques utilisées pour leur taxonomie sont insuffisantes. Dans ce chapitre, l'effet rhizosphère sur les populations bactériennes a été analysé au niveau phénotypique et taxonomique sur une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de sept biotopes différents. La définition du biotope est basée sur les caractéristiques pédo-climatiques de la région et le type de plante.

II-2. MATERIELS ET METHODES

II-2.1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE SOL

L'étude de la taxonomie et de l'influence de l'environnement sur les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été réalisée à partir de prélèvements de sol rhizosphérique de différentes régions agricoles d'Algérie, effectués entre 1997 et 2002. Ces régions ont été choisies sur la base de leurs vocations agricoles et des conditions climatiques et pédologiques. Chaque environnement représenté par la région (sol) et sa culture (plante) a été considéré comme un biotope ; sur cette base, sept biotopes, sources des prélèvements, ont été définis :

- (i) Vergers de rosacées fruitières à noyaux et à pépins, dans la plaine de la Mitidja.
- (ii) Vignobles, «vigne de table», âgés de plus de trois décennies, du littoral algérois.
- (iii) Cultures de pomme de terre, dans la région côtière à vocation maraîchère de la wilaya de Tipaza.
- (iv) Cultures de tomate conduite en plein champ ou sous abris, dans la région côtière de la wilaya de Tipaza.
- (v) Cultures céréalières (blé dur, blé tendre et orge), dans la région ouest de la Mitidja.
- (vi) Palmeraies des régions phœnicicoles de Ghardaïa et Metlili.
- (vii) Sols de la plaine de la Mitidja, non cultivés depuis au moins deux décennies.

Pour les espèces ligneuses (rosacées à noyaux et à pépins, vigne et palmier dattier), la partie supérieure du système racinaire a été déterrée et les échantillons de sol adhérent aux racines ont été récupérés dans des fioles stériles. Pour les plantes herbacées (céréales, pomme de terre et tomate), des systèmes racinaires entiers ou partiels ont été récupérés avec la masse de sol adhérent. Pour les sols nus, les prélèvements ont été effectués à des profondeurs de 30 à 50 cm.

De chaque biotope, 10 échantillons de sols ont été prélevés (200 à 250 g par échantillon) dans des conditions aseptiques et conservées à 4° C.

II-2.2. ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES

Après élimination des éléments racinaires grossiers, le sol fortement adhérent aux racines a été récupéré par rinçage dans des fioles contenant 100 ml d'une solution tampon ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM, pH 7), la suspension obtenue a été agitée pendant 10 min. Dans le cas du sol non cultivé, 10 g de sol ont été mis en suspension dans 90 ml de la même solution tampon. Des dilutions de 10 en 10 de chaque suspension ont servi, à raison de 100 μl , à l'ensemencement de milieu KB^+ , composé du milieu B de King (KB) (Annexe II.1) (King *et al.*, 1954) additionné de chloramphénicol (100 μg / ml) et d'ampicilline (40 μg / ml). L'incubation a été effectuée à 25 °C durant 24 à 48 h.

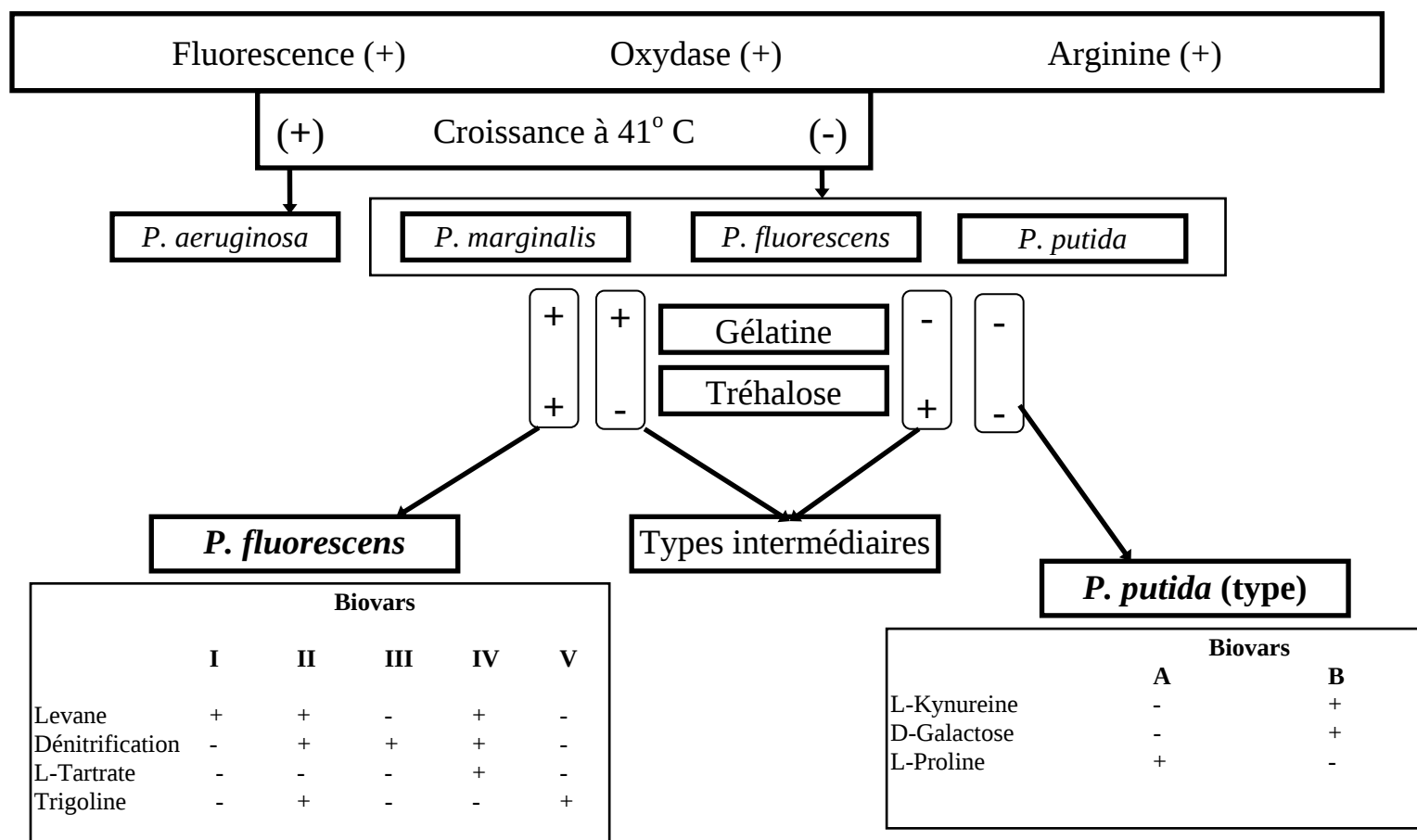
A raison de dix échantillons par prélèvement par biotope, trois isolements ont été réalisés à partir de chaque échantillon (10 x 3 x 7), soit 210 isolements.

Les colonies bactériennes individualisées fluorescentes ont été révélées sous UV (350 nm) et repiquées sur le milieu KB^+ . Les souches fluorescentes ont été conservées à -20 °C sur le milieu KB additionné de glycérol (25 %).

II-2.3. IDENTIFICATION TAXONOMIQUE

La vérification préliminaire de certains caractères génériques a été effectuée selon les tests classiques décrits par Lelliot et Stead (1987) et Schaad (1988), qui sont essentiellement la coloration de Gram et la morphologie cellulaire, l'oxydase, la recherche de catalase et la voie d'utilisation du glucose. Les caractérisations spécifique et intraspécifique ont été réalisées selon le schéma déterminatif de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens* - *putida* proposé par Stanier *et al.*, (1966) modifié par Digat et Gardan (1987) (Figure II.1) et les clés dichotomiques proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes (Figure II.2).

Hormis les tests où il est mentionné les conditions de culture et d'incubation, les autres tests ont été effectués avec des cultures bactériennes âgées de 18 à 24 heures sur milieu KB, incubées à 25 °C. Les concentrations des suspensions bactériennes ont été déterminées par photométrie (DO) en se référant à des courbes étalons (Annexe II.2). Les suspensions bactériennes ont été préparées dans l'eau distillée stérile ou dans la solution tampon ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mM, pH 7) selon les techniques de Lelliot et Stead (1987).



+ : réaction positive, - : réaction négative

Figure II.1 : Schéma général de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens-putida*
d'après Stanier *et al.*, (1966) Modifié par Digat et Gardan, (1987)

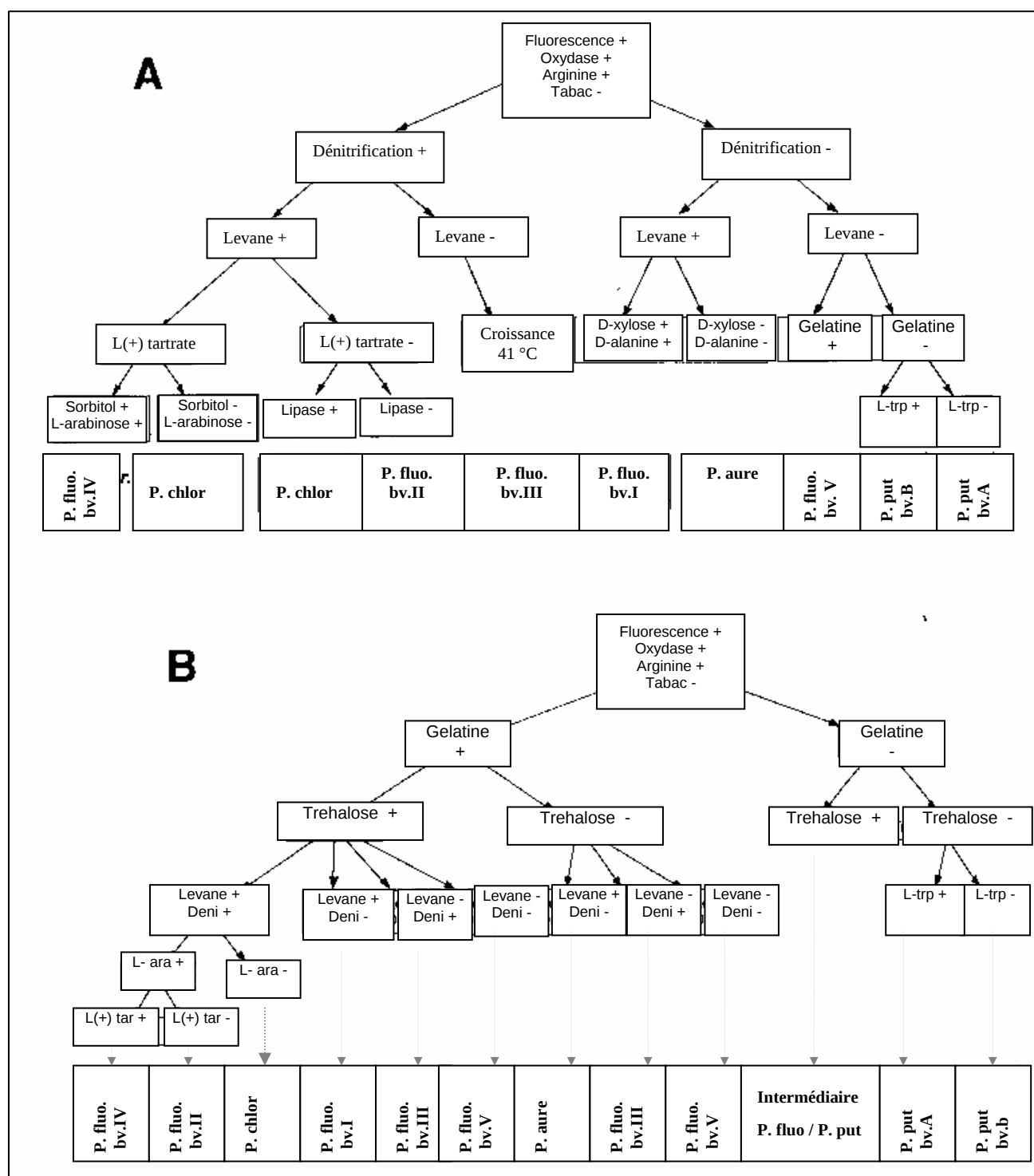


Figure II.2 : Clés dichotomiques d'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents :
 (A) d'après Jacques (1994) et (B) d'après Bossis (1995).

* **Production du pigment fluorescent** : La production du pigment fluorescent a été recherchée sur milieu KB. Après incubation de 24 à 96 heures à 26° C, le développement du pigment fluorescent a été révélé sous UV (350 - 400 nm).

* **Coloration de Gram** : Elle a été effectuée selon la technique classique décrite par Gardan et Luisetti (1981). En parallèle une deuxième technique, plus rapide, a été pratiquée (Suslow *et al.*, 1982), qui consiste en la vérification de la viscosité après mise en contact de la crème bactérienne avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH à 3 %). Le caractère Gram négatif est révélé par une réaction KOH positive se traduisant par la formation d'un filet visqueux. Des souches bactériennes témoins Gram⁺ (*Bacillus cereus*) et Gram⁻ (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) ont été utilisées.

* **Arginine dihydrolase** : Le système enzymatique dihydrolase 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 la citrulline ureidase. L'hydrolyse de l'arginine a été testée sur le milieu 2A (Thornley, 1960) (Annexe II.1). 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 rouge pourpre suite à l'alcalinisation du milieu dû à la présence de NH₃ (Hildebrand *et al.*, 1988).

* **Oxydase** : La recherche de la cytochrome oxydase (Kovacs, 1956) a été effectuée selon la méthode décrite par Moore *et al.*, (1988). L'inoculum est préparé avec une culture bactérienne de 24 heures sur milieu NA additionné de glucose à 1% (Annexe II.1) à 25° C. La crème bactérienne a été déposée, avec une anse de platine, sur du papier Wathman imprégné d'une solution aqueuse extemporanée de dihydrochloride tetraméthyl - p - phnyelendiamine à 1%. Une réaction d'oxydase positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes; la réaction est positive tardive entre 10 et 60 secondes et elle est négative après 60 secondes.

* **Test d'Hypersensibilité (HR)** : Le test de l'hypersensibilité (HR) (Klement, 1963) a été effectué avec des suspensions bactériennes (10⁸ à 10⁹ cfu/ml) en eau distillée stérile. L'inoculation des feuilles de tabac âgées d'un mois (*Nicotiana tabaccum* var. *xanthi*) a été pratiquée par infiltration, à l'aide d'une seringue. Les plants de tabac inoculés ont été déposés dans le phytotron (photopériode de 16 h) à la température de 20 à 25 °C et une humidité relative de 70 à 80 %. Les témoins négatifs et positifs ont été inoculés, respectivement, avec de l'eau

distillée stérile et avec la souche phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Le développement de collapse au niveau des zones inoculées 48 à 72 heures après l'inoculation traduit une réaction d'hypersensibilité positive.

* **Dénitrification:** Ce test a été réalisé en tubes sur milieu Ayers (Annexe II.1) additionné d'extrait de levure (5 g/l); KNO₃ (10 g/l) et d'agar noble (1 g/l). Après ensemencement avec une crème bactérienne, le milieu a été additionné à nouveau de 1 % d'agar noble. La croissance a été détectée par la mesure de la densité optique. Une croissance à 27° C durant les 5 jours d'incubation indique une réaction positive de dénitrification (Hildebrand *et al.*, 1988).

* **Production de levane sucrase :** Le test de levane sucrase a été effectué sur milieu NA hypersaccharosé (5 %) (Annexe II.1). Après ensemencement du milieu en boîte de Pétri et incubation pendant 3 à 5 jours, le développement de colonies blanchâtres, convexes et bombées, étincelantes et muqueuses indique la présence de levane sucrase (Hildebrand *et al.*, 1988).

* **Croissance à 41 °C:** Des suspensions bactériennes de 10⁴ à 10⁶ cfu/ml ont été préparées dans des tubes contenant 10 ml du milieu Ayers. L'incubation a été effectuée sous légère agitation à 41°C pendant 48 heures, alors que les tubes témoins ont été incubés à 25° C. La vérification de la croissance a été effectuée par mesure de la densité optique.

* **Utilisation du tréhalose :** Ce test a été réalisé selon la technique de Mamoun et Olivier (1992). Une solution de tréhalose (stérilisée par filtration sur membrane millipore® 0,22 µm) a été apportée au milieu Ayers à la concentration finale de 0,3 % et le substrat obtenu a été réparti à raison de 5 ml par tube. Chaque tube a été ensemencé avec 1 ml d'une suspension bactérienne de 10⁸ cfu/ml. Le catabolisme du tréhalose est mis en évidence par le virage de la coloration du vert au jaune après 72 heures d'incubation à 25° C.

* **Protéolyse :** Les tubes contenant le milieu gélatine (Annexe II.1) ont été ensemencés avec une crème bactérienne de 24 heures et incubés pendant 72 heures à 25° C. La lecture des résultats a été faite après passage des tubes inoculés, ainsi que des tubes témoins non inoculés, à la température de + 5° C pendant 30 minutes afin de vérifier la liquéfaction de la gélatine. La protéolyse se traduit par la liquéfaction du milieu, en comparaison avec le témoin qui reste solide (Lelliot et Stead, 1987). Une autre méthode a été utilisée, qui consiste à ensemencer en traits le milieu gélatine en boîte de Pétri. Après incubation, l'ajout du réactif de Frazier met en évidence un halo clair caractéristique des colonies protéolytiques (Gardan et Luisetti, 1981).

* **Utilisation de L-tartrate :** Ce test a été utilisé pour différencier entre les biovars II et IV de *Pseudomonas fluorescens* (Digat et Gardan, 1987). La solution de L-tartrate stérilisée par

filtration a été additionnée au milieu Ayers à une concentration finale de 0,5 %. Après ensemencement du milieu, le catabolisme du L-tartrate est mis en évidence par le virage de la coloration initiale verdâtre du milieu au jaune après 72 heures d'incubation à 26° C (Hildebrand *et al.*, 1988).

II-2.4. ETUDE DES PROFILS PLASMIDIQUES

Une analyse du profil plasmidique a été effectuée sur 14 souches, soit 2 par biotope. Les plasmides ont été extraits par la méthode de Kado et Liu (1981) (Annexe II.3). Une culture de 24 h à 25° C sur milieu LB (Annexe II.1) est centrifugée (8000 rpm, 3 min, 4°C) et le surnageant est resuspendu dans 100 µl de TE (pH 8), en incorporant délicatement 300 µl de tampon de lyse et 900 µl d'une solution de phénol-chloroforme. Après agitation manuelle douce et centrifugation (13000 rpm, 7 min, 4°C), le surnageant aqueux est prélevé et conservé à 8° C. L'électrophorèse des culots plasmidiques a été effectuée sur gel d'agarose (0,7 %) en cuve horizontale (11x14 cm, Gibco) pendant 2 h et 30 min à 100 V. La révélation a été faite par coloration du gel au bromure d'ethidium et examen sous UV. Le profil plasmidique d'une souche de référence de *Pseudomonas stewarti* (comportant plus de 12 plasmides) a servi de marqueur de poids moléculaire.

II-2.5. CARACTERISATION DES PROFILS TROPHIQUES

Cette caractérisation phénotypique par l'étude des profils trophiques a été réalisée sur 80 souches bactériennes des différents biotopes (Tableau II.1) et également sur dix souches de référence dont six souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, deux souches de *Pseudomonas syringae* et deux souches d'*Agrobacterium vitis* (Tableau II.2).

Les souches ont été testées pour leurs aptitudes à utiliser 99 sources de carbone à l'aide de galeries Biotype 100 (bio Merieux – France) (Annexe II.4). Les tests ont été réalisés selon la notice technique de la galerie et les recommandations du fabricant.

Tableau II- 1 : Nombre et Origine des souches bactériennes retenues

Biotopes	Nombre de souches
I (rosacées)	10
II (vignoble)	10
III (Pomme de terre)	15
IV (tomate)	15
V (céréales)	10
VI (palmeraies)	10
VII (sol non cultivé)	10

Tableau II- 2 : Souches de référence

Souches	Espèce	Caractéristiques	Origine
B 8 B 11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Non données	Pr. Thonart (Université de Liège - Belgique)
CHA0 CHA400 * CHA631*	<i>P. fluorescens</i>	Produit HCN, PhI, Pyoverdines et autres métabolites à effet antibiotique, utilisées dans de nombreux travaux (Keel <i>et al.</i> , 1998)	Dr. C. Keel Laboratoire de Biologie microbienne (Université de Lausanne, Suisse)
1650	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	Pathogène des rosacées à noyaux, isolée du prunier	Laboratoire de phytobactériologie (Angers - France) (Auteur Bernac).
1543	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Pathogène des rosacées à noyaux, isolée du cerisier	Laboratoire de phytobactériologie (Angers - France) (Auteur Bernac)
6/6 Ag63	<i>Agrobacterium vitis</i>	Tumorigène sur vigne	Laboratoire de Phytobactériologie (Université de Blida (Algérie)
C7R12	<i>P. fluorescens</i>	Résistante à la rifampicine utilisée dans de nombreux travaux (Latour, 1996 ; Lemanceau <i>et al.</i> , 1997 ; Delorme, 2002)	UMR- MGS, INRA Dijon – Université Bourgogne, France (Dr P. Lemanceau)

P : *Pseudomonas* ; pv. Pathovar.

* C HA400 : mutant de CHA0 déficient en synthèse de pyoverdine ; insertion dus transposon Tn1733; résistant à 25µg/ml kanamycine

** CHA631 : mutant de CHA0 déficient en synthèse de Phloroglucinol (DAPG), délétion "in frame" *ΔphlA*;

II-2.6. TAXONOMIE NUMERIQUE

L'analyse des résultats des profils trophiques (galerie API, Biotype 100) des 90 souches bactériennes a été réalisé avec le programme **Cabliq** (version 2.01) (<http://www.info.univ-angers.fr/pub/gh/Wcabliq/cabliq.htm>). Après établissement de la liste numérotée des tests positifs pour chaque souche bactérienne, la saisie des données a été réalisée en sens ligne pour le test phénotypique et en sens colonne pour la souche bactérienne.

La classification des souches c'est à dire la constitution de groupes de souches (ou "taxons") reprend les méthodes du logiciel **taxonum**. A partir des distances de Jaccard-Sneath entre paires de souches (Sneath et Sokal, 1973), on forme des classes regroupées selon le critère UPGMA (Unweighted Pairgroup Method With Averages) (average link = hiérarchie par la distance moyenne). Le dendrogramme correspondant a été tracé avec le logiciel du domaine public **Gnuplot**. La validation interprétative de la classification, c'est à dire la recherche des caractères les plus explicites quant à la formation des classes utilise des valeurs de probabilités nommées **ccd** (coefficient de capacité diagnostic).

Les valeurs de similarité ont été transformées en distance (1 - pourcentage de similarité), le groupement des souches a été fait sur la base d'une distance moyenne. L'identification probabiliste a été effectuée en calculant pour chaque classe (phénon) un taux d'association entre l'isolat bactérien et la classe et seules les classes pour lesquelles le taux normalisé est élevée sont retenues. Ainsi, la validation du choix de la classe se fait sur la base d'un taux d'association réciproque entre la classe et l'isolat. Les nœuds du dendrogramme représentent les fusions successives de la classification hiérarchique, alors que la hauteur des nœuds correspond à la distance entre les isolats ou les groupes d'isolats fusionnés.

Les groupes d'isolats obtenus ont été regroupés en phénons (classes) selon un niveau de similarité supérieur ou égal à 80 %, c'est à dire à une distance égale ou inférieure à 0,2000.

II-3. RESULTATS

II-3.1. ISOLEMENT DES *Pseudomonas* spp. FLUORESCENTS

Les méthodes de caractérisation décrites par Lelliot et Stead (1987) et par Schaad (1988) ont permis une identification générique préliminaire des souches isolées des différents biotopes. La sélection préliminaire basée sur la production de pigment fluorescent et les caractères macromorphologiques, sur le milieu KB, a permis de constituer une collection de **1800 souches** bactériennes fluorescentes.

Les tests de l'oxydase et de l'arginine dihydrolase, considérés comme des tests déterminatifs dans l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Mercenier *et al.*, 1980; Digat et Gardan, 1987 ; Jacques, 1994 ; Bossis, 1995), ont été pratiqués sur les 1800 souches. L'étude des cytochromes respiratoires permet de distinguer *P. aeruginosa* et les espèces saprophytes ayant une cytochrome C oxydase (Stanier *et al.*, 1966) de la plupart des espèces phytopathogènes dépourvues de cette enzyme (Lelliot *et al.*, 1966; Sands *et al.*, 1967 ; Palleroni, 1984).

Le test de l'hypersensibilité (HR) sur tabac a permis de discriminer davantage les saprophytes des phytopathogènes, lesquels provoquent une réaction d'hypersensibilité (Klement, 1963).

Les résultats des tests ont permis de retenir **1050 souches** [oxydase (+), arginine (+) et tabac (-)], soit un taux de 58,33 % du total des souches isolées, comme des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes.

La répartition des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les sept biotopes montre une dominance des souches issues du biotope de tomate, soit 399 souches (38 %). A partir du biotope des rosacées, 165 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (15,72 %) ont été isolées, suivi de près par les isolats du biotope de pomme de terre avec 157 souches (14,95 %) et du biotope viticole avec 126 souches (12,00 %). Les souches provenant des biotopes céréaliers (94 souches) et de palmeraies (77 souches) représentent respectivement 08,95 % et 07,33 % du total des isolats. Les isolats provenant du sol non cultivé représentent seulement 32 souches (03,05 %) (Tableau II.3).

Tableau II-3 : Répartition des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents selon les biotopes

	Biotopes						
	Tomate	Pomme de terre	Céréales	Vigne	Rosacées	Palmier	Sol non cultivé
Nombre de souches	399	157	94	126	165	77	32
Pourcentage*	38,00	14,95	08,95	12,00	15,72	07,33	03,05

* Pourcentage par rapport au nombre total de souches sélectionnées (n = 1050).

II-3.2. IDENTIFICATION SPECIFIQUE

Le schéma d'identification proposé par Digat et Gardan (1987) et les clés dichotomiques de Jacques (1994) et de Bossis (1995) ont montré des différences dans l'affiliation spécifique des souches aux taxons décrits (Tableau II.4). Selon la caractérisation proposée par Digat et Gardan (1987), 609 souches (58 %) et 126 souches (12 %) ont été assimilées respectivement à *P. fluorescens* et *P. putida*. Pour le reste des souches, 136 (12,95 %) représentent le groupe intermédiaire *P. fluorescens* / *P. putida* et 179 (17,05 %) forment un groupe de souches non classées. Le taux cumulé des souches de ces deux derniers groupes (30 %), dont l'identification reste imprécise, est important.

La clé dichotomique proposée par Jacques (1994), a permis d'affilier 79,95 % des souches aux principales espèces des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes: *P. fluorescens* (n = 440; 41,90 %), *P. putida* (n = 190; 18,10 %), *P. chlororaphis* (n = 84, 08,00 %) et *P. aureofaciens* (n = 31, 02,95 %). Les 305 souches restantes (29,05 %) ont été regroupées dans le groupe des souches non classées (Tableau II.4).

La comparaison entre les deux schémas d'identification de Digat et Gardan (1987) (I) et de Jacques (1994) (II) a montré des différences notables (Tableau II. 4) :

- L'effectif de *P. fluorescens* passe de 609 (I) à 440 souches (II), soit une diminution de 16,5 %.
- L'effectif de *P. putida* passe de 126 (I) à 190 souches (II), soit un accroissement de 6,1 %.
- Le nombre de souches non classées passe de 179 (I) à 305 souches (II), soit 70,39 % de différence.

L'identification de cette même collection de *Pseudomonas* spp. fluorescents à l'aide de la clé dichotomique de Bossis (1995) a permis de retrouver les quatre espèces précédentes, mais avec des taux différents de ceux des deux méthodes citées plus haut (Tableau II.4). A l'exception

de *P. chlororaphis* pour laquelle il y a eu concordance, il a été noté des différences dans l'affiliation des souches aux trois autres espèces.

Tableau II – 4 : Identification spécifique des souches sélectionnées

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. putida</i>	Intermed	Non classées
Digat et Gardan (1987)	609 ^a (58,00) ^b	-	-	126 (12,00)	136 (12,95)	179 (17,05)
Jaques (1994)	440 (41,90)	84 (08,00)	31 (02,95)	190 (18,10)	-	305 (29,05)
Bossis (1995)	494 (47,05)	84 (08,00)	52 (04,95)	146 (13,90)	179 (17,05)	95 (09,05)

P. Pseudomonas, Intermed : intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida*, - : non donné

a : nombre de souches, b : pourcentage de souches par rapport au nombre total de souches testées (n = 1050).

Pour *P. fluorescens* et *P. aureofaciens*, des augmentations ont été notées par rapport à l'identification effectuée selon la clé dichotomique de Jacques (1994), passant respectivement de 41,90 % à 47,05 % et de 02,95 % à 04,95 %. Pour *P. putida*, il a été noté une diminution de son pourcentage, passant de 18,10 % à 13,90 %. Toujours, selon cette clé dichotomique, 274 souches ont été affectées aux groupes des souches intermédiaires et des souches non classées.

II-3.3. IDENTIFICATION INFRASPECIFIQUE

Le typage de *P. fluorescens* et *P. putida* en leurs biovars a été réalisé à l'aide des tests infraspécifique de Jacques (1994) et Bossis (1995). La caractérisation spécifique et infraspécifique a permis d'observer 23 spectres de réponses, 22 spectres correspondent aux taxons et subdivisions des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Tableau II.5) et un spectre englobe les réponses ne concordant pas avec les caractéristiques des taxons et subdivisions décrits.

Chez *P. fluorescens* représentée par 494 souches, le biovar I, reconnu par ses réactions gélatine (+), tréhalose (+), levane (+) et dénitrification (-), est de loin le plus dominant avec 271 souches (54,68 %) (Tableau II.5) ; en deuxième position, on a le biovar II avec 85 souches (17,20 %). Les 138 souches restantes se répartissent dans les autres biovars : biovar III avec 57 souches (11,54 %), biovar IV avec 45 souches (09,10 %) et biovar V avec 36 souches (07,29%) (Tableau II.6).

En ce qui concerne *P. putida*, ses deux biovars (A) et (B) ont été mis en évidence par le test d'utilisation du L-tryptophane. Sur les 146 souches affiliées à cette espèce, 48 utilisant cet acide aminé ont été classées dans le biovar (A) et 98 souches L-tryptophane (-) ont été rattachées au biovar (B) (Tableau II.6).

Tableau II.5 : Spectres de réponses aux tests d'identification spécifique et infraspécifique selon les clés dichotomiques (A) et (B)

TESTS	SPECTRES DE REPONSES																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Fluorescence	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tabac (HR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dénitrification	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	nt	nt	nt
Levane	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	nt	nt	nt
L-Tartrate	+	+	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
D-Xylose	nt	nt	nt	nt	nt	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
D-Alanine	nt	nt	nt	nt	nt	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Gélatine	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Tréhalose	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Sorbitol	+	-	nt	nt	nt	ht	nt	nt	nt	nt	+	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Arabinose	+	-	nt	nt	nt	ht	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Lipase	nt	nt	+	-	nt	ht	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
L-Tryptophane	nt	nt	nt	nt	nt	ht	nt	nt	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	P f. bv. IV	P . chlor.	P . chlor.	P f. bv. II	P f. bv. III	P f. bv. I	P . aure	P f. bv. V	P p. bv. A	P p. bv. B	P f. bv. IV	P f. bv. II	P . chlor.	P f. bv. I	P f. bv. Iii	P f. bv. V	P . aure	P f. bv. III	P f. bv. V	Inter	P p. bv. B	P p. bv. A
	(A) Clé dichotomique (Jacques, 1994)										(B) Clé dichotomique (Bossis, 1995)											

+: réponse positive, -: réponse négative, nt : non testé ; P. f : *Pseudomonas fluorescens*, P. p : *Pseudomonas putida*, P. chlor : *Pseudomonas chlororaphis*, P. aure : *Pseudomonas aureofaciens* ;bv. : biovar, Inter : Intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida*.

II.3.4. Distribution des souches selon les biotopes

La caractérisation spécifique et infraspécifique des souches a permis de mettre en évidence **11 taxons** : 9 taxons correspondent aux cinq biovars de *P. fluorescens*, aux deux biovars de *P. putida*, à *P. aureofaciens* et à *P. chlororaphis*, et 2 taxons correspondent aux groupes intermédiaire et des souches non classées. Tous les taxons des *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été retrouvés dans les isollements issus des biotopes de tomate et des rosacées.

Les souches bactériennes du biotope de pomme de terre appartiennent aux principales espèces de ce groupe bactérien. On note une dominance de *P. fluorescens*, les cinq biovars confondus (73 sur les 157 souches). Le biovar I est prédominant (44 / 73 souches), tandis que le nombre de souches appartenant aux autres biovars varie de 6 à 9. En deuxième position, on retrouve le biotype B de *P. putida* représenté par 31 souches. Le groupe intermédiaire comporte 20 souches (Tableau II.6).

Les 94 isolats bactériens des sols céréaliers ont été affiliés aux deux taxons représentés par *P. fluorescens* (75 souches) et *P. putida* (19 souches). Le biovar I de *P. fluorescens* reste toujours dominant (29 souches). Le biovar (B) de *P. putida* comporte 18 souches et la souche restante appartient au biovar (A). Les espèces *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis* n'ont pas été retrouvées dans les isollements issus de cette spéculation végétale ; comme il n'a pas été retrouvé le taxon du groupe intermédiaire, ni le groupe des souches non classées.

Les isollements réalisés des sols viticoles ont permis de retrouver les principales espèces du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents : *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis*. Dans ce biotope, *P. fluorescens* reste dominante (65/126 souches), c'est le biovar IV qui est le plus fréquent, tandis que le biovar I n'est qu'en troisième position (13 souches) après le biovar II (16 souches). De faibles effectifs de *P. aureofaciens* et de *P. chlororaphis* ont été enregistrés avec, respectivement, 7 et 4 souches. Les deux souches identifiées comme étant *P. putida* appartiennent au biovar (A). L'effectif cumulé des souches intermédiaires et des souches non classées atteint 40 souches, soit un taux de 31,75 % du total des souches isolées de ce biotope.

Les isollements effectués à partir des échantillons du biotope de palmeraies ont permis d'identifier *P. fluorescens* (28 souches), *P. chlororaphis* (11 souches) et *P. putida* biovar (A) (une souche). Dans ce biotope, il a été observé une fois encore la prédominance du biovar I de *P. fluorescens*. Le taux cumulé des souches non classées (12 souches) et des souches intermédiaires (25 souches) avoisine celui du biotope viticole.

Tableau II.6 : Répartition spécifique et infraspécifique des souches sélectionnées

	Taxons								Intermédiaire	P. aureofaciens	P. chlororaphis	Non Classées
	P. fluorescens				P. putida							
	bv. I	bv. II	bv.III	bv.IV	bv. V	bv A	bv B					
Biotopes												
Tomate	118	28	17	07	13	12	36	39	28	36	65	
Pomme de terre	44	09	06	06	08	16	31	20	14	03	00	
Céréales	29	13	18	09	06	01	18	00	00	00	00	
Vigne	13	16	12	21	03	10	00	25	07	04	15	
Rosacées	29	10	02	01	04	03	12	68	03	30	03	
Palmier	18	07	02	01	00	01	00	25	00	11	12	
Sol non cultivé	20	02	00	00	02	05	01	02	00	00	00	

P : *Pseudomonas*, Intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida*

Le classement des souches issues des sols de vergers de rosacées comprend à la première position le groupe intermédiaire (68 souches), suivi par *P. fluorescens* (46 souches). Les cinq biovars de cette espèce ont été retrouvés, la dominance reste toujours pour le biovar I (29 souches); *P. chlororaphis* occupe la troisième position avec 30 souches.

Dans les isollements issus du biotope de la tomate, *P. fluorescens* occupe de loin la première position (183 souches, 45,86 %), avec une prédominance du biovar I (118 souches, 64,48 %). Les effectifs des autres biovars sont de 07 à 28 souches. *P. putida* est représentée par 48 souches dont 12 du biovar (A) et 36 du biovar (B). Le groupe intermédiaire est représenté par 39 souches. Les espèces *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis* comportent, respectivement 28 et 36 souches. Le reste des souches (n = 65, 16,29 %) a montré des profils trophiques ne permettant pas leur classement dans les taxons connus (Tableau II.6).

Dans le biotope représenté par le sol non cultivé, au total 32 souches ont été isolées, ce qui représente une fréquence d'isolement faible par rapport aux autres biotopes. Ces 32 souches se répartissent entre *P. fluorescens* (24 souches), *P. putida* (6 souches) et le groupe intermédiaire (2 souches). Le biovar I de *P. fluorescens* se distingue par sa fréquence d'isolement (20 / 24 souches), les biovars II et V sont représentés par deux souches chacun, alors que les biovars III et

IV n'ont pas été retrouvés. Les 6 souches de *P. putida* ont été affiliées au biovar A (5 souches) et biovar B (1 souche).

En résumé, *P. fluorescens* est toujours l'espèce la plus fréquemment isolée (25,80 %), suivi du groupe intermédiaire *P. fluorescens* / *P. putida* (17,05 %). Le biovar I prédomine dans l'ensemble et spécifiquement au niveau de six biotopes, à l'exception du biotope viticole. Les souches non classées (n = 95) représentent un taux de 9,05 % (Figure II.3).

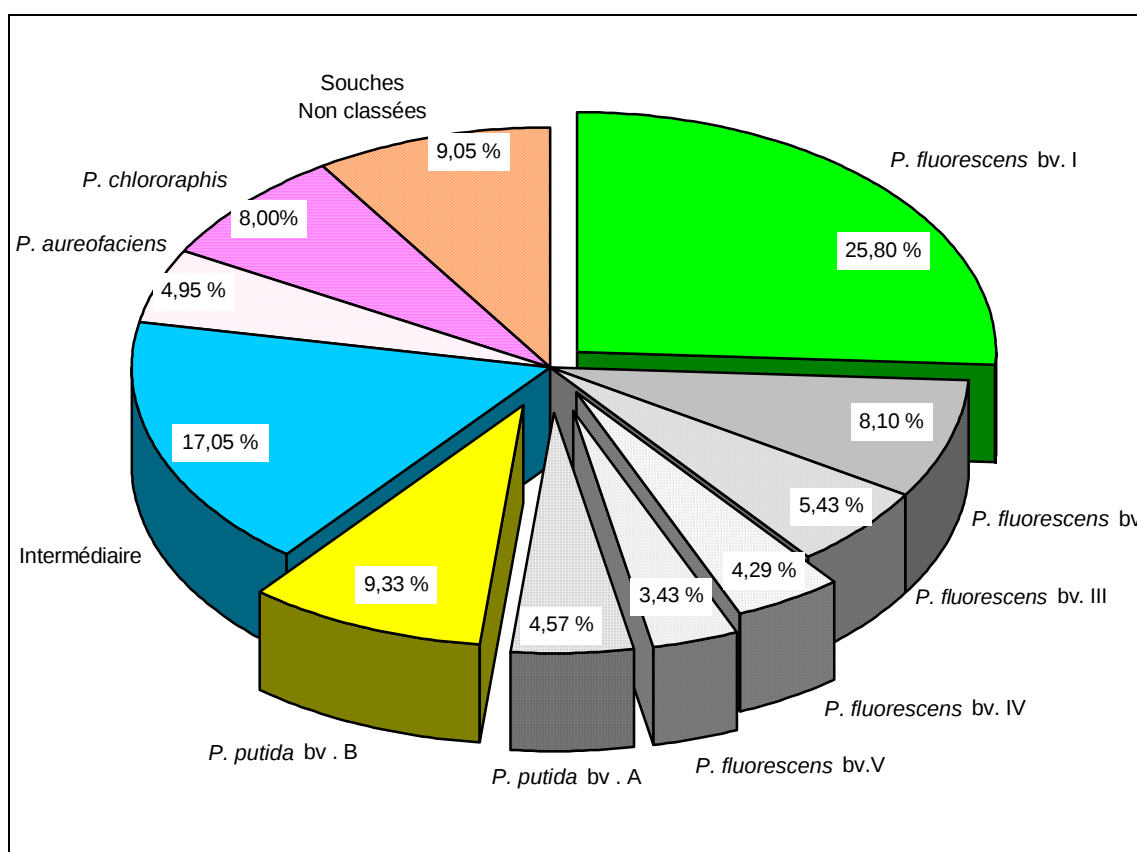


Figure II.3 : Répartition spécifique et infraspécifique des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées des sept biotopes (n = 1050).

II-3.5. PROFILS PLASMIDIQUES

Les culots plasmidiques de 14 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents provenant des sept biotopes ont été analysés par électrophorèse. A l'exception de deux souches chez lesquelles on note la présence de bandes plasmidiques de 45 Mda et 22 Mda, toutes les autres ne contiennent pas apparemment de plasmides.

II-3.6. TAXONOMIE NUMERIQUE

La caractérisation métabolique de **80 souches** objets de notre étude, en présence de 10 souches de référence, par leur aptitude à l'utilisation de 99 sources de carbone (galerie biotype 100) a permis leur groupement en fonction de leurs profils trophiques (Annexe II.5). Après le calcul de la matrice de distances entre les 90 souches testées, un dendrogramme phénotypique a été construit. Le niveau de similarité retenu, avec une coupure (ccd) au seuil de 0,200 a permis de grouper les souches ayant au moins 80 % de similarité dans la même classe ou phénon. A ce seuil de coupure, 33 classes ont pu être définies, allant à une distance de 0,6839 correspondant à moins de 32 % de similarité, dont 21 vraies classes contenant au moins deux souches et 12 singletons (souches individuelles). (Figure II.4, Tableau II.7, Annexe II.6).

- Le maximum de regroupement se retrouve dans la classe 15 renfermant 15 souches, dont six issues du biotope de rosacées, six du biotope de palmeraies et une des biotopes céréaliier et de pomme de terre. Dans cette classe, nous retrouvons la souche de référence *P. fluorescens* CHA0.
- Les classes 1 et 17 renferment chacune sept souches. La classe 1 est représentée par trois souches de référence *P. syringae* pv. *syringae* 1543, *P. fluorescens* C7R12 et *P. fluorescens* CHA631, deux souches du biotope de tomate et une souche du biotope céréaliier. La classe 17 regroupe trois souches du biotope de rosacées, trois souches du biotope de palmeraies et une souche isolée du sol non cultivé.
- La classe 5 regroupe six souches dont deux du biotope céréaliier, trois souches du biotope de tomate et la souche de référence *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1650.
- La classe 7 renferme cinq souches; trois du biotope de pomme de terre, une du biotope de tomate et une du biotope viticole.
- La classe 21 est représentée par quatre souches, trois souches du biotope de pomme de terre et une du biotope viticole.
- Les classes 9, 16, 28 et 32 regroupent chacune trois souches. La classe 9 contient deux souches du biotope de pomme de terre et la souche de référence *Pseudomonas fluorescens* B11. La classe 16 est représentée par trois souches isolées du sol non cultivé. La classe 28 renferme une souche du biotope de tomate, une du biotope céréaliier et la souche de référence *P. fluorescens* CHA400. La classe 32 regroupe deux souches du biotope viticole et une du sol non cultivé.

- 11 classes renferment deux souches chacune. Les classes contenant les souches issues du même biotope sont les classes 23 et 29 pour le biotope viticole, la classe 2 pour le biotope de tomate et la classe 22 pour le biotope de pomme de terre. Les classes 11, 13 et 28 sont représentées chacune par deux souches des biotopes de tomate et céréaliier. La classe 12 contient une souche du biotope de tomate et une du sol non cultivé. Des situations analogues ont été observées pour les classes 4, 19, 27 où l'origine des deux souches est différente. La souche de référence *Agrobacterium tumefaciens* 6/6 se retrouve dans la classe 4.
- 12 Classes sont des singletons, elles renferment une seule souche :
 - Les classes 10, 14, 24 et 25 renferment des souches issues du sol non cultivé.
 - Les classes 8 et 20 renferment, respectivement, les souches de référence *Agrobacterium tumefaciens* 63 et *Pseudomonas fluorescens* B8.
 - Les classes 18 et 30 renferment des souches du biotope viticole.
 - Les classes 31 et 33 renferment des souches du biotope de pomme de terre.
 - Dans les deux classes restantes, nous retrouvons une souche du biotope céréaliier dans la classe 12 et une du biotope de tomate dans la classe 26.

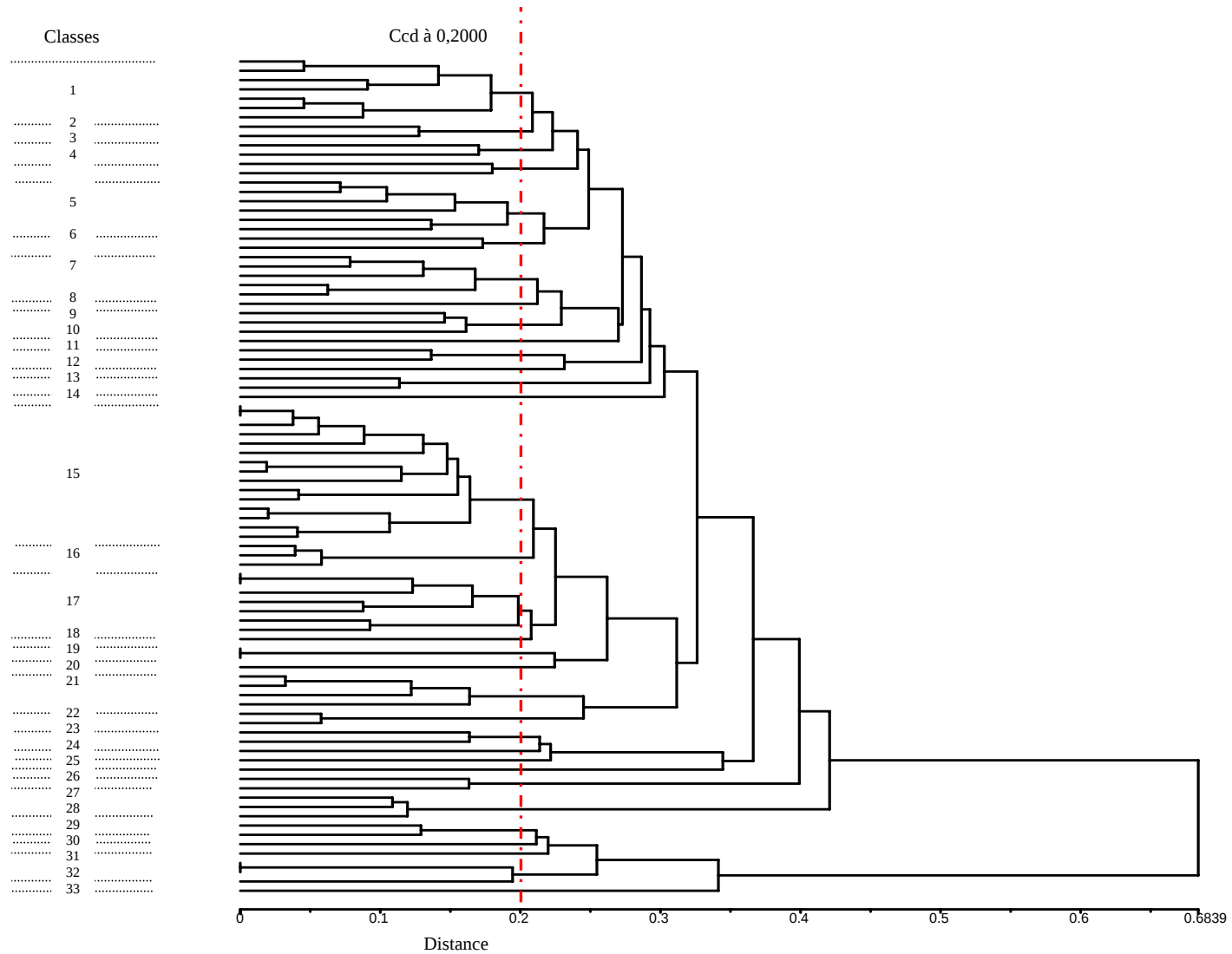


Figure II.4 : Dendrogramme des 90 souches (ccd : coupure au seuil 0.200).
Répartition en 33 classe(s) : 21 "vraies" classes et 12 singletons.

Tableau II.7 : Effectifs et souches des différentes classes du dendrogramme

Classe	Effectif	Souches
1	7	Pss 1543 , <i>Pf</i> (III) T6, Pf CHA631 , <i>pf</i> (IV) T7, Pf C7R12 , <i>Pf</i> (V) T8, <i>Pp</i> (B) B9
2	2	<i>Pp</i> (B) T10, <i>Pf</i> (V) SN6
3	2	<i>Pfi</i> T11, <i>Pa</i> T12
4	2	<i>Pf</i> (I) B1, At 6/6
5	6	Psm 1650 , <i>Pf</i> (I) T1, <i>Pf</i> (I) B2, <i>Pf</i> (II) T5, <i>Pf</i> (II) T4, <i>Pf</i> (III) B5
6	2	<i>Pfi</i> P13, <i>Pf</i> (IV) B6
7	5	<i>Pf</i> (IV) P4, <i>Pf</i> (II) P5, <i>Pp</i> (A) V6, <i>Pf</i> (I) P1, <i>Pfn</i> T14
8	1	At 63
9	3	<i>Pf</i> (I) P3, Pf B11 , <i>Pf</i> (III) P6
10	1	<i>Pp</i> (A) SN7
11	2	<i>Pf</i> (I) T2, <i>Pf</i> (I) B3
12	1	<i>Pf</i> (V) B7
13	2	<i>Pf</i> (I) T3, <i>Pf</i> (II) B4
14	1	<i>Pf</i> (II) SN5
15	15	<i>Pc</i> A8, <i>Pfi</i> D8, <i>Pp</i> (A) A4, <i>Pf</i> (II) A2, <i>Pf</i> (III) D4, <i>Pf</i> (I) D2, <i>Pf</i> (V) A3, <i>Pf</i> (II) D3, <i>Pp</i> (A) B8, <i>Pf</i> (I) A1, <i>Pf</i> (I) D1, Pf CHA0 , <i>Pp</i> (A) P9, <i>Pf</i> (I) A10, <i>Pfn</i> D10
16	3	<i>Pp</i> (B) SN9, <i>Pfi</i> SN10, <i>Pp</i> (B) SN8
17	7	<i>Pfi</i> A6, <i>Pp</i> (A) D6, <i>Pf</i> (I) SN4, <i>Pa</i> A7, <i>Pfi</i> D7, <i>Pp</i> (B) A5, <i>Pf</i> (IV) D5
18	1	<i>Pf</i> (I) V1
19	2	<i>Pfn</i> A9, <i>Pc</i> D9
20	1	Pf B8
21	4	<i>Pc</i> V9, <i>Pc</i> P15, <i>Pfi</i> P12, <i>Pf</i> (V) P8
22	2	<i>Pp</i> (B) P10, <i>Pp</i> (B) P11
23	2	<i>Pfn</i> V10, <i>Pf</i> (V) V5
24	1	<i>Pf</i> (I) SN1
25	1	<i>Pf</i> (I) SN3
26	1	<i>Pc</i> T13
27	2	<i>Pf</i> (I) P2, <i>Pfn</i> T15
28	3	<i>Pp</i> (A) T9, <i>Pp</i> (B) B10, Pf CH400
29	2	<i>Pf</i> (I) V2, <i>Pa</i> V8
30	1	<i>Pf</i> (I) V3
31	1	<i>Pf</i> (IV) P7
32	3	<i>Pf</i> (IV) V4, <i>Pf</i> (I) SN2, <i>Pfi</i> V7
33	1	<i>Pa</i> P14

Pf : *Pseudomonas fluorescens*. (I), (II), (III), (IV), (V): respectivement biovars I, II, III, IV et V.

Pp (A) : *Pseudomonas putida* biotype A, *Pp* (B) : *Pseudomonas putida* biotype B

Pa : *Pseudomonas aureofaciens*, *Pc* : *Pseudomonas chlororaphis*, *Pfi* : Intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida*,

Pfn : *Pseudomonas fluorescent* non classé, *At* : *Agrobacterium tumefaciens*.

Pss : *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Psm* : *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*,

Gras : souche de référence.

A (Arboriculture = rosacées), T (Tomate), SN (Sol non cultivé), P (Pomme de terre), D (Palmier Dattier), V (Vigne), B (Blé)

Exemples : *Pf*(I) V3: *Pseudomonas fluorescens* bv I, V3 = souche N° 3 isolée du biotope vigne

Pp(B) SN9 = *Pseudomonas putida* biotype B, souche N° 9 isolée du biotope sol non cultivé

Pa P14 : *Pseudomonas aureofaciens*, souche N° 14 isolée du biotope de Pomme de terre.

Globalement, du point de vue métabolique, les souches de 25 classes (Tableau II.8), dont la classe 15 importante par son effectif et 9 singletons, se distinguent par :

- Leurs aptitudes à assimiler le citrate, le 1- 0- méthyle-(3-D-glucopyranoside) et le glycérol.
- Leur inaptitude à utiliser le 1-0-Méthyl -(3- galactopyranoside), 1-0-Méthyl - α -galactopyranoside), D-Lyxose, α -L-(-)Fucose, D(+)Melezitose, α -L-Rhamnose, L(-)Malate, Maltose, 3-Hydroxybenzoate, Mucate et D-Tagatose.

Les singularités observées dans les profils trophiques ont été :

- La souche de la classe 8 assimile le α -L-Rhamnose.
- La souche de la classe 12 assimile le L-Malate.
- La souche de la classe 26 utilise le D (+) Melizitose et le Maltose.
- Les souches de la classe 27 dégradent le 1-0-méthyl-(3-galctopyranoside).
- Des réactions variables ont été notées pour les souches de la classe 4 concernant le glycérol et le (D+) Melezitose et des classes 6 et 21 pour le D-lyxose.

Le rangement des 99 composés organiques testés par ordre des ccd a montré que 84 caractères présentent un ccd non nul supérieur au moins à 0,0001. Les seuils en ccd enregistrés varient de 0,052015 à 0,928245 correspondant respectivement au D (+) xylose et au D-Tagatose (Annexe II.7).

La grande variabilité dans les profils trophiques et dans la répartition des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents par rapport à leur affiliation spécifique ou infraspécifique rend intéressant et utile les dendrogrammes des souches de même biotope.

Tableau II.8 : Résultats des caractères métaboliques en pourcentages

Classes	1-0-Methyl- β -galactopyranoside	Citrate	1-0-Methyl- β -glucopyranoside	1-0-Methyl- α -galactopyranoside	D-Lyxose	Glycerol	α -L(-) Fucose	D(+)Melzitose	α -L-Rhamnose	L(-)Malate	Maltose	3-Hydroxybenzoate	Mucate	D-Tagatose
8	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0
10	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	100	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0
14	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	100	100	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	0
30	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	100	100	0	0	50	0	50	0	0	0	0	0	0
6	0	100	100	0	50	100	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
27	100	0	100	0	0	50	0	0	0	0	0	50	0	0
29	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	100	100	0	50	100	0	0	25	0	0	0	25	25
7	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	100	100	0	0	71	43	0	0	0	0	0	0	0
15	0	100	100	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0	0

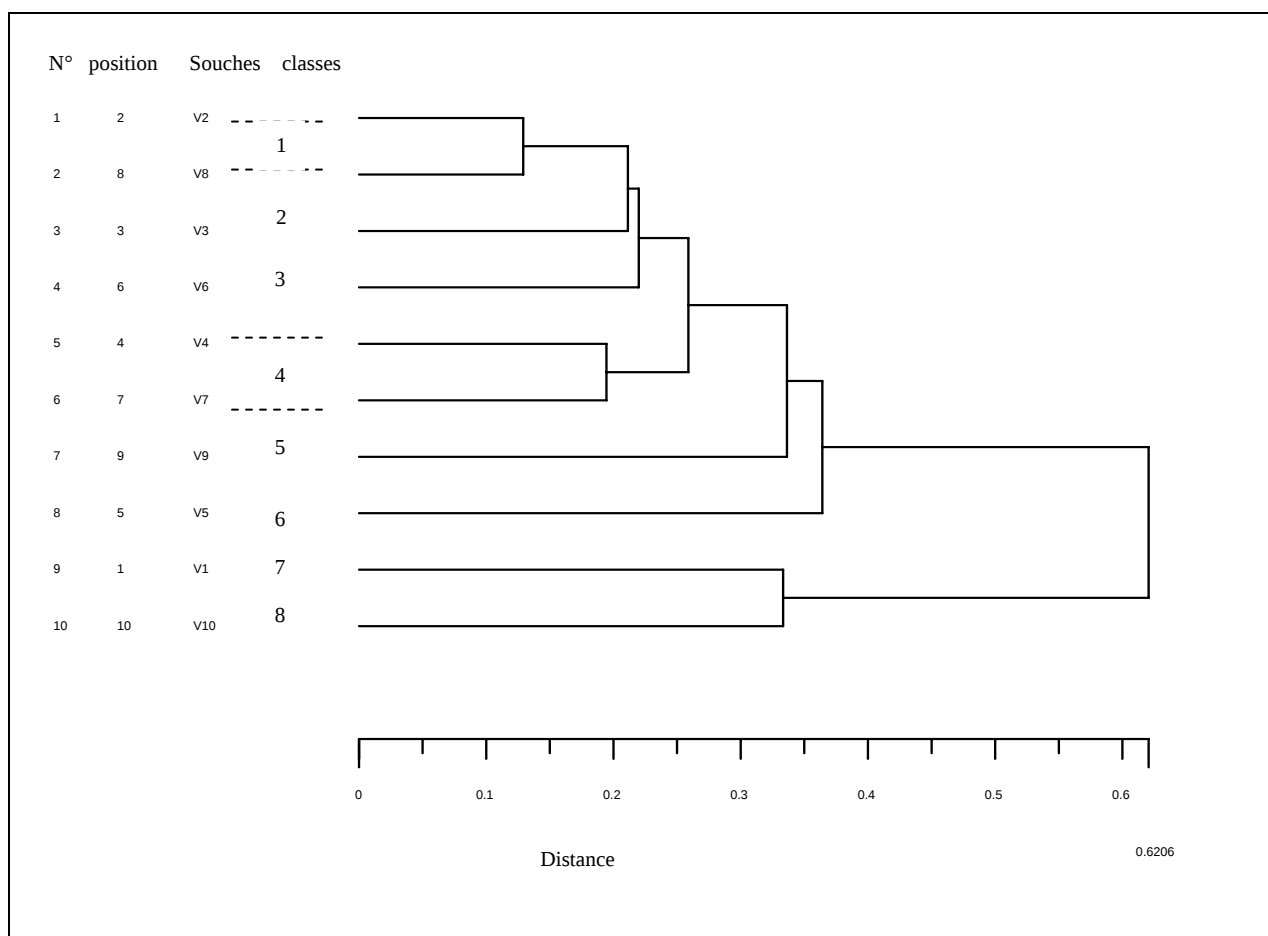
L'analyse globale des dendrogrammes des biotopes a fait ressortir qu'à l'exception du biotope de palmeraies dont les souches sont relativement homogènes au niveau de leurs profils trophiques et se répartissant entre un nombre restreint de classes (3), les autres biotopes présentent le même degré d'hétérogénéité que celle observée sur le dendrogramme général. L'analyse précise des biotopes viticoles (maximum d'hétérogénéité), de palmeraies (maximum d'homogénéité) et de sol non cultivé (biotope non rhizosphérique) (Figures II.5, II.6 et II.7) a montré :

BIOTOPE VITICOLE

Le dendrogramme répartit les 10 souches de ce biotope en 8 classes distinctes, 2 classes vraies contenant 2 souches chacune et 6 classes de singletons (Figure II.5). Le rangement des 99 substrats, par ordre des coupures (ccd) montre que 63 caractères ont un ccd non nul supérieur à 0,001 dont le maximum (0,970951) a été enregistré pour l'Arabitol (Annexe II.8, Tableau II.10). Les profils trophiques de ces souches ont été donc très hétérogènes, la distance phénotypique atteint 0,6206, soit moins de 38 % de similarité entre certaines souches (ex. V10 par rapport à V8 et V2). Seules les classes 1 et 4 de deux souches chacune ont montré un taux de similarité avoisinant 80 %. (Figure II.5, Tableau II.9).

Les particularités trophiques notées pour les souches de ce biotope sont (Tableau II.10) :

- Pour la classe 2: inaptitude d'assimilation du 1-0 Methyl β glucopyranoside.
- Pour la classe 3: assimilation du 4-Hydroxybenzoate et inaptitude d'assimilation du Hydroxquinoline β glucuronide.
- Pour la classe 6 : assimilation du D-Lyxose, 1-0 Methyl β galactopyranoside, Lactulose et L(+)Sorbose; et inaptitude d'utilisation du L(+) Arabinose et D(+) Galactose.
- Pour la classe 7 : utilisation du 3-phenyl propionate, Fumarate et D(+) Raffinose.
- Pour la classe 8 : Assimilation de m-cumarate, Benzoate, L(+)Tartrate et α -Ketoglutarate et inaptitude d'assimilation de Protocatechuate, D-Glucuronate et Aconitate.
- Pour la classe 4: des réactions de type (50%, +/-) ont été enregistrées concernant les composés α - Lactose, Maltitol et Esculine alors que les autres classes ont montré des réponses négatives.



Classe	Effectif	Souches
1	2	V2 et V8
2	1	V3
3	1	V6
4	2	V4 et V7
5	1	V9
6	1	V5
7	1	V1
8	1	V10

Figure II.5 : Dendrogramme des souches issues du biotope viticole

Tableau II.9 : Coordonnées du dendrogramme des souches du biotope viticole

N°	distance	phénon gauche	phénon droit	taille du phénon
1	0.1290	8	2	2
2	0.1944	7	4	2
3	0.2114	11	3	3
4	0.2198	13	6	4
5	0.2589	14	12	6
6	0.3333	10	1	2
7	0.3364	15	9	7
8	0.3642	17	5	8
9	0.6206	18	16	10

Tableau II.10 caractères trophiques discriminants entre les huit classes du biotope viticole (pourcentages)

Classe	m-cumarate	3-phenylpropionate	Benzoate	4-Hydroxybenzoate	Protocatechuate	Fumarate	D-Glucuronate	Aconitate	L(+) Tartrate	D-Lyxose	Hydroxyquinoline B glucuronide	L(+) Arabinose	1-0 Methyl B glucopyranoside	1-0 Methyl B galactopyranoside	Lactulose	D(+)Raffinose	L(+)Sorbitose	Malonate	D(+)Galactose	α - Ketoglutarate	α - Lactose	Maltitol	Esculine
2	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
3	0	0	0	100	100	0	100	100	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
5	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
6	0	0	0	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0
7	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0
8	100	0	100	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0
1	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
4	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100	0	50	50	50

Tableau II.11 caractères trophiques discriminants entre les trois classes du biotope palmeraies (pourcentages)

Classe	L-Arabitol	i-Erythritol	Xylitol	Adonitol	D(-)Ribose	Malonate	D(+)Xylose	Hydroxyquinoline B glucuronide	(-) Quinate	L-Tryptophane	3-Phenylpropionate	D(+=)Turannose	Myo-Inositol	Protocatechuate	Meso-Tartrate	D-Galcturonate	α -L-Fucose	Phenylacetate	D(-)Tartrate	D-Sorbitol	Trigoneline	Saccharose	Benzoate
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	67	67	100	100	100	67	67	33	33	67	100	33	33	33	67
1	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0	67	67	67	83	17	0	0	33	33	67	67	67	50

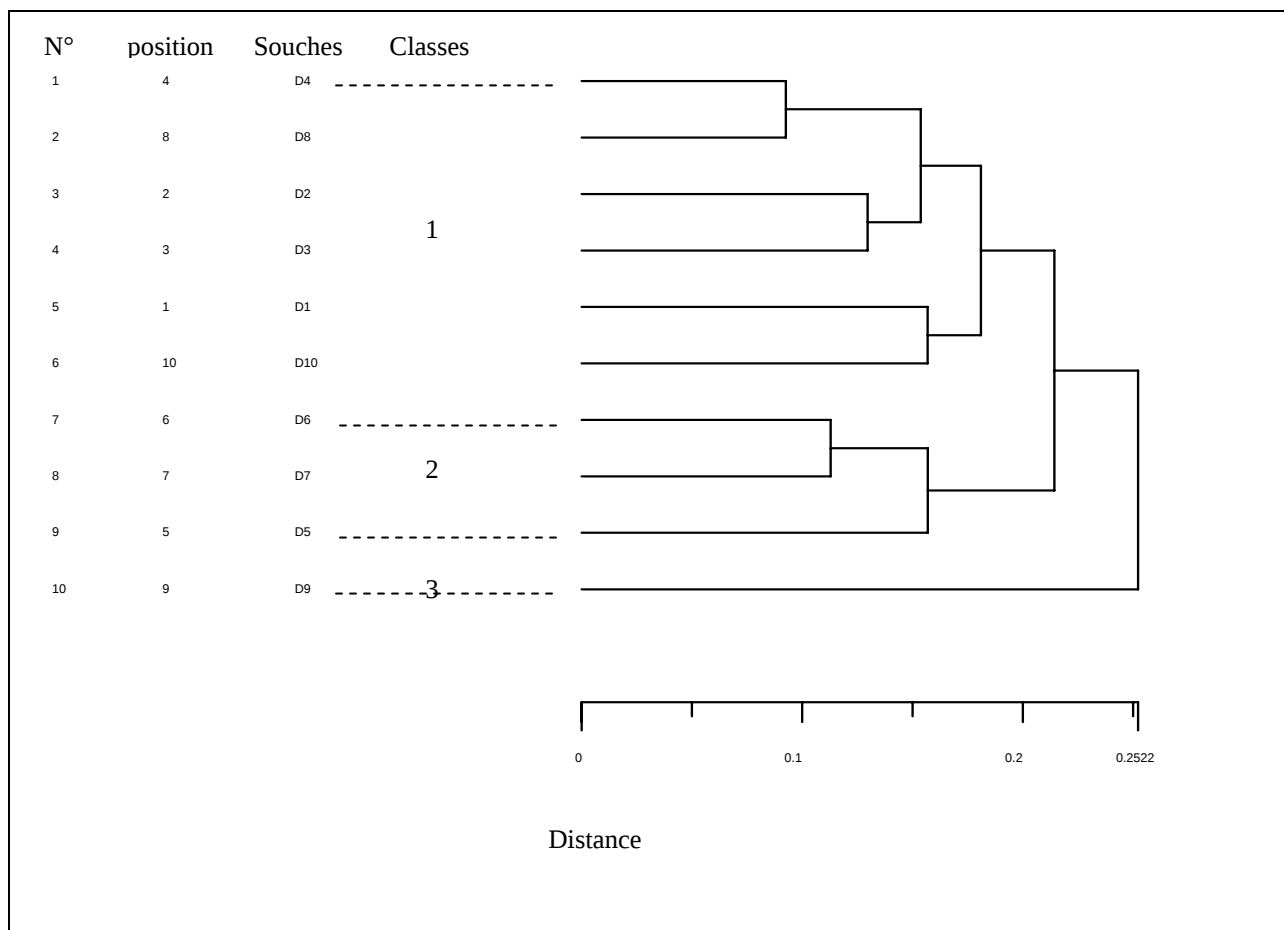
Tableau II.11 (suite) : caractères trophiques discriminants entre les trois classes du biotope palmeraies (pourcentages)

Classe	L-Serine	5- Aminovalerate	N-Acetyl Glucosamine	D(+)-Arabitol	D(+°)Trehalose	D-Mannitol	DL Glycerate	Lactulose	Glycerol
3	100	100	100	100	100	100	100	0	100
2	100	100	100	100	100	100	100	33	67
1	50	83	83	83	83	83	83	17	83

BIOTOPE PALMERAIES

Les dix souches du biotope de palmeraies ont présenté des profils trophiques analogues, la distance maximale entre les 10 souches est de 0,2522 correspondant à une similarité globale avoisinant 75 %. La similarité est supérieure à 80 % pour 8 souches (Tableau II.12). Le ccd de 32 caractères parmi les 99 testés est non nul, variant de 0,056426 pour le lactulose et le glycérol à 0,881291 pour le L(-) Arabitol, i-Erythritol, Xylitol, et Adonitol (Annexe II.9). Le dendrogramme montre leur regroupement majoritaire en deux classes vraies, la classe 1 avec 6 souches, la 2 avec 3 souches et un singleton (classe 3) (Figure II.6). Des particularités trophiques ont été notées : (Tableau II.11)

- La souche de la classe 3 se distingue par son inaptitude à utiliser le D(-)Ribose, le Malonate, le D(+)Xylose et l'Hydroxyquinoline - R- glucuronide.
- Les souches de la classe 2 se caractérisent par leur aptitude à utiliser : L(-)Arabitol, i-Erythritol, Xylitol et Adonitol.
- Des réactions variables ont été enregistrées, avec un taux d'assimilation le plus élevé (67 %) pour les composés Quinate, L-tryptophane, Protocatechuate, meso-Tartrate et Phenylacetate et le plus faible (33%) pour le D-Galcturonate et le α -L(-) Fucose (Tableau II.12).



Classe	Effectif	Souches
1	6	D4 D8 D2 D3 D1
2	3	D10
3	1	D6 D7 D5

Figure II.6 : Dendrogramme de dix souches issues du palmier dattier

Tableau II.12 : Coordonnées du dendrogramme des souches du biotope de palmeraies

N°	distance	phénon gauche	phénon droit	taille du phénon
1	0.0926	8	4	2
2	0.1129	7	6	2
3	0.1296	3	2	2
4	0.1537	13	11	4
5	0.1569	10	1	2
6	0.1569	12	5	3
7	0.1810	15	14	6
8	0.2143	17	16	9
9	0.2522	18	9	10

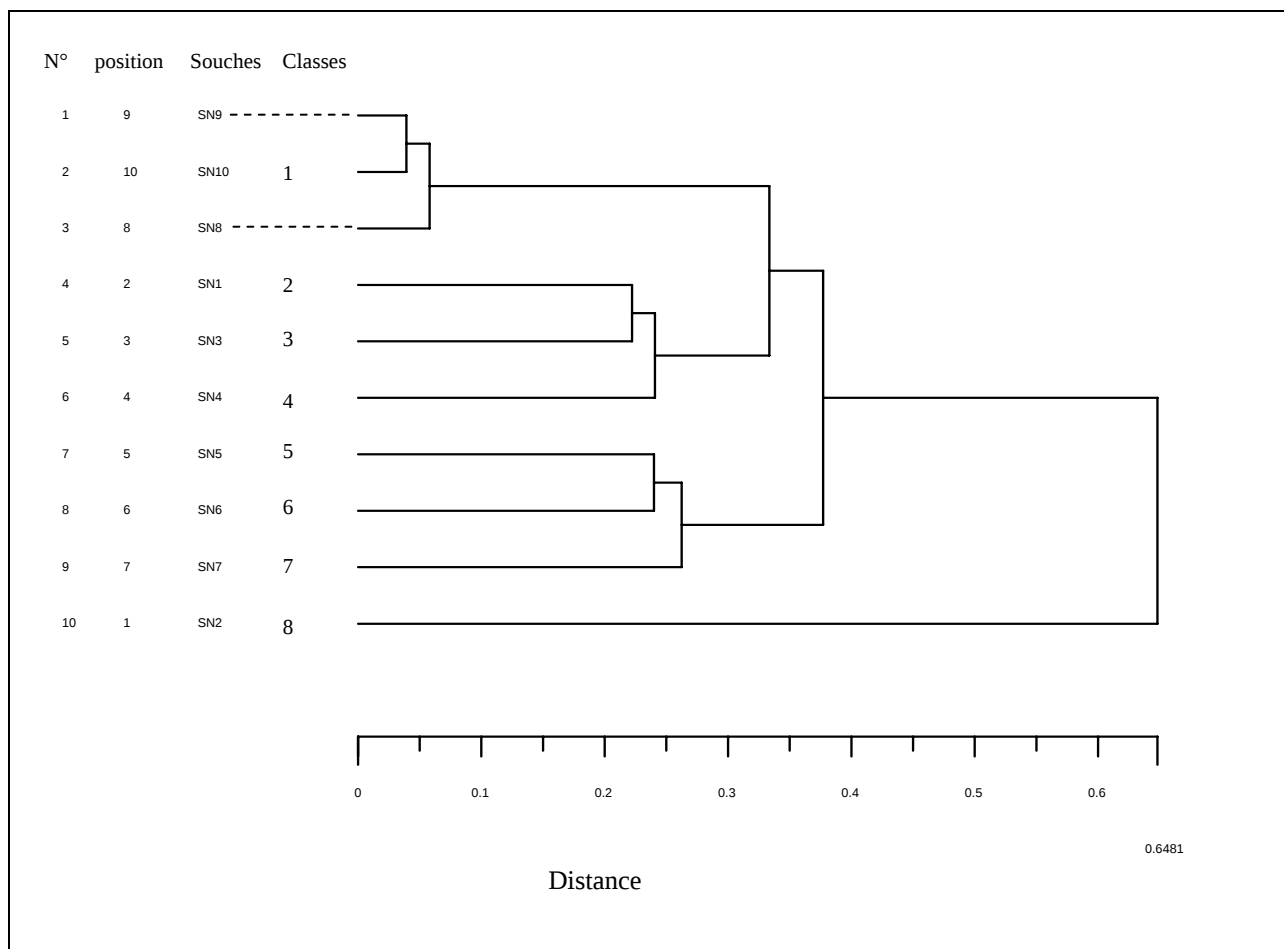
BIOTOPE SOL NON CULTIVE

Le dendrogramme construit à partir des profils trophiques des 10 souches issues des sols non cultivés a révélé une grande hétérogénéité métabolique (Figure II.7). Celle-ci concerne 66 des 99 composés testés avec un ccd non nul, dont les valeurs extrêmes sont de 0,446439 pour le DL-B.Hydroxybuturate et le Gentisate et de 1,000 pour un ensemble de composés : D-Sorbitol, Glutarate, Hydroxybenzoate, L (-) Arabitol et N-acetyl-D-glucosamine (Annexe II.10) (Tableau II.13).

Les souches ont été réparties en une classe vraie (classe 1 avec 3 souches) et 7 singletons. Au niveau de coupure (ccd = 0,2000), seules les trois souches de la classe 1 présentent une similarité supérieure à 80 %, se caractérisant par un niveau de 67% d'assimilation de Gentisate.

Pour les autres souches pour lesquelles les distances varient de 0,2222 à 0,6481, il en ressort une diversité de profils trophiques : (Tableau II.14)

- La classe 3 : assimilation de Lactulose
- La classe 4 : assimilation de alpha-L(-) Fucose
- La classe 5 : inaptitude à l'assimilation de β -D(+) Fructose
- La classe 6 : assimilation de D(-) Tartrate
- La classe 8 : se distinguent par un profil métabolique réduit par rapport aux autres souches, elle se caractérise par l'assimilation de 1-0-Methyl-alpha-D-glucopyranoside et l'inaptitude à l'assimilation de nombreux composés: Propionate, D-Alanine, L-Proline Betain, Putrescine (= Diaminobutane), DL-alpha-Amino-n-Butyrate (= 4-Aminobutyrate), Histamine, DL-Lactate, Caprate, Caprylate et de L-Histidine, DL- α Amino-n-valerate (= 5-Aminovalerate), D-Glucosamine, L-Aspartate, L-Tyrosine et L-Glutamate



Classe	Effectif	Souches
1	3	SN9 SN10 SN8
2	1	SN1
3	1	SN3
4	1	SN4
5	1	SN5
6	1	SN6
7	1	SN7
8	1	SN2

Figure II.7 : Dendrogramme de dix souches issues du sol non cultivé

Tableau II.13 : Coordonnées du dendrogramme des souches du biotope sol non cultivé

N°	distance	phénon gauche	phénon droit	taille du phénon
11	0.0392	10	9	2
12	0.0581	11	8	3
13	0.2222	3	2	2
14	0.2400	6	5	2
15	0.2407	13	4	3
16	0.2624	14	7	3
17	0.3335	15	12	6
18	0.3772	17	16	9
19	0.6481	18	1	10

Tableau II. 14 caractères discriminants entre les trois classes des souches du biotope sol non cultivé (pourcentages)

CLASSES	Propionate	β -D(+) Fructose	D-Alanine	L-Proline	D(+) Malate	D(-) Tartrate	alpha-L(-) Fucose	L(+) Arabinose	Betain	Putrescine (= Diaminobutane)	DL-alpha-Amino-n-Butyrate (= 4-Aminobutyrate)	Histamine	DL-Lactate	Caprate	Caprylate	L-Histidine	1-O-Methyl-alpha-D-glucopyranoside	Lactulose	DL-Glycerate	DL-alpha-Amino-n-valerate (= 5-Aminovalerate)	D-Glucosamine	L-Aspartate	L-Tyrosine	L-Glutamate	DL-beta-Hydroxybutyrate (= 3-Hydroxybutyrate)	Gentisate
2	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0
3	100	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0
4	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0
5	100	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0
6	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0
7	100	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0
8	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	100	100	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	67	67

II-4. DISCUSSION

Les différents isolements effectués ont permis d'isoler 1800 souches fluorescentes et de sélectionner 1050 souches comme étant des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes. Bien que les sept biotopes étudiés présentent des différences importantes (climat, sol, plante), nous notons la présence de populations appréciables de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Le caractère ubiquiste et le pouvoir d'adaptation à des conditions écologiques variées de ces rhizobactéries a été mentionné dans de nombreux travaux (Holloway, 1992 ; Lemanceau, 1992; Schroth *et al.*, 1992 ; Latour, 1996; Digat et Gardan, 1987; Latour et Lemanceau, 1997).

Comparativement aux sols cultivés (tomate, pomme de terre, rosacées, vigne, céréales et palmier dattier) où les fréquences de répartition des souches sélectionnées varient de 07,33 % (palmier) à 38 % (tomate), la fréquence d'isolement des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents était relativement faible dans le sol non cultivé (03,05 %). La tomate a été souvent présentée comme une plante hôte fortement colonisée par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Loper et Schroth, 1986; Lemanceau, 1992 ; Latour et Lemanceau, 1997). La plante entraîne des modifications dans les caractéristiques physico-chimiques du sol rhizosphérique engendrant l'effet rhizosphère qui s'exprime sur la densité et l'activité des populations microbiennes (Foster et Rovira, 1978; Kloepper *et al.*, 1988). La densité et l'activité des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont significativement plus élevées dans la rhizosphère que dans le sol nu, ceci est significative d'une compétitivité de ces bactéries leur facilitant l'adaptation (Latour, 1996) ; dans ce sens, ils peuvent constituer plus de 60 % de la microflore bactérienne rhizosphérique (Digat et Gardan, 1987).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent être présents à des densités de $10^3 - 10^5$ cfu/g de sol, plus associés aux particules organiques qu'aux particules minérales (Rovira, 1965; Vancura, 1980) et à des densités de 10^6 à 10^8 cfu/g de racines (Schroth *et al.*, 1992) ; ces bactéries peuvent même coloniser les racines de façon endophyte (Duijff *et al.*, 1996; Duijff *et al.*, 1999).

Avec les tests d'identification utilisés, l'espèce *P. fluorescens* a montré une nette dominance par rapport aux autres espèces *P. putida*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens*. Le groupe des souches intermédiaires entre *P. fluorescens* et *P. putida* était présent chez six biotopes, représentant une fréquence relativement élevée (17,05 %), ce qui confirme, une fois de plus, la difficulté de distinguer entre ces deux espèces et entre leurs biovars.

Les souches non classées (95 souches; 9,05 %) ont présenté les caractères préliminaires des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, mais la caractérisation spécifique et infraspécifique n'a pas permis leur affiliation aux taxons décrits. Ceci peut être expliqué par l'insuffisance qualitative et quantitative des tests phénotypiques utilisés dans l'identification de ce groupe bactérien, et cela d'autant plus qu'il est rapporté une grande variabilité et diversité chez ces rhizobactéries.

Globalement, les caractérisations phénotypiques utilisées n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique totale et précise. Il a été noté des différences entre les trois méthodes d'identification utilisées et de nombreuses souches n'ont pu être identifiées ; ce qui confirme la faiblesse de ces approches phénotypiques pour une caractérisation précise et stable des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes. La quasi-totalité des études taxonomiques réalisées sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents, particulièrement *P. fluorescens* et *P. putida*, a signalé la difficulté et la complexité dans l'élaboration de critères taxonomiques précis. Ces études ont révélé la complexité et la variabilité au niveau des différentes espèces appartenant à ce groupe (Palleroni et Doudoroff, 1956 ; Jessen, 1965 ; Stanier et al., 1966 ; Palleroni et al., 1972 ; Palleroni, 1992a ; Palleroni, 1992b; Digat et Gardan, 1987; Delorme, 2002). L'hétérogénéité que l'on rencontre chez certaines espèces et leurs biovars laisse la classification des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sujette à beaucoup de divergences (Bossis et al., 2000).

Jessen (1965) a distingué dans les *Pseudomonas* spp. fluorescents 82 biotypes alors que Lelliott et al., (1966) et Stanier et al., (1966) ont subdivisé ce groupe en espèces et en biovars. Ceci révèle l'existence d'une grande hétérogénéité, particulièrement chez les espèces *P. fluorescens* et *P. putida*. Les souches du biovar V sont très hétérogènes et montrent dans leurs caractéristiques une grande variabilité qui rendent difficile leur différenciation des autres biovars. L'espèce *P. putida* est subdivisée en deux biotypes A et B ou encore biovars A et B (Palleroni, 1984 ; Bossis et al., 2000).

L'analyse de la diversité taxonomique des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents en fonction de leur origine (biotope) montre, en grande partie, que leur distribution est aléatoire. Les différentes espèces, et leurs biovars s'ils existent, ont été isolées à partir de la majorité des biotopes étudiés. Même chez les isolats du sol non cultivé, on a retrouvé différents taxons du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents. D'une manière générale, les tests biochimiques utilisés, outre leur signification taxonomique, ils peuvent être des indicateurs sommaires de l'aspect métabolique de ces rhizobactéries, qui semble essentiel pour l'adaptation au sol et à la rhizosphère.

L'étude des cytochromes respiratoires permet de distinguer *P. aeruginosa* et les espèces saprophytes qui possèdent une cytochrome oxydase (Stanier et *al.*, 1966) surtout que la plupart des espèces phytopathogènes sont dépourvues de cette enzyme (Lelliot et *al.*, 1966). La présence ou non de cette enzyme est considérée comme un caractère taxinomique permettant d'identifier les espèces fluorescentes étudiées. Généralement, les espèces à oxydase positive présentent un métabolisme plus varié que les espèces à oxydase négative qui sont souvent phytopathogènes (Misaghi et Grogan, 1969 ; Palleroni, 1984). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Palleroni, 1984). Cette respiration est celle qui présente le rendement énergétique le plus important ; elle se caractérise par des cytochromes oxydases, transporteurs d'électrons terminaux qui réagissent directement avec l'oxygène (Latour et *al.*, 1996).

L'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique, elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose (Cunin et *al.*, 1986; Latour et Lemanceau, 1997). Il existe quatre voies distinctes d'assimilation de l'arginine chez *P. putida*, au moins trois d'entre-elles existent chez les autres espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Cunin et *al.*, 1986 ; Haas et *al.*, 1990). La dégradation de l'arginine est une voie caractéristique de ces rhizobactéries saprophytes (Thornley, 1960), elle fonctionne seulement en absence de l'oxygène et sous conditions dénitrifiantes (Mercenier et *al.*, 1980).

L'utilisation de la gélatine permet de distinguer les souches de *P. putida* des autres espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents. (Jacques, 1994; Bossis, 1995). La gélatine est utilisée par les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme source protéique, sa dégradation conduit à la formation d'acides aminés qui sont assimilables par ces bactéries. Ce groupe bactérien présente une capacité d'utilisation de nombreux acides aminés comme source énergétique, de carbone et d'azote. La présence de l'enzyme levane sucrase permet aux souches bactériennes d'utiliser le saccharose et diholoside non réducteur comme sources de carbone (Latour et Lemanceau, 1997).

Les capacités dénitrifiantes des *Pseudomonas* varient selon l'espèce et le biovar; *P. fluorescens* biovar I et V et *P. putida* peuvent uniquement réduire les nitrates, alors que *P. chlororaphis* et *P. fluorescens* biovar II III et IV sont des germes dénitrifiants (Palleroni, 1984). Un nombre important de nos souches s'avère dénitrifiant. Ces espèces microbiennes aérobies qui développent une respiration sur nitrate, lorsqu'elles sont privées d'oxygène, sont très représentées dans la rhizosphère, c'est le cas des *Pseudomonas* spp. fluorescents, (Smith et Tiedje, 1979; Mantelin et *al.*, 2004). Lorsque l'oxygène n'est plus disponible en quantité suffisante, certaines espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent utiliser des oxydes d'azote, cette réduction est

généralement inhibée en aérobiose et les nitrites formés sont ensuite rejetés dans le milieu. Dans certains cas, ils peuvent intervenir comme des accepteurs d'électrons et sont réduits en composés gazeux tels que : oxydes nitriques (NO), nitreux (N₂O) et en azote (N₂), il s'agit de la dénitrification dissimilatrice (Latour et Lemanceau, 1997; Mirleau, 2000; Mirleau *et al.*, 2001).

L'utilisation des hydrates de carbones a révélé des réponses variables des souches testées en présence des sucres, (tréhalose, arabinose, sorbitol et xylose) selon l'enchaînement proposé par Bossis (1995) et Jacques (1994) (Figure II.2). Le catabolisme du tréhalose est un caractère taxonomique permettant de classer les espèces *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. putida* (Palleroni, 1984). L'assimilation ou non du saccharose, du tréhalose, des pentoses (arabinose et xylose) et du sorbitol par les *Pseudomonas* spp. fluorescents permet leurs identification intraspécifique (Latour et Lemanceau, 1997). La nature du métabolisme carboné confère également un avantage compétitif à certaines souches capables d'utiliser des composés particuliers présents dans l'environnement et qui ne sont pas assimilés par d'autres souches ; c'est le cas en particulier du saccharose et du tréhalose assimilés par les populations associées à la rhizosphère de la tomate mais pas à celle du lin (Lemanceau *et al.*, 1995 ; Latour, 1996).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents utilisent de nombreux acides aminés comme source de carbone et d'azote (Palleroni, 1984) et l'assimilation de certains de ces composés (Tryptophane, Alanine...) permet également leur discrimination intraspécifique (Latour et Lemanceau, 1997).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des hétérotrophes, ils se caractérisent par une nutrition diversifiée et utilisent préférentiellement des acides organiques plutôt que des sucres. D'une façon générale, les exsudats racinaires assimilables peuvent être considérés comme des donneurs d'électrons (Latour, 1996).

La détermination des profils trophiques des bactéries peut, en plus de son utilisation dans l'étude de la nature du métabolisme carboné, contribuer à l'identification taxonomique des *Pseudomonas* spp. fluorescents et à la définition de traits métaboliques pouvant être liés à la compétence rhizosphérique.

Les profils trophiques de 80 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents issues des sept biotopes ont été déterminés. Nos résultats indiquent que la distribution des isolats bactériens (selon leurs profils trophiques) en fonction des biotopes n'est pas aléatoire. En effet, les dix isolats du sol non cultivé se retrouvent dans 9 classes distinctes, majoritairement en singletons (7 classes) et en 2 classes vraies (classe 16 avec 3 souches, classe 26 avec 2 souches). Une exception

a été notée avec l'isolat SN4 qui a été retrouvé dans la même classe que 6 autres isolats issus de biotopes cultivés (classe 17). L'analyse comparative des biotopes cultivés (présence de cultures) indique que certaines espèces végétales exercent un effet sélectif, à l'exemple des isolats du biotope de palmeraies dont six souches sur les dix testés se regroupent dans la classe 15, trois dans la classe 16 et un isolat dans la classe 19, avec d'autres isolats majoritairement issus d'espèces ligneuses (rosacées ou vigne). Le même constat a été noté pour les isolats issus des biotopes de tomate et de pomme de terre, à l'exception de quelques classes, à l'exemple des classes 31 et 33. Ces résultats suggèrent que la plante exerce un effet significatif sur le profil trophique des rhizobactéries. Nos résultats sont en accord avec ceux de Latour (1996) qui a suggéré que la plante exerce une sélection à l'égard des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents telluriques. Les populations microbiennes rhizosphériques assimilent particulièrement certains composés leur conférant une meilleure compétition, contrairement à celles du sol nu. La sélection de taxons microbiens particuliers par la plante a été déjà signalée (Lemanceau *et al.*, 1995).

Des sélections spécifiques ont été rapportés chez deux plantes, la tomate et le lin, en montrant que les isolats de la première plante assimilent préférentiellement l'inositol, le saccharose, le tréhalose et sont dénitrifiants, contrairement aux isolats du lin (Latour, 1996; Latour *et al.*, 1997). D'autres cas de sélection ont été mis en évidence chez les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de pomme de terre, de blé ou de mauvaises herbes spontanées (Glandorf *et al.*, 1993). Il a été signalé aussi avec ce groupe bactérien que la sélection exercée par la plante est plus forte pour les isolats endophytes que pour les isolats de rhizosphère ou de rhizoplan (Latour, 1996).

En accord avec les résultats de Lemanceau *et al.*, (1995) et Latour *et al.*, (1996), l'influence de la plante se traduit principalement par la réduction de la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents comparativement à celles du sol nu. En effet, les isolats du sol non cultivé sont plus diversifiés (distribution en 9 classes), contrairement aux isolats des biotopes cultivés où le nombre de classes est moins important, particulièrement pour le biotope de palmeraies (2 classes), tomate (4 classes). Des exceptions ont été cependant notées avec les biotopes viticole et céréalière; pour le premier, l'âge et les variétés des plants ne sont pas identiques et pour le second, les isolements ont été réalisés sans distinction à partir de blé dur, de blé tendre et d'orge ; ceci peut constituer un autre facteur de variabilité de la flore microbienne.

Le regroupement dans une grande partie des classes (classes 1, 2, 5, 7, 9, 21 ...) de souches isolées de plantes annuelles herbacées (pomme de terre, tomate) séparément des classes

(classes 15, 17, 19, 23 ...) regroupant des isolats des biotopes de plantes pérennes ligneuses (rosacées, palmiers, vigne) suggère que l'architecture et l'anatomie racinaire peuvent avoir un effet sur la distribution et le profil trophique des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Un volume racinaire important des plantes ligneuses exerce une action mécanique dans le sol compactant plus les particules telluriques par rapport aux racines des plantes herbacées. Les racines modifient la porosité du sol et influent les disponibilités en oxygène et en nutriments, or ces deux paramètres sont déterminants pour la croissance et l'activité microbienne.

Dans nos résultats, il a été constaté pour certaines classes, la distribution des isolats d'un même biotope cultivé sur de nombreuses classes du dendrogramme, à l'exemple des isolats du biotope viticole (classes 18, 23, 29, 30 et 32), de pomme de terre (classes 7, 9, 22, 27 et 33) et de céréales (2, 5, 11, 12 et 13). Cette variabilité illustrée par des différences dans les profils trophiques enregistrés, peut s'expliquer par la différence entre les propriétés pédologiques (texture et structure du sol) de ces biotopes. De nombreux travaux ont rapporté une meilleure densité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans des sols fins riches en argile et les travaux de Latour (1996) ont indiqué que les isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents associés à une même espèce végétale (tomate ou lin) différaient selon le sol dans lequel est cultivée la plante ; l'effet sol est donc déterminant.

Globalement, les méthodes phénotypiques et génotypiques d'analyse de la diversité sont complémentaires, leur utilisation conjointe permet d'appréhender au mieux la diversité des populations microbiennes du sol et de la rhizosphère. A titre d'exemple, l'expression du phénotype est toujours sujette aux variations des conditions expérimentales, ainsi les méthodes génotypiques complètent les données phénotypiques en détectant les gènes liés aux phénotypes étudiés (Bossis *et al.*, 2000; Delorme, 2002; Delorme *et al.*, 2002).

Lugtenberg *et al.*, (1999) ont signalé qu'il est difficile de corréler l'aptitude de colonisation rhizosphérique avec l'assimilation de certains composés organiques.

Dans le cas des plantes annuelles, la rotation des cultures peut influencer la quantité et la qualité (diversité) des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Achouak *et al.*, 2000a; Achouak *et al.*, 2000b). Outre ces pratiques culturales, il est à noter que pour ces cultures les travaux mécaniques du sol, les opérations d'amendement du sol et de fertilisation organique et minérale ainsi que l'utilisation des pesticides sont des facteurs qui bouleversent l'équilibre des populations microbiennes telluriques. Le stade phénologique de la plante exerce des effets notables sur les populations microbiennes du sol, la quantité et la qualité des exsudats racinaires

sont variables selon le stade de développement de la plante et de la croissance racinaire qui délimitera la rhizosphère et le rhizoplan.

En plus de ces paramètres relatifs à la plante et au sol, il ne faut pas omettre l'effet des facteurs biotiques du sol. Chaque type de culture (plante + techniques culturales) exerce des effets de sélection à l'égard de la flore tellurique. Cette dernière qui, souvent composée de saprophytes et de parasites, est sujette à des équilibres écologiques en faveur (bénéfique) ou en défaveur de la plante (parasite ou délétère), déterminant ainsi les populations microbiennes dominantes. La nature de l'équilibre microbien, ainsi établi, conditionne la diversité et la densité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Globalement, on a noté l'absence d'une concordance entre l'identification taxonomique, réalisée à l'aide des clés dichotomiques (Jacques, 1994; Bossis *et al.*, 1995), et les classes phénotypiques (dendrogrammes). Les souches d'une même espèce ont été retrouvées réparties entre plusieurs classes, à l'exemple des souches de *P. fluorescens* (43 souches sur les 80 testées) distribuées entre plus de 12 classes et dont les 5 biovars sont répartis aléatoirement dans ces classes ; le même constat est valable pour les biovars A et B des souches de *P. putida*. On a noté aussi le regroupement dans les mêmes classes de souches d'espèces différentes, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. chlororaphis*, et de souches du groupe des non classées. Les espèces *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens*, clustrées normalement dans une seule espèce *P. chlororaphis* (Palleroni, 1984), se retrouvent néanmoins dans des classes différentes. Les souches du groupe intermédiaire *P. fluorescens* / *P. putida* ont montré des profils trophiques variés les incluant dans les mêmes classes que les autres espèces ; ainsi, les tests phénotypiques utilisées n'ont pas permis de faire ressortir les spécificités taxonomiques des souches constituant le groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Des constats similaires ont été rapportés par Grimont *et al.*, (1980, 1996) et Delorme (2002) qui soulignent les limites des méthodes phénotypiques dans la classification des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les résultats de Delorme (2002) ont révélé que certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents se distinguent par leur assimilation préférentielle du sorbitol, du myo-inositol, du saccharose et leur inaptitude à assimiler le D-xylose, le D-lyxose et la trigonelline. Cette variabilité phénotypique complétée par des études génotypiques, de sidérotypage et de phylogénie (ADN r 16S) a abouti à la définition d'une nouvelle espèce *P. lini* sp. nov.

La diversité phénotypique des *Pseudomonas* spp. fluorescents a été rapporté dans de nombreux travaux confirmant la versatilité de leur métabolisme carboné (Palleroni, 1992a; Lemanceau *et al.*, 1995; Latour, 1996; Latour et Lemanceau, 1997; Delorme, 2002).

Bossis *et al.*, (2000) ont souligné la relation entre la caractérisation phénotypique et la caractérisation basée sur les analyses des séquences des régions ADN 23S. L'analyse de ces dernières ne permet pas une distinction claire entre l'espèce *P. fluorescens*, ses biovars et l'espèce *P. putida*. La subdivision de ces deux espèces en révèle les limites de l'identification basée sur les caractères phénotypiques. Des travaux complémentaires doivent prendre en compte certains caractères génotypiques. L'ensemble des travaux sur la taxonomie de *Pseudomonas fluorescens* et de *P. putida* montre que la définition de ces deux espèces est incomplète et qu'elles devraient être divisées en plusieurs sous espèces.

La clarification de la taxonomie de *P. fluorescens* et de *P. putida* requiert des recherches complémentaires qui associent des méthodes récentes phénotypiques et génotypiques plus poussées (Van der Wol *et al.*, 1995; Bossis *et al.*, 2000) . Ces auteurs proposent une identification basé sur une taxonomie polyphasique pour différencier ces deux espèces, permettant à la fois de réaliser une caractérisation phénotypique et une caractérisation génotypique, comme ils suggèrent que la diversité de ces espèces peut être associée à la variabilité de leurs habitats (sol, eau, plantes,). L'environnement et les facteurs trophiques jouent un rôle majeur dans leur évolution, certains de ces facteurs sont probablement impliqués dans le processus de spéciation de ces bactéries ubiquistes.

II.5 CONCLUSION

Les clés dichotomiques proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents à oxydase (+) et basées sur les caractères les plus discriminants décrits par Stanier *et al.*, (1966) et Palleroni (1984), peuvent être utilisées pour une identification préliminaire. Selon Bossis *et al.*, (2000), cette approche présente des limites majeures : (i) attribution d'une valeur taxonomique subjective à certains phénotypes (ii) le nombre de phénotypes pris en compte est relativement faible par rapport aux potentiels génétiques de ce groupe bactérien. Ces deux clés dichotomiques ont montré des divergences allant jusqu'à 5 % de différence dans l'affiliation des mêmes souches aux différents taxons. La dominance de *P. fluorescens*, notamment le biovar I, a été notée avec les trois méthodes d'identification utilisées.

Les souches non classées (95 souches, 9,05 %) ont présenté les caractères de base des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, mais la caractérisation spécifique et infraspécifique n'a pas permis leur affiliation aux taxons décrits. Le nombre élevé de souches appartenant au taxon intermédiaire *P. fluorescens* / *P. putida* confirme la difficulté de distinguer ces deux espèces et leurs biovars.

L'analyse des profils plasmidiques ne semble pas être informative pour les souches testées sur le plan typage et écologie.

Globalement, les caractérisations phénotypiques utilisées n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique totale et précise. Il a été noté des différences entre les trois méthodes d'identification utilisées et de nombreuses souches n'ont pu être identifiées; ce qui confirme la faiblesse de ces approches phénotypiques. Dans notre travail, il a été constaté des similarités trophiques inférieures à 60 % pour des souches appartenant taxonomiquement à la même espèce et parfois au même biovar, Ceci dénote de la grande diversité et variabilité métabolique dans ce groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents et particulièrement chez les espèces types *P. fluorescens* et *P. putida*.

Les origines de nos souches sont assez diversifiées, les sept biotopes présentent des (i) caractéristiques physico-chimiques de sols très hétérogènes, (ii) le climat est fortement variable, (iii) les cultures présentent des caractéristiques phénologiques et exigent des conduites culturales spécifiques à chaque spéculation végétale. Ce type de facteurs, parmi d'autres, peut influencer la diversité et l'adaptabilité et constituer une pression écologique déterminante sur les potentialités trophiques de ces rhizobactéries.

III –1. INTRODUCTION

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents synthétisent une large variété de métabolites secondaires (sidérophores, pyroles, indoles, antibiotiques...). L'implication d'une partie de ces métabolites dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes et dans la promotion de la croissance des plantes a été démontrée dans de nombreux travaux (Leisinger et Margraff, 1979; Schroth et Hancock, 1982; Schippers *et al.*, 1987; Weller, 1988; De Weger *et al.*, 1987; De Weger *et al.*, 1988; Weller *et al.*, 1988; Voisard *et al.*, 1989; Defago et Haas, 1990; Lemanceau, 1992; Dekkers *et al.*, 1998; Van Loon, 1999; Ton *et al.*, 1999; Ran *et al.*, 2003; Viebahn *et al.*, 2003; Van Loon et Glick, 2004). La détermination des liens entre l'action de ces métabolites et leurs effets sur l'inhibition et la suppression de certaines pathologies végétales a ouvert les voies sur une recherche pluridisciplinaire touchant, entre autres, les aspects microbiologique, biochimique, génétique et écologique des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les métabolites impliqués dans le processus de lutte biologique sont nombreux et diversifiés chez plusieurs espèces de la flore rhizosphérique. Ceux synthétisés par les membres du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents ont reçu et continuent de recevoir une attention particulière due à l'abondance et l'ubiquité de ces rhizobactéries d'une part et à l'aisance relative de leurs manipulations d'autre part. Certains de ces métabolites se caractérisent par des effets inhibiteurs vis à vis de nombreux agents phytopathogènes, notamment les agents fongiques et bactériens d'origine tellurique, à l'exemple des phénazines et des phloroglucinols qui se caractérisent par des actions antifongiques multiples.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents synthétisent de nombreux sidérophores, chélateurs du fer ionique, qui exhibent des effets fongistatique et bactériostatique, tels que les pyoverdines, les pseudobactines, les pyochelines et l'acide salicylique. Les sidérophores sont parmi les composés des rhizobactéries qui ont un effet de stimulation de la croissance des plantes (PGPR) (Loper et Buyer, 1991 ; O'sullivan et O'gara, 1992; Lugntenberg *et al.*, 1994; Pieterse et Van Loon, 1999).

La production de composés volatils, à l'exemple de l'acide cyanhydrique (HCN), est l'un des mécanismes actifs dans la suppression de l'agent fongique *Tielaviopsis basicola* (Voisard *et al.*, 1989, Keel *et al.*, 1992; De Boer *et al.*, 1996; Keel *et al.*, 1996).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs potentiels de phénazines. Les études préliminaires réalisées sur ce groupe bactérien ont mis en évidence en particulier la

production de pyocyanines chez *P. aeruginosa* et la phénazine -1- acide carboxylique (PCA) chez *P. fluorescens*. Ces composés présentent des propriétés antibiotiques vis à vis de nombreux agents phytopathogènes (Leisenger et Marrgraff, 1979 ; Dowling et O'gara, 1994; Pierson et Thomashow, 1992).

Les effets bénéfiques de ces métabolites sont liés à la compétition trophique des rhizobactéries pour certains éléments ioniques nutritionnels essentiels au métabolisme microbien, notamment le fer assimilable, ou à l'inhibition des pathogènes par antibiose. La suppression ou l'inhibition de pathologies végétales est un processus multifactoriel ; ainsi, les actions des métabolites secondaires ne sont pas mutuellement exclusifs, au contraire, ils peuvent être complémentaires entre eux et avec les effets additifs d'autres facteurs clés telle que l'efficacité de la colonisation racinaire (Voisard *et al.*, 1989).

Dans cette partie de notre travail nous nous sommes attelés à la mise en évidence *in vitro* de la synthèse de ces métabolites secondaires chez un ensemble de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents provenant des différents biotopes.

III-2. MATERIELS ET METHODES

III-2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les 80 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents identifiées et caractérisées par leurs profils trophiques (Tableau II. 7) ont été analysées quant à leur aptitude à la production des sidérophores, l'acide cyanhydrique (HCN), l'acide indole acétique (AIA), l'acide salicylique (AS) et les phosphatases, ainsi qu'à leur pouvoir antagoniste antimicrobien.

Trois souches P6, D2, et A6 sélectionnées sur la base de leurs réponses positives à l'ensemble des tests cités précédemment ont servi à la détection des phénazines.

III-2.2 PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES

III-2.1.1. SYNTHÈSE DE SIDEROPHORES

La détection des sidérophores a été réalisée dans le milieu CAS (chrome azurol S) (Annexe II.1) en boîtes de Pétri selon les techniques de Alexander et Zuberer (1991). Des cultures bactériennes de 24 h sur milieu KB (King *et al.*, 1954) ont été déposées en spots sur la surface du milieu CAS et incubées 72 heures à 28° C. L'apparition d'un halo orangeâtre sur le fond bleuté du milieu indique une synthèse de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987 ; Sharma et Johri, 2003).

L'estimation de la production des sidérophores a été effectuée par la méthode de Meyer et Abdallah (1978). Une culture de 18 h sur milieu KB est raclée, transférée dans 250 ml de milieu liquide succinate (MS) (Annexe II.1) et laissée en agitation continue (120 rpm) pendant 72 h à 28° C. Après centrifugation (10.000 rpm, 10 min), l'absorbance à 540 nm du surnageant a été déterminée et la quantité de siderophores calculée en utilisant le coefficient d'extinction ($\epsilon = 16.000$).

L'influence du milieu de culture sur la production des sidérophores a été testée. Outre le milieu MS, trois autres milieux ont été utilisés : KB, PDA (potato dextrose agar) et un milieu mixte composé des milieux KB + PDA à parts égales (Annexe II.1), le pH a été ajusté à 7,0.

L'influence du pH sur la production des sidérophores a été aussi évaluée en milieu MS (Annexe II.1) (pH 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 et 8.0) dans les conditions d'incubation précitées.

Dans un autre essai, il a été testé l'effet de l'incorporation de FeCl_3 et de CuCl_2 sur la production de sidérophores. Les solutions de ces composés (10 %) dans l'eau distillée ont été

stérilisées par filtration (0,22 μ) et additionnées à une concentration finale de 0,6 μ M au milieu MS en surfusion. L'incubation a été effectuée à 28° C pendant 72 h et la biomasse a été mesurée par photométrie à 600 nm (Alexander et Zubere, 1991).

III-2.1.2. CYANOGENESE

La production de cyanide d'hydrogène (HCN) a été recherchée par la technique de Bakker et Schippers (1987) modifiée. Le milieu TSA (10 %) (Tryptone Soya Agar) supplémenté avec 4,4 g/l de glycine a étéensemencé à partir d'une culture de 24 h. Après une incubation de 24 h à 28° C, des colonies individualisées ont été transférées dans le même milieu. Un fragment de papier filtre imprégné d'une solution d'acide picrique (0,5 %) et de carbonate de sodium (2 %) a été déposé aseptiquement sur la face interne du couvercle de la boîte. Après incubation à 25° C pendant 4 jours, la production d'HCN se traduit par le virage du papier filtre du jaune à l'orange – brun, La surface de virage du papier est proportionnelle à la production de ce composé volatil.

III-2.1.3. SYNTHÈSE DE L'ACIDE INDOLE ACÉTIQUE (AIA) ET/OU ANALOGUES D'AIA

La méthode décrite par Bric *et al.*, (1991) et modifiée par Alvarez *et al.*, (1995) a été utilisée pour mettre en évidence la production de l'AIA et/ou de composés apparentés. Le milieu TSA (10 %) additionné de tryptophane (1,02 g/l) a été recouvert avec une membrane de nitrocellulose. Après ensemencement sur la membrane à partir d'une culture bactérienne de 24 h, les boîtes ont été renversées et incubées à 28° C pendant 72 h. Ensuite, la membrane a été recouverte de papier filtre (Wathman n° 2) saturé avec le réactif de Salkowski composé de 2% en FeCl₃ (0,5 M) dans une solution d'acide perchlorique (35 %). Après 0,5 h à 3 h, les souches productrices de l'AIA et/ou de ses analogues sont révélées par le développement d'un halo rose – rouge et pour les souches productrices d'autres types d'indoles, la coloration est jaune à jaune brun.

III-2.1.3. SOLUBILISATION DES PHOSPHATES

La détection de phosphatases a été effectuée par la technique décrite par Goldstein (1986) modifiée en milieu GN (gélose nutritive) additionné de dicalcium phosphate (4 g/l). Ce milieu a étéensemencé par des cultures bactériennes de 24 h et incubé 5 jours à 28° C. La formation d'un halo clair autour des colonies indique une solubilisation des phosphates (Alvarez *et al.*, 1995).

III-2.1.4. PRODUCTION DE L'ACIDE SALICYLIQUE

Un volume de 100 µl d'une culture de 18 h à 25°C sur milieu CAB (Casamino Acide Broth) à l'obscurité et sous agitation (200 rpm) a servi à ensemercer 25 ml du même milieu que l'on a incubé 36 h à 48 h dans les mêmes conditions. Après centrifugation (3000 g , 15 min) et extraction sous vide avec l'acétate d'éthyle (1/3, v/v), l'absorbance de la phase aqueuse a été mesurée à 527 nm et comparée avec celle d'une solution témoin d'acide salicylique synthétique (Alvarez *et al.*,1995).

III-2.3. RECHERCHE DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE

III-2.3.1. SELECTION DE SOUCHES ANTAGONISTES *IN VITRO*

La détection sur milieu KB d'éventuelles activités inhibitrices de microorganismes (antifongique et antibactérienne) a été effectuée sur les 80 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnées des différents biotopes. Ces souches ont été confrontées à une collection d'agents phytopathogènes composée de cinq isolats fongiques (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria solani* et *Pythium* sp.) et deux isolats bactériens (*Clavibacter michiganens* subsp. *michiganens* et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (Tableau V.2).

Les interactions avec les champignons ont été testées en déposant un disque mycélien (5 mm de diamètre) de la culture fongique au centre de la boîte et 4 à 6 spots d'une culture bactérienne de 24 h équidistants du disque mycélien. Pour les tests avec les bactéries phytopathogènes, des suspensions dans l'eau distillée à partir de cultures bactériennes de 24 h ont été pulvérisées sur le milieu de culture en boîte de Pétri, préalablement ensemençé avec des spots de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents depuis 24 h et incubé à 25°C. Lorsque la croissance dans les boîtes témoins a atteint son maximum, couvrant la totalité de la boîte, les notations des zones d'inhibition dans les boîtes tests ont été relevées. Les témoins dans le cas des cultures fongiques étaient représentés par des disques mycéliens de chaque isolat fongique sans la présence des souches antagonistes. Pour les bactéries phytopathogènes, le témoin a été représenté par la pulvérisation de l'isolat bactérien sans la présence de spots des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

III-2.3.2. SYNTHÈSE DE PHÉNAZINES *IN VITRO*

La production de phénazines, *in vitro*, a été recherchée dans le milieu NBY (Sigma) additionné de glucose (2 %) sur les souches ayant manifestées un pouvoir antagoniste vis à vis des souches pathogènes fongiques et bactériennes. Le milieu a été ensemencé avec une culture de 24 h et incubé 48 h à 25° C. L'examen des cultures sous UV (365 nm) montre le développement de colonies pigmentées avec des halos sombres noirâtres, révélateur d'une activité phénazinique (Thomashow et Weller, 1988).

Pour les souches trouvées positives pour la production de phénazines, leur pouvoir antagoniste *in vitro* a été étudiées de manière plus détaillée, vis-à-vis de différents types de microorganismes et sur quatre milieux de culture différents: (Annexe II.1)

- Le milieu King B ou "**KB**" (King *et al.*, 1954)
- Le milieu gélose nutritive ou "**GN**" (Gardan et Luisetti, 1981)
- Le milieu Potato Dextrose Agar ou "**PDA**" (Jonhston et Booth, 1982).
- Le milieu **ISP2** "International *Streptomyces* Project" (Shirling et Gottlieb, 1966).

Sur chaque milieu, en deux répétitions, les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ont été ensemencées en deux traits parallèles équidistants du centre de la boîte et incubées à 28° C. Après 24 h, les microorganismes à tester ont été ensemencés en traits perpendiculaires aux deux traits de culture précédemment réalisés et incubés à la même température pendant 2 à 5 jours. A titre de témoins, les souches tests ont été cultivées selon la même procédure sans la présence de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, pour évaluer leur croissance optimale dans les mêmes conditions de culture.

Les micro-organismes tests provenant de la collection du laboratoire de microbiologie de l'Ecole Nationale Supérieure de Kouba (ENS - Kouba , Alger) sont représentatifs de la flore bactérienne et fongique:

- Champignons filamenteux : *Mucor ramanniamus* (MR) (NRRL 1829) et *Fusarium oxyspoum* f.sp. *albedinis* (Foa).
- Levures : *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (ATCC 4226)
- Bactérie Gram positif : *Bacillus subtilis* (Bs) (ENS Kouba)
- Bactérie Gram négatif : *Escherichia coli* (Ec) (ATCC 10536).

III-2.3.3. EXTRACTION DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE

Les souches ayant montré une activité antimicrobienne ont été sélectionnées pour l'extraction de composés à effet antibiotique. Chaque souche a été cultivée dans 100 ml des milieux de l'expérience précédente (à l'état liquide)ensemencés avec 3 ml d'une préculture de 24 h; l'incubation a été faite à 25° C sous agitation continue (150 rpm) pendant 48 h. La culture obtenue a été centrifugée (5000 g, 15 min à la température ambiante). Des tests préliminaires ont été effectués pour optimiser l'extraction des composés antibiotiques à partir du surnageant de culture et du culot cellulaire ; à cet effet quatre solvants de différentes polarités ont été testés : acétate d'éthyle, butanol, dichlorométhane et l'hexane.

L'extraction à partir du filtrat de la culture a été effectuée dans une ampoule à décanter avec un mélange à volume égal de solvant(s) / filtrat de culture. Après agitation et décantation, les phases organiques ont été évaporées sous vide à l'aide d'un rotavapor à 40° C. Les extraits secs ont été remis en solution dans 0,6 ml de méthanol avant d'être soumis à une autographie; les résultats de cette dernière ont servi à déterminer le meilleur solvant d'extraction.

Après 3 à 5 lavages avec de l'eau distillée stérile, le culot cellulaire a été mélangé au méthanol – acétone (50 % - 50 %) et agité (150 rpm) pendant 2 h à la température ambiante. Le filtrat obtenu a été concentré dans un rotavapor sous vide à 40° C et l'extrait sec a été remis en suspension dans 0,6 ml de méthanol.

Des disques de papier Wathman (n° 3) de 6 mm de diamètre imprégnés avec 30 µl d'extrait organique, séchés et exposés 30 min aux UV ont été déposés aseptiquement à la surface du milieu de culture (ISP2 ou KB) contenant 12 g/l de gélose, en boîte de Pétri, préensemencé avec le germe test. Les boîtes sont d'abord mises à 4°C pendant 2 h pour une meilleure diffusion des éventuels composés antibiotiques et ensuite incubées 24 à 48 h à 28° C.

Selon les descriptions de Betina (1973), la séparation des composés à activité antibiotique, à partir des extraits de surnageant et de culot cellulaire de chaque souche de *Pseudomonas* testée, a été réalisée par chromatographie en couche mince sur gel de silice (silcagel; 20 x 20 cm , 0,25 mm d'épaisseur). Deux associations de solvants ont été appliquées : le solvant AM (acétate d'éthyle – méthanol ; 100/15) et le solvant CA (chloroforme – acétone; 9/1).

Les extraits ont été déposés sous forme de spots de 150 µl au bord inférieur. Après migration et évaporation du solvant, la plaque sèche a été recouverte d'une couche de gélose molle (ISP2 ou KB, 7 g/l) en surfusion (45° C) préalablement ensemencée avec le microorganisme révélateur. Les plaques ainsi recouvertes ont été laissées 12 h à 4° C pour la

diffusion des composés à effet antibiotique et incubées ensuite 24 à 48 h à 30° C. Le micro-organisme révélateur croît sur toute la surface du milieu sauf au niveau des composés à effet antibiotique. Après notation des zones d'inhibition, le rapport frontal (Rf) a été calculé. Le Rf est le rapport de la distance entre le dépôt et la tâche active sur la distance séparant le dépôt du front du solvant.

En plus de la révélation biologique, il a été procédé à une révélation chimique avec le naphtoresorcinol-H₂SO₄ (révélateur de glucides), la vanilline-H₂SO₄ (révélateur des alcools et des huiles étherées), le Chlorure de fer ferrique (révélateur des phénols) et le formaldéhyde-H₂SO₄ (révélateur de composés aromatiques polycycliques). Après pulvérisation des plaques avec les révélateurs, les résultats peuvent être lus à froid ou à chaud (5 min à 100°C).

III-2.3.4. PURIFICATION DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE PAR HPLC

La purification des substances actives des souches de *Pseudomonas* a été réalisée en deux étapes : (i) une semipurification par CCM; (ii) une purification par HPLC.

Le dépôt des extraits sur la plaque de silice a été fait en traits à l'aide d'une microseringue (300 à 400 µl par trait) à 3 cm du bord inférieur et à 2 cm des bords latéraux, en plusieurs fois. Après localisation des bandes actives, les tâches ont été grattées et éluées dans du méthanol sous agitation (100 rpm) pendant 2 h à la température ambiante. Après filtration du mélange (silice + méthanol), le filtrat limpide a été évaporé à sec et conservé au congélateur pour la purification par HPLC.

Les extraits semipurifiés ont été analysés par HPLC. Le système utilisé, Waters HPLC (Waters SSV), est constitué de système de distribution de solvants (4 voies), une pré-colonne Guard – pack Bondapak C18, une colonne semi-préparative C18 WOD 300Å, un détecteur spectrophotométrique U.V visible (Lambda Max modèle 481). Les expérimentations ont été réalisées en phase inverse, la phase stationnaire de la colonne C18 est une silice greffée avec des groupements organiques apolaires, principalement des chaînes hydrocarbonées, et la phase mobile (solvant) est polaire, elle consiste en un mélange d'eau bidistillée et de méthanol avec un gradient discontinu : 20, 50, 80 et 100 % de MeOH dans de l'eau.

L'extrait a été remis en suspension dans 0.6 ml de méthanol pur et filtré (0,45 µm). Le débit du solvant est de 2 ml /mm et la longueur d'onde de détection dans l'UV est de 220 nm. L'échantillon est entièrement injecté à l'aide d'une seringue de 1 ml. Après passage par la pré-

colonne et la colonne, les différentes fractions (20, 50, 80 et 100% de méthanol – eau) ont été récoltées, évaporées puis testées par antibiographie pour déterminer les fractions actives.

La spectrophotométrie UV-visible est limitée uniquement aux composés possédant des chromophores. Elle n'est pas suffisante pour identifier une structure, mais elle reste utile pour détecter les composés aromatiques et les systèmes insaturés et conjugués

Les produits semi purifiés sur plaques de gel de silice et ceux purifiés par HPLC ont été solubilisés dans du méthanol. Les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV. 260) entre 195 nm et 500 nm. Du méthanol pur a été utilisé pour effectuer la ligne de base (témoin).

III-2.3.5. DETECTION DE LA SEQUENCE DU GENE PHENAZINE (*phz*) PAR PCR

La présence de séquences homologues au gène phénazine (*phz*) a été recherchée chez trois souches de *Pseudomonas fluorescens* (D2, P6 et A6) ayant montré une activité phénazinique et chez la souche de référence *P. fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132), selon la technique décrite par Delorme (2002). Les cultures ont été effectuées sur milieu KB à 25° C pendant 24 h d'incubation, à partir de précultures incubées dans les mêmes conditions.

Deux types de lysats cellulaires ont été préparés :

Lysat à l'azote liquide : Une suspension bactérienne dans 100 µl d'eau ultra pure à partir de la culture sur milieu KB a été mise au bain - Marie 15 minutes à 100° C . La suspension est ensuite plongée dans l'azote liquide pendant 1 à 2 minutes et stockée à – 20°C.

Lysat protéinase K : Les souches ont été cultivées successivement sur milieu KB gélosé incliné pendant 24 h à 25°C puis en milieu LB liquide (5 ml) pendant 24 h sous agitation (150 rpm). 1,4 ml de la culture bactérienne ont été centrifugés (4000 g, 10 min, 10°C) et lavés deux fois dans de l'eau ultra-pure. Le culot a été asséché et conservé à - 20° C. A 100 µl de suspension cellulaire dans l'eau ultra pure (UP) ont été additionnés 100 µl de tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,3) et 13 µl de protéinase K (1 mg/ml dans H₂O "Sigma") ; le mélange est d'abord mis à incuber au Bain Marie une nuit à 55°C, ensuite traité à 100°C pendant 10 minutes afin d'inactiver la protéinase K, puis conservé à -20°C.

La composition de la solution réactionnelle de la PCR les conditions d'amplification ont été les suivantes :

Amorces utilisées

Deux essais d'amplification ont été réalisés avec deux couples d'amorces :

Essai 1 : Amplification avec le couple d'amorces *Phz1* :

- *Phz 1 F* : 5' CAGGGCCGSR YATTTCTCGGTTCT 3'
(S = C ou G, R = A ou G, Y = C ou T)
- *Phz 1 R* : 5' GCGCGGGTCGCACAGGCTTTTGTA 3'

Les amorces *Phz 1* permettent d'amplifier un fragment de 522 paires de bases (pb).

Essai 2 : Amplification avec le couple d'amorces *Phz 2*

- *Phz 2 F* : 5' CAGCGCCGSR YATTTCTCGGTTCK 3'
(S = G ou C, R = A ou G, Y = C ou T, K = G ou T)
- *Phz 2 R* : 5' SCGCGGGTCGCACAGGCTTTTGTA 3'

Ces amorces permettent d'amplifier le gène phénazine chez la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1).

La composition de la solution réactionnelle (25µl) est comme suit :

		Concentrations finales
H ₂ O (UP) Ultra Pure	14,8 µl	
Tampon 10 X	2,5 µl	
dNTP (2,5 mM stock)	2 µl	200 µM
Amorce <i>Phz 1</i> ou <i>2 F</i> (10 µM stock)	1,25 µl	0,5 µM
Amorce <i>Phz 1</i> ou <i>2 R</i> (10 µM stock)	1,25 µl	0,5 µM
Taq polymérase (QbioTAQ) (5U/µL)	0,2 µl	1 U
Suspension cellulaire	3 µl	

Trois températures d'hybridation ont été testées :

1. Dénaturation initiale : 3 min à 94°C
30 cycles (1min 30 à 94°C, 1min à 55°C, 1min à 72°C)
2. Dénaturation initiale : 3 min à 94°C
30 cycles (1min 30 à 94°C, 1min à 60°C, 1min à 72°C)
3. Dénaturation initiale : 3min à 94°C
30 cycles (1min 30 à 94°C, 1min à 65°C, 1min à 72°C).

Ces conditions ont été testées sur les deux types de lysats. Dans le cas du lysat à l'azote liquide, il a été aussi utilisé dilué au 1/10 et au 1/50.

Des essais d'amplification avec des concentrations d'amorces de 0,5 µM, 1 µM, 1,5 µM et 2µM à une température d'hybridation de 65°C ont été réalisés

Un autre essai a été réalisé à une température d'hybridation de 55°C, en ajoutant dans la solution réactionnelle 1µl de DMSO (Annexe III.1)

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose dans les conditions suivantes :

Dépôt de 5 µl d'amplifiat (produits de PCR) encadrés par le marqueur VIII MBI (Roche, Boehringer Mannheim, Meylan, France), la migration a été effectuée pendant 30 min à 100 V en gel d'agarose « routine » (2 % dans 25 ml de tampon TAE) (Eurogentec, Seraing, Belgique) en cuve 6 cm x 8 cm (Horizon 58, Gibco BRL) (Annexe III.1) et contenant 0,4 µg/ml de bromure d'ethidium (BET). Après migration, l'ADN a été visualisé sous UV.

III-2.3.6. DETECTION DU GENE PHENAZINE PAR HYBRIDATION MOLECULAIRE *IN SITU*

Une recherche du gène phénazine (*phz*) par hybridation ADN-ADN *in-situ* sur colonies a été réalisée sur les mêmes souches de *Pseudomonas* avec la sonde *phz* selon la technique décrite par Raaijmakers *et al.*, (1997).

Les solutions et tampons utilisés dans le protocole d'hybridation moléculaire sont présentés en annexe (Annexe III.1).

On marque d'un trait une membrane de nylon et la boîte de culture afin de bien repérer la position des colonies. On dispose la membrane sur la boîte sans appuyer, trait sur trait et on laisse pendant une minute. On récupère la membrane et on la dispose dans un premier bac contenant un papier filtre imbibé de SDS à 10% (5 minutes), colonies vers le haut, tout en évitant la formation de bulles d'air. On essore la membrane sur le bord du bac et on la pose dans un deuxième bac tapissé d'un papier filtre imprégné d'une solution dénaturante, puis dans un troisième et ensuite quatrième contenant un papier filtre saturé d'une solution neutralisante, en essorant entre chaque transfert et en laissant 5 minutes. On sort la membrane du 4^{ème} bac et on la pose sur du papier filtre pour sécher à l'air libre.

On fixe l'ADN par la chaleur en soumettant la membrane à 80°C pendant 30 minutes. Dans un four à hybridation. A ce stade, les membranes peuvent être stockées. On met la membrane à incuber dans 200 ml solution de Protéinase K pendant 1 heure à 37°C en agitation au bain marie. On la remet une seconde fois dans 200 ml de la même solution pendant 1 heure à 65°C, au bain marie en agitation (1 heure minimum, on peut laisser 2 heures).

La membrane est rincée avec un peu de la solution d'hybridation, puis incubée dans 200 mL de cette solution, pendant une heure minimum à 65°C, au bain marie, en agitation. On remet la membrane dans 200 ml de cette même solution, pendant 10 min à 65°C, au bain marie en

agitation. Pendant ce temps, on dénature la sonde, 15 min à 100°C puis on la plonge dans la glace. La concentration de la sonde *phz* est de 250 ng/10 ml. On vide la solution, on ajoute la sonde et on incube une nuit à 65°C en agitation, au bain marie.

On rince la membrane deux fois avec 200 ml d'une solution de SSC (x 2) pendant 5 min à température ambiante. On rince encore deux fois avec 200 ml d'une solution de SSC (x 0,2) pendant 15 min à 65°C en agitation. Ensuite on effectue un rinçage dans 100 ml de tween 20 (0,3%) pendant 5 minutes à température ambiante et dans 200 ml de tampon R pendant 1 heure toujours à température ambiante avec agitation.

Pour la révélation, la membrane est incubée en présence de l'anticorps au 1/10 000^{ème}, en solution dans 100 ml de tampon R, pendant 30 min, à T° ambiante, en agitation. On vide et on rince rapidement avec 20 à 25 ml de tampon R. On remet 200 ml de tampon R et on incube 30 min à température ambiante, en agitation ; et cette opération est répétée deux fois.

On met la membrane 3 à 4 min dans du tampon (3), sans agitation ; puis elle est plongée dans 100 ml de NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt, produit toxique et qui se dégrade à la lumière), à l'abri de la lumière, sans agitation.

Après 5 à 20 min environ, lorsque le témoin est positif soit légèrement bleu, on retire la membrane et on la met dans du TE. La membrane peut être retirée du TE et emballée dans du film étirable et papier aluminium, mais il faut repérer rapidement les colonies positives car beaucoup de colonies bleussent et donnent des faux positifs.

III-3. RESULTATS

III-3.1. PRODUCTION DE SIDEROPHORES

La recherche de la production de métabolites secondaires a été testée sur les 80 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents issues des sept biotopes (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Nombre et taux des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents productrices de métabolites secondaires

	Sidérophores (+)	HCN (+)	AIA (+)	AS (+)	Phosphatases (+)
Nombre de souche	80	32	22	14	26
Pourcentage *	100	40	27,50	17,50	32,80

HCN : acide cyanhydrique, AIA : Acide indole acétique, AS : Acide salicylique. (+) réaction positive

* : le pourcentage par rapport aux 80 souches testées.

La totalité des souches, déjà sélectionnées sur la base de la synthèse d'un pigment fluorescent diffusible sur le milieu KB, a montré un halo orangeâtre net indiquant la production de sidérophores.

La quantification de la production des sidérophores a été faite avec trois souches de *Pseudomonas fluorescens* D2, P6 et la souche de référence CHA400 (mutant déficient en synthèse de pyoverdine, pvd -). La production maximale de sidérophores a été observée dans le milieu succinate (MS) avec des quantités dépassant 50 µg/l chez D2 et P6, alors qu'elle est modérée (13,44 µg/l) chez le mutant pvd- avec cependant une croissance moindre par rapport aux souches D2 et P6. Le milieu KB arrive en deuxième position avec une production de 38,53 µg/l chez la souche P6. Dans les milieux PDA et PDA + KB la production de sidérophores était relativement faible pour toutes les souches (Tableau III.2).

Les deux souches D2 et P6 ont montré des mêmes niveaux de synthèse de sidérophores dans les milieux MS et KB, avec une bonne croissance. Dans les milieux PDA et KB + PDA, la synthèse de sidérophores a été faible, malgré une croissance bactérienne appréciable. Pour le mutant CHA400 pvd-, la production de sidérophores était relativement faible dans les milieux MS et KB, les quantités enregistrées ne dépassant pas 13,44 µg/l et ce malgré une bonne croissance et elle a été négative dans PDA et KB + PDA (Tableau III. 2). Le maximum de synthèse des sidérophores a été enregistré au pH 7.0 dans tous les milieux, avec un net avantage pour le milieu MS et les pH basique et acide ne favorise pas leur production. a induit des diminutions notables en sidérophores (Tableau III. 3).

Tableau III.2 : Influence des milieux de culture sur la production de sidérophores (µg/l)

Souches	Milieux de culture			
	Succinate (SM)	King B (KB)	PDA	PDA + KB
D2	51,13 ^a (1,42) ^b	35,05 (1,53)	15,78 (0,91)	11,65 (0,98)
P6	52,31 (1,48)	38,53 (1,51)	13,68 (1,02)	13,68 (1,01)
CHA400 (pvd-)*	13,44 (0,93)	12,05 (1,11)	ND (0,98)	ND (0,79)

a : quantité de sidérophores en µg/l; b : DO₆₀₀ de la croissance bactérienne, ND : non détectable

* : souche de référence

Tableau III.3 : Influence du pH sur la production de sidérophores (µg/l)

pH	Milieux de culture			
	Succinate (SM)	King B (KB)	PDA	PDA + KB
4.5	13,44 ^a (0,10) ^b	12,05 (0,36)	ND (0,18)	ND (0,19)
5.0	19,69 (0,41)	17,78 (1,12)	06,50 (1,39)	05,29 (0,27)
6.0	34,40 (1,33)	28,89 (1,52)	13,68 (0,94)	07,46 (0,36)
7.0	49,31 (1,53)	41,23 (1,50)	15,78 (0,96)	11,65 (0,98)
7.5	41,12 (1,36)	35,31 (1,21)	13,68 (0,92)	09,68 (0,91)
8.0	36,82 (1,36)	26,44 (0,86)	ND (0,68)	ND (0,79)

a : quantité de sidérophores en µg/l; b : DO₆₀₀ de la croissance bactérienne, ND : non détectable

L'incorporation des ions Fe²⁺ et Cu²⁺, apportés sous formes de FeCl₃ et de CuCl₂, a influé sur la production de siderophores par la souche P6. A croissances relativement égales de la souche dans les milieux MS et MS+CuCl₂, la synthèse de siderophores est meilleure dans ce dernier. Par contre, en présence de Fe⁺², la synthèse des sidérophores et la croissance ont nettement régressé. (Tableau III.4).

Tableau III.4 : Influence de Cu⁺² et de Fe²⁺ sur la synthèse de sidérophores (µg/l) et la croissance bactérienne

	Milieux de culture		
	MS (témoin)	MS + FeCl ₃	MS + CuCl ₂
	50,46 ^a	36,21	57,18
	1,39 ^b	1,41	1,36

a : quantité de sidérophores en µg/l; b : DO₆₀₀ de la croissance bactérienne

III-3.2. CYANOGENESE

Sur les 80 souches testées, 32 (40 %) ont montré une cyanogénèse positive (Tableau III.1). Pendant les premières 24 heures, un léger virage du papier filtre imprégné d'acide picrique a été observé chez une dizaine de souches, pour devenir plus apparent après 36 h et net entre 48 h et 72 h, traduisant une intensification de la production d'HCN.

III-3.3. PRODUCTION DE L'AIA, DE L'AS ET DES PHOSPHATASES

La production de l'AIA (Acide indole acétique) et/ou de ses composés apparentés a été notée positive chez 22 des 80 souches testées (27,50 %) (Tableau III.1). Les souches productrices de ces métabolites ont développé un pigment jaunâtre à la suite de l'application du réactif révélateur après un temps de 0,5 h à 1 h ; parmi elles, 12 souches ont été productrices d'HCN dans le test précédent.

La production *in vitro* de l'acide salicylique (AS) a été positive pour 14 souches bactériennes (17,50 %) (Tableau III.1), dont 6 ayant synthétisées l'HCN et l'AIA.

Le nombre de souches solubilisatrices des phosphates est de 26 (32,5 %), il est plus élevé que celui des souches positifs pour l'AIA et l'AS (Tableau III.1). Le développement de halos clairs autour des colonies phosphatases (+) n'est apparu qu'après 48 h d'incubation, pour devenir net après 72 h. Parmi les souches synthétisant les phosphatases, quatre souches ont été productrices d'HCN, d'AIA, d'AS et de sidérophores.

III-3.4. PRODUCTION DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE

III-3.4.1. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Lors des tests préliminaires de détection de l'activité antagoniste *in vitro*, réalisés sur les 80 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, onze souches (13,75 %) ont montré des activités antagonistes au moins à l'encontre de deux agents phytopathogènes fongiques, parmi lesquelles six souches (07,50 %) ont provoqué l'inhibition de la croissance de la totalité des isolats fongiques et bactériens phytopathogènes testés (Tableau III.5). Les cinq autres souches actives ont montré des activités seulement antifongiques ne dépassant pas l'indice 2.

Le degré d'antagonisme varie selon que les interactions soient avec les bactéries ou les champignons, l'inhibition a été exercée plus nettement vis à vis des espèces cryptogamiques. La souche P6 a montré un spectre d'antagonisme dépassant celui de la souche de référence CHA0

connue par ses potentialités inhibitrices et la diversité de ses métabolites à effet toxique antagoniste, notamment vis à vis de *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani* (Tableau III.5).

Tableau III.5 : Activités antagonistes *in vitro*

Souches	Isolats fongiques et bactériens phytopathogènes					
	<i>F. o f.sp. lycopersici</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pythium ultimum</i>	<i>P. syringae pv. syringae</i>	<i>P.syringae. pv. tomato</i>
P6	3	2	3	4	1	1
D2,	2	1	2	2	1	1
A6, T6	1	2	1	1	1	1
B8, P4	1	1	1	1	1	1
CHA0*	3	1	2	3	1	1

F. o : *Fusarium oxysporum*, *P* : *Pseudomonas* ; * : souche de référence (*Pseudomonas fluorescens* CHA0).

0 $\Rightarrow$ (X = 0, Absence d'inhibition), 1 $\Rightarrow$ X $\leq$ 2 mm , 2 $\Rightarrow$ 2 mm < X $\leq$ 10 mm, 3 $\Rightarrow$ 10 mm < X $\leq$ 15 mm, 4 $\Rightarrow$ X > 15 mm (X = zone d'inhibition)

Gras : souches phénazines (+) *in vitro*

Les essais de production des phénazines *in vitro* ont révélé que trois (P6, D2 et A6) des 11 souches antagonistes *in vitro* synthétisent des composés phénaziniques, en plus de la souche de référence CHA0. Ces tests ont révélé aussi que deux autres souches (T9 et SN5) présentent une activité phénazinique positive, sachant que ces deux dernières ont montré de faibles activités antifongiques *in vitro*.

Les activités antibactériennes varient selon les souches et les milieux de culture. Le milieu de culture le moins performant pour l'activité antifongique était le milieu PDA. L'activité contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* est meilleure sur milieu KB que sur GN et ISP2. Par contre, ces deux derniers milieux se sont avérés intéressants pour l'inhibition de *M. ramanniamus*. (Tableau III.6).

Tableau III.6 : Activités d'antagonisme des souches de *Pseudomonas fluorescens* contre les micro-organismes - test sur quatre milieux de culture.

Souches	Milieux de culture																			
	KB					GN					ISP2					PDA				
	FOA	MR	SC	BS	EC	FOA	MR	SC	BS	EC	FOA	MR	SC	BS	EC	FOA	MR	SC	BS	EC
P6	20	18	0	11	25	6	41	7	36	16	13	41	10	22	0	0	0	0	31	39
D2	31	34	0	21	20	27	30	0	24	9	2	23	17	28	2	0	0	0	16	6
A6	13	NC	0	25	24	50	58	15	29	11	2	56	10	16	7	0	0	0	16	5
CHAO	34	NC	0	19	24*	9	22	11*	14	5*	18*	35	13*	17	3	6*	13	0	29	36

La méthode utilisé est celle des stries croisées. Les chiffres représentent les zones d'inhibition en mm.

FOA : *Fusarium Oxysporum* f sp. *albedenis* ; Mr = *Mucor ramanniamus*; SC = *Saccharomyces cerevisiae*; BS = *Bacillus subtilis*.

(*) indique que le microorganisme subit seulement un ralentissement de la croissance sur une distance donnée.

NC : test non concluant.

KB = Milieu King B; GN = Gélose nutritive; PDA = Potato Dextrose Agar.; ISP2 = International *Streptomyces* Project.

III-3.4.2. CARACTERISATION DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE

III-3.4.2.1. Extraction

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction des composés à effet antibiotique, des essais préliminaires ont été effectués en considérant uniquement deux souches de *P. fluorescens* (P6 et CHA0), deux microorganismes-tests (*B.subtilis* et *M.ramannianus*) et deux milieux de culture liquides KB et GN. Le meilleur solvant d'extraction était l'acétate d'éthyle suivi par le dichlorométhane. Les résultats ont été moins concluants pour le 1-butanol et inintéressants pour l'hexane. Les activités de la souche P6 sont plus importantes par rapport à celles de la souche de référence CHA0 (Figure III.1).

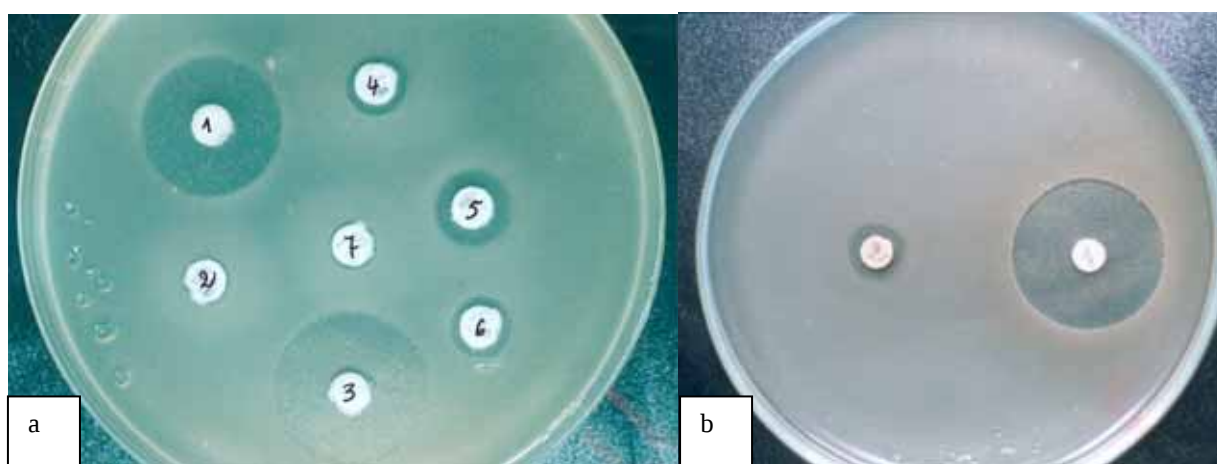


Figure III-1 : Antibiotogramme des extraits des surnageants et cellulaires des souches de *Pseudomonas fluorescens* par les différents solvants

a :

- 1 : Extrait de la souche P6 par l'acétate d'éthyle ; 2 et 4 : Extraits de la souche P6 par l'hexane
- 3 : Extrait de la souche P6 par le dichlorométhane.
- 5 : Extrait de la souche CHA0 par dichlorométhane.
- 6 et 7 : Extraits de la souche CHA0 par l'acétate d'éthyle.
- 1, 2, 5 et 6 les cultures sur le milieu KB
- 3, 4 et 7 les cultures sur le milieu GN

b :

- 1 : Extrait cellulaire du surnageant de la souche P6 par l'acétate d'éthyle ;
- 2 : extrait méthanolique cellulaire.

Dans d'autres essais, les surnageants des cultures des souches P6 et CHA0 ont fait l'objet d'une extraction par le dichlorométhane puis une réextraction par l'acétate d'éthyle. Les milieux de culture retenus sont KB, GN, et ISP2 (sans gélose). Les microorganismes – tests sont *Bacillus subtilis* (BS), *Escherichia coli* (EC), *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor ramannianus* (Mr) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. (Foa). Globalement, Il en est ressorti que l'activité de la souche P6 est plus intense de celle de la souche de référence CHA0. Cette dernière a montré une meilleure activité antagoniste vis à vis de l'isolat Foa.

III-3.4.2.2. Bioautographie et révélation chimique

Pour la souche P6, le nombre de composés à effet antibiotique détecté sur l'acétate d'éthyle – méthanol (AM) était supérieur à celui détecté sur CA (chloroforme – acétone). A partir de cultures sur milieu KB, trois tâches actives ont pu être mise en évidence avec AM et seulement une tâche active avec CA ; sur milieu ISP2, cinq tâches actives ont été obtenues avec AM et quatre avec CA. Avec les extraits de la souche CHA0, le nombre de composés à effet antibiotique détectés était plus grand avec AM qu'avec CA.

Ces résultats ont permis de retenir AM comme solvant de migration pour la séparation et la détection des composés à effet antibiotique dans les extraits des surnageants de culture des souches P6 et CHA0 et les extraits cellulaires des quatre souches P6, D2, A6 et CHA0.

L'extrait de surnageant de culture de la souche P6 sur milieu KB a donné trois tâches correspondant à des composés actifs A1, A2 et A3 (Tableau III.7, Figure III.2A). Le composé A1 ($R_f = 0.80$) était d'abord coloré en jaune vif, puis a viré en quelques minutes au vert-olive sombre; il a présenté l'activité antimicrobienne la plus efficace (très forte action antibactérienne et antifongique). Le composé A2 ($R_f = 0.10$) a montré une activité moyenne contre *Bacillus subtilis* et *M. ramanniamus*, tandis que le composé A3 ($R_f = 0.04$) était surtout antifongique avec une intensité moyenne.

Sur le milieu GN, la souche P6 a produit deux composés actifs C1 et C2. De par son R_f et son activité, le composé C1 semble analogue à A2, tandis que C2 se distingue de A3 par son activité essentiellement antibactérienne (Tableau III.7, Figure III.2B).

Toujours avec cette souche (P6), le maximum de composés (B1 à B5) a été détecté sur le milieu ISP2, ayant tous des activités antifongique et antibactérienne. Le composé B1, le plus actif, est pratiquement analogue à A1 (R_f , activité antimicrobienne et révélation chimique). Les composés B3 et B4 se rapprochent respectivement des composés A2 et A3 (R_f et activité antimicrobienne). Les composés B2 ($R_f = 0.26$) et B5 ($R_f = 0$) semblent être spécifiques au milieu ISP2 (Tableau III.7, Figure III.2A).

Pour la souche CHA0, une seule tâche active a été détectée par milieu de culture; E (KB), F(GN) et D (ISP2). Les composés E et F ont montré beaucoup de ressemblance (R_f et activité antimicrobienne), alors que le composé D s'est distingué par son R_f , sa révélation chimique et son activité plus antifongique qu'antibactérienne (Tableau III.7, Figure III.2B).

Les bioautographies effectuées sur les extraits méthanoliques des culots cellulaires (provenant du milieu KB) des quatre souches de *Pseudomonas fluorescens* ont montré une

ressemblance entre leurs composés et ceux des extraits des surnageants de culture (Tableau III.8, Figure III.3).

Ainsi, deux composés ont été détectés pour chacune des trois souches P6, D2 et A6 :

- Les composés A1 et A2 pour la souche P6,
- Les composés A1 et H pour la souche D2,
- Les composés A1 et I pour la souche A6.

Les composés H et I étaient proches ou semblables à A2. Pour la souche CHA0, le composé à effet antibiotique E, déjà détecté dans le surnageant, était aussi présent dans les extraits cellulaires.

Le composé A1 a présenté dans ce cas un R_f légèrement plus bas que celui obtenu avec l'extrait du surnageant. Ceci peut s'expliquer par la présence de lipides dans les extraits cellulaires qui ont dû ralentir quelque peu la migration de cet antibiotique. Cependant, A1 était reconnaissable grâce à sa couleur très caractéristique (jaune virant rapidement au vert olive terne).

Si l'on considère l'ensemble des milieux de culture pour les quatre souches (P6, D2, A6 et CHA0), sept groupes de composés à effet antibiotique ont été détectés. Les composés des groupes 1, 2 et 3 paraissent être semblables :

- **Groupe 1 :** A1 (P6, D2 et A6 sur KB) et B1 (P6 sur ISP2), $R_f = 0,80$ à $0,82$; fortement antifongiques
- **Groupe 2 :** A2 (P6 sur KB), C1 (P6 sur GN), B3 (P6 sur ISP2), E(CHA0 sur KB), F(CHA0 sur GN), H(D2 sur KB) et I(A6 sur KB), $R_f = 0.10$ à 0.12 , en général antifongiques et antibactériens moyens
- **Groupe 3 :** A3 (P6 sur KB) et B4 (P6 sur ISP2), $R_f = 0.04$, surtout antifongiques
- **Groupe 4 :** C2 (P6 sur GN), $R_f = 0$, uniquement antibactérien,
- **Groupe 5 :** B5 (P6 sur ISP2), $R_f = 0$, moyennement antifongique et faiblement antibactérien
- **Groupe 6 :** B2 (P6 sur ISP2), $R_f = 0.026$, moyennement antifongique et fortement antibactérien
- **Groupe 7 :** D (CHA0 sur ISP2), $R_f = 0.21$, fortement antifongique et moyennement antibactérien.

Tableau III.7 : Caractéristiques des extraits des filtrats de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. P6, D2, A6 et CHA0

Milieux	Souches	Solvants de migration	Composés révélés	Rf	Détection CCM	Action sur	
						Mr	Bs
KB	P6	AM	A1	0.80	V.O foncé ND Traînée jaune	4+	4+
			A2	0.10		2+	2+
			A3	0.04		2+	Traces
	CHA0	CA		0.50	N.D	4+	4+
		AM	E	0.11	N.D	2+	2+
		CA		0	N.D	1+	2+
	D2	AM	A1	0.80	V.O	1+	2+
			H	0.12	ND	4+	3+
GN	P6	AM	C1	0.11	ND	2+	2+
			C2	0	J.C	-	2+
	CHA0	CA		0	N.D	traces	±
		AM	F	0.11	N.D	±	+
		CA		0	N.D	-	1+
		AM					
ISP2	P6	AM	B1	0.82	V.O pâle Jaune olive ND J.B J.B	4+	4+
			B2	0.26		2+	4+
			B3	0.11		2+	2+
			B4	0.04		2+	1+
			B5	0		2+	1+
		CA		0.61	ND	NT	2+
				0.50		NT	2+
				0.12		NT	3+
				0.03		NT	3+
	CHA0	AM	D	0.21	Brun terne	4+	2+
		CA		0.03	N.D	4+	2+

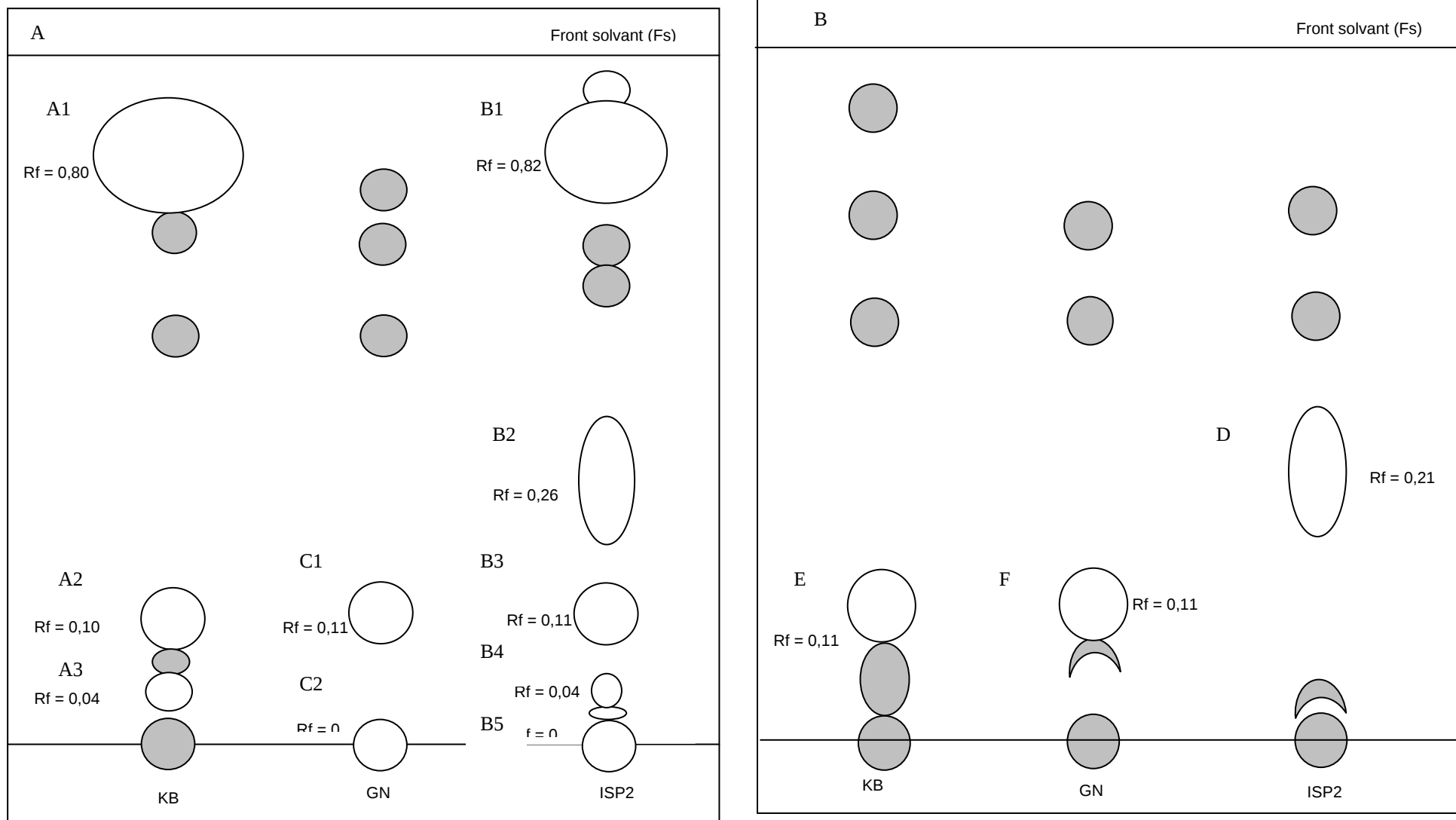
CCM = Chromatographie sur couche mince, Rf : Rapport frontal,

AM : Acétate d'éthyle-Méthanol (100/15, v/v) ; C.A : Chloroforme-Acétone (9/1, v/v)

ND : non détecté. NT : non testé; V.O : vert olive ; J.C : Jaune clair ; J.B : jaune brun ;

Mr : *Mucor rammaniamus* ; Bs : *Bacillus subtilis* ;

4+ : très fortement actif ; 3+ : fortement actif. ; 2+ : moyennement actif ; + : faiblement actif ; ± : très faiblement actif



Solvant : Acétate d'éthyle, KB, GN et ISP2 (milieux de culture). Tous les composés étaient antibactériens et antifongiques à la fois.

Les composés à effet antibiotique sont en auréoles claires : A1, A2, A3, C1, C2, B1, B2, B3, B4, B5, E, F et D. Les tâches sombres sont des impuretés inactives.

Figure III.2 : Bioautographie des extraits des surnageants de culture des souches P6 (A) et CHAO (B).

Tableau III.8 : Révélation microbiologiques des différents extraits méthanoliques des cellules des *Pseudomonas*.

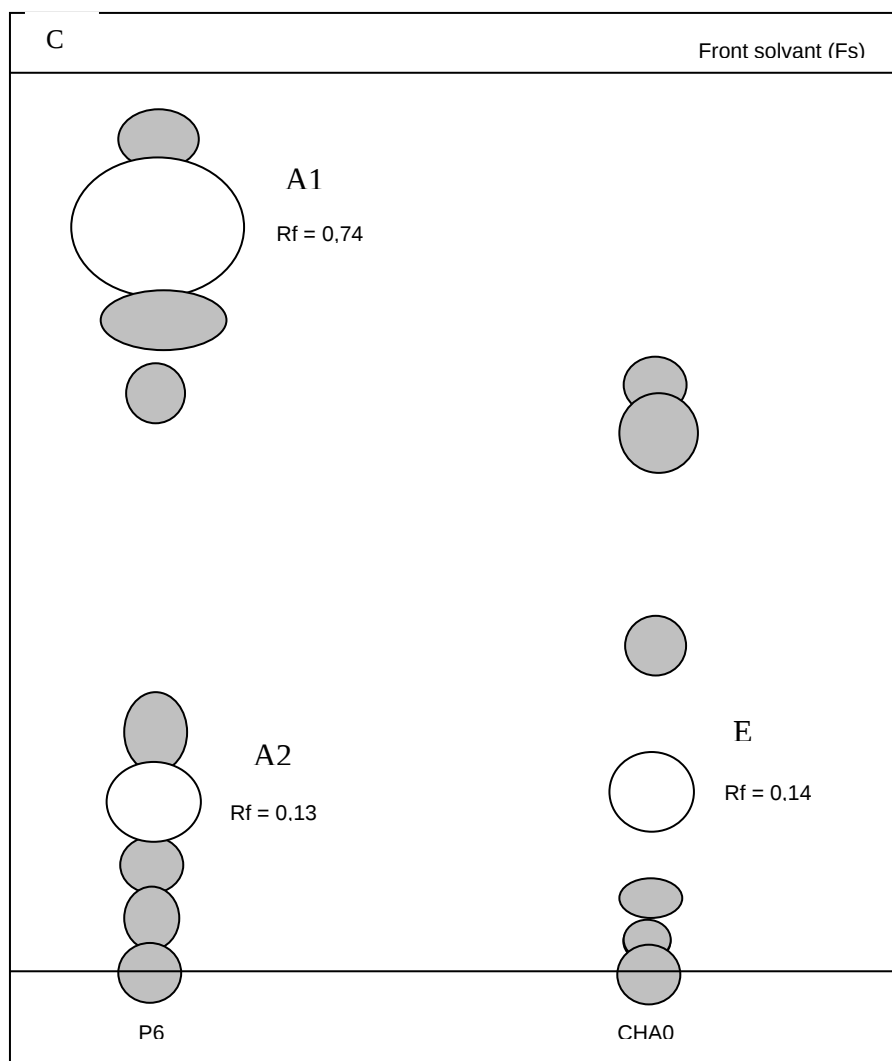
SOUCHES	Composés	Rf	Détection CCM	Action sur	
				<i>M. ramanniamus</i>	<i>B.subtilis</i>
P6	A1	0.74	V.O	4+	N.T
	A2	0.13	N.D	2+	N.T
D2	A1	0.70	V.O	4+	2+
	H	0.13	N.D	2+	1+
A6	A1	0.71	V.O	1+	Traces
	I	0.13	N.D	2+	2+
CHAO	E	0.14	N.D	1+	N.T

Rf : Rapport frontal; CCM: chromatographie sur couche mince.

Mr : *Mucor ramanniamus* ; Bs : *Bacillus subtilis*

4+ : très fortement actif ; 2+ : moyennement actif ; 1+ : faiblement actif

ND : non détecté ; N.T : non testé ; V.O : Vert Olive.



Solvant : Acétate d'éthyle ; KB, GN et ISP2 (milieux de culture).

Les composés à effet antibiotique sont en auréoles claires : A1, A2 et E.

Les tâches sombres sont des impuretés inactives.

Tous les composés étaient antibactériens et antifongiques à la fois

Figure III.3 : Bioautographie des extraits méthanoliques cellulaires des souches P6 et CHAO

Après révélation chimique, les composés à effet antibiotique A1 et B1 ont montré une coloration rose par la vanilline-H₂SO₄ et brun-rouge vif par le formaldéhyde-H₂SO₄. Les résultats étaient négatifs avec les révélateurs FeCl₃, naphtoresorcinol et ninhydrine (Tableau III.9).

Tableau III.9 : Résultats des révélations chimiques des composés à effet antibiotique des souches de *Pseudomonas fluorescens*

Groupes et Sous groupes (S/g)		Composés a effet antibiotique	Révélateurs chimiques				
			FeCl ₃	Naph	Van	Form	Nin
1		A1 , B1	-	-	+ rose	+ brun orange vif	-
2	S/g1	A2, B3, C1 E, F	-	-	-	-	-
	S/g 2	H, I	-	-	+ rose	+ brun orange vif	-
6		B2	-	-	-	-	-
7		D	+ bleu	-	-	-	-

+ : révélation positive ; - : pas de révélation

Van : vanilline-H₂SO₄, Form : formaldéhyde-H₂SO₄, Naph: naphtoresorcinol, Nin: ninhydrine

Les composés à effet antibiotique A2, C1, B3, E, F, H et I n'étaient pas homogènes et se présentaient en deux sous-groupes :

- Le premier sous-groupe comporte les composés A2, B3, C1, E et F qui n'ont été colorés par aucun des révélateurs chimiques utilisés,
- Le second sous-groupe comporte les composés H et I (des souches D2 et A6) détectés par la vanilline-H₂SO₄ (rose) et la formaldéhyde- H₂SO₄ (brun orangé vif).

Le composé B2 (groupe 6) n'a été coloré par aucun des révélateurs chimiques. Le composé D (groupe 7) a été coloré en bleu uniquement par FeCl₃,

Les composés des culots cellulaires A1 (souches P6, D2 et A6), H (souche D2) et I (souche A6) ont été colorés uniquement par la vanilline-H₂SO₄ et la formaldéhyde-H₂SO₄ et présentaient les mêmes caractéristiques que A1, H et I, issus des surnageants de culture. Les composés A2 (souche P6) et E (CHA0) n'ont pas été détectés par les révélateurs chimiques, tout comme les composés A2 et E issus des surnageants de culture des mêmes souches.

III-3.4.2.3. Spectres UV - visible

Les composés A1 et B1 (groupe 1) ; A2, C1 et E (groupe 2), C2 (groupe 4) et D (groupe 7) ont été semipurifiés par chromatographie préparative sur plaques épaisse de gel de silice. Leurs spectres d'absorption (UV- visible) ont été déterminés après dissolution dans du méthanol pur. Les résultats ont montré, d'une manière générale, une similarité entre les spectres des composés

appartenant à un même groupe (Annexe III.2). Les spectres d'absorption obtenus selon les groupes sont :

➤ **Composés du groupe 1**

- Composé A1 : 210 nm, 306 nm, épaulement à 357 nm
- Composé B1 : 212 nm, 289 nm, épaulement à 360 nm environ

Il a été noté une certaine similarité entre les deux spectres, les différences sont probablement dues aux impuretés, ces produits étant seulement semipurifiés.

➤ **Composés du groupe 2**

Les maxima d'absorption ont été les suivants :

- Composé A2 : 210 nm, épaulement à 249 nm
- Composé C1 : 209 nm, épaulement à 250 nm environ
- Composé E : 213 nm, épaulement à 250 nm environ

Les spectres semblent également similaires, avec de petites différences probablement dues aux impuretés.

➤ **Composés du groupe 4**

- Composé C2 : 213 nm, épaulement à 250 nm environ

Le spectre de ce composé était semblable au spectre des produits du groupe 2.

➤ **Composés du groupe 7**

- Composé D : 207 nm, épaulement à 250 nm environ – 325 nm.

III-3.4.2.4. Purification du composé actif A1 par HPLC

Seul le produit actif A1 a fait l'objet d'une analyse par HPLC. Après sa dissolution dans le méthanol, le produit A1, vert olive à sec, reprend sa couleur initiale jaune vif, c'est à dire, celle qu'il avait juste après la fin de migration sur CCM. La couleur de ce produit varie donc suivant son état (à sec ou en solution). A1 a été injecté entièrement. Le gradient méthanol (MeOH) /eau utilisé est comme suit :

- * 20 % (MeOH dans H₂O) pendant 10 min
- * 50 % (Me OH dans H₂O) pendant 15 min
- * 80 % (MeOH dans H₂O) pendant 15 min
- * 100 % (MeOH dans H₂O) pendant 20 min

L'expérimentation a duré au total 60 min, en utilisant un débit de gradient égal à 2 ml/mn. Les différentes fractions (20, 50, 80 et 100%) ont été recueillies, évaporées, reprises dans 0.1 ml de méthanol et testées par antibiographie.

Les résultats obtenus, illustrés par le chromatogramme (Figure III.4), montrent que l'activité était présente uniquement au niveau des fractions 50% et 80%.

Le profil d'absorption de la fraction 50% indique que le composé A1 présente deux pics juxtaposés, correspondant aux produits A_{1.1} et A_{1.2} :

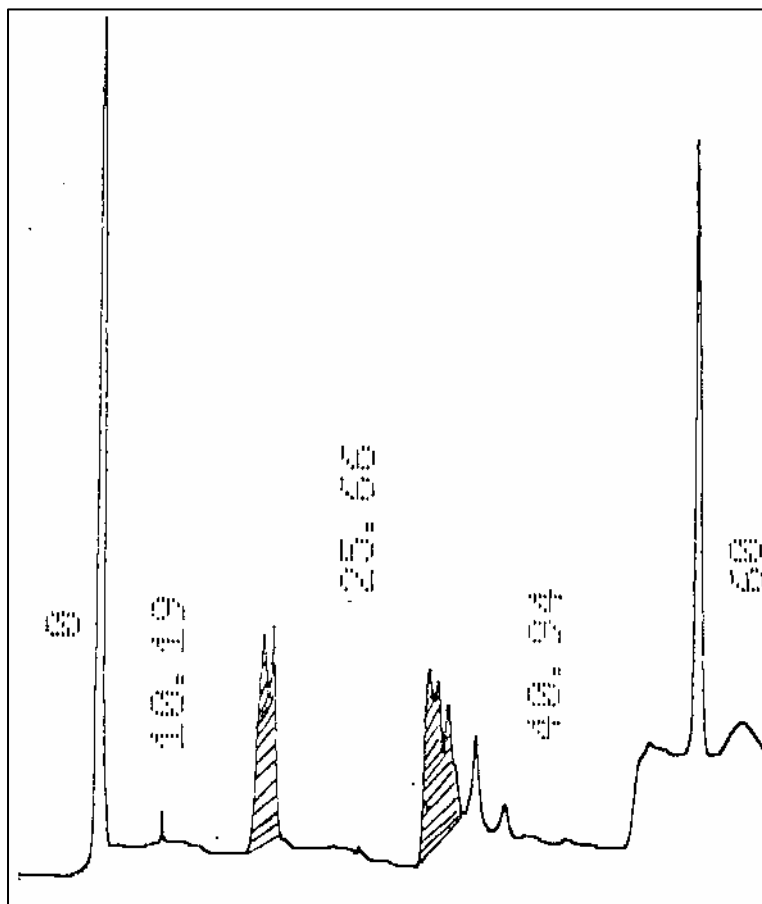
- Le composé A_{1.1} présente deux pics dont les maximums d'absorption se situent entre 203 et 313 nm avec un temps de rétention de 19 min.
- Le composé A_{1.2} présente des maximums d'absorption qui se situent à 200 et 307 nm, avec un temps de rétention de 20 min 30 s.

Les produits correspondant aux deux pics sont de couleur jaune (Jaune vif après concentration) et sont actifs contre *Bacillus subtilis*. Ces deux composés sont distincts, le temps de rétention de A_{1.1} est de 19 min et celui de A_{1.2} est de 20 min et 30 s et A_{1.1} étant plus actif que A_{1.2} lors des essais antibiographiques.

La fraction 80% a été recueillie en deux parties qui ont été testées chacune contre *B. subtilis*. La première partie notée A_{1.3}, composé incolore (jaune pâle après concentration) donnant trois pics, a été très active. Les temps de rétention ont été de 27 min 30 s (premier pic), 29 min (second pic) et 29min30 s (troisième pic). La seconde partie (deux derniers pics) était inactive. Les maxima d'absorption dans l'UV-visible des trois produits à effet antibiotique ont été comme suit :

- Composé A_{1.1} : 203 nm ; 313 nm et 385 nm – épaulement de 250 nm.
- Composé A_{1.2} : 201 nm, 307 nm et 385 nm – épaulement de 250 nm.
- Composé A_{1.3} : 202 nm, 287 nm et 360 nm.

De par leur spectre UV-visible, leur couleur et leur activité, les composés A_{1.1} et A_{1.2} semblent être très proches ; par contre, A_{1.3} se distingue par son spectre UV – visible et sa couleur.



Les zones hachurées représentent les fractions actives contre *Bacillus subtilis*
 Gradient "Eau – Méthanol" : De 0 à 10 min : 20 %, de 10 à 25 min : 50 %;
 de 25 à 40 min : 80 %; de 40 à 60 min : 100 %

Figure III.4 : Profil d'élution en HPLC du composé A1
 de la souche *P. fluorescens* P6.

III-3.5. AMPLIFICATION PAR PCR ET HYBRIDATION DU GENE PHENAZINE

La présence d'une séquence homologue au gène de phénazine *phz*, n'a pas été détectée chez les trois souches testées (P6, D2 et A6). Pour la souche de référence *P. fluorescens* 2-79, une bande de la taille recherchée (522 pb) susceptible de correspondre au produit d'amplification de la séquence *phz* a été observée après électrophorèse (Figure III. 5).

L'hybridation avec la sonde *phz* a révélé un signal correspondant à l'appariement de cette sonde avec les produits d'amplification de la souche 2-7. Pour les autres souches (P6, D2 et A6) aucun signal n'a été mis en évidence par hybridation sur colonies (Figure III.6).

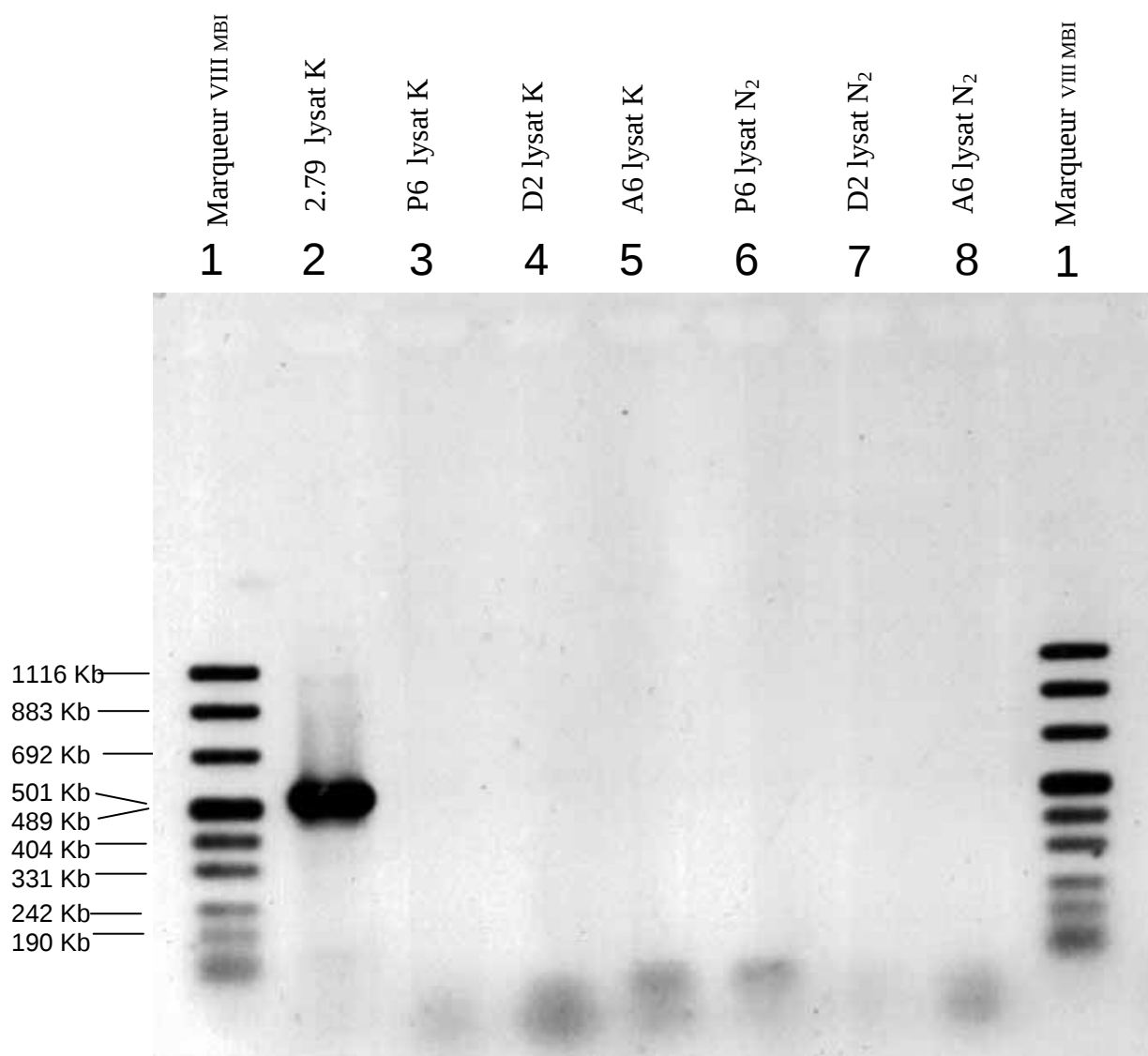


Figure III.5 :: Amplification par PCR d'une séquence génomique impliquée dans la synthèse des phénazines (**ph**) des souches (P6), (D2), et (A6) et de la souche 2.79 (témoin positif).

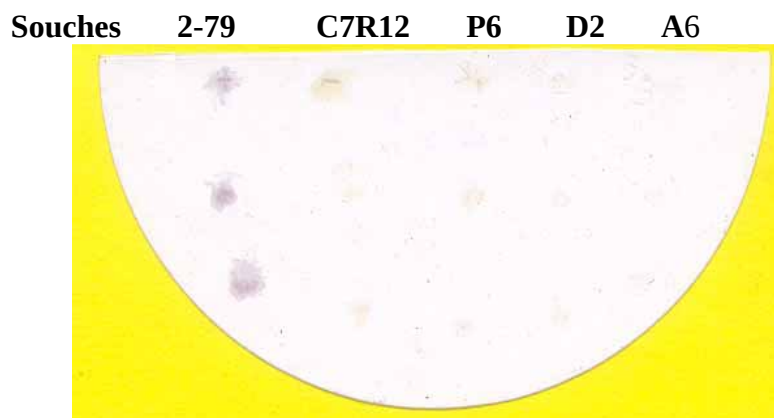


Figure III-6 : Hybridation sur colonies avec sonde **phz** 2.79 (3 spots pour chaque souche) 2.79 (témoin positif), C7R12 (témoin négatif)

III-5. DISCUSSION

La synthèse de sidérophores n'a été révélée que dans les milieux KB et MS, considérés comme carencés en fer, à travers la production d'un pigment fluorescent diffusible dans le milieu. Le milieu B de King (KB) est considéré comme un milieu sélectif pour la sélection des *Pseudomonas* spp. fluorescents (King *et al.*, 1954), ce constat a été aussi rapporté par Meyer et Abdallah (1978). Les milieux synthétiques sont mieux conseillés pour la production de siderophores que les milieux complexes (Sharma et Johri, 2003) ; ces derniers sont riches en ingrédients, tels que les peptones et les sucres, pouvant contenir des traces de fer inhibitrices de la synthèse de sidérophores, ceci a été vérifié avec les milieux PDA et PDA + KB.

Les sidérophores ne sont produits qu'en conditions de carence en fer (Meyer et Abdallah, 1978, Lemanceau, 1992; O'gara et O'Sullivan, 1992; Meyer *et al.*, 1995; Seong et Shin, 1996 ; Meyer *et al.*, 1999; Meyer, 2000). Gross (1990) a rapporté que chez des souches de *P. fluorescens* et *P. syringae*, la fluorescence, représentative des sidérophores, est réduite en présence de sels ferreux. A l'exception des lactobacilles, la quasi-totalité des microorganismes exige la présence d'ions assimilables pour leur croissance; cependant, les seuils de concentration en ions ferriques à pH 7.0 dans les environnements aqueux aérobies ne dépassent guère 10^{-17} M (Weinberg, 1978) ; à cet effet, la majorité des microorganismes réagissent à ce stress ferrique par la production de sidérophores.

Bien que la souche *P. fluorescens* CHA400 est un mutant déficient pour la synthèse de pyoverdines, sa croissance a été appréciable sur les milieux KB et MS et a été accompagnée d'une faible production de sidérophores ($< 13,44 \mu\text{g/l}$) ; ceci suggère la présence chez cette souche d'autres types de sidérophores que la pyoverdine. Les pyoverdines (PVDs) sont considérées comme le pigment fluorescent caractéristique des *Pseudomonas* spp. fluorescents, elles sont donc communément rencontrées chez les espèces de ce groupe (Meyer *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 1998), ainsi que les pseudobactines, composés diffusibles pouvant se complexer avec les ions Fe^{3+} avec une constante de stabilité élevée (10^{32} M^{-1}) (Meyer et Abdallah, 1978). Il existe d'autres types de sidérophores non fluorescents qui jouent un rôle dans la survie des bactéries, telles que les pyochelines chez *P. aeruginosa* (Neilands, 1981 et 1982; Meyer *et al.*, 1987 ; Budzikiewicz, 1993; Meyer *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Meyer, 2000; Delorme, 2002). Chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, à l'instar de la quasi-totalité des microorganismes aérobies, l'acquisition du fer est basée, en plus de la synthèse de sidérophores, sur la synthèse de protéines membranaires réceptrices des complexes ferri-siderophores (Neilands, 1981 et 1982; Meyer, 2000). Ces protéines réceptrices sont généralement spécifiques

et compatibles avec un seul type de pyoverdine ou ses analogues (Hohnadel et Meyer, 1988 ; Koster *et al.*, 1995. Meyer *et al.*, 1998; Meyer, 2000). La spécificité entre le complexe ferri-sidérophore et les protéines membranaires réceptrices dépend de la composition et de la longueur de la structure peptidique du sidérophore (Meyer, 2000 ; Delorme, 2002).

Nos résultats ont montré que les variations de pH et les apports ioniques peuvent influencer la synthèse *in vitro* des sidérophores chez les souches de *Pseudomonas* testées. Les pH acides et basiques rendent les ions Fe^{3+} insolubles, donc peu disponibles aux microorganismes (Meyer et Abdallah, 1978). Les sidérophores sont sensibles aux variations du pH, du fait de leur dégradation à des pH basiques (Sharma et Johri, 2003) et de l'inhibition de la croissance des bactéries aux pH acides.

Les sidérophores sont considérés chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme un élément clé dans la compétition rhizosphérique et ils sont souvent corrélé à aux effets bénéfiques de groupe bactérien sur les plantes (Bakker *et al.*, 1986b; Bakker *et al.*, 2003) ; Loper *et al.*, (1997) ont montré la perte du pouvoir antagoniste chez des mutants ne synthétisant pas des pyoverdines.

Il est difficile d'extrapoler le niveau de production en sidérophores *in vitro* aux conditions de la rhizosphère où le pH et les échanges ioniques sont dans une dynamique continue. Dans de telles conditions la quantification et le rôle potentiel des sidérophores bactériens sont difficiles à déterminer. Dans la rhizosphère, la détection des pyoverdines a été rapportée dans de nombreux travaux par le recours aux techniques immunologiques, notamment en utilisant des anticorps monoclonaux (Buyer *et al.*, 1993) ou par des techniques moléculaires à l'aide de gènes rapporteurs. Il a été démontré que le gène rapporteur (*inaZ*, ice nucleation activity), codant pour le caractère glaçogène, contrôlé par le promoteur du gène de biosynthèse de pyoverdine (*pvd*), formant une fusion (*pvd – inaZ*), aboutit à une transcription dans la rhizosphère régulée par la concentration en ions Fe^{3+} (Loper et Lindow, 1994 ; Loper *et al.*, 1997).

Chez *P. fluorescens* CHA0 et d'autres souches de *Pseudomonas*, il a été mis en évidence le rôle de la glycine comme précurseur de cyanides. Parmi les deux atomes de carbone de la glycine, c'est l'atome C2 qui est convertie en HCN (Castric, 1977) ; la glycine agit donc directement comme substrat et/ou stabilisateur de la HCN-synthase (Castric, 1977). Les ions ferriques sont requis aussi pour l'induction de la cyanogénèse chez les *Pseudomonas* (Voisard *et al.*, 1989). Des expériences ont confirmé que l'effet de la glycine est au niveau post-transcriptionnel, l'expression d'une fusion transcriptionnelle *hcnA – lacZ* chez la souche CHA0

est n'est pas influencée par l'addition de glycine dans le milieu (Blumer et Haas, 2000). L'HCN est produit par les *Pseudomonas* durant la phase de ralentissement de la croissance, il requiert l'oxygène à une concentration réduite analogue microaérophilie (Laville *et al.*, 1998). Dans les conditions dénitrifiantes, en présence de nitrates et en absence d'oxygène, *P. aeruginosa* ne produit pas de cyanides (Castric, 1977) ; par l'intermédiaire de ce mécanisme inexploré, il apparaît que l'inhibition des nitrates et nitrites réductases par les cyanides est prévenue ; de plus, cette bactérie a des potentialités pour détoxification des cyanides externes. La cyanogénèse joue un rôle écologique et peut constituer un avantage sélectif dans la rhizosphère et d'autres écosystèmes (Knowles et Bunch, 1986; Blumer et Haas, 2000).

Il a été démontré, grâce à l'utilisation de mutants (HCN -) de la souche *P. fluorescens* CHA0, que ce métabolite est impliqué dans le processus de suppression de *Tielaviopsis basicola* (Voisard *et al.*, 1989). La production d'HCN, *in vitro* sur milieu solide, inhibe la croissance de plusieurs agents phytopathogènes fongiques (*Tielaviopsis basicola*, *Gaunmannomyces graminis*...). L'implication d'HCN à l'état gazeux dans le sol ou la rhizosphère n'a pas été effectivement investiguée ; Bakker et Schippers (1987), dans une étude *in situ*, rapportent un effet délétère sur la pomme de terre des cyanides produits par des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, ce résultat, n'étant pas confronté à d'autres travaux, reste hypothétique.

L'intervalle de concentrations en AIA dans lequel l'AIA exogène à la plante peut avoir des effets bénéfiques sur la croissance et le développement racinaire est relativement étroit ; des concentrations élevées, de l'ordre de micromoles, ont provoqué des effets négatifs ; Il a été démontré avec la souche de *Pseudomonas* CHA0 que l'élévation de la concentration en AIA exogène n'implique pas une meilleure efficacité dans l'antagonisme. En terme d'activité de biocontrôle, l'AIA semble être de moindre importance par rapport aux autres métabolites secondaires, tels que le 2,4 diacetylphloroglucinol, la pyolutéorine, le cyanide d'hydrogène et les phénazines (Voisard *et al.*, 1989).

La production de l'acide salicylique (AS) est un caractère recherché dans les fonctions physiologiques de défense des plantes vis à vis des attaques de phytopathogènes. L'AS est considérée parmi les sidérophores intervenant dans les réactions d'induction systémique de la résistance (ISR) chez les plantes vis-à-vis de nombreux pathogènes, par bactérisation des racines ou du sol (Maurhofer *et al.*, 1992 , 1994 ; Leeman *et al.*, 1996 ; ; Mercado-Blanco *et al.*, 1997 ; Mercado-Blanco *et al.*, 1999 ; Van Loon, 1998, 2000a et 2000b).

La dissolution des phosphates naturels par les microorganismes n'est pas liée à un phénomène passif, comme par exemple une baisse de pH due à la libération d'acides organiques ; en fait, les bactéries sont capables d'extraire le phosphore dit 'assimilable' en séquestrant les cations métalliques intervenant dans l'adsorption du phosphore et en libérant le phosphore lié aux argiles et aux oxydes de fer et d'aluminium. Pour que le phosphate naturel puisse servir dans le métabolisme et la croissance des plantes, il faut que les conditions de son utilisation favorisent sa dissolution ; elles relèvent de la nature du sol et de facteurs exogènes au sol (physiques, chimiques et biologique) (Goldstein, 1986). Donc, les activités enzymatiques des *Pseudomonas* rhizosphériques peuvent contribuer, particulièrement en l'absence de formes assimilables de phosphore dans le sol, au pourvoiement de la plante en cet élément.

Les résultats obtenus, dans nos essais d'antagonisme *in vitro*, montrent que l'effet antagoniste exercé n'est pas spécifique, les spectres d'action des souches de *Pseudomonas* sont variables. Les activités antagonistes sur les milieux solides montrent que le spectre d'action est semblable pour les quatre souches (CHA0, P6, D2 et A6) de *Pseudomonas fluorescens*. Il s'agit d'un spectre large touchant aussi bien les champignons filamenteux et non filamenteux que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ceci pourrait suggérer la présence chez une même souche de nombreux métabolites, variables selon le milieu de culture utilisé. La production de métabolites secondaires, impliqués dans l'antagonisme microbien est sous l'effet du milieu de culture (Meyer et Abdallah, 1978; Leong, 1986). L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces et souches testées, mais aussi de la composition du milieu de culture (Digat, 1992). Etant donné que la sélection *in vitro* des souches bénéfiques oeuvre dans une perspective de localiser celles réunissant le maximum de mécanismes d'inhibition des pathogènes, l'antagonisme *in vitro* ne peut pas à lui seul s'imposer comme le critère fondamental de sélection ; ceci est dû que l'expression de l'antagonisme est variable selon les milieux de culture et les pathogènes ciblés. Il faut approfondir les investigations par d'autres tests et caractérisations afin de réaliser un criblage efficace permettant la sélection de souches performantes.

Les quatre souches de *Pseudomonas fluorescens* sécrètent dans le milieu de culture des substances actives extraites par le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. L'efficacité de ces solvants a été déjà rapportée dans l'extraction de phénazines (Gurusiddiah *et al.*, 1986), du 2,4 diacétyl phloroglucinol (DAPG) et de la pyolutéorine (Maurhofer *et al.*, 1992; Marvodi *et al.*, 2000) ou encore de la pyrrolnitrine (Burkhead *et al.*, 1994).

Les souches de *Pseudomonas fluorescens* P6, D2 et A6 ont produit entre deux et cinq composés à effet antibiotique retrouvés aussi bien dans le surnageant de culture que dans le culot cellulaire. Leur activité à la fois antifongique et antibactérienne et leur spectre UV-visible laisseraient supposer que ces composés sont de nature non polyénique. En effet, les polyènes sont des macromolécules constituées par un grand cycle lactone comprenant 12 à 37 atomes de carbone, ayant une partie squelettique carbonée hydrophobe caractérisée par la présence de 3 à 7 doubles liaisons conjuguées et une partie hydrophile (6 à 14 fractions hydroxyles) (Berdy *et al.*, 1987). Les doubles liaisons confèrent aux polyènes une absorption très caractéristique en U.V - visible : trois maxima entre 260 et 405 nm : 291, 304 et 318 nm pour un tétraène (quatre doubles liaisons conjuguées) et 340, 358 et 380 nm pour un hexaène (six doubles liaisons conjuguées). De plus ces molécules sont essentiellement antifongiques, avec cependant une certaine instabilité et une toxicité élevée (Berdy *et al.*, 1987), d'où l'intérêt des antifongiques non polyéniques.

La souche de référence CHA0 produit selon Maurhofer *et al.*, (1992) de la pyolutéorine sur milieu KB et du 2,4 diacétylphloroglucinol sur milieu à l'extrait de malt. Nos résultats montrent la production par CHA0 sur ISP2 (riche en extrait de malt) du composé D coloré par FeCl₃, révélateur de phénols. Ce composé est donc vraisemblablement le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) dont la structure chimique contient justement un noyau phénolique. Sur milieu KB, cette souche produit le composé E (différent du D) qui pourrait donc être la pyolutéorine en rapport avec les résultats de Maurhofer *et al.*, (1992) relatif au R_f de ce métabolite.

La souche P6 produit sur ISP2 un composé différent du D de la souche CHA0, ce qui exclut donc la présence de 2,4 diacétyl-phloroglucinol. Par contre, sur KB, cette souche sécrète le composé A2 qui, de par son R_f, sa révélation chimique, son activité antimicrobienne et son spectre U.V – visible, ressemble au composé E de la souche CHA0 et pourrait être donc de la pyolutéorine.

Berdy *et al.*, (1987) ont rapporté la présence de 35 antibiotiques de structures diverses chez *Pseudomonas*: des hétérocycles, des aromatiques, des peptides et protéines, des macrocycles, des quinones, des dérivés d'acides gras et des dérivés d'acides aminés. Les deux premiers présentent généralement une activité à la fois antifongique et antibactérienne, ils sont avec ceux à structure peptidique et protéique les plus fréquemment sécrétés.

Parmi les hétérocycles, un nombre important est représenté par les phénazines, hétérocycles accolés (trois cycles) contenant de l'azote (Budzikiewicz, 1993). Les phénazines sont très souvent de couleur jaune à verdâtre, actives sur les bactéries et les champignons (action forte) et extractibles par le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle (Gerber, 1969; Gurusiddaiah *et al.*, 1986). Les composés A_{1.1} et A_{1.2} (sécrétés par la souche P6) et A1 (sécrété par les souches D2 et A6) présentent ces caractéristiques ; de plus, ils ont été colorés par le révélateur des aromatiques polycyclique. Leur spectre UV-visible (201 à 203 - 250 - 307 à 313 - 385 nm) est proche de celui des phénazines, telle par exemple la 2,3,7 triméthoxyphénazine (224 - 256 - 310 - 390 nm) (Rômmer *et al.*, 1981). Les composés A_{1.1} et A_{1.2} pourraient donc être des phénazines.

Les travaux de Delorme (2002) sur l'extrait de la souche *P. chlororaphis* DTR133 ont montré par HPLC la présence d'un composé présentant un pic d'absorption à 248 nm détectée dans la fraction éluée après 29 min de rétention. Son profil d'absorption est composé de deux pics à 248 nm et 367 nm. Ce composé correspondrait à la phénazine -1- carboxamide (PCAD) ou à l'acide phénazine 1- carboxylique (PCA). Les pics d'absorption 2 et 3 de A_{1.3} à 287 et 360 nm avec des temps de rétention respectifs de 29 min et de 29 min 30 s pourraient suggérer que ces composés seraient du PCAD ou PCA.

Les phénazines chez *Pseudomonas* joueraient un rôle important dans la lutte biologique contre les maladies infectieuses des plantes (Thomashow et Weller, 1988; Thomashow *et al.*, 1990; Thomashow, 1991; Thomashow *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter dans notre cas que les composés majoritaires et les plus actifs, A_{1.1} et A_{1.2} de la souche P6, semblent appartenir au groupe des phénazines. La souche P6 s'est révélée apte à diminuer de manière très sensible la fusariose de la tomate dans nos travaux (Toua, 1996; Toua *et al.*, 1997; Larbaoui, 1999; Benchabane *et al.*, 2000; Larbaoui, 2003).

La nature phénazinique des composés A_{1.1}, A_{1.2} et A_{1.3} et que le composé E soit de la pyolutéorine ne peuvent être définitifs qu'après une étude approfondie de leur structure chimique. Il est aussi important de signaler que A1, ayant donné une seule tâche sur CCM, a été résolu par HPLC en trois composés (A_{1.1}, A_{1.2} et A_{1.3}) dont deux très semblables (A_{1.1} et A_{1.2}).

Les souches D2 et A6 ont synthétisé, en plus de A1, les composés H et I respectivement. Ces derniers semblent être des aromatiques polycycliques contenant des résidus éthers (révélation positive à la formaldéhyde - H₂ SO₄ et à la vanilline - H₂ SO₄).

Les composés E et F synthétisés respectivement par les souches CHA0 présentent le même R_f que H et I mais ils ont été négatifs à la révélation par le formaldéhyde-H₂ SO₄ et à la

vanilline - H₂ SO₄. Par comparaison avec les travaux de Maurhofer *et al.*, (1992), le composé E peut être assimilé à la pyolutéorine, tandis qu'aucune hypothèse ne peut être émise concernant F.

Notre étude a montré que les souches P6 et A6 présentent des similarités dans les métabolites synthétisés. Il faut signaler qu'elles appartiennent au même biovar II de *Pseudomonas fluorescens*.

La présence d'une séquence homologue au gène de phénazine *phz* n'a pas été détectée par PCR chez les trois souches testées (P6, D2 et A6), tandis la souche de référence *P. fluorescens* 2-79 a donné un amplifiat de la taille attendue soit 522 pb. L'hybridation moléculaire à l'aide de la sonde *phz* a donné les mêmes résultats que la PCR. L'inadéquation entre les résultats phénotypique et génotypique est probablement liée à un polymorphisme dans les séquences des gènes *phz*. Delorme (2002) a rapporté, concernant la détection des séquences génomiques *phzC* et *phzD* (1409 pb) sur des *Pseudomonas* spp. fluorescents, l'absence d'hybridation chez certaines souches malgré la présence dans leur surnageant des cultures de composés phénaziques.

La synthèse de ce type d'antibiotiques ainsi que celle d'autres métabolites tels que la pyoverdine apparaît être régulée chez certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents par le phénomène de quorum sensing (QS) (Pierson *et al.*, 1994, Stinizi *et al.*, 1998 ; Delorme, 2002). Ainsi la synthèse de ce type de métabolites secondaires n'a lieu que si la densité bactérienne est suffisante. Le phénomène du type « Quorum sensing » repose sur la synthèse de N-acyl homosérine lactone qui a un rôle déterminant dans la compétitivité rhizosphérique (Delorme 2002). Tomashow *et al.*, (1990) ont détecté du PCA (Acide phénazine -1-carboxylique) dans la rhizosphère et sur les racines de plants colonisés par les souches de *P. fluorescens* 2-79 et *P. putida* 30.84 ; par contre, il y a absence de ce métabolite dans le cas de la colonisation avec des souches mutantes déficientes pour la synthèse de phénazines (*phz*-). La grande partie de l'espace tellurique est d'une faible teneur en substrats organiques, les antibiotiques peuvent être d'un avantage écologique dans les microsites possédant suffisamment de matières organiques, particulièrement les sources de carbone, permettant à ces microorganismes à synthétiser leurs métabolites secondaires (Van Loon *et al.*, 1993; Van der Heuvel *et al.*, 1995; Steijl *et al.*, 1995; Smit *et al.*, 2002).

III-4. CONCLUSION

Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production de métabolites secondaires chez 80 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Toutes les souches ont synthétisé les sidérophores, la production de ces métabolites est dépendante de la composition des milieux de cultures. Les variations de pH et l'incorporation des ions (Cu^{2+} et Fe^{3+}) influent sur la quantité de siderophores synthétisée, les ions Fe^{3+} répriment leur synthèse, alors que les ions Cu^{2+} semblent stimuler leur production.

La cyanogénèse est une caractéristique qui a été retrouvée chez un nombre important de souches. Ce métabolite est un produit typique du métabolisme secondaire, qui n'a apparemment aucune fonction dans le métabolisme basal, mais qui peut procurer aux souches productrices un avantage sélectif au sein des communautés microbiennes rhizosphériques.

L'aptitude à synthétiser l'AIA ou des produits apparentés, ainsi que la solubilisation des phosphates sont des caractéristiques retrouvées chez certaines souches. Ces propriétés, parmi d'autres, peuvent avantager la souche dans sa compétition et son adaptation à divers écosystèmes (sol nu et sols rhizosphériques).

L'acide salicylique est produits par nos souches, son rôle dans la compétition rhizosphérique n'a pas été bien élucidée, mais ce métabolite est corrélé aux réactions d'autodéfense de la plante en stimulant l'induction de la résistance systémique chez la plante.

La production d'antibiotiques est parmi les mécanismes les plus actifs procurant un atout majeur dans l'antagonisme microbien. D'après nos résultats, certains composés à effet antibiotique retrouvés chez nos souches peuvent être de la pyrrolnitrine, du 2,4 phloroglucinol ou molécules phénaziniques. Ces métabolites sont des composés impliqués activement dans les mécanismes de la lutte biologique vis à vis de nombreux agents phytopathogènes d'origine tellurique.

La synthèse d'antibiotiques varie quantitativement et qualitativement, en fonction du milieu de culture, il serait intéressant, en perspective, de diversifier les milieux, d'effectuer des cinétiques de production et de compléter l'étude chimique des antibiotiques.

L'absence de concordance entre les résultats de détection des phénazines par la spectroscopie visible et par HPLC, par rapport à l'amplification par PCR et l'hybridation moléculaire, suggère un polymorphisme dans les séquences codant ce métabolite.

IV-1. INTRODUCTION

La rhizosphère représente une zone d'interaction où de multiples et intenses échanges s'opèrent entre le sol, les racines et la microflore tellurique. En plus de leur rôle comme support mécanique et moyen d'absorption et de prélèvement d'eau et de nutriments, les racines assurent des activités spécifiques de synthèse et d'accumulation de divers composés (Lynch, 1991). Les exsudats racinaires peuvent représenter 10 à 20 % des photosynthétats influençant la densité et l'activité des microorganismes rhizosphériques. Des populations microbiennes spécifiques peuvent être favorisées par l'adéquation de leur activité métabolique avec la composition des exsudats racinaires (Gamalero *et al.*, 2003). La structure et la nature des populations microbiennes rhizosphériques diffèrent significativement de celles des populations microbiennes telluriques en général (Lemanceau *et al.*, 1995).

L'effet rhizosphère désigne les variations qualitatives et quantitatives de la microflore du sol sous l'effet de la composition des exsudats racinaires. La rhizosphère est le siège d'interactions microbiennes complexes et variées qui peuvent être de différents types : compétition, antibiose, parasitisme, prédation et synergie. Par rapport à la nature de ces effets (positifs ou négatifs), l'état sanitaire des plantes est conditionnée aussi bien par la densité et l'activité des agents pathogènes par celle de la flore antagoniste saprophytes ; ainsi, l'importance relative de ces protagonistes au niveau de la rhizosphère est déterminante sur la physiologie et le développement de la plante (Lemanceau et Heulin, 1998).

Les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes sur la santé et l'amélioration de la croissance des plantes ont été rapportés depuis presque trois décennies dans différentes conditions de culture et d'expérimentation (Burr *et al.*, 1978; Kloepper et Schroth, 1981; Bakker *et al.*, 1987; Défago *et al.*, 1987; Lifshitz *et al.*, 1987; Weller, 1988; Keel *et al.*, 1989. Keel *et al.*, 1990 ; Défago et Haas, 1990; Keel et Défago, 1991; Lemanceau, 1992). Cependant, le contrôle des maladies telluriques par des inoculums de germes antagonistes a soulevé dans la majorité des cas un problème de stabilité et de reproductibilité des effets bénéfiques recherchés, ceci a été associé en partie, et même parfois totalement, avec le niveau de colonisation racinaire. Le succès de l'utilisation des bactéries antagonistes nécessite une densité de population suffisamment élevée et leur application au bon moment et au bon endroit (Gamalero *et al.*, 2003). La production de métabolites secondaires est requise dans le biocontrôle et la promotion de croissance ; cependant, leur impact dépend d'une colonisation rhizosphérique suffisante et de leur délivrance aux moments opportuns.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents présentent des aptitudes élevées à la colonisation de la rhizosphère de diverses espèces végétales (Bakker *et al.*, 1986, Bakker et Schippers, 1987; Bakker *et al.*, 1987; Digat et Gardant, 1987; Keel *et al.*, 1989; Keel *et al.*, 1990. Keel *et al.*, 1991; Lemanceau, 1992; Keel *et al.*, 1992. Bakker *et al.*, 1998). Il a été mis en évidence par Campbell, *et al.*, (1987), Raaijmakers *et al.*, (1995a et 1995b) l'importance relative de la densité de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère dans l'inhibition ou la suppression des maladies de pourriture racinaire et de fusarioses.

Dans ce chapitre, 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, le taux de croissance et la résistance aux stress thermique et hydrique.

La dynamique des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère dans des conditions gnotobiotiques et leur survie dans des préparations d'inoculum ont été étudiées.

IV-2. MATERIEL ET METHODES

IV-2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

- Les 80 souches de *Pseudomonas* identifiés et classés sur le plan trophique (10 ou 15 souches par biotope) (Tableau II.7) ont fait l'objet de tests de tolérance au Na Cl et de résistance aux antibiotiques.
- Pour les autres tests, ce sont des souches sélectionnées qui ont été utilisées :
 - La résistance aux stress thermique et hydrique, le taux de croissance et la colonisation sur tubercules de pomme de terre ont été déterminées sur 10 souches :
 - ✓ Sept souches sélectionnées pour leurs aptitudes à produire les métabolites secondaires recherchés (Chapitre III), six issues de nos isollements (**P6**, **P4**, **D2**, **A6**, **B3** et **T6**) et la souche de référence **CHA0** (cf. Chap III, Tab. III.5)
 - ✓ Deux autres souches (**T9** et **V8**), pyoverdine (+) mais non productrices des autres métabolites [phz (-b), HCN (-), AIA (-) et (AS (-)].
 - ✓ Une souche **SN1** issue d'un sol non cultivé.
 - Les essais de colonisation en microcosmes et de conservation des inoculum microbiens ont concerné quatre souches de différents biotopes : **T6** (tomate) et **B3** (blé), **D2** provenant (palmier dattier) et la souche **SN1** (sol non cultivé).
 - L'influence ou le rôle des pyoverdines dans la colonisation rhizosphérique a été étudié sur deux souches de notre collection, **P6** et **D2** productrices de sidérophores, notamment pyoverdiniques (pvd+) et une souche de référence mutée pour le caractère pyoverdines, CH400 (pvd -)

IV-2.2. RESISTANCE AU CHLORURE DE SODIUM ET AUX ANTIBIOTIQUES

La tolérance au chlorure de sodium (Na Cl) des souches a été testée sur le milieu NGA (Annexe II.1) additionné de Na Cl aux concentrations de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 %, on note la croissance bactérienne après incubation à 26° C pendant 3 à 5 jours.

La sensibilité à la streptomycine, au chloramphénicol et à l'acide nalidixique aux concentrations de 20, 50 et 100 µg/ml a été testée sur milieu TSA (10 %) (Annexe II.1). Après ensemencement et incubation pendant 3 jours à 28° C, la croissance de la souche à tester sur milieu contenant l'antibiotique a été comparée à sa croissance en absence de l'antibiotique (Alvarez *et al.*, 1995).

IV-2.3 TAUX DE CROISSANCE

Le taux de croissance *in vitro* a été déterminé sur milieu Ayers selon la méthode décrite par Scher *et al.*, (1988). La concentration bactérienne initiale a été ajustée à 10^6 ufc/ml et l'incubation a été effectuée à 25° C en agitation continue (100 rpm). La concentration bactérienne a été déterminée par mesure de l'absorbance à 620 nm après 4 heures (N_0) et après 24 heures (N_t) et le taux de croissance a été calculé suivant la formule :

$$1 / T_d = (\text{Log } N_t - \text{Log } N_0) / 0,301 \times t$$

T_d : temps de doublement en heures
 N_t : concentration finale après 24 heures en ufc/ml
 N_0 : concentration initiale après 4 heures en ufc/ml
 t : temps écoulé = 24 heures
 $0,301 = \text{Log } 2$

Le taux de croissance est calculé à partir des données de trois répétitions.

IV-2.4. STRESS THERMIQUE ET HYDRIQUE

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.

La résistance au stress thermique a été évaluée par la capacité des souches à reprendre une croissance normale à 26° C après un passage de 48 heures à la température de 41° C (Mattar, 1993). Un volume de 1 ml d'une suspension bactérienne (10^8 ufc/ml) a servi àensemencer 9 ml du milieu liquide Ayers en tube. La culture a été incubée pendant 48 heures à 41°C, puis à 26°C pendant 24 heures sous agitation. La croissance bactérienne a été évaluée par la mesure de la densité optique à 620 nm après 48 heures (juste après stress) et 72 heures (24 h après le stress), en comparaison avec les concentrations des témoins incubés uniquement à 26°C sous agitation.

La résistance au stress hydrique a été testée en adaptant la méthode de pelliculage décrite par Digat (1989 et 1991). Les tests ont été effectués en utilisant des semences de tomate (var. marmande) et la tourbe comme support adhésif pour améliorer l'efficacité de la bactérisation. Pour former un substrat collant, 100 ml d'une suspension bactérienne (10^8 ufc/ml) ont été versée sur 50 g de tourbe contenant 50 graines de tomate. Le mélange obtenu a été remué soigneusement et laissé au repos pendant 1 heure pour que le substrat s'imbibent de la suspension bactérienne et adhère aux graines.

Des lots de dix semences ont été transférés dans des boîtes de Pétri stériles et déshydratés à 40° C pendant 1 heure. En parallèle un lot de 10 semences a été mis dans 10 ml d'eau distillée stérile et laissé en agitation pendant 60 minutes à la température ambiante (18 à 20° C).

Pour comparer le taux de viabilité des populations bactériennes adhérentes aux semences avec et sans déshydratation, les semences ont été mises individuellement en suspensions dans des tubes de 10 ml d'eau distillée stérile laissés en agitation pendant 30 minutes. La concentration bactérienne par semence a été estimée par dénombrement sur milieu KB ensemencé avec 100 µl de la suspension et de ses dilutions et incubé à 26° C pendant 72 h.

IV-2.5 COMPETITIVITE RHIZOSPHERIQUE

Le but de cette étude est le suivi de la dynamique des populations bactériennes, après leur introduction dans le sol, afin d'évaluer le niveau de colonisation rhizosphérique. Les essais ont été réalisés avec des tubercules de pomme de terre dans des conditions gnotobiotiques; et séparément, avec trois espèces végétales herbacées, la tomate, le lin et le blé dur dans des microcosmes cultivés.

IV-2.5 1- COLONISATION DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE

Le suivi de la population bactérienne a été effectué après bactérisation de minitubercules de pomme de terre obtenus à partir de vitroplants certifiés indemnes de parasites.

Les minitubercules ont été désinfectés (hypochlorite de sodium à 10 % pendant 20 minutes), rincés à l'eau stérile (5 lavages consécutifs) pour éliminer les traces du désinfectant et plantés individuellement en pots (30 x 30 cm) contenant 5 Kg de substrat (1/3 de tourbe + 2/3 de sol tamisé à 2 mm) stérilisé au préalable par un thermo-stérilisateur (deux cycles à 120° C pendant 30 minutes).

La bactérisation du sol entourant les minitubercules a été réalisée avec une suspension bactérienne dans une solution tampon ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (10^6 ufc/g de sol.) (50 pots par souche testée). La conduite de la culture a été réalisée sous une serre en verre (le jour 22° C pendant 12 h et la nuit à 15 °C pendant 12 h). L'irrigation a été assurée par des apports quotidiens de 200 ml d'eau stérile dans chaque pot.

La densité bactérienne a été évaluée, comparativement à la concentration initiale appliquée lors de la bactérisation, après 30 et 70 jours, sur des prélèvements à partir de 10 pots. Chaque tubercule a été déterré et secoué sous un jet d'eau stérile pour ne garder que le sol

fortement adhérent aux tubercules, quelques grammes de ce dernier ont été prélevés pour évaluer la densité bactérienne.

Un gramme de sol a été mis en suspension dans l'eau distillée stérile, 100 µl des dilutions 10^{-5} à 10^{-10} ont été étalées sur milieu KB à raison de trois boîtes par dilution. Après incubation à 25° C pendant 36 heures, le dénombrement des colonies a été effectué sur les boîtes présentant entre 30 et 600 colonies

IV-2.5.2. ESSAIS EN MICROCOSMES

Ces essais ont consisté à étudier la dynamique des populations de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère de plantules herbacées. Les essais ont été conduits dans des microcosmes (Figure IV.1) conçus selon les descriptions de Latour *et al.*, (1996) et de Delorme (2002). Chaque microcosme est composé de :

- Un tube à essai (150 mm x 25 mm) contenant de l'eau distillée stérile à 1/3 de son volume, pour que la mèche absorbante assure par remontée capillaire un niveau d'humidité constant dans le sol.
- Une mèche de tissu absorbant (8 cm de long et 2 cm de large), dont l'extrémité haute a été introduite dans le sol et l'autre a été plongée dans le tube contenant de l'eau distillée stérile.
- Une seringue stérile de 5 ml contenant le sol, dont l'aiguille a été sectionnée et remplacée par un tube en plastique cylindrique (3 cm de long) assurant le passage de la mèche absorbante.

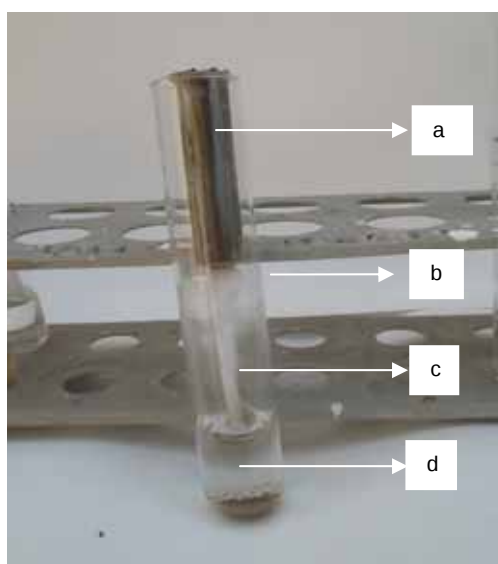


Figure IV.1 : les différents constituants du microcosme.

a : seringue stérile contenant 10 g de sol.
 b : tube à essai de 2,5 cm de diamètre.
 c : bande de tissu (8 cm x 2 cm).
 d : niveau d'eau.

Présentation des essais : Les essais réalisés sont :

- L'étude de l'effet de la plante sur les aptitudes des souches à la colonisation rhizosphérique : Les essais ont été conduits avec trois espèces végétales, la tomate (var. heinz 1370), le blé dur (var. waha) et le lin (var. opaline) ainsi qu'en sol nu, en interaction avec chacune des quatre souches : **T6** (pomme de terre), **B3** (blé), **D2** (palmier) et **SN1** (sol non cultivé).
- L'étude de l'effet de la synthèse des pyoverdines sur la compétence rhizosphérique : Les souches T6 et D2 synthétisant les pyoverdines (pvd +) ont été comparées au mutant CHA400 déficient en la synthèse de ces métabolites (pvd -). Dans ces essais, le sol des microcosmes a été enrichi en fer (FeCl_3) ou en acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) à la concentration finale de 50 $\mu\text{g/g}$ de sol

Le sol : Le sol a été prélevé d'une parcelle non cultivée depuis au moins deux décennies. Après séchage à l'air libre et élimination des éléments grossiers, le sol a été tamisé (2 mm) et stérilisé par autoclavage (trois autoclavages à 120 °C pendant 30 minutes chacun, espacés de 24 heures).

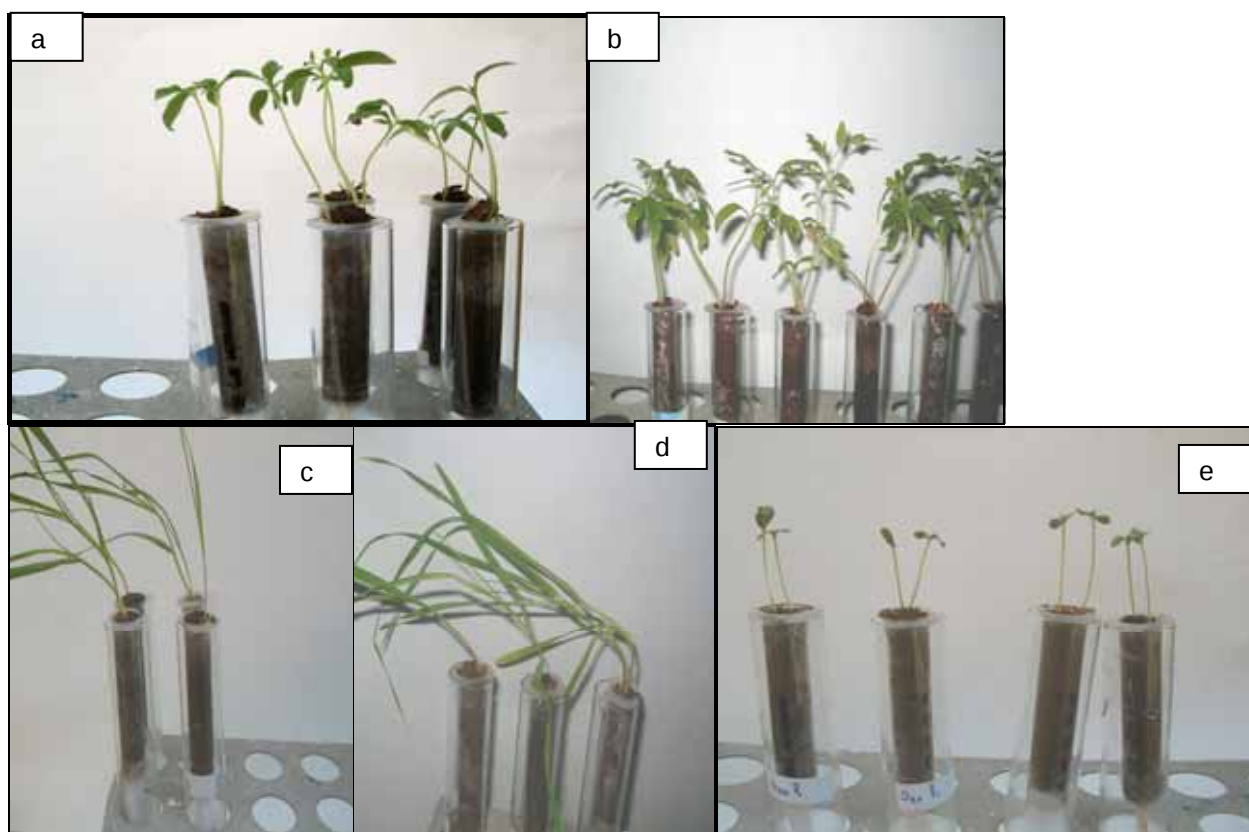
Les semences végétales : Les graines des trois espèces végétales (tomate, lin et blé) ont été désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium (10 %, 20 min), lavées cinq fois consécutives avec de l'eau distillée stérile et laissées pour séchage sur papier absorbant. Ces graines ont été déposées dans des boîtes Pétri stériles tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillée stérile, pour prégermination à 25°C pendant 48 heures.

Inoculation des microcosmes: L'inoculum bactérien a été préparé avec des cultures de 24 h sur milieu KB incubées à 25 °C, remises en suspension dans l'eau stérile. La densité des suspensions bactériennes a été ajustée en mesurant la densité optique ($\lambda = 620 \text{ nm}$). Selon les techniques décrites par Latour (1996), 9 g de sol sec ont été introduits dans la seringue où 3 graines prégermées ont été déposées et recouvertes avec 1 g de sol sec. Un volume de 4 ml de la suspension bactérienne a été versé dans chaque seringue (10 g de sol) donnant une concentration finale de 10^6 ufc/g de sol sec.

Des microcosmes de sol nu, sans graines végétales, ont été réalisés dans les mêmes conditions et selon la même procédure.

Les microcosmes ont été déposés en chambre de culture pendant 30 jours (photopériode : 16 h à 25 °C avec une intensité lumineuse de 10000 lux; nyctipériode : 8 h à 20°C et une hygrométrie relative de 60 %).

Dénombrement : Le suivi de la dynamique des populations bactériennes a été effectué après 15 et 30 jours d'incubation (Figure IV.2). Pour chaque traitement (variante), cinq microcosmes ont été analysés à chaque date de prélèvement. Après élimination de la partie aérienne du plant, le contenu de chaque seringue (sol + système racinaire) a été homogénéisé dans 90 ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue a été mixée pendant 5 minutes à l'aide d'un mixeur (Blender). Un ml de la mixture a été versé dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile et le dénombrement bactérien a été effectué sur milieu King B ensemencé avec 100 μ l de dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} étalées à l'aide de billes en verre, à raison de 3 répétitions par dilution. Après incubation à 25 °C pendant 24 à 36 heures, le dénombrement a concerné les boîtes présentant entre 30 et 600 colonies.



microcosmes de tomate : (a) après 15j et (b) après 30 jours.
microcosmes de blé : (c) après 15j et (d) après 30 jours.
microcosmes de lin après 15 jours (e).

Figure IV.2 : Développement des plantes dans les microcosmes.

IV-2.6. CONSERVATION DES INOCULUMS BACTERIENS

La colonisation rhizosphérique dépend aussi bien de la concentration bactérienne apportée, que de la technique de bactérisation utilisée. La nature du support des inoculums bactériens introduits au niveau de la rhizosphère ou sur les semences joue un rôle important dans le maintien de la viabilité des bactéries. Dans le but d'une recherche de supports ou d'adjuvants aux microorganismes, leur assurant une conservation optimale, il a été testé deux substrats, la tourbe et le méthyle-cellulose. Ces deux substrats ont été utilisés dans la préparation d'inoculums avec les souches de *Pseudomonas fluorescens* P4 et P6, dont la survie a été évaluée pendant une période de conservation de 12 mois à 4°C.

Des suspensions bactériennes dans le tampon ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1M, pH 7) ont été préparées à partir de cultures de 24 h sur milieu KB. Un volume de 400 ml de suspension (10^6 ufc/ml) a été mélangé avec 200 g de substrat (tourbe ou méthyle cellulose) préalablement stérilisé par autoclavage (trois autoclavages à 120 °C espacés de 24 h) pour former une préparation pâteuse. Après une incubation de 48 h à 25° C pour initier la croissance bactérienne, les préparations ont été conservées dans des sacs en papier à 4° C. La concentration bactérienne a été évaluée par des dénombrements de colonies après 1, 2, 3, 6, 9 et 12 mois, selon les techniques décrites précédemment (IV-2.5.2).

IV-2.7. ANALYSE DES DONNEES

Les essais de l'étude de la dynamique des populations bactériennes ont été répétés au moins trois fois (3 à 5 répétitions) par souche. La biomasse de chaque souche a été exprimée par rapport à la densité initiale à la bactérisation. La distribution des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère étant de type lognormal (Loper *et al.*, 1985), les densités moyennes ont été transformées en valeurs logarithmiques décimales avant de subir une analyse de variance. Dans le cas où la différence est significative, les moyennes ont été comparées selon le test de Newman-Keuls au seuil du risque d'erreur $\alpha = 1\%$ et 5% (Dagneli, 1975).

IV-3 RESULTATS

IV-3.1. RESISTANCE AU NaCl ET AUX ANTIBIOTIQUES

La totalité des 80 souches testées se développent aux concentrations de 1 et 2 % en NaCl. Les concentrations de 3 et 4 % en NaCl ont été tolérées par 36 souches et aucune souche n'a poussé à des concentrations supérieures.

Globalement, la fréquence de résistance des 80 souches aux trois antibiotiques était élevée aux concentrations de 20 et 50 µg/ml. A la concentration de 100µg/ml, les *Pseudomonas* se sont avérés plus résistants à la streptomycine (60%) par rapport au chloramphénicol (20%) et l'acide nalidixique (15%) (Tableau IV.1). 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.

Tableau IV.1 : Fréquences * (%) des souches résistantes aux antibiotiques

Antibiotiques	Concentration		
	20 µg /ml	50 µg /ml	100 µg /ml
Streptomycine	100	100	66
Chloramphénicol	95	70	20
Acide nalidixique	95	80	15

* Par rapport au nombre total de souches testées (n = 80).

IV-3.2. TAUX DE CROISSANCE

Le taux de croissance *in vitro* des dix souches testées a été de 0,17 à 0,35 h⁻¹, correspondant à des temps de génération de 2,85 h à 5,85 h (Tableau IV.2). Les souches pouvaient être divisées en quatre groupes selon leur taux de croissance :

- ✓ Le groupe (a) comprenant les souches P6, A6 et T9 avec un taux de croissance supérieur à 0,33 h⁻¹
- ✓ Le groupe (b) comportant les souches B3 et T6 avec un taux de croissance entre 0,33 h⁻¹ et 0,25 h⁻¹.
- ✓ Le groupe (c) formé des souches D2, SN1 et D4 ayant un taux de croissance entre 0,25 h⁻¹ et 0,2 h⁻¹.
- ✓ Le groupe (d) constitué des souches V8 et P4 dont le taux de croissance est inférieur à 0,2 h⁻¹.

Tableau IV.2 : Taux de croissance *in vitro* (1/h)

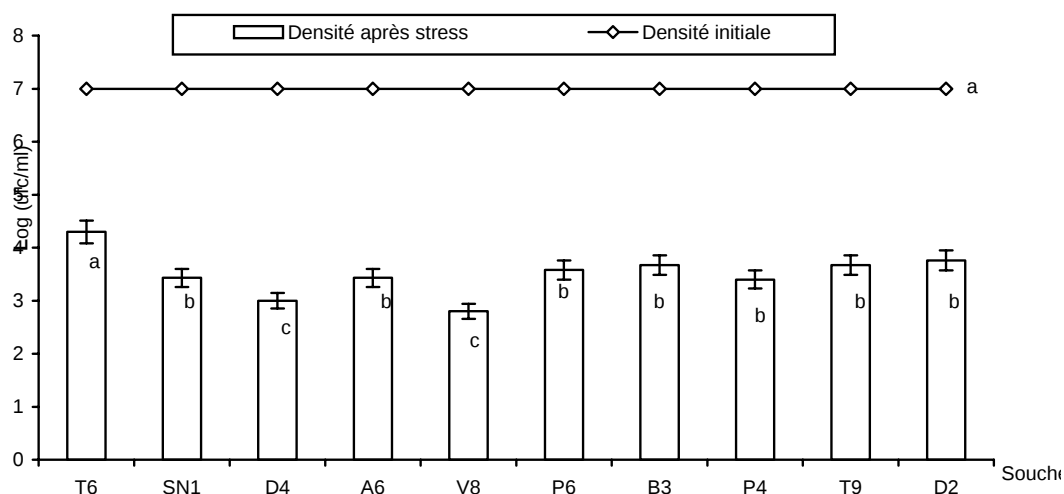
Souches	Taux de croissance (h ⁻¹)
<i>P. fluorescens</i> A6	0,35 a
<i>P. fluorescens</i> P4	0,17 d
<i>P. fluorescens</i> T6	0,28 b
<i>P. fluorescens</i> P6	0,40 a
<i>P. fluorescens</i> T9	0,34 a
<i>P. fluorescens</i> SN1	0,22 c
<i>P. putida</i> D4	0,22 c
<i>P. fluorescens</i> V8	0,19 d
<i>P. fluorescens</i> D2	0,22 c
<i>P. putida</i> B3	0,29 b

Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas des différences significatives au seuil de risque d'erreur 1 % et 5%.

IV-3.3. STRESS THERMIQUE ET HYDRIQUE

Toutes les souches ont résisté au stress thermique. Après un passage à la température de 41 °C pendant 24 heures, les dix souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents testées ont pu reprendre une croissance normale à la température de 26 °C comparable à celle de leurs témoins respectifs non stressés. Les concentrations des suspensions bactériennes ont largement dépassées dans l'ensemble le seuil de 10⁷ cfu/ml. La thermorésistance des souches est un atout dans leur utilisation sous forme d'inoculum dans le traitement par bactérisation des semences, des substrats de culture et du sol.

Pour le stress hydrique, une légère diminution dans les populations bactériennes a été enregistrée par rapport aux concentrations initiales (Figure IV.3); cependant, les densités bactériennes restaient assez élevées et dépassaient le seuil de 10³ ufc/ml.



Les mêmes lettres indiquent des traitements dont la différence n'est pas significative au risque d'erreur de 1 et de 5 %.
I: Ecart type avec $\alpha = 5\%$.

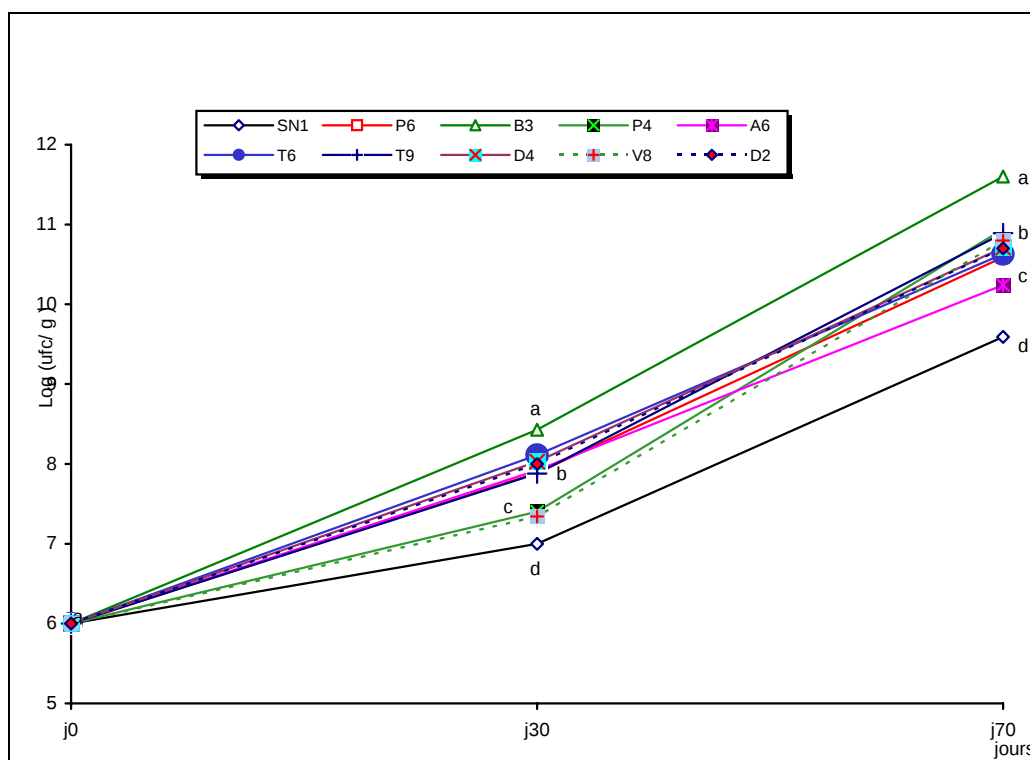
Figure IV.3 : Effet du stress hydrique sur les populations bactériennes

IV-3.4. COMPETITIVITE RHIZOSPHERIQUE

IV-3.4.1. COLONISATION DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE

Trente jours après la bactérisation des minitubercules, des accroissements notables en densités bactériennes ont été notés pour les dix souches testées (Figure IV.4), elles s'échelonnent entre 10^6 et 10^9 ufc/g de sol. Les densités moyennes enregistrées divisent les souches en quatre groupes selon la plus petite amplitude significative (test de Newman-Keuls avec un risque d'erreur de 1 %) :

- ✓ Le groupe (a) représenté par la souche B3 dont la croissance a dépassé la concentration de $2,69.10^8$ ufc/g de sol.
- ✓ Le groupe (b) formé de six souches dont les densités bactériennes varient entre $7,58.10^7$ et $1,2.10^8$ ufc/g de sol.
- ✓ Le groupe (c) constitué de deux souches, P4 et V8, avec une biomasse entre $2,1.10^7$ et $2,5.10^7$ ufc/g de sol.
- ✓ Le quatrième groupe (d) représenté par la souche SN1 avec une densité de colonisation de 10^7 ufc/g de sol.



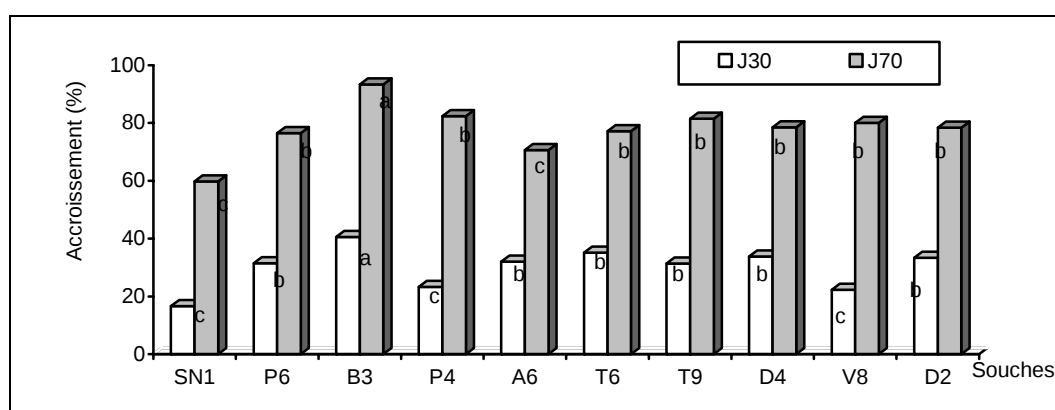
J30 : 30 jours, J70 : 70 jours
 Pour un même temps, les traitements portant la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil d'erreur $\alpha = 5\%$ et 1% .

Figure IV.4 : Densités bactériennes de colonisation des tubercules de pomme de terre

Les populations bactériennes se sont encore accrues après 70 jours de végétation (Figure IV.4), avec des concentrations microbiennes de l'ordre 10^9 à 10^{11} ufc/g de sol. L'analyse des biomasses moyennes, selon la plus petite amplitude significative (PPAS) du test de Newman-Keuls au risque d'erreur de 5 et de 1 %, a permis de grouper les souches :

- Les groupes (a) et (d) représentés par les souches B3 et SN1 ayant présentés respectivement la densité de colonisation maximale ($3.98.10^{11}$ ufc/g de sol) et minimale ($3.89.10^9$ ufc/g de sol).
- Le groupe (b) constitué de sept souches (A6, P6, V8, D4, D2, T6 et T9) présentant des densités de colonisation allant de $1,73.10^{10}$ à $7,76.10^{10}$ ufc/g.
- . La souche P4 a été classée séparément en groupe (c) avec une densité de $8,7.10^{10}$ ufc/g de sol.

L'accroissement des populations bactériennes traduisant un processus de colonisation étaient plus conséquent 70 jours après la bactérisation, en comparaison avec une durée de 30 jours. Même pour la souche SN1 qui a montré la densité de colonisation minimale, l'accroissement est passé de 16,67 % à 59,83 %. Pour les autres souches, les accroissements étaient entre 22,33 % à 40,50 % durant la première période et de 76,50 % à 93,33 % après 70 jours (figure IV.5).



J30 : 30 jours, J70 : 70 jours
 Pour un même temps, les traitements avec la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil d'erreur $\alpha = 5\%$ et 1%

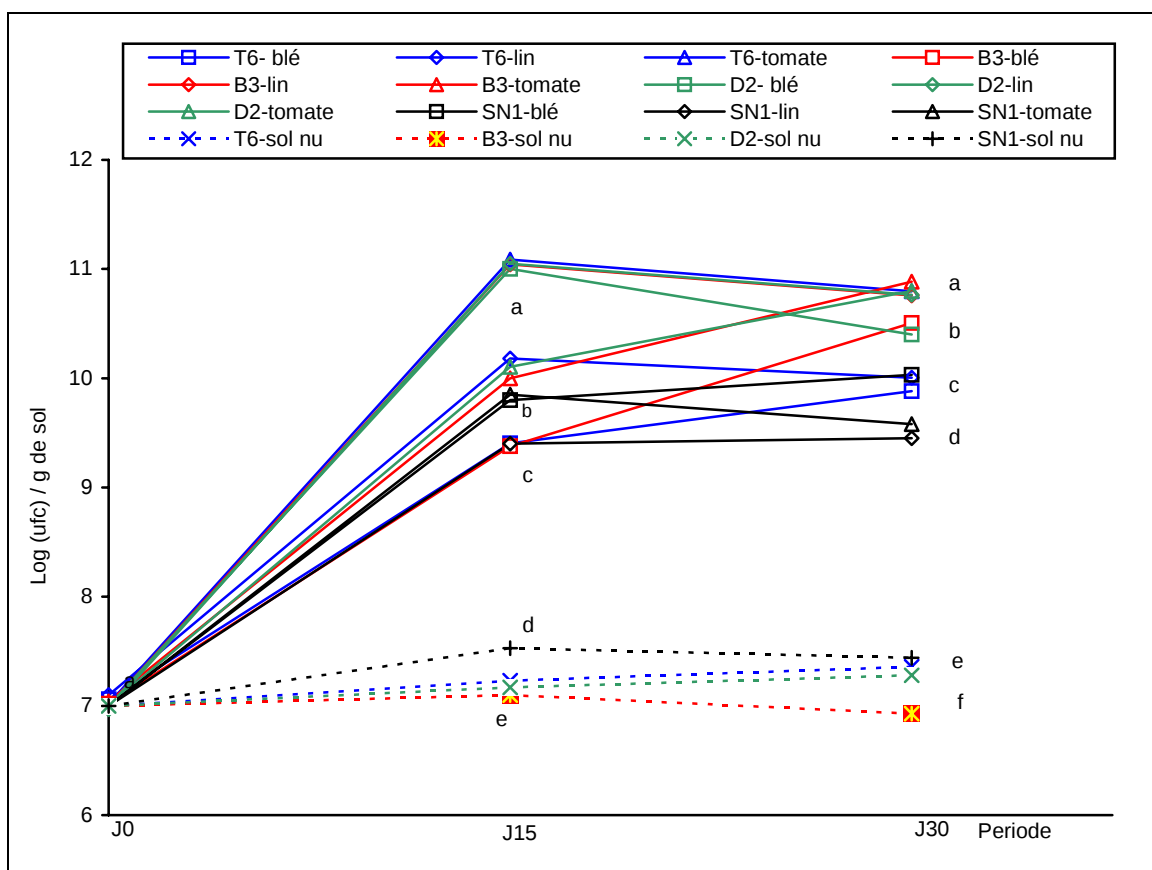
Figure IV.5 : Accroissement des densités bactériennes 30 et 70 jours après la bactérisation

IV-3.4.2. EFFET DE LA PLANTE

Durant les deux durées de 15 et de 30 jours, les densités bactériennes ont évolué très positivement comparées aux densités initiales, à la bactérisation des microcosmes (Figure IV.6).

Quinze jours après la bactérisation, les densités bactériennes ont atteint plus de 10^{11} ufc/g de sol pour les souches B3 et D2, T6 ainsi que D2 en contact respectivement des plantules de lin, de tomate et blé. Ces quatre types d'environnements spécifiques souche – plante ont formé le groupe d'interaction (a).

Dans les groupes d'interactions (b) et (c), on retrouve une densité de colonisation entre 10^9 à 10^{10} ufc/ g de sol, ils sont constitués par la moitié (8/16) des variantes souche-plante étudiées, qui sont les souches T6, B3 et SN1 avec le blé; SN1, B3 et D2 avec la tomate et enfin T6 et SN1 avec le lin.



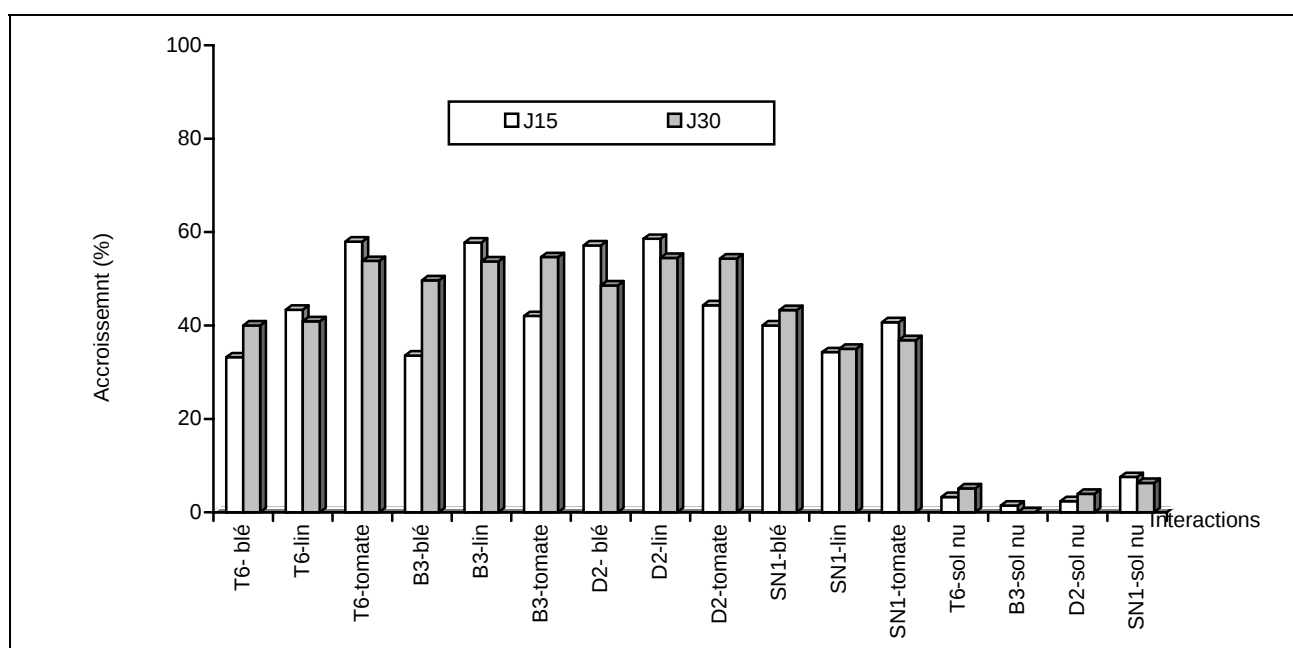
J0 : jour de la bactérisation, J15 : 15 jours, J30 : 30 jours
 Pour un même temps, les traitements avec la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil d'erreur $\alpha=5\%$ et 1%

Figure IV.6 : Effet de la plante sur la densité de colonisation rhizosphérique

Les groupes (d) et (e) sont représentés par la dynamique des souches en sol nu, le niveau de colonisation était inférieur à 10^8 ufc/g de sol.

Si d'une manière globale on a enregistré un accroissement de la population bactérienne; cependant, l'évolution entre 15 jours et 30 jours de végétation est variable selon le type d'interaction souche-plante. La population microbienne a régressé après 15 jours pour sept interactions, celles formant le groupe (a) et en partie le groupe (b). Par contre les interactions formées par les souches D2 et B3 avec les plantules de tomate et T6, B3 et SN1 avec celles de blé ont donné des densités de colonisation plus élevées à 30j.

Pour les traitements effectués sur des microcosmes de sol nu, on n'a pas noté de variations significatives entre les deux durées de végétation et même par rapport aux densités initiales à la bactérisation, à l'exemple de la souche B3 pour laquelle il a été noté une diminution de sa biomasse (1%) à 30 j après la bactérisation. Par ailleurs, cette souche a montré le taux d'accroissement le plus élevé (54, 62 %) après 30 jours de la bactérisation, dans les microcosmes de plantules de tomate (figure IV.7).



J15 : 15 jours, J30 : 30 jours

Figure IV.7 : Comparaison des taux d'accroissement de la densité de colonisation à J15 en J30

IV-3.4.3. EFFET DE PRODUCTION DE PYOVERDINES

Les souches de *Pseudomonas fluorescens* T9 et D2 productrices de sidérophores, notamment pyoverdiniques (pvd +), isolées des biotope de la tomate et du palmier dattier ont été testées quand à leur compétitivité rhizosphérique, par rapport à une souche témoin CHA400

déficiente en synthèse de pyoverdines (pvd-). Le sol des microcosmes a été enrichi en fer (FeCl_3) ou en EDTA à une concentration finale de 50 $\mu\text{g/g}$ de sol

Quinze jours après la bactérisation des microcosmes de plantules de tomate, les accroissements en densité bactérienne étaient globalement plus élevés par rapport aux densités initiales à la bactérisation (Figures IV.8 et IV.9). Les résultats ont permis de distinguer quatre groupes d'interactions (Figure IV.7) :

- Le groupe (a) formé par les interactions souche T6-sol et T6-sol+ FeCl_3 . Ce dernier est intermédiaire entre les groupes homogènes (a) et (b).
- Le groupe (b) constitué par les interactions (D2-sol + FeCl_3), (D2-sol), (D2-sol + FeCl_3), (CHA400- sol) et (CHA400- sol+ FeCl_3).
- L'interaction (T6 - sol + EDTA) est intermédiaire entre les groupes (a) et (b)
- Le groupe (c) représenté par l'interaction (CHA400-sol + EDTA).

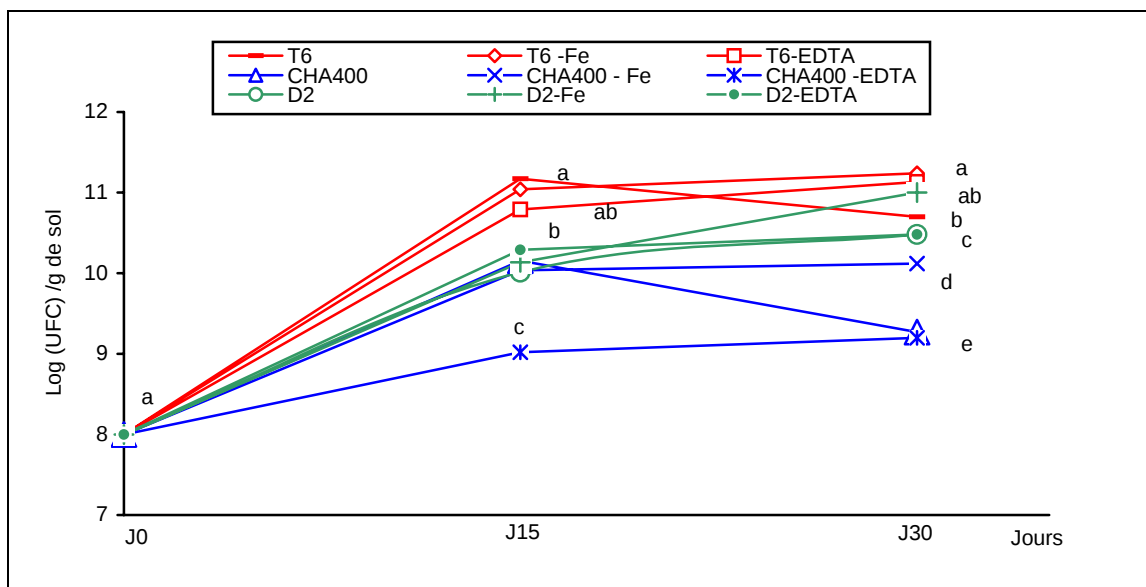
Les dénombrements bactériens effectués 30 j après la bactérisation ont montré

- ✓ des taux de croissance presque nuls pour les souches T6, CHA400 et D2 dans le sol amendé en EDTA, et pour les deux premières souches dans le sol amendé en FeCl_3 .
- ✓ Des taux de croissance significatifs, cependant avec un ralentissement par rapport à 15j, pour la souche D2 dans le sol non amendé et amendé en FeCl_3 .
- ✓ Des taux de croissance négatifs pour les souches T6 et CHA400 dans le sol non amendé.

L'analyse des interactions en fonction de leurs densités microbiennes finales a donné la répartition suivante :

- Les interactions (T6-sol+ FeCl_3) et (T6-sol + EDTA) constituent le groupe (a)
- Le groupe (b) est représenté par (T6- sol non amendé).
- l'interaction (D2-sol+ FeCl_3) est intermédiaire au plan densité de population entre les groupes (a) et (b).
- Le groupe (c) est formé de la souche D2 dans le sol amendé en EDTA ou en FeCl_3 .
- Le groupe (d) est représenté par la souche CHA400 dans le sol amendé en FeCl_3 .

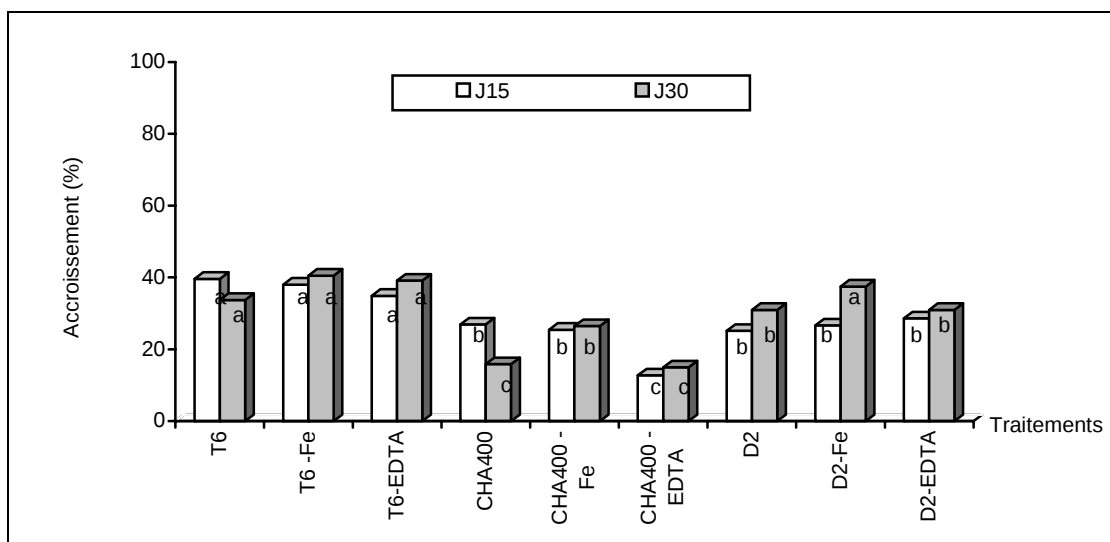
- Les interactions (CHA400- sol) et (CHA400- sol+ EDTA) forment le dernier groupe (e) dont les biomasses sont les plus faibles.



J0 : jour de la bactérisation, J15 : 15 jours, J30 : 30 jours

Pour un même temps, les traitements avec la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil d'erreur $\alpha=5\%$ et 1%

Figure IV.8 : Effet de l'addition du fer ou de l'EDTA sur la densité bactérienne dans les microcosmes



Pour un même temps, les traitements avec la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil d'erreur $\alpha=5\%$ et 1%

J15 : 15 jours, J30 : 30 jours

Figure IV.9 : Accroissements des densités bactériennes dans les microcosmes additionnés de Fer ou d'EDTA

IV-3.5. CONSERVATION DES INOCULUMS BACTERIENS

Les essais de conservation des inoculums des souches de *Pseudomonas fluorescens* T6, D2, et SN1, et de *Pseudomonas putida* B3 ont montré que les deux supports utilisés, la tourbe (naturelle) ou le méthyle-cellulose (synthétique), ont assuré une bonne conservation des microorganismes comme le révèle le taux de viabilité élevé après douze mois de conservation. Les densités bactériennes étaient relativement proches, ou même similaires, dans leur évolution durant les six périodes d'évaluation. (Figure IV.10).

Les cinétiques d'évolution de la biomasse bactérienne durant les 12 mois de conservation pour les quatre souches et avec les deux supports sont globalement analogues; la concentration microbienne chute brutalement à un mois d'environ 10 à 20 % de la concentration initiale, pour se stabiliser relativement jusqu'au 12^{ème} mois. Les biomasses finales se situaient entre 10^4 à 10^5 ufc/ g de substrat, correspondant à des taux de survie variant de 77,17 % à 85,79 % (Tableau IV.3).

Tableau IV.3 : Taux de survie des inoculums bactériens (%) *

Souches (support)	Durées de conservation					
	1 mois	2 mois	3 mois	6 mois	9 mois	12 mois
T6 (M)	80,83	82,17	79,33	76,83	73,5	70,67
T6 (T)	81,43	80,1	80,76	75,79	71,47	69,65
D2 (M)	78,7	75,04	74,71	72,55	73,38	74,71
D2 (T)	79,24	77,41	74,92	81,23	71,59	72,76
B3 (M)	79,83	82,31	77,02	69,75	72,89	71,9
B3 (T)	77,17	78,49	85,88	68,14	70,78	73,24
SN1 (M)	79,42	76,02	71,77	71,77	72,12	73,98
SN1 (T)	85,79	73,77	73,27	73,6	74,281	75,47

Pour une même période, les différences n'ont pas été significatives (aux risques d'erreur 1 et 5 %).

Support : (T) = Tourbe, (M) = Méthyle cellulose

* : Le pourcentage de survie est déterminé par le rapport densité microbienne à chaque période sur la densité initiale appliquée.

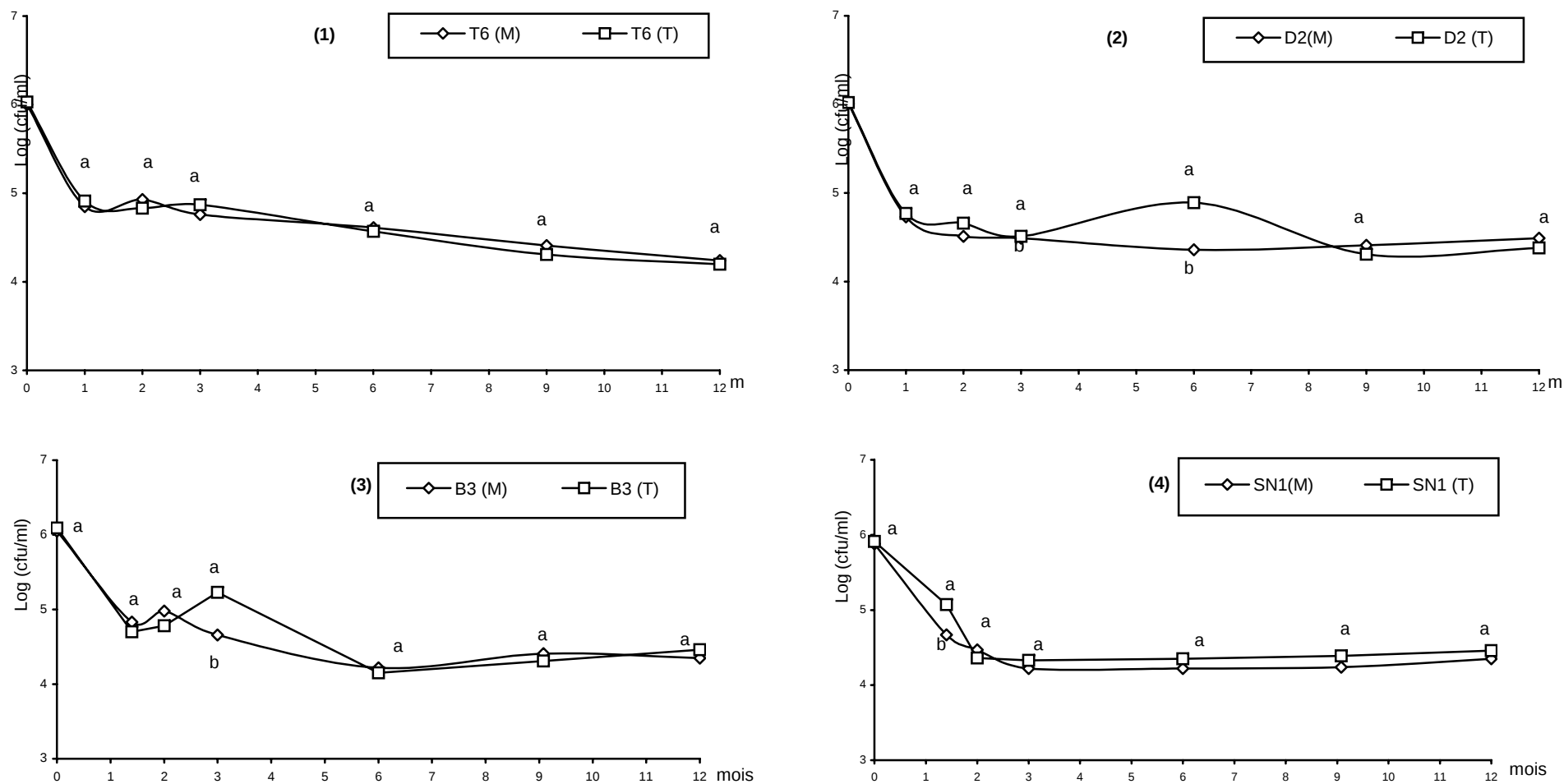


Figure IV.10 : Survie des souches bactériennes dans les préparations d'inoculum à base de tourbe (T) ou de méthyle cellulose (M)

Pour un même temps, les traitements avec la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil d'erreur $\alpha = 5\%$ et 1%

(1): souche *P. fluorescens* P6, (2) : souche *P. fluorescens* D2, (3) : souche *P. putida*, B3, (4) : souche *P. fluorescens* SN1.

IV-4. DISCUSSION

Nos souches ont montré une halotolérance appréciable, surtout si l'on tient compte de l'importance des exigences en eau libre des *Pseudomonas*, ainsi qu'une résistance de haut niveau aux 3 antibiotiques testés. La résistance à de telles conditions, hostiles à la croissance et défavorables à la colonisation, peut constituer des avantages écologiques dans la compétition et la sélection de microorganismes.

La concentration des sels peut être élevée dans les sols irrigués, surtout en situation de mauvais drainage ou de sols lourds et les échanges ioniques sont intenses entre les racines, le sol et la microflore tellurique ; ainsi, l'accumulation de sels peut exercer un effet sélectif positif sur les microorganismes halotolérants.

De nombreux travaux ont signalé des fréquences élevées de souches bactériennes rhizosphériques résistantes à divers antibiotiques. Les travaux de Digat et Gardan (1987), réalisés sur 252 souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *P. putida* ont révélé des fréquences de résistance de 92,4 % vis à vis du chloramphénicol et de 54,59 % vis-à-vis de l'acide nalidixique. Avec les sulfamides, les β -lactamines et la clindamycine, les fréquences de souches résistantes ont dépassé le seuil de 90 %. Alvarez *et al.*, (1995) ont montré sur une collection de bactéries de la rhizosphère de tomate que 68 % des souches étaient résistantes à la streptomycine (100 μ g/ml), 44,90 % au chloramphénicol et 90,48 % à l'oxytétracycline. La fréquence de souches résistantes aux antibiotiques est élevée parmi les souches rhizosphériques par rapport à celles du sol non cultivé (Gilbert *et al.*, 1993). La résistance aux concentrations élevées d'antibiotiques a été corrélée chez les rhizobactéries à la survie et l'adaptation des inoculums microbiens aux conditions de la rhizosphère (Döbereiner et Baldani, 1979).

Les taux de croissance enregistrés pour les dix souches testées sont relativement faibles si on se réfère à la vigueur physiologique et aux capacités métaboliques reconnus chez le genre *Pseudomonas*, cependant ces résultats peuvent s'expliquer par le milieu de culture utilisé relativement peu riche et la nature spécifique des rhizobactéries. De nombreux travaux ont montré que les souches de *Pseudomonas fluorescens* se caractérisent par un temps de génération très court en comparaison avec d'autres genres bactériens (*Bacillus*, *Agrobacterium* et *Erwinia*) (Scher *et al.*, 1988 ; Parke, 1990). Les temps de génération observés dans les milieux de culture sont souvent plus courts que ceux *in situ* dans le sol. Scher *et al.*, (1988) ont enregistré *in vitro* des temps de génération allant de 0,8 à 3,7 heures, alors que *in situ*, ils sont en moyenne de 5,2 heures. Même si l'extrapolation du temps de génération enregistré *in vitro* à celui dans rhizosphère ne semble donc

pas évident, néanmoins la croissance *in vitro* reste dans une certaine mesure représentative du comportement de la souche bactérienne *in situ*

Le temps de génération d'une souche est significatif de sa capacité de multiplication et donc de sa vigueur physiologique, il conditionne les chances de colonisation et de compétitivité au site (Digat et Gardan (1987). En présence de facteurs sélectifs notamment toxiques, la capacité de croissance, donc la taille de la population microbienne, peut constituer un avantage, entre autres par le phénomène « de dépassement » des concentrations de l'agent sélectif. Par ailleurs, la répartition spatiale est un des paramètres régissant les interactions entre les groupes de microorganismes et conditionnant donc la compétitivité dans la rhizosphère.

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). Les souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *P. putida* sont isolées dans différentes contrées géographiques et sont caractérisées par une grande variabilité. Au delà de 30° C, les fonctions physiologiques des *Pseudomonas* peuvent être affectées (Digat, 1992), notamment dans leur aptitude à la synthèse des métabolites secondaires. Les températures élevées peuvent donc affecter *in situ* les populations microbiennes et leurs activités physiologiques. Certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* soumises à des températures supérieures à 33 °C sont inhibées dans la production du pigment fluorescent et des sidérophores (Loper et Schroth, 1986). Il faut noter que dans les régions tropicales et tempérées, des températures avoisinant 33° C sont fréquemment atteintes au niveau des couches superficielles du sol et durant plusieurs heures dans les conditions de culture sous serre. De telles températures sont souvent dépassées dans les palmeraies (palmier dattier) et les cultures maraîchères conduites sous abris en plastique.

Il a été mis en évidence, *in vitro*, une corrélation entre l'origine géographique des souches et leur optimum de température ainsi que leur thermorésistance. Ainsi, des souches d'origine tropicale se développent normalement à 35 °C et produisent des sidérophores, alors que les souches de région tempérée n'ont pas ces facultés à cette température (Digat, 1992). Le taux d'humidité conditionne l'établissement, la délivrance et la dynamique des populations rhizobactériennes entourant les semences au niveau de la rhizosphère (Digat, 1991).

Les souches résistantes au stress ne subissent pas de déclin important en population lors de leur conservation ou leur conditionnement dans des préparations sous forme d'inoculums (Digat 1991). Scher *et al.*, (1988) ont considéré qu'une densité de 5.10^3 cellules bactériennes par gramme de racine ou plus était un niveau de colonisation important. Selon Digat (1991), le seuil de

colonisation permettant d'obtenir des effets de biostimulation est environ de l'ordre de 10^4 cellules bactériennes par centimètre de racine pour un système racinaire développé et de 10^3 cellules bactériennes par centimètre de racine pour des jeunes radicules. Ces accroissements peuvent s'expliquer par l'augmentation de la surface générée par le développement des tubercules et par conséquent l'augmentation du volume des échanges entre les rhizobactéries et la plante ainsi que de l'espace vital.

Dans les conditions gnotobiotiques, le niveau de colonisation atteint par la souche SN1 isolée de sol non cultivé était déjà considérable, bien qu'il se situait en deçà du niveau enregistrée pour les souches isolées de biotopes rhizosphériques, ceci traduit bien l'adaptation aux conditions rhizosphériques acquise par sélection par ces souches. Ces résultats mettent en évidence l'effet plante sur l'évolution de la population microbienne dans la rhizosphère. Les propriétés phénotypiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents associés aux racines du lin et de tomate ont été trouvées différentes de celles des souches isolées d'un sol non cultivé (Clays Josserand *et al* ; 1995). La nature du biotope d'origine des souches n'a pas eu d'impact sur leur aptitude à la colonisation, à l'exemple de la souche B3 isolée du biotope céréaliier qui a montré le niveau de colonisation le plus élevé, dépassant même ceux enregistrés par les souches (P4 et P6) issues du biotope de pomme de terre.

Dans les conditions de microcosmes, en comparant d'une manière générale les dénombrements après 15 et 30 jours, on peut conclure que les souches bactériennes sont plus actives entre J0 et J15. Le ralentissement, parfois la régression, observé entre J15 et J30 peut indiquer une occupation spatiale maximale. La multiplication et la survie bactérienne sont régies et régulées par l'espace rhizosphérique et la quantité et la qualité des éléments nutritifs disponibles. Cette survie et d'autant meilleure que la biomasse microbienne est limitée (Compeau *et al.*, 1988; Davies et Whiterbread, 1989; Morel *et al* ; 1989) et que la quantité de nutriments est importante (Wessendorf et Lingens, 1989).

Quelque soit la souche étudiée et son origine (rhizosphères de blé, de tomate, de palmier dattier ou de sol nu), on a noté une bonne adaptation (densité de population) aux différents environnements testés, qui signifie une bonne colonisation racinaire. Scher *et al.*, (1984) ont rapporté que le seuil de 5.10^3 ufc / g de sol constitue un bon indice de colonisation racinaire, par conséquent, avec 10^{11} cfu / g de sol, nos souches sont très performantes.

Il est bien connu que la colonisation racinaire est une étape cruciale et critique dans l'utilisation des rhizobactéries en lutte biologique. Une meilleure compréhension du processus de

colonisation racinaire est indispensable pour sélectionner ou construire des mutants efficaces en lutte biologique adaptés à des conditions environnementales variées. La connaissance des mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents permettrait de préciser les conditions favorables à leur expression ; ces conditions sont liées aux caractéristiques intrinsèques des souches et à l'environnement traité (Lemanceau, 1992).

Les fluctuations des densités de population observées entre les différents modèles d'interactions peuvent être liées à la capacité d'accueil de la rhizosphère; Le sol et la plante ont un effet sur la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Latour *et al.*, 1996). Les rhizodépôts représentent la source principale de carbone dans la rhizosphère, elles joueraient donc un rôle important dans l'établissement et l'efficacité antagoniste et promotrice de croissance des rhizobactéries (Beniziri *et al.*, 2002). La nature qualitative et quantitative des exsudats racinaires peut varier en fonction de l'espèce végétale et même du cultivar (Van Overbeek et Elsas, 1995) et leur disponibilité est tributaire de la nature du sol. De plus, les rhizobactéries présentent intrinsèquement des aptitudes compétitrices variables (Lemanceau., 1992).

Nos résultats ont montré que l'amendement du sol en FeCl_3 , n'a pas influé notablement sur les populations de nos souches productrices de sidérophores pyoverdiniques (pvd+) et CHA400 (pvd-) ; Donc, l'aptitude à la synthèse des sidérophores n'a pas eu d'influence sur la croissance bactérienne. En effet, la production de sidérophores étant une propriété inductible par des conditions de carence en ions ferriques, la présence de cet ion en concentration normalisée dans le sol non amendé (Annexe IV.1) et en excès par ajout de FeCl_3 a agi comme un régulateur négatif.

Dans le sol appauvri en ions ferriques par leur séquestration par l'EDTA, on a observé une différence notable entre la croissance plus élevée des souches (pvd +) et celle moindre de CHA400 (pvd-), bien illustrée dans la figure (IV.7) où on remarque que l'interaction (CHA400- Sol + EDTA) représentant les groupes (c) à 15j et (e) à 30j se démarque nettement des autres interactions. Ceci permet de relever que dans les conditions de contrainte nutritionnelle en fer, les sidérophores peuvent conférer un certain avantage compétitif pour les souches qui les produisent ; cet avantage est amplifié dans l'environnement rhizosphérique, complexe dans sa composition et ses interactions, pour se traduire en terme d'antagonisme.

Il faut cependant noter que dans les trois situations de sol non amendé ou amendé en FeCl_3 ou EDTA, le niveau de croissance du mutant CHA400 (pvd-) reste appréciable par rapport à ce qui est admis comme densité de colonisation. Ceci peut être inhérent au fait que la souche mutée est inoculée seule et donc ne subit pas de pression compétitive de la part d'une souche (pvd +), et

aussi au fait que les *Pseudomonas* peuvent développer des mécanismes secondaires de captation et d'assimilation du fer. Mossialos *et al.*, (2000) ont montré que des mutants de *Pseudomonas fluorescens* déficients en production de pyoverdines ont pu croître dans un milieu carencé en fer grâce à la production d'un sidérophore nommé quinolobactine, ce dernier possédant néanmoins une affinité pour le fer inférieure à celle des pyoverdines.

Par ailleurs, Duffy et Défago, (2000), ont montré que des mutants de la souche CHA0 produisent, en cas de carence en fer, dix fois plus de pyochelines que la souche sauvage. La production de pyoverdines n'est pas dépendante seulement de la concentration en fer, elle est aussi régulée par la voie de synthèse d'autres métabolites secondaires (Duffy et Defago, 2000; Kinscherf et Willis, 2002; Sanchez-Contreras *et al.*, 2002).

Les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le biocontrôle et la biostimulation de la croissance des plantes, ont été largement démontrés particulièrement en conditions contrôlées, les essais en conditions agronomiques ne présentent pas la même efficacité, stabilité et régularité dans les résultats. Une des principales entraves recensées se situe dans la difficulté de criblage de souches stables lors de l'élaboration des formulations et leur application (Paau, 1989; Bowen et Rovira, 1999; Nelson, 2004).

Nos résultats permettent néanmoins de conclure que la tourbe et le méthyle cellulose possèdent des qualités indéniables de conservation des microorganismes au moins à moyen terme, ils peuvent donc être préconisés comme supports dans la formulation des inoculums de souches antagonistes de *Pseudomonas* en vue de leur utilisation en lutte biologique. Dans ce sens, l'efficacité de ces supports inertes a été aussi signalée par Sulslow et Schroth, (1982) et Digat, (1992). Nos résultats sont comparables à ceux de Paau *et al.*, (1991) sur le méthyle cellulose qui rapportent des densités de 10^5 à 10^6 ufc de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* par gramme de support, après dix mois de stockage ; tandis que sur le disulfide de molybdène (MoS_2), en granulés ou en poudre, les densités étaient nettement plus élevées, de l'ordre de 10^7 à 10^8 ufc/g, après 11 mois de conservation.

Bien la capacité de survie, la dynamique de croissance et le pouvoir de colonisation de nos souches semblent prometteurs; cependant, il est difficile d'extrapoler nos résultats obtenus dans des conditions expérimentales (microcosmes, gnotobiotiques...) aux conditions naturelles, car elles ne reflètent pas forcément la vraie complexité de la rhizosphère.

IV-5. CONCLUSION

La compétence rhizosphérique des *Pseudomonas* spp. fluorescents dépend de leurs caractéristiques intrinsèques donc génotypiques et des conditions rhizosphériques. Ces dernières sont déterminées par le sol, la plante et la flore tellurique.

La pression écologique, toxique et trophique, au niveau de la rhizosphère détermine l'équilibre microbien par sélection et adaptation. Ainsi, les résistances aux substances toxiques, à la pression osmotique, aux stress thermique et hydrique sont déterminantes pour la survie et la propagation de souches microbiennes dans le sol; dans ce sens elles constituent des paramètres de criblage pour la sélection de souches antagonistes susceptibles d'être utilisées en lutte biologique. Nos souches ont montré des aptitudes à tolérer largement des concentrations en sel solubilisé (3 à 4%) rencontrées dans les sols cultivées, leur résistance élevée aux antibiotiques augure de leur tolérance générale des substances antibactériennes et enfin, leur taux de croissance et leur résistance aux stress thermique et hydrique appréciables confèrent à nos souches des qualités d'antagonistes potentiels.

La compétence rhizosphérique, c'est-à-dire le pouvoir d'adaptation et de colonisation de l'espace rhizosphérique par les souches de *Pseudomonas* a été investiguée par l'étude de la dynamique des souches dans des sols nus et des sols contenant des tubercules ou des plantes herbacées (pomme de terre, lin, tomate et blé) (microcosmes). Les densités microbiennes déterminées à différents temps de végétation ont mis évidence une multiplication des souches *in situ*, traduisant un pouvoir potentiel de colonisation des souches, indépendamment de la nature de leur biotope d'origine. L'effet positif de la plante par rapport au sol nu sur l'évolution des populations bactériennes a été constaté. Les pyoverdines joueraient un rôle, au moins partiel, dans la compétition rhizosphérique, dans les situations de carence nutritionnelle en fer.

L'utilisation agronomique des souches comme biopesticides nécessite des procédés de conservation et stabilisation des souches, au moins à moyen terme et leur protection du stress environnemental au contact du sol ; ainsi, les inoculums de souches antagonistes sont formulés avec un support organique ou minéral protecteur. Dans ce sens, notre étude a montré la performance de deux adjuvants, le méthyle cellulose et la tourbe, dans la préservation des populations bactériennes.

V-1. INTRODUCTION

Dans la rhizosphère, les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont associés à diverses populations microbiennes saprophytes et/ou parasites des plantes avec lesquelles ils interagissent, à l'exemple de *Rhizoctonia* DC., *Pythium* Pringsh., *Alternaria* Nees., *Verticillium* Nees. et *Fusarium* Link., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Ralstonia solanacearum*.

L'espèce *Fusarium oxysporum* Schltdl. qui est souvent dominante au sein des populations fusariennes du sol a été beaucoup utilisée comme modèle d'étude dans les interactions de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Cette espèce comporte diverses formes spéciales adaptées à des espèces végétales pour lesquelles elles sont pathogènes, causant les fusarioses vasculaires qui engendrent souvent des pertes considérables (Sneh *et al.*, 1984). Les fusarioses vasculaires constituent des maladies redoutables qui affectent des plantes de différentes familles botaniques à l'exemple de la tomate, du lin et du palmier dattier. La lutte contre certaines fusarioses vasculaires, comme celles causées par *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* W.C. Snyder et H.N. Hansen, *F. oxysporum* f.sp. *lini* (Bolley) W.C. Snyder et H.N. Hansen et *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* W.L. Gordon, n'est pas toujours aisée. La nature systémique et le caractère infectieux et épidémique des fusarioses vasculaires limitent les possibilités de prévention et de la lutte conventionnelle contre ces maladies (Alabouvette *et al.*, 1996; De Boer *et al.*, 1997; Alabouvette *et al.*, 1998; Chin-A-Woeng *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2003). L'utilisation de fongicides systémiques reste cependant le moyen le plus utilisé et ce, malgré le risque d'apparition de souches résistantes.

Bien que rencontrés souvent comme agents de pourritures racinaires, les pythiums sont unanimement reconnus comme de redoutables agents de fontes de semis, maladies à extension rapide. Ces agents fongiques s'attaquent particulièrement aux tissus jeunes (radicelles, bourgeons, cambium et collet des plantules). La maladie commence par l'infection de l'embryon de la graine suivie par l'infection racinaire (Becker et Cook, 1988; Pierson et Weller, 1994). Chez les plantes, la progression du champignon se fait à la fois de façon inter et intracellulaire, les cellules atteintes se lysent rapidement. La colonisation par le champignon est limitée aux cellules sans paroi, cette dernière représentant un obstacle pour le champignon. Dans les racines de plantules, le champignon progresse rapidement et au bout de quelques jours, le système racinaire est totalement détruit. Le mycélium remonte dans la tige en provoquant un rétrécissement du collet, ce qui provoque la mort rapide de la plantule. Les dégâts sont économiquement très importants sur les cultures céréalières, maraîchères, horticoles et en pépinière forestière. Les dégâts causés par les pythiacées constituent un problème chronique en particulier pour la culture de blé et d'une

manière générale pour les grandes cultures. Les fontes de semis constituent un facteur limitant des cultures dans plusieurs régions du monde à vocation céréalière (Gurusiddaiah, *et al.*, 1986; Elad et Chet, 1987; Kraus et Loper, 1991; Zhou et Paulitz, 1994; Beyeler *et al.*, 1999).

Le chancre bactérien de la tomate, causé par *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, est une bactériose systémique, avec son aspect maladif ressemblant à la fusariose et à la verticilliose vasculaires, elle est difficilement détectable et par conséquent difficile à contrôler. Le caractère épidémique de cette bactériose et sa nature systémique limitent les possibilités de lutte chimique, surtout en l'absence de cultivars réellement résistants (Trigalet, 1972; Benchabane *et al.*, 2000b).

La lutte microbiologique contre *F. oxysporum*, faisant appel au pouvoir antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents, a fait l'objet de nombreuses recherches réalisées dans des conditions contrôlées ou naturelles. (Alabouvette *et al.*, 1980; Kloepper *et al.*, 1980b; Scher et Baker, 1982; Shneider, 1984; Lemanceau, 1988; Défago *et al.*, 1990; Lemanceau et Alabouvette, 1991; Lemanceau et Alabouvette, 1993; Alabouvette *et al.*, 1993; Duijff *et al.*, 1993; Lemanceau *et al.*, 1993; Duijff *et al.*, 1994b; Raaijmakers, 1994; M'Piga *et al.*, 1997; Alabouvette *et al.*, 1998; Larkin *et al.*, 1998; Mercado-Banco *et al.*, 1998; Benchabane *et al.*, 2000a, Bakker *et al.*, 2002 a; Bakker *et al.*, 2003). Outre les propriétés d'antibiose et de compétition trophique reconnues chez ces rhizobactéries, il a été mis en évidence chez des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents la capacité d'induction systémique de résistance (ISR) chez la plante, lui assurant une protection contre un large spectre d'agents phytopathogènes (Hoffland *et al.*, 1996b; Hoffland *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998; Knoester *et al.*, 1998; Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Pieterse *et al.*, 2001; Lugtenberg *et al.*, 2001; De Boer *et al.*, 2003; Pieterse *et al.*, 2003; Menke *et al.*, 2004; Pieterse et Van Loon, 2004). Ce mécanisme d'action semble assurer une bioprotection large et non spécifique.

Le travail de ce chapitre a porté sur l'étude du pouvoir antagoniste de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de trois formes spéciales de *F. oxysporum* et de *Pythium ultimum*, *in vitro* et *in situ*. Nous avons testé aussi la capacité de deux souches de *Pseudomonas fluorescens* d'induire une résistance systémique (ISR) chez la tomate vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Le troisième type d'expérimentations a consisté en l'évaluation de la réceptivité d'un sol à la fusariose du lin causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* en présence de deux souches de *Pseudomonas fluorescens*, en d'autres termes l'aptitude du sol à développer une résistance à cette maladie.

V-2. MATERIELS ET METHODES

V-2.1. PRESENTATION DES ESSAIS

La finalité des essais a été de tester l'efficacité de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le contrôle biologique de deux espèces cryptogamiques telluriques, *Fusarium oxysporum* et *Pythium ultimum*, responsables respectivement des fusarioses vasculaires et de fontes de semis (Tableau V.2). A cet effet, on a réalisé des essais d'antagonisme *in vitro* et *in situ*. Les souches de *Pseudomonas* testées ont été retenues sur la base de leurs aptitudes à produire des métabolites secondaires et leur compétence rhizosphérique (Tableau V.1).

Tableau V.1 : Origine des souches de *Pseudomonas fluorescens* testées

Souches	Origine d'isolement	Observations
P6	Rhizosphère de pomme de terre (Algérie)	Pvd +, HCN+, AIA +, Phos +, phz +, NaCl (4 %),
B3	Rhizosphère de blé dur (Algérie)	Pvd +, HCN+, AIA -, Phos +, phz +, NaCl (4 %),
T9	Rhizosphère de tomate (Algérie)	Pvd +, HCN-, AIA +, Phos -, phz +, NaCl (4 %),
SN1	Sol non cultivé (Algérie)	Pvd +, HCN-, AIA -, Phos -, phz -, NaCl (4 %),
D2	Rhizosphère de palmier dattier (Algérie)	Pvd +, HCN+, AIA -, Phos +, phz +, NaCl (4 %),
CHA0	Rhizosphère de tabac (Suisse)	Souche de référence dans le biocontrôle, synthétise divers métabolites secondaires. (Keel et al., 1991)
CHA400	-	mutant de CHA0 déficient pour la synthèse de pyoverdines (pvd -)
C7R12	Rhizosphère de lin (France)	Souche de référence dans le biocontrôle, résistante à la rifampicine (rif +) (Lemanceau et al., 1997)

Pvd : pyoverdines, HCN: cyanide d'hydrogène, AIA: acide indole acétique, Phos: Phosphatase, phz: phénazines, NaCl : chlorure de sodium

Tableau V.2 : Origine des Isolats fongiques phytopathogènes

Isolats fongiques	Plante hôte	Origine géographique
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i> (Foln)	Lin	Dijon (France)
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	Tomate	Dijon (France)
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> (Foa)	Palmier dattier	Ghardaïa (Algérie)
<i>Pythium ultimum</i> (Pu)	Céréales	Mitidja (Algérie)

Les expérimentations réalisées sont :

- ✓ L'activité d'antagonisme *in vitro*
- ✓ L'activité d'antagonisme *in planta*
- ✓ L'induction systémique de la résistance (ISR) chez la tomate vis à vis de *F. o f.sp. lycopersici* et de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- ✓ La réceptivité du sol à *F. o f.sp. lini*

V-2.2 ANTAGONISME *in vitro*

V.2.2.1. INHIBITION DE LA CROISSANCE MYCELIENNE

Le pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* a été testé par l'inhibition de la croissance mycélienne d'isolats cryptogamiques en milieux de culture solides. Quatre isolats cryptogamiques ont été utilisés, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (**Fol**), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (**Foln**), *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (**Foa**) responsables des fusarioses vasculaire de la tomate, du lin et du palmier dattier et *Pythium ultimum* (**Pu**), agent polyphage de fonte de semis et de nécroses racinaires.

La pureté des isolats fongiques a été vérifiée après repiquage sur milieu gélosé PDA (caractères cultureux) (Annexe I.1) et par observations microscopiques des microconidies et des macroconidies (caractères micromorphologiques).

Les tests d'antagonisme ont été réalisés sur les milieux de culture KB, PDA et KB+ PDA (Annexe 1) selon la méthode de Becker et Cook (1988). Des disques (5 mm de diamètre) de papier Whatman, tapissés d'une crème bactérienne d'une culture de 24 heures en milieu solide, ont été déposés à la périphérie de la boîte Pétri contenant le milieu de culture. Après 24 heures d'incubation à 25°C, une pastille "milieu solide" de 5 mm de diamètre de l'isolat fongique pathogène a été déposée au centre de la boîte. Cet essai a été réalisé en deux étapes :

- (i) Une première étape préliminaire où l'isolat fongique a été confronté aux quatre souches de *Pseudomonas* en même temps, les observations ont porté sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne;
- (ii) Dans la deuxième étape, chaque souche bactérienne ayant montré une activité antagoniste notable a été confrontée seule avec l'isolat fongique, dans une disposition en deux spots bactériens aux extrémités opposées de la boîte et l'isolat fongique au centre. La lecture portant sur la présence ou l'absence d'une activité antagoniste a été faite après 8 jours d'incubation à 25°C, la comparaison a été faite avec des cultures témoins ne contenant que l'agent fongique. La croissance mycélienne a été estimée par la mesure du diamètre moyen de la colonie fongique.

V.2.2.2. INHIBITION DE LA GERMINATION CONIDIENNE ET DE L'ELONGATION DU TUBE GERMINATIF

Les suspensions conidiennes ont été obtenues par la technique de Scher et Baker, (1982). A partir de cultures fongiques de 7 jours, des pastilles de 5 mm de diamètre ont été transférées dans 100 ml du milieu liquide PD (Potato Dextrose) (Annexe I.1) incubé 15 à 20 jours à 25°C sous agitation continue (50 rpm). Le milieu liquide est ensuite filtré pour éliminer les amas mycéliens et la présence de conidies a été vérifiée dans les filtrats de culture.

La concentration des suspensions conidiennes a été ajustée, à l'aide d'un hématimètre de Mallassez, à 10^6 conidies/ml. Les suspensions bactériennes dans l'eau distillée stérile ont été préparées à partir de cultures de 24 h à 25 °C sur milieu KB. La densité bactérienne a été ajustée à 10^6 ufc/m ($\lambda = 620$ nm).

Les interactions bactéries-conidies ont été testées dans des tubes à essai (8 ml) contenant un milieu liquide (PD, KB ou KB + PD). Un ml de suspension bactérienne a servi àensemencer le milieu et après 6 h d'incubation à 25°C, le même volume de suspension conidienne a été additionné au tube. Des témoins sans bactéries ont été préparés de la même manière. Pour chaque interaction bactéries-conidies dans un des milieux de culture, trois répétitions ont été réalisées. Après une incubation de 18 h à 25 °C, le taux de germination a été noté, il correspond au rapport entre le nombre de conidies germées sur le nombre total de conidies observées.

La mesure de la longueur des tubes germinatifs issus des conidies a été effectuée, à l'aide d'un microscope étalonné, durant les essais précédents d'inhibition de la germination conidienne.

V-2.3. ANTAGONISME *in planta*

Les essais d'antagonisme *in situ* (biocontrôle) ont été réalisés avec les plantes hôtes respectives des agents fongiques utilisés : la tomate, le lin, le palmier dattier et le blé pour respectivement *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Pythium ultimum*.

Les essais en conditions gnotobiotiques, substrats stérilisés (sol + tourbe), ont été réalisés avec les quatre plantes hôtes, tandis que les essais en sols naturels (conditions non gnotobiotiques) ont été conduits seulement avec la tomate.

V.2.3.1. FONTE DE SEMIS SUR BLE DUR

Une suspension conidienne de l'isolat fongique *P. ultimum* (**Pu**) a été préparée à partir d'une culture de 8 jours sur milieu PDA. L'inoculation du sol a été faite à une concentration conidienne finale de 10^6 conidies / g de sol.

Les semences de blé dur (var. waha) ont été désinfectées à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (10 %, 20 min), suivi de cinq lavages consécutifs avec de l'eau distillée stérile.

Les grains ont été déposés dans la suspension bactérienne (10^6 ufc/ml) pendant 20 minutes et semés dans des terrines (0,5m x 0,75m x 0,2 m) contenant un substrat désinfecté (tourbe + sol; 1/3 - 2/3), à raison de 60 grains par terrine. L'infestation par l'isolat fongique a été effectuée 24 h après la bactérisation, à la concentration finale de 10^7 conidies/g de substrat. Le témoin positif a été seulement infesté et le témoin négatif n'a pas été traité.

Un dispositif expérimental en quatre blocs aléatoires complets a été adopté. Chaque bloc a été représenté par 6 terrines pour chaque souche de *Pseudomonas* testée.

Les mêmes paramètres d'évolution de la maladie que ceux utilisés dans l'étude des fusarioses de la tomate et du lin, à savoir le taux d'infection (**I** %) et la sévérité de la maladie (**S** %), ont été adoptés, avec une échelle de symptômes spécifiques à la fonte de semis :

- 0 : Pas de symptômes
- 1 : Jaunissement des extrémités foliaires
- 2 : Perte de turgescence
- 3 : Brunissement des racines
- 4 : Fonte ou pourriture

Pour estimer le nombre de plants malades, un comptage régulier a été effectué pendant 30 jours. Le plant a été considéré malade s'il présente le degré 2 ou plus de l'échelle d'évaluation des symptômes spécifiques de la maladie (Becker et Cook, 1988).

V.2.3.2. FUSARIOSES VASCULAIRES DE LA TOMATE ET DU LIN

V.2.3.2.1 Conditions gnotobiotiques

Les semences de tomate et de lin ont été désinfectées à l'aide de l'eau javellisée (6° à 20 min), ensuite elles ont été rincées à l'eau distillée stérile et mises à sécher avant d'être semées dans des pots contenant le substrat stérilisé (sol + tourbe). Les pots ensemencés ont été déposés sous serre en verre et arrosés quotidiennement avec de l'eau stérile. Après trois semaines, les plantules de tomate et de lin ont été bactérisés en versant autour des racines la suspension bactérienne de

Pseudomonas (10^7 ufc/ g de substrat). Les suspensions bactérienne ont été préparées dans une solution tampon ($\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7) à partir d'une culture de 24 heures sur milieu KB.

Les suspensions conidiennes de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* dans le tampon ($\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7) ont été préparées à partir de cultures fongiques âgées de 8 jours sur milieu PDA. L'isolat fongique a été inoculé 24 h après la bactérisation, au même site et à la concentration finale de 10^7 conidies/g de substrat.

Chaque essai comprend un dispositif expérimental en quatre blocs aléatoires complets. Chaque traitement a concerné 100 plants, soit 25 plants par bloc .

V.2.3.2.2 Conditions non gnotobiotiques

Dans cet essai, les interactions (bactéries antagonistes - agent fusarien) ont été réalisées dans des substrats (sol naturel + tourbe stérile), dans le but d'étudier l'impact de la flore indigène du sol sur les activités antagonistes des souches bactériennes testées. La bactérisation et l'infestation par l'agent fongique ont été effectuées dans les mêmes conditions que les essais gnotobiotiques décrits précédemment.

La mise en évidence de la présence de nos souches de *Pseudomonas* dans le sol naturel, notamment en fin d'essai, implique leur sélection par rapport aux microorganismes indigènes. A cet effet, des mutants de ces souches résistants à la rifampicine ont été construits par sélection en présence de l'antibiotique.

Les techniques décrites par Latour (1996) et Delorme (2002) ont été appliquées pour l'obtention et la sélection de mutants résistants à la rifampicine. A partir de cultures de 24 h sur le milieu KB liquide, 100 μl d'une suspension bactérienne (10^9 ufc/ml) ont été étalés sur le milieu KB⁺ contenant la rifampicine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Après incubation de 72 h à 25 °C, les colonies obtenues après plusieurs repiquages ont été cultivées 24 h à 25° C sous agitation (150 rpm) en milieu KB liquide additionnée de rifampicine. La pureté des souches a été vérifiée par étalement sur milieu KB et la stabilité de la résistance à la rifampicine a été testée par repiquages successifs (n = 15) (48 h à 25° C) sur le milieu KB+Rifampicine.

Les mutants obtenus ont été vérifiés quant à la conservation de leur profil trophique et leur vigueur physiologique. A cet effet, la croissance des souches mutées en milieu KB à 25°C sous agitation (100 rpm) a été comparée à celle des souches parentales. Les taux de croissance ont été déduits à partir des courbes de croissance tracées à partir des densités microbiennes déterminées aux temps : 0 h, 8 h, 10 h, 24 h, 48 h et 72 h. Sur le plan trophique, les mutants ont été testés pour

l'assimilation de 99 composés organiques comme sources de carbone (galerie Biotype 100, Biomérieux) (Annexe II.4).

V.2.3.2.3. Paramètres analysés

Les observations des symptômes et du développement des fusarioses de tomate et du lin ont été effectuées à partir du 3^{ème} jour de l'infestation par l'agent fongique. Selon la symptomatologie typique du flétrissement fusarien, nous avons adopté une échelle de symptomatologie typique de chaque maladie :

Fusariose vasculaire de la tomate :

- * 0 : Pas de symptômes.
- * 1 : Léger flétrissement basal.
- * 2 : Flétrissement unilatéral.
- * 3 : Flétrissement généralisé.
- * 4 : Mort du plant.

Fusariose vasculaire du lin :

- * 0 = Aucun symptôme
- * 1 = Jaunissement partiel
- * 2 = Flétrissement du sommet
- * sous forme d'arc «Shephard's Crook»
- * 3 = Flétrissement partiel
- * 4 = Flétrissement de la plante entière
- * 5 = Mort du plant.

Le suivi de l'évolution de la maladie est basé sur deux paramètres : le nombre de plants malades représente le taux d'infection et la gravité de la maladie est appréciée à travers la sévérité des symptômes. Pour les deux affections fongiques, le plant a été considéré comme malade dès l'apparition des symptômes de niveau 2. Le taux d'infection (I %) et la sévérité (S %) de la maladie ont été calculés comme suit :

- **I(%)** = (Total de plants malades / Total de plants observés) x 100.
I (%) : Indice de maladie (en pourcentage).

- **S(%)** = [$\sum (E - a) / N.T \times 100$]

S (%) : sévérité de la maladie en pourcentage

N : nombre total de plants observés

T : valeur du niveau le plus élevé, en l'occurrence 4 pour la tomate et 5 pour le lin.

E : niveau de symptôme (0 à 4) pour la tomate et (0 à 5) pour le lin

a : nombre de plants malades pour chaque niveau de symptomatologie.

V.2.3.3. FUSARIOSE VASCULAIRE PALMIER DATTIER

Les essais d'antagonisme *in planta* entre les souches de *Pseudomonas* et l'isolat fongique *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (**Foa**) ont été réalisés dans des conditions gnotobiotiques (2/3 sable + 1/3 de tourbe).

Pour la vérification préalable du pouvoir pathogène de l'isolat fongique **Foa**, le matériel végétal utilisé a consisté en des plantules issues de graines d'une variété sensible "Deglet-nour". Afin de ramollir leurs téguments, les graines ont été trempées dans l'eau chaude (60 à 70° C) et laissées jusqu'à refroidissement, puis elles ont été soigneusement lavées à l'eau distillée afin d'éliminer les restes du péricarpe. Pour éviter le développement ultérieur des agents de pourriture, les graines ont été traitées par trempage dans une solution de benomyl (10 %) pendant 5 minutes. Ainsi traitées, les graines ont été mises à prégermer, en orientant le pore germinatif vers le bas, dans des boîtes de Pétri stériles tapissées de papier filtre humidifié avec de l'eau distillée stérile et déposées à l'obscurité à 35°C pendant la première semaine et à 28°C jusqu'à germination.

Les graines prégermées ont été repiquées dans un substrat (1/3 tourbe + 2/3 sable) stérilisé par autoclavage et conditionné dans des sachets en plastique "polyéthylène" de 10 cm de diamètre et 20 cm de profondeur perforés à la base. Ces graines prégermées ont été réparties à la périphérie à raison de 3 graines par sachet, tel que préconisés par Saaïdi (1979) et Sedra (1994 et 1996).

Les plantules ont été conduites sous serre vitrée chauffée (25°C). L'infestation des plantules a été effectuée au stade végétatif (un à deux feuilles) favorable à l'infection (Saaïdi, 1979). Cinq ml d'inoculum fongique ont été déposés à l'aide d'une pipette au niveau de la racine principale des 12 plantules utilisées. Les témoins négatifs ont été inoculés avec l'eau distillée stérile, selon la même procédure. L'observation des symptômes a été faite à raison de deux fois par semaine durant 40 jours.

Dans le cas de développement de symptômes typiques, le plant est déclaré malade. Quand les symptômes ont été absents ou masqués, on a procédé à la technique de coupes séries comme décrit par Péresse (1971). Pour une désinfection superficielle, la partie du végétal (racine, collet) où a été recherché le parasite a été javellisée (8°) pendant 5 minutes. Cette opération a été complétée par un passage rapide dans la flamme d'un bec Bunsen. Des coupes transversales de 3 à 4 millimètres d'épaisseur ont été déposées aseptiquement, dans l'ordre de leur succession (numérotées) depuis la racine jusqu'au collet, sur le milieu PDA gélosé en boîtes et incubées 5 à 7 jours à 25°C. Les coupes ayant développées des colonies fongiques ont été vérifiées par observation microscopique.

V-2.4. INDUCTION SYSTEMIQUE DE LA RESISTANCE "ISR"

La majorité des hypothèses tendant à expliquer les effets bénéfiques des *Pseudomonas* fluorescents dans la promotion de la croissance des plantes s'articulent autour des actions directes (stimulation positive du métabolisme et de la physiologie de la plante), et des actions indirectes (déplacement et inhibition de la microflore pathogène et délétère). Des travaux récents portant sur différents modèles d'études ont mis en évidence l'implication de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans l'induction chez les plantes d'une résistance systémique non spécifique à différents agents pathogènes.

Dans le but de rechercher cette propriété chez nos souches, des essais ont été effectués sur l'induction systémique de la résistance chez des plants de tomate vis à vis d'isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (**Fol**) et de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (**Cmm**) par les souches de *Pseudomonas fluorescens* P6, B3, T9 et SN1.

Les essais ont été conduits dans des conditions excluant le contact direct au niveau des racines de la plante entre la souche de *Pseudomonas* testée pour le caractère inducteur et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (**Fol**). Le protocole expérimental a été adapté de Liu et al., (1995) et de Djuiff et al., (1998). Au stade plantule, les plants ont été dépotés et secoués soigneusement pour éliminer les particules du sol adhérentes au système racinaire, et à l'aide d'un scalpel stérile, on a réalisé une incision au niveau de la coiffe du système racinaire jusqu'à la base du collet. Cette opération permet la séparation du système racinaire en deux parties, chaque partie a été transplantée séparément dans un pot (Figures V.1 et V.2).

L'inoculation a été faite séparément au niveau des racines de la plante par bactérisation d'une partie du système racinaire avec une suspension de *Pseudomonas* (10^6 ufc./ml) et par infestation de l'autre partie avec une suspension fongique de **Fol** (10^6 conidies/ml). De plus, chaque partie de substrat (sol + tourbe) a été inoculée avec la suspension de *Pseudomonas* ou fongique de **Fol** à une concentration finale de 10^6 ufc/g de substrat.

En ce qui concerne l'agent du chancre bactérien *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (**Cmm**), la bactérisation avec *Pseudomonas* a été effectuée par immersion du système racinaire entier du plant pendant 15 minutes dans une suspension bactérienne de 10^6 ufc/ml avant de le replanter. 72 heures après la bactérisation, l'infestation du plant par l'agent phytopathogène **Cmm** a été faite par infiltration systémique au niveau du collet, à l'aide d'une seringue (5 ml), d'une suspension bactérienne en eau distillée stérile (10^6 ufc/ml). Les témoins ont été traités de la même façon avec de l'eau distillée stérile.

Pour chaque essai, les traitements ont été organisés selon un dispositif en quatre blocs aléatoires complets, avec 15 plants par traitement et par bloc, soit 60 plants par traitement. Un traitement correspond à l'interaction d'une souche de *Pseudomonas* avec l'isolat pathogène fongique (*Fol*) ou bactérien (*Cmm*). Les traitements témoins consistent en l'infestation du plant par l'agent phytopathogène (témoin malade), en uniquement la bactérisation par *Pseudomonas* (témoin normalement non malade, excluant un effet négatif de *Pseudomonas*), en une absence de traitement (témoin non malade) et enfin en la bactérisation et l'infestation simultanée du système racinaire entier du plant (témoin révélant l'effet de protection par antagonisme).

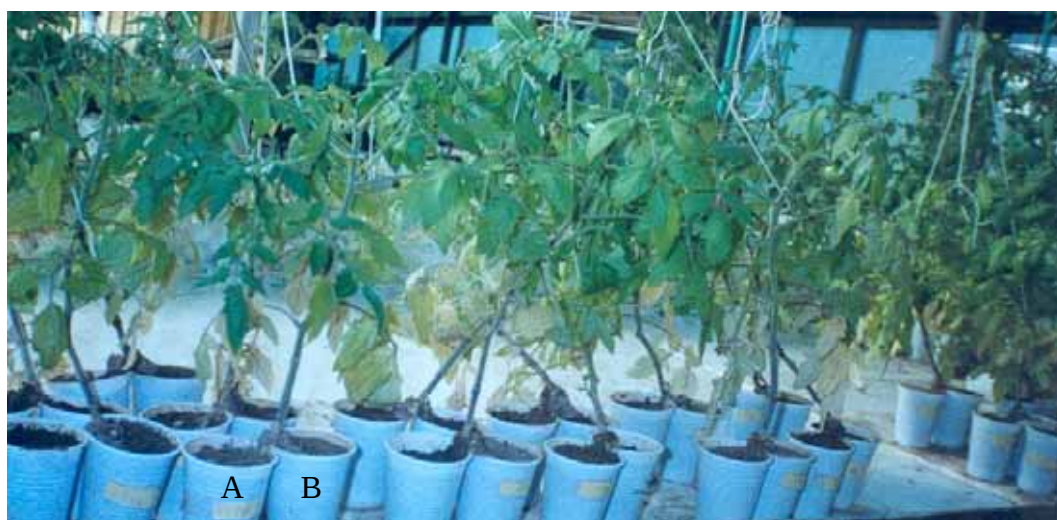
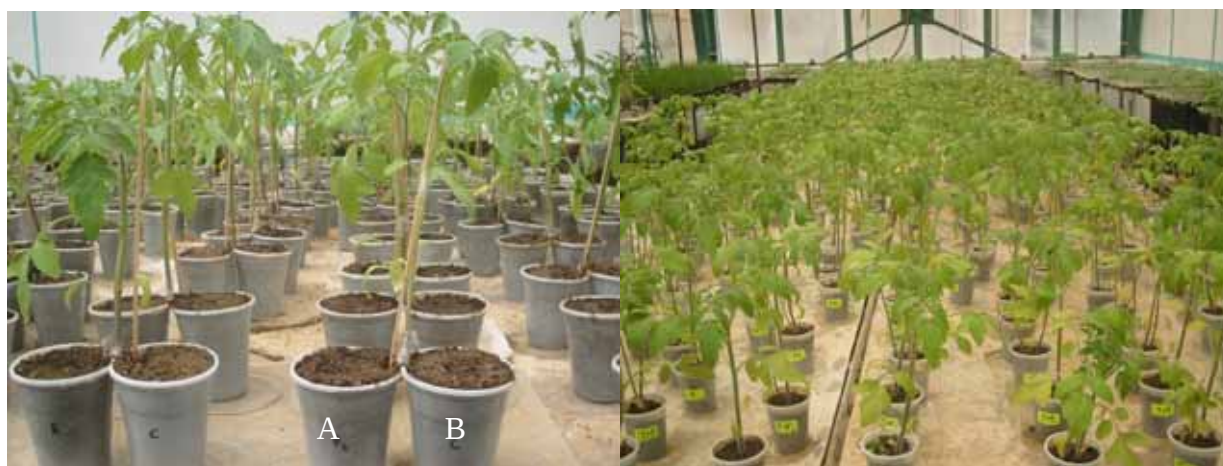


Figure V.2.1 : Exemple d'un traitement conduit en Split



Système Split

Système classique (non split)

(A) : partie bactérisée, (B) partie infestée

Figure V.2.2 : Dispositif expérimental de l'essai de l'induction systémique de la résistance (ISR)

V-2.4. 1. PARAMETRES ANALYSES

Le développement de la maladie a été suivi selon la même procédure que pour les essais d'antagonisme *in planta* (cf. V.2.3.1.1), en estimant le taux d'infection (**I %**) et la sévérité de la maladie (**S %**). Il faut rechercher une particularité symptomatologique de *Clavibacter* (chancre bactérien) qui consiste en un brunissement typique des tissus conducteurs (phase finale). La détection de certaines activités enzymatiques indicatrices de l'activation de la résistance de la plante, dosage des protéines et de l'activité phenylalanine-ammonia-lyase, a été effectuée sur les extraits foliaires des plantules bactérisés.

V-2.4.1.1. Préparation des extraits foliaires

Les extraits foliaires ont été préparés selon la technique de Lanna *et al.*, (1996). Dix jours après la bactérisation, 3 à 5 feuilles ont été prélevées aléatoirement à partir de trois plants du même traitement (3 répétitions). Chaque échantillon (poids frais = 1 g) a été broyé finement dans un mortier refroidi en glace en présence d'une pincée de sable stérile, de pyrolydone polyvinyle (PVP, neutralise les phénols inhibiteurs des réactions enzymatiques) et de 1 ml de tampon Tris HCl 0,2 M pH 7,5 - 14 mM β -mercaptoéthanol. Le contenu a été transvasé dans des tubes Eppendorf de 2 ml et le mortier a été rincé avec 0,5 ml de tampon d'extraction. Le mélange obtenu a été centrifugé (20.000 g pendant 25 min à 4°C) et le surnageant a été conservé en glace pour subir la détection des activités enzymatiques.

V-2.4.1.2. Concentration des protéines

La quantification des protéines (protéines totales) a été réalisée par la technique de Bradford (1976). A 0,1 ml de l'extrait foliaire (surnageant) a été additionné 1 ml de réactif de Bradford. Après une agitation durant 2 minutes, la lecture des résultats après agitation (au maximum 10 minutes) a été effectuée à 595 nm (A_{595}), en utilisant une gamme étalon préparée à partir d'une solution mère d'albumine bovine à 0,1 mg / ml.

V-2.4.1.3. Activité Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

L'activité PAL (EC 4.3.1.5) a été mesurée à $\lambda = 290$ nm (A_{290}), après incubation du surnageant (10 μ l) avec 1 ml d'une solution de L-phénylalanine (0,2 %) dans le tampon Tris HCl 0,2 M pH 7,5. En parallèle, une incubation d'un même échantillon dans une solution de D-phénylalanine sert de contrôle. La mesure de la formation d'acide cinnamique à 290 nm permet de connaître l'activité PAL (Pascholati, 1986).

V-2.4.1.4. Détection de l'agent pathogène

La présence des agents pathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, lors des essais, a été vérifiée par leur réisolement à partir des

plants de tomate infestés. Après désinfection des fragments végétaux à l'eau javellisée (6°) et rinçage à l'eau distillée stérile, des coupes de fragments de collet ou de racines ont été déposés sur milieu PDA (**Fol**) ou gélose nutritive (**Cmm**). Les colonies bactériennes et fongiques ont été observées après une incubation à 25° C de 48 à 72 h pour l'agent bactérien et d'une semaine pour l'agent fongique.

V-2.5. RECEPTIVITE DU SOL A *Fusarium oxysporum f.sp. lini*

Un sol résistant à la maladie est un sol dit suppressif dans lequel la sévérité de celle-ci reste limitée malgré la présence du pathogène à une densité optimale pouvant générer la maladie et la susceptibilité de la plante. Un sol sensible dit permissif est celui dans lequel la maladie s'exprime dans toute sa sévérité permet une sévérité importante en présence d'une faible densité d'inoculum du pathogène. Les essais ont consisté à étudier la réceptivité du sol aux souches antagonistes de *Pseudomonas*, lui permettant d'acquérir une résistance vis-à-vis de la fusariose vasculaire du lin due à *Fusarium oxysporum f. sp. lini*.

La sensibilité du sol à *Fusarium oxysporum f. sp. lini* et l'expression de la maladie ont été investiguées. Un sol provenant d'un biotope tomate d'une région maraîchère, désinfecté par autoclavage, a été infesté avec une suspension conidienne de **Foln** à des concentrations croissantes de 0, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 et 10^7 conidies / g de sol.

Dans d'autres essais, le sol a été successivement, à un intervalle de 24 h, infesté puis bactérisé par **Foln** et *Pseudomonas* à la même concentration finale de 10^6 bactéries ou conidies / g de sol. Par ailleurs, dans les mêmes conditions, le sol a été amendé en glucose ou en EDTA aux concentrations 0 µg (témoin), 50 µg, 100 ou 150 µg/ g de sol.

Les sols ainsi traités ont été répartis dans des pots et 5 graines de lin préalablement prégermées ont été plantées selon la technique d'antagonisme *in planta* décrite précédemment. Pour chaque essai, un dispositif expérimental en quatre blocs aléatoires complets a été conçu. Chaque bloc est représenté par 5 pots, soit 25 plants de lin/bloc, donc 100 plants par traitement (par souche de *Pseudomonas* testée). Le développement de la maladie, observation des symptômes typiques, a été suivi durant 60 jours à raison de trois observations par semaine.

V-2.6. ANALYSE DE DONNEES

Les valeurs des paramètres **I %** (Infection) et **S%** (sévérité) ont été transformées en $\arcsin \sqrt{I}$ ou en $\arcsin \sqrt{S}$, avant de subir une analyse de variance (ANOVA). Dans le cas des traitements où la différence est significative au seuil des risques d'erreur (1% et 5 %), la comparaison a été effectuée selon la plus petite amplitude significative (PPAS) "test de Newman-Keuls" (Dagnelie, 1975).

V-3. RESULTATS

V-3.1 ANTAGONISME *IN VITRO*

Les cinq souches de *Pseudomonas fluorescens* P6, B3, T9, SN1 et D2 étudiées ont montré des activités antagonistes appréciables sur les trois milieux de culture à l'encontre des quatre isolats fongiques (Tableaux V.3.1, V.3.2, V.3.3, Figure V.3)

La croissance mycélienne enregistrée chez les témoins a été nettement supérieure à celle des interactions *Pseudomonas*-isolat cryptogamique. Les diamètres moyens des colonies ont été de $8 \pm 1,09$ cm pour *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), $7 \pm 0,89$ cm pour *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) et de $7,3 \pm 1,02$ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (Foln) et 8 cm pour *Pythium ultimum* (Pu). Indépendamment du milieu de culture et des souches de *Pseudomonas*, les taux d'inhibition de la croissance mycélienne enregistrés dans les interactions *Pseudomonas*-isolat cryptogamique s'échelonnent entre le minimum de 4,25 % jusqu'au maximum de 78,21 % pour le champignon le plus sensible, *Pythium ultimum* (Tableau V.3.1).

A l'exception des interactions (T9 – Foln, P6 -Foa) sur le milieu "PDA + KB" (Tableau V.3.3) et (D2-Fol) sur le milieu PDA (Tableau V.3.1) pour lesquelles les plus faibles inhibitions ont été observées, toutes les souches ont présenté un antagonisme d'une efficacité relativement homogène, avec les taux d'inhibition les plus élevés vis-à-vis de *Pythium ultimum*.

Le milieu de culture n'a pas eu d'influence notable sur l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* testées.

Globalement, la germination des conidies en présence des souches de *Pseudomonas* était nettement moins efficiente par rapport à celle des témoins respectifs. Les taux d'inhibition de la germination varient de 5,33 % (B3- Foa en milieu PD) à 67,28 % enregistré chez l'isolat fongique le plus sensible, *Pythium ultimum* (Pu). Le même constat a été noté en ce qui concerne l'élongation du tube germinatif dont les taux d'inhibition varient entre 1,63 % et 46,66 % (Tableau V.5).

Il y a une augmentation progressive des taux de germination des conidies en fonction du temps d'incubation que ce soit pour les témoins ou en présence de souches de *Pseudomonas*. Les taux de germination, chez les quatre isolats fongiques, ont été plus élevés dans le milieu PDA que dans les deux autres milieux. (Tableau V.4). Ce test d'inhibition de la germination conidienne a montré, également, que *Pythium ultimum* était plus sensible aux actions des bactéries antagonistes.

Le maximum d'inhibition de la germination conidienne chez les fusariums (55,95 %) a été enregistré dans l'interaction de la souche T9 avec **Fol** dans le milieu PD. Sur ce même milieu, la souche SN1 a induit l'inhibition maximale (67,28 %) vis à vis de *Pythium ultimum* (Tableau V.4).

Tableau V.3.1 : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne sur le milieu PDA.

Souches bactériennes	ISOLATS FONGIQUES			
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i> (Foln)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . (Foa)	<i>Pythium ultimum</i> (Pu)
B3	31,39 (a)	28,40 (c)	44,63 (a)	65,21 (b)
P6	33,72 (a)	39,95 (b)	46,46 (a)	62,11 (b)
T9	34,88 (a)	35,33 (b)	35,24 (b)	62,73 (b)
D2	14,86 (b)	44,57 (a)	32,78 (b)	72,88 (a)
SN1	36,75 (a)	33,52 (b)	31,95 (b)	76,39 (a)

*: Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman et Keuls au seuil $\alpha=5\%$ et 1%.

Tableau V.3.2 : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne sur le milieu KB.

Souches bactériennes	ISOLATS FONGIQUES			
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i> (Foln)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . (Foa)	<i>Pythium ultimum</i> (Pu)
B3	38,52 (a)	39,78 (b)	18,63 (c)	78,21 (a)
P6	26,40 (b)	29,95 (c)	26,46 (b)	46,11 (c)
T9	34,33 (a)	49,33 (a)	45,24 (a)	68,22 (b)
D2	33,48 (a)	30,19 (c)	42,78 (a)	69,82 (b)
SN1	36,25 (a)	23,52 (d)	18,95 (c)	56,41 (d)

*: Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman et Keuls au seuil $\alpha=5\%$ et 1%.

Tableau V.3.3 : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne sur le milieu (PDA + KB)

Souches bactériennes	ISOLATS FONGIQUES			
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i> (Foln)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . (Foa)	<i>Pythium ultimum</i> (Pu)
B3	38,52 (a)	22,66 (b)	23,30 (b)	66,33 (a)
P6	26,40 (b)	31,15 (a)	04,25 (c)	66,11 (a)
T9	34,33 (a)	08,33 (c)	25,58 (b)	58,22 (b)
D2	33,48 (a)	25,33 (b)	32,15 (a)	68,32 (a)
SN1	36,25 (a)	33,88 (a)	32,95 (a)	66,33 (a)

*: Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman et Keuls au seuil $\alpha=5\%$ et 1%.

Tableau V.4 : Inhibition (%) de la germination conidienne

Souches bactériennes	Milieux de culture	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lin</i> (Foln)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . (Foa)	<i>Pythium ultimum</i> (Pu)
B3	KB	22,10 ± 0,58*	11,33 ± 2,08	42,11 ± 2,95	36,90 ± 1,35
	PD	18,26 ± 0,54	13,44 ± 1,06	05,33 ± 0,94	48,15 ± 1,25
	PD+KB	09,34 ± 0,65	16,25 ± 1,65	31,55 ± 2,20	61,76 ± 1,22
P6	KB	37,33 ± 0,90	29,38 ± 1,95	36,18 ± 3,96	29,33 ± 1,74
	PD	16,26 ± 1,14	12,35 ± 2,11	23,13 ± 1,09	47,28 ± 1,29
	PD+KB	16,58 ± 1,78	26,35 ± 2,11	28,13 ± 1,59	24,28 ± 1,12
T9	KB	47,33 ± 3,52	15,33 ± 1,22	29,78 ± 2,96	28,15 ± 2,74
	PD	55,95 ± 3,52	14,69 ± 3,52	18,09 ± 3,52	58,12 ± 3,52
	PD+KB	17,88 ± 3,52	6,17 ± 3,52	11,56 ± 3,52	49,46 ± 3,52
D2	KB	23,21 ± 3,52	13,17 ± 3,52	14,06 ± 3,52	41,56 ± 3,52
	PD	46,65 ± 3,52	14,69 ± 3,52	18,09 ± 3,52	38,19 ± 3,52
	PD+KB	18,69 ± 3,52	6,15 ± 3,52	11,55 ± 3,52	39,44 ± 3,52
SN1	KB	22,31 ± 3,52	13,15 ± 1,56	14,65 ± 3,52	51,64 ± 2,15
	PD	16,26 ± 1,14	12,35 ± 2,11	23,13 ± 1,09	67,28 ± 1,29
	PD+KB	16,58 ± 1,78	26,35 ± 2,11	28,13 ± 1,59	44,28 ± 1,12

* : Ecart Type calculé à partir de cinq répétition de chaque traitement

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés par rapport aux pourcentages obtenus chez les témoins respectifs.

Tableau V.5 : Inhibition (%) de l'élongation du tube germinatif

Souches bactériennes	Milieux de culture	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lin</i> (Foln)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . (Foa)	<i>Pythium ultimum</i> (Pu)
B3	KB	26,02 ± 0,758 *	06,28 ± 0,08	35,38 ± 2,83	33,25 ± 1,59
	PD	19,36 ± 1,28	06,44 ± 0,06	08,35 ± 0,07	32,17 ± 2,57
	PD+KB	05,42 ± 0,65	09,43 ± 0,65	27,75 ± 0,83	46,02 ± 2,16
P6	KB	26,62 ± 1,82	20,89 ± 1,63	34,82 ± 1,04	21,02 ± 0,63
	PD	09,58 ± 0,72	10,58 ± 1,18	17,76 ± 0,53	39,47 ± 1,18
	PD+KB	10,52 ± 1,11	10,36 ± 0,31	22,41 ± 0,67	18,25 ± 1,02
T9	KB	42,04 ± 1,26	08,38 ± 0,82	29,81 ± 0,89	16,27 ± 0,49
	PD	44,97 ± 1,85	07,16 ± 0,52	11,35 ± 1,12	45,11 ± 1,35
	PD+KB	11,12 ± 1,45	2,29 ± 0,07	07,38 ± 0,95	23,77 ± 0,71
D2	KB	09,12 ± 0,82	09,15 ± 1,28	10,11 ± 1,15	46,66 ± 2,72
	PD	45,45 ± 1,51	08,11 ± 1,32	09,72 ± 1,08	29,58 ± 0,89
	PD+KB	13,42 ± 1,38	1,63 ± 0,05	08,35 ± 1,02	26,22 ± 1,79
SN1	KB	11,11 ± 0,33	07,34 ± 1,12	09,38 ± 1,22	38,57 ± 2,06
	PD	08,25 ± 0,74	05,28 ± 0,75	11,25 ± 1,15	35,66 ± 1,61
	PD+KB	08,38 ± 1,08	16,32 ± 0,85	25,15 ± 0,75	34,65 ± 2,77

* : Ecart Type calculé à partir de cinq répétition de chaque traitement

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés par rapport aux pourcentages obtenus chez les témoins respectifs.

La longueur moyenne des tubes germinatifs, après 18 h d'incubation, était nettement supérieure chez les témoins (sans bactérisation), que chez les interactions (bactéries– conidies). En effet, chez les témoins, cette longueur varie de 116,31 µm à 171,30 µm, alors que chez les conidies mises en présence des bactéries antagonistes, elle n'était que de 84,23µm à 91,80 µm. Globalement, les résultats obtenus pour une même souche de *Pseudomonas* en interaction avec le même champignon (répétition de la même expérience) ont été très hétérogènes; ainsi, il était impossible de spécifier les actions d'inhibition par rapport à chaque souche bactérienne utilisée. Toutes souches bactériennes confondues, il apparaît des différences significatives entre les témoins et les traitements bactérisés, traduisant un effet antagoniste réel, mais sans différence notable entre les souches.

V-3.2 ANTAGONISME *IN PLANTA*

V-3.2.1. INHIBITION DE *Pythium ultimum*

La symptomatologie observée à 9 jours après l'inoculation du pathogène a montré que les plants infestés par *Pythium ultimum* avaient développé de nécroses des extrémités foliaires. L'évolution du taux d'infection (51 %) a été très rapide chez les plants non bactérisés (plants infestés par le pathogène), tandis que chez les plants bactérisés, les taux d'infection sont significativement moindres (entre 0 et 12,6 %), selon le test de Newman-Keuls, par rapport au témoin malade (Figure V.4.1).

La bactérisation des plants par les souches de *Pseudomonas* a induit une inhibition de la maladie, allant jusqu'à 76,65 % (bactérisation avec la souche T9) et une moindre gravité des symptômes (Figure V.4.2). Pour les plants bactérisés qui ont néanmoins développé la maladie, le niveau le plus élevé de la sévérité des symptômes était de 3, il correspond au brunissement racinaire; tandis que les plants non bactérisés et infestés par le pathogène (T+) ont développé fréquemment un niveau de symptomatologie de 4, correspondant à la mort des plants

A la fin des observations, soit 21 jours après la bactérisation, une inhibition appréciable de la maladie a été constatée chez les plants bactérisés, notamment avec les souches T9 et B3 pour lesquelles les taux d'infection enregistrés étaient relativement faibles, respectivement, 19,96% et 23,30 % avec des symptômes atténués, alors que le témoin malade a atteint un taux d'infection de 85,5 %. Les souches SN1 et P6 ont été moins performantes et D2 la moins efficace (Figures V.4.1 et V.4.2).

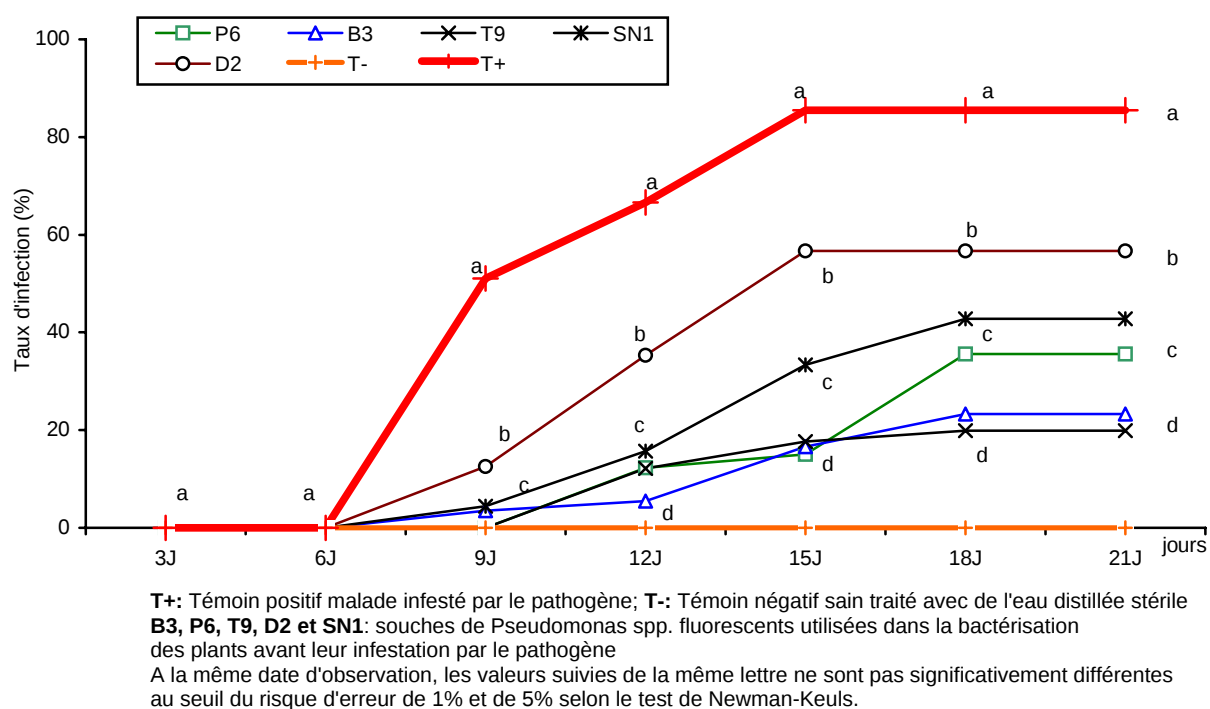
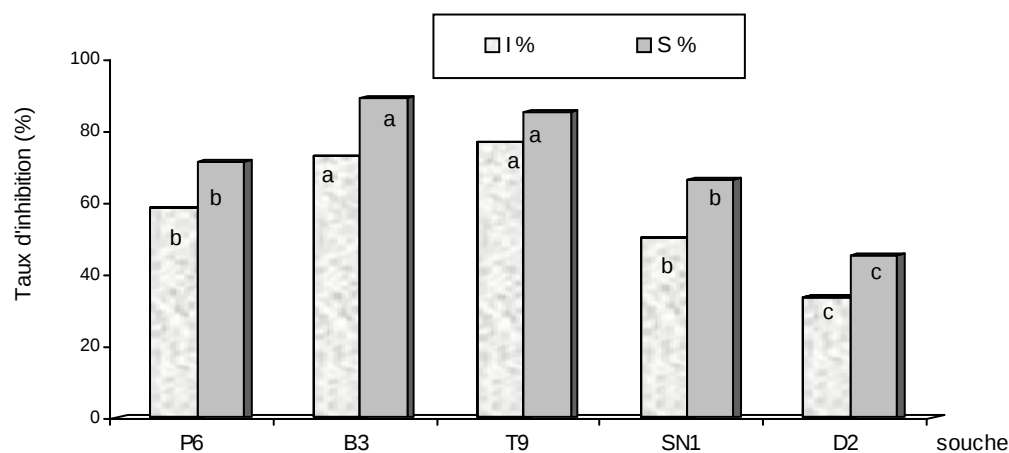


Figure V.4.1 : Evolution du taux d'infection causée par *Pythium*.



Les taux ont été exprimés par rapport au taux moyen de la sévérité de la maladie enregistrée chez le témoin positif malade (T+)
B3, P6, T9, D2 et SN1 : souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents utilisées dans la bactérisation des plants avant leur infestation par le pathogène
 En comparant l'effet des souches, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil du risque d'erreur de 1% et de 5% selon le test de Newman-Keuls.

Figure V.4.2 : Taux d'inhibition de l'infection (I %) et de la sévérité de la maladie (S %) causée par *Pythium*.

V-3.2.2. INHIBITION DE *Fusarium oxysporum*

Pour *F.o. f.sp lycopersici*, les symptômes de la maladie ont commencé à apparaître à 10 j après l'inoculation du pathogène, notamment sur les plants témoins malades (T+) et ceux traités par les souches SN1, B3, T9 et CHA400, le niveau symptomatologique était de 2 et le taux d'infection de l'ordre de 14%. L'évolution de la maladie a été ensuite rapide pour le T+ pour atteindre 51 % à 17j et les taux d'infection ont commencé à se stabiliser à partir du 26^{ème} jour (Figure V.5). Pour les plants de tomate bactérisés, leur bioprotection s'est traduite par un ralentissement de l'expression des symptômes de la fusariose vasculaire. Les taux d'inhibition de la maladie ont été de l'ordre de 44,13 %, 59,92 %, 63,56% et 74,49 % pour respectivement les souches D2, CHA0, CHA400 et P6. Il faut noter que la souche mutante CHA400, déficiente pour la synthèse de pyoverdines (pvd -), a permis une bioprotection plus efficace que la souche de référence CHA0. Les souches SN1 et T9 ont été les moins performantes (figure V. 7).

La comparaison des niveaux d'infection, en fin d'expérimentation (35j), a permis de dégager cinq groupes de réponse à l'infestation par l'agent pathogène, par ordre décroissant de développement de l'infection (Figure V.5) :

- * Le groupe (a) avec les taux d'infection les plus élevés, il regroupe, en plus du témoin positif traité uniquement par *F.o. f.sp lycopersici*, les plants bactérisés par les souches T9 et SN1;
- * Le groupe (b) représenté par les plants bactérisés avec la souche D2 ;
- * Le groupe (c) correspondant aux plants bactérisés avec les souches CHA0, CHA400 et B3;
- * Le groupe (d) correspondant à la bactérisation des plants par la souche P6;
- * Le groupe (e) représenté par le témoin sain (T-) n'ayant pas été infecté.

Dans les essais sur la fusariose vasculaire du lin, les constations sont globalement similaires à celles des essais sur la tomate, la bactérisation des plants par les souches de *Pseudomonas* a provoqué un ralentissement significatif de l'apparition des symptômes et par conséquent la réduction du taux final d'infection. La fusariose du lin a été contrôlée significativement par la souche CHA400 avec un taux d'infection de 20,83 % (groupe e), suivie de B3 (35%) et P6 (27,33 %) et CHA0 (38,46 %) (groupe d), ensuite vient la souche D2 (46 %) (groupe c) et enfin la souche T9 avec 56,66% d'infection (groupe b). La souche SN1 avec 96,07% d'infection est la moins performante, elle égale le comportement du témoin malade (groupe a) (Figures V.6, V.7).

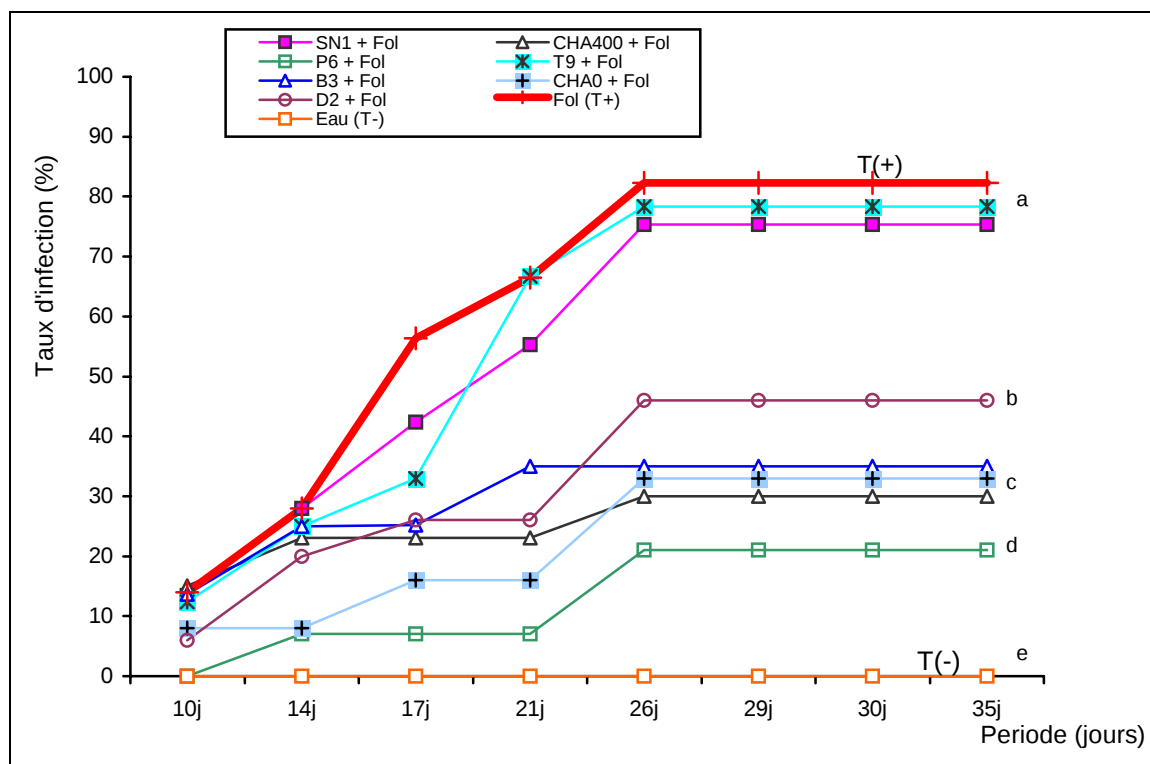


Figure V.5 : Evolution du taux d'infection de la fusariose de la tomate

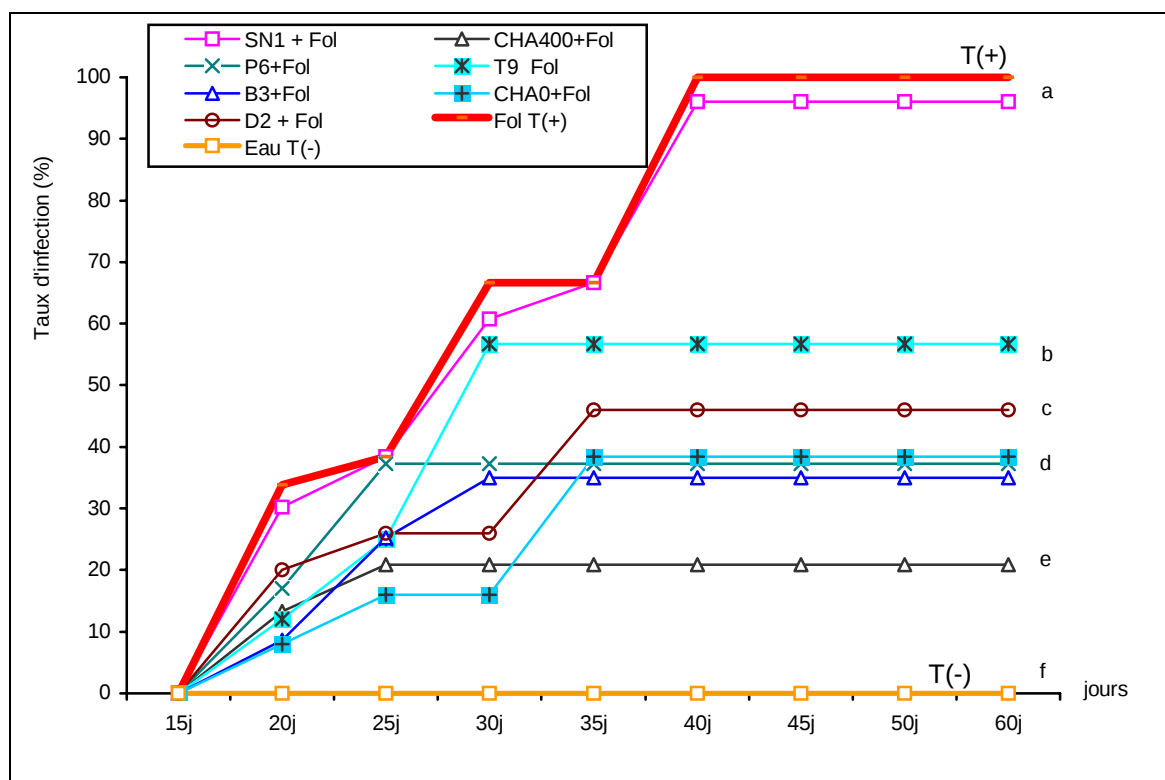


Figure V.6 : Evolution du taux d'infection de la fusariose du lin.

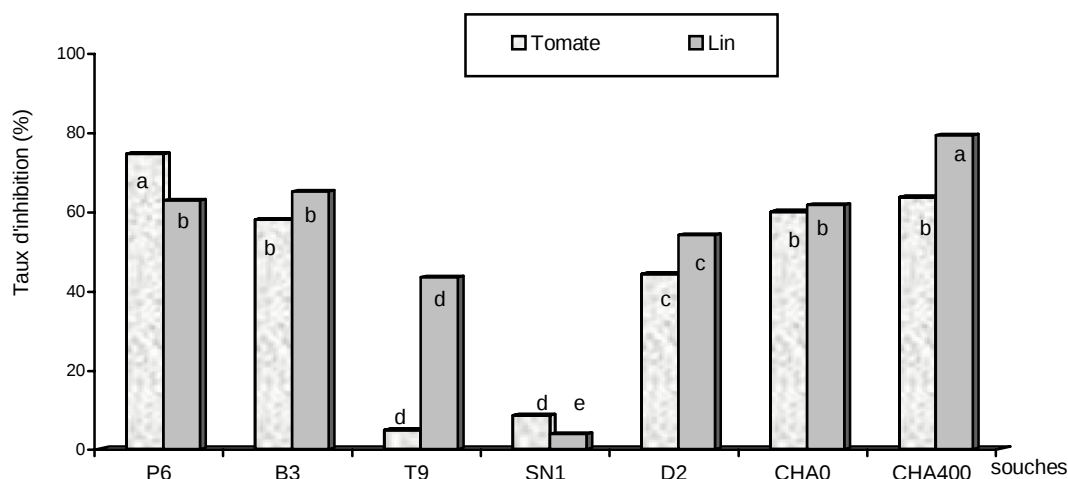


Figure V.7 : Protection biologique (%) vis à vis des fusarioses vasculaires de la tomate et du lin.

L'étude en sol naturel de l'effet antagoniste de nos souches a nécessité la construction de souches mutantes possédant un marqueur de résistance permettant leur sélection. Les souches mutantes obtenues ont été analysées quant à leur compétitivité *in vitro* et leur profil trophique par rapport à leurs souches sauvages respectives, seuls deux mutants des souches P6 et B3 résistants à la rifampicine, B3R et P6R, ont été retenus pour cet essai, avec la souche de référence C7R12.

Pour les trois souches testées, les taux d'inhibition de la maladie ont été meilleurs en sol naturel qu'en sol désinfecté (Figure V.8). En sol naturel, les activités inhibitrices des souches P6R (83,33 %) et C7R12 (86,66%) sont globalement équivalentes (groupe a), suivies de celle de la souche B3R (66,67 %) (groupe b). En sol désinfecté, les activités antagonistes sont plus atténuées, le taux d'inhibition maximal (58,33 %) a été enregistré sur les plants bactérisés avec la souche C7R12, suivie par les traitements avec la souche B3R (53,33 %), ces deux souches forment un même groupe de réponse (groupe a), et enfin on retrouve la souche P6R avec le niveau de protection le moins important avec un taux d'inhibition de 33,33 % (groupe b).

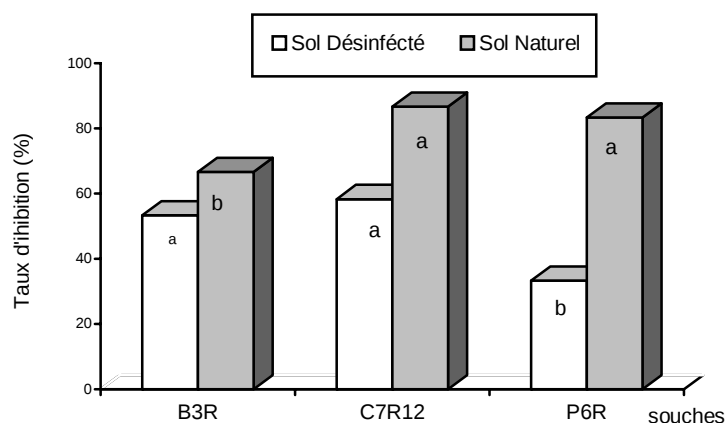


Figure V.8 : Protection assurée par les souches de *Pseudomonas* en sol naturel et en sol désinfecté vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp.*lini*

Les traitements désignés avec la même lettre ne diffèrent pas significativement au risque d'erreur de 1 % et de 5 %

Concernant *F.o f.sp. albedinis*, en l'absence de symptômes typiques de la fusariose vasculaire du palmier dattier, l'évaluation du taux d'infection a été basée sur les résultats des coupes séries. A partir de chaque plant, une série de coupes (1 à 27) de la racine jusqu'au collet a été réalisée en trois répétitions, et comparée au témoin. Le plant a été considéré comme malade si au moins une de ces coupes a permis le réisolement de *F.o f.sp. albedinis*. Dans le cas contraire où aucune coupe n'a permis le développement du pathogène sur le milieu de culture, le plant a été considéré sain (Figure V.9). Chez les plants où le pathogène a été réisolée au niveau des coupes des racines, un brunissement racinaire a été observé, affectant parfois les vaisseaux conducteurs, ce qui témoigne d'une progression du champignon dans le plant.

Chez les plants témoins sains (non bactérisés et non infestés), aucun symptôme n'a été observé sur les plants après 60 jours de végétation, toutes les coupes se sont avérées indemnes de *F.o f.sp. albedinis*, après incubation sur le milieu de culture. Les plants témoins malades (infestés par le pathogène) n'ont pas développé de symptômes typiques du bayoud ; cependant, *F.o f.sp. albedinis* a été réisolé sur milieu de culture à partir de toutes les coupes séries.

Chez les plants bactérisés, les souches de *Pseudomonas* les plus performantes dans le contrôle de *F.o f.sp. albedinis* ont été CHAO, P6 et CHA400 avec des taux d'infection respectifs de 23,33 %, 28,33 % et 38,33 %. Les souches B3 (43,33 %) et D2 (50%) ont présenté une activité antagoniste moyenne. Les niveaux de protection les plus faibles ont été enregistrés avec les souches T9 et SN1 avec des taux d'infection de 66,33 % et 68,88 %. (Figure V.10).

Globalement, la bactérisation des plants a induit une bioprotection des plants *in situ*, révélatrice du pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis à vis des trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum*.

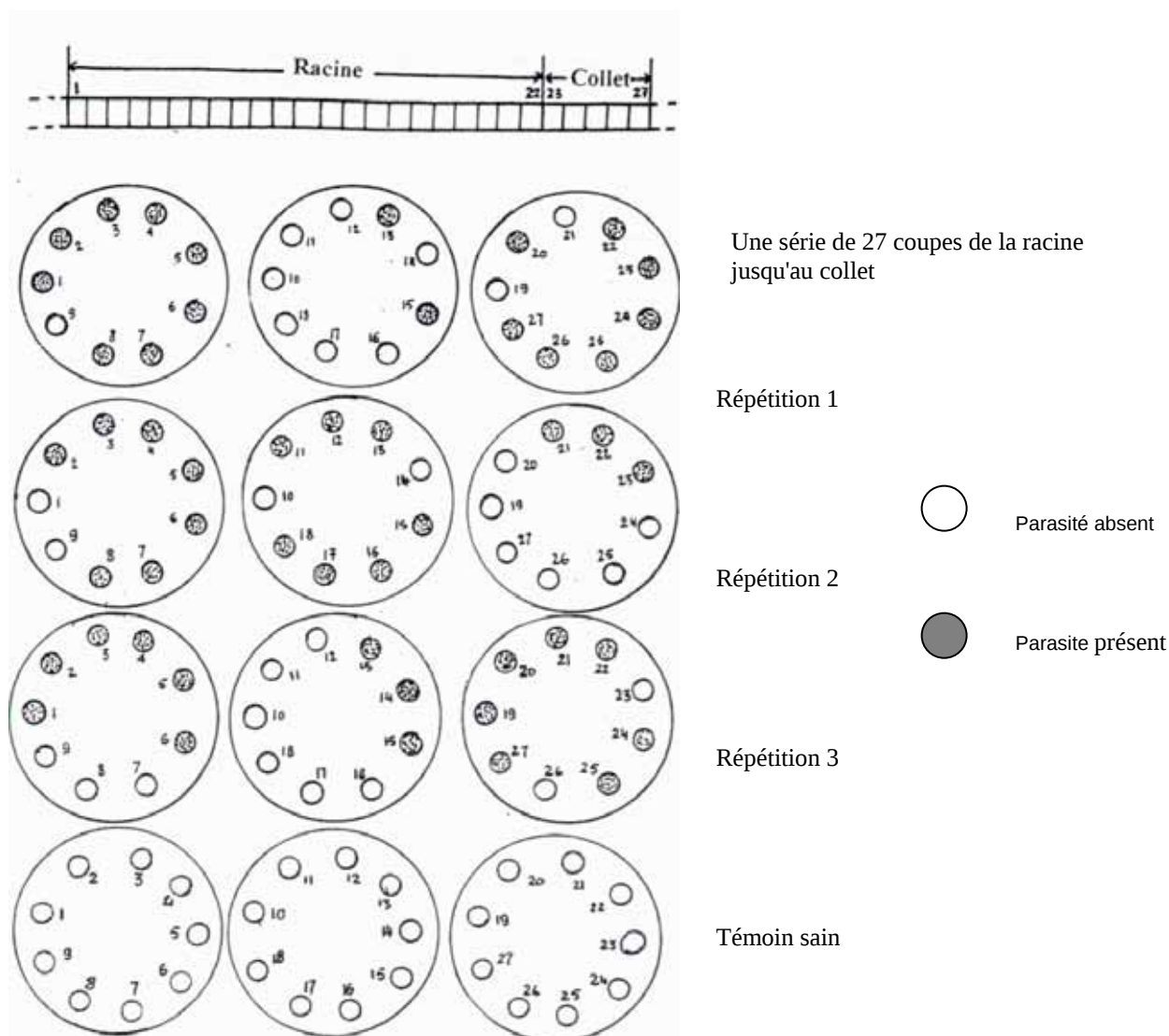
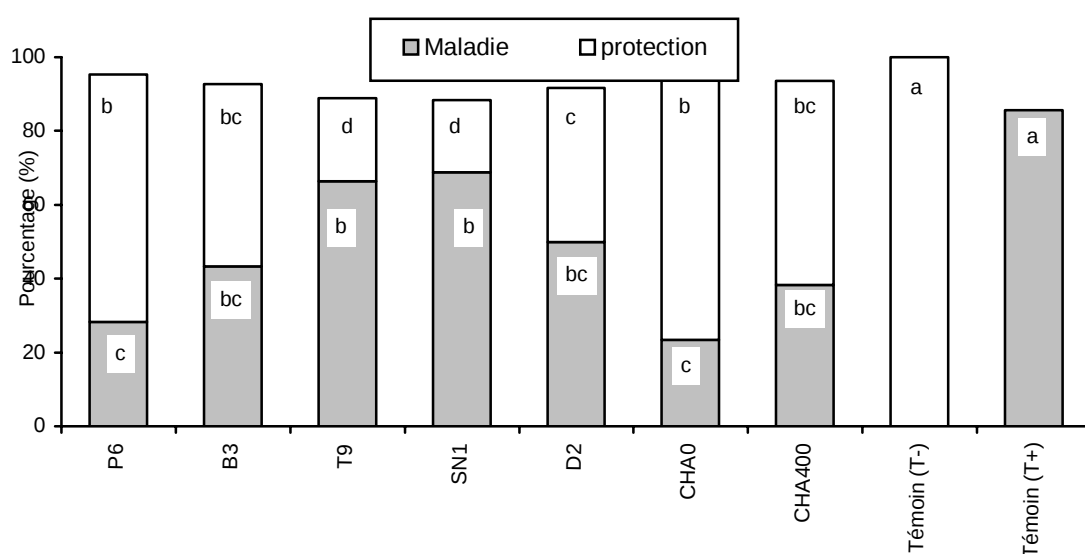


Figure V.9 : Exemple de résultats de détection de *F.o f.sp albedinis* selon la technique de coupes série .



La même lettre, pour la même variable, correspond à l'absence de différence significative ($\alpha = 5\%$ et 1%).

Figure V.10 : Taux d'infection et de protection des plantules de palmier dattier.

V.3.3. EFFET ISR

L'induction systémique de la résistance, par bactérisation des plants de tomate à l'aide de souches de *Pseudomonas*, a été plus marquante vis à vis de *F.o. f.sp lycopersici* (**Fol**) que de l'agent du chancre bactérien *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (**Cmm**). Dans ces essais d'induction systémique de la résistance (ISR), la cinétique d'évolution de la fusariose est relativement analogue pour les plants conduits en condition classique (non split) et ceux conduits en système split (induction systémique de la résistance). L'infection entame une phase d'accroissement active à partir du 15^{ième} jour après la transplantation, elle ralentit à partir du 49^{ième} jour et devient stationnaire à partir du 56^{ième} jour (Figure V.11A et V.11B).

La réduction de la fusariose sur les plants de tomate conduits en système classique a été globalement la même avec les souches CHAO, T9 et P6 (groupe a) avec un taux moyen d'inhibition de la maladie de 47,71 % et elle a été moindre avec la souche CHA400 (31,76 %) (groupe b) (Tableau V.6, Figure V.11A).

Dans l'essai conduit en système split, la réduction de la maladie, liée uniquement à un effet d'induction systémique de la résistance chez la plante, a été de 37,26 % avec la souche CHAO, suivie par la souche P6 (21,58 %) et enfin des souches T9 et CHA400 avec respectivement 13,73 % et 14,91 % (Tableau V.6, Figures V.11B, 12 et 13).

Dans l'essai où le pathogène bactérien, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a été inoculé au niveau du collet par systémie, la bactérisation semble inefficace, les taux d'infection enregistrés chez les plants traités avec les souches T9 et CHA400 sont proches du taux atteint par le témoin malade; ces plants ont développé des symptômes vasculaires, signes d'une infection et progression du pathogène (Figure V.12). Une faible protection a été obtenue avec les souches CHA0 et P6, les taux d'inhibition de la maladie ont été de 11,37 % et 12,67 % (Tableau V.6, Figure V.11C, Figure 12).

Les protéines totales sont plus importante dans les extraits foliaires des plants bactérisés (169 à 235 µg / mg d'extrait foliaire) que chez les témoins malades infectés seulement par **Fol** (120 µg / mg d'extrait foliaire). Dans les essais avec *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, les protéines totales dans les extraits foliaires étaient moindres par rapport à l'essai avec *F.o. f.sp lycopersici*. Le maximum en protéines a été noté chez les plants bactérisés avec la souche de référence CHA0 (138 µg/mg d'extrait foliaire), suivis par ceux bactérisés avec la souche P6 (128 µg/mg d'extrait foliaire). Les niveaux enregistrés avec les souches CHA400 et T9 ont été relativement équivalents à celui du plant témoin infecté et non bactérisé (114µg/mg d'extrait foliaire) (Tableau V.7).

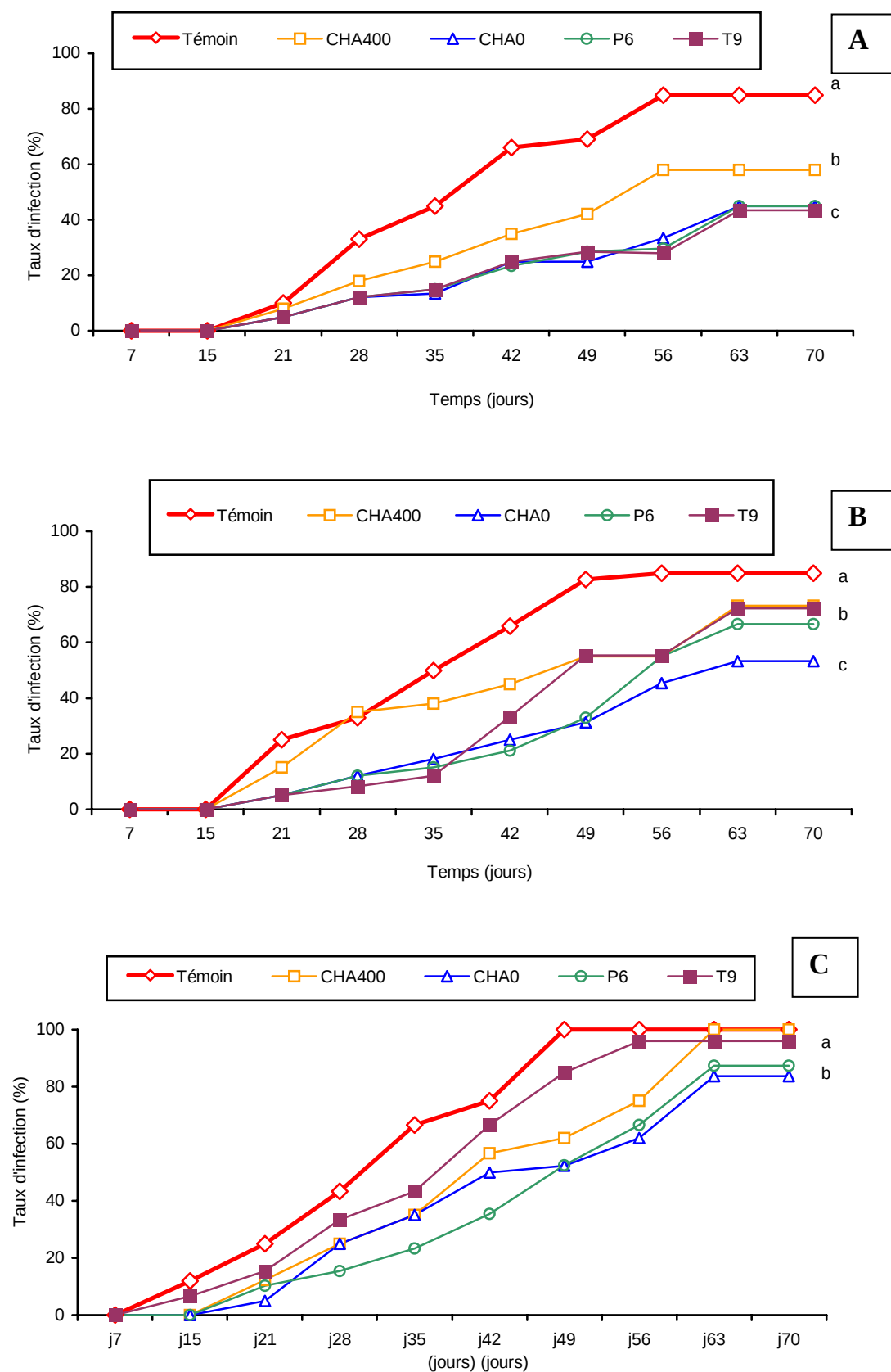


Figure V.11: Evolution des maladies causées par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en non split (A), en split (B) et *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (C)

L'activité enzymatique PAL a été plus élevée chez les plants bactérisés par les souches CHA0 et P6 et infectés par l'agent fongique Fol avec 27,50 et 24,00 nmol d'acide cinnamique/min/mg de protéines. La bactérisation avec la souche T9 a également induit une activité PAL appréciable de l'ordre de 17,35 nmol d'acide cinnamique/min/mg de protéines, suit de loin la souche CHA400 (09,33 nmol d'acide cinnamique/min / mg de protéines) et enfin le témoin non bactérisé (03,75 nmol d'acide cinnamique/min /mg de protéines) (Tableau V.7).

Dans l'essai d'induction systémique de la résistance de plants de tomate vis à vis de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, l'activité PAL détectée a été relativement faible par rapport à l'expérimentation précédente. Le maximum d'activité enzymatique PAL a été noté chez les plants bactérisés avec la souche CHA0 (07,45 nmol d'acide cinnamique/min /mg de protéines), suivi de près par ceux bactérisés par la souche P6 (06,75 nmol d'acide cinnamique/min/mg de protéines). Les deux autres souches n'ont pas induit une activité PAL significativement différente de celle du témoin malade non bactérisé (Tableau V.7).

Tableau V.7 : Effet de la bactérisation par les souches de *Pseudomonas* sur l'activité PAL des plants infectés par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

Souches	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Fol) Split		<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	
	Protéines totales *	PAL **	Protéines Totales	PAL
Témoin	120 c	03,75 d	114 c	02,65 b
CHA400	185 b	09,33 c	113 c	03,56 b
CHA0	235 a	27,50 a	138 a	07,45 a
P6	214 a	24,00 a	128 ab	06,75 a
T9	169 b	17,35 b	117 c	03,35 b

* Protéines totales /mg de poids frais (μg / mg de poids frais foliaire)

** PAL : Activité Phényle ammonia lyase (nmol d'acide cinnamique/min. mg de protéines)

La détection de l'agent pathogène, apporté lors de l'infestation des plants, a révélé la présence de l'isolat fongique au niveau de la majorité des fragments de collet des plants traités. La présence de l'agent phytopathogène indique clairement que la maladie a été inhibée ou atténuée par les souches de *Pseudomonas* bactérisées. Chez les plants inoculés par *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, la présence d'invasion vasculaire était très perceptible (symptômes typiques du chancre bactérien) (Figures 13 et 14).

V.3.4. RECEPTIVITE DU SOL A *Fusarium oxysporum f.sp. lini*

L'étude de la réceptivité du sol au *Fusarium oxysporum f.sp. lini*, par l'inoculation du sol avec des concentrations croissantes de l'agent pathogène et l'observation du développement de la maladie sur les plants de lin, a montré clairement que l'augmentation de la concentration de l'inoculum fongique s'est traduite par une augmentation du taux de plants malades (Figure V.15). Aussi les taux d'infection enregistrés ont été proportionnels avec la concentration de l'inoculum fongique, avec un coefficient de corrélation de 0,8957. Ce constat confirme bien que le sol utilisé dans nos essais permet une bonne activité microbienne révélée par l'installation du pathogène, son développement et l'expression de son pouvoir pathogène au contact des plants de lin.

La bactérisation des sols a permis une inhibition de l'agent pathogène *Fusarium oxysporum f.sp. lini* par les trois souches de *Pseudomonas fluorescens* P6, CHA400 et C7R12, de manière égale ; il y a une réduction significative du taux de plants malades, par rapport au sol non bactérisé, donc diminution de la réceptivité du sol à l'agent pathogène (Figures V 15, A et B).

L'amendement du sol par du glucose a influencé positivement l'évolution du taux d'infection des plants de lin, donc l'activité du pathogène *F.o f.sp. lini* et par conséquent l'inhibition des propriétés antagonistes des trois souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Le taux d'infection était négligeable dans le sol non amendé en glucose et a augmenté proportionnellement avec la concentration dans le sol de ce substrat; ainsi,, les coefficients de corrélation enregistrés de 0,8658 à 0,9243 indiquent bien que l'apport du glucose a induit un accroissement du taux d'infection, malgré la présence des trois souches antagonistes de *Pseudomonas*. (Figure 15B).

Les apports en EDTA ont influencé l'évolution du taux d'infection de façon variable selon les souches bactériennes. En effet, avec les souches P6 et C7R12, on a enregistré des coefficients de corrélations respectifs de 0,89970 et 0,8000 traduisant une diminution de l'infection; alors qu'avec la souche CHA400, on a noté un accroissement de l'infection confirmé par un coefficient de corrélation de 0,9737. Ceci montre que l'addition de l'EDTA a stimulé ou n'a pas eu d'effet sur le pouvoir antagoniste des premières souches, mais a inhibé celui de la souche CHA400, qui, rappelons le, est un mutant déficient en synthèse de pyoverdines (Figure V.15C).

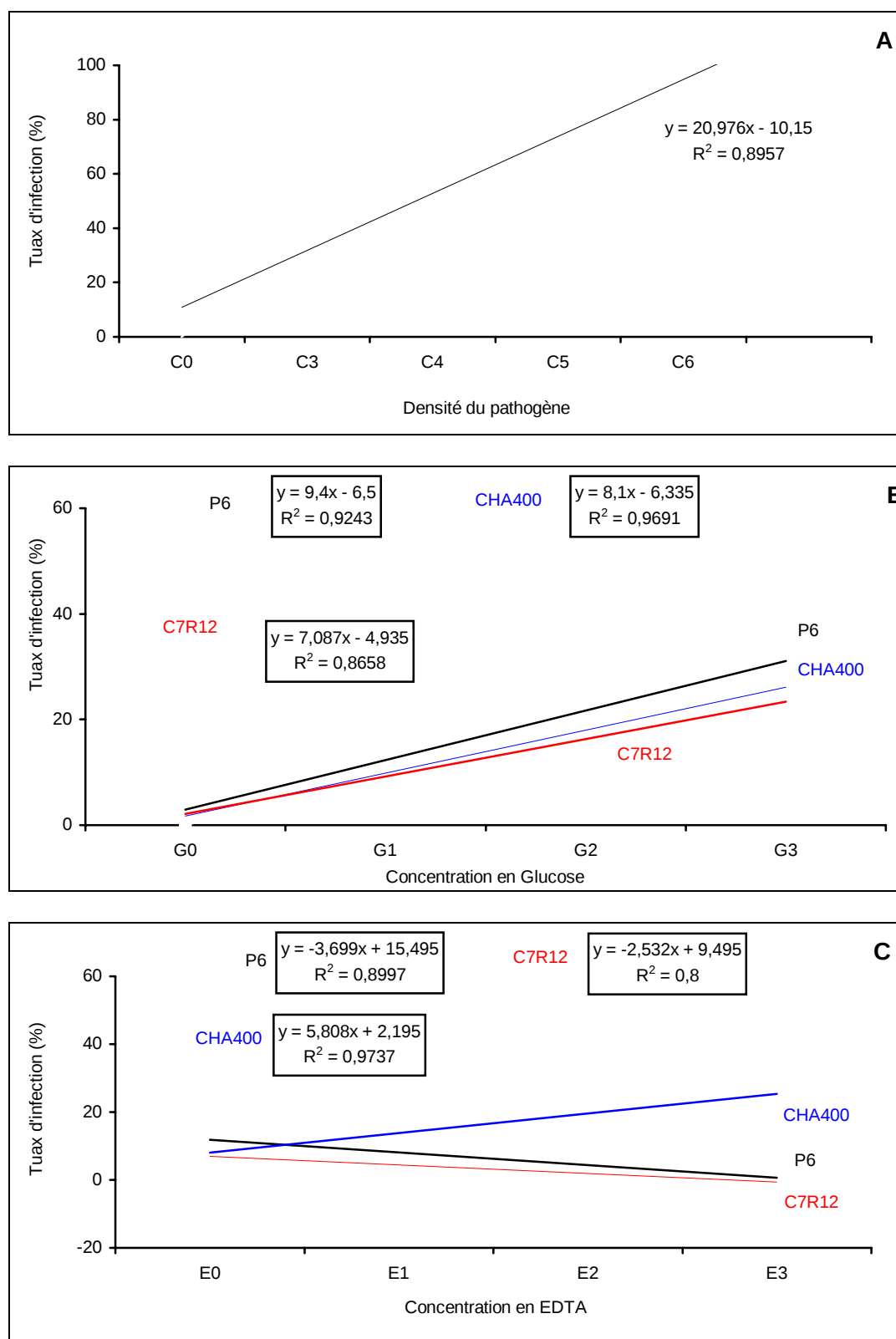


Figure V. 15: Corrélation entre le taux d'infection avec la densité de l'inoculum fongique (A), avec la concentration en glucose (B) et avec EDTA (C).

C0, C1, C2, C3, C4 et C5 correspondent à 0, 10^3 , 10^4 , 10^5 et 10^6 conidies /g de sol.

G0, G1, G2 et G3 correspondent à 0, 50, 100 et 150 μg de glucose / g de sol.

E0, E1, E2 et E3 correspondent à 0, 50 et 100 et 150 μg d'EDTA /g de sol.

DISCUSSION

Un effet antagoniste, *in vitro*, vis à vis des trois formes spéciales (lycopersici, lini et albedinis) de *F. oxysporum* et *Pythium ultimum*, a été observé pour les cinq souches de *Pseudomonas* testées. Les effets majeurs ont été obtenus contre *Pythium ultimum*, qui se présente comme l'agent le plus sensible.

Les trois milieux de culture utilisés ont permis l'expression de l'antagonisme par les cinq souches de *Pseudomonas*, et ce malgré les différences dans leur composition chimique et leur influence sur la synthèse de métabolite dont le rôle dans le biocontrôle est reconnu, à l'exemple du milieu KB qui favorise la synthèse de sidérophores, contrairement au milieu PD.

L'inhibition de la germination conidienne et de l'élongation du tube germinatif observée sur le milieu PD suggère qu'elle n'est pas due à l'action des sidérophores, mais à d'autres mécanismes développés par les bactéries; à la différence de la germination conidienne inhibée sur le milieu KB, qui peut être liée à la présence des sidérophores.

L'action antagoniste des souches ne semble pas être spécifique de l'agent pathogène, elle dépend du milieu de culture et elle peut être dans certains cas à large spectre, agissant en même temps sur les quatre isolats cryptogamiques. La variabilité dans l'expression de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* dans les trois milieux de culture suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le biocontrôle. Outre le déterminisme multifactoriel de l'antagonisme, nos résultats soulignent la possibilité d'un effet à large spectre affectant de façon non spécifique les trois formes spéciales de *F. oxysporum* et *Pythium ultimum*.

D'une façon globale, les souches de *Pseudomonas* les plus actives ont été P6, B3 et T9, leur performance peut être corrélés à leur pouvoir métabolique, notamment secondaire.

Le fer est un élément indispensable à la germination conidienne. La production en quantité importante de métabolites chélateurs de Fe^{+3} , permet aux *Pseudomonas* spp. fluorescents de s'approprier le fer nécessaire à leur croissance et de le rendre inassimilable pour les autres microorganismes (Lemanceau *et al.*, 1986; Jacques *et al.*, 1993). Des effets inhibiteurs par des pseudobactines purifiées des souches WC358 et WC417 de *Pseudomonas putida* ont été obtenus *in vitro* sur la germination conidienne de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Duijff *et al.*, 1993) et de *F.oxysporum* f.sp.*lini* (Reddy, 1992). Cependant Weller *et al.*, (1988) ont rapporté que la compétition pour le fer n'est pas le seul mode d'action des *Pseudomonas* spp. fluorescents antagonistes. Fravel (1988) a montré l'absence de corrélation entre l'activité antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents et la concentration en pigment fluorescent, même si ces bactéries

sont plus aptes que les *Fusariums* à mobiliser le fer. Ces rhizobactéries possèdent d'autres mécanismes inhibiteurs, qui peuvent être liés à la synthèse d'antibiotiques et à d'autres types de métabolites secondaires à effet d'antibiose (Lemanceau, 1988; Lemanceau, 1992).

D'après les travaux de Howell et Stipanovic (1980), de nombreuses molécules antibiotiques sont impliqués, notamment la pyolutéorine et la pyrrolnitrine. Ces antibiotiques ont inhibé *in vitro* la croissance de *Pythium ultimum* et de *Rhizoctonia solani*. Il a été démontré également que certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* ont la capacité de produire le 2,4 diacétylphloroglucinol (Phl) qui se caractérise par des effets d'antibiose (Keel et al., 1990, 1991).

D'après les travaux de Défago et al., (1990), la souche CHA0 de *Pseudomonas fluorescens* synthétise de l'acide salicylique, un produit toxique sur de nombreux pathogènes des plantes (Singhi, 1978). Des essais *in vitro* ont montré que la réduction de la croissance des hyphes de *F.o. f. sp. raphani* est obtenue seulement à des concentrations élevées d'acide salicylique (Leeman et al., 1996).

Howie et Suslow (1991), ont montré que la souche HV37a de *P. fluorescens* produisant un composé "oomycine A" responsable à une limite de 70% de sa capacité de cette souche à réduire l'infection racinaire due à *Pythium ultimum* et approximativement au niveau de 50% de l'augmentation de l'émergence des plantules du coton.

D'après les travaux de Défago et al., (1990), l'acide cyanhydrique produit par la souche CHA0 de *P. fluorescens* est responsable de la réduction de la maladie causée par *Thielaviopsis basicola* sur tabac, *Pythium ultimum* sur concombre et cresson et *Rhizoctonia solani* sur coton.

L'origine rhizosphérique (biotope) des souches de *Pseudomonas* ne semble pas jouer un rôle dans leur pouvoir antagoniste *in vitro* ; ainsi, les souche T9 et D2 isolées respectivement des biotopes de tomate et du palmier dattier n'ont pas présenté de manière spécifique ou régulière un antagonisme vis à vis de *F.o. f.sp lycopersici* et *F.o. f.sp albedinis*.

Les essais d'antagonisme conduits *in situ* vis à vis des fusarioses de la tomate, du lin et du palmier dattier ont mis en évidence une action globalement similaire des souches de *Pseudomonas* actives. Cette action s'est traduite par une réduction du taux d'infection (nombre de plants malades) et de la sévérité des symptômes. Les souches P6, CHA400, CHA0 et D2 ont exercé un contrôle sur la maladie, contrairement à SN1 et T9. Toutes les souches actives présentent un profil de synthèse de métabolites secondaires qui les prédisposent à un pouvoir de bioprotection.

Concernant *Pythium ultimum*, ce sont les souches B3 et T9 qui ont montré un grand pouvoir de biocontrôle. Howell et Stipanovic (1980) ont montré que l'utilisation des rhizobactéries

a augmenté de 71 % la survie des plantules de blé, dans un sol infesté par *Pythium ultimum*. L'utilisation des rhizobactéries a donné une diminution de 26 % de l'infection racinaire du coton causée par ce pathogène induisant des gains en émergence de 20 à 25 % (Thomashow, 1991).

Il a été signalé que les pyoverdines de *Pseudomonas* sont aussi impliquées dans le biocontrôle de la pourriture molle de la pomme de terre provoquée par *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Kloepper, 1983; Coyler et Mount, 1984).

L'inefficacité des souches T9 et D2 vis à vis de *F.o. f.sp lycopersici* et *F.o. f.sp albedinis* conforte l'absence de relation entre le biotope rhizosphérique d'origine de la souche et son action. Cependant, l'absence de pouvoir antagoniste chez la souche SN1, issue du sol nu non rhizosphérique, montre que le caractère rhizosphérique des souches, indépendamment du biotope, semble jouer un rôle primordial dans le biocontrôle, ceci est sûrement en rapport avec leur capacité d'adaptation et leur compétitivité rhizosphérique acquises.

La comparaison du biocontrôle de *F.o. f.sp lycopersici* par des souches de *Pseudomonas* en sol naturel et en sol désinfecté a montré que cet effet est plus important en sol naturel. Dans ce dernier, la compétition à laquelle sont confrontées les souches de *Pseudomonas* est plus importante en raison de la flore bactérienne et fongique indigène préexistante qui s'ajoute à l'agent phytopathogène introduit. Dans le sol désinfecté, cette concurrence a été préalablement éliminée permettant aux souches bactériennes d'exercer leurs potentialités d'antagonisme exclusivement à l'encontre du pathogène introduit dans le sol. De nombreuses études ont révélé de meilleures performances de biocontrôle dans des conditions défavorables ; il semble que celles-ci stimulent plus les communautés antagonistes et activent le maximum de leurs mécanismes d'action avec pour conséquences des effets bénéfiques directs et indirects sur la croissance végétale.

Les végétaux sont des organismes sessiles, pour se défendre vis à vis des attaques d'une multitude d'agents pathogènes ils possèdent une panoplie de mécanismes inductibles et constitutifs de résistance. Les plantes, durant leur processus d'évolution ont développé des stratégies sophistiquées de défense pour percevoir les attaques des agents phytopathogènes et traduire cette perception en une réponse adaptative (Slusarenko *et al.*, 2000).

La résistance la plus rencontrée est celle du type non-hôte qui s'exprime lorsque la plante se trouve en contact avec un agent pathogène incapable de l'infecter (Agrios, 1997). En l'absence de la résistance non-hôte, la plante devient susceptible et ses réactions seront lentes par rapport au développement du pathogène. Chaque plante possède une résistance dite basale mais son efficacité dépend des mécanismes et des voies de sa mise en œuvre après la perception de la présence du

pathogène. L'induction systémique de la résistance (ISR) vis à vis des agents phytopathogènes est une composante de la panoplie des mécanismes développés par la plante résultante de son interaction avec son environnement, notamment microbienne.

Nos expérimentations ont mis en évidence une ISR chez la tomate vis à vis de *F.o. f.sp. lycopersici* par les souches de *Pseudomonas*. Cette résistance a eu pour effet la réduction de la maladie de façon relativement importante, par rapport à la réduction observée dans les conditions classiques d'interaction directe agent phytopathogène- bactérie antagoniste ; ceci augure du rôle important joué par ce mécanisme dans la protection biologique de la plante.

Il est à noter que les souches de *Pseudomonas* testées sont productrices de métabolites qui peuvent être impliqués dans l'ISR, à l'exemple des sidérophores, phénazines, acide salicylique et HCN.

Plusieurs auteurs suggèrent que la production d'HCN, de la pyolutéorine (plt) et de phloroglucinol provoquerait chez la plante un stress auquel elle réagirait par une augmentation de son système racinaire et sa résistance naturelle (Défago et al., 1990 ; Keel et al., 1992 ; Maurhofer et al., 1992). L'acide salicylique et les pyoverdines produits par les souches de *P. fluorescens* provoquent un signal local ou systémique induisant une résistance du tabac contre le virus de la nécrose du tabac (TNV) (Maurhofer et al., 1994; Maurhofer et al., 1998).

Les *Pseudomonas* spp fluorescents peuvent stimuler la production de composés biochimiques liés aux mécanismes de défense de la plante hôte (Albert et Anderson, 1987 ; Zdor et Anderson, 1992 ; M'piga et al., 1997). Selon Wei et al., (1991), l'action de l'induction de la résistance systémique comme mécanisme de contrôle biologique, est une conséquence de l'activation des mécanismes actifs de défense de la plante qui sont stimulés par des agents inducteurs; tandis que l'antagonisme microbien présente des actions directes et parfois cumulées comme la compétition trophique et la production d'antibiotiques, de sidérophores et d'HCN.

La résistance induite recouvre un ensemble de mécanismes par lesquels une plante d'un génotype sensible à une maladie acquiert un caractère résistant après avoir été traité par un stress biologique (Semal, 1989). La résistance basale est souvent dépendante de l'une ou de plusieurs phytohormones, telles que l'acide jasmonique (AJ), l'éthylène (ET) et l'acide salicylique (AS) (Van Loon, 2000a; Van Loon, 2000b; Pieterse et al., 2000a; Pieterse et al., 2000b; Pieterse et al., 2002b; Hammerschmidt et al., 2001; Knoester et al., 2001; Hase et al., 2003; Spoel et al., 2003; Pozo et al., 2005). La résistance des plants de tomates bactérisés par des souches de *P. fluorescens* à *F.o. f. sp. radialis lycopersici* est surtout associée à l'induction de la formation de barrières structurales et

biochimiques affectant défavorablement la croissance et le développement du pathogène (M'piga *et al.*, 1997). Van Peer *et al.*, (1991) et Duijff *et al.*, (1993) ont mis en évidence une induction de la résistance systémique de l'œillet vis-à-vis de *F.o. f. sp. dianthi* par la souche WCS417r de *P. fluorescens*, cet effet est accompagné par une accumulation de phytoalexines chez les plants.

La résistance de la plante, donc l'inhibition de l'effet délétère du pathogène, peut être perçue à travers l'activité de biosynthèse des protéines totales ou de certains enzymes spécifiques notamment la phénylalanine ammonia lyase (PAL) qui est augmentée ; les résultats des dosages de ces paramètres confortent les observations précédentes. Dans de nombreux essais portant sur l'ISR, il a été révélé l'implication d'un large panel d'enzymes notamment la peroxydase, lipoxygénase, phénylalanine ammonia lyase, β 1,3- glucanase et chitinases (Van Loon, 1997; 1998). Les enzymes associées à l'effet ISR participent dans le renforcement des potentialités de défense de la plante sur le plan physique (lignification) ou sur le plan chimique (quinones) en consolidant les barrières de défense naturelle de la plante (Silva *et al.*, 2003). Elles peuvent intervenir en qualité d'éléciteurs, individuellement ou en synergie, à l'exemple de β 1,3-glucanase et les protéines PR (proteins related) (Van Loon, 1994). La PAL génère des précurseurs pour la biosynthèse de la lignine et d'autres composés phénoliques qui s'accumulent en réponse à l'infection (Silva *et al.*, 2003). L'accumulation de ce type d'enzymes dépend de l'agent inducteur en premier lieu, mais aussi du génotype végétal, des conditions physiologiques et des mécanismes d'action de l'agent phytopathogène (Tuzun, 2001).

Chez des plants de tomate bactérisés avec des rhizobactéries, il a été constaté une augmentation sensible des activités enzymatiques, notamment en peroxydase et en lipoxygénase après des infections fongiques par *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola*, *Oidium lycopersici*, *Stemphylium solani* et de l'infections bactérienne par *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Silva *et al.*, (2003). Selon Podile et Laxmi (1998), l'activité PAL est directement liée au processus de lignification et des niveaux élevés de cette enzyme ont été détectés 24 h après l'infection initiale. De même, Meena *et al.*, (1997) ont montré qu'une application foliaire de *P. fluorescens* induit l'activation de l'enzyme PAL, de la chitinase et de la β -1.3- glucanase ainsi qu'une accumulation des composés phénoliques dans les feuilles du riz. Hynes et Lazorovits (1989) ont signalé une augmentation des protéines " PR " dans les feuilles de haricot suite à un traitement des semences par les *P. fluorescens*. Ces protéines seules ou en combinaison ont présenté une activité antifongique (Datta et Muthukrishnan, 1999).

L'investigation d'une possible diminution de la réceptivité du sol à l'agent pathogène, dans notre cas *F.o. f.sp lycopersici* (Fol), par la bactérisation du sol par les souches de *Pseudomonas*

après infestation par Fol a montré une réduction significative de la maladie, donc une moindre prédisposition du sol à la propagation de l'agent fongique.

Par ailleurs l'amendement du sol par le glucose a eu un effet négatif sur la protection des plants de tomate par les souches de *Pseudomonas*. L'addition de l'EDTA, qui diminue notamment la concentration en fer dans le sol, a stimulé ou n'a pas eu d'effet sur le pouvoir antagoniste des souches productrices de sidérophores, tandis qu'on a observé le contraire avec la souche mutante CHA400 (pvd-)

D'après Van Peer et *al.*, (1991), les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents agissent directement sur la physiologie et le métabolisme de la plante, en améliorant son alimentation minérale et sa croissance.

Scher et Baker (1982) et Lemanceau et *al.*, (1988) ont démontré l'implication des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la résistance des sols de Salinas Valley (Californie, USA) et de Châteaurenard (France). Dans les conditions de carence en fer, les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent les pyoverdines qui rendent le fer non disponible pour les *Fusarium*; la croissance des tubes germinatifs issus de leurs chlamydospores est réduite, ce qui diminue les risques d'infection des racines (Scher et Baker, 1982). Ces auteurs ont pu augmenter le niveau de résistance de certains sols soit par l'apport de chélates de synthèse, soit par introduction des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. La promotion de la croissance du blé par la suppression de la pourriture racinaire causée par *Pythium* a été obtenue par l'utilisation de la souche de *Pseudomonas* sp. B324, cet effet n'a pas été observé en présence du mutant de cette souche, non producteur de sidérophores (Becker et Cook, 1988).

Alabouvette et *al.*, (1985), ont démontré que le niveau de réceptivité du sol est en relation avec leur niveau énergétique. Le carbone est un élément indispensable à la germination de *Fusarium*, celle ci étant soumise à la fongistase des sols. Lemanceau et Alabouvette (1988) ont montré que l'enrichissement des sols avec le glucose provoque une augmentation de la gravité de la maladie.

V.-4 CONCLUSION

Les souches *Pseudomonas* ont montré, *in vitro*, des effets inhibiteurs appréciables sur la croissance mycélienne, la germination conidienne et l'élongation du tube germinatif de quatre isolats fongiques phytopathogènes. Ces activités ont été exprimées dans les trois milieux de culture

utilisés (KB, PDA, KB+PDA). *Pythium ultimum* apparaît comme l'agent phytopathogène le plus sensible aux actions des *Pseudomonas*.

Les essais d'antagonisme *in situ* par bactérisation des plants ont révélé une inhibition des maladies à des degrés variables, qui s'est traduit par une réduction du taux d'infection et de la sévérité des symptômes. Les meilleures performances ont été obtenues en sol naturel par rapport aux conditions gnotobiotiques. Les meilleures activités antagonistes ont été induites par les souches bactériennes ayant l'aptitude à synthétiser des métabolites secondaires tels que les phénazines, l'acide cyanhydrique et les sidérophores. Par ailleurs, la rhizosphère impose une pression de sélection sur les souches qui acquièrent une adaptation et une compétitivité rhizosphérique qui les prédispose au rôle d'antagoniste.

Une résistance systémique des plants de tomate vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* a pu être induite par des souches de *Pseudomonas*, celle-ci est étayée par un accroissement de la biosynthèse des protéines totales et d'enzyme spécifique, la PAL.

La bactérisation du sol avec les souches de *Pseudomonas* après infestation de celui-ci par l'agent pathogène a permis de mettre en évidence une diminution de la réceptivité du sol au pathogène. Cet effet peut être modulé par l'équilibre nutritionnel dans le sol, comme le révèle les amendements en glucose et en EDTA apportés au sol.

Nos résultats montrent que les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, sélectionnées sur la base d'un maximum de propriétés génétiques, physiologiques, métaboliques et écologiques reconnus dans l'antagonisme, peuvent constituer un moyen de lutte biologique efficace. L'action non spécifique des souches vis à vis des phytopathogènes, la variabilité des réponses en fonction de l'environnement et la diversité des mécanismes mis en jeu et même dans certains cas redondants dans leur action, font que l'efficacité des souches doit être recherchée à travers :

- La superposition d'un maximum de caractères intervenant dans l'antagonisme.
- La sélection chez la souche de caractères ayant le même mécanisme d'action ou cible sur le pathogène, pour cumuler et renforcer l'effet de biocontrôle.
- L'association de souches à propriétés différentes dans le but au mieux de synergiser leurs effets ou au moins obtenir une action additive. Ceci permettrait une intensité dans l'effet et/ou un spectre élargi.
- Le génie génétique peut répondre à ces approches par la construction de souches génétiquement modifiées

V-1. INTRODUCTION

Les microorganismes utilisés dans la lutte biologique protègent la plante, d'une part en inhibant les agents pathogènes et d'autre part en favorisant sa croissance. Ces deux propriétés sont souvent le fait d'une même souche (Kloepper, 1993), leur déterminisme est en grande partie commun. Le contrôle biologique est principalement en relation avec la résistance aux stress, l'effet d'antibiose et la compétition trophique. La biostimulation de la plante est liée à la réduction des populations des agents pathogènes ou délétères à des seuils sans gravité pour la plante ; en effet, outre leur parasitisme strict, les phytopathogènes telluriques, tels que les pythiacées radiculaires, peuvent causer, à certains seuils de densités microbiennes, des réductions de vigueur et de rendement des plants. D'autres mécanismes de stimulation de la croissance végétale impliquent des métabolites d'origine microbienne (De Weger *et al.*, 1986; Becker et Cook, 1988; Kloepper *et al.*, 1989; Lemanceau, 1992 ; Duijff *et al.*, 1994a; Bol *et al.*, 1996; Beyeler *et al.*, 1999; Bloemberg et Lugtenberg, 2001).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des rhizobactéries qui présentent des aptitudes à stimuler la croissance végétale (Lemanceau et Samson, 1983). Des effets précis de ces microorganismes ont été rapportés dans l'amélioration de la germination et de la levée (EPR: Emergence Promoting Rhizobacteria) (Kloepper, 1991), et l'accroissement de la phytomasse ainsi que l'amélioration des rendements des cultures (Kloepper *et al.*, 1980a; Kloepper *et al.*, 1991 ; Lemanceau, 1992 ; Bashan et Holguin, 1997; Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Ryu *et al.*, 2004; Liyan et Wilhelm, 2004). Il a été rapporté aussi que certaines souches favorisent la nodulation dans les interactions *Rhizobium*-légumineuses (NPR : Nodulating Promoting Rhizobacteria) (Grimes et Mount, 1987 ; Polonenko *et al.*, 1987). Différents mécanismes ont été avancés pour la promotion de la croissance végétale; tels que la synthèse par les bactéries des phytohormones et de leurs précurseurs et l'amélioration de la nutrition minérale dans le sol. (Timmusk *et al.*, 1999; Loper et Schroth, 1986),

Les mécanismes précis des propriétés de phytostimulation des rhizobactéries restent cependant un champ d'investigation ouvert ; ainsi, bien que des métabolites microbiens, produits *in vitro*, soient analogues à des composés intervenant dans la physiologie et la croissance des plantes, notamment les phytohormones ; leur action, *in situ* «dans la rhizosphère», reste à élucider dans un contexte d'interactions complexes sol-plante-agents microbiens.

Dans cette partie de notre travail, nous avons testé les aptitudes de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sélectionnées dans la promotion de la croissance végétale, dans des conditions expérimentales excluant l'intervention de l'effet de biocontrôle.

V-2. MATERIELS ET METHODES

V-2.1. SOUCHES BACTERIENNES

Quatre souches de *Pseudomonas fluorescens* (B3, P6, T9 et SN1) ont été utilisées dans les essais de promotion de la croissance végétale. Ces souches ont été retenues sur la base de leur biotope d'origine et leur production de métabolites secondaires, qui pourraient jouer un rôle dans la biostimulation, notamment l'AIA, l'HCN et les phosphatases, (cf. chapitre III) (Tableau VI.1).

Tableau VI.1 : Souches de *Pseudomonas fluorescens*

Souches	Biotope d'origine	Caractéristiques
P6	Pomme de terre	Pvd +, HCN +, AIA +, Phos +, phz +, NaCl (4 %)*,
B3	Blé dur	Pvd +, HCN +, AIA -, Phos +, phz +, NaCl (4 %),
T9	Tomate	Pvd +, HCN -, AIA +, Phos -, phz +, NaCl (4 %),
SN1	Sol non cultivé	Pvd +, HCN -, AIA -, Phos -, phz -, NaCl (4 %),

Pvd : pyoverdines, HCN : acide cyanhydrique, AIA: acide indole acétique, Phos :phosphatases, phz: phénazines, NaCl : chlorure de sodium, + : synthèse, - : absence de synthèse
* : souches tolérant *in vitro* la présence de NaCl dans le milieu de culture (4 %).

V-2.2. PRESENTATION DES ESSAIS

L'inoculum bactérien a été préparé dans le tampon (MgSO₄. 7H₂O, pH 7) à partir de cultures de 24 h à 25°C sur milieu KB. La densité des suspensions bactériennes a été ajustée par spectrophotométrie ($\lambda = 620$ nm).

Trois types d'expérimentation ont été réalisés :

- Le premier type a consisté en la bactérisation des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* var. claustar) en trois essais distincts :
 - Essai (A) : sol déjà cultivé en pomme de terre, depuis au moins cinq années consécutives, provenant de la région de Tipaza.
 - Essai (B) : le sol utilisé en (A) soumis à une désinfection pour éliminer ou inhiber l'effet de la microflore indigène. Le sol a été désinfecté par autoclavage (trois autoclavages à 120 °C pendant 30 minutes, espacés de 24 heures).
 - Essai (C) : Sol non cultivé depuis au moins une décennie, provenant de la station expérimentale du Département d'Agronomie (Université de Blida).

- Dans le deuxième type d'expérimentation, la bactérisation a été effectuée sur les semences de trois variétés de blé dur (*Triticum durum*): Mohamed ben bachir (**V1**), Oued zenati (**V2**) et Vitron (**V3**).
- Le troisième type d'essais a consisté à étudier les effets de bactérisation sur la croissance du haricot (*Phaseolus vulgaris* var. moliere) et de la tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill, var marmande) cultivées en hydroponie (hors sol).

Les tubercules de pomme de terre et les semences des espèces végétales testées (blé, tomate et haricot) ont été désinfectées à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (10 %) (20 minutes), suivi de cinq lavages consécutifs avec de l'eau distillée stérile. Dans chaque essai, le sol a été tamisé (2 mm) et réparti en pots ou en terrines, préalablement désinfectés à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (10%) et rincés à l'eau stérile.

V-2.1.1. CONDUITE DES ESSAIS ET BACTERISATION

Pomme de terre : Les tubercules de pomme de terre ont été bactérisés (10^6 ufc/g de support) selon la technique de pelliculage décrite par Digat (1988, 1989) (cf. IV-5.2.1). Les tubercules bactérisés ont été plantés individuellement dans des pots contenant 5 Kg de sol selon les essais A, B ou C et arrosés quotidiennement à l'eau stérile. Sept jours après la plantation, un rappel de bactérisation a été réalisé en versant autour du tubercule 100 ml de suspension bactérienne à 10^6 ufc/ml. Les essais ont été réalisés selon un dispositif expérimental en quatre blocs aléatoires. Chaque souche bactérienne a été appliquée sur 25 plants par bloc, soit 100 plants pour chaque essai.

Blé dur: Les semences désinfectées ont été plantés dans des terrines (0,5m x 0,75m x 0,2 m) contenant un substrat désinfecté (tourbe + sol; 1/3 - 2/3). Les grains ont été déposés dans la suspension bactérienne (10^6 ufc/ ml) pendant 20 minutes et semés à raison de 125 grains par terrine. Chaque terrine a été bactérisée à la concentration finale de 10^6 ufc/g de sol. L'essai a été réalisé en quatre blocs aléatoires complets, soit 500 plants (125 x 4) pour chaque traitement (souche bactérienne x variété).

Tomate et haricot (hydroponie) : Le substrat de culture utilisé est composé d'un mélange de gravier fin de rivière (3 à 5 mm de diamètre) et de la tourbe (1/2, 1/2). Après leur désinfection, les grains de tomate et de haricot ont été mis à prégermer pendant 48 h à 25 °C, dans des boîtes de Pétri tapissées de papier absorbant imbibé d'eau distillée stérile. Les grains prégermés ont été transférés dans des pots en plastique (217 ml) remplis de substrat et irrigués quotidiennement avec une solution nutritive (Annexe VI.1).

Le substrat de culture a été bactérisés 24 h avant la plantation à raison de 10^6 ufc/g. Les traitements testés ont été répartis selon un dispositif expérimental en quatre blocs aléatoires complets où chaque traitement a été représenté par 25 plants par bloc, soit 100 plants par essai. Les témoins, non bactérisés, ont été préparés selon le même protocole, spécifique à chaque essai, avec l'eau distillée stérile en remplacement des suspensions bactériennes. Tous les essais ont été conduits sous serre en verre (22 à 25 °C).

V-2.1.2. PARAMETRES DE CROISSANCE

Les effets de la bactérisation sur la croissance des plantes ont été évalués à travers les paramètres de croissance de chaque type végétal.

- * **Pomme de terre** : suivi de l'évolution de la levée durant les trois premières semaines après la bactérisation et mesure des poids frais de la partie aérienne et des tubercules après 60 jours de végétation.
- * **Blé dur** : suivi de l'évolution de la levée durant les deux premières semaines après la bactérisation et mesure des paramètres de croissance (longueur cotylédonaire, surface foliaire, poids frais de la partie aérienne et poids frais de la partie racinaire) après 60 jours de la bactérisation.
- * **Tomate et haricot** : mesure des poids frais et secs des parties aériennes et racinaires après 30 jours (première coupe) et après 60 jours (deuxième coupe) de végétation.

A la fin des expérimentations, la survie des bactéries dans la rhizosphère et leur absence dans les traitements témoins ont été vérifiées au niveau du sol de 3 plants choisis aléatoirement. Un gramme de substrat a été prélevé de chaque plant et transféré dans 10 ml d'eau distille stérile. Après agitation, 100 µl de la suspension et de ses dilutions ont été étalés sur milieu KB et incubés 24 à 48 h à 25 °C.

V-2.1.3. ANALYSE DES DONNEES

Les résultats observés ont subi une analyse de variance (ANOVA). Les gains en croissance (pourcentage) obtenus ont été calculés selon la formule :

$$[(\text{Traitement bactérisé} - \text{Témoin}) / \text{Témoin}] \times 100].$$

Dans le cas où la différence est significative, les moyennes ont été comparées et classées (classement hiérarchique) selon les test de Newman-Keuls et de Dunette au seuil du risque d'erreur $\alpha = 1\%$ et 5% (Dagnelie, 1975).

V-3. RESULTATS

V-3.1. EFFET SUR LA CROISSANCE DE LA POMME DE TERRE

Dans l'essai A, le taux de levée finale a été de 100% pour les tubercules bactérisés et de 83,33 % pour le témoin. La cinétique de levée des plants bactérisés a été globalement plus rapide que celle des témoins pour toutes les souches testées (Figure VI.1A). Le même constat a été fait concernant les poids frais des tubercules et de la partie aérienne (Tableau VI.2). Les souches B3, T9 et SN1 ont eu un effet sur la levée plus prononcé que celui de la souche P6, qui est intermédiaire entre le témoin et ces 3 souches ; à l'exemple du 9^{ème} jour où on a enregistré les écarts les plus importants, illustrés par le taux de levée de 95,83% pour la souche T9 et seulement de 50% pour la souche P6, alors que chez le témoin, il est de 29,16% (Figure VI.1A).

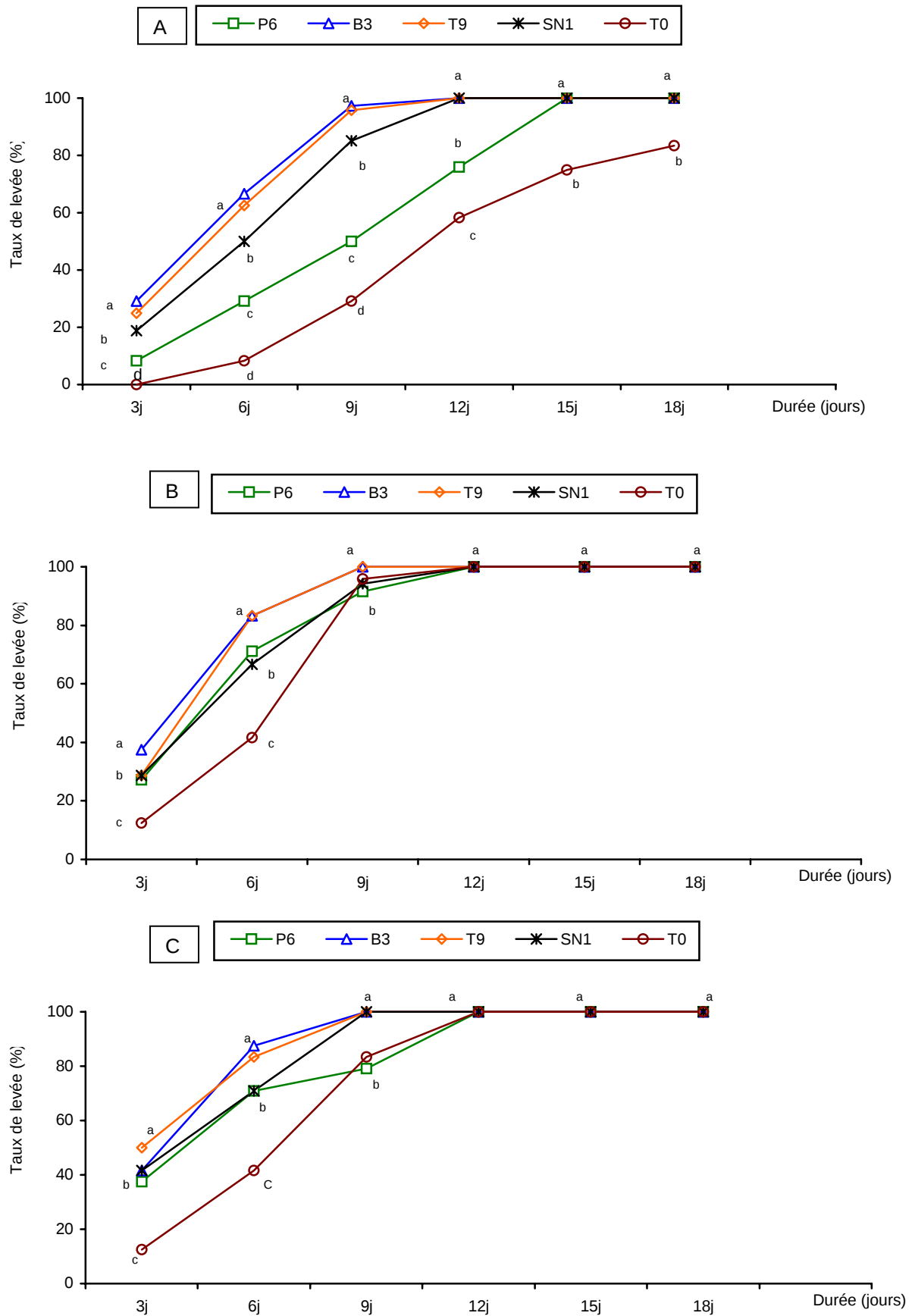
Toujours dans l'essai A, concernant la biomasse de la partie aérienne, les souches B3 et T9 ont été les plus performantes avec des gains de croissance, par rapport au témoin, dépassant les 100 %, tandis que les souches P6 et SN1 n'ont permis que des gains de 70 % et 50 %. En terme de production (poids des tubercules), on peut classer les souches selon un ordre décroissant des gains induits : B3 (183,10 %), T9 (100 %), SN1 (89,36 %) et enfin P6 (56,32 %).

Dans les essais (B) et (C), aucune différence entre les taux de levée finaux (100 %) des plants bactérisés et du témoin n'a été observée (Figures VI.1B, VI.1C). Sur le plan de la cinétique, des différences ont été observées entre les plants bactérisés, plus performants, et le témoin, principalement aux 3 et 6^{ème} jour après la plantation. La comparaison des cinétiques de levée des trois essais a montré, globalement, une allure plus accélérée pour les essais (B) et (C) par rapport à l'essai (A).

Le comportement des souches, quant à l'effet induit sur la levée, est plus homogène dans les essais (B) et (C) que dans (A). La comparaison des trois essais, sur la base de l'effet de la bactérisation, a montré (Tableau VI.2) :

- Pour la biomasse aérienne, c'est dans l'essai A où les performances obtenues ont été les plus élevées, suivi de (B) et ensuite de (C).
- Pour les tubercules, c'est dans l'essai (B) que les gains de poids ont été les plus importants, suivi de A et ensuite de (C).

Les gains en croissance ont été notablement différents selon la souche utilisée, les maximums de gain enregistrés respectivement pour la partie aérienne et le tubercule ont été pour la souche B3 de 141,14 % et 213,13 %, T9 de 122,37 % et 140,49, P6 de 69,98 % et 174,43 % et enfin pour SN1 de 49,53 % et 93,15 % (Tableau VI.2).



Pour la même période, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($\alpha = 5\%$ et 1% .)

FigureVI.1 : Taux de levée (%) en sol naturel cultivé en pomme de terre (A), en sol naturel cultivé en pomme de terre après désinfection (B) et en sol non cultivé (C).

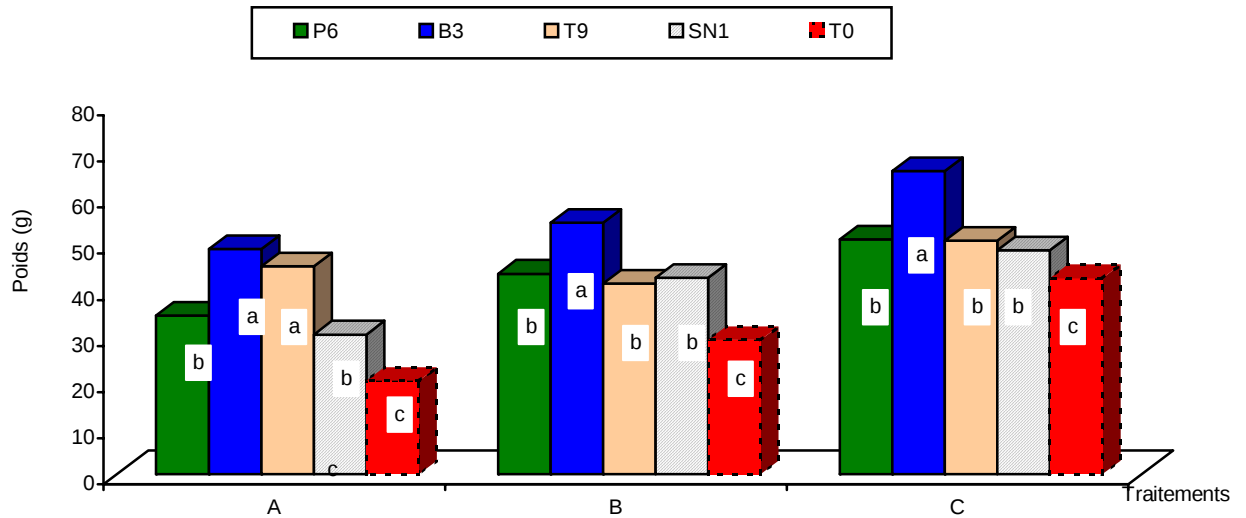
La comparaison des gains induits par la bactérisation, les quatre souches confondues, a montré que les performances des souches bactériennes étaient meilleures sur les plants conduits en sol cultivé en pomme de terre (essai A). Ceci laisse suggérer qu'en plus des effets directs de la biostimulation de la croissance végétale, il peut y avoir des effets de réduction des activités néfastes de la flore indigène déjà adaptée à cette culture. En effet, dans ce même sol désinfecté, on a bien noté une augmentation dans les paramètres de croissance, mais ces accroissements sont loin de ceux observés dans l'essai (A) avec les mêmes souches bactériennes et dans les mêmes conditions expérimentales. Ce constat a pu être confirmé par les résultats obtenus dans l'essai (C) où le sol utilisé est un sol n'hébergeant pas de microflore spécifique et adaptée à la pomme de terre (Figures VI.2 et VI.3).

Tableau VI.2 : Gains (%) en poids frais de la partie aérienne et des tubercules par rapport aux témoins

Souches	Poids frais partie aérienne			Poids frais des tubercules		
	A	B	C	A	B	C
P6	69,98 b	49,36 b	19,72 b	56,32 d	174,43 b	52,63 a
B3	141,14 a	87,19 a	54,67 a	183,10 a	213,13 a	51,96 a
T9	122,37 a	41,98 b	19,13 b	100,20 b	140,49 b	30,26 c
SN1	49,53 a	46,17 b	14,19 b	89,36 c	93,15 c	40,97 b

Les pourcentages suivis de la même lettre, pour un même traitement, ne diffèrent pas significativement au risque d'erreur ($\alpha = 5\%$ et 1% .)

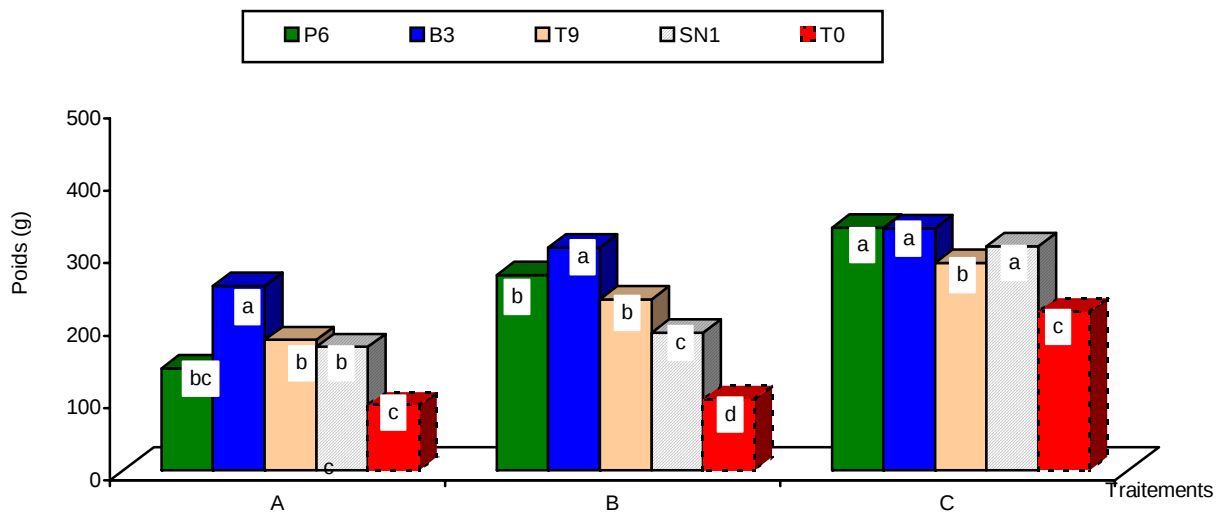
(A) : sol naturel cultivé en pomme de terre ; (B) : sol naturel cultivé en pomme de terre après désinfection ; (C) : sol nu .



Pour le même traitement, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($\alpha = 5\%$ et 1% .)

T0 : Témoin non bactérié

Figure VI.2 : Poids frais de la partie aérienne (g) en sol naturel cultivé en pomme de terre (A), en sol naturel cultivé en pomme de terre après désinfection (B) et en sol nu (C).



Pour le même traitement, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($\alpha = 5\%$ et 1% .)

T0 : Témoin non bactérié

Figure VI.3 : Poids frais des tubercules (g) en sol naturel cultivé en pomme de terre (A), en sol naturel cultivé en pomme de terre après désinfection (B) et en sol nu (C).

V-3.2. STIMULATION DE LA CROISSANCE DU BLE DUR

Les taux de levée ont été globalement plus élevés pour les semences bactériées que pour les témoins, indépendamment de la variété de blé utilisée (Figure VI.4). Néanmoins, l'analyse détaillée par variété a fait ressortir :

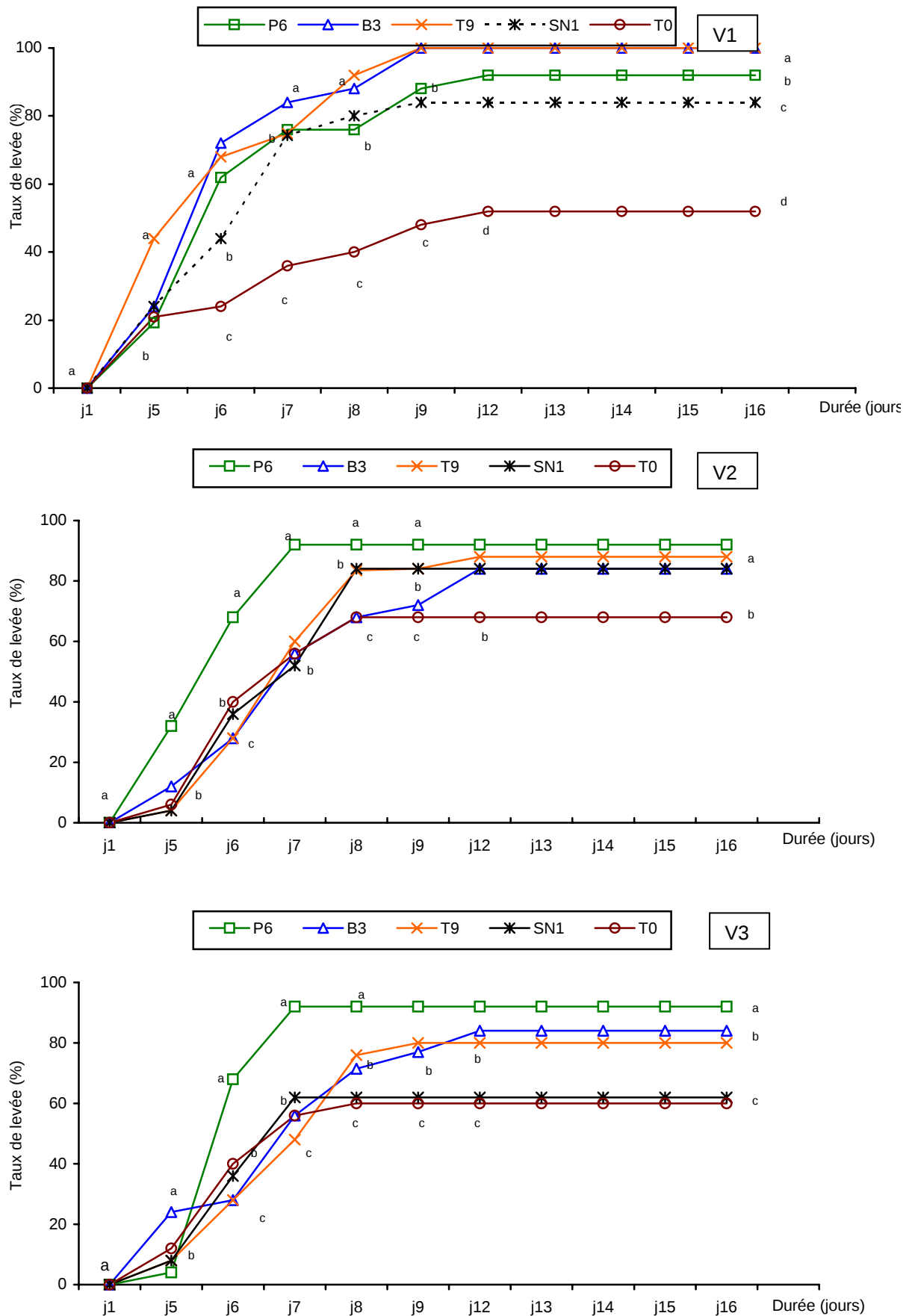
- Pour la variété V1 (Mohamen ben bachir), la différence entre les taux de levée des semences bactérisées (84 % à 100 %) et celui du témoin (52 %) est très significative.
- Pour la variété V2 (Oued zenati), le même constat que pour V1 peut être fait, cependant avec une différence entre semences bactérisées (84 à 92 %) et témoin (68 %) moins prononcée.
- Pour V3 (Vitron), sur les quatre traitements réalisés, trois ont présenté des taux de levée nettement distincts du témoin (80 à 92 %), tandis que le quatrième traitement (62 %) ne présente pas de différence significative avec ce dernier (60 %).

Les cinétiques de levée ont présenté des allures semblables pour les trois variétés de blé. Les maximums du taux de levée ont été atteints entre le 7^{ième} et 9^{ième} jour après le semis. Bien que globalement les souches bactériennes ont induit un effet positif dépassant un taux de levée de 80 % ; cependant, il faut noter la performance de la souche T9 par rapport aux autres souches pour les trois variétés de blé, et l'absence de différence entre la souche SN1 et le témoin non bactérisé pour la variété V3 (FigureVI.4).

L'analyse de la variance des paramètres de croissance mesurés sur les plants bactérisés a montré une différence significative ($P = 0.007$) par rapport aux témoins non bactérisés, cependant sans différences notables entre les trois variétés ($P = 0,128$). (TableauVI.4). Les meilleures performances ont été notées pour le poids frais racinaire et la hauteur des plants où les gains induits par la bactérisation dépassent respectivement les taux de 30 % et 94 % par rapport aux plants non bactérisés (témoins).

Comparativement au témoin, la bactérisation a induit un effet de stimulation de l'ensemble des paramètres étudiés, à l'exception de la souche SN1 avec laquelle les gains ont été d'une moindre importance par rapport aux autres souches (TableauVI.4). Ceci est illustré par les gains induits qui sont généralement classés dans les groupe (b) ou (c), alors que ceux réalisés par les autres souches sont dans le groupe (a). En poids frais racinaire, cette souche n'a pas engendré de gain significatif par rapport au témoin (TableauVI.3).

Globalement, c'est la souche P6 qui a induit les gains les plus importants suivi par les souches T9 et B3.



Pour la même période, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($\alpha = 5\%$ et 1% .)

Figure VI.4 : Taux de levée (%) du blé dur : (V1) Mohamed ben bachir, (V2) Oued Znati et (V3) vitron.

Tableau VI.3 Effet de la bactérisation sur les paramètres de croissance du blé gains (%) obtenus par rapport aux témoins non bactérisés

SOUCHES	Longueur Cotylédonaire (cm)	Longueur Foliaire (cm)	Hauteur Tige (cm)	Poids Frais aérien (g)	Poids Sec Aérien (g)	Poids Frais Racines (g)
P6	12,19 a (22,51) a	36,53 a (18,03) a	13,88 a (34,63) a	3,28 a (26,64) a	0,67 a (28,85) a	1,98 a (94,12) a
B3	11,83a (18,89)a	35,54 a (14,83) a	13,48 a (30,75) a	3,26 a (25,87) a	0,67a (28,85)a	1,53 b (50,00) b
T9	12,18a (22,41)a	37,61a (21,52) a	13,72a (33,07) a	3,22a (24,32) a	0,62a (19,23)b	1,54 b (50,98) b
SN1	11,71a (17,69)a	33,71a (8,92) b	13,51a (31,04) a	2,86 b (10,42) b	0,62 a (19,23) b	1,03 c (0,98) c
Témoin	9,95 b	30,95 b	10,31 b	2,59 b	0,52 b	1,02 c

La différence de gain entre les trois variétés étant non significatives, les gains représentés dans le tableau correspondent à la moyenne.

Pour chaque paramètre, les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas une différence significative au risque d'erreur de 5 % (test Newman-Keuls).

V-3.3. STIMULATION DE LA CROISSANCE EN CULTURES HYDROPONIQUES

D'après les résultats des tests de viabilité des populations bactériennes, le degré de colonisation en hydroponie est assez appréciable avec un seuil de 10^5 ufc/g de tourbe ou de substrat, la vérification de l'installation d'une population bactérienne de *Pseudomonas* spp. fluorescents est indispensable, elle conditionne la stimulation de la croissance végétale.

Globalement, la bactérisation a induit des gains en poids frais des parties aériennes, racinaires et du plant entier ainsi qu'en surface foliaire, aussi bien chez la tomate que le haricot.

Le mode de croissance des deux espèces végétales étant fondamentalement différent, le paramètre commun le plus représentatif de leur croissance est donc le poids frais du plant entier. Ce paramètre montre que les gains en croissance à la 2^{ème} coupe sont plus importants qu'à la 1^{ière} coupe pour le haricot, tandis que l'inverse a été observé pour la tomate.

L'importance des gains en croissance est relativement homogène pour les bactérisations conduites avec les souches P6, B3 et T9; la souche SN1 présente l'effet le moins prononcé.

Tableau VI.4 : Gains (%) en croissance chez le haricot par rapport aux témoins non bactérisés

Souches	Coupes	Hauteur plants	Poids frais foliaire	Surface foliaire	Poids frais racinaire	Poids frais total (plant)	Poids frais gousses
P6	J30	43,27 a	35,53 c	-	-	13,15 a	-
	J60	19,04 b	15,58 b	14,83 a	13,86 b	19,13 a	23,19 a
B3	J30	32,40 b	42,36 b	-	-	8,75 b	-
	J60	38,80 a	18,58 a	12,52 a	11,25 b	15,24 b	12,25 b
T9	J30	40,87 a	55,12 a	-	-	9,66 b	-
	J60	32,28 a	15,56 b	11,23 a	22,53 a	12,35 b	14,58 b
SN1	J30	11,53 c	36,15 c	-	-	6,63 c	-
	J60	02,28 c	08,56 c	09,52 a	08,56 c	3,25 c	08,52 c

- : pas de gain ; coupes J30 et J60: après 30 et 60 jours

Les valeurs suivies de la même lettre pour une même coupe ne présentent des différences significatives au risque d'erreur de 5 % et 1 % (Test Newman-Keuls).

Tableau VI.5 : Gains (%) en croissance chez la tomate par rapport aux témoins non bactérisés

Souches	Coupes	Hauteur plants	Poids frais foliaire	Surface foliaire	Poids frais racinaire	Poids frais total (plant)
P6	J30	15,07 a	15,15 a	-	-	22,58 a
	J60	18,10 a	17,15 b	09,62 a	17,52 a	15,19 a
B3	J30	09,52 b	12,83 a	-	-	18,33 a
	J60	18,30 a	28,15 a	05,13 b	13,75 b	10,20 b
T9	J30	19,26 a	05,72 b	-	-	11,55 b
	J60	12,32 b	08,25 c	08,72 a	12,89 b	06,35 c
SN1	J30	04,87 c	16,75 a	-	-	09,25 c
	J60	12,28 b	09,11 c	04,80 b	09,87 c	06,25 c

- : pas de gain ; coupes J30 et J60 : après 30 et 60 jours

Les valeurs suivies de la même lettre pour une même coupe ne présentent des différences significatives au risque d'erreur de 5 % et 1 % (Test Newman-Keuls).

V-4. DISCUSSION

La bactérisation a pour but de prévenir les risques naturels autour de la semence, une germination rapide réduit ainsi les risques d'attaques parasitaires. (Digat, 1989). Les semences ont besoin de protection vis-à-vis des microflore telluriques hostiles lors de leur germination, sa stimulation peut accélérer la levée en la rendant plus homogène sur l'ensemble de la culture.

Nos expérimentations sur la promotion de la croissance par des souches de *Pseudomonas fluorescens* ont montré objectivement un effet positif se traduisant par une amélioration des paramètres de croissance, notamment des cinétiques et des taux de levée importants (jusqu'à 100%) et des gains en phytomasse dépassant les 100% dans certains cas.

Les effets de la stimulation de la croissance ont été mieux perceptibles au niveau de la longueur cotylédonaire, la masse foliaire et des poids frais de la partie aérienne et des racines. Ceci peut être expliqué par une meilleure prédisposition de la plante durant les stades juvéniles, surtout au niveau des sites d'action des bactéries (racines). Les effets bénéfiques des PGPR se font sentir précocement sur la croissance du système racinaire (Digat, 1992).

Les effets obtenus dans l'amélioration des poids frais sont plus représentatifs de la biostimulation de la physiologie de la plante.

La stimulation de la croissance observée est étroitement liée à la compétence des *Pseudomonas* spp. *fluorescents* qui colonisent les racines de plantes en deux phases ; dans la première phase, les bactéries s'attachent et sont transportées le long des racines jusqu'aux extrémités; dans la deuxième phase, elles s'étendent localement et prolifèrent aux limites du système racinaire, en compétition avec les organismes indigènes (Howie *et al.*, 1987).

Cette dynamique permet aux rhizobactéries d'exercer leur action de promotion de croissance et de biocontrôle (Keel *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1991 ; Digat , 1992). Kloepper *et al.*, (1991), ont montré qu'il existe une corrélation directe entre la colonisation des racines par les souches de *Pseudomonas* et l'accroissement de la biomasse des plantes. La stimulation de la germination a été mise en évidence par Kloepper *et al.*, (1986) qui ont obtenu des gains d'émergence des semences de soja allant jusqu'à 50 %. Un gain en poids frais de 36,5% par rapport au témoin a été obtenu avec la laitue par Digat, (1990). Hofte *et al.*, (1991) ont noté une vitesse d'émergence plus rapide et un gain de 30 à 60 % chez le maïs bactérisé par des souches de *Pseudomonas* spp. *fluorescents*

La bactérisation des semences, avec deux souches de *Pseudomonas fluorescens*, a engendré des gains de plus de 125 % dans la production d'épis chez le blé, par rapport aux témoins non traités (Grayton *et al.*, 1991). Ces mêmes auteurs ont enregistré, en conditions contrôlées, des gains en poids de grains allant jusqu'à 135 % et en poids sec des racines de plus de 136 %. Dans les conditions de plein champs, ils ont réalisé, à l'aide six souches de rhizobactéries, des gains en grains allant de 0,5 à 9,3 % et de 0,7 à 7,5 % pour la production totale (Grains et paille). Becker et Cook (1988) ont montré une stimulation de la longueur de la première feuille allant de 112,72 % à 164, 58 % chez le blé dur bactérisé par deux souches différentes de *Pseudomonas fluorescens*.

Dans notre étude, la présence de la microflore indigène dans le sol naturel (Essai A) a eu un effet relativement négatif sur la croissance du végétal, dans notre cas la pomme de terre, illustré par les courbes d'évolution de l'émergence des témoins non bactérisés dans les trois essais A, B et C. Cependant, Les effets bénéfiques des souches de *Pseudomonas fluorescens* les plus importants sur la promotion de la croissance ont été observés au niveau du sol naturel ; en effet, les écarts entre les paramètres de croissance mesurés chez les plants bactérisés et les plants témoins non bactérisés sont plus importants dans le sol naturel (Essai A), par rapport aux sols désinfecté (Essai B) et non cultivé (Essai C).

En condition hydroponique, l'action des souches sur le développement du végétal, la tomate et le haricot, s'est traduite par des gains en poids frais des parties aériennes, racinaires et du plant entier ainsi qu'en surface foliaire, relativement dans la même proportion que dans le sol non cultivé. Ceci permet de déduire que la flore indigène du sol naturel, complexe dans sa structure et sa composition, peut être neutre ou dans une certaine mesure délétère pour la plante. Notons que l'utilisation du sol désinfecté peut faciliter l'installation des rhizobactéries introduites en l'absence d'une microflore indigène.

L'amendement du sol avec des souches de *Pseudomonas bénéfiques* peut promouvoir la croissance des plantes par la réduction de la propagation de la flore délétère et par l'interaction métabolique directe avec la plante.

Dans certains sols intensivement cultivés où les rotations des cultures ne sont pas fréquentes, on parle de "fatigue des sols", la microflore résidente exerce à la longue un effet dépressif sur le végétal. Les *Pseudomonas* bénéfiques sont capables de déplacer et parfois de remplacer la microflore concurrente délétère ou parasite. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents synthétisent diverses substances inhibitrices de la microflore indigène, plusieurs molécules ont

été identifiées dans l'environnement, particulièrement la pyrrolnitrine (Howell et Stipanovic, 1979), l'oomycine (Gutterson, 1990) et l'acide cyanhydrique (Laville *et al.*, 1998) à fortes activités antifongiques.

Les quatre souches utilisées ont toutes présentés des aptitudes à la promotion de croissance végétale. Les souches B3, T9 et P6 provenant de sols cultivés, ont été beaucoup plus performantes que la souche SN1 originaire de sol non cultivé. La performance des souches B3, T9 et P6 est probablement liés à leurs propriétés de synthèse de métabolites tels que les sidérophores pyoverdiniques, l'acide cyanhydrique, l'acide indole acétique, les phénazines et leur tolérance au NaCl, qui seraient le résultat d'une pression de sélection de l'environnement rhizosphérique, aboutissant à des souches d'une part adaptées à cet environnement et d'autre part bénéfiques à la plante.

Les mécanismes par lesquels les *Pseudomonas* spp. fluorescents promeuvent la croissance végétale sont mal élucidés, il a été suggéré l'implication des métabolites secondaires, tels que les phytohormones; les activités d'antibiose, l'assimilation de l'azote, la minéralisation du phosphore organique, l'acquisition d'autres minéraux en solution dans le sol...etc. (Grayston *et al.*, 1991). Dans ce sens, Frankenberger et Arshad, (1991) pensent que la présence de régulateurs de croissance des plantes (PGRs) dans le sol est d'une très grande importance écologique ; plusieurs microorganismes (PGPR), notamment des *Pseudomonas*, produisent ce type de régulateurs qui consistent en des auxines, cytokinines, gibbérellines, éthylène... à effets directs sur la stimulation de la croissance végétale (Digat, 1994).

Loper (1986), Suslow et Schroth (1982) et Crowley et al, (1987) ont montré que le fer chélaté par les sidérophores de *Pseudomonas* spp fluorescents peut être assimilé par le système racinaire. La stimulation de la croissance du blé, par bactérisation par des *Pseudomonas* spp. fluorescents en conditions contrôlées, a été corrélée à une augmentation de la concentration en fer des plantes pendant la période de croissance végétale.

Le phosphore étant souvent immobilisé sous forme de phosphates insolubles (phosphates de calcium, de fer ou d'aluminium...), les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont la capacité de solubiliser ces sels soit par excrétion de phosphatases, soit par la production d'acides organiques (Berthelin *et al.*, 1991). La souche de *Pseudomonas fluorescens* (P221) a été trouvée, en conditions contrôlées, capable de transformer le phosphore total en phosphate assimilable par les céréales (Raj *et al.*, 1981).

Nos résultats montrent que l'action des souches B3, T9 et P6 sur la promotion physiologique de la plante n'a pas subi d'influence par rapport à leur biotope d'origine et par rapport aux différents génotypes végétaux utilisés (variétés et espèces). Par contre, d'autres travaux ont rapporté que l'effet bénéfique d'une souche bactérienne est spécifique du génotype végétal ; en d'autres termes, l'action d'une souche est d'autant plus optimale qu'il y a une adéquation entre l'environnement rhizosphérique d'où est issue la souche bactérienne et l'espèce végétale sur laquelle s'exerce ses effets (Chanway *et al.*, 1988; Latour, 1996). Des souches isolées à partir de sol cultivé souvent avec une même variété de blé, pendant plus de deux décennies , ont induit des gains en croissance sur cette même variété et pas sur d'autres (Grayston *et al.*, 1991).

Il a été suggéré aussi que la stimulation de la croissance des plantes peut être due à un effet lié à l'amélioration nutritionnelle de la plante en azote, cet élément pouvant être fixé par les *Pseudomonas* spp fluorescents (Lifshitz *et al.*, 1987).

V-5. CONCLUSION

La bactérisation des tubercules de pomme de terre a influencé positivement la levée et la croissance des plantes, la souche B3 a été la plus performante et les effets bénéfiques ont été plus importants en sol naturel cultivé qu'en sol désinfecté ou en condition hydroponique

La bactérisation des semences de blé dur a permis des gains appréciables dans la cinétique (temps d'émergence) et les taux finaux de levée, ainsi que dans la croissance globale des plants (cf paramètres de croissance) chez les 3 variétés étudiées. Les gains obtenus sont variables en fonction de la souche bactérienne et le génotype de blé.

Pour la même variété de blé, les effets des souches bactériennes sont variables selon le paramètre de croissance mesuré ; cependant, la comparaison inter-variétale des gains obtenus par paramètre de croissance n'a pas montré de différence notable ou une meilleure prédisposition d'une variété par rapport aux autres.

La bactérisation des plantules de haricot et de tomate, cultivés en hydroponie, a permis de mettre en évidence l'effet stimulateur de croissance végétal des souches de *Pseudomonas*, par des gains notables (5,03 % à 26,32 %) au niveau de l'ensemble des paramètres de croissance végétale analysées et apparents pendant les stades juvéniles de la plante.

La viabilité microbienne indique que les souches de *Pseudomonas* inoculées ont réussi à coloniser et même à se propager intensivement dans les différents substrats ou sols utilisés. Les conditions relativement extrêmes d'hydroponie permettent de conclure que l'effet promoteur de croissance végétale des souches bactériennes peut être du type direct

De la même manière que dans le cas du phénomène d'antagonisme (cf chap. V), le profil métabolique des quatre souches de *Pseudomonas* utilisées semble influencer leur performance dans la promotion de croissance du blé, et de la tomate et haricot, à l'image des souches P6, B3 et T9 plus active que SN1. Par ailleurs, il n'existe pas forcément de lien entre le biotope rhizosphérique de la souche et une spécificité d'action par rapport à l'espèce végétale. Cependant, le caractère rhizosphérique des souches de *Pseudomonas* (provenant de sols cultivés), indépendamment du type de leur biotope, conditionne leur activité phytostimulatrice.

La promotion de la croissance végétale est la résultante d'un processus complexe multifactoriel impliquant le génotype bactérien avec ses capacités physiologiques et métaboliques, dont l'expression et la valorisation dépendent de l'environnement abiotique du sol et des interactions réciproques avec la flore microbienne et la plante.

DISCUSSION GENERALE

Les prélèvements de sols à partir des sept biotopes étudiés ont permis de constater l'existence de densités élevées en populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ceci témoigne de l'adaptation de ces rhizobactéries à ces biotopes dont les caractéristiques pédoclimatiques et végétales sont pourtant relativement différentes. La colonisation des sols cultivés a été plus importante qu'au niveau des sols non cultivés; la fréquence d'isolement de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les biotopes cultivés a atteint 38 %, alors que dans le sol non cultivé la fréquence n'est que de 3,05 %. Ce constat reste valable même pour le biotope de palmeraies (7,33 %) où les conditions de sol et de climat sont relativement extrêmes pour l'activité microbienne mésophiles. Donc, la plante exerce un effet direct important sur la modification des caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol, modulant ainsi sa réceptivité et sa colonisation par les microorganismes.

Les fréquences d'isolement de ces rhizobactéries, variables en fonction de chaque biotope, suggèrent que la plante exerce des effets sélectifs et stimulateurs, par le biais de ses exsudats racinaires, à l'égard des communautés microbiennes évoluant dans le rhizoplan et la rhizosphère. Le biotope de tomate a montré la fréquence de colonisation par les *Pseudomonas* spp. fluorescents la plus élevée, les autres plantes qu'elles soient ligneuses ou herbacées ont montré une présence appréciable de ces rhizobactéries. En effet, les caractéristiques de développement et de progression des parties souterraines (racines ou tubercules) diffèrent d'une plante à l'autre et les plantes herbacées annuelles semblent prédisposer à une meilleure colonisation par les *Pseudomonas* spp. fluorescents. L'effet rhizosphère engendre des modifications biotiques et abiotiques dans le sol sous l'influence de la plante (Gilbert *et al.*, 1993; Latour *et al.*, 1997; Latour *et al.*, 2003).

L'effet rhizosphère est déterminée en grande partie par la libération active ou passive des composés organiques (rhizodépôts) par la plante (exsudats, sécrétions, lysats, mucigel...). Ces photosynthétats largués par les racines des plantes participent dans la formation du complexe organo-minéral caractérisant chaque sol. L'activité respiratoire racinaire conditionne les échanges gazeux et ioniques, notamment la pression partielle en O₂ et en CO₂. L'activité métabolique racinaire (absorption – libération) joue un rôle prépondérant dans la composition ionique du sol. L'effet rhizosphère est une notion dynamique dans l'espace et dans le temps (Lemanceau et Heulin, 1998); en effet, sa localisation évolue selon la croissance racinaire : longueur,

progression et architecture des racines. La présence de la plante modifie l'équilibre entre les hydrates de carbone et les éléments minéraux au niveau de la rhizosphère; cette modulation conditionne la densité microbienne dans la rhizosphère.

L'identification taxonomique a permis de retrouver les principales espèces du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents avec une nette dominance de *P. fluorescens* dans la totalité des prélèvements analysés. Même si les fréquences d'isolement des autres espèces (*P. putida*, *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis*) sont moindres, leur présence témoigne de l'ubiquité et des capacités d'adaptation de ces rhizobactéries aux différentes conditions écologiques et agronomiques caractérisants nos biotopes.

Dans notre étude, nous avons adopté trois méthodes pour l'identification des souches sélectionnées représentatives des sept biotopes; ces méthodes, procédant des tests préliminaires de base de Stanier *et al.*, (1966), sont le schéma déterminatif de Digat et Gardan (1987) et les clés dichotomiques de Jacques *et al.*, (1994) et de Bossis (1995). Quel que soit la méthode utilisée, nous avons noté, outre les espèces types citées précédemment, la présence de deux taxons, souvent rapportés dans les travaux relatifs à la taxonomie de ces rhizobactéries, à savoir le groupe intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida* et celui des souches non classées. De plus, la comparaison des résultats obtenus par ces trois méthodes fait ressortir des divergences entre elles, allant jusqu'à 5 % de différence dans l'affiliation des souches. Les effectifs appartenant aux groupes dont la classification reste imprécise sont considérables, jusqu'à 17 % des souches analysées, aussi bien pour le groupe des souches intermédiaires que pour celui des souches non classées. Il en ressort qu'il persiste donc une mauvaise définition des taxons spécifiques et infraspécifiques chez ces *Pseudomonas*, notamment pour *P. fluorescences*, *P. putida* et leurs subdivisions (biovars).

En se basant sur les caractères phénotypiques proposés, l'identification taxonomique reste imprécise et incomplète.

La faiblesse de la caractérisation taxonomique de ce groupe bactérien a ouvert le champ à de nombreuses investigations et propositions, d'où de nombreux travaux récents proposant de nouvelles espèces : *P. graminis* sp. nov. et *P. cannabina* sp. nov (Gardan *et al.*, 1999), *P. brassicacearum* sp. nov. et *P. thivervatensis* sp. nov. (Achouak *et al.*, (2000), *P. frederiksbergensis* sp. nov (Anderson *et al.*, 2000), *P. lini* sp. nov. (Delorme *et al.*, 2002) et *P. rhizosphaerae* sp. nov. (Peix *et al.* 2003 , 2003).

La nécessité de recourir à un complément de tests d'identification plus discriminatifs s'impose, d'ailleurs de nombreux travaux récents ont conseillé l'utilisation de méthodes polyphasiques (phénotypique + génotypique) (Bossis *et al.*, 2000; Delorme *et al.*, 2002).

Le recours exclusif aux techniques génotypiques n'apporte pas une caractérisation représentative des aptitudes phénotypiques des rhizobactéries ayant une relation avec le processus d'évolution et d'adaptation dans la rhizosphère. Pour mieux cerner la diversité de ce groupe bactérien, il est nécessaire d'élargir au maximum leur étude aux constituants cellulaires et membranaires tels que les acides gras phospholipidiques (Zeller *et al.*, 1992), les esters, les lypopolysaccharides (Saunier *et al.*, 1996), l'expression in situ de métabolites (Latour, 1996; Achouak *et al.*, 2000; Bossis *et al.*, 2000; Delorme *et al.*, 2002). L'approche génotypique basée sur le polymorphisme des séquences servira à typer les souches par rapport à leur profil phénotypique (Delorme, 2002).

Même si les techniques d'isolement des microorganismes telluriques ont évolué, notamment pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents, néanmoins, elles se basent globalement sur des techniques sélectives; donc, les populations de rhizobactéries isolées dans ces conditions ne peuvent pas être représentative de la diversité quantitative et qualitative de la microflore rhizosphérique, qui reste un élément clé dans la compréhension de l'aspect fonctionnel microbien communautaire. Notre étude, comme les autres ayant traitées de l'aspect de diversité, reste confrontée au problème de la représentativité des populations étudiées pour extrapoler par rapport à la forte diversité et hétérogénéité spatio-temporelle des rhizobactéries. Cette hétérogénéité est d'autant plus complexe que les souches antagonistes doivent réguler une interaction tri-trophique (plante – agent antagoniste – agent phytopathogène). De plus, la structure et la diversité de ces rhizobactéries dépendent des périodes, de la nature de la plante et son stade phénologique, des techniques de prélèvement, de l'échantillonnage et des méthodes d'analyse.

L'analyse numérique des résultats des tests des profils trophiques des souches par rapport à l'assimilation de 99 substrats a mis en évidence une forte hétérogénéité des profils chez les 80 souches de *Pseudomonas* issues des sept biotopes. Il en est ressorti une absence de corrélation entre l'identification spécifique et infraspécifique des souches et leur regroupement sur le dendrogramme construit à partir des profils obtenus. Ainsi, des souches de la même espèce se sont retrouvées réparties dans différents groupes, signe des distances d'éloignement et de variabilité de leurs profils; par contre, des souches appartenant à des espèces différentes ont été regroupées dans la même classe trophique. La compréhension des profils trophiques est plus que

nécessaire pour mieux comprendre l'aspect fonctionnel du métabolisme primaire et secondaire de ces bactéries et son rôle dans leur comportement dans le sol et la rhizosphère.

Dans une étude similaire, Delorme (2002) a rapporté la faible corrélation entre la taxonomie classique et le classement des souches en fonction de leurs profils trophiques ou de caractéristiques moléculaires (homologie ADN/ADN, polymorphisme de l'ADNr 16S). A cet effet, dans cette même étude, sept souches identifiées comme *P. putida* (Lemanceau *et al.*, 1995) ont été rattachées à *P. jessenii*. Ces résultats ont été confortés par des analyses par sidérotypage, nouvel outil pouvant apporter un complément d'information et de précision dans la taxonomie (Meyer, 2000; Delorme *et al.*, 2002); surtout que les pyoverdines sont des métabolites très communs chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents et en même temps très diversifiés.

L'efficacité des souches de *Pseudomonas* dans la lutte biologique repose sur la convergence d'une multitude propriétés physiologiques, métaboliques et écologiques ; leur projection dans un programme de travail ciblant à déterminer systématiquement le rôle et l'importance de chacun d'eux est nécessaire pour l'optimisation des conditions d'utilisation de ces souches.

Dans le but de rechercher d'éventuelles relations entre l'origine écologique (biotope) des souches, leur taxonomie, leurs profils trophiques, leur aptitude à la synthèse de métabolites secondaires, leur pouvoir antagoniste *in vitro* et leur résistance aux conditions hostiles du milieu (NaCl et antibiotiques), nous avons réalisé une analyse statistique exploratoire factorielle de correspondance (AFC). Cette dernière a été effectuée à partir d'un fichier (Annexe D1) représentant un tableau de contingences qui comporte les données des variables étudiées chez les 80 souches sélectionnées. Les dix variables prises en considération sont jugées inhérentes aux interrogations posées :

- **Biotope** : avec sept modalités, chaque biotope étudié représente une modalité (cf. chap. II),
- **Taxon** : avec 11 modalités, représentant les 11 taxons identifiés (cf., chap. II).
- **Profil trophique** : avec 33 modalités, représentant les 33 classes du dendrogramme (cf. chap. II)
- **Acide cyanhydrique (HCN)** : avec deux modalités, inaptitude (1) ou aptitude (2) à synthétiser cyanides d'hydrogène
- **Acide indole acétique (AIA)**: avec deux modalités, inaptitude (1) ou aptitude (2) à synthétiser l'acide-indole-acétique

- **Acide salicylique (AS)** : avec deux modalités, inaptitude (1) ou aptitude (2) à synthétiser l'acide salicylique,
- **Phosphatases (PHOS)**: avec deux modalités, inaptitude (1) ou aptitude (2) à synthétiser les phosphatases,
- **Résistance aux antibiotiques (R. ATB)**: avec trois modalités, exprimant la résistance aux concentrations d'antibiotique testées (cf. chap. IV).
- **Tolérance au NaCl** : avec 4 modalités, représentant les concentrations en NaCl tolérées (cf. chap. IV)
- **Antagonisme *in vitro* (A. vitro)** : avec 5 modalités exprimant l'indice d'antagonisme *in vitro* exhibé à l'encontre des phytopathogènes testés (cf. chap. IV).

L'AFC appliquée aux 80 souches et composée de 800 observations (10 variables) (Figure D), nous a permis d'identifier trois axes principaux qui reconstituent 71 % de l'inertie totale de l'ensemble des observations; soit 45 % pour l'axe F1 et 26 % pour l'axe F2 (Annexe D2).

Le premier axe se décrit par une répartition aléatoire des 80 souches, représentant la variable biotope, par rapport à leur position taxonomique et leurs profils trophiques. Les variables biotope (particulièrement les souches des sols cultivés en plantes herbacées), métabolites secondaires, antagonisme *in vitro* et résistance à NaCl et antibiotiques se regroupent, augurant un lien entre ces propriétés. Le caractère rhizosphérique des souches (biotopes cultivés) semble exercer une action sélective, éventuellement par l'environnement nutritionnel généré par la plante, favorisant les souches douées de synthèse de métabolites secondaires spécifiques.

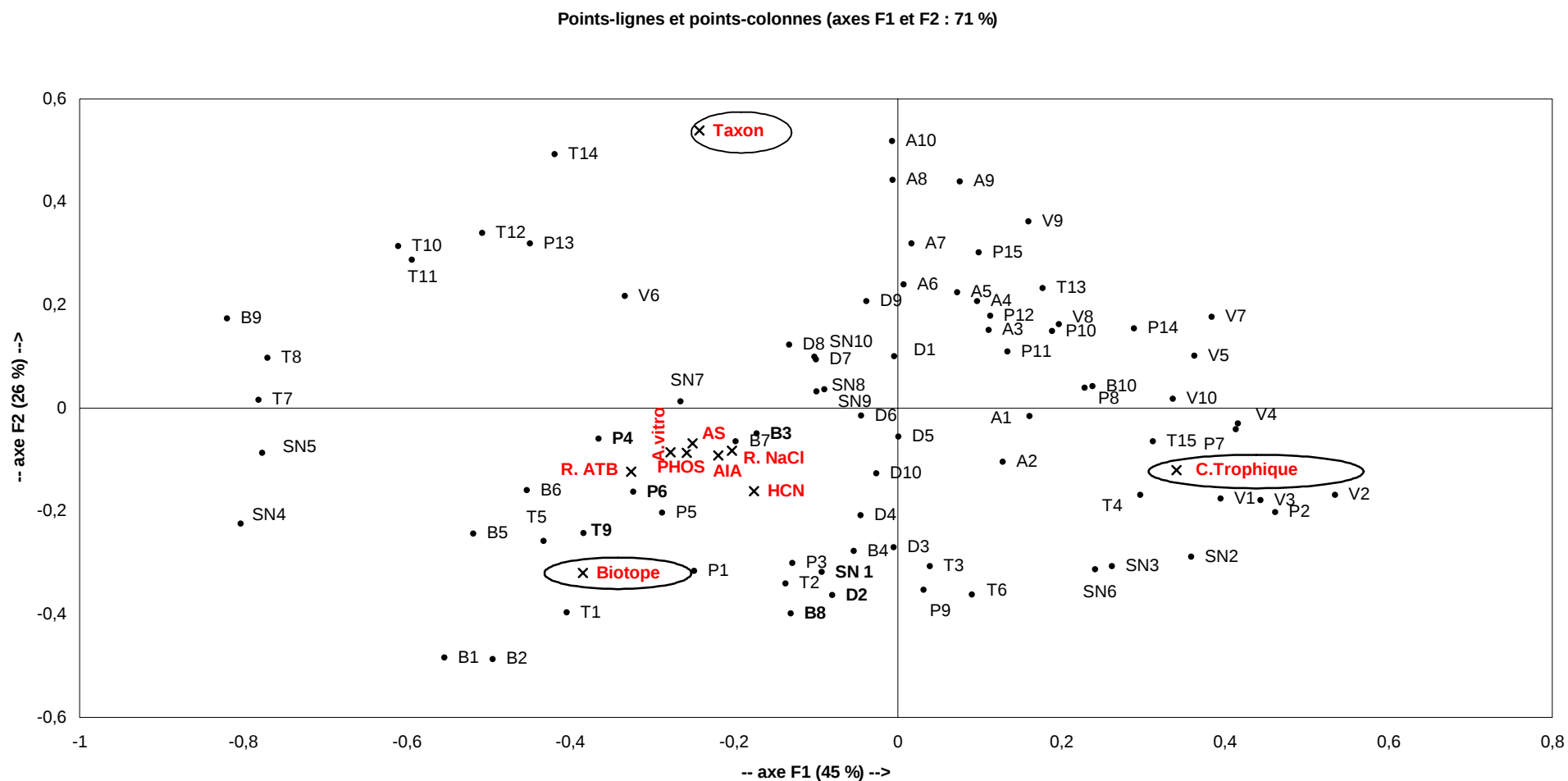
Le deuxième axe se décrit par le groupement des souches du biotope de palmeraies (les points Di) et celles du biotope de rosacées (les points Ai) et par l'opposition des taxons ainsi que du biotope aux profils trophiques pour le reste des souches des autres biotopes (Annexe D2). Une relative homogénéité trophique a été déjà notée pour les souches du biotope de palmeraies (chap. II), suggérant que les conditions de culture du palmier dattier et l'environnement édaphique dans lequel il évolue favorisent certains profils métaboliques des rhizobactéries. A un degré moindre, ce constat est valable pour une grande partie des souches issues du biotope de rosacées. Les souches du biotope viticole ont montré des aptitudes métaboliques variables mais les distinguant des autres souches. Les souches du biotope sol non cultivé ont montré une forte hétérogénéité et variabilité dans leurs positions taxonomiques et leurs profils trophiques. Ceci suggère qu'en plus des caractéristiques pédoclimatique du biotope, la structure de la rhizosphère déterminée par la partie souterraine de la plante (tubercule ou racines), à l'exemple de la morphologie des plantes herbacées différentes de celle des plantes ligneuses (volume racinaire, profondeur et architecture

des racines, quantité et qualités des rhizodépôts...) peuvent déterminer des espèces ou sous-espèces et même des écotypes adaptées à ces biotopes ; ou bien à l'inverse, le profil trophique qui appartient au métabolisme primaire de la bactérie est une caractéristique intrinsèque et stable du microorganisme qui peut déterminer au préalable son comportement rhizosphérique. Une analyse taxonomique polyphasique (phénotypique et génotypique) approfondie est nécessaire pour étayer cette suggestion.

De cette première partie du travail consacré à l'identification et au criblage métabolique des souches de *Pseudomonas*, il en est ressorti des souches présentant un ensemble de propriétés qui font d'elles des candidats potentiels dans la lutte biologique; en effet, de nombreuses souches ont montré des aptitudes à la synthèse de métabolites secondaires reconnus comme importants dans le processus de biocontrôle (pyoverdines, phénazines, HCN) et/ou de phytostimulation (AIA, Phosphatases) et même dans l'ISR (Acide Salicylique). Ces souches se caractérisent aussi par leur tolérance *in vitro* à des concentrations de 4 % en NaCl, leur résistance aux agents antimicrobiens et leur survie dans des préparations d'inoculum à base de tourbe et de méthyle cellulose après 12 mois de conservation. De plus, parmi ces souches, certaines se sont avérées douées d'une compétitivité rhizosphérique.

Dans l'environnement rhizosphérique, les racines et la flore indigène libèrent des composés toxiques qui peuvent inhiber ou créer un état de stase pour ces populations bactériennes bénéfiques, donc la sélection de souches résistantes aux antibiotiques, xénobiotiques, salinité, stress thermique et hydrique et autres conditions hostiles, est un outil de criblage des souches performantes et actives dans la rhizosphère.

La compétitivité rhizosphérique constitue un support pour les aptitudes antagoniste et promotrice de la croissance végétale proprement dites des rhizobactéries, elle garantit leur propagation et la colonisation de la rhizosphère, conditions préalables à l'expression génétique de leurs propriétés bénéfiques. Les bactéries en interaction avec les plantes se présentent sous forme d'agrégats, de microcolonies ou de biofilms sur les feuilles, les racines et dans les espaces intercellulaires des tissus. Ces biofilms ont été décrits comme les conditions où certaines activités microbiennes, notamment adaptatives, deviennent fonctionnelles, parce que leur expression synchronisée et optimale est assujettie à un niveau de densité de population, c'est le phénomène quorum sensing. Les fonctions microbiennes deviennent optimisées et synchronisées; le métabolisme secondaire en est la conséquence.



Dans la deuxième partie du travail, des essais biotechnologiques sur les propriétés de biopesticides et de biofertilisants de ces souches ont été conduits *in situ* avec quatre d'entre elles (*P. fluorescens* P6, B3, D2 et T9). Ces souches se sont révélées, à des degrés variables, efficaces aussi bien dans bioprotection que dans la phytostimulation. Globalement, il y a une corrélation entre leur performance métabolique et compétence rhizosphérique, et leur efficacité. Cependant, il est difficile de raisonner sur l'importance de chaque caractère, à l'exemple des pyoverdines qui, sont considérés comme des facteurs clé dans le biocontrôle, alors des mutants se sont avérés relativement actifs. Ceci peut être en rapport avec des mécanismes d'action spécifiques de ces métabolites secondaires, de l'influence du milieu sur leur expression et l'intensité de leur effet, de la ou les cibles et enfin, surtout, du fait du déterminisme multifactoriel de l'antagonisme microbien.

Selon Chaussod (1996), la qualité biologique d'un sol est définie par sa fertilité, son état sanitaire, ses externalités (impact environnemental du fonctionnement du sol) et sa résilience (sensibilité aux contraintes extérieures et aptitude au retour à un état initial). Cette définition ne tient pas compte uniquement de l'aspect agronomique, mais aussi du rôle du sol vis à vis de l'environnement et des fonctions d'intérêt (social) qu'il doit remplir dans la biosphère. Nous notons l'intervention active de l'activité microbienne au niveau de ces quatre paramètres ; les *Pseudomonas* saprophytes telluriques antagonistes peuvent contribuer à l'amélioration de la fertilité du sol et son état sanitaire, en diminuant les intrants chimiques et en restaurant son équilibre biologique ; un système de production durable exige une conservation des qualités biologiques du sol.

Les perspectives de l'utilisation de *Pseudomonas* doivent prendre en compte le criblage des souches par rapport à leur aptitude trophique, leur métabolisme secondaire, leur compétence rhizosphérique, leur antagonisme *in vitro* et *in situ*. De telles souches au profil multifactoriel sont d'abord difficiles à sélectionner et elles peuvent être physiologiquement affaiblies par le cumul de caractères secondaires qu'elles portent ; à cet effet, il est intéressant d'utiliser des associations de souches naturelles ou améliorées par génie génétique, ayant des profils complémentaires.

La finalité de notre travail est d'apporter une contribution aux connaissances visant l'amélioration de la fiabilité et l'efficacité de la lutte biologique, en utilisant des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents caractérisées par un profil plurifactoriel. Nos résultats ont porté sur une évaluation de ces rhizobactéries à un niveau écologique populationnel plus informatifs sur les potentialités des souches et leur sélection.

Les applications *in situ*, bien que réalisées à un niveau expérimental, pas totalement représentatif de l'échelle production, ont permis néanmoins de mettre en exergue des souches performantes en relation avec des caractéristiques phénotypiques bien déterminées, qui peuvent servir , dans un cadre général de sélection de souches, de critères de criblage.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre travail était d'apporter une contribution à la connaissance du déterminisme physiologique, métabolique et écologique du pouvoir antagoniste et promoteur de la croissance végétale des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes telluriques. L'approche adoptée dans notre étude a été un criblage à un niveau populationnel dans différents environnements rhizosphériques ou biotopes.

Notre travail a permis d'identifier des caractères reconnus aux populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents comme leur conférant un pouvoir de contrôle des microorganismes phytopathogènes. Les recommandations des derniers congrès et séminaires internationaux, notamment le dernier en date « Rhizosphère 2004 » tenu en Allemagne, concernant l'efficacité et la fiabilité de la lutte biologique contre les maladies d'origine tellurique, s'inscrivent dans des orientations visant la détermination des caractères impliqués dans la compétence rhizosphérique de ces bactéries.

Nous avons pu isoler 1050 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir de 7 biotopes différents, ce résultat montre l'ubiquité et l'adaptation de ce groupe bactérien, en particulier dans les sols cultivés (effet rhizosphère). Les 4 espèces types de ce groupe *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* ont été retrouvées avec la prédominance de la première espèce, particulièrement de son biovar 1, cependant, le nombre de souches non identifiées est relativement important. La détermination des profils trophiques des souches a mis en évidence une grande diversité dans leur métabolisme carboné ; néanmoins, il n'y pas eu de concordance entre les résultats de l'identification et les profils trophiques, ce qui pose les limites des tests phénotypiques d'identification des *Pseudomonas*. Les espèces de *Pseudomonas* se répartissent de manière aléatoire par rapport aux biotopes, tandis que ces derniers semblent influencer sur les profils trophiques des souches, probablement en les sélectionnant.

Parmi ces souches, certaines ont montré un pouvoir antagoniste *in vitro* vis-à-vis de phytopathogènes fongiques et bactériens et se sont avérées productrices de métabolites secondaires (sidérophores, cyanide d'hydrogène, phosphatases, acide salicylique, acide indole acétique, phénazines et autres composés antimicrobiens) dont le rôle dans l'antagonisme et la biostimulation végétale a été rapporté, résistantes à certains facteurs et conditions hostiles retrouvées dans l'environnement (tolérance du NaCl, résistance aux antibiotiques et aux stress

thermique et hydrique) et douées de capacité de colonisation racinaire (compétence rhizosphérique). Il faut noter que ces caractères ont été retrouvés principalement chez les souches provenant des sols cultivées (effet rhizosphère), indépendamment du type de biotope et la compétence rhizosphérique s'exprime mieux dans le sol naturel (présence de la flore indigène) que dans les conditions gnotobiotiques. Toutes ces propriétés, retrouvées totalement ou dans des combinaisons variables selon la souche et dont l'implication directe ou indirecte dans le biocontrôle des maladies et la phytostimulation est partagée par la communauté scientifique, augurent de la capacité antagoniste de nos souches et rendent intéressants les essais *in situ*.

Les essais *in situ* conduits en sol cultivé avec différentes plantes ont montré de manière évidente que nos souches, à des degrés variables, protégeaient la plante bactériisée contre différents agents phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Pythium ultimum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) et promouvaient la croissance végétale, en réduisant le taux et les symptômes de la maladie et en stimulant la germination, la levée et la phytomasse ; la performance des souches est corrélée à leur caractère rhizosphérique et à leur performance métabolique.

Le pouvoir antagoniste est la conséquence d'un processus multifactoriel; en effet, outre les propriétés déjà citées, nos souches ont été capables d'induire chez la plante une résistance systémique vis-à-vis des phytopathogènes et de diminuer la réceptivité du sol à ces agents.

Bien que les études ont commencé à élucider les mécanismes qui régissent le pouvoir de biocontrôle et de phytostimulation, il reste cependant difficile d'attribuer à chaque facteur sa part d'importance dans ces phénomènes, tant ils dépendent de beaucoup de paramètres tels que la nature du sol et de la plante, la flore indigène, l'agent phytopathogène ciblé.... Pour optimiser les chances de succès de l'utilisation de souches de *Pseudomonas* dans la lutte biologique, la stratégie consiste à réunir un maximum d'atouts au niveau d'une même souche par un criblage large à un niveau populationnel dans diverses rhizosphères et à associer des souches aux profils complémentaires ; le génie génétique peut aussi contribuer à la construction et à l'amélioration des souches.

L'utilisation de souches bactériennes dans la lutte biologique nécessite leur production à grande échelle et leur formulation en inoculums (en les associant à des supports minéraux et/ou organique) servant à la bactérisation du sol et/ou de la plante. La survie et la stabilité des populations microbiennes dans les inoculums et lors des premiers temps de leur contact avec le sol sont primordiales pour leur installation, donc leur efficacité. Nos résultats ont montré que la tourbe et le méthyle cellulose conservent et stabilisent les souches de *Pseudomonas*, ils peuvent donc être préconisés comme supports dans la formulation des inoculums.

Bien que nos essais *in vitro* et *in situ* ont été réalisés à un niveau expérimental, probablement non représentatif de toute la complexité à l'échelle de la culture en champs, ils ont permis néanmoins de sélectionner et de mettre en exergue des souches intéressantes par leur pouvoir d'antagoniste intense et à large spectre et de promotion de la croissance végétale. En terme d'exploitation, ces souches bénéfiques peuvent trouver leur place dans les applications biotechnologiques visant une amélioration des rendements, en même temps que la préservation de l'équilibre biologique de l'environnement et la restauration des activités microbiennes dans les sols cultivés.

De nombreux laboratoires ont sélectionné des souches modèles, néanmoins l'enjeu actuel est de garantir la stabilité et la reproductibilité des effets bénéfiques de ces rhizobactéries à l'échelle de pratiques agronomiques. Bien que des biopesticides à base de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont déjà commercialisés, leur application à grande échelle n'est pas encore complètement concrétisée. Les difficultés de formulation et d'utilisation, ainsi que les problèmes réglementaires relatifs à la manutention de ces microorganismes sont parmi les obstacles ayant retardé leur vulgarisation.

- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R. et Gardan, L., 2000a. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**, 9-18
- Achouak, W., Thiery, J.M., Roubaud, P. et Heulin, T., 2000b. Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. *FEMS Microbiology Ecology.* **31**, 11-19.
- Agrios, G., 1997. Plant Pathology., 4^{ième}. De, Academic Press. New York, 635 pp.
- Alabouvette, C . 1986. Fusarium wilt suppressive soils from châteaurenard region : review of a 10 years study. *Agronomie.* **6(3)**, 273 -284.
- Alabouvette, C. et Lemanceau, P. 1996. Natural suppressiveness of soils in management of fusarium wilts, 301-322. R. Utkhede and V. K. Gupta .Eds., /In Management of soil-borne diseases, Ludhiana, Inde.
- Alabouvette C, Tramier R., Grouet D., 1980. Recherche sur la résiatnce des sols aux maladies, VIII. Perspectives de l'utilisation de la résistance des sols pour lutter contre les fusarioses. *Ann Pytopathol* **12(2)**, 83-85.
- Alabouvette, C., Couteaudier Y., Louvet J., 1982. Comparaison de la réceptivité de différents sols et substrats de culture aux fusarioses vasculaires. *Agronomie* **2(11)** ,1-6.
- Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P. and Bakker, P.A.H.M. 1998. Biological control of fusarium wilts: towards development of commercial products. In: Plant-Microbe Interactions and Biological Control (G.J. Boland and L.D. Kuykendall, eds), pp. 15-36. Marcel Dekker, New York.
- Albert, F. and Anderson, A.J. 1987. The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxidase. *Plant physiol.* **85**, 535-541.
- Alexander, D.B., and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* **12** , 39-45.
- Alstrôm, S. 1991. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37** , 495-501.
- Alvarez, M. B., Gagné, S and Antoun, H. 1995. Effect of compost on rhizosphere miroflora of the tomato and on the incidence of plant growth – promoting rhizobacteria. *Appl. Envir. Microb.* **61** (1) ,194-199.
- Amir, H., and Alabouvette, C.1993. Involvement of soil abiotic factors in the mechanism of soil suppressiveness to *Fusarium* wilts. *Soil biology and biochemistry* **25**, 157- 164.
- Anderson A.J .1983. Isolation from root and shoot surfaces of agglutinins that show specificity for saprophytic pseudomonads. *Can J Bot* **61**, 3438-3443
- Anderson AJ, Guerra D . 1985. Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in hydroponic system. *Phytopathology* **75**, 992-995
- Anthony,U., Christophensen,C.,Neilse,P.H.,Gram,L.,Petersen,B.O.1995. Pseudomonine, an isoxazolidone with siderophoric activity from *Pseudomonas fluorescens* AH2 isolated from lake Victoria Nile perch.J.nat prod **58** ,1786-1789.
- Atkinson TG, Neal LJJ, Larson RI .1975. Genetic control of the rhizosphere microflora of wheat. In: *Biology and control of soilborne pathogens* .GW Bruehl, ed. Am Phytopathol Soc, Saint Paul, MN, 116-122
- Audenaert, K., Panery, T., Cornelis, P., and Hiiftc, M. 2002. Induction of systemic resistance tu *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2: rote of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **15** , 1147–1156.
- Bahme, J.B., Schroth, M.N. 1987. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology* **77** ,1093-1100.
- Bais H P, Park S W, Weir T L., Callaway R M and. Vivanco J M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Science*, **9** (1) , 26-32.
- Bakker, P.A.H.M., Lamers, J.G., Bakker, A.W., Marugg, J.D., Weisbeek, P.J., Schippers, B.1986. The role of siderophores in potato tuber yield increased by *Pseudomona putida* in a short rotation of potato. Netherlands *Journal of Plant Pathology*, **92**, 249-256.
- Bakker, A.W., and Schippers, B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp - mediated plant growth-stimulation. *Soil. Biol. Biochem.* **19** , 249-256.
- Bakker , P.A.H.M , Bakker , A W , Marugg , J D , Weisbeek , P J , and Schippers B. 1987 Bioassay for studying the role of siderophores in potato growth stimulation by *Pseudomonas* spp in short potato rotations. *Soil Biol Biochem* . **19** , 443-449.

- Bakker , P.A.H.M , Van Peer , R ,and Schippers , B. 1990.** Specificity of siderophores and siderophore receptors and biocontrol by *Pseudomonas* spp In Biological control of soil-borne plant pathogens .Edit: D Hornby . C A B international . pp 131-142.
- Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van der Sluis, I., Van Pelt, J.A. and Schippers, B. 1995.** Effects of the pseudobactin uptake protein A on the ecology of rhizosphere pseudomonads. in: The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Organisms (D.D. Jones, ed.), pp. 143-148. University of California, USA.
- Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M. and Schippers, B. 1998.** Siderophore receptor as a marker to track fluorescent *Pseudomonas* spp. In: Molecular Microbial Ecology Manual (A.D.L. Akkermans, J.D. Van Elsas and F.J. De Bruijn, eds), 6.1.4. pp. 1-9, Kluwer, Dordrecht.
- Bakker, P.A.H.M., De Boer, M., Zhang, K., Van der Sluis, I. and Van Loon, L.C. 2002a.** Dose response relationships for control of fusarium wilts by *Pseudomonas fluorescens* RS111. In: Influence of A-Biotic Factors on Biocontrol Agents (Y. Elad, J. Köhl and D. Shtienberg, eds), IOBC/wprs Bulletin 25(10) , 107-110.
- Bakker, P.A.H.M., Glandorf, D.C.M., Viebahn, M., Ouwens, T.W.M., Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K., Thomashow, L.S., Thomas-Oates, J.E. and Van Loon, L.C. 2002b.** Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* **81** , 617-624.
- Bakker, P.A.H.M., Mercado-Blanco, J., Ran, L., Van der Sluis, I. and Van Loon, L.C. 2002c.** Production of salicylic acid and pseudomonine of disease by *Pseudomonas fluorescens* WCS374. In: Influence of A-Biotic Factors on Biocontrol Agents (Y. Elad, J. Köhl and D. Shtienberg, eds), IOBC/wprs Bulletin 25(10) , 265-268.
- Bakker PAHM., Ran LX., Pieterse CMJ., Van Loon, L.C. 2003.** Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.* **25**, 5-9.
- Barach,I.1990.** Iron,siderophores and plant-pathogen interaction *phytoparasitica*. **18**,183-188.
- Baysse,C.,De Vos,D.,Naudet,Y.,Vandermonde,A.,Ochsner,U.,Meyer,J.M.,et al. 2000.** Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**, 2425-2434.
- Beauchamp EG, Trevors JT, Paul JW .1989.** Carbon sources for bacterial denitrification. *Adv Microb Sci* **10**, 113-142
- Becker J.O, Cook RJ .1988.** Role of siderophores on suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* **78**, 778-782
- Benchabane M., Bakour R.,Toua D., Boutekrabt,A. 2000.** Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *Bulletin OEPP/EPPO*. **30**,243-246.
- Benizri ,E ., Boudoin,E ., Guckert,A. 2001.** Root colonisation by Plant Growth Promoting Rhizobacteria . *Biocontrol science and technology* **5** (11) , 557-574.
- Benizri ,E., Dedourage,O., Di Batista-Leboeuf,C., Nguyen,C.S., and Guckert,A. 2002.** Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology*, **21**, 261-265.
- Berdy, J. Aszalos, A. and Mc Nitt, K.L. 1987.** CRC Hand book of antibiotic compounds Vol XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3 . Florida, USA CRC Press , Boca Raton.
- Berthelin J., Leyval C., Laheurte F., De Guidici P. 1991.** Some consideration on the relation between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization pp 359-364 in: plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel , B. Koller , and G. Défago , eds. Int. Org. Biol. Control Noxious Anim. plants/West. *palaerctic Reg. Sec. Bull.* 1418.
- Betina, V. 1973.** Bioautography in paper and the layer chromatography and its scope in the antiniotic field. *J. Chromato.* **78** , 41-51.
- Beyeler, M., Keel, C., Michaux, P, and Haas, D. 1999.** Enhanced production of *Pseudomonas fluorescens* CHAO affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiology Ecology* **28** , 225-233.
- Bitter,W., Marugg,J.D.,De Weger,L.A., Tommassen,J., Weibeek,P.J.1991.** the ferri-pseudobactine receptor PupA of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to TonB dependent *Escherichia coli* receptors and specificity on the protein. *Mol Microbiol* **5** ,647-655.
- Bloemberg,G.V., Lugtenberg,B.J. 2001.** Mlecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria.*Curr Opin plant soil* **4**,343-350.
- Blumer, C, and Haas, D. 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacteria cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol.* **173** ,170-177.
- Bol, J.F., Buchel, A.S., Knoester, M., Baladin, T., Van Loon, L.C. and Linthorst, H.J.M. 1996.** Regulation of the expression of plant defence genes. *Plant Growth Regulation* **18** , 87-91.

- Bosgelmez-Ti,az G. 2003.** Quorum sensing in Gram negative bacteria. *Turk J Biol* **27**, 86-93.
- Bossis E. 1995.** Les *Pseudomonas* fluorescents de la rhizosphère : étude taxonomique et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée. Thèse Doctorat, Université de Nantes, France, 143p.
- 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.
- Bowen, G.D, and Rovira, A.D. 1976.** Microbial colonization of plant roots. *Ann Rev Phytopathol* **14**, 121-144.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braun,V. 1997.** Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Bio Chem* **378**, 779-786.
- Briat JF, Lobréaux S, Grignon N, Vansuyt G. 1999.** Regulation of plant ferritin synthesis : how and why ? *Cell Mol Life Sci* ; **56**, 155-66.
- Briat, JF., Vert, G. 2004.** Acquisition et gestion du fer par les plantes. *Cahiers d'agriculture*, 13(2), 183-201.
- Bric, J. M., Bostock, R. M. and Silverstone, S. E. 1991.** Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 535-538.
- Brisbane PG, Harris JR, Moen P. 1989.** Inhibition of fungi from wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and fungicides. *soil Bio/ Biochem* **21**, 1019-1025
- Brisbane PG, Rovira AD. 1988.** Mechanisms of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* by fluorescent pseudomonads. *Plant Pathol/* **37**, 104-111.
- Brown ME .1974.** Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathol* **12**, 181-197
- Budzikiewicz,H. 1993.** Secondary metabolites from fluorescent Pseudomonads. *FEMS. Microbial Rev.* **104**, 209-228.
- Bull, C.T., Weller, D.M. et Thomashow, L.S., 1991.** Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*. **81**, 954-959.
- Burklead, K.D., Schisler, D.A, and Slininger P.J. 1994.** Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37W in culture and in colonized wounds of potatoes. *App Environ Microbiol.* **60** (6), 2031-2039.
- Burr, T.J., and Caesar, A. 1984.** Beneficial plant bacteria CRC Crit. Rev. Plant. Sci. **2**, 1-20.
- Burr, T.J., Schroth, M.N., and Suslow, T. 1978.** Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strain of *Pseudomona fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* **68**, 1377-1383.
- Buyer JS, Wright JM, Leong J .1986.** Structure of pseudobactin A214, a siderophore from a bean deleterious *Pseudomonas*. *Biochemistry* **25**, 5492-5499
- Buyer, J.S., Kratzke, M.G. et Sikora, L.J., 1993.** A method for detection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth-promoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere. *Appl Environ Microbiol.* **59**, 677-681.
- Campbell, J.N., Cass, D.D., and Peteya, D. 1987.** Colonization and penetration of intact canola seedling roots by an opportunistic fluorescent *Pseudomonas* sp. and the reponse of host tissue. *Phytopathology* **77**, 1166-1173.
- Carmi R, Carmeli S, Levy E, Gough FJ. 1994.** (i-)-(S)-Dihydroaeruginosic acid, an inhibitor of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria, produced by *Pseudomonas fluorescens*. *J Nat Prod* **57**, 1200-1205.
- Castric P.A 1977.** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *J.Bacteriol.* **130**, 826-831.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D. et Farrand, S.K., 1998.** Production of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by grain-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microb Interact.* **11**, 1119-1129.
- Chain,E.B., and Mellows,G.1977.** Pseudomonic acid part 1 : The structure of pseudomonic acid A, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *J.C.S.Perkin* **1**, 294-309.
- Chanaway CD. Nelson LM. 1990.** Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* inoculated with coexistent promoting *Bacillus* strains. *Soil Biol Biochem* **22**, 789-795.
- Chang-Senk, P., Paulitz, T.C., and Beker, R. 1988.** Biocontrol of Fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomona putida* and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **78**, 190-194.
- Chin-A-Woeng, T., Bloemberg, G.V., Van der Bij, A., Van der Drift, K.M.G.M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A.H.M., Tichy, H.V., De Bruijn, F.J., Thomas-Oates, J.E. and Lugtenberg, B.J.J. 1998.** Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis*

- PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1069-1077.
- Clays-Josserand A., Lemanceau P., Philippot L., Lensi R. 1995.** Influence of two plant species .flax and tomate. on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp., *Appl. Environ. Microbiol* **61**, 1745-1749.
- Clays-Josserand, A., Ghiglione, J.F., Philippot, L., Lemanceau, P. et Lensi, R., 1999.** Effect of soil type and plant species on the fluorescent pseudomonads nitrate dissimilating community. *Plant Soil.* **209** , 275-282.
- Colbert, S.F., Schroth, M.N. , Weinhold, A.R., and Hendson, M. 1993.** Enhancement of population densities of *Pseudomonas putida* PpG7 in agricultural ecosystems by selective feeding with the carbon source sakicylate . *Appl. Environ. Microbio* **59** ,2064-2070.
- Colyer PD, Mount MS., 1984.** Bacterization of potato with *Pseudomonas putida* and its influence on post harvest soft rot diseases. *Plant Dis* **68**, 703-706.
- Compeau G, Al-Achi BJ, Platsouka E, Levy SB .1988.** Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *App/ Environ Microbiol* **54**, 2432-2438
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J. and Mauch-Mani, B. 2002.** Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7** , 210-216 _.
- Cook, R.J., and Baker, K.F 1983.** The natural and Practices of biological control of plant pathogens. American phytopathological Society, St Paul, 539 pp.
- Cook, R.J., and Weller, D.M. 1987.** Managment of take-all in consecutive crops of wheat or barley. In I. Chet (ed.), Innovative appraoches to plant disease control, pp. 41-76. Wiley, New York.
- Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto,D., Mazzola, M., Banger, G., Kim,D.S. 1995.** Molecular mechanisms of defence by rhizobacteria against root disease, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 4197-4201.
- Cooper R .1959.** Bacterial fertilizers in the Soviet Union. *Soils Fertil* **22**, 327-333.
- Cox, C. D. ,Rinehart, K. L. , Moore, M. L., and Cook, J.C. 1981** Pyochelin. novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Nath. Acad. Sci. USA* **78** ,4256-4260.
- Crowley E, Reid CPP, Szaniszló PJ .1987.** Microbial siderophores as iron sources for plants. In: *Mon transport in microbes plants and animals* .GWinkelmann, D Van der Helm, JB Neilands, eds. VCH, Weinheim, 375-385
- Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, Stalon V.,1986.** Biosynthesis and metabolism of arginine in *bacteria*. *Microbiol Rev* **50**, 314-352
- Curl, E.A . 1982.** The rhizosphere: relation to pathogen behaviour and root disease. *Plant dis* **66**.624-630.
- Dagnelie, P. 1975.** Theories et methodes statistiques. Vol2. Les methodes de l'interference statistique. Les presses agronomiques de Gembloux. 463p.
- Dao, K.H.T., Hamer, K.E., Clark, C.L., Harshman, L.G. 2001.** pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**, 2425-2434.
- Davies KG, Whitebread R .1989.** Factors affecting the colonization of a root system by fluorescent pseudomonads: the effects of water, temperature and soil microflora. *Plant Soil* **116**, 247-256
- De Boer, M., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 1996.** Biological control of fusarium wilt of radish by combinations of fluorescent *Pseudomonas* spp. strains. in: Biological and Integrated Control of Root Diseases in Soilless Cultures (C. Alabouvette, ed.), IOBC *wprs Bulletin* **19** , 47-52.
- De Boer, M., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 1997.** *In vitro* compatibility between fluorescent *Pseudomonas* spp. strains can increase effectivity of Fusarium wilt control by combinations of these strains. In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Present Status and Future Prospects (A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino, eds.), pp. 380-382. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- De Boer, M., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 1998.** *In vitro* compatibility between fluorescent *Pseudomonas* spp. strains can increase effectivity of Fusarium wilt control by combinations of these strains. In: Molecular Approaches to Biological Control (B.K. Duffy, U. Rosenberger and G. DJfago, eds), IOBC/wprs Bulletin **21**(9) , 257-262.
- De Boer, M., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 1999.** Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 201-210.
- De Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J.J.B., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 2003.** Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* **93** , 626-632_.

- De Freitas, J.R., Germida, J.J. 1991.** *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *rhizoctonia solani*. *Can J Microbiol* **37**, 78-804.
- De Meyer, G, and Höfte, M. 1997.** Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* **87**, 588-593.
- De Weger, L.A., VanBoxtel, R., VanDer Burg, B., Bruter, R.A., Geels, F.P., Schippers, B., Lugtenberg, B. 1986.** Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant growth stimulating, root colonizing *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol* **165**, 585-594.
- De Weger, L. A. , Van der Vlugt, C. I. M. , Wijfies, A. H. M. , Bakker, P. A. H. M. , Schippers, B. , and Lugtenberg, B. 1987.** Flagella of a plant growth stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonisation of Potato roots. *J. Bacteriol.* **169**, 2769-2773.
- De Weger, L.A., van Arendonk, J.J., Recourt, K., van der Hofstad, G.A., Weisbeek, P.J. et Lugtenberg, B., 1988.** Siderophore-mediated uptake of Fe³⁺ by the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida* strain WCS358 and by other rhizosphere microorganisms. *J Bacteriol.* **170**, 4693-4698.
- De Weger, L.A., Bloemberg, G.V., Van Wezel, T., Van Raamsdonk, M., Glandorf, D.C.M., Van Vuurde, J., Jann, K. and Lugtenberg, B.J.J. 1996.** A novel cell surface polysaccharide in *Pseudomonas putida* WCS358, which shares characteristics with *Escherichia coli* K antigens, is not involved in root colonization. *J. Bacteriol.* **178**, 1955-1961.
- Défago, G. , and Hass, D. 1990.** Pseudomonads as antagonists of soil borne plant pathogens : Mode of actions and genetic analysis. pp 249-291 in : *Soil Biochemistry*. Vol. 6. J. M. Bollag and G. Stotzky, eds. Marcel Dekker, New York.
- Défago, G. , Berling, C. H., Henggeler, S. , Hungerbühler, W. , Kern, H. , Schlepp, P. , Stutz, E. W. , and Zurrer, M. 1987.** Survie d'un *Pseudomonas fluorescens* dans le sol et protection du blé contre des maladies d'origine fongique. *Schweiz. Landwirtsch. Fo.* **26**, 155-160.
- Defago G, Haas D, Berling CH, Burger U, Keel C, Voisard C, Wirthner P, Wuthrich B . 1990.** Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms. In: *Bio/ogical control of soil-borne plant pathogens* .D Hornby, ed., CAB Int, 93-108
- Dekkers, L.C., Van der Bij, A.J., Mulders, I.H.M., Phoelich, C.C., Wentwoord, R.A.R., Glandorf, D.C.M., Wijffelman, C.A. and Lugtenberg, B.J.J. 1998.** Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS356. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 763-771.
- Delorme, S. 2002.** Caractères bactériens associés à la compétitivité des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère. Thèse Doctorat - Université Bourgogne, France. 165p.
- Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Coberand, T., Meyer, J.M., Gardan, L. 2002.** *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils, *Int. j. syst. Bacteriol.* **52**, 513-523.
- Delorme S., Philippot, Edel-Herman V., Deuleuvot C., Mougél C., Lemanceau P. 2003.** Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ* and 16S rRNA gene in fluorescent pseudomonads. *App Env Microb* **2**, 1004-1012.
- Demange, P., Wendenbaum, S., Bateman, A., Dell, A., Abdallah, M.A. 1987.** Structure and physicochemical properties of pyoverdins and related compounds. In: *Iron transport in microbes, plants and animals*, Weinheim : VCH. 167-187.
- Densison R F, Bledsoe C, Kahn M, O'gara F, SIMMS E L, and Thomashow L S. 2003.** Cooperation in the rhizosphere and the "free rider" problem. *Ecology*, **84** (4) ,. 838-845.
- Dickson, J.S., Koochamaraie, M. 1989.** Cell surface change characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surface. *Appl Environ Microbiol.* **55**, 832-836.
- Digat, B. 1989.** Strategies for seed bacterization. *Acta Hort* **253**, 121-130.
- Digat, B. 1991.** A new encapsulation technology for bacterial inoculants and seed bacterization. In *Plant Growth-Promoting rhizobacteria. Progress and Prospects*. C. Keel, B. Koller, and G. Défago, (eds.), IOB/ WPRS Bulletin XIV / **8**, 383-391.
- Digat, B. 1992.** Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. *Phytoma. Défense des végétaux.* **441**, 34-38.
- Digat, B. 1994.** Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : Le cas des *Pseudomonas*. The plant growth promoting rhizobacteria. An example with *Pseudomonas*.. *C.R. Acad. Agric. Fr.* **80(2)**, 125-140.
- Digat, B. et Gardan, L., 1987.** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bulletin OEPP.* **17**, 559-568.
- Digat B, Gaudillat M, Labadie JM .1990.** Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes to plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Symbiosis* **9**, 295-303

- Döbereiner, J., and Baldani, V. L. D. 1979.** Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Asospirillum lipofrum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**, 1264-1269.
- Dowling, D.N. et O'Gara, F., 1994.** Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**, 133-140.
- Duffy, B.K., Défago, G. 2000.** Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3142-3150.
- Duijff, B.J., Meijer, J.W., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1993.** Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Neth. J. Plant Pathol.* **99**, 277-289.
- Duijff, B.J., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1994a.** Ferric pseudobactin 358 as an iron source for carnation. *J. Plant Nutrition* **17**, 2069-2078.
- Duijff, B.J., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1994b.** Suppression of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Sci. Technol.* **4**, 279-288.
- Duijff, B.J., Kogel, W.J. de, Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1994c.** Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 1681-1688.
- Duijff, B.J., Erkelens, A., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1995.** Influence of pH on suppression of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r. *J. Phytopathol.* **143**, 217-222.
- Duijff, B.J., Gianinazzi-Pearson, V., Lemanceau, P. 1996.** Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol.* **125**, 325-334.
- Duijff B.J., Poughlair P., Olivain C., Alabouvette C., Lemanceau P. 1998.** Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Eur J Plant Pathology* **104**, 903-910.
- Duijff, B.J., Recorbet, G., Bakker, P.A.H.M., Loper, J.E., Lemanceau, P. 1999.** Microbial antagonism at the root level is involved in suppression of Fusarium wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* **89**, 1073-1079.
- Dupler M, Baker R .1984.** Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent in soil. *Phytopathology* **75**, 1047-1052
- Elad Y, Baker R .1985a.** The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **75**, 1053-1059
- Elad,Y., Baker,R. 1985b.** influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **75**, 1047-1052.
- Elad Y, Chet I .1987.** Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* **77** , 190-195
- Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickmann, E., Oger, P.M. et Dessaux, Y., 2001.** Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* **67** , 1198-1209.
- Fodor ,J., Gullner, G., Adam, A.L., Barna, B., Kômives, T. and Kiraly, Z. 1997.** Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.* **114**,1443-1451.
- Folders, J., De Groot, A., Van Loon, L.C. and Tommassen, J. 1996.** Biocontrol of soil-borne plant pathogens by means of biotechnology. in: Biological and Integrated Control of Root Diseases in Soilless Cultures (C. Alabouvette, ed.), IOBC wprs Bulletin **19** , 115-119.
- Foster RC, Rovira AD .1978.** The ultrastructure of the rhizosphere of *Trifolium subterraneum* L. In: *Microbial ecology* .MW Loutit, JAR Miles, eds. SpringerVerlag, Berlin, 278-290
- Frankenberger, W.T., and Arshad,M. 1991.** Microbial production of plant growth regulating substances in soil. In Plant Growth-Promoting rhizobacteri. Progress and Prospects. C. Keel, B. Koller, and G. Défago, (eds.), IOB/ WPRS Bulletin XIV I **8** , 162-171.
- Fravel DR .1988.** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu Rev Phytopatho.* **26**, 75-91
- Fuqua WC., Winam SC., Greenberg EP., 1994.** Quorum sensing in bacteria: The Lux R- Lux I family of cell density responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176** ,269-275.
- Fuqua, C. et Greenberg, E.P., 1998.** Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol.* **1**, 183-189.
- Gamalero, E., Lingua G., Berta G., Lemanceau P. 2003.** Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie* **23**, 407-418.

- Gamard P, Sauriol F, Benhamou N, Belanger RR, Paulitz TC. 1997.** Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *J Antibiot*, **50** ,742-749.
- Garcia de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M. 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can.J.Microbiol.* **47**, 404-411.
- Gardan, L. et Luisetti, G. 1981.** Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. INRA Angers, France. 32p.
- Gaur R, Shani N, Kawaljeet N., Johri B. N, Rossi P and Aragno M. 2004.** Diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads do not influence fungi in wheat rhizosphere. *Current Science*. **86** (3), 10 , 453 – 457.
- Geels FP, Schippers B .1983.** Reduction of yield depressing in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatment with antagonistic fluorescent *Pseudomonas spp.* *Phytopathol/ Z* **108**, 207214
- Geraats, B.P.J., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 2001.** Can enhanced susceptibility to pathogens of ethylene-insensitive plants be overcome by biocontrol agents that induce systemic resistance ? in: Biocontrol Agents: Mode of Action and Interaction with Other Means of Control (Y. Elad, S. Freeman and E. Monte, eds.), IOBC *wprs Bulletin* **24** , 283-286.
- Geraats, B.P.J., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 2002.** Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15** ,1078-1085 .
- Geraats, B.P.J., Bakker, P.A.H.M., Lawrence, C.B., Achuo, E.A., Höfte, M. and Van Loon, L.C. 2003.** Ethylene-insensitive tobacco shows differential altered susceptibility to different pathogens. *Phytopathology* **93** , 813-821
- Gilbert, G.S., Parke, J.L., Clayton, M.K. et Handelsman, J., 1993.** Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*. **74** , 840-854.
- Gill PR, Warren GJ ., 1988 .**An iron-antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. *J Bacteriol* **170**, 163-170.
- Glandorf, D.C.M., Peters, L.G.L., van der Sluis, I., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B., 1993.** Crop specificity in rhizosphere pseudomonads and the involvement of root agglutinins. *Soil Biol Biochem.* **25** , 981-989.
- Glandorf, D.C.M., Sluis, I. van der, Anderson, A.J., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1994.** Agglutination, adherence and root colonization by fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol* **60**, 1726-1733.
- Glandorf, D.C.M., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 1995.** Influence of the expression of antibacterial and antifungal genes in transgenic plants on the saprophytic soil microflora. in: Unanswered Safety Questions when Employing GMO's. Workshop Proceedings Leeuwenhorst Congress Centre Noordwijkerhout, the Netherlands, May 2-4, 1995, pp.111-115. Coordination Commission Risk Assessment Research (CCRO).
- Glandorf, D.C.M., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 1997.** Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. *Acta Bot. Neerl.* **46**, 85-104.
- Glandorf, D.C.M., Thomashow, L.S., Smit, E., Wernars, K., Bakker, P.A.H.M., Van Loon, L.C. 1997.** Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358R to study effects on the indigenous soil microflora: preliminary experiments. In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Present Status and Future Prospects (A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino, eds.), pp. 428-430. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Glandorf, D.C.M., Verheggen, P., Jansen, T., Thomashow, L.S., Leeflang, P., Smit, E., Wernars, K., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 1999.** Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r to study effects on the indigenous soil microflora. In: Workshop Proceedings Leeuwenhorst Congress Centre Noordwijkerhout, the Netherlands, March 5-6, 1998, pp. 41-46. Coordination Commission Risk Assessment Research (CCRO).
- Glandorf, D.C.M., Verheggen, P., Jansen, T., Jorritsma, J.-W., Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K., Thomashow, L.S., Laureijs, E., Thomas-Oates, J.E., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 2001.** Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** , 3371-3378.
- Glick, B.R., 1995.** The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can Journal Microbiol* **41**, 109-117.
- Goldstein, A. H. 1986.** bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* **1** ,51-57.
- Gonzalez, L.E., Bashan, Y. 2000.** Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth promoting rhizobacteria *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ microbiol* **66**, 1527-1531.
- Grayston S.J., Stephens J.H., Nelson L.M. 1991.** Field and greenhouse studies on growth promotion of spring wheat inoculated with co existent rhizobacteria pp 11-16 in: plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel , B. Koller , and G. Défago , eds. Int. Org. Biol. Control Noxious Anim. plants/West. *palaerctic Reg. Sec. Bull.* **1418**.

- Grimes HD, Mount MS .1987.** Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biot Biochem* **6**, 27-30
- Grimont, P.A.D., Popoff, M.Y., Grimont, F., Coynault, C. et Lemelin, M., 1980.** Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr Microbiol.* **4** , 325-330.
- Grimont, P.A.D., Vancanneyt, M., Lefèvre, M., Vandemeulebroecke, K., Vauterin, L., Brosch, R., Kersters, K. et Grimont, F., 1996.** Ability of Biolog and Biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the pseudomonads. *Syst Appl Microbiol.* **19** ,510-527.
- Gross, M. 1990.** Factors of virulence of bacteria. In : Methods in phyto bacteriology Ed. Klement, Z., K , Rudolph, and D.C, Sands . Akademia Kiado , Budapest. 436 - 437.
- Guerrinot, M.L. 1994.** Microbial iron transport. *Ann. Rev. Microbiol* **48** , 743-772.
- Gurusiddaiah, S., Weller, D.M, Sarkar, A. and Cook R.,j 1986.** Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother*, **29** , 488-495.
- Guttererson, N. 1990.** Microbial fungicides : Recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10** , 69-91.
- Haas D, Galimand M, Gamper M, Zimmermann A. 1990.** Arginine network of *Pseudomonas aeruginosa*: Specific and global controls. In : *Pseudomonas* Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology (S Silver, AM Chakrabarty, B Iglewski, S Kaplan, eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 303-313
- Haas, D., Keel., Laville,L., Maurhofer,M., Oberkanoli,T., Schneider., Voisard,C., Wuthrich,B., and Défago,G. 1991.** Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO involved in suppression of root diseases, pp.450-456. In H. Hennecke and D.P.S. Verma.ed., *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*.Kluwer Academic Dordrecht, Netherlands.
- Haas, D., Blumer C., Keel C. 2000.** Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected. Importance of positive feedback regulation. *Curr opin Biotechnol* **11**, 240-279.
- Hammer PE, Hill DS, Lam ST, Van Pée KH, Ligon JM. 1997.** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl Environ Microbiol*, **63** ,2147-2154.
- Hammer PE, Burd W, Hill DS, Ligon JM, Van Pée K-H. 1999.** Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbiol Lett*, **180** ,39-44.
- Hammerschmidt, R., Métraux, J.-P. and Van Loon, L.C. 2001.** Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 1-6.
- Handelsman, J., and Stabb. E.V. 1996.** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, **8** , 1855-1869.
- Harayama S, Wasserfallen A, Cerdan P, Rekik M .1992.** Mutational modification of the substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase encoded by TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida*. In : *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology .E Galli, S Silver, B Witholt, eds., Am Soc Microbiol, Washington, DC, 223-230.
- Hase, S., Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C. 2001.** Mechanisms of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance. *In: Recognition and Signal Transduction in Plant-Microbe Interactions* (T. Teraoka, ed), PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium Report 37, pp. 15-24. Yamanashi, Japan.
- Hase, S., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2003.** Colonization of Arabidopsis roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **62** , 219-226
- Heil, M. 2001.** The ecological concept of costs of induced systemic resistance .ISR.. *Eur. J. Plant. Pathol.* **107** , 137-146.
- Heming BC .1986.** Microbial-iron interactions in the plant rhizosphere. An overview. *J Plant Nutr* **9**, 505-521
- Hildebrand, D.C, Sschroth, M.N., and Sand , D.C .1983.** *Pseudomonas* . pp 60-77. In Schaad N.W. .Ed . Laboratory guide for identification of plant pathogens bacteria . 2nd ed. St Paul Minnesota . APS.
- Hildebrand, D.C., Palleroni, N.J., Henderson, M., Toth, J. et Johnson, J.L., 1994.** *Pseudomonas flavescentis* sp. nov., isolated from walnut blight cankers. *Int J Syst Bacteriol.* **44** , 410-415.
- Hoffland, E., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 1997.** Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - reply. *Phytopathology* **87**, 138.
- Hoffland, E., Hakulinen, J. and Van Pelt, J.A. 1996b.** Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* **86** , 757-762.

- Hoffland, E., Niemann, G.J., Van Pelt, J.A., Pureveen, J.B.M., Eijkel, G.B., Boon, J.J. and Lambers, H. 1996a. Relative growth rate correlates negatively with pathogen resistance in radish: the role of plant chemistry. *Plant Cell Environ.* **19**, 1281-1290.
- Hoffland, E., Pieterse, C.M.J., Bik, L. and Van Pelt, J.A. 1995. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**, 309-320.
- Hofte, M., Boelens, J., and Verstraete, W. 1991. seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANP15. *soil Biol. Biochem.*, **23**, 407-410.
- Höfte, M., Buysens, S., Koedam, N., Cornelis, P. 1993. Zinc effects siderophore-mediated high affinity iron uptake systems in the rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Bio / metals* **6**, 85-91.
- Hohnadel, D. et Meyer, J.M., 1988. Specificity of pyoverdine mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. *J Bacteriol.* **170**, 4865-4873.
- Holloway BW., Morgan AF. 1986. Genomic organization in *Pseudomonas*. *Ann. Rev Microbiol* **40**, 79-105.
- Holloway, B.W. 1992- *Pseudomonas* in the late twenties three century . In: Molecular Biology and biotechnology . E. Galli, S. Silver, B. Witholt, eds., AM Soc Microbiol, Washington. DC, 1-8
- Howell CR, Stipanovic RD .1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacteria. *Phytopathology* **69**, 480-482
- Howell CR, Stipanovic RD .1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* **70**, 712-715
- Howie WJ, Cook RJ, Weller DM .1987. Effects of soil matric potential and cell mobility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology* **77**, 286-292
- Howie WJ, Suslow TV .1986. Effect of antifungal compound biosynthesis on cotton root colonization and *Pythium* suppression by a strain of *Pseudomonas fluorescens* and its antifungal minus isogenic mutant. *Phytopathology* **76**, 1069 .abstract.
- Hynes, R.K and Lazarovits, G. 1989. Effect of seed treatment with plant growth- promoting rhizobacteria on the protein profiles of incellular fluids from bean and tomato leaves. *Can J plant Microbe Interact.* **4**, 393 – 399.
- Jacques MA .1994. Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllle de *Cichorium endivia* var *latifolia* L. Thèse de doctorat, université de Paris-XI, Orsay, 123 p
- James DW, Suslow TV, Steinback KE .1985. Relationship between rapid, firm adhesion and longterm colonization of roots by bacteria. *Appt Environ Microbiol* **50**, 392-397
- Janse J.D., Derks J.H.J., Spit B.E., Van Der Tuin W.R., 1992. Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria, including *P. marginales* strains, using whole cell fatty acid analysis, *Syst. Appt. Microbiol.* **15**, 538-553.
- Jaques, P., Delfosse, P., Ongena, M., Lepoivre, P., Cornelis, P., Koedam, N., Neirinckx, L., Thonart, P. 1993. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plants transmises par le sol. *Cahiers agriculture* **2**, 301-307.
- Jasalavich CA, Anderson AJ .1981. Isolation from legume tissue of an agglutinin of saprophytic pseudomonads. *Can J Bot* **59**, 264-271
- Jessen, O. 1965. *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads. A taxonomic study, Copenhagen : Munksgaard. 345 p.
- Johnson, J. et Palleroni, N.J., 1989. Desoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int J Syst Bacteriol.* **39**, 230-235.
- Jonsthon, A., and Booth, C. 1982. Plant pathologist's pocket book. 2nd ed Commonwealth. Mycological Institute, Kew Surrey, England. 439p.
- Joyce, E., Loper, J.E., Carol, A., Ishimaru, 1991. Factors influencing siderophore mediated biocontrol activity of rhizosphere *Pseudomonas* spp. The rhizosphere and plant growth. 253-261.
- Kado, C.I., and Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, **145**, 1365-1373.
- Keel, C., Voisard, C., Berling, C. H., Kahr, G., and Défago, G. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* **79**, 584-589
- Keel, C., and Défago, G. 1991 The fluorescent siderophore of *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO has no effect on the suppression of root diseases of wheat. pp 136-142 in: Plant Growth- Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel, B. Koller, and G. Défago, eds. Int. Org. Biol. control Noxions Anim Plants/West Palaerctic Reg. *Sec. Bull.* 1418.

- Keel, C., Haas, D., Laville, J., Maurhofer, M., Oberhansli, Th., Schnider, U., Voisard, C., and Défago, G. 1991. Suppression of soil-borne pathogens by *Pseudomonas fluorescens*-A Multifactorial mechanism. pp 195-196 in: plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel, B. Koller, and G. Défago, eds. Int. Org. Biol. Control Noxious Anim. plants/West. *palaerctic Reg. Sec. Bull.* 1418.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., and Défago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 5, 4-13.
- Keel C, Wirthner P, Oberhansli TH, Voisard C, Burger U, Haas D, Defago G .1990. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbioses* 9, 327-341.
- Keel, C., Welter, D.M., Natsch, A., Defago, G., Cook, R.J. et Thomashow, L.S., 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl Environ Microbiol.* 62, 552-563.
- King, E.O., Ward, M.K. et Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *JLab Clin Med.* 44, 301-307.
- Kinscherf, T.G., Willis, K. 2002. Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *J Bacterial* 184, 2281-2286.
- Klement, Z., 1963. Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature.* 199, 299-300.
- Kloepper, J. W. 1991. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soilborne diseases-in: Biological control of diseases. J. Bay-Petersen, ed, FFTC Book, 42. Food and Fertilizer technology center, Taipei. Taiwan, 142-152.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., and Zablotowicz, R. M. 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7, 39-44.
- Kloepper JW, Hume DJ, Scher FM, Singleton C, Tipping B, Laliberte M, Frauley K, Kutchaw T, Simonson C, Lifshitz R, Zaleska I, Lee L .1988. Plant growth-promoting rhizobacteria on canola. *Plant Dis* 72, 42-46
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN .1980a. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885-886
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN .1980b. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr Microbiol* 4, 317-320
- Kloepper JW, Schroth MN .1981. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71, 642-664
- Kloepper, J.W., Tuzun, S., and Kuc, J.A. 1992. Proposed definition related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology* 2, 349-351.
- Kloepper, JW. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control Agents. In: Metting B, ed. Soil Microbial Technologies. New York: M. Dekker Inc., 255-274.
- Knoester, M, Linthorst, H.J.M., Bol, J.F. and Van Loon, L.C. 2001. Involvement of ethylene in lesion development and systemic acquired resistance in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59, 45-57.
- Knoester, M., Van Loon, L.C., Van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. and Linthorst, H.J.M. 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1933-1937.
- Knowles, C. J, Bunch, A. W. 1986. Microbial cyanide metabolism. *Adv Microb Physiol.* 27, 73-111.
- Koster, M., Ovaa, W., Bitter, W. et Weisbeek, P., 1995. Multiple outer membrane receptors for uptake of ferric pseudobactins in *Pseudomonas putida* WCS358. *Mol Gen Genet.* 248, 735-743.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocanea* by the oxidase reaction. *Nature* .London. . 178, 703.
- Krasilnikov M .1961. On the role of soil bacteria in plant nutrition. *J Gen Appt Microbiol/* 7, 128-144.
- Kraus J, Loper JE . 1991. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cotton and cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: mechanistic studies. In: *Plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects* .C Keel, B Koller, G Defago, eds. IOBC/ WPRS XIV/8, 172-176
- Kresters, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Devos, P., Gillis, M. et Schleifer, K.H., 1996. Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Syst Appl Microbiol.* 19, 465-477.
- Kwok, O.C.H., Fahy, P.C., Hoitink, H.A.J., and Kuter, G.A., 1987. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 77, 1206-1212.

- Lampis, G. Deidda, D., Maullu, C. Petruzzelli, S, and Pompei, R. 1996.** Karalicin, a new biologically active compound from *Pseudomonas fluorescens- putida* J. *Antibiotics*. Vol **49**,3.
- Lanna AC., Oliveira MGA., Barros EG., Moreira MA. 1996.** Kinetic parameters of leaf lipoxgeinase pool from normal soybean genotypes and from a line devoid of seed lipoxygenase . *Rev Bras Fisiol vegetal* **8** , 87-92.
- Larbaoui, A. 1999.** Mise en évidence de la production de sidérophores, de l'acide cyanhydrique et d'antibiotiques chez quelques souches de *Pseudomonas fluorescens*. Thèse Ing (Univ Blida) 68p.
- Larbaoui,A. 2003.** Etude des mécanismes d'action des *Pseudomonas* spp fluorescents dans l'amélioration de la protection biologique des plantes par induction de résistance systémique vis à vis des fusarioses vasculaires. Thèse Magistère. Univ Blida, 94p.
- Larkin RP., Fravel DR. 1998.** Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of fusarium wilt of tomatoes. *Plant Dis* **82**, 1022-1028.
- Larkin RP., Hopkins DL., Martin FN., 1993.** Ecology of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* wilt of watermelon. *Phytopathology* **83** ,1105-1116.
- Larpent J P., Sanglier, J.J.1989.** Biotechnologie des antibiotiques. Ed Maye. 481pp.
- Latour X. et Lemanceau, P., 1997.** Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie*. **17** , 427-443.
- Latour X., 1996.** Effet de la plante et du sol sur la diversité des populations telluriques de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse de doctorat-Université de Bourgogne, 70p, Dijon.
- Latour X., Corberand,T., Laguerre,G., Allard,F., Lemanceau,P. 1996.** The composition of fluorescent Pseudomonads associated with roots is influenced by plant soil type. *Applied and environmental microbiology*.**62**(7) , 2449-2456.
- Latour X., Delorme S., Mirleau P., Lemanceau P. 2003.** Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* **23**, 397-405.
- Latour X., Philippot, L., Corberand, T. et Lemanceau, P., 1999.** The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiol Ecol.* **30** , 163170.
- Laville J, Blumer C, von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C, Haas D. 1998.** Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J Bacterid*, **180** ,3187-3196.
- Leefflang P., Smit, E., Glandorf, D.C.M., Van Hannen, E.J. and Wernars, K. 2002.** Effects of *Pseudomonas putida* WCS358r and its genetically modified phenazine producing derivative on the *Fusarium* population in a field experiment, as determined by 18S rDNA analysis. *Soil Biol. Biochem.* **34** , 1021-1025.
- Leeman M., Den Ouden, F.M, Van Pelt, J.A., Cornelissen, C., Matamala-Garros, A., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1996.** Suppression of fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* **102** , 21-31.
- Leeman, M., Den Ouden, F.M., Van Pelt, J.A., Dirkx, F.P., Steijl, H., Bakker, P.A.H.M., and Schippers, B.1996.** Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **86**,149-155.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1995.** Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* **101** , 655-664.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1995a.** Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **85** , 1021-1027.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Hendrickx, M.J., Scheffer, R.J., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1995b.** Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* **85** , 1301-1305.
- Leisinger, T. et Margraff, R., 1979.** Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev.* **43** , 422-442.
- Lelliott, R.A, and Stead, D.E. 1987.** Methods for the diagnostic of bacterial diseases of plants . BSC. MSC. Blackwell Scientific. Oxford . 212p.
- Lelliott, R.A., Billing, E. et Hayward, A.C., 1966.** A determinative scheme for fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *JAppl Bacteriol.* **29** , 470-489.

- Lemanceau P .1988.** Réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires : étude critique des théories proposées. Thèse de doctorat, univ Claude bernard, Lyon, 99 p
- Lemanceau P, Alabouvette C .1991.** Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protec* **10**, 279-286
- Lemanceau P, Alabouvette C, Couteaudier Y .1988.** Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XIV. Modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer et de glucose. *Agronomie* **8**,155-162
- Lemanceau P, Alabouvette C, Meyer JM. 1986.** Production of fusarinine and iron assimilation by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium*. In: *Iron siderophores and plant diseases* .TR Swinburne, ed. Plenum press, New York, 251-253
- Lemanceau P, Samson R .1983.** Relations entre quelques caractéristiques *in vitro* de 10 *Pseudomonas* fluorescents et leur effet sur la croissance du haricot .*Phaseolus vulgaris* L. In : *Les antagonismes microbiens*, 24e colloque SFP Bordeaux INRA, 327-328
- Lemanceau, P. 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : Exemples des *Pseudomonas* spp. Fluorescents. *Agronomie* **12** , 413-437.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C. 1993.** Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent *Pseudomonads*: mechanism and applications. *Biocontrol sciences and Technology* **3** , 219-234.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., De Kogel, W.J., Alabouvette, C. and Schippers, B. 1993.** Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* F047 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** , 74-82.
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J.M. et Alabouvette, C., 1995.** Effect of two plant species, flax .*Linum usitatissimum* L. and tomato .*Lycopersicon esculentum* Mill., on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol.* **61** , 1004-1012.
- Lemanceau, P., et Heulin, T. 1998.** La rhizosphère. In Stengel, P, Gelin S (Eds.), pp 93-106. Soil, intercae fragile, Coll. « Mieux comprendre » , INRA et Nathan, Paris.
- Leong, J.1986.** Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens . *Annu. Rev Phytopathol* **24** , 187-208.
- Halda-Alija L. 2003.** Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Can. J. Microbiol.* **49**(12) , 781-787.
- Lifshitz R, Kloepper JW, Kozlowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM, Zaleska I . 1987.** Growth promotion of canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can J Microbiol* **33**, 390-395
- Linberg GO.1981.**An antibiotic lethal to fungi. *Plant Dis* **65**, 680-683.
- Linderman RG, Paulitz TC .1990.** Mycorrhizalrhizobacterial interactions. In: Biological control of soil-borne plant pathogens .D Hornby, ed. CAB, Int, 261-283
- Liu, L., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1995.** Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth- promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **85**. 843 – 847
- Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1992.** Induction of systemic resistance against cucumber mosaic virus by seed inoculation with select rhizobacterial strains. .Abst.. *Phytopathology*. **82** , 1108-1109.
- Liyan P., Wilhelm B. 2004.** Signal from the underground: bacterial volatils promete growth in Arabidopsis. *Trends Plant Science* **9**(6), 263-266.
- Loper JE, Buyer JS .1991.** Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol Plant-Microbe Interac* **4**, 5-13
- Loper JE, Schroth MN .1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* **76**, 386-389
- Loper, J.E. et Henkels, M.D., 1997.** Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Appl Environ Microbiol.* **63** , 99-105.
- Loper, J.E. et Lindow, S.E., 1994.** A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces. *Appl Environ Microbiol.* **60** , 1934-1941.
- Loper, J.E., Haack, C. et Schroth, M.N., 1985.** Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Appl Environ Microbiol.* **49** , 416-422.
- Louvet, J., Rouxel, F., Alabouvette, C. 1976.** Recherche sur la résistance des sols aux maladies. I. Mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. *J. gen. Microbiol*, **107**,319 -328.

- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V. et Simons, M., 1999.** Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ Microbiol.* **1** , 439-446.
- Lugtenberg, B.J.J., Weger, L.A. de and Schippers, B. 1994.** Bacterization to protect seed and rhizosphere against disease. in: BCPC Monograph No 57: Seed Treatment: Progress and Prospects, pp. 293-302.
- Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L.C., Bensraj, M., Bloembergen, G.V., Camacho, M., Chin-A. Woeng, T., Van der Hondel, K., Kravchenko, L., Kuiper, I., Lagobodi, A.L. 1999.** *Pseudomonas* genes and traits involved in tomato root colonization. In: Biology of Plant-Microbe interactions, Vol 2. Proceeding of the 9th international congress on molecular Plant-Microbe interactions 25-30., Amsterdam. PJ national society for molecular Plant-Microbe interactions.
- Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L., Bloembergen, V.G. 2001.** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol* 46:1-49.
- Lynch JM., Whipps JM. 1991.** Substrate flow in the rhizosphere. IN the Rhizosphere and plant growth (Keister DL., and Cregan B., eds.) pp, 15-24, Beltsville Sympos. In *Agric Res* 14, Kluwer, Dordrecht. The Netherlands.
- Mamoun, M. and Olivier, J. M. 1992.** Effect of pseudomonads on colonization of hazel roots by the ecto-mycorrhizal species *Tuber melanosporum* and its competitors. *Plant soil.* **139** , 265-273.
- Mantelin S., and Bruno Touraine B., * 2004.** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake *Journal of Experimental Botany.* **55**(394) , 27-34
- Marschner H, Romheld V, Kissel M. 1968.** Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J Plant Nutr* ; **9** , 3-7.
- Marugg JD, Weger LA .de., Neilander HB, Oorthuizen M, Recourt K, Lugtenberg B, Van der Hofstad GAHM, Weisbeek PJ . 1989.** Cloning and characterization of a gene encoding an outer membrane protein required for siderophore-mediated uptake of Fe³⁺ in *Pseudomonas putida* WCS358. *J Bacteriol* **171**, 2819-2826
- Mattar, J. 1993.** Les *Pseudomonas* fluorescents de la rhizosphère : caractérisation, incidence de la température et microflore autochtone sur la colonisation racinaire. Thèse. Doct. Univ. Lyon 130p.
- Maurhauser, M., Hass, C., Meuwly, P., Metraux, J. P., and Défago, G. 1994.** Induction of systemic resistance of tobacco to necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gac A* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84** , 139-146.
- Maurhauser, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D., and Défago, G. 1992.** Influence of induced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology* **82** , 190-195.
- Mavrodi, D.V., Ksenzenko, V.N., Bonsall, R.F., Cook, R.J., Boronin, A.M. et Thomashow, L.S., 1998.** A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol.* **180** , 2541-2548.
- Mavrodi, O.V., Gardener, B.B.M., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. et Thomashow, L.S., 2000.** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* **91** , 35-43.
- McInroy JA, Kloepper JW .1991.** Analysis of populations densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. In: *Plant growth-promoting rhizobacteria-progress and prospects* .C Keel, B Koller, G Defago, eds. IOBC/ WPRS, XIV/8, 328-331
- Meena, B., Radhajealakshmi, R., Vidhyasekaran, R., and Velazhahan, R. 1999.** Effect of foliar application of *Pseudomonas fluorescens* on activities of phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and B-1,3- Glucanase and accumulation of phenolics in rice. *Acta phytopathologica et entomologica hungarica* **34** .4., pp 307 – 315.
- Mench M .1985.** Influence des exsudats racinaires solubles sur la dynamique des métaux dans la rhizosphère du maïs *Zea mays L.*. Thèse de Dr de l'INPL, Univ Nancy, 109 p
- Menke, F.L.H., Van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J., and Klessig, D.F. 2004.** Silencing of *Arabidopsis* MAP kinase 6 compromises disease resistance. *Plant Cell* **16** , 897-907 .
- Mercado-Blanco, J., Olsson, P.E., Van der Drift, K.M.G.M., Thomas-Oates, J.E., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 1997.** Analysis of a gene cluster involved in the production of salicylic acid and a new siderophore in *Pseudomonas fluorescens* WCS374. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Present Status and Future Prospects* (A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino, eds.), pp. 355-357. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Mercado-Blanco, J., Olsson, P.E., Van der Sluis, I., Van der Drift, K.M.G.M., Thomas-Oates, J.E., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 1998.** Analysis of a gene cluster involved in the biosynthesis of a new salicylic acid-based siderophore and its implication for the suppression of Fusarium wilt by *Pseudomonas fluorescens* WCS374. In: *Molecular Approaches to Biological Control* (B.K. Duffy, U. Rosenberger and G. Défago, eds), IOBC/ wprs Bulletin **21**(9) , 35-40.

- Mercado-Blanco J., Van der Drift, KMG.M., Olsson PE., Thomas-Oates JE., Van Loon LC., Bakker, PAHM. 2001. Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* **183**, 1909-1920.
- Mercenier A. Simon .IP, Vander Wauven C, Haas D, Stalon V., 1980. Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **144**, 159-163
- Meyer JM, Abbdallah MA .1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. *J Gen Microbiol* **107**, 319-328
- Meyer JR, Linderman RG .1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesiculararbuscular mycorrhizal fungi and a plant growthpromoting bacteria, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol Biochem* **18**,185-190
- Meyer, J.M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol.* **174**, 135-142.
- Meyer, J.M., Hallé, F., Hohnadel, D., Lemanceau, P. et Ratefiarivelo, H., 1987. Siderophores of *Pseudomonas* - biological properties, 188-205. G. Winkelmann, D. van der Helm and J. B. Neilands .Eds., *In* Iron transport in microbes, plants and animals, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Meyer, J.M., Stintzi, A., Coulanges, V., Shivaji, S., Voss, J.A., Taraz, K. et Budzikiewicz, H., 1998. Siderotyping of fluorescent pseudomonads: characterization of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains from Antarctica. *Microbiology UK.* **144**, 3119-3126.
- Meyer, J.M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K. et Budzikiewicz, H., 1997. Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology UK.* **143**, 35-43.
- Meyer, J.M., Stintzi, A. et Poole, K., 1999. The ferripyoverdine receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 recognizes the ferripyoverdines of *P. aeruginosa* PAO1 and *P. fluorescens* ATCC 13525. *FEMS Microbiol Lett.* **170**, 145-150.
- Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C., Höfte, M. and Bakker, P.A.H.M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 177-185
- Migula W. 1894. Über ein neues system de bakterien. *Arb Bakteriolog Inst Karlsruhe* **1**: 235-238.
- Mirleau, P., 2000. Rôle de la pyoverdine et de la nitrate réductase dans la compétence rhizosphérique et tellurique de la souche *Pseudomonas fluorescens* C7R12. Thèse de Doctorat-Université de Bourgogne, .France, 88p.
- Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J.M., Mazurien, S., Lemanceau, P. 2000. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake *FEMS Microbiol Ecol* **34**, 35-44.
- Mirleau, P., Philippot, L., Corberand, T. et Lemanceau, P., 2001. Involvement of nitrate reductase and pyoverdine in competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 in Soil. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 2627-2635.
- Misaghi I., Grogan RG. 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* **59**, 1436-1450
- Moore, L.W., Kado, C.I., and Bouzar, H. 1988. Agrobacterium, p 16-36. In Scaads, N.W (ed.) . Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria . 2nd ed. St Paul MN . APS.
- Moore, J.C., Magazin, M., Ditta, G.S., Leong, J. 1984. Cloning of gene involved in the biosynthesis of pseudobactine, a high affinity iron transport agent of a plant growth-promoting *Pseudomonas* strains. *Jbacteriol.* **157**, 53-58.
- Morel, J.L., Bitton, G., Chaudry, G.R., Awong, J. 1989. Fate of genetically modified micro-organisms in the corn rhizosphere. *Curr Microbiol* **18**, 355-360.
- Morgan JAW., Whipps JM., 2001.. Methodological approaches to the study of rhizosphere carbon flow and microbial population dynamics. In: Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P., eds. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil plant interface. New York- Marcel Decker, 373-409.
- Mossialos, D., Mayer, J.M., Budzikiewicz, H., Wolff, U., Kødarn, N., Baysse, C., et al, 2000. quinolobactin, a, new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 whose production is repressed by the cognate pyoverdine . *Appl Environ Microbiol* **66**, 487-492.
- Moulin, F., Lemanceau, P., Alabouvette, C. 1996. Suppression of *pythium* root rot of cucumber by a fluorescent pseudomonads is related to reduce root colonization by *pythium aphanidratum*, *J. phytopathol.* **144**, 125-129.
- M'Piga, P., Belanger, R.R., Paulitz, T.C., and Benhamou, N. 1997- Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *radicis lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50**. 301-320.

- Neilands JB .1973.** Microbial iron transport compounds .siderochromes.. *In: Inorganic biochemistry* .GL Eichorn. Elsevier, Amsterdam, 167-202
- Neilands JB, Leong SA .1986.** Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu Rev Plant Physiol* **137**, 187-208
- Neilands, J.B., 1981.** Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr.* **1** , 27-46.
- Neilands, J.B., 1982.** Microbial envelope proteins related to iron. *Annu Rev Microbiol.* **36** , 285-309.
- Neilands,J.B.1984.** Methodology of siderophores struct. *Bonding* **58** ,1-24.
- Neilands,J.B.1995.** Siderophores: Structure and function of microbial iron Transport compounds *J. Biol. chem.* **270** , 26723-26726.
- Nelson, L. M. 2004.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. *Crop Management* doi:10.1094/CM-2004-0301-05-RV.
- Nielsen TH, Christophersen C, Anthoni U, Serensen J: Viscosinamide, .1999.** a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J Appl Microbiol*, **87** ,80-90.
- Nowak-Thompson B., Chaney N., Wing 1S., Gould Si., Loper JE. 1999.** Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol*, **181** ,2166-2174.
- O'Sullivan, D.J., and O'Gara, F. 1992.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev.* **56** , 662-676.
- Oberhansli , T. , Défago , G. , and Hass. D. 1991.** Indole-3- acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J. Gen. Microbiology.* **137** , 2273-2279.
- Oliveira E, Sieverding E, Toros .1987.** Interaction between three species of VAM fungi and an isolate of *Pseudomonas putida* on cassava. *In: Proc 7th North Am Conf Mycorrhizae* .DM Sylvia, LL Hung, JH Graham, eds. Univ Florida, Gainesville, FL 216.
- Ongena M., Jaques,P.,Delfosse P. Thonart P. 2001.** unusual traits of the pyoverdine-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* BTP1. *Biomaterials* **15**,1-13.
- Paau AS ., 1989.** Formulations useful in applying beneficial microorganisms ta seeds. *Trends Biotechnol* **6**,276-279.
- Paau AS., Graham LL., Bennett M. 1991.** Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculant pp 399-403 in: plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects. C. Keel , B. Koller , and G. Défago , eds. Int. Org. Biol. Control Noxions Anim. plants/West. *palaerctic Reg. Sec. Bull.* 1418.
- Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopolou R., Doudoroff M. 1973.** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23** 333-339.
- Palleroni NJ., Doudoroff M.,1956.** Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem* **218**, 535-548.
- Palleroni, N.J., 1984.** Gram-negative aerobic rods and cocci : family *I Pseudomonadaceae*, 141-168. Krieg, Holt, William and Wilkings .Eds., *In* Bergey's manual of bacteriology, 1, William & Wilkins, Baltimore.
- Palleroni, N.J., 1992a.** Introduction to the family *Pseudomonadaceae*, 3071-3085. A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworking, W. Harder and K. H. Schleifer .Eds., *In* The prokaryotes, Springer Verlag, New York.
- Palleroni, N.J., 1992b.** Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads, 105-115. S. Galli, S. Silver and B. Witholt .Eds., *In Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, 60, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Palleroni, N.J., Ballard, R.W., Ralston, E. et Doudoroff, M., 1972.** Desoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *JBacteriol.* **110** ,1-11.
- Parke , J. L.1990.** Root Colonization by indigenous and introduced microorganisms. pp 33-42 in: The Rhizosphere and plant Growth. D. L. Keister and P. B. Grogan , eds. Kluwer Academic publishers , Dordrecht , The Netherlands.
- Parker JE. 2003.** Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Science* **8**, 245-247.
- Parsello-Cartiaux,F.,Nussaume,L.,Robaglia,C.2003.** Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant cell Environ.* **26**,189-199.
- Pascholati SF., Nicholson RI., Butler LG. 1986.** Phenylalanine ammonia lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *J Phytopathol* **115**, 165-172.
- Peix, A., Rivas, R., Mateos, PF., Martínez-Molina E., Rodríguez-Barrueco, C., Velázquez, E. 2003.** *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **53**, 2067-2072.
- Pierson EA., Weller DM., 1994.** Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* **84** ,940-947.

- Pierson LS, Gaffney T, Lam S, Gong FC. 1995.** Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *FEMS Microbiol Lett*, **134**, 299-307.
- Pierson LS, Wood DW, Pierson EA. 1998.** Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, **36**, 207-225.
- Pierson, I.L.S., Keppenne, W.D. et Wood, D.W., 1994.** Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol*. **176**, 3966-3974.
- Pierson, L.S. et Thomashow, L.S., 1992.** Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol Plant Microb Interact*. **5**, 330-339.
- Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C. 1999.** Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci*. **4**, 52-58.
- Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C. 2004.** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opinion Plant Biol*. **7**, 456-464.
- Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., Verhagen, B.W.M. and Van Loon, L.C. 2004.** Signaling during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. In: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 4 (I. Tikhonovich, B. Lugtenberg and N. Provorov, eds.), The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN, pp. 192-195.
- Pieterse, C.M.J., Spoel, S., Ton, J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C. 2002b.** Cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent induced defenses in *Arabidopsis*. In: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Volume 3 (S.A. Leong, C. Allen and E.W. Triplett, eds), The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN, pp. 107-112.
- Pieterse, C.M.J., Ton, J., Van Wees, S.C.M., Hase, S., Léon-Kloosterziel, K.M., Verhagen, B.W.M., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C. 2002a.** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in *Arabidopsis*. In: *Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases*. A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds., IOBC/wprs Bulletin **25**(6), 9-16.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P. and Van Loon, L.C. 2000a.** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. **57**, 123-134.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B.W.M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P.A.H.M. and Van Loon, L.C. 2001.** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling, and expression. *Eur. J. Plant Pathol*. **107**, 51-61.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Verhagen, B.W.M., Ton, J., Van Wees, S.C.M., Léon-Kloosterziel, K.M. and Van Loon, L.C. 2003.** Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* **35**, 39-54.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C. 1996.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Van Pelt, J.A., Keurentjes, J.J.B., Knoester, M. and Van Loon, L.C. 2000b.** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis*: involvement of jasmonate and ethylene. In: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Volume 2 (P.J.G.M. De Wit, T. Bisseling and W.J. Stiekema, eds), The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN., pp. 291-296.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C. 2002c.** Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*. **4**, 535-544.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. and Van Loon, L.C. 1998.** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571-1580.
- Polonenko DR, Scher FM, Kloepper JW, Singleton CA, Laliberté EM, Zaleska I. 1987.** Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean mofs by *Bradyrhizobium japonicum*. *Can J Microb* **33**, 498-503
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2004.** Boosting plant defence by beneficial soil microorganisms. In: *Proceedings of the 16th Workshop of Marie Curie Fellows: Research Training in Progress*, Petten (Netherlands), 21-22 October, 2003, pp. 158-161.
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2005.** Jasmonates - signals in plant-microbe interactions. *J. Plant Growth Regul*. **23**, 211-222

- Raaijmakers, J.M. 1994.** Microbial Interactions in the Rhizosphere; Root Colonization by *Pseudomonas* spp. and Suppression of Fusarium Wilt. Ph.D. Thesis Utrecht University, 127 pp.
- Raaijmakers, J.M., Bitter, W., Punte, H.L.M., Bakker, P.A.H.M., Weisbeek, P.J. and Schippers, B. 1994.** Siderophore receptor PupA as a marker to monitor wild-type *Pseudomonas putida* WCS358 in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1184-1190.
- Raaijmakers, J.M., Van der Sluis, I., Koster, M., Bakker, P.A.H.M., Weisbeek, P.J. and Schippers, B. 1995a.** Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Can. J. Microbiol.* **41**, 126-135.
- Raaijmakers, J.M., Van der Sluis, I., Van den Hout, M., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1995b.** Dispersal of wild-type and genetically-modified *Pseudomonas* spp from treated seeds or soil to aerial parts of radish plants. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 1473-1478.
- Raaijmakers, J.M., Welter, D.M. et Thomashow, L.S., 1997.** Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol.* **63**, 881-887.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., Van der Sluis, I., Schippers, B., and Bakker, P.A.H.M. 1995.** Dose response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. **85**, 1075-1081.
- Rainey, P.B. et Bailey, M.J., 1996.** Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. *Mol Microbiol.* **19**, 521-533.
- Raj J, Bagyaraj DJ, Manjunath A .1981.** Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza and a phosphate-dissolving bacterium on plant growth and ³²P-uptake. *Soil Biol/ Biochem* **13**,105-108.
- Ran, L.X., Liu, C.Y., Wu, G.J., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 2005.** Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biol. Control* **32**, 111-120.
- Ran, L.X., Xiang, M.L., Van Loon, L.C., and Bakker, P.A.H.M. 2003.** Siderophore-mediated suppression of gray mould in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. In: 6th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria (M.S. Reddy, M. Anandaraj, S.J. Eapen, Y.R. Sarma, J.W. Kloepper, eds.), pp. 558-563. Indian Institute of Spices Research, Calicut, India.
- Reddy MS., Rahe JE., 1989.** Bacillus subtilis B-2 and selected onion rhizobacteria in onion seedling rhizospheres: Effect on seedling growth and indigenous rhizosphere microflora. *Soil Biol Biochem* **21**,379-389.
- Reddy, M.S . 1992 .** Biological control of plant diseases ESSO Ag biologicals, 402-415. Innovation Blvd. Saskatoon, Saskatchewan S7N 2x2.
- Reddy,M.S.,Cambel,S.E.,Young,S.E.,Brown,G.1991.** Greenhouse evaluation of rhizobacteria for the suppression of crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radici lycopersici*. In *plant growth-promoting rhizobacteria*, progress and prospect (Keel,C.,Koller,B., Défago,G.,eds) *IOBC/WPRS*,39-44.
- Reimann C, Serine L, Beyeler M, Haas D. 1998.** Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **144**,3135-3148.
- Reitz. M., Oger. P., Meyer, A., Niehaus, K., Farrand, S.K., Hallman, J. and Sikora, R.A. 2002.** Importance of the O-antigen, core-region and lipid A of rhizobial lipopolysaccharides for the induction of systemic resistance in potato to *Globodera pallida*. *Nematology*. **4**, 73-79.
- Richardson, A., E. 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**,897-906.
- Robson, N.D., Cox, A.R.J., McGowan, S.J., Bycroft, B.W. et Salmond, G.P.C., 1997.** Bacterial N-acyl-homoserinelactone-dependent signalling and its potential biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **15**, 459-464.
- Rodelas, B., V. Salmeron, M. V. Martinz – Toledo et G. J. Loper. 1993.** Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically defined media. *Plant Soil* **153**, 97 – 101.
- Rommer, A., Scholl, H., Budzikewicz, H. 1981.** Phenazine ans Pseudomonaden Z. *Naturforsch*, **366**, 1037-1046.
- Roseinweig WD, Stotzky G .1979.** Influence of environmental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: clay minerals and pH. *Appt Environ Microbio/* **38**, 1120-1126.
- Rosenweig WD, Stotzky G .1980.** Influence of environmental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: nutrient levels. *Appt Environ Microbiol* **39**, 354-360.
- Rossbach,S.,Wilson,T.L.,Kukuk,M.L.,Carty,H.A. 2000.** Elevated zinc induce siderophore biosynthesis genes and a zntA- like gene in *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol Lett* **191**,61-70.

- Rouxel, F., Alabouvette, C. et Louvet, J., 1977.** Recherches sur la résistance des sols aux maladies. II - Incidence de traitements thermiques sur la résistance microbiologique d'un sol à la Fusariose vasculaire du melon. *Ann Phytopathol.* **9**, 183-192.
- Rovira AD, Davey CB . 1971.** Biology of the rhizosphere. *In: The plant root and its environment* .EW Carson, ed. Univ Press Virginia, Charlottesville,pp 153-204.
- Rovira, A.D., 1965.** Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annu RevMicrobiol.* **19** , 241-266.
- Ryu CM, Farag MA., Hu CH., Reddy MS., Kloepper JW., Paré PW. 2004.** Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **134** ,1-10.
- Sanchez-Contreras M., Martin M., Villacieros M., O'Gara F., Bonilla I., Rivilla R. 2002.** Phenotypic selection an phase variation occur during *Alfalfa* root colonisation by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol* **184** , 1587-1596.
- Sanchez-Contreras, M., Martin,M., Villacieros,M., O'Gara,F., Bonilla,I., Rivilla,R. 2002.** Phenotypic selection an phase variation occur during *Alfalfa* root colonisation by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol* **184** , 1587-1596.
- Sands , D. , and Rovira , A. D. 1971.** *Pseudomonas fluorescens* biotype G. , the dominant fluorescent *Pseudomonads* in South Australian soils and wheat rhizosphere. *J. Appl. Bacteriol* **38** ,261-275.
- Schaad, N.W . 1988.** Initial identification of common genera , p: 1-15. In In Scaads, N.W .ed.. . Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria . 2nd ed. St Paul. Minnosota . APS.
- Schalk, IJ., Abdallah, MA., and Pattus, P. 2002.** A new mechanisms for membrane iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Society Transactions* **30**(4) ,702-705.
- Scher FM, Baker R .1982.** Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of suppressiveness to *Fusarium-wilt* pathogens. *Phytopathology* **72**, 1567-1573.
- Scher FM, Kloepper JW, Singleton C, Zaleska I, Laliberte M .1988.** Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis, and generation time. *Phytopathology* **78**, 1055-1059.
- Scher FM, Kloepper JW, Singleton CA . 1985.** Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp to soybeans seed exudates *in vitro* and in soil. *Can J Microbiol* **31**,570-574
- Scher FM., Baker R. 1980.** Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology*, **72** , 412-417.
- Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM .1987.** Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu Rev Phytopathol* **25**, 339-358
- Schippers, B. 1993.** Exploitation of microbial mechanisms to promote plant health and plant growth. *Phytoparasitica* **21**, 275-279 (guest editorial).
- Schippers,B., Scheffer,R.J.,Lugtemberg,B.J.J., Weisbeek,P.J.1995.** Biocoating of seeds with plant growth-promoting rhizobacteria to improve plant establishment, *outlook Agric.* **24**,179-185.
- Schirling, E.B., and Gottlied, D . 1996.** Methods for characerization of *Streptomyces* species *Int J Sysys Bacetriol* **16** , 3313 - 3340.
- Schneider R W. 1982.** Suppressive soils and plant disease. American Phytopathological. Society, St Paul. 88 pp.
- Schneider RW. 1984.** Effects of non pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* and a novel use of the lineweaver-burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology* **74** , 646-653.
- Schroth MN, Hancock JG .1982.** Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* **216**, 1376-1381
- Schroth MN, Hildenbrand DC .1964.** Influence of plant exudates on root-infecting fungi. *Annu Rev Phytopathol* **2**, 101-132
- Schroth, M.N. ,Hancock,J.G.1981.** Selected topics in biological control. *Annu Rev Microbiol* **34**,453-476.
- Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. et Panopoulos, N., 1992.** Phytopathogenic *Pseudomonads* and related plant-associated *Pseudomonads*, 3104-3131. Balows .Eds., *In The Procaryotes*, Springer Verlag.
- Schwyn, B. et Neilands, J.B., 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Annal Biochem.* **160** , 47-56.
- Seong, KY., and Shin, P.G. 1996.** Effect of siderophore on biological control of plant pathogens and promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* Ps 88. *Agr. Chem Biotech*, **39** , 20-24.

- Shanahan,P., O'sullivan,D.J., Simpson,P., Glennon,J.D., O'gara,F.1992.** Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from fluorescent *Pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production . *App Environ Microbiol* **58** ,353-358.
- Sharma, A., and Johri, B.N. 2003.** Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A IN MUNG BEAN . *Vigna radiata* L. Wilzeck.. *Microbiol Res.* **158** ,77-81.
- Shippers, B. Bakker, A.W., and Bakker, P.A.H.M. 1987.** Interactions of delterios and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of crooping practices. *Annu. Rev Phytopathol* **25** , 339-358.
- Silva MSA., Romeiro RDS., Macaghan D., Holfold-Vieira BDA., Periera MCB., Monteer A. 2003.** Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase in enzyme activities. *Biological control* **29** , 287-295.
- Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S. and Van Loon, L.C. 2000.** Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 620 pp.
- Smit, E., Viebahn, M., Glandorf, D.C.M., Ouwens, T.W.M., Leeflang, P., Wernars, K., Thomashow, L.S., Thomas-Oates, J.E., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 2002.** Monitoring the fate and ecosystem effects of genetically modified *Pseudomonas putida* producing phloroglucinol and phenazine in wheat rhizosphere. In: Proceedings of the 7th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, International Society of Biosafety Research, Peking University, China, pp. 251-255.
- Smith, S. N. et Snyder., W. C. 1971.** Relationships of density and soil types to severity of *Fusarium* wilt of sweet potato. *Phytopathology* **61** , 1049 – 1051.
- Sneath, P.H.A. et Sokal, R.R., 1973.** "Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification". W.H. Freeman, San Francisco.
- Sneh,B., Dupler,M., Elad,Y., and Baker,R.1984.** Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f sp. *cucurimerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium* suppressive soil .*Phytopatology* **74** ,1115-1124.
- Spiers, AJ., Buckling, A., and Rainney, B. 2000.** Thse causes of Pseuddomonas diversity. *Microbiology*, **146**, 2345-2350
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X. and Pieterse, C.M.J. 2003.** NPR1 modulates cross talk between salicylic acid- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**, 760-770
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. et Doudoroff, M., 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J Gen Microbiol.* **43** , 159-271.
- Steenhoudt,O.,Vanderleyden,J. 2000.** Azopirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic,biochemical and ecological aspects.*FEMS microbial Rev* **24**,487-506.
- Steijl, H., Van der Sluis, I., Van den Heuvel, J. and Van Loon, L.C. 1995.** Aspects of induced resistance in radish; effects of PGPR induced systemic resistance on disease progress. in: Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control (M. Ma½ka, ed.). Proceedings 3rd Conference of European Foundation for Plant Pathology Poznan, Poland, September 5-9, 1994, pp. 523-526. The Polish Phytopathological Society, Poznan.
- Stephens PM, Crowley JJ, O'Connell C . 1993.** Selection of pseudomonad strains inhibiting Pvthium ultinuem on sugarbeet seeds in Soil *Biol Biochem* **9** , 1283-1288
- Stintzi A., Evans K., Meyer JM., Poole, K., 1998.** Quorum sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.* **166** , 341-345.
- Sturz AV., Christie BR. 2003.** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil Tillage Research* **72** , 107-123.
- Stutz , E. , Défago , G. , and Kern , H. 1986.** Naturally occuring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology* **76** ,181-185
- Sundara, B., Natarajan, V., Hari, K. 2002.** Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research.* **77** , 43-49.
- Suslow TV .1982.** Role of root colonizing bacteria in plant growth. In: *Phytopathogenic prokaryotes* .MS Mount, GH Lacy, eds. Acad Press, Londres, 187-223
- Suslow TV, Schroth MN .1982a.** Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology***72**, 111-115
- Suslow TV, Schroth MN .1982b.** Rhizobacteria of sugarbeet: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology***72**, 199-206

- Suslow, T. V. , Schroth, M. N. , and Isaka, M. , 1982. Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* **72** , 917-918
- Synder, W.C., and Hansen, H.N.1954. Variation and speciation in the genus *Fusarium* *Ann.N.Y. Acad. Sc* **60** ,16-23.
- Tada, M., Takakdwa, T., Nagari, M., and Takao, Y. 1990. Antiviral and antimicrobial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol, 2-acylcyclohexan- 1,3- diones and 2-Carboxymidocyclohexane-1,3 diones. *Agric. Biol. Chem.* **54** , 3061-3063.
- Taraz,K.,Tappe,R.,Schröder,H. *et al.* 1991. Ferribactins the biogenetic precursors of pyoverdins . *Z naturforsch*, 46C , 527-533.
- Teintze M, Hossain MB, Barnes CL, Leong J, Van der Helm D . 1981. Structure of ferripseudobactin, a siderophore from plant growth promoting *Pseudomonas* B10. *Biochemistry* **20**, 6446-6457
- Thomashow LS .1991. Molecular basis of antibiosis mediated by rhizosphere pseudomonads. *In: Plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects* .C Keel, B Koller, G Defago, eds. IOBC/ WPRS, XIV/8, 109-115
- Thomashow LS, Weller DM .1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. *J Bacteriol* **170**, 3499-3508
- Thomashow LS, Weller DM, Bonsall RF, Pierson III LS .1990. Production of antibiotic phenazine-1carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appt Environ Microbiol* **56**, 908-912
- Thomashow, L.S. 1991. Molecular basis of antibiosis mediated by rhizosphere Pseudomonads. In Plant Growth-Promoting rhizobacteri. Progress and Prospects. C. Keel, B. Koller, and G. Défago, .eds., IOB/WPRS Bulletin XIV / **8** , 109-114.
- Thomashow, L.S., Bonsall, R.F. et Welter, D.M., 1997. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ, 493-500. A. Press .Eds., *In* Manual of environmental microbiology, Hurst, C.J., Washington, D.C.
- Thornley, M.J., 1960. The différentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Jappl Bacteriol.* **23** , 37-52.
- Tombolini,R., Van der Gaag,D.J.,Gerhardson,B.,Jansson,J.K.1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *App Eniron Microbiol*, **65** ,3674-3680.
- Ton, J. 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in *Arabidopsis*: molecular-genetic basis of induced resistance in relation to basal resistance, pp. 1-136, Ph.D. Thesis Utrecht University, ISBN 90-393-2629-0.
- Ton, J., Davison, S., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2001a. Heritability of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance and basal resistance in Arabidopsis. *Eur. J. Plant Pathol.* **107** , 63-68.
- Ton, J., Davison, S., Van Wees, S.C.M., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2001b. The Arabidopsis *ISR1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol.* **125**, 652-661.
- Ton, J., De Vos, M., Robben, C., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2002c. Induced resistance: an enhancement of basal resistance? In: Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases (A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds), IOBC/ wprs Bulletin **25**(6) , 133-138.
- Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, M.N., Métraux, J.-P. and Mauch-Mani, B. 2005. Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell.* **17** , 987-999.
- Ton, J., Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C. 1999. Identification of a locus in *Arabidopsis* controlling both the expression of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12** , 911-918.
- Ton J., Van Pelt JA., Van Loon LC., Pieterse CMJ. 2002a. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 27-34.
- Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2002b. The Arabidopsis *ISR1* locus is required for rhizobacteria-mediated induced systemic resistance against different pathogens. *Plant Biol.* **4** , 224-227.
- Toua D, Benchabane M, Bakour. 1997. Effect of some selected *Pseudomonas fluorescens* strains on suppression *Fusarium* wilt of tomatoes. Proceedings 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union June 1st – 5th 1997- Montpellier – Le Corum (SFM -). France : 811 – 814.
- Toua, D. 1996. Essai d'utilisation de *Pseudomonas fluorescens* dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* et de *Verticillium dahliae* sur tomate et dans la promotion de la croissance végétale. Thèse Magister. INA. El Harrach. Alger.138p.
- Toussoun TA., 1975. *Fusarium* – suppressive soils, 145-151. In: GW Bruhel, Biology and control of soil borne plant pathogens. *Ann Phytopathol Soc*, 217p.

- Tuzun, S., Kloepper, J. 1995.** Practical application and implementation of induced resistance. In: hammerschmidt R, Kuc J, eds. Induced resistance to disease in plants. Dordrecht, Boston, London : Kluwer Academic Press, 152-168.
- Van der Heuvel, J., Van Dam, J.A.C. and Van der Sluis, I. 1995.** How general is the induction of resistance by nonpathogenic rhizobacteria? in: Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control (M. Ma¹/₂ka, ed.), Proceedings 3rd Conference of European Foundation for Plant Pathology Poznan, Poland, September 5-9, 1994, pp. 261-264. The Polish Phytopathological Society, Poznan.
- Van der Hofstad GAJM, Marugg JD, Verjans GMGM, Weisbeek PJ . 1986.** Characterization and structural analysis of the siderophore produced by the PGPR *Pseudomonas putida* strain WCS358. In: *Iron, siderophores and plant diseases* .TR Swinburne, ed. Plenum Press, New York, 71-75
- Van der Wolf, J.M., Van Beckhoven, J.R.C.M., De Vries, P.M., Raaijmakers, J.M., Bakker, P.A.H.M., Bertheau, Y. and Van Vuurde, J.W.L. 1995.** Polymerase chain reaction for verification of fluorescent colonies of *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas putida* WCS358 in immunofluorescence colony staining. *J. Appl. Microbiol.* **79**, 569-577.
- Van Loon, L.C. 1996.** Disease-suppressive actions of *Pseudomonas* bacteria: induced resistance. in: Biological and Integrated Control of Root Diseases in Soilless Cultures (C. Alabouvette, ed.), IOBC *wprs Bulletin* **19** , 53-61.
- Van Loon, L.C. 1997.** Induced resistance and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* **103** , 753-765.
- Van Loon, L.C. 1998.** Biotechnology as a means to improve biological control of plant diseases. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **63**, 1657-1666.
- Van Loon, L.C. 1999.** Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Pathogenesis-Related Proteins in Plants (S.K. Datta and S. Muthukrishnan, eds), pp. 1-19. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Van Loon, L.C. 2000a.** Helping plants to defend themselves: biocontrol by disease-suppressing rhizobacteria. In: Developments in Plant Genetics and Breeding, vol 6; Phytosfere '99, Highlights in European Plant Biotechnology Research and Technology Transfer (G.E. de Vries and K. Metzlaiff, eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 203-213.
- Van Loon, L.C. 2000b.** Systemic induced resistance. In: Mechanisms of Resistance to Plant Diseases (A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser and L.C. Van Loon, eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 521-574.
- Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 2004.** Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In: Ecological Studies, vol. 168, Root Ecology (J. De Kroon and E.J.W. Visser, eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 287-330 .
- Van Loon, L.C. and Glick, B.R. 2004.** Increased plant fitness by rhizobacteria. In: Ecological Studies, vol. 170, Molecular Ecotoxicology of Plants (H. Sandermann, ed.), Springer Verlag, Berlin, pp. 177-205.
- Van Loon, L.C. and Pennings, G.G.H. 1993.** Involvement of ethylene in the induction of systemic acquired resistance in tobacco. In: Mechanisms of Plant Defense Responses (B.Fritig and M.Legrand, eds), pp. 156-159. Kluwer, Dordrecht.
- Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2002.** Biocontrol agents in signaling resistance. In: Biological Control of Crop Diseases (Gnanamanickam, ed), Marcel Dekker, New York, NY, pp. 355-386.
- Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55** , 85-97.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1997.** Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Present Status and Future Prospects (A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino, eds.), pp. 50-57. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998a.** Induction and expression of PGPR-mediated induced resistance against pathogens. In: Molecular Approaches to Biological Control (B.K. Duffy, U. Rosenberger and G. Défago, eds), IOBC/wprs Bulletin 21(9): 103-110.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998b.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453-483.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 2002.** Prospects and challenges for practical application of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance. In: Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases (A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds), IOBC/wprs Bulletin 25(6) , 75-82.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Scheffer, R.J. 1993.** Seed treatment with bacteria protects plants against soil-borne diseases. *Profyta* **4**, 14-17.
- Van Loosdrecht MCM, Lykema J, Norden W, Schraa G, Zehnder A . 1987.** The role of bacteria. cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appt Environ Microbiol* **53**, 1893-1897

- Van Oosten, V.R., De Vos, M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Van Poecke, R.M.P., Dicke, M. and Pieterse, C.M.J. 2004.** Signal signature of *Arabidopsis* induced upon pathogen and insect attack. In: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 4 (I. Tikhonovich, B. Lugtenberg and N. Provorov, eds.), The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN, pp. 199-202.
- Van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D. 1995.** Root exudates induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Applied and environmental Microbiology*, p 890-898.
- Van Peer R, Niemann CJ, Schippers B .1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS417r. *Phytopathology* **81**, 728-734
- Van Peer R, Schippers B .1989.** Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can J Microbiol* **35**, 456-463
- Van Peer R, Van Kuik AJ, Rattink H, Schippers B .1990b.** Control of *Fusarium* wilt in carnation grown on rockwool by *Pseudomonas* sp strain WCS417r and by Fe-EDDHA. *Neth J Plant Pathol* **196**, 119-132.
- Van Peer, Punte HLM, Weger LA .de., Schippers B .1 990a.** Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of mts. *Appt Environ Microbiol* **56**, 2462-2470.
- Van Peer, R., Schippers, B. 1992.** Lipopolysaccharides of plant growth –promoting rhizobacteria sp. Strain wc417r induce resistance in carnation of *Fusarium* wilt. *Neth.J.Plant Pathol* **98** , 129-139.
- Van Veen, JA. 2004.** The rhizosphere – A historical perspective. Rhizosphere 2004, Perspectives and challenges- A tribute to Lorenz Hiltner. 12-17, Septembre, Munich, Germany.
- Van Wees, S.C.M., De Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2000.** Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 8711-8716.
- Van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 1999.** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes, but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* **41** , 537-549.
- Vancura, V., 1980.** Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. *Folia microbiol.* **25**, 108-173.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Izard, D. et Leclerc, H., 1999a.** *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. *Int J Syst Bacteriol.* **49**, 1559-1572.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D. et Leclerc, H., 1999b.** Taxonomie study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposai of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* **22**, 45-58.
- Vidhyasekaran, R., Rabindran, R., Muthamilan, M., Nayar, K., Rajappan, K., Subramanian, N., and Vasumathi, K. 1997.** Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control pigeonpea wilt. *Biol. Control* **8**, 166-171.
- Viebahn, M. 2005.** Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r: Molecular analysis of effects on microbial communities in the rhizosphere of wheat, pp. 1-159, Ph.D. Thesis Utrecht University, ISBN **90-393**.
- Viebahn M., Glandorf DCM., Ouwens TWM., Smit E., Leeflang P., Wernars K., Thomashow LS., Van Loon, LC., Bakker, P.A.H.M. 2003.** Repeated introduction of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r without intensified effects on the indigenous microflora of field-grown wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** , 3110-3118.
- Voisard C, Bull C, Keel C, Laville J. Maurhofer M, Schnider U, Défago G, Haas D .1994.** Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: current concepts and experimental approaches. In : *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. F O'Gara, D Dowling, B Boesten. eds., VCH, Weinheim, **67-89**
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., and Défago, G. 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO. J.* **8**, 351-358.
- Wakelin, S. A., and Ryder, M. H. 2004.** Plant growth-promoting inoculants in Australian agriculture. Online. *Crop Management* doi:10.1094/CM-2004-0301-01-RV.
- Walsh U., Morrissey JP., O'Gara F. 2001.** *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 289-295.
- Wei G, Kloepper JW, Tuzun S .1991.** Induction of systemic resistance with seed treatment by PGPR strains. In: *Plant growth-promoting-rhizobacteriaprogress and prospects* .C Keel, B Koller, G Defago, eds. IOBC/ WPRS, XIV/8, 191-194
- Weinberg, E.D. 1989.** Cellular regulation of iron assimilation. *Quart Rev Biol* **64**, 261 - 290.

- Weller DM .1986** . Effects of wheat genotype on root colonization by a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **76**, 1059
- Weller DM, Cook RJ . 1983**. Suppression of take ail of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* **73**, 463-469
- Weller DM, Cook RJ . 1986**. Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Can J Plant Pathoi* **8**, 328-334
- Weller DM, Howie WJ, Cook RJ .1988**. Relationships between *in vitro* inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* and suppression of take ail wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* **78**, 1094-1100
- Weller, D.M., 1988**. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol.* **26** , 379-407.
- Weller DM., Raaijmakers JM., McSpadden Gardener. R.B.. and Thomashow, L.S. 2002**. Microhial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40** , 309—348.
- Weller,D.M.,Thomashow,L.S.1993**. Microbial metabolites with biological activity against plan pathogens. In: Pest management: Biologically based technologies (Lunsden, Rd .,Vanghan,J.L,eds), Am Chem Soc, Washington, DC, 67-89.
- Wessendorf J, Lingens F .1989**. Effect of culture and soil conditions on survival of *Pseudomonas fluorescens* R1 in soil. *Appt Microbiol Biotech* **31**, 97-102
- Whipps, J.M. 2001**. Microbia linteractions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Botany* **52** ,487-511.
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M.M., Williams, P. et Pierson, L.S., 3rd, 1997**. N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J Bacteriol.* **179** , 7663-7670.
- Yang C, Leong J .1984**. Structure of pseudobactin 7SR1, a siderophore from a plant-deleterious *Pseudomonas* strain. *Biochemistry* **23**, 3534-3540
- Young, S., Pharis, R.P., Reid, D., Reddy, M.S., Lifshitz, R., and Brown, G. 1991**. PGPR : Is there a relationship between plant growth regulators and the stimulation of plant growth or biological activity ? pp 182-186In Plant Growth-Promoting rhizobacteri. Progress and Prospects. C. Keel, B. Koller, and G. Défago, (eds.), IOB/WPRS Bulletin XIV/ 8.
- Yuen GY, Schroth MN . 1986**. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root colonizing microflora. *Phytopathology* **76**, 176-180
- Zaleska,I. 1987**. Growth promotion of canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can J . Microbiol* **33**, 390-395.
- Zdor, R.E., and Anderson, A .J. 1992**. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. *Plant Soil* **140**. 99-107
- Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E.J., and Kloepper, J.W. 2001**. Application of rhizobacteria for induced resistance. *J Plant Pathology* **107**, 39-50
- Zhou, T., and Paulitz, T.C. 1994**. Induced resistance in the biological control of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on cucumber. *J. phypathol.* **142**, 51- 63.

Annexe I.1 : Liste des espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Pseudomonas Migula 1894, *genus*. (Type genus of the order α *Pseudomonadales* Orla-Jensen 1921 [Approved Lists 1980]; type genus of the suborder α *Pseudomonadineae* Breed *et al.* 1957 [Approved Lists 1980]; type genus of the family α *Pseudomonadaceae* Winslow *et al.* 1917 [Approved Lists 1980]; type genus of the tribe α *Pseudomonadeae* Kluver and Van Niel 1936 [Approved Lists 1980]). — **Type species:** α *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (Approved Lists 1980). — **Synonyms:** "*Chlorobacterium*" Guillebeau 1890, nom. rejic. Opin. 6 (not "*Chlorobacterium*" Lauterborn 1916), "*Liquidomonas*" Orla-Jensen 1909, "*Loefflerella*" Holden 1935. — **References:** SKERMAN (V.B.D.), McGOWAN (V.) and SNEATH (P.H.A.) (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, **30**, 225-420. [MIGULA (W.): Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe*, 1894, **1**, 235-238].

Pseudomonas aeruginosa (Schroeter 1872) Migula 1900, *species*. (Type species of the genus). — **Type strain:** strain RH 815 = ATCC 10145 = ATCC 10145-U = CCEB 481 = CCUG 551 = CCUG 28447 = CCUG 29297 = CFBP 2466 = CIP 100720 = DSM 50071 = IBCS 277 = IFO (now NBRC) 12689 = JCM 5962 = LMG 1242 = NCCB 76039 = NCIB (now NCIMB) 8295 = NCTC 10332 = NRRL B-771 = VKM B-588. — **Synonyms:** "*Bacterium aeruginosum*" Schroeter 1872, "*Bacterium aeruginosum*" Cohn 1872, "*Micrococcus pyocyaneus*" Zopf 1884, "*Bacillus aeruginosus*" (Schroeter 1872) Trevisan 1885, "*Bacillus pyocyaneus*" (Zopf 1884) Flügge 1886, "*Pseudomonas pyocyanea*" (Zopf 1884) Migula 1895, "*Bacterium pyocyaneum*" (Zopf 1884) Lehmann and Neumann 1896, probable synonym or variety: "*Pseudomonas polycolor*" Clara 1930. — **References:** SKERMAN (V.B.D.), McGOWAN (V.) and SNEATH (P.H.A.) (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, **30**, 225-420. [1 SCHROETER (J.): Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente. (1872). In: F. COHN (ed.), *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, J.U. Kern's Verlag, Breslau, 1875, pp. 109-126. 2 MIGULA (W.): *System der Bakterien*, Vol. 2, Gustav Fischer, Jena, 1900.].

Pseudomonas aureofaciens Kluver 1956, *species*. — **Type strain:** strain ATCC 13985 = CFBP 2133 = LMG 1245. — **References:** SKERMAN (V.B.D.), McGOWAN (V.) and SNEATH (P.H.A.) (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, **30**, 225-420. [KLUYVER (A.J.): *Pseudomonas aureofaciens* nov. spec. and its pigments. *Journal of Bacteriology*, 1956, **72**, 406-411.] α *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard and Sauvageau 1894) Bergey *et al.* 1930 (Approved Lists 1980). — **Reference:** JOHNSON (J.L.) and PALLERONI (N.J.): Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989, **39**, 230-235. **Note:** *Pseudomonas aureofaciens* Kluver 1956 (Approved Lists 1980) is a later heterotypic synonym of *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard and Sauvageau 1894) Bergey *et al.* 1930 (Approved Lists 1980).

Pseudomonas chlororaphis (Guignard and Sauvageau 1894) Bergey *et al.* 1930, *species*. — **Type strain:** strain ATCC 9446 = CCUG 552 B = CFBP 2132 = CIP 63.22 = DSM 50083 = HAMBI 2011 = IFO (now NBRC) 3904 = JCM 2778 = LMG 5004 = NCCB 76041 = NCCB 37027 = NCTC 13002 = VKM B-1246. — **Synonym:** "*Bacillus chlororaphis*" Guignard and Sauvageau 1894. — **References:** SKERMAN (V.B.D.), McGOWAN (V.) and SNEATH (P.H.A.) (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, **30**, 225-420. [1 GUIGNARD (L.) and SAUVAGEAU (C.): Sur un nouveau microbe chromogène, le *Bacillus chlororaphis*. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie (Paris)*, Séries 10, 1894, **1**, 841-843. 2 BERGEY (D.H.), HARRISON (F.C.), BREED (R.S.), HAMMER (B.W.) and HUNTOON (F.M.) (eds): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 3rd ed., The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1930, pp. 1-589.]. **Note:** *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard and Sauvageau 1894) Bergey *et al.* 1930 (Approved Lists 1980) is an earlier synonym of α *Pseudomonas aureofaciens* Kluver 1956 (Approved Lists 1980). — **Reference:** JOHNSON (J.L.) and PALLERONI (N.J.): Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989, **39**, 230-235.

Pseudomonas fluorescens Migula 1895, *species*. — **Type strain:** strain RH 818 = M. Rhodes 28/5 = ATCC 13525 = CCUG 1253 = CCEB 546 = CFBP 2102 = CIP 69.13 = DSM 50090 = IFO (now NBRC) 14160 = JCM 5963 = LMG 1794 = NCCB 76040 = NCIB (now NCIMB) 9046 = NCTC 10038 = NRRL B-14678 = VKM B-894. — **Synonyms:** "*Bacillus fluorescens liquefaciens*" Flügge 1886, "*Bacillus fluorescens*" Trevisan 1889, "*Bacterium fluorescens*" (Trevisan 1889) Lehmann and Neumann 1896, "*Liquidomonas fluorescens*" (Trevisan 1889) Orla-Jensen 1909. — **References:** SKERMAN (V.B.D.), McGOWAN (V.) and SNEATH (P.H.A.) (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, **30**, 225-420. [MIGULA (W.): *Bacteriaceae* (Stäbchenbakterien). In: A. ENGLER and K. PRANTL (eds): Die natürlichen Pflanzenfamilien, W. Engelmann, Leipzig, Teil I, Abteilung Ia, 1895, pp. 20-30.].

Pseudomonas jessenii Verhille *et al.* 1999, *sp. nov.* — **Type strain:** strain ATCC 700870 = CCUG 42059 = CFML 95-307 = CIP 105274. — **References:** VALIDATION LIST N° 70. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 935-936. [VERHILLE (S.), BAIDA (N.), DABBOUSSI (F.), IZARD (D.) and LECLERC (H.): Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* *sp. nov.* and *Pseudomonas mandelii* *sp. nov.* *Syst. Appl. Microbiol.*, 1999, **22**, 45-58.].

Pseudomonas lini Delorme *et al.* 2002, *sp. nov.* — **Type strain:** strain DLE411J = CFBP 5737 = ICMP 14138. — **Reference:** DELORME (S.), LEMANCEAU (P.), CHRISTEN (R.), CORBERAND (T.), MEYER (J.M.) and GARDAN (L.): *Pseudomonas lini* *sp. nov.*, a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, **52**, 513-523.

Pseudomonas putida (Trevisan 1889) Migula 1895, *species*. — **Type strain:** strain ATCC 12633 = CCUG 12690 = CFBP 2066 = CIP 52.191 = DSM 291 = HAMBI 7 = IFO (now NBRC) 14164 = LMG 2257 = NCAIM B.01634 = NCCB 72006 = NCCB 68020 = NCTC 10936. — **Synonyms:** "*Bacillus fluorescens putidus*" Flügge 1886, "*Bacillus putidus*" Trevisan 1889, "*Pseudomonas eisenbergii*" Migula 1900, "*Pseudomonas convexa*" Chester 1901, "*Pseudomonas incognita*" Chester 1901, "*Pseudomonas ovalis*" Chester 1901, "*Pseudomonas rugosa*" (Wright 1895) Chester 1901, "*Pseudomonas striata*" Chester 1901. — **References:** SKERMAN (V.B.D.), McGOWAN (V.) and SNEATH (P.H.A.) (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, **30**, 225-420. [1 TREVISAN (V.): I. Generi e le Specie delle Batteriacee, Zanaboni and Gabuzzi, Milano, 1889. 2 MIGULA (W.): *Schizomycetes* (Bacteria, Bacterien). In: A. ENGLER and K. PRANTL (eds): Die natürlichen Pflanzenfamilien, W. Engelmann, Leipzig, Teil I, Abteilung Ia, 1895, pp. 1-44.].

Note: *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895 (Approved Lists 1980) is an earlier synonym of *Arthrobacter siderocapsulatus* Dubinina and Zhdanov 1975 (Approved Lists 1980). — **Reference:** CHUN (J.), RHEE (M.S.), HAN (J.I.) and BAE (K.S.): *Arthrobacter siderocapsulatus* Dubinina and Zhdanov 1975^{AL} is a later subjective synonym of *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895^{AL}. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, **51**, 169-170.

Int. J. Syst. Bacteriol., 1980, **30**, 225-420. [DELAPORTE (B.), RAYMOND (M.) and DASTE (P.): Une bactérie du sol capable d'utiliser, comme source de carbone, la fraction fixe de certaines oléorésines, *Pseudomonas resinovorans* n. sp. *Compte Rendu des Séances de l'Académie des Sciences, Paris*, 1961, **252**, 1073-1075.].

Pseudomonas rhizosphaerae Peix *et al.* 2003, *sp. nov.* — **Type strain:** strain IH5 = CECT 5726 = LMG 21640. — **Reference:** PEIX (A.), RIVAS (R.), MATEOS (P.F.), MARTÍNEZ-MOLINA (E.), RODRÍGUEZ-BARRUECO (C.) and VELÁZQUEZ (E.): *Pseudomonas rhizosphaerae* *sp. nov.*, a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, **53**, 2067-2072.

Annexe II.1 : Milieux de cultures

MILIEU B de King (KB) (King et al., 1954)

Peptone (Difco)	20 g
Glycerole (Prolabo)	15 ml
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	1,5 g
MgSO ₄ (Sigma)	1,5 g
Agar (Sigma)	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2 autoclavage 20 minutes à 120° C	

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthorpe et Booth, 1983)

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH 7 autoclavage 20 minutes à 120° C	

Milieu Ayers "Ayers et al., 1919" (Schaad, 1988)

NH ₄ H ₂ PO ₄ (Sigma)	1 g
KCl (Sigma)	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma)	0,2 g
Bleu de bromothymol (1,6 % "w/v")	1 ml
Eau distillée	1000 ml
pH = 7 autoclavage 20 minutes à 120° C	

Milieu NA "Nutrient Agar" (in Schaad, 1988)

Extrait de boeuf	3g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7 autoclavage 20 minutes à 120° C	

Milieu LB (Gardan et Luisetti, 1981)

Bacto tryptone	10g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7 autoclavage 20 minutes à 120° C	

Milieu 2A (Thornley, 1960)

Peptone	1 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	3 g
Rouge de phénol	0,01 g
Arginine HCl	10 g
Ajuster à pH (7,2) pour obtenir une coloration rose	

Milieu gélatine (Lelliot et Stead, 1987)

Extrait de levure	3 g
Peptone	5 g
Gélatine	120 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7 autoclavage 20 minutes à 120° C	

Milieu Levane (Hildebrand et al., 1988)

Extrait de levure	2 g
Bactopeptone	5 g
NaCl	5 g
Saccharose	50 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH 7,2 autoclavage 20 minutes à 120 °C	

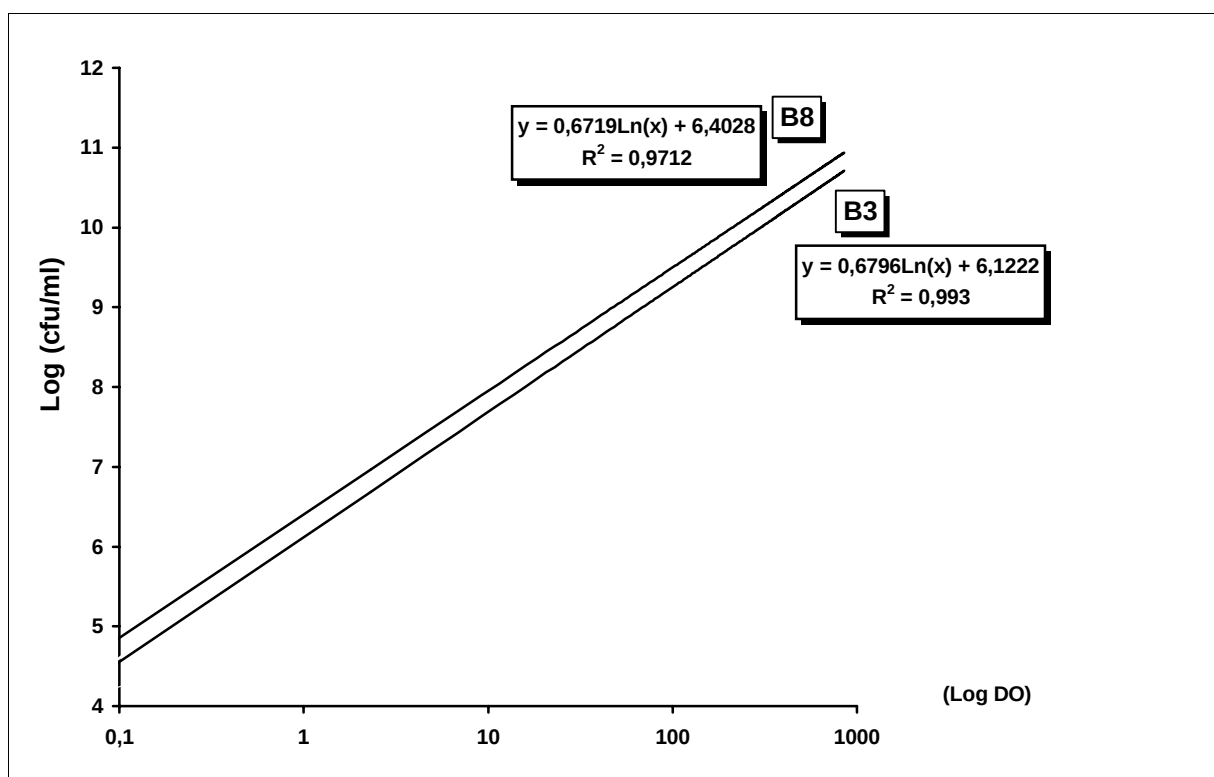
Milieu Esculine (Lelliot et Stead, 1987)

Peptone	10 g
Esculine	1 g
Citrate de fer	0,5 g
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2 autoclavage 20 minutes à 120°C	

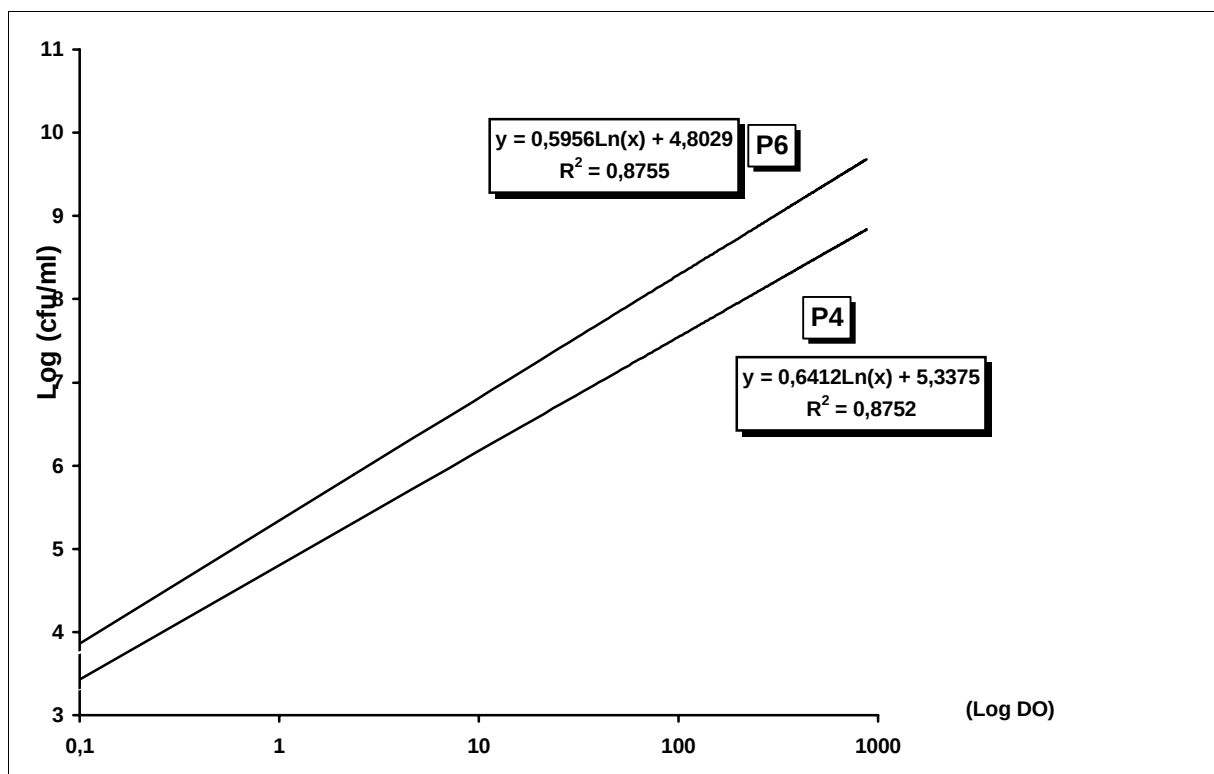
Milieu Succinate (MS)**(Meyer et Abdallah, 1978)**

K ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma)	0,2 g
Agar	3 g
NH ₄ (SO ₄)	1 g
Acide Succinique	1 g
Ajuster à pH (7) pour obtenir une coloration rose	

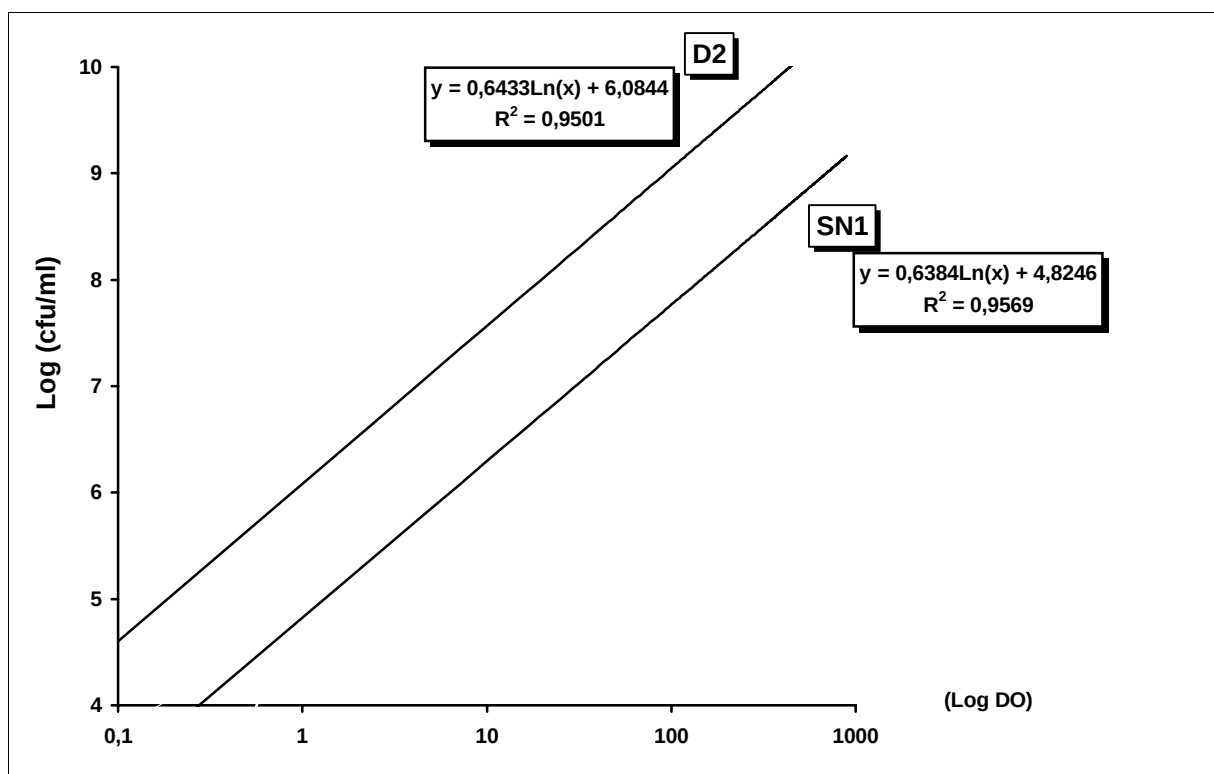
Annexe II.2 : Courbes étalons des souches bactériennes
Établies dans le milieu Ayers



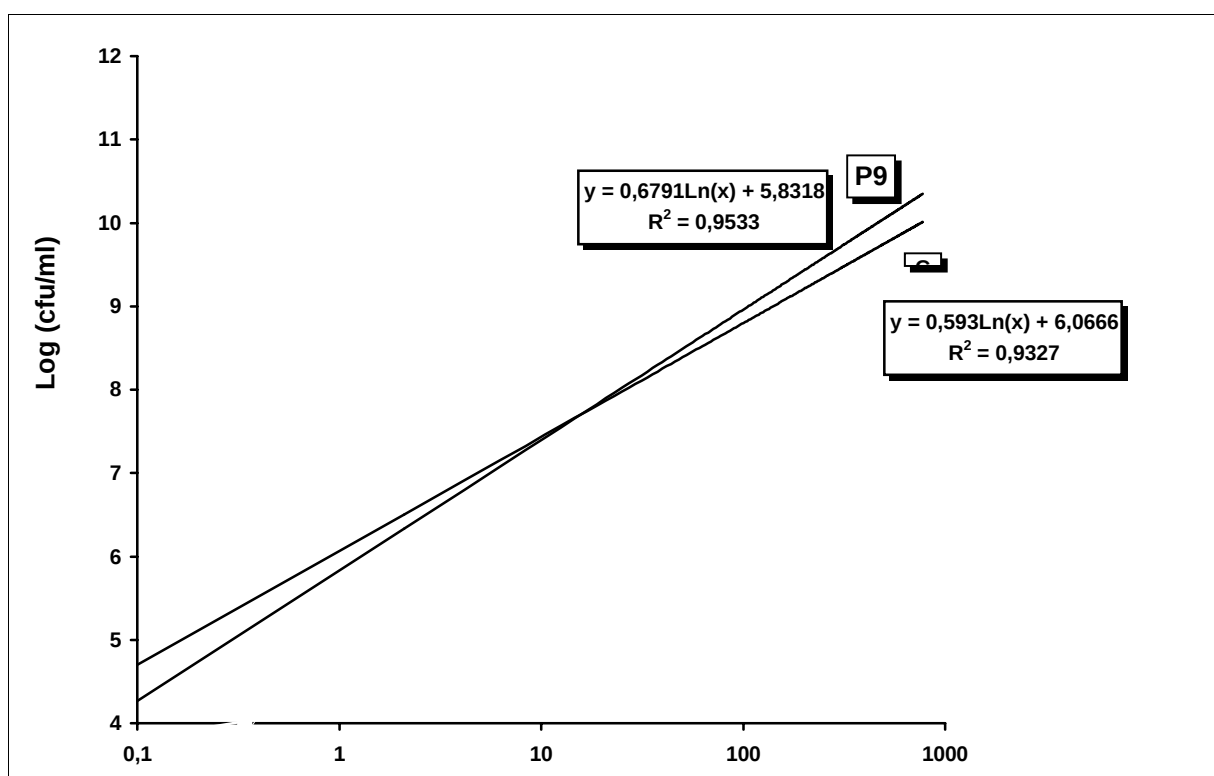
Courbes étalons des souches B8 et B11



Courbes étalons des souches P41 et P66



Courbes étalons des souches D2 et SN1



Courbes étalons des souches P9 et CHA0

Annexe II.3 : Méthode de Kado et Lui (1981) modifiée

Préparer une culture cellulaire, en LB, sous agitation, à 25°C.

Après 21 à 24 heures de culture, centrifuger en Eppendorf à 8000 trs/mn, à 4°C, pendant 3 mn, l'équivalent de 1 ml de suspension bactérienne dont la DO à 620 nm = 1.

Enlever le surnageant (coton tige).

Resuspendre dans 100 µl de TE pH = 8.

Ajouter délicatement 300 µl de tampon de lyse (mélanger délicatement avec 1 cône).

Ajouter 900 µl de solution de phénol-chloroforme.

Agiter doucement.

Centrifuger 13000 trs/mn, 7 mn, 4°C.

Extraire le surnageant (maximum 3 fois 60 µl).

Conserver au frigidaire à 8°C.

Mélanger 16 µl de surnageant avec 5 µl de bleu.

Dépôt par puits de 16 µl de mélange, sur gel d'agarose (11/14 cm) à 0,7 % dans du TBE.

Migration 2 heures 30 à 100 volts

Préparation des solutions

TE pH = 8 : Tris 50 mM, EDTA 20 mM

TBE : Tris 89 mM, Na Borate 89 mM, EDTA 2,5 mM

Tampon de lyse : Tris 50 mM, Sarkosyl 3 %, 7 ml (environ) NaOH 2 N

pour ajuster à pH 12,6

Phénol-chloroforme : volume à volume (phénol non équilibré, non saturé)

Bleu de dépôt : SDS 5 %, glycérol 33 %, bleu de Bromophénol 0,07 %
dans du TBE

Annexe II.4 : Galerie BIOTYPE100 (Biomérieux)

N° Substrat	N° Substrat
1 alpha-D(+) Glucose	50 L (-) Malate
2 beta-D(+) Fructose	51 cis Aconitate
3 D(+) Galactose	52 trans-Aconitate
4 D(+) Trehalose	53 Tricarballoylate
5 D(+) Mannose	54 Citrate
6 L(+) Sorbose	55 D-Glucuronate
7 alpha-D(+) Melibiose	56 D-Galacturonate
8 Sucrose (= Saccharose)	57 2-Keto-D-Gluconate
9 D(+) Raffinose	58 5-Keto-D-Gluconate
10 Maltotriose	59 L-Tryptophan
11 Maltose	60 N-Acetyl-D-Glucosamine
12 alpha-Lactose	61 D-Gluconate
13 Lactulose	62 Phenylacetate
14 1-O-Methyl-beta-galactopyranoside	63 Protocatechuate
15 1-O-Methyl-alpha-galactopyranoside	64 p-Hydroxybenzoate (= 4-Hydroxybenzoate)
16 D(+) Cellobiose	65 (-) Quinate
17 beta-Gentiobiose	66 Gentisate
18 1-O-Methyl-beta-D-glucopyranoside	67 m-Hydroxybenzoate (= 3-Hydroxybenzoate)
19 Esculin	68 Benzoate
20 D(-) Ribose	69 3-Phenylpropionate
21 L(+) Arabinose	70 m-Coumarate
22 D(+) Xylose	71 Trigonelline
23 Palatinose	72 Betain
24 alpha-L-Rhamnose	73 Putrescine (= Diaminobutane)
25 alpha-L(-) Fucose	74 DL-alpha-Amino-n-Butyrate (= 4-Aminobutyrate)
26 D(+) Melezitose	75 Histamine
27 D(+) Arabitol	76 DL-Lactate
28 L(-) Arabitol	77 Caprate
29 Xylitol	78 Caprylate
30 Dulcitol	79 L-Histidine
31 D-Tagatose	80 Succinate
32 Glycerol	81 Fumarate
33 myo-Inositol	82 Glutarate
34 D-Mannitol	83 DL-Glycerate
35 Maltitol	84 DL-alpha-Amino-n-valerate (= 5-Aminovalerate)
36 D(+) Turanose	85 Ethanolamine
37 D-Sorbitol	86 Tryptamine
38 Adonitol	87 D-Glucosamine
39 Hydroxyquinoline-beta-glucuronide	88 Itaconate
40 D-Lyxose	89 DL-beta-Hydroxybutyrate (= 3-Hydroxybutyrate)
41 i-Erythritol	90 L-Aspartate
42 1-O-Methyl-alpha-D-glucopyranoside	91 L-Glutamate
43 3-O-Methyl-D-glucopyranose	92 L-Proline
44 D-Saccharate	93 D-Alanine
45 Mucate	94 L-Alanine
46 L(+) Tartrate	95 L-Serine
47 D(-) Tartrate	96 Malonate
48 meso-Tartrate	97 Propionate
49 D(+) Malate	98 L-Tyrosine
	99 alpha-Ketoglutarate (= 2-Ketoglutarate, 2-Oxoglutarate)

Annexe II.5 : Résultats des tests de la caractérisation des profils trophiques

Galerie BIOTYPE100.

GAL 90 souches 99 caractères

Table TAXO.DBF

Souches

AAAAAAAASSSSPPPPPPVPSPPPPVPTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVVVSPVVPVSVSSBBBBBBBSBSSSSS

1234567891TTTTT12345668T111191123456789111111234N77811N5NNN1234567T91NNNNN

012345 70123 5 012345 2 401 345 9 067891

0

001 alpha-D(+) Glucose	+++++
002 beta-D(+) Fructose	+++++
003 D(+) Galactose	+++++
004 D(+) Trehalose	+++++
005 D(+) Mannose	+++++
006 L(+) Sorbose	+++++
007 alpha-D(+) Melibiose	+++++
008 Sucrose (= Saccharos	+++++
009 D(+) Raffinose	+++++
010 Maltotriose	+++++
011 Maltose	+++++
012 alpha-Lactose	+++++
013 Lactulose	+++++
014 1-0-Methyl-beta-gala	+++++
015 1-0-Methyl-alpha-gal	+++++
016 D(+) Cellobiose	+++++
017 beta-Gentiobiose	+++++
018 1-0-Methyl-beta-D-gl	+++++
019 Esculin	+++++
020 D(-) Ribose	+++++
021 L(+) Arabinose	+++++
022 D(+) Xylose	+++++
023 Palatinose	+++++
024 alpha-L-Rhamnose	+++++
025 alpha-L(-) Fucose	+++++
026 D(+) Melezitose	+++++
027 D(+) Arabitol	+++++
028 L(-) Arabitol	+++++
029 Xylitol	+++++
030 Dulcitol	+++++
031 D-Tagatose	+++++
032 Glycerol	+++++
033 myo-Inositol	+++++
034 D-Mannitol	+++++
035 Maltitol	+++++
036 D(+) Turanose	+++++
037 D-Sorbitol	+++++
038 Adonitol	+++++
039 Hydroxyquinoline-bet	+++++
040 D-Lyxose	+++++
041 i-Erythritol	+++++
042 1-0-Methyl-alpha-D-g	+++++
043 3-0-Methyl-D-glucopy	+++++
044 D-Saccharate	+++++
045 Mucate	+++++
046 L(+) Tartrate	+++++
047 D(-) Tartrate	+++++
048 meso-Tartrate	+++++
049 D(+) Malate	+++++
050 L(-) Malate	+++++
051 cis-Aconitate	+++++
052 trans-Aconitate	+++++
053 Tricarbalylate	+++++
054 Citrate	+++++
055 D-Glucuronate	+++++
056 D-Galacturonate	+++++
057 2-Keto-D-Gluconate	+++++
058 5-Keto-D-Gluconate	+++++
059 L-Tryptophan	+++++

060 N-Acetyl-D-Glucosami ++++++-----++-+-+--+---+++
 061 D-Gluconate ++++++-----
 062 Phenylacetate -----++-+-+--+---
 063 Protocatechuate +++-+++-----
 064 p-Hydroxybenzoate (= ++++++-----
 065 (-) Quinate +++-+++-----
 066 Gentisate -----++
 067 m-Hydroxybenzoate (= -----
 068 Benzoate +-+-----
 069 3-Phenylpropionate ++++++-----
 070 m-Coumarate -----++-+-+--+---
 071 Trigonelline -+++-----
 072 Betain ++++++-----
 073 Putrescine (= Diamin ++++++-----
 074 DL-alpha-Amino-n-But ++++++-----
 075 Histamine ++++++-----
 076 DL-Lactate ++++++-----
 077 Caprate ++++++-----
 078 Caprylate ++++++-----
 079 L-Histidine ++++++-----
 080 Succinate -----++-+-+--+---
 081 Fumarate ++++++-----
 082 Glutarate -----++-+-+--+---
 083 DL-Glycerate ++++++-----
 084 DL-alpha-Amino-n-val ++++++-----
 085 Ethanolamine -----++-+-+--+---
 086 Tryptamine -----++-+-+--+---
 087 D-Glucosamine ++++++-----
 088 Itaconate -----++-+-+--+---
 089 DL-beta-Hydroxybutyr ++++++-----
 090 L-Aspartate ++++++-----
 091 L-Glutamate ++++++-----
 092 L-Proline ++++++-----
 093 D-Alanine ++++++-----
 094 L-Alanine ++++++-----
 095 L-Serine +-+-----
 096 Malonate ++++++-----
 097 Propionate ++++++-----
 098 L-Tyrosine ++++++-----
 099 alpha-Ketoglutarate ++++++-----

Annexe II.5 (ii): Résultats des tests de la caractérisation des profils trophiques

Souches	DDDDDDDDDDDDSPSBS 1234567891T9T8T	DDDDDDDDDDDDSPSBS 1234567891T9T8T	
001 alpha-D(+) Glucose	+++++	051 cis-Aconitate	+++++
002 beta-D(+) Fructose	+++++	052 trans-Aconitate	+++++--
003 D(+) Galactose	+++++--	053 Tricarballlylate	-----
004 D(+) Trehalose	-+++++--	054 Citrate	+++++
005 D(+) Mannose	+++++	055 D-Glucuronate	+++++
006 L(+) Sorbose	-----	056 D-Galacturonate	----+-----
007 alpha-D(+) Melibiose	-----	057 2-Keto-D-Gluconate	+++++--
008 Sucrose (= Saccharos	-+----+-----	058 5-Keto-D-Gluconate	-----+
009 D(+) Raffinose	-----	059 L-Tryptophan	----+-+-----+
010 Maltotriose	-----	060 N-Acetyl-D-Glucosami	+++--+-----+--
011 Maltose	-----	061 D-Gluconate	+++++--+++
012 alpha-Lactose	-----	062 Phenylacetate	---+-++-+++-++063
013 Lactulose	--+-+-----	Protocatechuate	+++--+++-++-++
014 1-0-Methyl-beta-gala	-----	064 p-Hydroxybenzoate (=	+++++
015 1-0-Methyl-alpha-gal	-----	065 (-) Quinate	+++++--++-++
016 D(+) Cellobiose	-----	066 Gentisate	-----
017 beta-Gentiobiose	-----	067 m-Hydroxybenzoate (=	-----
018 1-0-Methyl-beta-D-gl	+++++-----++	068 Benzoate	--+-+-----+
019 Esculin	-----	069 3-Phenylpropionate	-+++++-----++
020 D(-) Ribose	+++++--+++	070 m-Coumarate	-----
021 L(+) Arabinose	+++++--	071 Trigonelline	-+++--+-+--+-++
022 D(+) Xylose	+++++--++---	072 Betain	+++++
023 Palatinose	-----	073 Putrescine (= Diamin	+++++
024 alpha-L-Rhamnose	-----	074 DL-alpha-Amino-n-But	+++++
025 alpha-L(-) Fucose	-----+-----	075 Histamine	+++++
026 D(+) Melezitose	-----	076 DL-Lactate	+++++
027 D(+) Arabitol	+-----+	077 Caprate	+++++
028 L(-) Arabitol	----++-----	078 Caprylate	+++++
029 Xylitol	-----++-----	079 L-Histidine	+++++
030 Dulcitol	-----	080 Succinate	-----
031 D-Tagatose	-----	081 Fumarate	+++++
032 Glycerol	+---+-----+	082 Glutarate	-----+--
033 myo-Inositol	+--++++-++++--	083 DL-Glycerate	+++++-----+
034 D-Mannitol	+-----+	084 DL-alpha-Amino-n-val	+++++-----+
035 Maltitol	-----	085 Ethanolamine	-----
036 D(+) Turanose	-+++++-----+	086 Tryptamine	-----
037 D-Sorbitol	-+-----+	087 D-Glucosamine	+++++
038 Adonitol	----++-----	088 Itaconate	-----
039 Hydroxyquinoline-bet	+++++-----++	089 DL-beta-Hydroxybutyr	+++++
040 D-Lyxose	-----	090 L-Aspartate	+++++
041 i-Erythritol	----++-----	091 L-Glutamate	+++++
042 1-0-Methyl-alpha-D-g	-----+	092 L-Proline	+++++
043 3-0-Methyl-D-glucopy	-----	093 D-Alanine	+++++
044 D-Saccharate	-----	094 L-Alanine	+++++
045 Mucate	-----	095 L-Serine	+++--+-+-----++
046 L(+) Tartrate	-----+--	096 Malonate	+++++-----+
047 D(-) Tartrate	---+-+-----	097 Propionate	+++++-----+
048 meso-Tartrate	--+-+-----++	098 L-Tyrosine	+++++
049 D(+) Malate	-----	099 alpha-Ketoglutarate	+++++
050 L(-) Malate	-----		

Annexe II. 6 : Coordonnées du dendrogramme des 90 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents avec 99 caractères (Galerie BIOTYPE100).

N°	distance	gauche phénon	phénon droit	taille du phénon	N°	distance	gauche phénon	phénon droit	taille du phénon
1	0.0000	84	9	2	46	0.1633	45	17	2
2	0.0000	83	8	2	47	0.1636	57	55	2
3	0.0000	81	6	2	48	0.1637	121	23	4
5	0.0000	50	49	2	49	0.1640	133	116	15
6	0.0189	78	3	2	50	0.1658	122	111	5
7	0.0200	87	86	2	51	0.1678	125	107	5
8	0.0323	30	29	2	52	0.1702	42	41	2
9	0.0377	92	4	3	53	0.1731	66	28	2
10	0.0392	75	74	2	54	0.1791	129	110	7
11	0.0408	85	10	2	55	0.1800	68	61	2
12	0.0417	76	1	2	56	0.1907	132	127	6
13	0.0455	38	14	2	57	0.1944	94	52	3
14	0.0455	36	12	2	58	0.1985	139	114	7
15	0.0559	98	2	4	59	0.2077	147	46	8
16	0.0577	26	25	2	60	0.2086	143	123	9
17	0.0581	99	73	3	61	0.2093	138	106	18
18	0.0625	44	16	2	62	0.2114	124	48	3
19	0.0714	31	11	2	63	0.2121	140	24	6
20	0.0784	20	19	2	64	0.2138	136	56	3
21	0.0877	102	69	3	65	0.2168	145	142	8
22	0.0877	82	7	2	66	0.2198	151	51	4
23	0.0885	104	79	5	67	0.2216	153	58	4
24	0.0909	37	13	2	68	0.2230	149	141	11
25	0.0926	80	5	2	69	0.2245	91	88	3
26	0.1047	108	62	3	70	0.2251	150	148	26
27	0.1066	100	96	4	71	0.2292	152	134	9
28	0.1087	70	39	2	72	0.2314	128	67	3
29	0.1136	64	33	2	73	0.2408	157	144	13
30	0.1150	95	89	3	74	0.2451	137	105	6
31	0.1194	117	15	3	75	0.2488	162	154	21
32	0.1220	97	27	3	76	0.2547	155	146	7
33	0.1231	93	59	3	77	0.2620	159	158	29
34	0.1277	71	40	2	78	0.2700	160	72	10
35	0.1290	53	47	2	79	0.2729	167	164	31
36	0.1307	109	22	3	80	0.2864	168	161	34
37	0.1307	112	77	6	81	0.2925	169	118	36
38	0.1364	65	34	2	82	0.3028	170	60	37
39	0.1364	63	32	2	83	0.3117	166	163	35
40	0.1415	113	103	4	84	0.3262	172	171	72
41	0.1458	90	18	2	85	0.3414	165	54	8
42	0.1477	126	119	9	86	0.3446	156	43	5
43	0.1532	115	35	4	87	0.3663	175	173	77
44	0.1553	131	101	11	88	0.3992	176	135	79
45	0.1612	130	21	3	89	0.4208	177	120	82
					90	0.6839	178	174	90

Annexe II.7 : Rangement par ordre des CCD

1	0.928245	22	D(+) Xylose2
	0.862153	4	D(+) Trehalose3
	0.819677	60	N-Acetyl-D-Glucosamine4
	0.807203	37	D-Sorbitol5
	0.797743	41	i-Erythritol6
	0.795601	3	D(+) Galactose7
	0.790653	21	L(+) Arabinose8
	0.780131	42	1-O-Methyl-alpha-D-glucopyranoside9
	0.761555	38	Adonitol10
	0.755092	36	D(+) Turanose11
	0.749187	57	2-Keto-D-Gluconate12
	0.725788	33	myo-Inositol13
	0.697582	28	L(-) Arabitol14
	0.697315	59	L-Tryptophan15
	0.680969	48	meso-Tartrate16
	0.673714	96	Malonate17
	0.654247	29	Xylitol18
	0.640691	69	3-Phenylpropionate19
	0.624022	34	D-Mannitol20
	0.610436	62	Phenylacetate21
	0.606166	71	Trigonelline22
	0.592960	81	Fumarate23
	0.587781	87	D-Glucosamine24
	0.580235	20	D(-) Ribose25
	0.579305	99	alpha-Ketoglutarate (= 2-Ketoglutarate, 2-Oxoglutarate) 26
	0.576741	68	Benzoate27
	0.575777	95	L-Serine28
	0.574022	82	Glutarate29
	0.571790	8	Sucrose (= Saccharose)30
	0.569680	65	(-) Quinate31
	0.547153	64	p-Hydroxybenzoate (= 4-Hydroxybenzoate)32
	0.544287	5	D(+) Mannose33
	0.473156	27	D(+) Arabitol34
	0.472648	94	L-Alanine35
	0.463857	70	m-Coumarate36
	0.453101	63	Protocatechuate37
	0.446773	72	Betain38
	0.442039	89	DL-beta-Hydroxybutyrate (= 3-Hydroxybutyrate)39
	0.441481	83	DL-Glycerate40
	0.439548	77	Caprate41
	0.439446	46	L(+) Tartrate42
	0.432750	73	Putrescine (= Diaminobutane) 98 L-Tyrosine 79 L-Histidine 91 L-Glutamate
		92	L-Proline 93 D-Alanine 74 DL-alpha-Amino-n-Butyrate (= 4-Aminobutyrate)
		75	Histamine 76 DL-Lactate 78 Caprylate
		75	Histamine 76 DL-Lactate 78 Caprylate
		75	Histamine 76 DL-Lactate 78 Caprylate 75
			Histamine 76 DL-Lactate 78 Caprylate
			Histamine 76 DL-Lactate 78 Caprylate
			Histamine 76 DL-Lactate 78 Caprylate Histamine
			76 DL-Lactate 78 Caprylate
			76 DL-Lactate 78 Caprylate
			76 DL-Lactate 78 Caprylate 76
			DL-Lactate 78 Caprylate
			DL-Lactate 78 Caprylate
			DL-Lactate 78 Caprylate DL-Lactate
			78 Caprylate
			78 Caprylate
			78 Caprylate 78
			Caprylate
			Caprylate

on a trouvé 94 caractères avec un ccd non nul
pour retenir 94 ccd, on utilise 94 caractères

Annexe II.9 : Rangement par ordre des CCD des souches du biotope palmeraies
--

1	0.881291	28 L(-) Arabitol	41 i-Erythritol	29 Xylitol	38 Adonitol
2	0.468996	20 D(-) Ribose	96 Malonate	22 D(+) Xylose	39 Hydroxyquinoline-beta-glucuronide
3	0.446439	65 (-) Quinate	59 L-Tryptophan	4	
	0.330313	69 3-Phenylpropionate	36 D(+) Turanose	33 myo-Inositol	
	0.215789	63 Protocatechuate	48 meso-Tartrate	6	
	0.193507	56 D-Galacturonate	25 alpha-L(-) Fucose	7	
	0.173534	62 Phenylacetate	8		
	0.170951	47 D(-) Tartrate	37 D-Sorbitol	9	
	0.144484	71 Trigonelline	8 Sucrose (= Saccharose)	10	
	0.124511	68 Benzoate	11		
	0.095462	95 L-Serine	12		
	0.078982	84 DL-alpha-Amino-n-valerate (= 5-Aminovalerate)	60 N-Acetyl-D-Glucosamine		
	0.056426	27 D(+) Arabitol	4 D(+) Trehalose	34 D-Mannitol	83 DL-Glycerate 13
		13 Lactulose	32 Glycérol		

pour les autres caractères, le ccd est nul ou vaut moins de 0.0001

on a trouvé 32 caractères avec un ccd non nul
pour retenir 32 ccd, on utilise 32 caractères

Annexe II.10 : Rangement par ordre des ccd du biotope sol non cultivé

- 1 1.000000 37 D-Sorbitol 82 Glutarate 64 p-Hydroxybenzoate (= 4-Hydroxybenzoate)
 28 L(-) Arabitol 60 N-Acetyl-D-Glucosamine 28
 L(-) Arabitol 60 N-Acetyl-D-Glucosamine
 L(-) Arabitol 60 N-Acetyl-D-Glucosamine
 L(-) Arabitol 60 N-Acetyl-D-Glucosamine L(-)
 Arabitol 60 N-Acetyl-D-Glucosamine Arabitol
 60 N-Acetyl-D-Glucosamine
 60 N-Acetyl-D-Glucosamine
 60 N-Acetyl-D-Glucosamine 60
 N-Acetyl-D-Glucosamine
 N-Acetyl-D-Glucosamine
 N-Acetyl-D-Glucosamine N-Acetyl-D-Glucosamine
- 2 0.970951 22 D(+) Xylose 71 Trigonelline 68 Benzoate 96 Malonate 8 Sucrose
 (= Saccharose) (= Saccharose) Saccharose)
- 3 0.881291 34 D-Mannitol 36 D(+) Turanose 33 myo-Inositol 69 3-Phenylpropionate
 81 Fumarate 41 i-Erythritol 65 (-) Quinate 62 Phenylacetate 61
 D-Gluconate 4 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 D-Gluconate 4 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 D-Gluconate 4 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol D-Gluconate
 4 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 4 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 4 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol 4
 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 D(+) Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol D(+)
 Trehalose 59 L-Tryptophan 38 Adonitol Trehalose
 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 59 L-Tryptophan 38 Adonitol
 59 L-Tryptophan 38 Adonitol 59
 L-Tryptophan 38 Adonitol
 L-Tryptophan 38 Adonitol
 L-Tryptophan 38 Adonitol L-Tryptophan
 38 Adonitol
 38 Adonitol
 38 Adonitol 38
 Adonitol
 Adonitol
 Adonitol Adonitol
- 4 0.721928 58 5-Keto-D-Gluconate 56 D-Galacturonate 55 D-Glucuronate 53 Tricarballoylate
 63 Protocatechuete 48 meso-Tartrate 46 L(+) Tartrate 29 Xylitol
 27 D(+) Arabitol 70 m-Coumarate 23 Palatinose 20 D(-) Ribose 10
 Maltotriose 5 D(+) Mannose 3 D(+) Galactose 99 alpha-Ketoglutarate
 (= 2-Ketoglutarate, 2-Oxoglutarate) (= 2-Ketoglutarate, 2-Oxoglutarate) 2-Ketoglutarate,
 2-Oxoglutarate) 2-Oxoglutarate) 5
- 0.695462 95 L-Serine6
 0.605802 94 L-Alanine7
 0.468996 97 Propionate 2 beta-D(+) Fructose 93 D-Alanine 92 L-Proline 49
 D(+) Malate 47 D(-) Tartrate 25 alpha-L(-) Fucose 21 L(+) Arabinose
 72 Betain 73 Putrescine (= Diaminobutane) 74 DL-alpha-Amino-n-Butyrate
 (= 4-Aminobutyrate) 75 Histamine 76 DL-Lactate 77 Caprate 78 Caprylate
 79 L-Histidine 42 1-0-Methyl-alpha-D-glucopyranoside 13 Lactulose 83
 DL-Glycerate 84 DL-alpha-Amino-n-valerate (= 5-Aminovalerate) 87 D-Glucosamine
 90 L-Aspartate 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 90 L-Aspartate 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 90 L-Aspartate 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate 90
 L-Aspartate 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 L-Aspartate 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 L-Aspartate 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate L-Aspartate
 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 98 L-Tyrosine 91 L-Glutamate 98
 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 L-Tyrosine 91 L-Glutamate
 L-Tyrosine 91 L-Glutamate L-Tyrosine
 91 L-Glutamate
 91 L-Glutamate
 91 L-Glutamate 91
 L-Glutamate
 L-Glutamate
 L-Glutamate L-Glutamate 8
- 0.446439 89 DL-beta-Hydroxybutyrate (= 3-Hydroxybutyrate) 66 Gentisate
 pour les autres caractères, le ccd est nul ou vaut moins de 0.0001
 on a trouvé 66 caractères avec un ccd non nul pour retenir 66 ccd, on utilise 66 caractères.

Annexe III.1 : Solutions utilisées en hybridation sur colonies de *Pseudomonas* spp. fluorescents**Solutions**

SDS 10% : 10 g/100 mL H₂O UP, ne pas stériliser.

Solution dénaturante : 0,5 M NaOH (20 g /L)
1,5 M NaCL (87,7 g/L)

Solution neutralisante : 1,5 M NaCL (87,7 g/L)
0,5 M TRIS-HCL (60,5 g/L)

20 X SSPE : 20 mM EDTA (7,4 g/L)
200 mM NaH₂PO₄·2H₂O (31,2 g/L)
3,6 M NaCL (210,4 g/L)
Ajuster le pH à 7,4 avec au moins 10 pastilles de soude

20 X SSC : NaCL 3 M (175,32 g/L)
Citrate de Na 0,3 M (88,23 g/L)

Pronase E : 200 mg + 20 mL H₂O UP stérile donc solution à 10 mg/ml.
Aliquoter et congeler à -20°C.

Tampon 1 : 0,1 M acide maléique (poudre) soit 11,61 g/L
0,15 M NaCL soit 8,77 g/L
Ajuster le pH à 7,5 avec pastilles de soude et autoclaver.

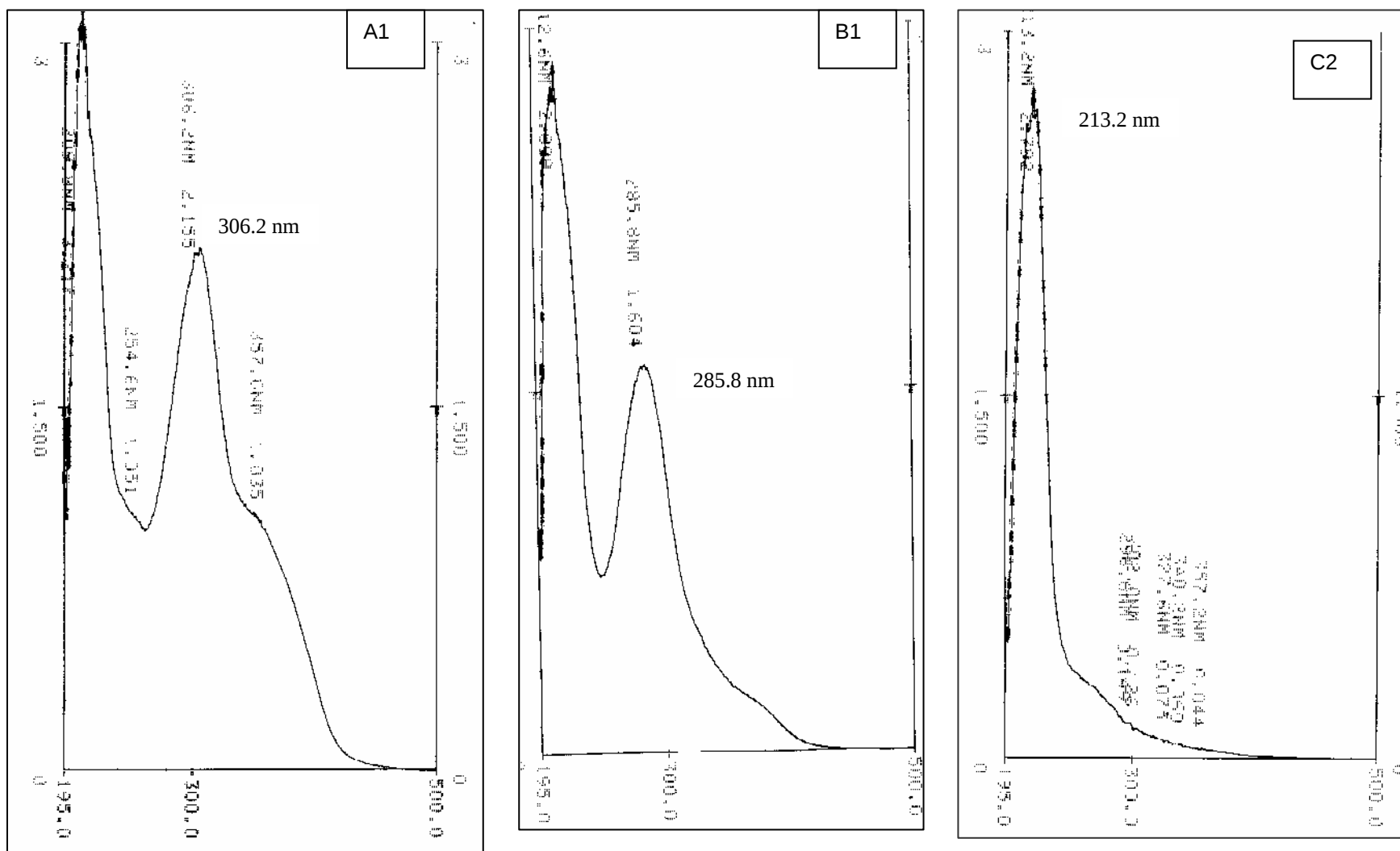
Tampon 1 + tween 20 0,3% V/V.

Tampon 3 ou tampon de détection :
0,1 M Tris-HCL (trisbase) soit 12,11g/L
0,1 M NaCL soit 5,84 g/L
50 mM MgCL₂ soit 4,76 g/L
Ajuster le pH à 9,5 et autoclaver.

TE : Tris 10 mM soit 1,21 g/L + EDTA 1 mM soit 0,37 g/L, ajuster le pH à 7,5-8 et autoclaver.

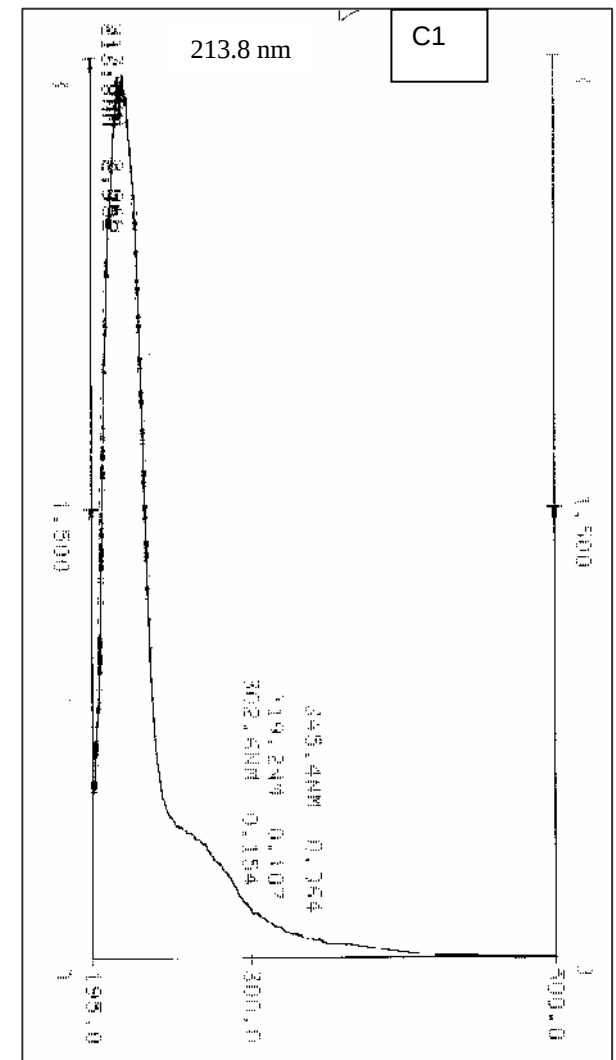
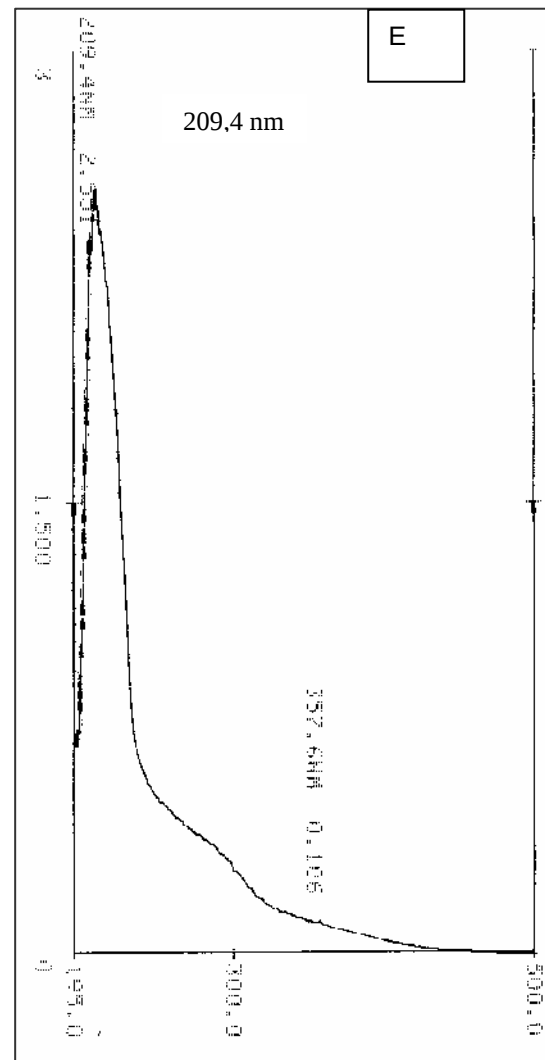
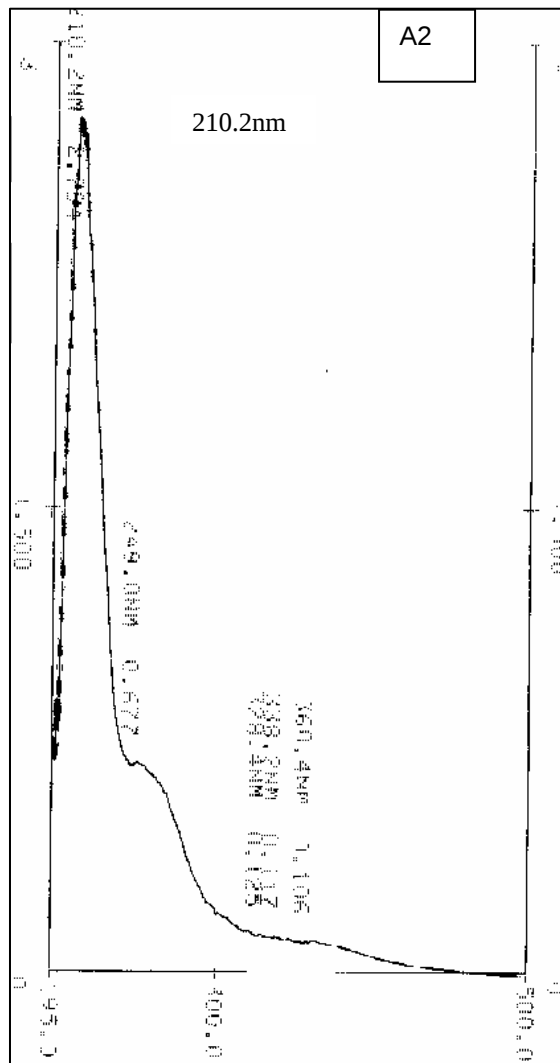
Tampon d'hybridation :
250 mL 20 SSC + 750 mL H₂O distillée + 10 g Blocking Reagent
dissoudre à 65°C et stériliser 20 mn à 120°C.
Ajouter N Lauroylsarcosine 0,1% (W/V) soit 1 g et Laurylsulfate
(SDS) 0,02%(W/V) soit 0,2 g, poudre à dissoudre à 65°C.

Annexe III.2 : Spectres d'absorption (UV visibles)



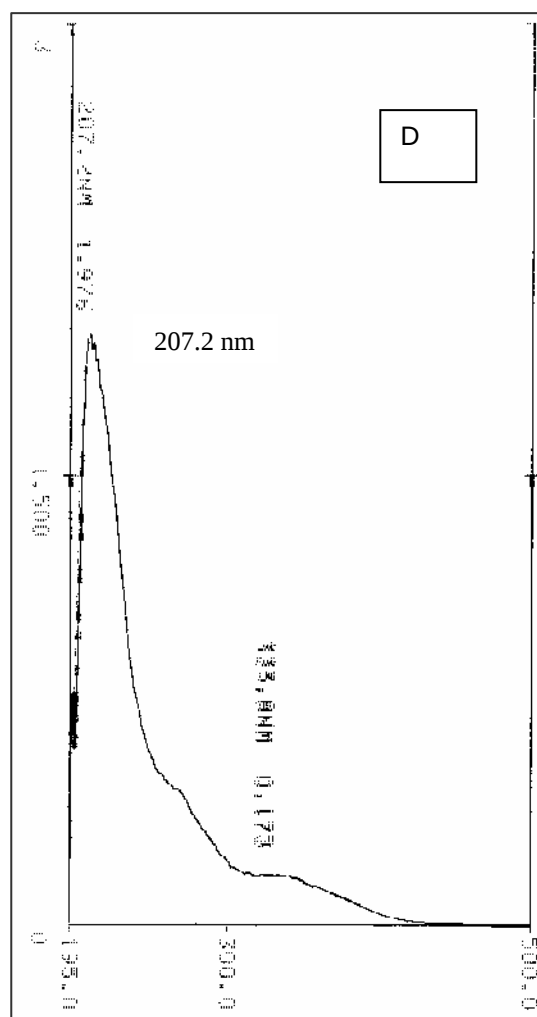
Spectres d'absorption (UV visible) des composés A1, B1 et C2 sécrétés par la souche *Pseudomonas fluorescens* P6

Annexe III.2 : Spectres d'absorption (UV visibles)



Spectres d'absorption (UV visible) des composés A2, E et C1 sécrétés par la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA0.

Annexe III.2 (suite 2) : Spectres d'absorption (UV visibles)



Spectres d'absorption (UV visible) du composé D sécrété
par la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA0

Annexe IV.1 : Caractéristiques physico-chimiques du sol utilisé

Caractéristiques physico-chimiques	Concentration / g de sol
- Matières organiques	3.80 (%)
- Phosphore	470 ppm
- Fer	0.70 – 1.30 mg
- pH	7.49 %
- Humidité hygroscopique	2.05 %
- Texture	Limono-sableux

ANNEXE VI.1 composition de la solution Nutritive (en milliéquivalents par litre).

	NO₃	PO₄	SO₄	Cl.	TOTAL
K	3.8	0.8 0.6			5.2
Na				0.2	0.2
Ca	6.2				6.2
Mg			1.5		1.5
NH₄	2.0				2.0
H		1.6 0.3			1.9
Total	12.0	3.3	1.5	0.2	17.0

ملخص

حماية الصحة النباتية بالطرق البيولوجية، باستعمال العزلات البكتيرية النافعة من نوع وسلالات (*Pseudomonas Fluorescents*) قد أصبح من الطرق المرغوب فيها، و لكن نجاعة مفعول هذه البكتيريا في استعمالها على نطاق واسع متلائم و ظروف الإنتاج الزراعي، بما فيه التغيرات العديدة من تربة و مناخ، لم يحقق لحد الآن استمرارية المفعول. هذا النقص مرده إلى عدم تلائم و تكيف هذه البكتيريا في المجموع الجذري للنبات أو في التربة الحاوية له. من أجل تحسين استغلال هذه البكتيريا النافعة و ضمان نطاق واسع من مفعولها الإيجابي على النباتات، يستلزم علينا التعرف بعمق على الخاصيات و الآليات، المستعملة من قبل هذه البكتيريا من أجل تأقلمها و تعمير التربة الحاوية للمجموع الجذري. من الأهداف المسطرة في أطروحتنا هذه، تشخيص و تعريف أبرز الخاصيات التي تتقاسمها البكتيريا لتحسين قدراتها على النمو و إفراز المواد الثانوية تيسر بها تعمير و استقطان المجموع الجذري. الخطة المتبعة في دراستنا سمحت بإظهار تغييرات عدة لدى العزلات التي وجدناها في عينات التربة بعد تحليلها البكتيولوجي. قد لوحظ تناسق كبير بين الخاصيات المدروسة و منبع عزل هذه البكتيريا (من نبات وصف التربة). الطرق التصنيفية المعتمدة لم تعد كافية مما يستلزم تعميق طرق التصنيف بإجراء دراسات على الأحماض النووية و التفرعات السلائية. التجارب الخاصة بدراسة المفاعيل الإيجابية لهذه البكتيريا قد أظهرت نتائج جد إيجابية فيما يخص تحسين فيزيولوجيا النبات (لزيادة في الكتلة الحيوية للنبات) و إبطال مفعول بعض الأمراض الفطرية الناجمة من التربة. يجدر الإشارة أنه ضد هذه الأمراض، استعمال الوسائل الكلاسيكية من مبيدات كيميائية يعد غير كاف لمقاومة هذه الأمراض. استعمال هذه البكتيريا باستطاعته الزيادة في حظوظ نجاح الطرق الوقائية ضد هذه الأوبئة المنقولة عبر التربة. استعمال التحاليل الرياضية البيومترية أمكننا من إبراز بعض العلاقات التناسبية لدى بعض الخاصيات و الآليات الطبيعية للبكتيريا. في أفق استعمال هذه البكتيريا كمبيدات بيولوجية حيوية يستلزم إجراء دراسات معمقة من أجل ابتكار التدابير الميسرة لتصنيع مركبات بيولوجية على نطاق تجاري لاستعمال واسع و تطبيقي في الأنظمة الزراعية المعهودة.

Titre :**CARACTERISATION DES EFFETS D'ANTAGONISME MICROBIEN ET DE PROMOTION DE LA CROISSANCE VEGETALE DE SOUCHES DE *Pseudomonas* spp. FLUORESCENTS****Résumé :**

L'objectif de notre travail était d'apporter une contribution à la connaissance du déterminisme physiologique, métabolique et écologique du pouvoir antagoniste et promoteur de la croissance végétale des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes telluriques.

Un total de 1050 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été isolées à partir de divers sols rhizosphériques et de sol non cultivé constituant 7 biotopes différents, ce résultat confirme l'ubiquité et l'adaptation de ce groupe bactérien, particulièrement dans les sols cultivés (effet rhizosphère). Les quatre espèces types de ce groupe *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* ont été retrouvées avec la prédominance de la première espèce, particulièrement de son biovar 1, cependant, le nombre de souches non identifiées est relativement important. La détermination des profils trophiques des souches a mis en évidence une grande diversité dans leur métabolisme carboné ; néanmoins, il n'y pas eu de concordance entre les résultats de l'identification et les profils trophiques, ce qui pose les limites des tests phénotypiques d'identification des *Pseudomonas*. Les espèces de *Pseudomonas* se répartissent de manière aléatoire par rapport aux biotopes, tandis que ces derniers semblent influencer sur les profils trophiques des souches, probablement en les sélectionnant.

Parmi ces souches, certaines ont montré un pouvoir antagoniste *in vitro* vis-à-vis de phytopathogènes fongiques et bactériens et se sont avérées productrices de métabolites secondaires (sidérophores, cyanide d'hydrogène, phosphatases, acide salicylique, acide indole acétique, phénazines et autres composés antimicrobiens) dont le rôle dans l'antagonisme et la biostimulation végétale a été rapporté, résistantes à certains facteurs et conditions hostiles retrouvées dans l'environnement (tolérance du NaCl, résistance aux antibiotiques et aux stress thermique et hydrique) et douées de capacité de colonisation racinaire (compétence rhizosphérique). Il faut noter que ces caractères ont été retrouvés principalement chez les souches provenant des sols cultivés (effet rhizosphère), indépendamment du type de biotope et la compétence rhizosphérique s'exprime mieux dans le sol naturel (présence de la flore indigène) que dans les conditions gnotobiotiques (sol stérile). Les essais *in situ* conduits en sol cultivé avec différentes plantes ont montré de manière évidente que nos souches, à des degrés variables, protégeaient la plante bactérisée contre différents agents phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Pythium ultimum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) et promouvaient la croissance végétale, en réduisant le taux et les symptômes de la maladie et en stimulant la germination, la levée et la phytomasse ; la performance des souches est corrélée à leur caractère rhizosphérique et à leur performance métabolique. Nos souches ont été aussi capables d'induire chez la plante une résistance systémique vis-à-vis des phytopathogènes et de diminuer la réceptivité du sol à ces agents.

Nos résultats ont montré que la tourbe et le méthyle cellulose conservent et stabilisent les souches de *Pseudomonas*, ils peuvent donc être préconisés comme supports dans la formulation des inoculums bactériens destinés à la bactérisation du sol et/ou de la plante.

Mots clefs : *Pseudomonas* spp. fluorescents, rhizosphère, antagonisme, phytopathogène.