

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat ABBAS Sétif
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Microbiologie

N° /SNV/2012

THÈSE

Présentée par: **Mme MEZAACHE Samia**
Pour obtenir le diplôme de **Doctorat en Sciences**
Option : **Microbiologie**

THÈME

**LOCALISATION DES DÉTERMINANTS DE LA SUPPRESSION DE
QUELQUES SOUCHES DE *PSEUDOMONAS* ISOLÉES DE LA
RHIZOSPHERE DE LA POMME DE TERRE.**

Soutenue le 04 /07/2012

DEVANT LE JURY

Président:	HARZALLAH, D.	Professeur	Université Ferhat ABBAS de Sétif
Rapporteur:	GUECHI, A.	Professeur	Université Ferhat ABBAS de Sétif
Examinatrice:	YAHIAOUI, R.	Professeur	Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Examineur:	MAAMACHE, B.	Professeur	Université Hadj LAKHDHAR de Batna

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des Figures et Tableaux

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE PREMIER : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. CARACTERISTIQUES DU GENRE <i>PSEUDOMONAS</i>	6
1.1. CARACTERISTIQUES METABOLIQUES	6
1.2. CLASSIFICATION DU GENRE	8
1.2.1. Etapes de la classification	8
1.2.2. Classification contemporaine	10
2. DISTRIBUTION ECOLOGIQUE ET ROLE DU GENRE <i>PSEUDOMONAS</i>	14
2.1. DISTRIBUTION ECOLOGIQUE	14
2.2. LES <i>PSEUDOMONAS</i> SPP. FLUORESCENTS AGENTS DE BIOCONTROLE ET DE CROISSANCE DES PLANTES	15
2.2.1. Stimulation de la croissance des plantes	16
2.2.2. Mécanismes d'antagonisme	18
2.2.3. Quorum Sensing(QS)	22
3. BIOLOGIE DU FER CHEZ LES BACTERIES	22
3.1. PROPRIETES CHIMIQUES	22
3.2. PROPRIETES BIOLOGIQUES	23
3.3. L'HOMÉOSTASIE DU FER	24
3.3.1. La protéine FUR	24
3.3.2. Les facteurs σ -ECF	25
3.3.3. Petits ARN non-codants	26
3.4. LES SIDEROPHORES	26
3.4.1. Définition	26
3.4.2. Caractéristiques	27
3.4.3. Classification des sidérophores	27
DEUXIÈME CHAPITRE : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES <i>PSEUDOMONAS</i>	29
1. INTRODUCTION	29
2. MATERIELS ET METHODES	31
2.1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS	31
2.2. DETERMINATION DES ISOLATS BACTERIENS	31
2.2.1. MÉTHODE D'ISOLEMENT	31
2.2.2. CONSERVATION DES ISOLATS	32
2.2.3. IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS	32
2.2.4. TAXONOMIE NUMERIQUE	36
2.2.5. IDENTIFICATION GÉNOTYPIQUE DES ISOLATS	37
3. RESULTATS	42
3.1. ISOLEMENT DES <i>PSEUDOMONAS</i> FLUORESCENTS	42
3.2. IDENTIFICATION SPECIFIQUE DES <i>PSEUDOMONAS</i> FLUORESCENTS	42
3.3. IDENTIFICATION INFRASPECIFIQUE DE <i>PSEUDOMONAS</i> FLUORESCENTS	43
3.4. DISTRIBUTION DES ISOLATS	44
3.5. IDENTIFICATION DES ISOLATS PHYTOPATHOGENES	46
3.6. TAXONOMIE .NUMERIQUE	46
3.6.1. BIOTOPE CULTIVE	47
3.6.2. BIOTOPE NON CULTIVÉ	50
3.7. SEQUENÇAGE r RNA 16S ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE	51
3.8. PROFILS PLASMIDIQUES	51

4. DISCUSSION	53
5. CONCLUSION	61
TROISIÈME CHAPITRE : MÉTABOLITES IMPLIQUES DANS LA SUPPRESSION	62
1. INTRODUCTION	62
2. MATERIELS ET METHODES	64
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	64
2.2. PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES	64
2.2.1. SYNTHÈSE DES SIDEROPHORES	64
2.2.1.1. Electrophorèse des sidérophores	65
2.2.1.2. Détermination de la nature chimique des sidérophores	65
2.2.1.3. Synthèse des IRCP (Iron Repressed Cytoplasmic Proteins)	66
2.2.2. SYNTHÈSE DE L'ACIDE INDOLE ACETIQUE (AIA)	67
2.2.2.1. Estimation de la production d'AIA	67
2.2.2.2. Quantification de l'AIA	67
2.3. PRODUCTION D'ENZYMES	67
2.3.1. PHOSPHATASES	67
2.3.2. CELLULASES	68
2.3.3. LIPASES	68
2.3.4. LES ENZYMES DEGRADANT LES PAROIS CELLULAIRES	68
2.4. SYNTHÈSE D'ANTIBIOTIQUES	68
2.4.1. PRODUCTION DE SUBSTANCES VOLATILES (HCN)	68
2.4.2. PRODUCTION DE SUBSTANCES DIFFUSIBLES: Phenazines.	69
2.4.2.1. Sélection des souches antagonistes in vitro	69
2.4.2.2. Détection et extraction des métabolites à effet antibiotique	70
2.4.2.3. Quantification des phénazines	70
2.4.2.4. Analyse des composés à effet antibiotique : phénaziniques	70
3. RESULTATS	73
3.1. PRODUCTION DE SIDEROPHORES	73
3.2. PRODUCTION DE L'ACIDE SALYCILIQUE	77
3.3. PRODUCTION DE L'ACIDE-INDOLE-ACETIQUE	77
3.4. PRODUCTION D'ENZYMES	79
3.5. CYANOGENESE	79
3.6. PRODUCTION DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE	79
3.6.1. CARACTERISATION DES PHENAZINES	80
3.6.1.1. Extraction	80
3.6.1.2. Bio autographie et révélation chimique	81
3.6.1.3. Spectres UV-Visible	81
3.6.1.4. Analyse HPLC	82
3.6.1.5. Analyse GC/MS	83
4. DISCUSSION	85
5. CONCLUSION	93
QUATRIÈME CHAPITRE : COMPÉTITION RHIZOSPHERIQUE	94
1. INTRODUCTION	94
2. MATERIELS ET METHODES	96
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	96
2.2. DETECTION DE LA PRODUCTION DE BACTERIOCINES	96
2.3. PRODUCTION DE BACTERIOCINES PAR INDUCTION	96
2.4. ACTIVITE BACTERICIDE DES LYSATS	97
2.5. DETERMINATION DU TYPE DE BACTERIOCINE	97
2.5.1. DIGESTION TRYPIQUE	97
2.5.2. FILTRATION	97

2.5.3. CONGELATION	98
2.5.4. TRAITEMENT THERMIQUE	98
3. RESULTATS	99
3.1. DETECTION DE BACTERIOCINES	99
3.2. DETERMINATION DU TYPE DE BACTERIOCINE	99
4. DISCUSSION	102
5. CONCLUSION	106
CINQUIÈME CHAPITRE : CAPACITÉS D'ANTAGONISME ET STIMULATION DE LA CROISSANCE	107
1. INTRODUCTION	107
2. MATERIELS ET METHODES	109
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	109
2.2. ANTAGONISME <i>IN VITRO</i>	110
2.2.1. INHIBITION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE	110
2.2.2.1. Activité antifongique	111
2.2.2.2. Activité antibactérienne	112
2.2.2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES SURNAGEANTS	112
2.2.2.1. Activité antibactérienne	112
2.2.2.2. Activité antifongique	113
2.2.3. UTILISATION DES SIDEROPHORES	113
2.2.3.1. Évaluation de la capacité d'utilisation des sidérophores	113
2.2.3.2. Utilisation des sidérophores hétérologues	114
2.2.4. TESTS D'ENROBAGE DES TUBERCULES	114
2.3. TESTS D'ANTAGONISME <i>IN SITU</i>	115
2.3.1. PREPARATION DES TERREAUX	115
2.3.2. TRAITEMENT DES TUBERCULES	115
3. RESULTATS	116
3.1. ANTAGONISME <i>IN VITRO</i>	116
3.1.1. INHIBITION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE	116
3.1.2. UTILISATION DES SIDEROPHORES	119
3.1.3. ENROBAGE DES TUBERCULES	120
3.2. ANTAGONISME <i>IN PLANTA</i>	121
3.2.1. STIMULATION DE LA CROISSANCE DES PLANTES	121
3.2.2. POUVOIR PATHOGENE DES ISOLATS DE <i>PSEUDOMONAS</i> 10 ET 12	122
3.2.3. ANTAGONISME <i>IN PLANTA</i> : INHIBITION DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> SP.	122
4. DISCUSSION	124
5. CONCLUSION	128
DISCUSSION GÉNÉRALE	129
CONCLUSION GÉNÉRALE	139
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
ANNEXES	

JE DÉDIE CETTE THÈSE
À MA FAMILLE QUI A FAIT DE MOI CE QUE JE SUIS,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Le **PR. GUECHI ABDELHADI**, doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Vous avez rendu possible la réalisation de ce travail. Au-delà de votre rôle de directeur de thèse, le temps que vous m'avez consacré, vos critiques pertinentes et votre esprit de synthèse ont été des éléments déterminants dans la valorisation de cette thèse.

Un **ENORME** merci à tous ceux qui m'ont aidé, m'ont conseillé, m'ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront sans que je n'ai à citer leurs noms. Tous le corps technique et **ENSEIGNANT** de la faculté, chacun d'entre vous a participé activement au bon déroulement de ce travail de thèse et sans vous, certaines études expérimentales n'auraient pu être réalisables.

Merci aux membres du jury, les Professeurs **D. HARZALLAH, R. YAHIAOUI** et **B. MAAMACHE** d'avoir accepté de juger mon travail. Je suis convaincue que votre savoir me permettra d'avancer encore plus loin dans ce sujet qui m'a passionné pendant très longtemps.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé étroitement à l'avancée de mes recherches et à la réalisation des études expérimentales. Le Dr. Djamel DRIDER et Dr. Hervé PREVOST à l'ENITIAA (Nantes), Dr. Jane NICKLIN et Dr. Richard STRANGE, Birkbeck college University of London. Melle Safia ZOUBIRI (Moubydal, Alger).

L'un des côtés agréables du domaine de la recherche est la possibilité de faire de nombreuses rencontres, plus ou moins éphémères, toutes différentes les unes des autres.

Je finirai par remercier ma très chère mère **SAIDA** et mon regretté et défunt père, pour m'avoir permis d'aller jusqu'au bout.

Je remercie **SALIM**, pour avoir été là tout simplement au quotidien et avoir relevé tous les défis. Enfin, toute ma famille mes sœurs **FOUZIA, NADIA** et **NINA** ; mes frères **SAMIR** et **HICHEM** ; mes filles **NIHEL, CHAÏMA** et **WIHED**, sans oublier **TOUTES MES AMIES** et mes **COLLÈGUES**.

LISTE des ABRÉVIATIONS

2-OH-PCA:	le 2-hydroxy-phénazine-1 carboxylate.
2-OH-PZ :	le 2-hydroxy-phénazine.
30-84 :	<i>P. chlororaphis</i> 30-84 (<i>P. auréofaciens</i> 30-84).
ACC désaminase :	La 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate.
ACN :	acétonitrile.
AHL:	N-acyl-homoserine lactone.
AIA :	acide indole acétique.
AMPC :	adénosine monophosphate cyclique.
AS :	acide salicylique.
ATB :	antibiotique.
ATP :	adénosine tri-phosphate.
<i>B.subtilis</i>:	<i>Bacillus subtilis</i> .
BPB :	Bromo-Phenol-Bleu.
bv :	biovar.
CAA :	Casamino-Acids.
CAS:	chrome azurol S.
Ccd :	coefficient de capacité de diagnostique.
CCM :	chromatographie sur couche mince.
CHAO :	<i>P. fluorescens</i> CHAO.
CWDE :	enzymes ayant une activité protéolytique et chitinases.
DAPG :	2,4-diacetylphloroglucinol.
DO :	densité optique.
<i>E.coli</i> MC 4100:	<i>Escheichia coli</i> MC 4100.
E.P.S :	exo-polysaccharide.
EDDA:	Ethylenediamine di (o-hydroxyphenyl) acetic acid.
Fo:	<i>Fusarium oxysporum</i> .
Foa:	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> .
Fol:	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .
Fr:	<i>Fusarium roseum</i> sp.
Fs:	<i>Fusarium solani</i> sp.
Fsc:	<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i> .
Fsul18:	<i>Fusarium sulphureum</i> 18 (<i>sambucinum</i>).
FUR:	Ferric Uptake Regulator.
G+C:	guanine + cytosine.

GC/MS :	chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectroscopie de masse.
gyrB :	sous unité β de l'ADN gyrase.
H₂O₂ :	eau oxygénée.
H₂S :	hydrogène sulfuré.
HMW:	High Molecular Weight.
HPLC:	high performance liquid chromatographie.
HR:	hypersensitive reaction.
HSL:	homo sérines lactones.
IRCP:	Iron Repressed Cytoplasmic Proteins.
ISR:	induced systemic resistance.
ITS:	intergenic spacer.
KB:	milieu B de King.
kDa :	kilo Daltons.
KNO₃:	nitrates de potassium.
LlIpA:	La lectine-like putidacine-A.
LB :	Luria Bertani.
LlIpA :	lectin-like putidacin-A.
LOPAT :	Levane Oxydase, , Potato rotting, hydrolyse de l'Arginine, Tobacco.
M. luteus :	<i>Micrococcus luteus</i> ;
MALDI-TOF-MS:	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.
MHB:	mycorrhiza helper bacteria.
MS:	milieu au succinate.
NA:	nutrient agar.
NBY:	nutrient broth yeast extract.
NYA /NAY:	nutrient yeast extract agar.
O-CAS:	overlayed chrome azurol S.
P.diminutus :	<i>Pseudomonas diminutus</i> .
Pa. paratrophus:	<i>Paracoccus paratrophus</i> .
PAO1 :	<i>P.aeruginosa</i> 1.
PCA :	phénazine-1-carboxylate.
PCN :	phénazine-1-carboxamide.
PCR:	polymerase chain reaction.
PDA:	potato dextrose agar.
PDB:	Potato Dextrose Broth.
PGPR :	Plant Growth Promoting Rhizobacteria.
Pi:	<i>Phytophthora infestans</i> .

PLT:	Pyolutéorine.
PM:	Poids moléculaire.
PRN:	pyrrolnitrine.
Pu:	<i>Pytium ultimum</i> .
PVDs:	pyoverdines.
QS:	Quorum Sensing.
recA:	recombinase A.
Rf:	rapport frontal.
rhyB :	ARN non-codant.
rpm:	Rotation par minute.
rpoB :	sous unité β de l'ARN polymerase.
rpoD :	facteur σ^{70} de l'ARN polymérase.
Rs:	<i>Rhizoctonia solani</i> .
S.enteridis :	<i>Salmonella enteridis</i> .
SA :	sucrose/asparagine.
SAR :	systemic acquired resistance
SDS-PAGE :	sodium dodécyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis.
SOS :	Save Our Selves.
TFA:	tri-fluoro-acetic acid.
TLC:	thin layer chromatography.
tr :	le temps de rétention du composé.
TSA :	Tryptic-soy-agar.
TSB :	tryptic-soy-broth.
U.F.C:	unity forming colony.
UPGMA:	unweighted pairgroup method with averages.
σ-ECF :	facteur sigma de fonctions extra-cytoplasmiques.

LISTE DE FIGURES ET TABLEAUX

Chapitre I

Figure 1.	Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries	6
Figure 2.	Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère	17
Figure 3.	Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : <i>Pseudomonas</i> de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol	20
Figure 4.	Oxydation et réduction du fer	23
Figure 5.	Réaction de Fenton	24
Figure 6.	Exemples de Sidérophores classés selon leurs groupements fonctionnels	28

Chapitre II

Figure 7.	Schéma général de caractérisation du groupe <i>Pseudomonas fluorescens-putida</i>	33
Figure 8.	Clé dichotomique pour l'identification des souches appartenant aux espèces <i>P. fluorescens</i> et <i>P. putida</i>	34
Figure 9.	Dendrogramme des 14 isolats du site Dirou	47
Figure 10.	Dendrogramme des neufs isolats du site Ras el oued	50
Figure 11.	Dendrogramme de 17 isolats de sols non cultivés	50
Figure 12.	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, et montrant la relation des isolats 2 et 10 avec les espèces type du genre <i>Pseudomonas</i>	52

Chapitre III

Figure 13.	Production de sidérophores sur milieu au succinate O-CAS	74
Figure 14.	Electrophorèse SDS-PAGE des protéines cytoplasmiques solubles	76
Figure 15.	Production d'acide indole acétique	78
Figure 16.	Production de protéases	79
Figure 17.	Production d'HCN sur milieu à la glycine	80
Figure 18.	Bioautographie des extraits C/A cellulaires de l'isolat P ₂	82
Figure 19.	Superposition des spectres UV/Visible du Standard (PCA) et des isolats <i>Pseudomonas</i> P ₂ et 30-84	82
Figure 20.	Superposition des chromatogrammes de l'extrait actif de P ₂ (rouge), et du standard PCA (bleu)	84
Figure 21.	Profil chromatographique de l'extrait méthanolique pour un m/z = 180	84

Chapitre IV

Figure 22.	Production de bactériocines par les isolats de <i>Pseudomonas</i>	99
Figure 23.	Activité bactéricide des surnageants	100

Chapitre V

Figure 24.	Confrontations A : équidistante par contact direct sur PDA, B : à distance	111
Figure 25.	Utilisation des sidérophores hétérologues	113
Figure 26.	Antagonisme fongique <i>in vitro</i>	118
Figure 27.	Antagonisme bactérien indirect par l'extrait brut de P ₂	118
Figure 28.	Antagonisme par production de substances volatiles présence de FeCl ₃	119
Figure 29.	Utilisation des sidérophores hétérologues sur Sucrose/Asparagine	120
Figure 30.	Utilisation de sidérophores semi purifiés	120
Figure 31.	Pouvoir protecteur des isolats de <i>Pseudomonas</i>	121
Figure 32.	Effet de la bactérisation sur la croissance des plantes	121
Figure 33.	Effet de la bactérisation par les isolats 10 et 12 après 8 semaines d'inoculation	123
Figure 34.	Nécroses foliaires après 20 jours d'inoculation	123
Figure 35.	Effet de la bactérisation sur le développement de la maladie	123

Chapitre I

Tableau I.	Les espèces appartenant actuellement au genre <i>Pseudomonas</i>	11
-------------------	--	-----------

Chapitre II

TableauII.	Répartition des isolats de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents selon les biotopes	43
Tableau III.	Identification spécifique des isolats de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	44
TableauIV.	Spectres de réponses aux tests d'identification spécifique et infraspécifique selon les clés A, B et C	45
Tableau V.	Répartition des souches sélectionnées dans les taxons	46
Tableau VI.	Principales caractéristiques des souches phytopathogènes	47
Tableau VII.	Résultats des caractères métaboliques	48
TableauVIII.	Classes et isolats du dendrogramme Dirou	49
Tableau IX.	Classe et isolats du dendrogramme Ras el oued	49
Tableau X.	Classes et isolats du dendrogramme sol non cultivé	51

Chapitre III

Tableau XI.	Nombre et taux des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents producteurs de métabolites secondaires	73
Tableau XII.	Influence des milieux de culture sur la production de sidérophores	74
TableauXIII.	Production de sidérophores sur milieu au Succinate en absence et en présence de Fer	75
Tableau XIV.	Détection de la nature chimique des sidérophores produits par les <i>Pseudomonas</i> spp.	76
Tableau XV.	Détection de la production d'acide salicylique	77
TableauXVI.	Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique en présence et en absence de tryptophane.	78
TableauXVII.	Composés phénaziniques révélés par GC/MS	83

Chapitre IV

TableauXVIII.	Antagonisme <i>in Vitro</i> entre les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents par production de substances antibactériennes	100
Tableau XIX.	Activité bactéricide des surnageants traités	101

Chapitre V

Tableau XX.	Isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescents testés	109
Tableau XXI.	Origine des microorganismes utilisés dans l'antagonisme	110
TableauXXII.	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne	116
TableauXXIII.	Quantités d'extrait requises pour l'inhibition fongique	117

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

La quête constante de l'homme pour l'amélioration de la productivité et la réduction des coûts des produits agricoles ont eu des incidences négatives et à plusieurs niveaux. La qualité de l'environnement a été particulièrement touchée : contamination de l'eau par une utilisation intensive de produits phytosanitaires et d'engrais de synthèse, présence dans les aliments de résidus nocifs pour la santé, appauvrissement des sols, réduction de la biodiversité du fait de la présence de mono cultures de masse, et particulièrement la perturbation de la vie microbienne.

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002) et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Pivato *et al.*, 2009), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006). Cependant, leur impact sur la productivité et la diversité des plantes est encore mal compris.

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. La rhizosphère est définie comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne.

Une partie significative des photo-synthétats de la plante est directement libérée dans le sol sous forme de molécules organiques appelées 'rhizodépôts'. Ces rhizodépôts représentent de 5 à 40% des produits de la photosynthèse (Nguyen, 2009). La plante modifie donc l'environnement rhizosphérique en libérant divers composés dans les rhizodépôts.

La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu (van Loon, 2007). Ces modifications quantitatives de la microflore, ou 'effet rhizosphère', s'accompagnent également de modifications qualitatives.

La diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Latour *et al.*, 2009; Kowalchuk *et al.*, 2010) et leur activité métabolique (Nannipieri *et al.*, 2008) diffèrent de celles du sol nu. Les populations aptes à percevoir les variations de l'environnement rhizosphérique et à adapter leur physiologie, sont favorisées et tirent profit de cette perturbation.

Les composés organiques exsudés par les plantes dans la rhizosphère activent différents groupes de microorganismes et augmentent leur prolifération (Bais *et al.*, 2006).

Les rhizodépôts constituent donc un élément majeur de perturbation de la microflore tellurique qui en retour, influence la croissance et la santé des plantes et donc, à nouveau, l'émission des rhizodépôts. La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes (Cardon et Gage, 2006). Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur influence sur le développement des végétaux ne soit connue (microorganismes commensaux), certains sont favorables aux plantes (mutualistes) alors que d'autres ont des effets délétères sur les plantes (parasites et phytopathogènes). La croissance, la santé des plantes et leur diversité sont donc influencées par la diversité des populations microbiennes présentes dans la rhizosphère (Lemanceau, 1992; Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Whipps, 2001; Weller *et al.*, 2002; van der Heijden *et al.*, 2008). Les rhizodépôts jouent un rôle actif dans la régulation des interactions mutualistes et parasites/pathogènes, entre les plantes et les microbes du sol (Hirsch *et al.*, 2003).

La variabilité des résultats obtenue par l'utilisation d'organismes vivants est souvent supérieure à celle obtenue par l'application de produits de synthèse. De meilleures connaissances des mécanismes d'interaction plantes-microorganismes permettent de favoriser des populations déjà présentes dans la rhizosphère et qui sont bénéfiques pour les plantes, et de développer des pratiques autres que l'utilisation d'inoculants (Elhassan *et al.*, 2010).

Deux catégories d'effets bénéfiques des microorganismes sur les plantes peuvent être distinguées (van der Heijden *et al.*, 2008) : (i) les effets directs via les organismes microbiens associés à la racine qui mettent en place des relations mutualistes avec les plantes et (ii) les effets indirects via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère qui modifient les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs et la répartition des ressources.

Les microorganismes vivant librement dans la rhizosphère peuvent également avoir un effet bénéfique indirect sur la plante. D'une manière générale, le processus de minéralisation est une voie importante par laquelle les microorganismes vivant librement influencent la disponibilité des éléments nutritifs et donc la productivité, la santé et la diversité des plantes. Par ce processus, les microorganismes du sol décomposent la matière organique soluble et insoluble et libèrent ensuite des éléments minéraux disponibles pour les plantes.

Parmi les microorganismes à effets bénéfiques indirects, il existe notamment des bactéries dont l'effet global favorise la croissance de la plante (Lemanceau, 1992).

Le terme PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) désignant ces bactéries a été introduit par Kloepper et Schroth (1978). Différents mécanismes sont à l'origine des effets PGPR des bactéries rhizosphériques.

Certaines bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculants pour améliorer le développement des racines via la production de certaines phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg, 2001), telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (Vessey, 2003).

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance saprophyte des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Whipps, 2001).

Les microorganismes pathogènes sont connus pour pouvoir induire chez les plantes des mécanismes de défense, par l'intermédiaire de:

- *La résistance systémique acquise (SAR) qui protège les plantes contre les attaques ultérieures d'autres pathogènes.

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

- *D'autres bactéries peuvent contrôler la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, la compétition pour le carbone (Lemanceau *et al.*, 1988) et la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible (Lemanceau *et al.*, 2009).

- *L'antagonisme microbien, lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques, est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les microorganismes phytopathogènes (van Loon, 2007; Mazurier *et al.*, 2009).

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux pathovars de *Pseudomonas syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes (Höfte et de Vos, 2006). *P. syringae*, comme beaucoup d'autres *Pseudomonas* phytopathogènes, est capable d'induire chez les plantes résistantes non hôtes, une réaction hypersensible (HR) à l'origine de la SAR (Alfano et Collmer, 1997).

La HR est une réaction rapide de défense des plantes correspondant à une mort programmée des cellules aux sites d'invasion, qui bloque la progression du pathogène (Klement, 1982).

Néanmoins, d'autres espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui promouvoient la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires et à induire l'ISR chez les plantes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Whipps, 2001; van Loon, 2007; Weller *et al.*, 2002, 2007).

Les *Pseudomonas* produisent notamment, de nombreux métabolites antifongiques (Weller *et al.*, 2002, 2007). En effet, la plupart des *Pseudomonas* produisent des antifongiques tels que des phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) qui sont les antifongiques les plus fréquemment détectés (Haas et Défago, 2005). Ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes (Lemanceau *et al.*, 2009) et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux (Vansuyt *et al.*, 2007).

Elles élicitent les réactions de défenses des plantes et, de par leur forte affinité pour le fer, elles limitent la croissance saprophyte de certains microorganismes phytopathogènes (Lemanceau *et al.*, 2009).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail est d'apporter un plus dans la lutte biologique par la mise en évidence de bactéries indigènes bénéfiques pour les plantes. En évaluant leurs contributions dans la croissance et la santé des plantes, par la mise en évidence des principaux déterminants de la suppression ou de la pathogénicité (si elle existe).

La stratégie d'étude de ce travail consiste à (i) isoler et caractériser, à partir de la rhizosphère, une population bactérienne spécifique, en l'occurrence des *Pseudomonas* spp. fluorescents. (ii) déterminer les principaux métabolites synthétisés par ces microorganismes, qui auraient un impact bénéfique sur les plantes. (iii) explorer les capacités compétitives des isolats bénéfiques. Et enfin (iv) tester *in vitro* les métabolites produits sur des phytopathogènes telluriques.

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

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. CARACTERISTIQUES DU GENRE *PSEUDOMONAS*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Fig.1). Néanmoins, 188 espèces sont actuellement répertoriées sur le site internet <http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>.

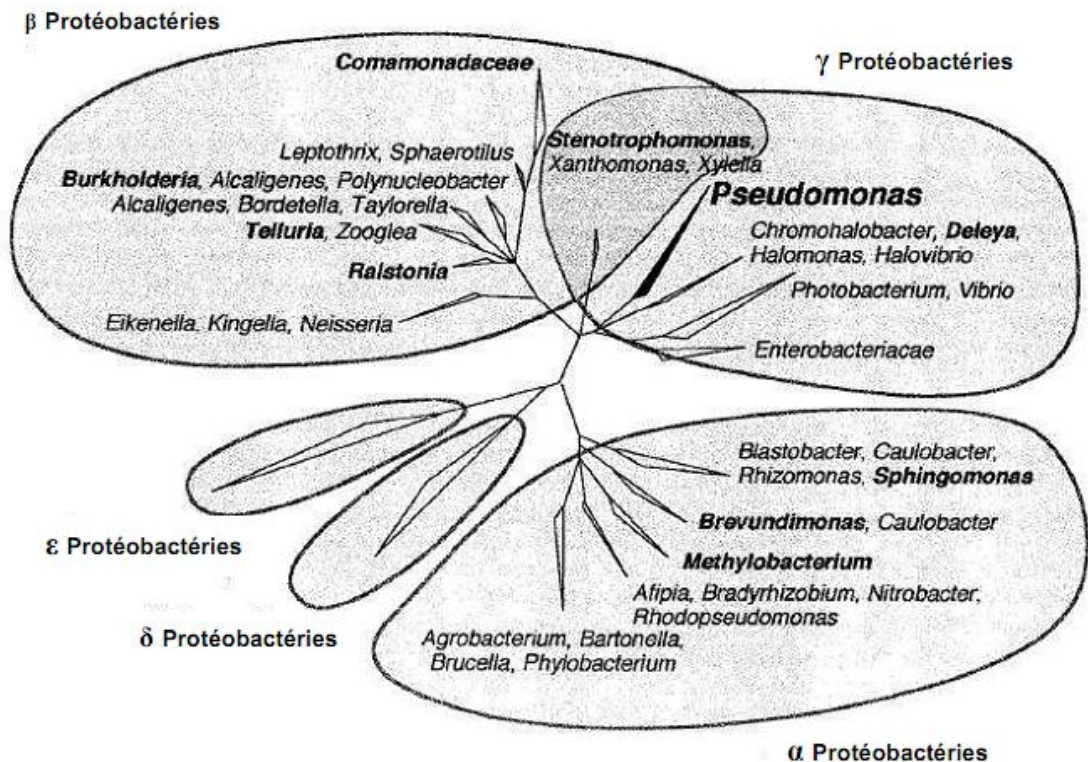


Figure 1. Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis *et al.*, 2000).

1.1. CARACTERISTIQUES METABOLIQUES

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes possèdent tous une cytochrome oxydase c ayant un maximum d'absorption caractéristique à 552/554 nm, qui peut être mise en évidence par l'oxalate de N, N-diméthyl-paraphénylène-diainine (Lelliot *et al.*, 1966). Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Toutefois, certaines sont chimio organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier. Elles peuvent utiliser des sources de carbones variables (versatilité nutritionnelle), et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (Stanier *et al.*, 1966). La plupart étant saprophytes (Bossis *et al.*, 2000 ; Ramalho *et al.*, 2002). Quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes (Stanier *et al.*, 1966), et certaines peuvent causer des infections chez l'homme. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi *et al.*, 2001).

Les températures cardinales aux quelles les espèces se multiplient varient de 4° à 42°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer sont négatifs (Palleroni, 1984).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (Palleroni, 1984), certaines seulement comme *P. pseudoalcaligenes* peuvent dégrader le poly β -hydroxybutyrate; (Palleroni, 1993). L'aptitude de certains isolats à dégrader des substances xénobiotiques a également retenu l'attention de différents chercheurs (Latour et lemanceau, 1997 ; Bossis *et al.*, 2000). De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Campbell *et al.*, 1995 ; Latour *et al.*, 1996).

Le catabolisme des xénobiotiques par les *Pseudomonas* spp fluorescents se caractérise en effet par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes dégradatives. Il présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une gamme importante de composés (Golovleva *et al.*, 1992). Enfin, certaines populations de *Pseudomonas* spp fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'azote (Clays-Josserand *et al.*, 1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

Ces bactéries contribuent donc, de façon significative, à la réduction des nitrates et des nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques (Latour et Lemanceau, 1997). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (Euzéby, 2008).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio films, grâce aux quels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Visca *et al.*, 2007). Ce genre produit beaucoup de poly hydroxy alcanates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

1.2. CLASSIFICATION DU GENRE *PSEUDOMONAS*

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (Palleroni, 2008).

1.2.1. Étapes de la classification

En 1960 Stanier *et al.*, dans une approche de clarification de la taxonomie du genre, ont publié un travail reportant les caractéristiques nutritionnelles de 267 isolats du genre ; basé sur l'utilisation de 146 composés organiques, en plus d'autres tests considérés comme déterminants dans la classification du genre. Dans la même décennie, la découverte du caractère de renaturation de l'ADN par Marmur, a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN (Colwell et Mandel, 1964; Colwell *et al.*, 1965; Johnson et Ordal, 1968).

Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques fût atteint par Palleroni et ses collaborateurs. Qui ont classifiés ce groupe bactérien en cinq sous-groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN (Palleroni *et al.*, 1973). Toutefois ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et finalement seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (Peix *et al.*, 2009).

Pourtant dans l'édition de 1974 du Bergey's Manual, ces bactéries sont incluses dans la famille des *Pseudomonadaceae*. Leur classification repose sur des caractéristiques phénotypiques, seules la composition en G+C fût rajouté comme caractéristique génétique. Dans la première édition du Bergey's Manual, la classification basée sur les cette homologie ARN/ADN fût incluse, mais le nombre d'espèces et les caractéristiques phénotypiques ont été maintenu (Palleroni, 1984).

Les principaux changements dans la taxonomie viennent de Woese, qui proposa de les classer et de les identifier en fonction de leurs ARN ribosomaux (Woese *et al.*, 1984). Toutefois ce nouveau schéma d'identification n'a pas été pris en considération dans l'édition 1994 du Bergey's Manual. Pourtant, c'est la classification phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARNr 16S, établie par Woese *et al.* (1984), qui a permis plus tard la subdivision par Kersters *et al.* (1996) des protéobactéries en 15 genres appartenant aux classes α , β et γ proposé par Stackebrandt *et al.* (1987).

En même temps, *Pseudomonas acidovorans* et *P. testosteroni* inclus dans le groupe ARNr III sont reclassifiés en 1987 dans le genre *Comamonas* (Tamaoka *et al.*, 1987), alors que les espèces *P. flava*, *P. palleroni*, *P. taeniospiralis*, *P. pseudoflava* et *P. carboxydoflava* seront reclassifiés deux ans plus tard dans le genre *Hydrogenophaga* (Willems *et al.*, 1989).

Depuis 1990, le séquençage du gène codant ARNr 16S a débuté, et est appliqué pour toutes les bactéries connus. Partiel au début, mais plus tard des génomes entiers ont été séquencés et déposés dans les banques de données. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres représentant les similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (Peix *et al.*, 2009). Et depuis, la reclassification des espèces initialement incluses dans les groupes ARNr de Palleroni continue.

Les espèces du groupe ARNr III comme *P. facilis*, *P. delafieldii* et d'autres isolats cliniques sont désormais reclassifiés dans le genre *Acidovorax* (Willems *et al.*, 1990), des espèces phytopathogènes comme *P. avenae* et *P. catleyae* ont aussi été reclassifiés dans ce genre (Willems *et al.*, 1992). En effet, ces nouveaux genres sont inclus dans la classe des beta-*Proteobacteria*, au même titre que *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992) et *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995). Ces deux derniers genres proviennent de la reclassification des espèces du groupe ARNrII comme *P. cepacia* (designée comme espèce type du genre *Burkholderia*) *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* et *P. solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1992, 1995).

Le groupe ARNr V, est phylogénétiquement le plus proche des vrais *Pseudomonas* (ARNr groupe I), *Xanthomonas maltophilia* reclassifié dans le genre *Stenotrophomonas* en 1993, mais appartenant à la classe des gamma-Proteobacteria (Palleroni et Bradbury, 1993).

Dans la première décennie du nouveau millénaire, la révision taxonomique la plus détaillée du genre *Pseudomonas* basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, fût entreprise par Anzai *et al.* (2000). En analysant les séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de références), ils ont conclu que 57 seulement appartenaient aux groupe des *Pseudomonas sensu stricto*; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes :

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- et le groupe des *P. pertucinogena*.

Depuis l'an 2000, la reclassification continue toujours (Tableau I). Plusieurs espèces étant mal classées comme *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* qui sont désormais des sous espèces du groupe *P. chlororaphis* (Johnson et Palleroni, 1989; Peix *et al.*, 2007), qui compte actuellement trois sous espèces: *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov.; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. et *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. (Peix *et al.*, 2007).

1.2.2. Classification contemporaine

L'édition actuelle du Bergey's (Palleroni, 2005) compte de nombreuses méthodes utilisées dans la classification des *Pseudomonas*. Ces méthodes révèlent les efforts fournis pour la caractérisation des espèces de *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les caractéristiques génétiques et écologiques, le pouvoir pathogène et la structure antigénique (Peix *et al.*, 2009).

1.2.2.1. Caractéristiques phénotypiques

Comprennent les tests tels que : la forme cellulaire, le type de flagelle, l'utilisation des sources de carbones tel que : les acides organiques, les polyols, les acides aminés, la capacité de croissance dans des conditions de culture variables, la synthèse d'exo-enzymes et la production d'antibiotiques (Palleroni, 2005).

Tableau I: Les espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas* (d'après Euzéby, 2008 in Peix *et al.*, 2009).

<i>P. abietaniphila</i> ^a	<i>P. cuatrociénegasensis</i> ^b	<i>P. mandelii</i> ^a	<i>P. pseudoalcaligenes</i> ^a
<i>P. aeruginosa</i> ^a	<i>P. delhiensis</i> ^b	<i>P. marginalis</i> ^a	<i>P. psychrophila</i> ^b
<i>P. agarici</i> ^a	<i>P. duriflava</i> ^b	<i>P. marincola</i> ^b	<i>P. psychrotolerans</i> ^b
<i>P. alcaligenes</i> ^a	<i>P. extremorientalis</i> ^b	<i>P. mediterranea</i> ^c	<i>P. putida</i> ^a
<i>P. alcaliphila</i> ^b	<i>P. ficuserectae</i> ^a	<i>P. meliae</i> ^a	<i>P. reinekei</i> ^b
<i>P. amygdali</i> ^a	<i>P. flavescens</i> ^a	<i>P. mendocina</i> ^a	<i>P. resinovorans</i> ^a
<i>P. anguilliseptica</i> ^a	<i>P. flectens</i> ^a	<i>P. meridiana</i> ^c	<i>P. rhizosphaerae</i> ^b
<i>P. antarctica</i> ^b	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. migulae</i> ^a	<i>P. rhodesiae</i> ^a
<i>P. argentinensis</i> ^b	<i>P. fragi</i> ^a	<i>P. mohnii</i> ^b	<i>P. sabulinigri</i> ^b
<i>P. asplenii</i> ^a	<i>P. frederiksbergensis</i> ^b	<i>P. monteilii</i> ^a	<i>P. salomonii</i> ^b
<i>P. avellanae</i> ^a	<i>P. fulva</i> ^a	<i>P. moorei</i> ^b	<i>P. savastanoi</i> ^a
<i>P. azotifigens</i> ^b	<i>P. fuscovaginae</i> ^a	<i>P. moraviensis</i> ^b	<i>P. segetis</i> ^b
<i>P. azotoformans</i> ^a	<i>P. gelidicola</i> ^c	<i>P. mosselii</i> ^b	<i>P. simiae</i> ^b
<i>P. balearica</i> ^a	<i>P. geniculata</i> ^c	<i>P. mucidolens</i> ^a	<i>P. straminea</i> ^a
<i>P. beteli</i> ^c	<i>P. gessardii</i> ^a	<i>P. multiresinivorans</i> ^a	<i>P. stutzeri</i> ^a
<i>P. borborti</i> ^b	<i>P. graminis</i> ^a	<i>P. nitroreducens</i> ^a	<i>P. synxantha</i> ^a
<i>P. boreopolis</i> ^b	<i>P. grimontii</i> ^b	<i>P. oleovorans</i> ^a	<i>P. syringae</i> ^a
<i>P. brassicaearum</i> ^b	<i>P. guineae</i> ^b	<i>P. orientalis</i> ^a	<i>P. taetrolens</i> ^a
<i>P. brenneri</i> ^b	<i>P. halophila</i> ^a	<i>P. oryzihabitans</i> ^a	<i>P. thermotolerans</i> ^b
<i>P. caeni</i> ^b	<i>P. indica</i> ^b	<i>P. otitidis</i> ^b	<i>P. thivervalensis</i> ^b
<i>P. cannabina</i> ^a	<i>P. japonica</i> ^b	<i>P. pachastrellae</i> ^b	<i>P. tolaasii</i> ^a
<i>P. caricapayae</i> ^a	<i>P. jessenii</i> ^a	<i>P. palleroniana</i> ^b	<i>P. tremae</i> ^a
<i>P. cedrella</i> ^a	<i>P. jinjuensis</i> ^b	<i>P. panacis</i> ^b	<i>P. trivialis</i> ^b
<i>P. chloritidismutans</i> ^b	<i>P. kilonensis</i> ^b	<i>P. panipatensis</i> ^b	<i>P. tuomuerensis</i> ^b
<i>P. chlororaphis</i> ^a	<i>P. knackmussii</i> ^b	<i>P. parafulva</i> ^b	<i>P. umsongensis</i> ^b
<i>P. cichorii</i> ^a	<i>P. koreensis</i> ^b	<i>P. pelti</i> ^b	<i>P. vancouverensis</i> ^a
<i>P. cissicola</i> ^b	<i>P. libanensis</i> ^a	<i>P. pertucinogena</i> ^a	<i>P. veronii</i> ^a
<i>P. citronellolis</i> ^a	<i>P. lini</i> ^b	<i>P. pictorum</i> ^c	<i>P. viridiflava</i> ^a
<i>P. congelans</i> ^b	<i>P. lundensis</i> ^a	<i>P. plecoglossicida</i> ^b	<i>P. vranovensis</i> ^b
<i>P. corrugata</i> ^a	<i>P. lurida</i> ^b	<i>P. poae</i> ^b	<i>P. xanthomarina</i> ^b
<i>P. costantinii</i> ^b	<i>P. lutea</i> ^b	<i>P. pohangensis</i> ^b	<i>P. xiamenensis</i> ^b
<i>P. cremoricolorata</i> ^b	<i>P. luteola</i> ^a	<i>P. proteolytica</i> ^b	<i>P. xinjiangensis</i> ^b

a: espèces incluses dans le Bergey's Manual (Palleroni, 2005); b: espèces décrites après la publication du Bergey's Manual (2005) ; c: espèces décrites avant la publication du Bergey's Manual (2005) qui n'ont pas été incluses dans cette édition mais dont les noms sont validés (d'après Euzéby, 2008 in Peix *et al.*, 2009).

1.2.2.2. Études chémo-taxonomiques

Parmi les caractéristiques utilisées dans la taxonomie des *Pseudomonas*, l'utilité des études chémo-taxonomiques a été prouvée à maintes reprises, dans la reclassification des espèces (Peix *et al.*, 2009).

La présence de certains lipides polaires comme le phosphatidyl-glycerol, diphosphatidyl-glycerol et la phosphatidyl-éthanolamine (Camara *et al.*, 2007), les ARN stable (5S rRNA et tRNA) de faible poids moléculaire (Höfle, 1988, 1990), les systèmes quinones, en plus d'autres marqueurs ont été utilisés dans la reclassification de certains genres de *Pseudomonas* dans d'autres genres (Kampfer *et al.*, 2008).

Auling *et al.* (1991) ont contribué à différencier les espèces de ce groupe en étudiant la composition en polyamine chez les *Protéobacteria*. Janse *et al.* (1992), avaient analysé les acides gras d'une collection de phytopathogènes opportunistes, pour clarifier la position taxonomique de souches de *P. marginalis* incluses dans le groupe de *P. fluorescens*.

Jean-Marie Meyer et ses collaborateurs, ont utilisé le sidérotypage pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents d'abord, et ensuite pour les non fluorescents. Cette approche taxonomique, est basée sur la caractérisation iso-électrophorétique des sidérophores et pyoverdines; et la détermination de la spécificité des pyoverdines pour les souches productrices. Ceci a permis la caractérisation des espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de pyoverdines spécifiques aux espèces (Meyer *et al.*, 2002, 2007).

Delorme *et al.*, (2002) et Ramette *et al.* (2011), l'ont utilisé pour la classification et reclassification des espèces de *Pseudomonas*. Le pouvoir de résolution et l'exactitude de cette nouvelle technique taxonomique a été améliorée par la détermination de la masse moléculaire des pyoverdines par spectroscopie de masse (Meyer *et al.*, 2008).

Actuellement, les techniques les plus modernes d'analyse des biomolécules sont appliquées pour la taxonomie des *Pseudomonas*. En effet, l'empreinte génétique par spectroscopie à fluorescence (spectres d'émission de fluorophores intrinsèques: NADH, tryptophane et un complexe d'acides aminés aromatiques et d'acides nucléiques), a permis une discrimination entre les genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* ou *Stenotrophomonas* avec une grande sensibilité. Mais aussi, entre les espèces de *P. chlororaphis*, *P. lundensis*, *P. fragi*, *P. taetrolens* et *P. stutzeri* groupé séparément de *P. putida*, *P. pseudoalcaligenes* et *P. fluorescens*, correspondant aux classes phylogénétiques obtenues par Anzai *et al.* (2000) et Tourkya *et al.* (2009).

Malgré la pertinence de ces approches chémo-taxonomique avec les études phénotypiques et écologiques, toutefois c'est le séquençage des gènes qui a permis des avancées majeures dans la taxonomie des bactéries, et par la même celle des *Pseudomonas*.

1.2.2.3. Caractérisations génétiques

Les gènes ribosomaux sont présents chez tous les organismes, et possèdent la même fonction vitale : la synthèse protéique. Ces caractéristiques font des ribosomes d'excellents candidats d'études pour les taxonomistes. En effet ces molécules possèdent un niveau d'évolution assez élevé pour assurer une variabilité entre les différentes espèces ; mais avec un degré de conservation suffisant pour assurer que ces différences correspondent à des catégories taxonomiques stables comme les genres et les espèces.

Parmi tout les ARN ribosomaux seul le gène ARNr16S remplit ces deux caractéristiques, le gène ARNr23S est extrêmement conservé alors que le gène ARNr5S est trop petit (Peix *et al.*, 2009). C'est pour cela que le gène ARNr16S est devenu la molécule clé sur laquelle est basée la classification des procaryotes, incluant celle des *Pseudomonas* (Anzai *et al.*, 2000; Palleroni, 2005).

Parfois l'analyse du gène ARNr16S ne permet pas la différenciation entre des espèces très proche. D'autres gènes ayant démontré leur importance pour la différenciation entre les espèces ont été analysés. Ces gènes nommés gènes de ménage : *recA* (recombinase A), *rpoD* (facteur σ^{70} de l'ARN polymérase), *gyrB* (sous unité β de l'ADN gyrase), *rpoB* (sous unité β de l'ARN polymérase), ont permis la différenciation des espèces de *Pseudomonas* (Hilario *et al.*, 2004). En effet, la discrimination entre des espèces très proches de *Pseudomonas* est obtenue par l'analyse du gène *rpoB*.

L'arbre phylogénétique obtenu avec ce gène donne une résolution 3 fois plus importante que celui obtenu avec le gène ARNr16S (Ait-Tayeb *et al.*, 2005). Et pourtant c'est le gène ARNr16S, qui a permis la différenciation des sous espèces de *P. chlororaphis* (Peix *et al.*, 2007). Cependant, l'analyse des gènes de ménage n'est pas communément utilisée dans la description des espèces de *Pseudomonas*. Et seulement, la description des gènes *rpoD*, *gyrB*, *rpoB* a été incluse dans des descriptions récentes de *Pseudomonas*: chez *P. xiamenensis* (Lai et Shao, 2008), chez 107 espèces de référence de *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2010), et chez *P. syringae*, *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* (Ramette *et al.*, 2011).

Un autre marqueur phylogénétique a été utilisé dans les études taxonomiques, il s'agit des ITS (intergenic spacer), région située entre ADNr 16S-23S. Cette séquence présente une grande variabilité tant du point de vue taille que séquence, permettent ainsi une distinction entre des espèces très proches (Gurtler et Stanisich, 1996).

Des protocoles spécifiques utilisant des amorces universelles, ont été désigné pour analyser cette séquence chez les *Pseudomonas* environnementaux (Locatelli *et al.*, 2002).

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

2. DISTRIBUTION ECOLOGIQUE ET ROLE DU GENRE *PSEUDOMONAS*

2.1. DISTRIBUTION ECOLOGIQUE

Les espèces de *Pseudomonas* décrites durant la dernière décennie montrent que c'est l'un des genres bactériens les plus ubiquistes dans le monde, et différents espèces ont été isolées de niches écologiques diverse. En effet, *P. plecoglossicida* est un pathogène de poissons (Nishimori *et al.*, 2000)); *P. salomonii* et *P. palleroniana* sont des espèces phytopathogènes (Gardan *et al.*, 2002); *P. simiae* a été isolé d'un échantillon clinique de singe (Vela *et al.*, 2006) et *P. costantinii* est un pathogène de champignons comestibles (Munsch *et al.*, 2002).

D'autres sont des bactéries associées aux racines, et ont été isolés de différentes plantes *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* isolés respectivement de plants d'ail et de riz (Achouak *et al.*, 2000). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (Peix *et al.*, 2003, 2004, 2005).

Certaines ont été isolés de la phyllosphère des plantes, c'est le cas de *P. lurida* de la phyllosphère de l'herbe (Behrendt *et al.*, 2007). Quelques espèces ont été isolées d'écosystèmes marins comme c'est le cas de *P. marincola* (Romanenko *et al.*, 2008), ou encore d'écosystèmes désertiques *P. duriflava* (Liu *et al.*, 2008), *P. guineae*, une bactérie psychro-tolérante du sol de l'antarctique (Bozal *et al.*, 2007), *P. thermotolerans*, qui peut croître à 55°C isolée d'échantillons animaux (Manaia et Moore, 2002).

Cette distribution mondiale semble être due à une adaptabilité physiologique et génétique élevée (Spiers *et al.*, 2000). La clé de cette adaptabilité de souches individuelles à de tels environnements, est la présence chez ce genre bactérien de nombreux îlots génomiques, c'est le cas de la souche *P. aeruginosa* PSE9 (Battle *et al.*, 2009).

2.2. LES *PSEUDOMONAS* SPP. FLUORESCENTS AGENTS DE BIOCONTROLE ET DE CROISSANCE DES PLANTES

La plupart des substances chimiques utilisées pour combattre les maladies en plus d'être dangereux pour l'homme, les animaux et les organismes bénéfiques ; persistent dans les écosystèmes naturels. Durant les trois dernières décennies, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été identifiées comme agents potentiels de biocontrôle, à l'encontre des phytopathogènes.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophyte sont les habitants type des sols agricoles et la rhizosphère des plantes, et sont impliqués dans de nombreuses interactions avec les plantes (Schroth *et al.*, 1992). Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, et sont responsable de la suppression des maladies fongiques dans les cultures. Ces *Pseudomonas* diminuent la sévérité de la maladie et stimulent la croissance des plantes comme le riz (Sakhivel et Gnanamanickam, 1987), le blé (Weller et Cook 1983), la pomme de terre (Kloepper *et al.*, 1980b), la canne à sucre (Suslow et Schroth 1982), le radis (Kloepper et Schroth 1978), le coton (Howell et Stipanovic 1980) et le manioc (Hernandez *et al.*, 1986).

Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été rapportés à la fois comme PGPR (plant growth promoting rhizobactéria), et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes (de Salmone *et al.*, 2001). *P. putida* (Scher et Baker, 1980), *P. aeruginosa* (Bano et Musarrat, 2003), *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998) et *P. cepacia* (Cattelan *et al.*, 1999). Toutefois, les *Pseudomonas* spp. fluorescents ne sont pas tous des antagonistes.

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat et Gardan, 1987). D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Sands et Rovira, 1971). Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération *in situ* relativement court (Garbaye, 1994), leur capacité à utiliser les exsudats de plantes comme nutriments (Lugtenberg *et al.*, 2002), et à chélater les ions ferriques (Garbaye, 1994).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connus pour leurs aptitude d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplan, mais sont aussi mobiles et prototrophes (de Weger *et al.* 1994), produisent des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch *et al.*, 1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim *et al.*, 1991; Neilsen *et al.*, 1998; Neilsen et Sorensen, 1999).

Ces capacités antagonistes et PGPR, sont dues à des mécanismes directs et indirects (Fig.2). Les mécanismes indirects utilisés par ces *Pseudomonas* spp. fluorescents, comprennent la production d'antibiotiques contre des bactéries pathogènes (Thomashow *et al.*, 1990), la réduction de fer disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982), la synthèse d'enzymes dégradant les paroi cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante.

Les mécanismes directs concernent, la séquestration du fer pour les plantes par les sidrophores. la production de phytohormones ou encore par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rendant ainsi le phosphore biodisponible (Salisbury, 1994), et diminuer les taux d'éthylène produits par la plante (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999). Ces bactéries sont capable d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et porte le nom d'ISR (van Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2001). Il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorhization, stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Garbaye, 1994).

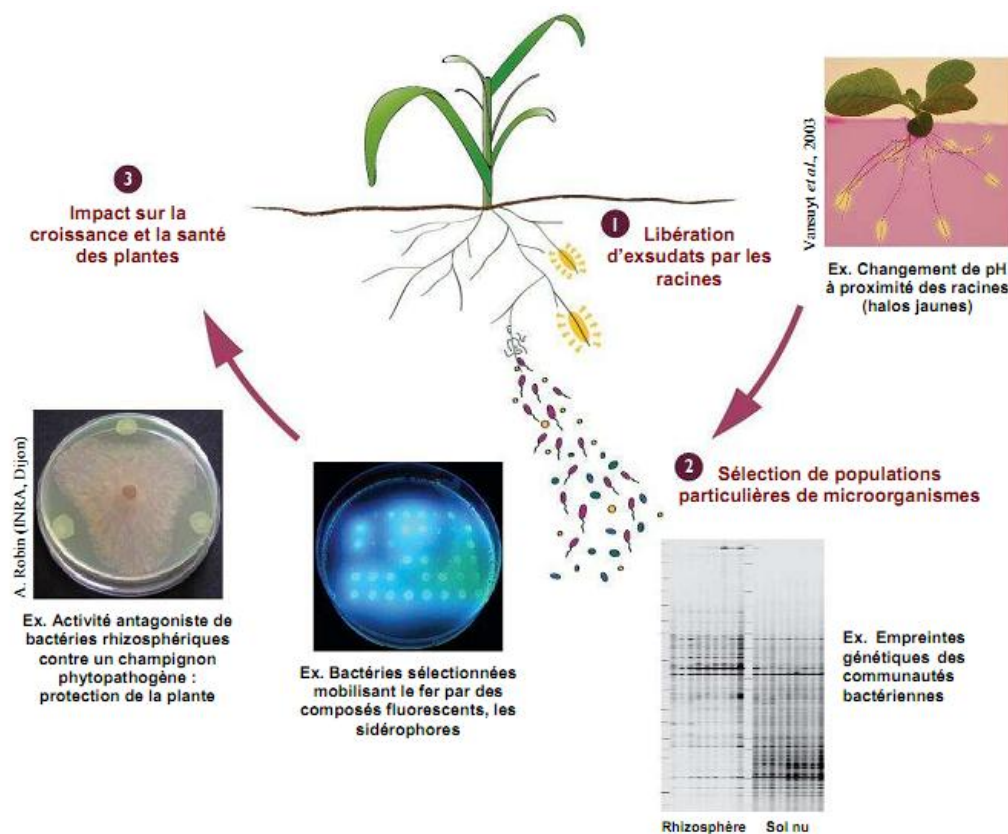


Figure 2. Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau *et al.*, 2006).

2.2.1. Stimulation de la croissance des plantes

2.2.1.1. Solubilisation des phosphates par les *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère, cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Kim *et al.*, 1998; Richardson, 2001). Les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. chlororaphis*, *P. putida* et *P. aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Cattelan *et al.*, 1999; Bano et Musarat, 2003).

2.2.1.2. Synthèse de phyto-hormones

a. Acide Indole-3-acétique (AIA)

Cette phytohormone est impliquée dans l'initiation de la division des cellules au niveau des racines, et de leurs élargissements (Salisbury, 1994). Communément produite par les rhizobactéries (Barazani et Friedman, 1999). Les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante. Patten et Glick (2002), ont rapporté le rôle de l'AIA produit par *P. putida*, chez la plante hôte, dans le développement de son système racinaire.

b. Cytokinines

Les cytokinines forment une classe de phytohormones qui stimulent les divisions cellulaires, l'élargissement et le développement des tissus (Salisbury, 1994). Ce sont des signaux impliqués dans la médiation du stress environnemental des racines vers les parties supérieures de la plante. La production de cytokinines a été rapportée chez *P. fluorescens* (Garcia *et al.*, 2001).

c. La 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

L'éthylène est la seule phytohormone gazeuse. Il est connu pour être l'hormone des blessures, parce que sa production dans la plante peut être induite par n'importe quel perturbation physique ou chimique des tissus (Salisbury, 1994). Parmi ses nombreux effets sur la croissance et le développement de la plante, la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines. Glick *et al.* (1998) ont émis une théorie selon laquelle le mode d'action de certains PGPR serait par l'intermédiaire d'une AAC-désaminase. Cette enzyme clive l'AAC précurseur immédiat de l'éthylène. L'AAC-désaminase diminuerait la production d'éthylène au niveau des racines de la plante hôte et résulterait en leurs allongements.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs d'AAC-désaminase (Glick *et al.*, 1994). La transformation des *Pseudomonas* spp. par des gènes codant cette enzyme, permet à celles-ci de croître sur un milieu dont la seule source de carbone et d'azote est le AAC, et de stimuler l'élongation des racine (Shah *et al.*, 1998). Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations (Grichko et Glick, 2001), ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Burd *et al.*, 1998; Belimov *et al.*, 2001).

2.2.1.3. Dénitrification

La dénitrification est un processus microbien dans lequel les oxydes d'azote sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons, pour la production d'énergie en absence d'oxygène. La dénitrification est composée de quatre réactions par lesquelles les nitrates sont réduits en di azote (N_2), par des métallo-enzymes comme la nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont les dénitrifiants les plus communs des sols des régions tempérées (Gamble *et al.*, 1977). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont capable de s'adapter au manque d'oxygène par l'utilisation des oxydes d'azote comme accepteurs alternatifs d'électrons (Stewart, 1988). La respiration sur nitrate et la réduction des nitrites sont impliquées dans la compétition des souches modèles de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol (Philippot *et al.*, 1995; Ghiglione, 2000).

2.2.1.4. Les médiateurs de l'absorption de fer par les *Pseudomonas* spp. fluorescents

La majorité des espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des sidérophores. Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes Fe^{3+} - sidérophore bactériens (Becker et Cook, 1988; Loper, 1988; Bitter *et al.*, 1991). Les sidérophores jaunes-verts sont només pyoverdines (PVDs) ou pseudobactines (Budzikiewicz, 1993, 1997). A côté de la PVD, *P. aeruginosa* produit un autre sidérophore nommé pyocheline avec une affinité plus faible pour le Fe^{3+} (Cox *et al.*, 1981). Les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent aussi la pseudomonine (isoxazolidone) comme *P. fluorescens*, *P. stutzeri* et *P. putida* (Lewis *et al.*, 2000; Mossialos *et al.*, 2000; Mercado-Blanco *et al.*, 2001).

2.2.2. Mécanismes d'antagonisme

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les paroi cellulaires. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (Fig.3).

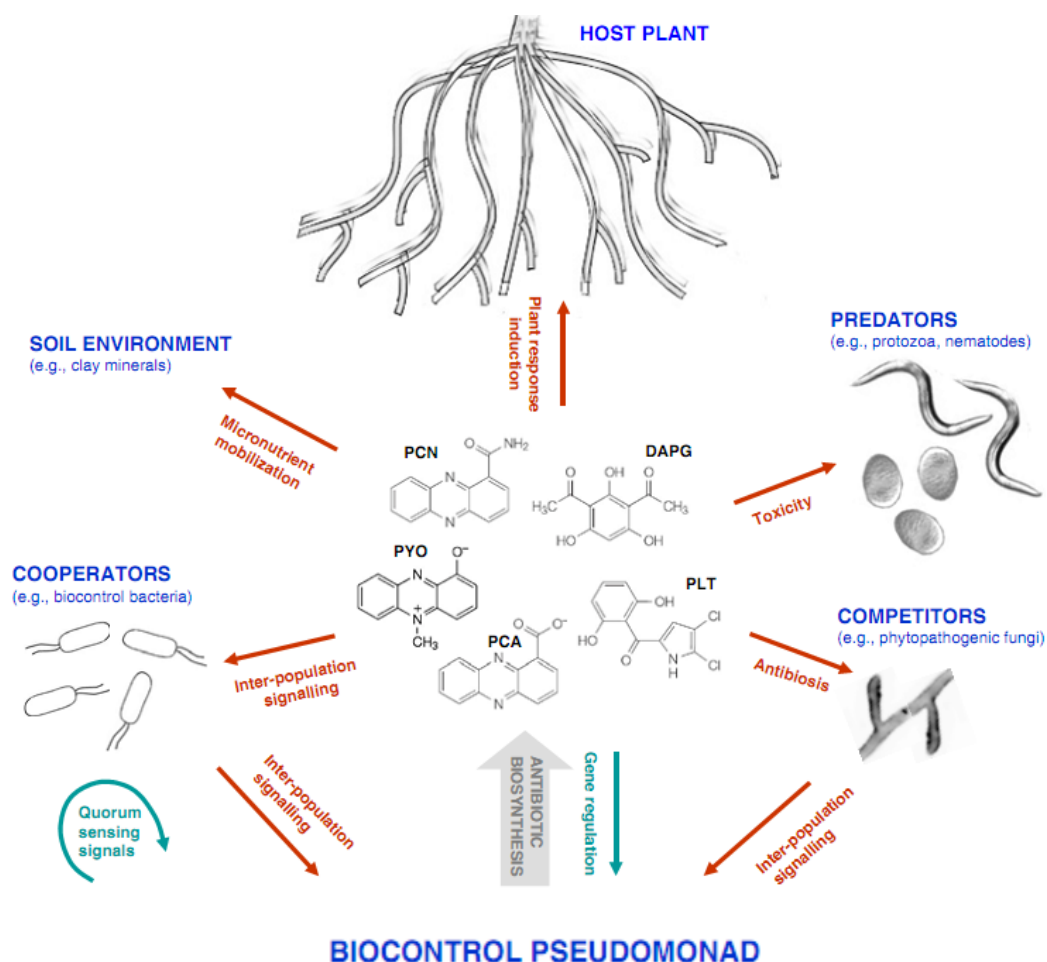


Figure 3. Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : *Pseudomonas* de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol (Dubuis *et al.*, 2007).

PCA : phénazine-1-carboxylate, PYO : pyocianine, PCN : phénazine-1-carboxamide, DAPG : 2-4, diacétyl phloroglucinol, PLT : pyolutéorine.

2.2.2.1. Métabolites Secondaires possédant des propriétés de biocontrôle

a. Les phénazines

Les phénazines sont des pigments hétérocycliques azotés intensément colorés, produits par différentes souches bactériennes (Leisinger et Margraff 1979; Budzikiewicz, 1993; Stevans *et al.*, 1994). Ces hétérocycles expriment un large spectre d'activité sur les bactéries et les champignons (Smirnov et Kiprianova, 1990). Les phénazines jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique, incluant la survie et la compétence des bactéries productrices (Mazzola *et al.*, 1992).

La phénazine-1-carboxylate (PCA), a été rapporté chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, comme *P. fluorescens* (Gurusiddaiah *et al.*, 1986), *P. chlororaphis* (Pierson et Thamashow, 1992) et *P. aeruginosa* (Anjaiah *et al.*, 1998).

L'efficacité de la PCA a été démontré contre un nombre de champignons phytopathogènes comme *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium* sp., *Polyporus* sp., *Rhizoctonia solani*, et les bactéries pathogènes comme *Actinomyces viscosus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia amylovora* (Gurusiddaiah *et al.*, 1986; Thomashow *et al.*, 1990).

La phénazine-1-carboxamide (PCN), a aussi été rapportée chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, tel que *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998; Mavrodi *et al.*, 2001). La PCN diffère du PCA par la présence du groupement carboxamide (CONH) au lieu du groupement hydroxyle sur le carbone 1 du noyau phénazine. Cette molécule est plus stable que la PCA, et exprime ses activités antifongiques même à pH alcalin (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998).

La pyocyanine (1-hydroxy-5methyl-phénazine), est prédominante chez *P. aeruginosa* (Demange *et al.*, 1989). Cette phénazine de couleur bleue est toxique pour une large gamme de bactéries et champignons (Hassan et Fridovich, 1980). Mais c'est aussi un facteur de virulence dans les infections opportunistes humaines (Price-Whelan *et al.*, 2006).

b. Phloroglucinols

Les phloroglucinols sont des antibiotiques à large spectre, produits par une large variété de souches bactériennes. Le 2,4-diacétyl phloroglucinol (DAPG) est aussi un antibiotique phénolique à large spectre d'action produit par *P. fluorescens* Pf-5 (Howell et Stipanovic, 1979), *P. fluorescens* F113 (Fenton *et al.*, 1992), *P. fluorescens* CHAO (Keel *et al.*, 1992) et *P. fluorescens* Q2-87 (Bangera et Thomashow, 1996).

Cet antibiotique possède aussi une activité herbicide, ressemblant à l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique (2, 4-D) un herbicide de post-émergence, pour le contrôle des mauvaises herbes des céréales, de la canne à sucre et d'autres plantations. Le DAPG induit aussi la résistance systémique chez les plantes, et joue donc le rôle d'un éliciteur des phytoaléxines (Dwivedi et Johri 2003).

c. Pyrrolnitrine (PRN)

La pyrrolnitrine (PRN) (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) un composé pyrrole, est produite par les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. fluorescens* (Kirner *et al.*, 1998) et *P. chlororaphis* (Elander *et al.*, 1968). La pyrrolnitrine a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole (Hammer *et al.* 1997, McSpadden Gardener et Fravel, 2002).

La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *R. solani*, *Verticillium dahliae*, *G. graminis* et *Fusarium oxysporum* (Howell et Stipanovic 1979, Homma *et al.*, 1989).

d. Pyolutéorine (PLT)

La pyolutéorine, un autre antibiotique produit par différents *Pseudomonas*. Les souches produisant la PLT sont à l'origine de la suppression de nombreuses maladies telluriques (Howell et Stipanovic 1980; Défago *et al.*, 1990; Maurhofer *et al.*, 1994). Cette molécule, isolée pour la première chez *P. aeruginosa*, est composée d'un anneau résocinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie pyrrole bichlorée (Nowak-Thompson *et al.*, 1997, 1999), possédant un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes, notamment *Pythium ultimum* (Maurhofer *et al.*, 1992).

e. Mupirocine

Plus connu comme l'acide pseudomonique, est un antibiotique polycétide naturellement présent chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents. La mupirocine produite par *P. fluorescens* NCIMB 10586, est d'une activité élevée contre *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries à Gram positif (El-sayed *et al.*, 2001). C'est un antibiotique largement utilisé dans les maladies tropicales (Carcanague, 1997).

f. Antibiotiques peptidique

Les antibiotiques peptidiques sont aussi bien produits par les bactéries à Gram positif (Katz et Demain, 1977) que celles à Gram-négatif (Dowling et O'Gara, 1994), par une synthèse multienzymatique non-ribosomique (Kleinkauf et Dohren, 1996). Récemment, il a été démontré que des *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des lipopeptides cycliques (CLPs). La tensine produite par *P. fluorescens* 96.578, a montré un effet potentiel sur le basidiomycète *R. solani* (Nielsen *et al.*, 2000). La Viscosinamide un autre lipopeptide cyclique produit par *P. fluorescens* DR54 (Nielsen *et al.*, 1999), est aussi actif sur *R. solani* par la réduction de la biomasse mycélienne et donc la formation de sclérotas (Thane *et al.*, 2000). L'Oomycin A est un antibiotique produit par *P. fluorescens* HV37a, est à l'origine de la suppression du damping-off du coton causé par *P. ultimum* (Gutterson *et al.*, 1988).

g. Enzymes dégradant les parois fongiques

L'excrétion d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliqué dans les attaques des champignons phytopathogènes (Martin et Loper 1999; Nielsen et Sorensen, 1998; Picard *et al.*, 2000).

La lyse des parois cellulaires, par les enzymes dégradatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue du mycoparasitisme. La Chitinase, la β -1,3 glucanase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives des composés des parois cellulaires tels que : la chitine, le β 1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981; Chet, 1987; Lorito *et al.*, 1996). Les microorganismes excréant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (Ordentlich *et al.*, 1988; Inbar et Chet, 1991). Le contrôle biologique de *Fusarium solani*, se fait essentiellement via les activités des laminarinase et chitinase chez *P. stutzeri* YPL-1 (Lim *et al.*, 1991). *P. cepacia* produisant la β -1,3 glucanase, réduit l'incidence des maladies causées par *R. solani*, *P. ultimum* et *Sclerotium rolfsii* (Fridlender *et al.*, 1993). Nielson *et al.* (1998) ont rapporté que dans la rhizosphère de la betterave à sucre, les *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibaient *R. solani* par production d'endochitinase.

2.2.3. Quorum Sensing(QS)

La production d'antibiotiques chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents est soumise à une régulation complexe. Les facteurs clés dans cette régulation sont des facteurs globaux et le QS (communication cellulaire). La régulation globale est médiée par les gènes *gacS* et *gacA* qui codent pour un système régulateur à deux composés. Le QS implique la production de molécules signales de N-acyl-homoserine lactone (AHL). Le système régulateur *gacS* et *gacA* contrôle aussi le QS, illustrant ainsi la complexité de la régulation de la production des antibiotiques chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Bassler, 1999). La molécule AHL du QS, est impliquée dans la régulation de la production d'antibiotiques chez: *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* (Pessi et Haas, 2001). Les gènes des facteurs signaux, *rpoD* et *rpoS* sont aussi impliqués dans le contrôle de la production de tels antibiotiques, et augmentent les activités antagonistes des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Des doses élevées du produit du gène *rpoD* peuvent stimuler directement ou indirectement la production d'antibiotiques chez *P. fluorescens* (Whistler *et al.*, 2000). D'autres formes de régulation globale ont été rapportées: le répresseur transcriptionnel *phlF* (Delany *et al.*, 2000) et le régulateur de l'ARN (*PrrB*) sur la production de métabolites secondaires (Aarons *et al.*, 2000).

3. BIOLOGIE DU FER CHEZ LES BACTERIES

3.1. PROPRIETES CHIMIQUES

Le fer est le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre. Parmi les métaux de transition ayant une relevance biologique (fer, zinc, cuivre, manganèse, cobalt, nickel, tungstène et le molybdène), le fer est le plus important des métaux dans le métabolisme cellulaire.

Cette prédominance peut être expliquée par la grande réactivité chimique de cet élément. Dans les systèmes biologiques, incorporé dans les protéines, le fer joue principalement le rôle de biocatalyseur ou de donneur d'électrons (Johnson, 2008). Les propriétés d'oxydo-réduction du fer lui permettent d'exister sous différents degrés d'oxydation (Fig 4) ; Fe^{2+} (ferreuse) et Fe^{3+} (ferrique) respectivement comme donneur et accepteurs d'électrons (Yeterian *et al.*, 2009).

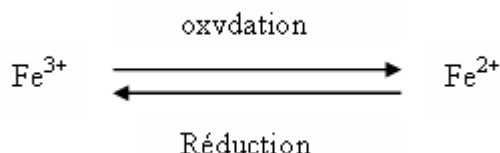


Figure 4. Oxydation et réduction du fer.

En dépit de son abondance, sa biodisponibilité est relativement faible dans les conditions d'aérobiose. En effet, en présence d'oxygène et à pH neutre, les ions ferreux sont rapidement oxydés en ions ferriques, qui précipitent sous forme d'oxy-hydroxydes polymériques insolubles (Ratledge et Dover, 2000). La solubilité de cet hydroxyde ferrique est relativement basse (de l'ordre de 10^{-18} M), la biodisponibilité du fer est donc limitée par la haute insolubilité du Fe^{3+} à pH physiologique (Lindsay, 1979).

Les ions ferriques possèdent six sites de coordination, qui permettent la formation de complexes Fe^{3+} octaédriques hétéroatomés. En conditions physiologiques, le fer existe dans un des deux états redox facilement convertible, sa forme réduite ferreuse ou sa forme oxydée ferrique.

La capacité de transfert d'électrons est modifiée par l'environnement ligand dans lequel le fer est incorporé. En effet une large gamme de potentiels redox des composants contenant du fer allant de +300mV à -500mV. Ces propriétés font du fer un composant prosthétique extrêmement versatile, particulièrement utile dans les systèmes biologiques (Guerinot, 1994).

3.2. PROPRIETES BIOLOGIQUES

Le fer est un micronutriment indispensable pour pratiquement tous les organismes vivants (sauf les bactéries lactiques qui utilisent le cobalt et le manganèse ; Weinberg, 1997). En effet, le fer est un constituant essentiel des enzymes, cruciales pour de nombreux processus biologiques tels que : la photosynthèse, la respiration, le transfert d'électrons, le cycle tri-carboxylique, le transport et le métabolisme de l'oxygène, la régulation génique, et la biosynthèse d'acides nucléiques (Braun, 1997 ; Andrews *et al.*, 2003). Seul ou incorporé, le fer sert de centre catalytique ou de cofacteur essentiel d'enzymes pour des réactions redox.

Ainsi, il est communément admis que de nombreuses bactéries requièrent une concentration minimale de fer bio disponible, supérieur à 10^{-6} M, pour une croissance optimale (Guerinot, 1994). La concentration en fer libre dans les environnements terrestres et aqueux, en conditions aérobies et à pH neutre, sont situés approximativement entre 10^{-9} et 10^{-18} selon le milieu (Chipperfield et Ratledge, 2000 ; Ratledge et Dover, 2000). En conséquence les concentrations environnementales en ion ferrique sont très basses pour que les microorganismes puissent survivre en utilisant seulement le fer libre. Pour récupérer le fer nécessaire à leur croissance, les bactéries ont développé de nombreuses stratégies pour récupérer le fer de sources différentes. Notamment, la réduction du fer ferrique en fer ferreux, ou le transport du fer de l'environnement par les sidérophores (Wandersman et Delepelaire, 2004).

3.3. L'HOMEOSTASIE DU FER

L'homéostasie du fer est maintenue par une balance délicate. C'est pourquoi, une supplémentation suffisante en fer permet de prévenir sa cyto-toxicité. Des stratégies de régulation pour un contrôle minutieux de la fixation, l'utilisation et le stockage de fer ont été retrouvées chez des organismes diversifiés (Expert, 1999).

A l'inverse, l'excès de fer pourrait être délétère. En effet, et selon Halliwell et Gutteridge (1992) la forme libre (ferreuse) catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène, générant des hydroxyles hautement réactifs, via la réaction de Fenton (Fig. 5).

Les radicaux hydroxyles ainsi produits attaquent les membranes et l'ADN, pouvant entraîner la mort de la cellule (Storz et Imlay, 1999 ; Hantke et Braun, 2000).



Figure 5. Réaction de Fenton

L'homéostasie du fer est finement contrôlée, assurant son acquisition, stockage et sa disponibilité, pour que les concentrations intracellulaires n'atteignent pas des niveaux toxiques (Andrews *et al.*, 2003). Pour cela, il existe chez les bactéries et à différents niveaux des processus biologiques cellulaires, des systèmes de régulation (Massé et Arguin, 2005).

3.3.1. La protéine FUR

Chez les bactéries Gram négatifs, le facteur de régulation FUR (Ferric Uptake Regulator) joue un rôle central dans le contrôle de l'acquisition du fer, par une régulation génique à la fois positive et négative (Hantke, 2001).

Lorsque le fer intracellulaire atteint un niveau trop élevé, FUR réprime plusieurs gènes impliqués dans l'acquisition du fer. En effet, la protéine FUR liée à son corépresseur le Fe^{2+} , peut se fixer à une séquence cible (boîte FUR) située dans une région promotrice des gènes cibles et réprimer ainsi leur transcription (Escobar *et al.*, 1999). Le fer ferreux est nécessaire à la dimérisation de la protéine FUR puis sa liaison à la séquence consensus. Lorsque cet ion tend à manquer, FUR se trouve sous une forme d'apoprotéine, qui ne peut plus être dimérisée, ne pouvant se fixer à l'ADN, permettant ainsi la transcription des gènes cibles (Jacquemet *et al.*, 1998; Althaus *et al.*, 1999). Par ce mécanisme FUR peut moduler l'expression de nombreux gènes (Hantke, 2001).

Plus de 90 gènes différents décrits chez des espèces d'*Escherichia coli* sont contrôlés, par FUR et par le fer. Parmi ces gènes : 60 sont impliqués dans la synthèse et le transport des sidérophores ; 18 gènes codent des protéines cytoplasmiques impliqués dans le métabolisme (exemple : aconitase), protéine du métabolisme du fer (bactério ferritine), protéine du stress (superoxyde dismutase [SodB]) ; et 13 pour des facteurs de virulence, comme les colicines et hémolysines. L'expression de certains de ces gènes est positivement régulée par FUR (Hantke, 2001).

Dans certains cas, FUR va aussi pouvoir contrôler indirectement les systèmes d'assimilation du fer via la régulation de l'expression de trois types d'activateurs : deux composés clé du système de transduction, le régulateur AraC-like de la synthèse de sidérophores et leurs systèmes de capture, et le facteur sigma (σ -ECF) de fonction extracytoplasmique (Hantke, 2001 ; Michel *et al.*, 2005 ; Braun *et al.*, 2006).

Dans le génome de la souche PAO1 de *P.aeruginosa*, parmi les 19 gènes codant pour les facteurs σ -ECF (Llamas *et al.*, 2008 ; Potvin *et al.*, 2008), 10 sont peut-être régulés par FUR (van Oeffelen *et al.*, 2008).

De nombreux gènes sont aussi régulés positivement par FUR, par un contrôle post transcriptionnel de leurs ARN messagers via de petits ARN non codant (Massé *et al.*, 2003b). La protéine FUR est autorégulée par FUR et le Fe^{2+} . Un site de liaison pour la protéine répresseur cAMP-catabolite dans la région promotrice de *fur*, permet de lier l'expression de *fur* au métabolisme cellulaire (Escobar *et al.*, 1999). Zheng *et al.* (1999) furent les premiers à rapporter la régulation de FUR par le stress oxydatif.

3.3.2. Les facteurs σ -ECF

Les facteurs σ alternatifs, se lient au cœur de l'ARN polymérase, fournissent un moyen de régulation de l'expression des gènes, en réponse aux variations extracellulaires (Potvin *et al.*, 2008).

L'une des classes de ces facteurs σ , contrôle plusieurs fonctions incluant la capture de fer chez *E. coli* et *Pseudomonas* spp., l'efflux de cobalt et de nickel chez *Alcaligenes europa* (renommé actuellement *Cupriavidus necator*), phytopathogénèse chez *P. syringae* et la synthèse de protéines extra-membranaires chez *Photobacterium* sp. souche SS9 (Missiakas et Raina, 1998). Toutes ces fonctions sont en accord avec le facteur σ -ECF. La plupart sinon tous les gènes codant le facteur σ -ECF sont eux-mêmes contrôlés par un gène anti- σ , et de plus sont fréquemment liés aux gènes contrôlant les récepteurs protéiques extracellulaires impliqués dans le transport des complexes ferri-sidérophore. Parmi ces σ -ECF, deux ont été étudié en détail il s'agit des facteurs de virulence (HrpL et AlgT) de *P. syringae* (Oguiza *et al.*, 2005).

En conditions de carence en fer, la liaison du ferri-sidérophore à son récepteur de membrane externe déclenche une cascade de signalisation qui permet de dissocier le facteur σ -ECF de son facteur anti- σ , et l'activation des gènes impliqués dans la synthèse et l'acquisition de sidérophores (Ochsner *et al.*, 2002). Alors que dans des conditions suffisantes en fer, la transcription de ces σ -ECF est réprimée (Leoni *et al.*, 1996).

3.3.3. Petits ARN non-codants

De nouvelles voies, permettant un contrôle du métabolisme du fer chez les bactéries, ont été récemment élucidées (Massé *et al.*, 2007). Ainsi un petit ARN non-codant appelé *rhyB*, a été impliqué dans la régulation post transcriptionnelle e gènes de protéines utilisant le fer chez *E. coli* (Massé et Arguin, 2005). *rhyB* va s'apparier aux ARN messagers de gènes positivement régulés par FUR et empêcher leur traduction par atténuation (Massé *et al.*, 2003a). Ce mécanisme permet d'assurer que, en conditions de carence, les rares ressources de fer soient allouées aux fonctions cellulaires cruciales (Jacques *et al.*, 2006). Chez *P. aeruginosa*, une approche bioinformatique a permis d'identifier deux tandems de petits ARN non codants, candidats pour être des homologues fonctionnels de *rhyB* (Wilderman *et al.*, 2004).

3.4. LES SIDEROPHORES

Le mot sidérophore, issu du grec, signifie sidêros : fer et phore : porteur. L'utilisation des sidérophores représente chez les bactéries l'un des systèmes les plus efficaces pour l'acquisition du fer.

3.4.1. Définition

Les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, compris entre 200 et 2000 daltons, dont le rôle set de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (Neilands, 1995).

3.4.2. Caractéristiques

La caractéristique majeure des sidérophores est leur très haute affinité pour les ions ferriques. En effet, l'entérobactine a une constante d'affinité de 10^{-49} M. Cette chélation se fait par des hétéroatomes oxygénés et azotés, hautement électronégatifs, susceptibles d'entrer en interaction avec des ions métalliques (Hay *et al.*, 2001).

Les sidérophores sont synthétisés et sécrétés pour la solubilisation d'ions ferriques par des microorganismes aérobies, tels que les bactéries, certains champignons mais aussi organismes supérieurs (certaines plantes monocotylédones) en réponse à des conditions de carence en fer (Ratledge et Dover, 2000).

Les quelques exceptions sont les bactéries anaérobies et quelques levures comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, et *Cryptococcus neoformans* (Neilands *et al.*, 1987; Lesuisse et Labbe, 1989; Howard, 1999). Toutefois, ces levures peuvent utiliser les sidérophores produits par d'autres organismes (Neilands, 1995).

Les sidérophores sont très importants pour la croissance et la survie des bactéries dans le sol et les environnements aqueux (Guerinot, 1994). Dans la rhizosphère, la concentration des sidérophores est estimée de quelques micro molaires à quelques milli molaires (Hersman *et al.*, 1995). Les sidérophores sont aussi importants pour la virulence de nombreux pathogènes dans les modèles animaux des maladies (Ratledge et Dover, 2000). Ils servent de molécules signal contrôlant l'expression pour la production du sidérophore lui-même, mais aussi pour la production d'autres facteurs de virulence (Lamont *et al.*, 2002; Visca *et al.*, 2002).

Après sécrétion par la bactérie, les sidérophores chélatent avec une haute affinité le fer dans l'environnement extracellulaire, et le transportent via des voies d'assimilation spécifiques (Krewulak et Vogel, 2008).

3.4.3. Classification des sidérophores

Actuellement plus de 500 composés de structures chimiques différentes ont été définis comme sidérophores. Ils sont toujours caractérisés par un, deux ou trois groupes chélatants bidentés, généralement oxygénés, cruciaux pour la formation de complexes octédriques hétérocoordonnés très stables entre le sidérophore et le fer ferrique, qui permettront de capter le fer. Par contre la nature des groupements chimiques chélatant le fer est assez restreinte (Winkelmann, 2002).

Ainsi les sidérophores peuvent être classifiés selon les groupes fonctionnels qu'ils utilisent comme ligands du fer (Winkelmann, 2002 ; Miethke et Marahiel, 2007).

Ces groupes peuvent être des : catécholates, hydroxamates, carboxylates ou des phénolates (Fig. 6). On trouve plus rarement des hydroxyacides comme la rhizobactine. Du fait de la forte oxygénation des groupes chélatants, le Fe^{3+} , est plus oxophile que le Fe^{2+} , reste la forme de fer pour laquelle le sidérophore a généralement la plus grande affinité. Les sidérophores peuvent être composés de groupes chélatant identiques, mais sont plus fréquemment mixtes. La stœchiométrie sidérophore : fer est variable, et est fonction du nombre de groupes chélatant portés par le sidérophore (Miethke et Marahiel, 2007).

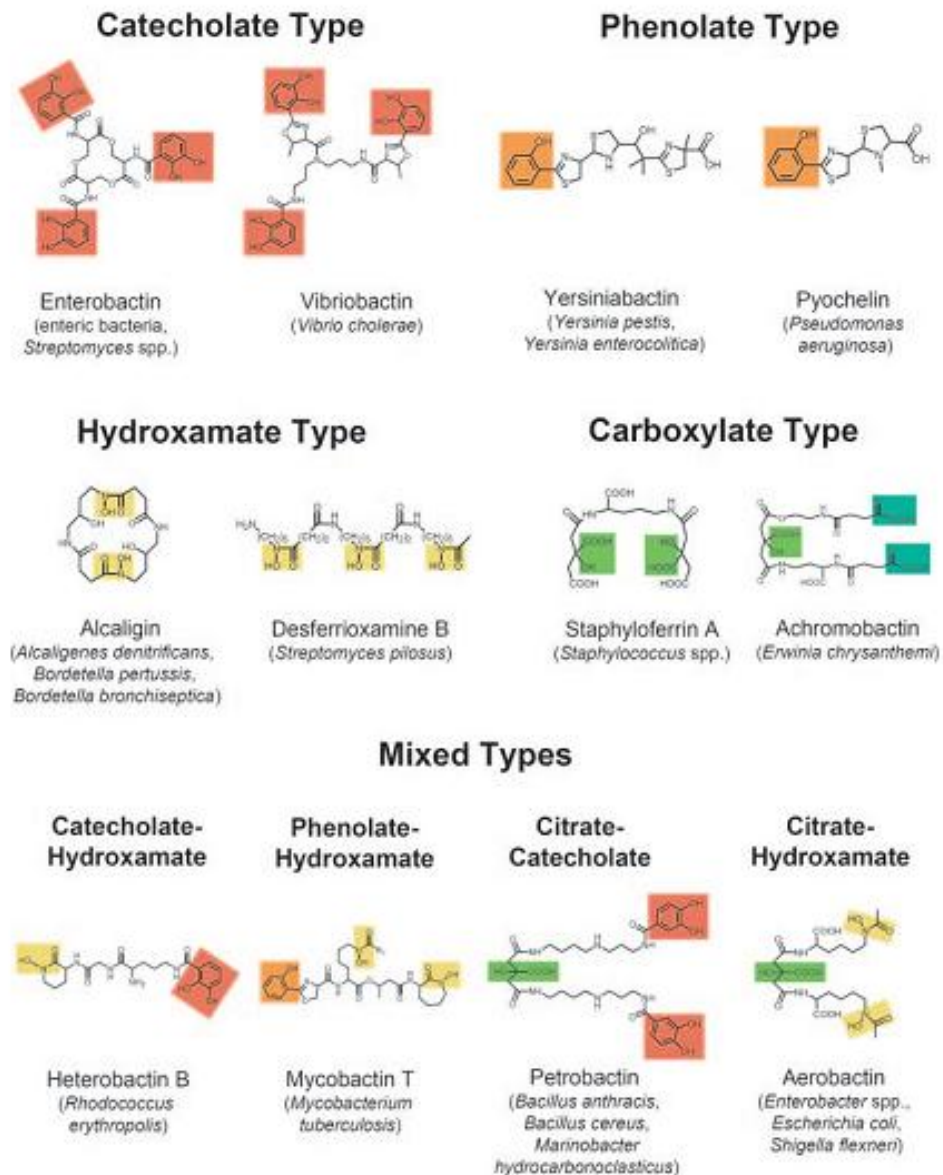


Figure 6. Exemples de Sidérophores classés selon leurs groupements fonctionnels (d'après Miethke et Marahiel, 2007).

En rouge: catécholates; en orange: phénolates; en jaune pâle : hydroxamates; α -hydroxy-carboxylates (derivant des unités citrate) : en vert clair ; α - céto-carboxylates (derivant des unités 2-oxo-glutarate) : bleu-vert.

CHAPITRE II
ISOLEMENT ET IDENTIFICATION
DES *PSEUDOMONAS*

1. INTRODUCTION

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents forment un groupe diversifié de bactéries qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert soluble dans l'eau (Palleroni *et al.*, 1973) qui sont les pyoverdines produites dans des milieux pauvres en fer (Palleroni, 1984). Ce sont des bacilles à Gram négatifs typiques, chimiohétérotrophes mobiles avec un flagelle polaire et sont regroupés au sein d'un même groupe d'homologie rRNA I (Palleroni *et al.*, 1973). Le groupe inclus des espèces importantes pour la biodégradation de divers composés (Johnsen *et al.*, 1996 ; Heinaru *et al.*, 2000), la production de métabolites utiles (Palleroni, 1992). Quelques espèces sont des agents pathogènes des animaux et végétaux (Gardan *et al.*, 1992), par contre d'autres peuvent stimuler la croissance des plantes (Kloepper *et al.*, 1980b) et contrôler les maladies telluriques (Weller, 1988). Le groupe auquel on s'intéresse appartient à cette dernière catégorie.

P. fluorescens est communément retrouvé dans le sol et dans l'eau, associé aux plantes, certains spécimens sont cliniques, ces espèces peuvent être subdivisées en 5 biovars : **I II III IV et V** (Stanier *et al.*, 1966). *P. putida* communément isolé du sol et de l'eau, est divisée en 3 biovars **A, B** (Stanier *et al.*, 1966 ; Palleroni, 1984, 2005), un d'importance mineur **C** (Barrett *et al.*, 1986). Ces travaux conduits sur la taxonomie de *P. fluorescens* et de *P. putida* montrent que la définition de ces espèces est obsolète, et qu'elles devraient être divisées en plusieurs nomenspecies (Bossis *et al.*, 2000). La clarification de la taxonomie de *P. fluorescens* (Couillerot *et al.*, 2009; Palleroni, 2010) et de *P. putida* requiert des recherches complémentaires qui associent des méthodes phénotypiques récentes, et génotypiques (Palleroni, 2010).

P. chlororaphis est retrouvé dans le sol, l'eau ou associé aux plantes, les souches de cette bactérie ont été historiquement subdivisés en deux espèces : *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens*, mais sont actuellement classées dans le même groupe d'espèces (Johnson et Palleroni, 1989). *P. aurantiaca* qui fût rattaché par Palleroni (1984) au groupe rRNA V, est en fait un synonyme hétérotypique éloigné de *P. chlororaphis* (Hilario *et al.*, 2004). Peix *et al.* (2007) ont regroupés ces bactéries dans le même groupe d'espèces de *P. chlororaphis*. Désormais, ces bactéries en seraient respectivement les sous espèces: *P. chlororaphis* sp. *chlororaphis*, *P. chlororaphis* sp. *aureofaciens* sp. nov., comb.nov. et *P. chlororaphis* sp. *aurantiaca* sp. nov., comb.nov.

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

La diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents en milieu riche en matière organique permet de compenser le handicap lié à l'absence de formes de conservation développées par d'autres groupes bactériens tels que les *Bacillus* par exemple (Latour et Lemanceau, 1997). Les bactéries appartenant à ces espèces présentent en effet un intérêt potentiel pour l'environnement, et contribuent à réduire l'utilisation d'intrants de synthèse en agriculture.

Dans ce chapitre, l'étude de la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents rhizosphériques a été effectuée après isolement, purification et identification préliminaire des populations bactériennes. Cette analyse phénotypique et taxonomique a portée sur une collection d'isolats appartenant à un même biotope. Le biotope se définit par les caractéristiques pédo-climatiques de la région et le type de plante.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Dans un but d'échantillonnage et l'obtention de souches de *Pseudomonas* de la zone rhizosphérique de plantes, les échantillons ont été prélevés dans différents lieux de la Wilaya de Sétif et la Wilaya de Bordj Bouareridj, effectuées entre 2000 et 2009. Ces régions ont été choisies sur la base de leurs vocations agricoles. Chaque environnement représenté par la région (sol) et sa culture (plante) a été considéré comme un biotope, sur cette base, deux biotopes, sources des prélèvements, ont été définis:

- (i)- Cultures de pomme de terre, dans le site Dirou (à proximité de la station de l'ITGC) à vocation maraîchère et des cultures de pomme de terre à Ras el oued.
- (ii)- Sol nu ayant servi à une culture de pomme de terre (récoltée depuis 1mois) Mechta Zarouel Ain azel, ainsi qu'un sol nu ayant servis pour les cultures de pomme de terre à Ain zeda.

Les systèmes racinaires entiers ou partiels ont été récupérés avec la masse de sol adhérent. Pour le sol nu, les prélèvements ont été effectués à des profondeurs de 10 à 15 cm.

De chaque biotope, 1 à deux échantillons (100 à 150g) sont prélevés aseptiquement et sont ensuite transportés au laboratoire et conservés à 4°C en vu de leurs analyses.

2.2. DETERMINATION DES ISOLATS BACTERIENS

Pour la détermination des genres et espèces bactériennes, on a utilisé les méthodes basées sur: les caractéristiques morpho- physiologiques et donc phénotypiques. Et aussi la caractéristique génétique et moléculaire, où l'on a étudié le segment d'ADN correspondant à l'ARN 16S par séquençage de cette dernière chez 2 souches des bactéries étudiées.

2.2.1. Méthode d'isolement

L'isolement des bactéries appartenant aux *Pseudomonas* du sol rhizosphérique a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions décrite par Vidhyasekaran *et al.* (1997). Les racines sont d'abord débarrassées de la terre facilement détachable, ensuite de chaque échantillon sont récupérés 10 g du sol adhérent aux racines.

Les échantillons sont suspendus dans 100 ml d'eau physiologique stérile, et sont agités pendant 15 mn, pour récupérer les bactéries de la rhizosphère; dans le cas du sol non cultivé, 10 g. de sol pris à une profondeur de 15cm ont été mis en suspension dans 100 ml de la même solution tampon (Tamietti et Pramotton, 1990).

Ces dernières suspensions serviront à isoler les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* après décantation des différentes suspensions.

Une série de suspensions-dilutions au 1/10^{ème} est réalisée à partir de chaque échantillon (biotope). Pour chaque analyse, 2 suspensions-dilutions sont réalisées à partir d'échantillons différents, on a alors procédé à deux types d'isolement :

(i)- le premier a consisté à étaler 100µl de chaque suspensions-dilutions en boîtes de Pétri contenant 10ml du milieu B de King *et al.*(1954).

(ii)- le second a consisté à étaler 100µl de chaque suspensions-dilutions sur un front (moitié) en boîtes de Pétri contenant soit : 10ml du milieu B de King *et al.*(1954) soit du Potato Dextrose Agar (PDA), alors que le second front est inoculé par un disque de 6 mm de diamètre issue d'une colonie fongique phytopathogène d'une semaine, avec pour témoin des boîtes ensemencées sur un front par un disque fongique (Vidhyasekaran *et al.*, 1997).

Après 48 h, d'incubation on a repéré les souches fluorescentes (celles produisant un pigment fluorescent) soit à l'œil nu, soit en utilisant une lampe UV (366nm), sur milieu B de King. Alors que, les souches de *Pseudomonas* fluorescents efficaces sont repérées après inhibition des champignons en boîtes co-inoculées. Après avoir choisi les souches vient alors l'étape de purification par étalement en strie sur KB.

2.2.2. Conservation des isolats

Les souches bactériennes individualisées fluorescentes sont repiquées dans des tubes contenant un milieu KB additionné de glycérol (25%), et après croissance à 28°C, elles sont conservées à -20°C. On effectue un repiquage tout les 6 mois.

2.2.3. Identification phénotypique des isolats

L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques (morphologie cellulaire), la coloration de Gram, la mobilité, la recherche de la catalase et de l'oxydase, arginine dihydrolase, voie d'utilisation du glucose, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques selon: Holt *et al.* (1994) et Bossis *et al.* (2000).

Les caractéristiques spécifiques et intra spécifique ont été réalisées selon le schéma (Fig.7) de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens / putida* proposé par Digat et Gardan (1987) et les clés dichotomiques (Fig.8 A et B) proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes.

Les principaux milieux représentés par l'Annexe I, ont été utilisés pour les tests tels que :

- Production des pigments sur King B (KB).
- Croissance à 41° et à 4° C.
- La lyse de la gélatine et celle du Tréhalose (Lyse de la gélatine et du Tréhalose)
- Utilisation du géraniol et Mésos- Inositol.
- Utilisation des sucres: D mannose, D fructose, amidon, mannitol, arabinose, lactose, ribose, raffinose, D glucose.
- Utilisation des acides aminés: L valine, β alanine, L arginine.
- Utilisation des acides organiques: citrate, acétate, lactate, succinate et malate.
- Identification par l'utilisation des plaques API 20 Ne, selon les recommandations de Biomerieux Marcy l'étoile France.

Hormis les tests où l'on mentionne les conditions de culture et d'incubation, tous les tests ont été effectués avec des cultures en phase de croissance (18 à 24h) sur gélose nutritive (NA, nutrient agar) et incubés à 28° C. Les suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau physiologique stérile ou dans une solution tampon ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mM, pH7) selon les techniques de Lelliot et Stead (1987). Les concentrations des suspensions bactériennes ont été déterminées par photométrie, en déterminant l'absorbance des cultures à 625nm. Pour une concentration de l'ordre 10^7 - 10^8 cellule/ml, une absorbance de l'ordre de 0.08 à 0.1 équivaut 0,5 Mc Farland (Ausubel *et al.*, 1991).

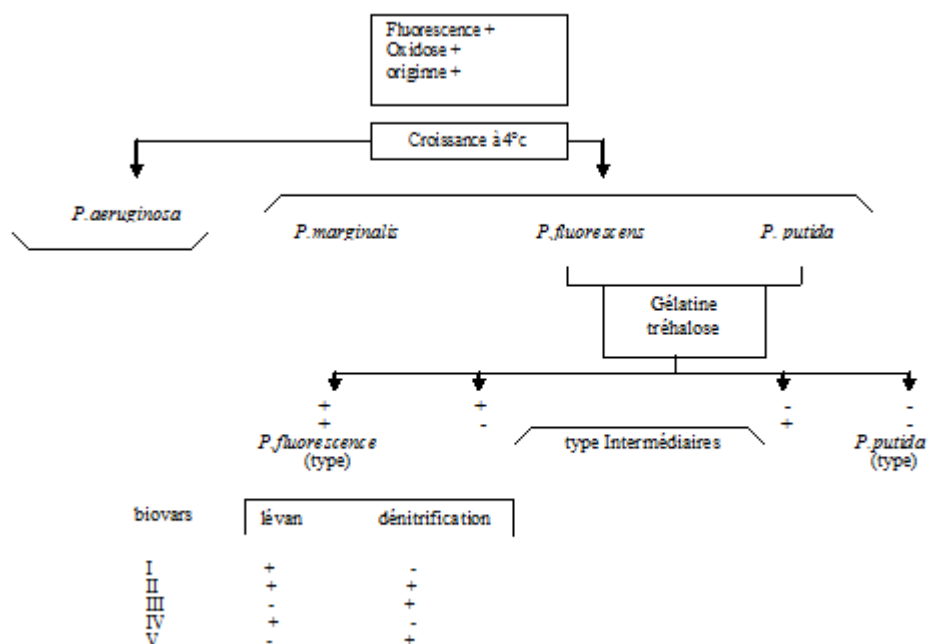


Figure 7: Schéma général de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens-putida* (Digat et Gardan, 1987).

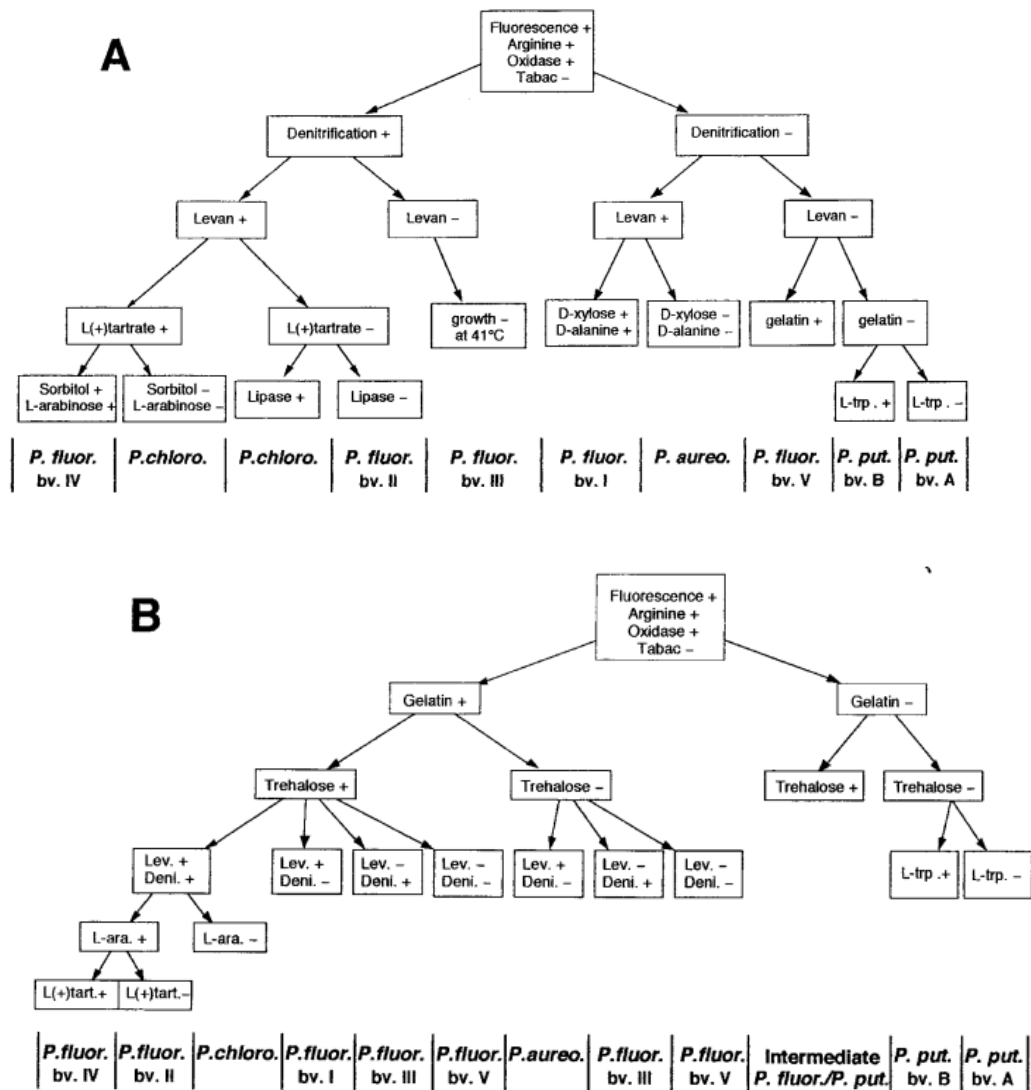


Figure 8 : Clé dichotomique pour l'identification des souches appartenant aux espèces *P. fluorescens* et *P. putida* . A :selon Jacques (1994) et B selon Bossis (1995).

P. aureo.: *Pseudomonas aureofaciens*; *P. chloro.*: *P. chlororaphis*; *P. fluo.*: *P. fluorescens*; *P. put.*: *P. putida*; L-ara: L- arabinose; Den.: Denitrification; Lev.: Levan; L(+) tart.: L(+) tartrate; L-trp.: L-tryptophane.

***Production de pigment fluorescent:** la production du pigment fluorescent a été recherchée sur milieu KB. Après une incubation de 24 à 96 heures entre 27-28°C, le développement du pigment fluorescent a été révélé à l'œil nu ou sous UV (254 et 366nm).

***Coloration de Gram:** la coloration a été effectuée selon la méthode classique. Parallèlement, un test plus rapide, a été effectué. Deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%), sont mises en contact avec une crème bactérienne sur une lame en effectuant un mouvement circulaire. La solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s (Bourgault et Lamothe, 1988).

***Mobilité:** la mobilité des bactéries a été étudiée par observation microscopique à l'état frais sur cultures en phase de croissance dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle, et confirmée par repiquage sur milieu spécifique : mannitol-mobilité.

***Catalase:** la catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H_2O_2 à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al.*, 1992).

***Oxydase:** l'oxydase a été recherchée sur papier filtre selon la technique de Kovacs (1956) : une colonie est étalée sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

***Arginine dihydrolase:** complexe enzymatique capable de dégrader l'arginine en anaérobiose, agissant selon deux types de réaction envisageables. La première réaction est une transformation de l'arginine en citrulline et ammoniacque par son activité dihydrolase. La seconde est une décarboxylation de la citrulline en ornithine et ammoniacque. Certains *Pseudomonas* spp. sont capables de dégrader l'arginine, des tubes contenant le milieu de Falkow (0.5% arginine) inoculés ont été recouverts d'une couche de vaseline et incubés à 28°C pendant 5 jours. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge pourpre suite à l'alcalinisation du milieu dû à la présence de l'ammoniacque (Hildebrand, 1988).

***Fermentation des sucres:** la fermentation des sucres (glucose, lactose) ainsi que la production de H_2S ont été recherchées sur le milieu d'identification combiné : milieu Hajna-Kligler, en ensemencant abondamment la surface par des stries ou par inondation, le culot est inoculé par simple piqûre centrale avant de les mettre à l'étuve pendant 24h à 30°C.

***Test d'hypersensibilité:** le test d'hypersensibilité (HR) a été effectué avec des suspensions bactériennes (10^3) en eau physiologique stérile. L'inoculation de la face inférieure des feuilles de tabac d'une plante à 6 feuilles, par infiltration, à l'aide d'une seringue hypodermique. Les plants de tabac inoculés ont été déposés dans le laboratoire, à la température 20-25 ° C. le témoin négatif est inoculé avec de l'eau physiologique stérile. Le développement de collapse au niveau des zones inoculées 2 à 3 jours après, traduit une réaction d'hypersensibilité positive (Klement, 1963).

***Dénitrification:** la réduction des nitrates a été testée selon la méthode décrite par Roussel-Delif *et al.* (2005). Des tubes contenant du bouillon nutritif à 0.2 % de KNO_3 et une cloche, pour détecter la formation de gaz, sont inoculés et incubés à température ambiante (22 à 25°C).

La présence de nitrate est révélée après 7 jours par addition de quelques gouttes du réactif de Nessler, la réaction positive donnant une coloration orange à rouge brique. L'adjonction de poudre de Zinc sous forme de $ZnCl_2$ va permettre la réduction des nitrates en nitrites et donc de confirmer le pouvoir dénitrifiant des isolats. Les isolats capables de produire du gaz ainsi que ceux réduisant les nitrates en nitrites sont aussi considérés comme des dénitrifiants potentiels.

***Production de levane sucrase:** la recherche de levane sucrase a été effectuée sur milieu NA à 5 % de sucrose. Après ensemencement du milieu, et incubation de 3 à 5 jours à température ambiante, le développement de colonies blanchâtres, convexes et brillantes indique la présence de levane sucrase (Lelliot et Stead, 1987; Hildebrand, 1988).

***Protéolyse:** les tubes contenant le milieu gélatine ont été ensemencés avec une crème bactérienne de 24 heures et incubés pendant 72 heures à 25° C. Les tubes inoculés ainsi que le tube témoin sont chauffés légèrement (+5 °) pour vérifier la liquéfaction de la gélatine. La protéolyse se traduit par la liquéfaction du milieu, par comparaison à un témoin négatif qui doit rester solide (Lelliot et Stead, 1987).

***Pouvoir pectolytique:** les tubercules de pomme de terre sont d'abord débarrassés de résidu de terre en les passant sous l'eau. Ensuite, ils sont désinfectés (10mn) en passant dans une solution alcoolique (éthanol à 70%), et une seconde solution contenant de l'hypochlorite de sodium. Après rinçage à l'eau distillée stérile, les tubercules sont ensuite tranchés et déposés dans des boîtes de pétri contenant de l'eau physiologique stérile, quelques gouttes d'une suspension bactérienne en phase de croissance sont déposées sur les tranches. Après 7 à 14 jours, la réaction est considérée positive par l'apparition de pourriture qui s'accompagne d'une forte odeur (Cooksey *et al.*, 1990).

2.2.4. Taxonomie numérique

Un total de 66 caractéristiques basées sur les principaux tests biochimiques conventionnels rapportés par Sutra *et al.* (1997), et sur le pouvoir d'assimilation des sources de carbone, ont été utilisés pour l'analyse taxonomique. L'analyse des résultats des profils trophiques des 65 isolats a été réalisée avec le programme STATISTICA (version 5, '97). Après établissement des listes des tests positifs ou négatif pour chaque isolat bactérien, la saisie des données a été réalisée en sens ligne pour le test phénotypique et en sens colonne pour l'isolat bactérien.

La matrice de similarité a été calculée en utilisant le coefficient de Jaccard (Sneath et Sokal, 1973), et les valeurs de similarités ont été converties en distances euclidiennes (distance = 1-% similarité).

La méthode d'agrégation est celle des moyennes non pondérées des groupes associés (UPGMA unweighted pairgroup method with averages), en remplaçant les valeurs manquantes par les moyennes.

A une distance donnée et pour les différents phénons, les informations recueillis pour chaque test phénotypique permettent de déterminer le coefficient de capacité de diagnostique (ccd), pour la détermination des caractéristiques biochimiques discriminants les différents isolats (Descamps et Veron, 1981).

Le dendrogramme correspondant a été tracée, et l'identification probabiliste a été effectuée en calculant pour chaque cluster (phénon) un taux d'association entre l'isolat bactérien et la classe. Ainsi, la validation du choix de la classe se fait sur la base d'un taux d'association 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, selon un niveau de similarité inférieur ou égal à 80%, soit une distance supérieure ou égale à 0.2.

2.2.5. Identification genotypique des isolats

Deux isolats ont fait l'objet d'une identification génotypique, classés morphologiquement et physiologiquement selon des genres différents. Cette étude a portée sur l'homologie de la séquence rRNA 16S suivie du séquençage des bases azotées de cette séquence.

2.2.5.1. Extraction de L'ADN

L'ADN génomique a été préparé par des méthodes standard de références (Marmur, 1961; Maniatis *et al.*, 1982; Weisburg *et al.*, 1991) à l'ENITIAA (Ecole Nationale des Techniques et Industries Agro-Alimentaires de Nantes, France). Après une croissance de 24h dans un bouillon Luria Bertani (LB), l'absorbance est déterminée à 600 nm (Ausubel *et al.*, 1991). La méthodologie appliquée, est une méthode utilisant le kit QIAGEN (DN easy Blood and tissue kit for purification of total DNA), contenant les différents tampons pré préparés.

Les cellules sont centrifugées à 4°C, pendant 10 minutes à 7500 tr/min (5000g) et le culot (de chaque échantillon cellulaire) est suspendu dans 180µl de tampon ATL (pour la lyse des cellules), dans lequel on rajoute extemporanément 20µl de protéinase K pour optimiser la digestion. Le mélange homogénéisé par le vortex, est ensuite incubé pendant 1 heure dans un bain marie à 56°C. De temps à autre le mélange est homogénéisé par le vortex pour disperser l'échantillon.

Pour s'assurer que nos échantillons d'ADN seront purs et donc exempts de contaminants, 4µl de RNase (100mg/ml) sont rajoutés à la fin de cette phase de lyse suivi d'une incubation de 2min à température ambiante.

Lorsque l'étape de lyse parvient à sa fin, on homogénéise encore une fois par vortex ; on rajoute 200µl de tampon AL (homogénéiser par vortex pour la séparation) et 200µl d'éthanol (100%, homogénéisé par vortex pour la précipitation) extemporanément. On observe alors un précipité qui est dissipé par vortex.

L'étape de dialyse (se déroulant en 3 phases), effectuée avec une colonne fournie par le kit. **i-** L'échantillon transféré dans la colonne subit une centrifugation à 4° C, pendant 1 minute, à 8000 tr/min (6000g). **ii-** On rajoute ensuite 500µl de tampon AW1, et la colonne subit une centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. **iii-** 500µl de tampon AW2 sont à nouveau rajoutés et la centrifugation à 4° C est répétée, mais pendant 3 minutes à 14000tr/min. Ces étapes de centrifugation tentent d'éliminer toute trace d'éthanol résiduel, qui pourrait interférer avec l'étape suivante d'élution.

L'élution est alors effectuée avec la même colonne, centrifugée pendant 1 minute à 8000tr/min, mais avec un tampon différent. 200µl de tampon AE sont rajoutés directement sur la colonne, la solution d'ADN est alors récupérée, et congelée à -20° C en vue d'amplification.

2.2.5.2. Quantification de l'ADN

L'analyse de l'absorption en UV des nucléotides procure une estimation simple de la concentration des acides nucléiques dans un échantillon. En effet, les bases puriques et pyrimidiques présentent dans les acides nucléiques montrent un maximum d'absorption autour de 260nm, si l'échantillon d'ADN est pur (sans aucune contamination significative par les protéines et les solvants). Le rapport Absorbance₂₆₀/ Absorbance₂₈₀ doit donc être déterminé pour évaluer la pureté de l'échantillon. L'absorbance des échantillons d'ADN extrait dilué au 1/10^{ème} (dans de l'eau extra pure ou dans un tampon TE : 10 mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH8), est alors déterminée à 260 et 280 nm, par un spectromètre UV-Visible à balayage (SECOMAM Prim C). Le zéro de l'appareil est obtenu avec de l'eau extra pure ou du tampon TE.

1- Détermination de la pureté d'ADN le rapport Absorbance₂₆₀/ Absorbance₂₈₀ doit être compris entre : 1,7 et 1,9. si ce rapport est inférieur à 1,7 cela signifie que notre ADN est contaminé par du phénol, par contre s'il est supérieur à 1,9 cela suppose qu'il est contaminé par des protéines, et qu'il faudra le purifier avant de poursuivre les tests.

2- Concentration d'ADN celle-ci est déterminée par la formule suivante :

$$[\text{ADN}] = \frac{\text{Absorbance}_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 50}{1000} \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Où une unité d'absorbance correspond à 50µg d'ADN par µl (Hoisington *et al.*, 1994).

2.2.5.3. Amplification de l'ADN

Les essais d'amplification ont été réalisés avec un thermocycleur programmable (PTC-100), avec les amorces universelles décrites par Weisburg *et al.* (1991):

- fD1 (forward): 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'.
- rD1 (reverse): 5'TAAGGAGGTGATCCAGGC3'.

Ces amorces permettent d'amplifier le gène 16SrDNA (1.5 Kb). Approximativement 50ng (2µl) d'ADN génomique sont amplifié dans 50µl de solution réactionnelle.

Deux températures d'hybridation ont été testées, en présence et en absence de MgCl₂.

*Dénaturation initiale: 15 sec à 94°C

34 cycles (15 sec à 94°C, 15 sec à 56°C, 15 sec à 72°C).

* Dénaturation initiale: 15 sec à 94°C

34 cycles (15 sec à 94°C, 15 sec à 58°C, 15 sec à 72°C).

	Concentrations finales	Volume pour une réaction en µl
H ₂ O ultra pure (UP)		38,5
Tampon 1X		5
Dntp	10 mM	2
Amorce Mo53	5µM	1,5
Amorce Mo54	5µM	1,5
Taq polymerase	1U/50µl	0,5
ADN génomique	50ng	2

Les produits de cette amplification ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Dépôt de 5µl d'amplifiat (produits de PCR) encadrés par le marqueur N 3232 (1Kb de New England Biolabs inc), la migration est suivie en présence d'1µl de tampon de charge (bromophénol bleu 0,25% et xylène cyanol 0,25%) et a été effectuée pendant 20 min à 100 V en gel d'agarose à 1,5% (Eurobio Agarose standard) dans 20 ml de tampon TAE (Tris Acetate EDTA Euromedex) en cuve 6 cm x 8 cm (Embitec), contenant 0,5µg/ml de bromure d'éthidium (BET Euromedex). Après migration, l'ADN a été visualisé et photographié sous UV (COFRALAB).

2.2.5.4. Purification de l'ADN

La déplétion du tampon TAE peut survenir au cours de l'électrophorèse, et se traduit par la visualisation de traînées sur les gels (Ameziane *et al.*, 2005). Ces traînées peuvent aussi avoir pour origine la contamination de l'ADN (par des protéines ou par des solvants). En compilant les résultats de l'électrophorèse avec ceux obtenus lors de la mesure de l'absorbance, naquit l'intérêt de purifier l'ADN amplifié. Pour procéder à sa purification, l'ADN doit d'abord subir une électrophorèse dans les mêmes conditions que précédemment, avec cependant une différence quand à la quantité déposée (40µl), et la concentration en agarose du gel (0.8%). Cette purification a été effectuée en trois étapes : **i** liaisons **ii** lavage **iii** et enfin élution à travers une membrane de silice, selon la technique chromatographique échangeuse d'ions décrite par Vogelstein et Gillespie (1979); en utilisant un kit d'extraction d'ADN à partir de gels électrophorétique (QIA Quick Gel extraction). A ce propos, et après électrophorèse la bande de gel correspondant à 1500 pb est incisée et traitée selon la méthodologie suivante:

a. Fixation : au fragment du gel 3 volumes de tampon QG sont rajoutés, ce tampon solubilise le gel et favorise la liaison de l'ADN à la membrane de silice (la présence d'un indicateur de pH facilite la détermination du pH idéal pour la liaison < 7,5). Cette mixture est incubée à 50° C afin de dissoudre le gel, l'ajout d'un volume d'isopropanol aidera à débarrasser l'ADN des contaminants (enzymatiques et autres).

b. lavage : le tampon PE (contenant de l'éthanol à 100%) est la solution de lavage idéale pour éliminer les sels l'agarose.....etc.

c. élution : contrairement à l'adsorption l'élution est effectuée dans des conditions basiques à faible concentration saline dans un tampon EB (10mM Tris HCl pH 8,5). L'ADN purifié est alors soumis à une électrophorèse dans les mêmes conditions que précédemment, avec cependant une différence quand à la concentration du gel en agarose qui est de 0.8%.

2.2.5.5. Séquençage

Les produits PCR purifiés ont alors fait l'objet de séquençage automatisé (<https://www.gexbyweb.com>), par l'utilisation des amorces universelles: SP1 (ACTCCTACGGGAGGCAGCA), SP2 (ACCGCGGCTGCTGGCACG), SP3 (GATACCCTGTTAGTCCACG), SP4 (CTCGTTGCGGGACTTAAC) et SP5 (GGTACCTTGTTACGACTT) correspondant respectivement à: Mo408: Mo 416, Mo410, Mo409 et Mo411. Les séquences obtenues sont alors comparées avec celles du NCBI Blast-contig et ce en utilisant le programme blast (Altschul *et al.*, 1997).

L'analyse phylogénétique des séquences 16S r DNA des deux isolats séquencés, est réalisée en utilisant le Logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007). La construction d'un arbre par la méthode du Neighbour-Joining, utilise une matrice des distances pour faire des regroupements entre espèces. Les distances sont calculées en rapportant le nombre de sites variables sur le nombre total de sites par comparaison des séquences deux à deux. Ces distances permettent de regrouper les séquences par paires et de choisir, à chaque étape, celles qui minimisent la longueur totale de l'arbre (Saitou et Nei, 1987). À cette méthode est associé un test de robustesse, le bootstrap, qui permet de mesurer si les regroupements obtenus à partir de la méthode du Neighbour-Joining, sont solides ou non. La robustesse est testée en soumettant plusieurs fois les séquences à l'analyse en Neighbour-Joining (Felsenstein, 1985).

2.2.5.6. Etude des profils Plasmidiques

Après croissance de 18 heures à 28°C dans un bouillon LB, les bactéries sont centrifugées (6000 tr/min pendant 7 min à 4°C), et re-suspendues dans 150µl d'une solution: glucose/EDTA/Tris-HCl (0,9%, 10mM, 25mM, pH 8). Ensuite 150µl d'une solution de lyse NaOH/SDS (0,2 M, 1%) sont rajoutés en présence de RNase (Birnboim et Doly, 1979; Birnboim, 1983). Le SDS (sodium dodécyl sulfate) solubilise les phospholipides et les composés protéiques de la membrane cellulaire, fragilisée cette dernière est rompue libérant ainsi le contenu cellulaire. Alors que les conditions alcalines dénaturent l'ADN chromosomique, plasmidique, aussi bien que les protéines; l'optimisation du temps de lyse (en minimisant l'exposition du plasmide aux conditions dénaturantes) permet une renaturation de l'ADN plasmidique, tandis que l'ADN chromosomique n'est pas re-naturé. Lorsque les plasmides sont trop longtemps exposés aux conditions alcalines, leur dénaturation est irréversible (Birnboim et Doly, 1979).

Le lysat est neutralisé et ajusté par addition d'acétate de sodium (3M, pH 5,2). La concentration élevée de sels va précipiter les protéines dénaturées, l'ADN chromosomique, les débris cellulaires ainsi que le SDS; par contre l'ADN plasmidique sera correctement renaturé et restera en solution. Il est important que cette solution soit mélangée méticuleusement par inversion pour assurer une précipitation complète.

3. RESULTATS

3.1. ISOLEMENT DES PSEUDOMONAS FLUORESCENTS

Les méthodes de caractérisation bactériologiques décrites ont permis une identification préliminaire des isolats des biotopes cités. La sélection basée sur l'antagonisme sur PDA d'une part. La production de pigments fluorescents et les caractères macromorphologiques, sur le milieu B de King d'autre part, permet la constitution d'une collection de 65 souches bactériennes fluorescentes. Le test de l'oxydase considéré comme caractère taxinomique permettant de discriminer aisément les *Pseudomonas* fluorescents (Palleroni *et al.*, 1984; Jacques, 1994; Bossis, 1995); ainsi que le test de l'arginine dihydrolase considéré comme déterminatif a été pratiqué sur toutes les souches de la collection (Jacques, 1994; Bossis, 1995). Les tests de l'hypersensibilité sur tabac (Klement, 1963) et le potato rotting, qui provoquent respectivement une hypersensibilité et des nécroses ont permis de discriminer davantage les saprophytes des phytopathogènes (Cooksey *et al.*, 1990). Les résultats obtenus ont permis de retenir 48 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, soit un taux de 73,84% du total des souches isolées dont 5 sont phytopathogènes, et 10 pouvant croître à 41°C et sur cétrimide sont identifiés comme *Pseudomonas aeruginosa*.

La répartition des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les deux biotopes montre une dominance du biotope en culture du site Dirou, soit 17 isolats (26,15%); suivi de près par celui du site Ras el oued, 13 isolats (20%). Les isolats provenant du second biotope des sites Ain azel (9) et Ain zada (9) représentant 13,8 % chacun du total des isolats (Tableau I).

3.2. IDENTIFICATION SPECIFIQUE DES PSEUDOMONAS FLUORESCENTS

Le schéma général de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens-putida* modifié par Digat et Gardan (1987), et les clés dichotomiques de Jacques (1994) et Bossis (1995) ont montré des affiliations différentes des souches aux taxons décrits. Selon le schéma d'identification proposé par Digat et Gardan (1987 ; **A**), le groupe des *P. fluorescens/putida* a été représenté respectivement par 20 (41,66%) et 3 (6,25%) des isolats caractérisés.

La clé dichotomique proposée par Jacques (1994 ; **B**), a permis l'affiliation des souches isolées aux principales espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents, *P. fluorescens* est représentée par 25 isolats (52,08%), *P. putida* par 3 isolats (6,25%) et *P. chlororaphis* 5 isolats (10,41% ; Tableau II).

TableauII: Répartition des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents selon les biotopes.

	Biotopes			
	Culture Pomme de terre		Sols nus	
	Dirou	Ras el oued	Ain azel	Ain zada
Nombre d'isolats	17	13	9	9
Pourcentage*	26,15	20	13,8	13,8

* pourcentage par rapport au nombre total d'isolats sélectionnés(65).

La caractérisation de ces souches par la clé proposée par Bossis (1995 ; C), a permis de retrouver trois des espèces précédentes, *P. chlororaphis* avec la même fréquence, et les *P. fluorescens/putida* mais avec des fréquences différentes (Tableau III). Il a été noté par ailleurs, des différences d'affiliation des souches dans d'autres espèces. Des différences notables ont été observées entre ces trois modèles d'identification.

*L'effectif de *P. fluorescens* passe de 20 (A), à 25 (B) et 18 souches pour (C).

*L'effectif de *P. putida* passe de 3 (A, B) à 10 souches pour (C) donc une augmentation de 14%.

**P. chlororaphis* est uniquement retrouvée avec la clé de Jacques (1994), alors que sa fréquence était nulle avec celle de Digat et Gardan (1987) et Bossis (1995).

3.3. IDENTIFICATION INFRASPECIFIQUE DES PSEUDOMONAS FLUORESCENTS

La caractérisation de *P. fluorescens* et *P. putida* en leurs biovars, a été réalisée à l'aide des tests décrits dans les clés de Jacques (1994) et Bossis (1995), ainsi que le schéma général de Digat et Gardan (1987). Cette caractérisation a permis d'observer 15 spectres de réponses correspondant aux taxons des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Tableau IV).

Chez *P. fluorescens* représentée par 18 isolats, le biovar III, reconnu par ses réactions gélatine positive, levane positive et dénitrification négative, est le plus dominant avec 10 isolats (55,55%). Suivi par le biovar V avec 5 isolats (27.7%), les 3 isolats restants appartiennent au biovar I.

Concernant *P. putida*, ses biovars A et B ont été identifiés par l'utilisation du L-tryptophane. Les isolats pouvant utiliser cet acide aminé sont rattachés au biovar A, alors que les isolats tryptophane négatifs sont rattachés au biovar B.

Tableau III : Identification spécifique des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. chlororaphis</i>	Non classés
Digat et Gardan (1987)	20 ^a (41,66) ^b	3 (6,25)	-	10 (20,82)
Jacques (1994)	25 (52,08)	3 (6,25)	5 (10,41)	-
Bossis (1995)	18 (37,5)	10 (20,82)	5 (10,41)	-

P : *Pseudomonas* ; a : nombre d'isolats ; b : pourcentage par rapport aux isolats caractérisés (48), - : absence d'isolats.

3.4. DISTRIBUTION DES ISOLATS

La caractérisation spécifique et infraspécifique des isolats a permis de mettre en évidence 6 taxons : trois taxons correspondent à 3 biovars de *P. fluorescens*, aux deux biovars de *P. putida*, et *P. chlororaphis*. La plupart des taxons proviennent des sites Dirou et Ras el oued.

Les isolats provenant du site Dirou appartiennent aux principales espèces saprophytes du groupe étudié. Ces isolats ont été majoritairement affiliés aux 3 biovars *P. fluorescens* (9 parmi 17). Le biovar **III** est prédominant avec (4/9), suivi de près par le biovar **V**, et enfin **I**. Les biovars de *P. putida*, viennent en deuxième position représenté par 4 isolats. *P. chlororaphis* n'est représenté que par un seul isolat (Tableau V). Les isolats bactériens de Ras el oued appartiennent principalement aux trois taxons de *P. fluorescens* cités précédemment (5/13). Dans ce cas, les biovar **V** et **III** sont représentés par 2 isolats chacun et enfin le biovar **I** par un seul. Le biovar **A** de *P. putida* est représenté par 3 isolats. Alors que *P. chlororaphis* n'est représenté que par un seul isolat. Les souches isolées d'Ain Azel (2/3/1) ont été affiliés respectivement à *P. fluorescens* biovar **III**, *P. putida* biovar **A** et *P. chlororaphis*. Par contre, sur le site Ain zeda seuls *P. fluorescens* biovar **III** et *P. chlororaphis* ont été isolés. D'après, cette analyse il apparaît nettement que l'espèce la plus fréquemment isolée est *P. fluorescens*, suivi de près par *P. putida*.

Tableau IV : Spectres de réponses aux tests d'identification spécifique et infraspécifique selon les clés A, B et C.

Spectres de réponses															
Tests	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Fluorescence	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HR Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dénitrification	nt	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	nt	nt
Levane	nt	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	nt	nt
Gélatinolyse	-	+	+	+	nt	nt	nt	+	-	<u>+</u>	+	+	+	-	-
Lipase	nt	nt	nt	nt	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	Nt	nt	nt
L-tryptophane	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	-	nt	nt	nt	Nt	+	-
Tréhalose	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	<u>+</u>	+	+	-	-
Arabinose	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	-	nt	nt	Nt	nt	nt
Biovars	Pt	I	III	V	Pc	III	I	V	A	Pc	I	V	III	B	A
clés	Caractérisation (A)					Clé dichotomique Jacques (1994, B)					Clé dichotomique Bossis (1995, C)				

+ : réponse positive, - : réponse négative, nt : non testé, I, III et V : *P. fluorescens* biovar I, III et V, Pt : *P. putida* type, Pc : *P. chlororaphis*, A et B : *P. putida* biovar A et B, HR : Réact d'hypersensibilité (A) : Digat et Gardan.

Tableau V : Répartition des souches sélectionnées dans les taxons

Taxons						
Site	<i>P. fluorescens</i>			<i>P. putida</i>		<i>P. chlororaphis</i>
	bv.I	bv.III	bv.V	bv.A	bv.B	
Dirou	2	4	3	2	2	1
Ras el oued	1	2	2	3		1
Ain azel		2		3		1
Ain zeda		2				2

bv : biovar ; *P* : pseudomonas.

3.5. IDENTIFICATION DES ISOLATS PHYTOPATHOGENES

Les isolats caractérisés comme phytopathogènes ont été soumis aux mêmes tests d'identification présomptifs décrits dans les clés dichotomiques. La fluorescence sur le milieu B de King, l'hydrolyse d'arginine, la présence ou l'absence d'une oxydase, la production de levane à partir de sucrose; mais aussi la réaction d'hypersensibilité sur plant de tabac, et la capacité pectolytique sur tranches de pomme de terre (Tableau VI). En effet, uniquement 5 isolats ont été affiliés aux *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes. 2 isolats provenant du site Dirou et 3 de celui de Ras el oued. Les isolats affiliés au premier site sont à oxydase positive, alors que ceux affiliés au second sont à oxydase négative.

3.6. TAXONOMIE NUMERIQUE

La caractérisation métabolique des 48 isolats de notre étude, par leur aptitude à l'utilisation de 24 sources de carbone, et leurs activités enzymatiques (Tableau VII), a permis leurs groupement en fonction de leurs profils trophiques. Après le calcul de la matrice de distances entre les isolats testés, pour chaque site un dendrogramme a été construit. Le niveau de similarité retenu, avec une coupure (ccd) au seuil de 0,2 a permis de grouper les isolats ayant au moins 80% de similarité dans le même phénon. À ce seuil de coupure, et selon le biotope considéré on a observé une homogénéité entre les isolats caractérisés.

L'analyse globale des dendrogrammes des sites étudiés a fait ressortir qu'à l'exception du site de Ras el oued dont les isolats ont montré une homogénéité relative au niveau de leurs profils trophiques regroupés en une seule classe. Les autres sites ont présenté une hétérogénéité plus marquée, 11 classes pour le site Dirou et 7 classes pour les sols non cultivés.

Tableau VI : Principales caractéristiques des souches phytopathogènes.

Site /Isolat	LOPAT					
	Levane sucrase	Oxydas e	Potato- rotting	Arginine dihydrolase	Hypersensib ilité du tabac	Liquéfaction de la Gélatine
Dirou						
Pp ₁	-	+	+	-	+	-
Pp ₂	-	+	+	-	+	-
Ras el						
Pp ₃	+	-	+	+	+	nd
oued						
Pp ₄	+	-	-	-	+	nd
Pp ₅	-	-	+	+	+	nd

Pp : *Pseudomonas* sp. phytopathogène ; nd : non-déterminé ; potato-rotting : activité pectolytique.

3.6.1. Biotope cultivé

3.6.1.1. Site Dirou

À une distance de 0.24, le dendrogramme répartit les 14 isolats de ce site en 11 classes distinctes, dont 3 sont vraies contenant chacune 2 isolats et 8 singletons (Fig. 9 et Tableau VIII).

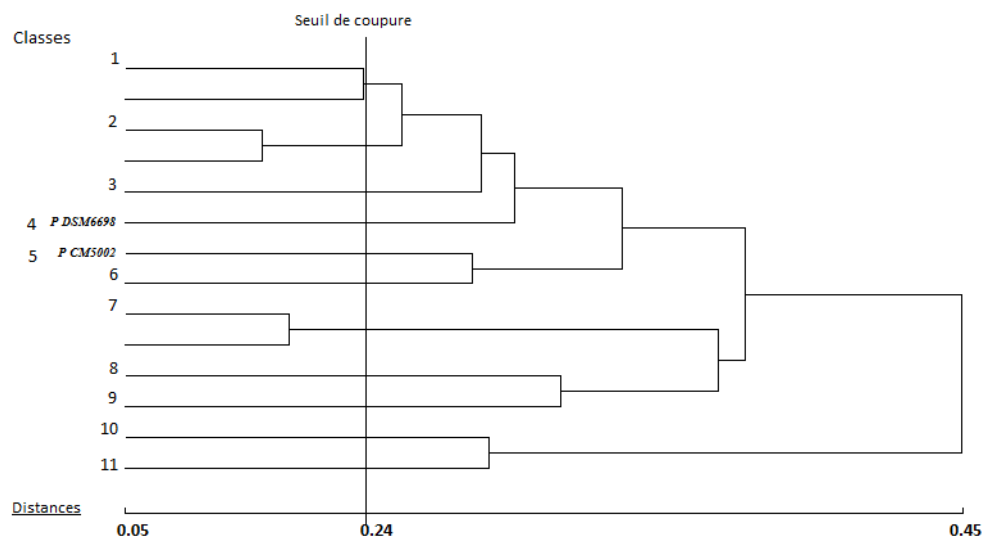


Figure 9: Dendrogramme des 14 isolats du site Dirou 1, 2,...,11 : classes ; *P. DSM6698* : *Pseudomonas chlororaphis* sbsp. *aureofaciens* ; *PCM5002* : *P. putida* CM5002 ; seuil de coupure : déterminant les classes.

Tableau VII: Résultats des																			caractères m.
SCC	PAC	CIT	MLT	ADI	CAP	GNT	TRP	CWDE	β -gal	GEL	AMY	UREE	ODC	LDC	ADH	EST	NO ₂	Glu f	
Site Dirou	d ₍₅₈₎	-	+	d ₍₂₀₎	-	+	d ₍₂₇₎	d ₍₂₀₎	d ₍₃₃₎	d ₍₇₃₎	+	d ₍₆₆₎	d ₍₁₃₎	d ₍₁₃₎	d ₍₈₆₎	d ₍₄₆₎	d ₍₂₆₎	-	
Site Ras el oued	d ₍₂₀₎	-	d ₍₈₆₎	-	-	d ₍₈₂₎	-	d ₍₁₃₎	d ₍₁₇₎	d ₍₄₆₎	nd	nd	nd	nd	d ₍₆₀₎	d ₍₁₃₎	d ₍₃₇₎	-	
Sols nu	d ₍₁₃₎	-	+	d ₍₁₃₎	-	d ₍₈₂₎	-	d ₍₃₅₎	d ₍₂₃₎	d ₍₄₁₎	d ₍₁₁₎	nd	nd	nd	d ₍₅₄₎	d ₍₄₇₎	d ₍₇₆₎	-	
D-GAL	MAN	MNE	ARA	GLU	RHA	SOR	RIB	RAF	FRU	INO	MEL	SAC	MAL	NAG	ESC	VP	IND	TDA	
Dirou	d ₍₃₃₎	+	d ₍₁₃₎	+	d ₍₁₃₎	d ₍₄₇₎	-	-	+	d ₍₃₃₎	d ₍₇₅₎	d ₍₂₆₎	-	-	d ₍₁₃₎	-	d ₍₁₃₎	-	
Site Ras el oued	d ₍₁₇₎	d ₍₁₇₎	d ₍₂₀₎	+	d ₍₁₇₎	-	d ₍₂₇₎	d ₍₂₇₎	+	d ₍₁₅₎	d ₍₂₃₎	d ₍₁₅₎	-	-	-	-	-	-	
Sols nu	d ₍₂₃₎	d ₍₈₂₎	d ₍₁₇₎	+	d ₍₂₃₎	-	d ₍₂₉₎	d ₍₂₃₎	+	d ₍₂₆₎	d ₍₁₈₎	d ₍₁₈₎	d ₍₂₆₎	-	-	d ₍₁₁₎	-	-	

Assimilations : SCC : succinate, PAC : Phényl-acétate, CIT : citrate, MLT : malate, ADI : adiapate, CAP : caprate, GNT : gluconate, TRP : tryptophane, D-GAL : D-galactose ;MAN : mannitol, MNE : mannose, ARA : arabinose, GLU : glucose, RHA : rhamnose, SOR : sorbitol, RIB : ribose, RAF : raffinose, FRU : fructose, INO : inositol, MEL : melibiose, SAC : saccharose, MAL : maltose, NAG : N-acétyl-glucosamine, ESC : esculine ; **Activités enzymatique** : CWDE : enzymes dégradant les paroi cellulaires, β -gal : β -galactosidase, GEL : hydrolyse de la gélatine, AMY : amylase, UREE : uréase, ODC : ornithine decarboxylase, LDC : lysine decarboxylase, ADH : arginine dihydrolase, EST : esterase, NO₂ : nitrate-réductase ; **AUTRES** : Glu_f : fermentation du glucose ; VP : production d'acétoïne, IND : production d'indole, TDA : formation d'acide indol-pyruvique .+ :90-100% des isolats positifs ; - :90-100% des isolats négatifs, d() : 10-89% des isolats positifs ; nd : non déterminé

Tableau VIII : Classes et isolats du dendrogramme Dirou

Classes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Isolats	Ps ₁	Ps ₆	Ps ₈	Ps ₂	Ps ₁₀	Ps ₁₂	Ps ₄	Ps ₉	Ps ₁₅	Ps ₁₁	Ps ₁₄
	Ps ₅	Ps ₇					Ps ₁₃				
Distances	0.237	0.2	0.28	0.292	0.277	0.277	0.21	0.30	0.30	0.283	0.283

Ps : *Pseudomonas* ; 1,2,...,15 : numéros attribués aux isolats.

Les profils trophiques de ces isolats ont été très hétérogènes, la distance phénotypique atteint 0.4565, soit au moins 55% de similarité entre certains isolats (P₁₄ et P₆). Seules les classes 2 et 7 ont montré un taux de similarités avoisinant 80%.

Les particularités trophiques de ces isolats sont :

- *Les classes 4 et 7 sont les seules à pouvoir utiliser le tryptophane.
- *Les classes 5 et 6 similaires à 73%, sont pectolytiques et produisent une réaction hypersensitive sur plant de tabac.
- *Les isolats esculine positive sont ceux regroupés dans la classe 7.
- *La classe 8 renferme les isolats assimilant le raffinose.
- *Les classes 10 et 11 regroupent les isolats utilisant l'arabinose.
- *La classe 11 est la seule productrice d'ammoniaque à partir d'acétamide.

3.6.1.2. Site Ras el oued

Le dendrogramme obtenu pour ce site répartit les isolats en une seule classe avec une distance maximale de 0.1796, donc avec une similarité supérieure à 80% (Tableau IX et Fig. 10). En allant à une distance de 0.116 et donc une similarité proche de 90%, 6 phénons (classes) ont pu être définis, dont 3 singletons et 3 vrais phénons comprenant deux isolats chacun.

Tableau IX : Classe et isolats du dendrogramme Ras el oued

Classe 1									
Isolats*	S ₁	S ₆	S ₄	S ₈	S ₉	S ₇	S ₅	S ₂	S ₃
Distances	0.174	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.141	0.141

* : ordre de défilement des isolats sur le dendrogramme, S : souche de *Pseudomonas* isolée, 1,2,...,9 : numéros affectés aux souches du site.

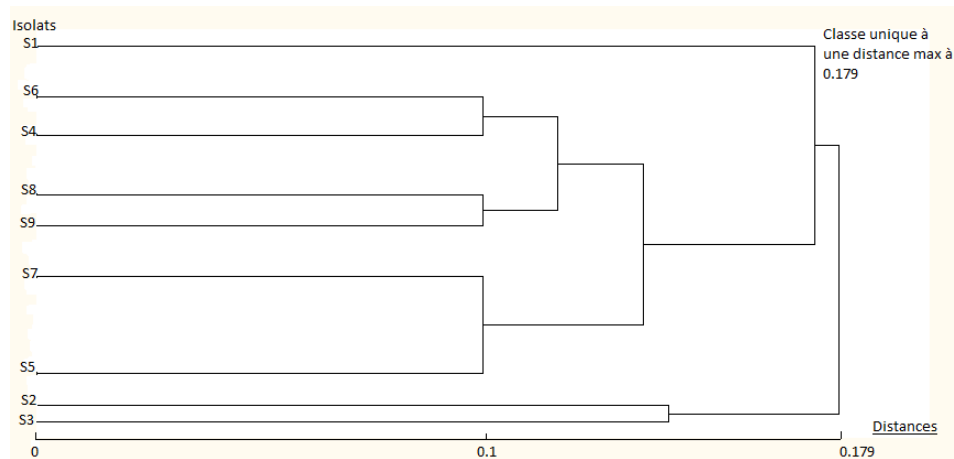


Figure 10 : Dendrogramme des neuf isolats du site Ras el oued
S1, S2.....S9: isolats du site ras el oued.

3.6.2. Biotope non cultivé

Le nombre de variables étant insuffisant pour être analysé, la combinaison des deux sites s'est imposée pour pouvoir les classer. Le dendrogramme obtenu à partir des profils trophiques des 18 isolats issus de sols non cultivés a révélé une hétérogénéité métabolique. En effet, la distance maximale est de 0.3038 soit près de 70% de similarité (Fig.11). Au seuil de coupure 0.2 soit 80% de similarité, 7 classes ont été définies, 2 singletons et 5 vrais phénons comprenant au moins deux isolats (Tableau X).

*Tous les isolats de ce biotope assimilent le mannitol.

*Les classes 4 et 5 sont représentées par des isolats non dénitrifiant.

*Les classes 6 et 7 regroupent les isolats assimilant : l'arabinose, D-galactose, raffinose et ribose.

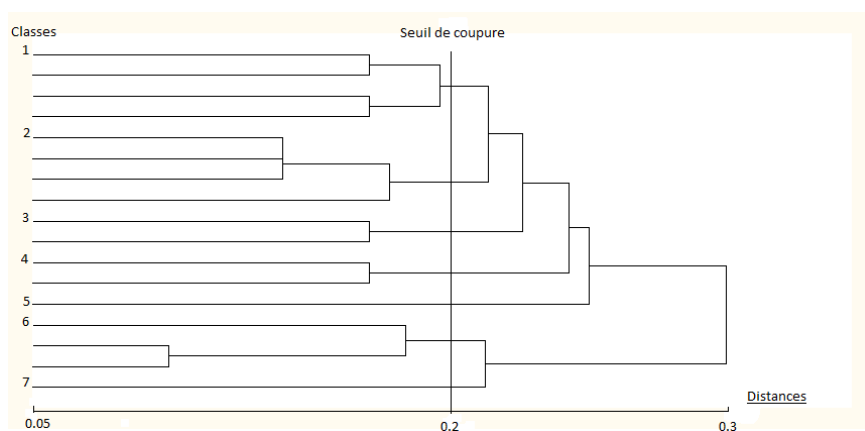


Figure 11: Dendrogramme de 17 isolats de sols non cultivés. 1,2, ..7: Classes; seuil de coupure: déterminant les classes.

Tableau X : Classes et isolats du dendrogramme sol non cultivé

Classes	1	2	3	4	5	6	7
Isolats	A _{5, 10, 7, 3}	A _{9, 14, 16, 2}	A _{1, 11}	A* _{4, 8}	A ₁₈	A _{15, 12, 13}	A ₆
Distances	0.173	0.141 ; 0.18	0.173	0.173	0.253	0.186 ^a ; 0.1	0.215

A : isolat sol non cultivé ; 1,2.....17 : numéros attribués aux isolats ; A*_{4, 8} : exemple d'ordre de défilement dans le dendrogramme, ^a : certaines classes sont composées d'isolats à distances différentes.

3.7. SEQUENÇAGE r RNA 16S ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE

Les séquences 16S de l'ADNr des isolats 2 et 10 ont été directement déterminés à partir des produits PCR dans les deux sens (reverse et forward), par Genome-Express. Les séquences 16S de l'ADNr de ces isolats ont été alignées manuellement en utilisant le programme blastn de la banque de données NCBI, par référence à des données de séquences 16S de l'ADNr bactériennes préalablement alignées. La séquence 16S de l'ADNr de l'isolat 2 a montré une similarité de 99% avec *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* DSM 6698 (NR_042939.1 ; Annexe II.A) soit une identité nucléotidique de 1523/1530. Alors que, la séquence rDNA 16S de l'isolat 10 a montré une similarité de 99% avec *Pseudomonas putida* souche CM5002 (EF529517.1; Annexe II.B) soit une identité nucléotidique de 1426/1433.

L'analyse de la fraction 16S de l'ADNr a confirmée l'appartenance des isolats 2 et 10 aux γ protéobactéria genre *Pseudomonas* et plus précisément aux *Pseudomonas* spp. fluorescents. L'analyse évolutive a été déduite en utilisant la méthode Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987). L'arbre optimal avec la somme des longueurs des branches = 0.05427434 est montré, avec les pourcentages d'arbres répliqués dans lequel les taxons associés regroupés dans le test de bootstrap (500 répliqués) sont affichées à côté des branches (Felsenstein, 1985; Fig. 12). L'arbre comprenant 51 isolats, est dessiné dans les mêmes unités que celles de la distance évolutive utilisée pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode du composite maximum de vraisemblance (Tamura *et al.*, 2004) et sont en unités du nombre de substitutions de base par site (Tamura *et al.*, 2007).

3.8. PROFILS PLASMIDIQUES

Les culots plasmidiques des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents provenant du site Dirou ont été analysés par électrophorèse. Cependant, on a noté l'absence de bandes plasmidiques chez ces isolats.

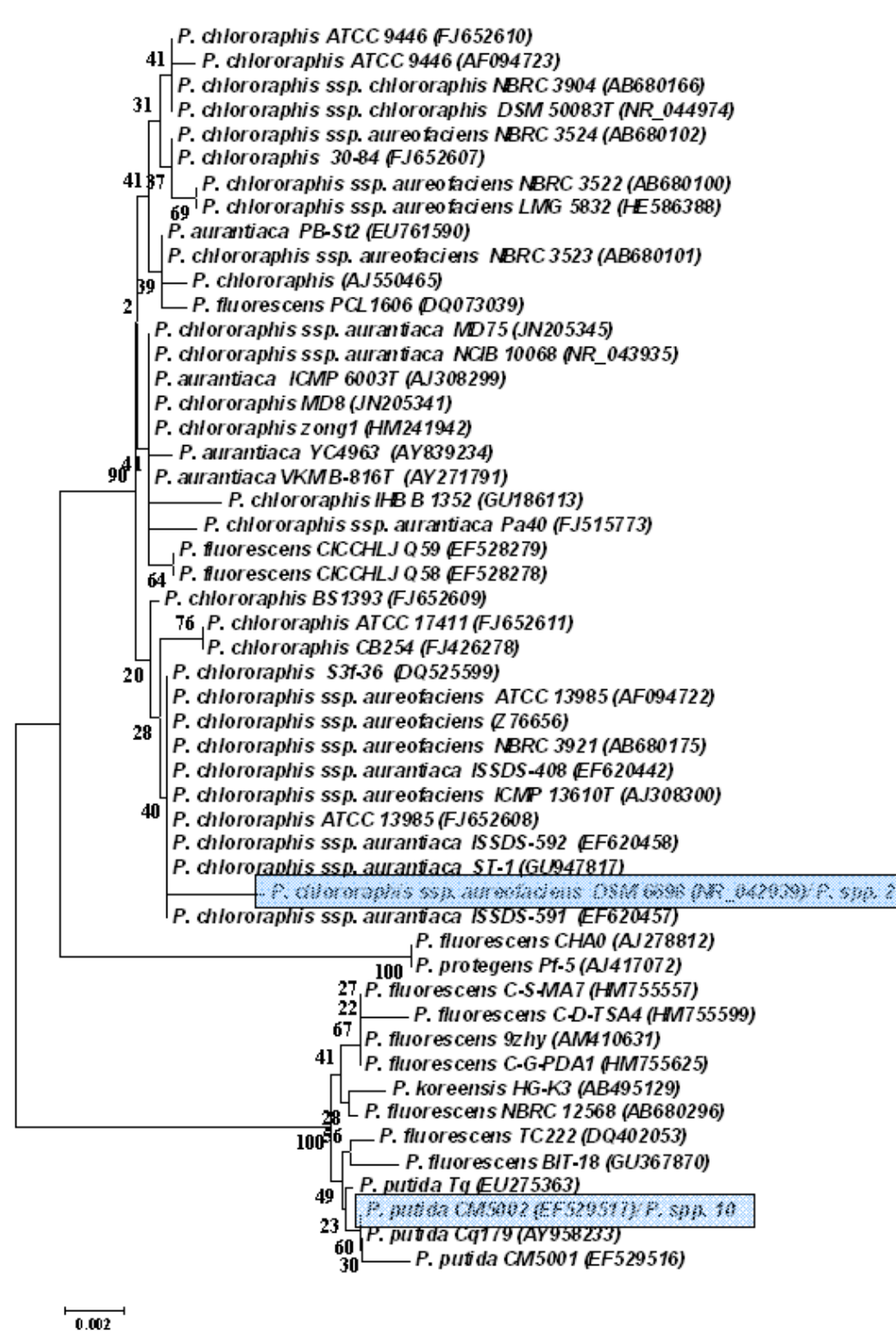


Figure 12 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, et montrant la relation des isolats 2 et 10 avec les espèces type du genre *Pseudomonas*.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux de Bootstrap (500 répliquats), la barre 0.002 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.

4. DISCUSSION

Les isolements effectués ont permis de sélectionner 65 souches bactériennes dont 48 isolats comme étant des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Bien que les sites étudiés présentent des différences importantes du point de vue climat et sol, nous notons la présence de populations appréciables de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Alexander (1977), avait rapporté que les petits bacilles à gram négatifs représentaient une part significative de la microflore associée à la rhizosphère. Ces microorganismes sont à propagation rapide, sont capables d'utiliser aussi bien des acides-aminés que des sucres hydrosolubles, et sont généralement résistants aux antibiotiques. Généralement, les *Pseudomonas* sont spécialement communs dans la rhizosphère.

La versatilité nutritionnelle des *Pseudomonas* (Misko et Germida, 2002; Pacheco *et al.*, 2003), ainsi que le caractère ubiquiste et le pouvoir d'adaptation à des conditions écologiques variées a été mentionnée dans de nombreux travaux (Digat et Gardan, 1987; Schroth *et al.*, 1992; Latour et Lemanceau, 1997; Bossis *et al.*, 2000). Ainsi, *P. salomonii* et *P. palleroniana* sont des espèces phytopathogènes (Gardan *et al.*, 2002), *P. costantinii* est un pathogène des champignons comestibles (Munsch *et al.*, 2002). D'autres espèces, sont associées aux racines de plantes, c'est le cas de *P. brassicacearum* (ail) et *P. thivervalensis* (riz ; Achouak *et al.*, 2000). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* de la rhizosphère de gazons (Peix *et al.*, 2003, 2004, 2005), ou encore des phyllosphères des plantes comme *P. lurida* (Behrendt *et al.*, 2007).

Cette distribution de part le monde semble être due à une capacité adaptative génétique et physiologique élevée (Spiers *et al.*, 2000). La présence de nombreux îlots génomiques dans le patrimoine de ces bactéries, est la clé de cette adaptabilité aux environnements ubiquistes, c'est le cas de *P. aeruginosa* PSE9 (Battle *et al.*, 2009).

Comparativement aux sols cultivés où les fréquences de répartition des isolats sélectionnés varient de 26,15% (Dirou) à 20% (Ras el oued), la fréquence des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les sols nus était plus faible (entre 10 et 13 %). D'après Latour et Lemanceau (1997), la variabilité du métabolisme des *Pseudomonas* spp. fluorescents confère à ces bactéries une plasticité importante dans leur adaptation à des environnements variés, tels que le sol et la rhizosphère.

Les rhizo-dépôts stimulent et sélectionnent la communauté microbienne associée à la rhizosphère des plantes, où la communauté bactérienne est la plus influencée (Lynch, 1990). L'effet rhizosphère ne se limite pas à un groupe spécifique, mais peut influencer des groupes morphologiques, physiologiques et taxonomiques différents (Alexander, 1977).

La densité et l'activité des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont plus élevées dans la rhizosphère de pomme de terre que dans le sol nu (Baker, 1986; Bahme *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1988; deWeger et Lugtenberg, 1990). Dans ce sens, ils peuvent constituer plus de 60% de la microflore bactérienne rhizosphérique (Digat et Gardan, 1987).

Selon, Sutra *et al.* (2000) et Berg *et al.* (2005), les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent être présents respectivement à des densités de 5.10^4 - 1.10^6 et $1,1.10^3$ - $6,7.10^5$ cfu/g de sol, et à des densités de 1.10^5 - 6.10^6 et $3,6.10^7$ - $7,6.10^7$ cfu/g de sol rhizosphérique. Ces bactéries ont même été décrites comme endophytes (Nielsen *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2005; Botelho et Mendonça-Hagler, 2006; Hardoim *et al.*, 2008).

La caractérisation phénotypique a été utilisée pour identifier et classer les isolats selon certains critères, morphologiques, pigmentaires, la réaction avec certains colorants et les exigences nutritionnelles. Cependant ces propriétés nutritionnelles n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique totale et précise. Il a été noté des différences entre les trois clés utilisées et de nombreux isolats n'ont pu être identifiés; ce qui confirme la faiblesse de ces approches phénotypiques pour la caractérisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *P. flourescens* et *P. putida* sont très hétérogène.

Les études phénotypiques ont révélées cette variabilité élevée avec ces deux espèces, dont le résultat est leurs subdivisions en ses biovars et sous groupes (Palleroni, 1984; Johnson et Palleroni, 1989; Sorensen *et al.*, 1991; Janse *et al.*, 1992; Lemanceau *et al.*, 1995; Grimont *et al.*, 1996; Latour *et al.*, 1996; Bossis *et al.*, 2000; Botelho et Mendonça-Hagler, 2006; Bashanov et Yatsevich, 2011).

P. flourescens bv. V comprend des souches qui sont difficiles à classer parce que les propriétés essentielles qui permettraient leurs différenciations des autres biovars ne sont pas identifiées (Palleroni, 1984). Ce système de multiples biovars révèle une hétérogénéité phénotypique élevée et probablement reflète une diversité génétique élevée. L'hétérogénéité que l'on rencontre chez certaines espèces et leurs biovars laisse la classification des *Pseudomonas* spp. fluorescents sujette à beaucoup de divergences (Bossis *et al.*, 2000), et est archaïque (Bashanov et Yatsevich, 2011).

L'analyse taxonomique montre que la diversité des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents est fonction de leur origine. En effet, les espèces et leurs biovars s'ils existent, ont été isolés à partir de tous les sites étudiés (sols non cultivés compris), mais avec des fréquences variables.

Outre leur signification taxonomique, les tests biochimiques utilisés pour l'identification des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents, peuvent être considérés comme indicateurs de l'aspect métabolique de ces bactéries, qui semble être un avantage pour leurs adaptation au sol et à la rhizosphère.

L'étude des cytochromes respiratoires permet de distinguer:

- (i) les *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes à cytochrome C oxydase comme *P. cichorii*, *P. marginalis* et *P. tolaasii* (Young *et al.*, 1992) des saprophytes non necrogénique comme *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, et l'espèce type *P. aeruginosa* ;
- (ii) les *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes dépourvus de cette enzyme: *P. syringae* et *P. viridiflava*; (iii) les *Pseudomonas* spp. non-fluorescents phytopathogènes: *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* et *P. pseudoalcaligenes* (Kerstens *et al.*, 1996).

La présence ou non de cette enzyme est considérée comme un caractère taxinomique permettant l'identification des espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents étudiées. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents à cytochrome oxydase positive sont des microorganismes hétérotrophes qui ont l'aptitude d'utiliser une gamme étendue de composés organique (Latour et Lemanceau, 1997). Contrairement aux espèces oxydase-négative qui sont toutes phytopathogènes (Misaghi et Grogan, 1969; Palleroni, 1984). Au sein des *Pseudomonas* spp fluorescents, les espèces saprophytes à cytochrome oxydase positive *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* et *P. putida* sont présentes à une densité élevée dans des environnements variés (Holloway, 1992; Schroth *et al.*, 1992). Les isolats sélectionnés, ont montré une diversité phénotypique considérable. En effet, l'espèce *P. fluorescens* est nettement dominante par rapport aux autres espèces retrouvées *P. putida* et *P. chlororaphis*.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents phytopatgènes oxydase positive isolés ont été caractérisé, en fonction de leur pouvoir pectolytique sur tranches de pomme de terre d'une part et l'induction de la réaction d'hypersensibilité sur plante hétérologue d'autre part (Lelliot *et al.*, 1966; Lelliot et Stead, 1987; Cottyn *et al.*, 2009).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont définis comme étant des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme recepteur final d'électrons (Palleroni, 1984). Cette respiration sur O₂ est celle qui présente le rendement énergétique le plus important suite au potentiel rédox élevé de l'oxygène. Elle est caractérisée par des cytochromes oxydases, transporteurs d'électrons terminaux qui réagissent directement avec l'oxygène (Latour et Lemanceau, 1997).

La capacité d'utiliser les nitrates à la place de l'oxygène comme récepteur final d'électrons, et donc de croître de manière anaérobie, est un autre caractère multi-enzymatique ayant une signification taxonomique considérable chez les *Pseudomonas* aérobies (Stanier *et al.*, 1966). Plusieurs isolats de notre collection sont dénitrifiants. Les capacités dénitrifiantes des *Pseudomonas* varient selon l'espèce et le biovar: *P. fluorescens* biovars I, V, et VI et *P. putida* peuvent uniquement réduire les nitrates (Palleroni, 1984), grâce à une nitrate réductase (Latour et Lemanceau, 1997). Alors que, *P. chlororaphis* et *P. fluorescens* biovars II, III et IV sont des germes dénitrifiants (Palleroni, 1984). Lors d'une étude où ont été comparées différentes souches de *P. chlororaphis* et *P. fluorescens* biovars II et III, Matsubara et Zumft (1982) ont montré que seules celles de *P. fluorescens* sont capables de réaliser une dénitrification complète. Les isolats dénitrifiants sont les plus compétitifs dans la rhizosphère (Botelho et Mendonça-Hagler, 2006).

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. La complexité du catabolisme de l'arginine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes (Cunin *et al.*, 1986). Elle est d'une grande importance physiologique puisqu'elle génère des substrats à haut niveau d'énergie, et constitue donc un mode d'élaboration d'ATP en anaérobiose (Stanier *et al.*, 1966). Il existe quatre voies distinctes d'assimilation de l'arginine chez *P. putida* et au moins trois d'entre elles existent chez les autres espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Cunin *et al.*, 1986 ; Haas *et al.*, 1990). Ces voies mettent en jeu d'autres acides aminés comme l'ornithine (Latour et Lemanceau, 1997). La dégradation de l'arginine est une voie caractéristique des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes (Thornley, 1960). Elle fonctionne seulement en absence d'O₂ et sous conditions non-dénitrifiantes, c'est-à-dire lorsque la chaîne respiratoire est totalement bloquée (Shoesmith et Sherris, 1960; Mercenier *et al.*, 1980). C'est la seule voie fermentative connue chez ces bactéries (Latour et Lemanceau, 1997).

La production de protéases extracellulaires, comme évidence l'hydrolyse de la gélatine, est une propriété universelle de *P. aeruginosa*, présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P. putida* (Stanier *et al.*, 1966). Selon les clés dichotomiques proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995), l'hydrolyse de la gélatine permet la distinction de *P. putida* des autres *Pseudomonas* spp. fluorescents. De même que la production de levane sucrase extracellulaire, qui est présente chez tout les pathovars de *P. syringae* (Hettwer *et al.*, 1995), présente aussi chez *P. chlororaphis*, quelques biovars de *P. fluorescens*, mais absente chez *P. putida* (Jacques, 1994; Bossis, 1995). Cette enzyme catalyse la synthèse de levane à partir du sucrose, mais catalyse aussi l'hydrolyse du levane en monosaccharides (Hettwer *et al.*, 1995), et le saccharose un diholoside non-réducteur (Pascal et Dedonder, 1972).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents utilisent préférentiellement les acides organiques du cycle de Krebs (Latour et Lemanceau, 1997). En effet, la plupart de nos souches utilisent le citrate et d'autres acides organiques. McGregor *et al.* (1992) ont montré chez *P. aeruginosa* l'inhibition des voies d'assimilation de substrats comme : le glucose, le fructose, le glycérol, le gluconate ou le DL glycérate, en présence d'acides organiques. Cette répression dure aussi longtemps que le composé ajouté est présent dans le milieu. Parmi les isolats étudiés, certains sont capables de dégrader des détergents tels que le Tween 80. De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules plus ou moins complexes (Latour *et al.*, 1996).

L'assimilation ou non du saccharose, du tréhalose, des pentoses et des polyols par les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes permet leur discrimination infraspécifique (Latour et Lemanceau, 1997). Quasiment tous les isolats étudiés sont capables d'assimiler comme seule source de carbone les sucres en C 6 les plus couramment rencontrés dans la nature (D-glucose, D-fructose). Et à une moindre mesure le D-mannose et galactose, ainsi que ceux en C 5 : L-arabinose et ribose, et des polyols tel que le sorbitol mannitol et l'inositol. Le comportement trophique des isolats étudiés rejoint celui des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes vis-à-vis des principaux oligo et polysaccharides (Latour et Lemanceau, 1997). En rattachant, *P. auréofaciens* comme sous espèce du groupe de *P. chlororaphis*. Peix *et al.* (2007), ont souligné le fait qu'en plus de la production de phénazines (phénazine-1-acide carboxylique : PCA), *P. auréofaciens* se distingue de l'espèce type *P. chlororaphis* par son pouvoir à assimiler le L-arabinose.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents utilisent de nombreux acides aminés comme sources de carbone, d'azote et d'énergie. Cette capacité d'assimilation permet leur discrimination infraspécifique (Palleroni, 1984). En effet, l'utilisation de certains acides aminés aromatiques tels que le tryptophane qui est largement retrouvé dans les exudats racinaires contribuerait à leurs compétences rhizosphérique. Benizri *et al.* (1998) ont observé qu'au niveau de la rhizosphère de maïs, les exudats influencent la production d'acide indole acétique par *P. fluorescens*.

Les profils trophiques des 48 isolats *Pseudomonas* spp. fluorescents issus des 4 sites ont été déterminés. Les résultats indiquent une distribution des isolats en fonction de leurs biotopes.

Les isolats du biotope non cultivé sont subdivisés en 7 classes distinctes, majoritairement en phénons (5 classes vraies), et 2 singletons. Par contre, l'analyse comparative des sites du biotope cultivé indique une différence quand à l'homogénéité des isolats.

Alors que dans le site Dirou, les isolats ont été subdivisés en 11 classes majoritairement singletons, le site Ras el oued n'a donné qu'une seule classe avec une similarité supérieure à 80%. Sur la base des données phénotypiques, Achouak *et al.* (2000) ont isolés du rhizoplan d'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica napus* des souches de *Pseudomonas* appartenant à une seule classe. Ces résultats suggèrent que la plante exerce un effet significatif sur le profil trophique des rhizobactéries. En effet, la sélection de la plante semble être plus forte pour les endophytes que pour les isolats de la rhizosphère et du rhizoplan (Latour *et al.*, 1996 ; Botelho et Mendonça-Hagler, 2006).

D'après Loper *et al.* (2011), des diversités génotypiques sont observées chez les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés des plantes (parties aériennes et souterraines). Auparavant, Latour *et al.* (1996) avaient aussi rapporté que des *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés de sol nu et rhizosphérique présentaient des diversités phénotypiques et génotypiques. Ces différences indiquent l'existence d'une diversité significative au niveau des espèces et des sous espèces.

L'analyse de la distribution de ces isolats en clusters en fonction de leurs origines a révélée : (i) la plante hôte a un effet sélectif sur la population de *Pseudomonas* spp. fluorescents, (ii) les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents diffèrent d'un sol non cultivé à un autre, (iii) les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents associées aux racines d'une plante donnée diffèrent d'un sol à un autre.

Par ailleurs Sutra *et al.* (2000), en dénombrant les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont remarqué une grande variabilité, au niveau du sol et de la rhizosphère de bananiers. Ces bactéries sont significativement moins abondantes dans le sol que dans la rhizosphère. Et donc, les résultats obtenus ont encore souligné le rôle de la rhizosphère dans la sélection de microorganismes tellurique. Il a été suggéré que la plante influencerait la structure et l'activité des communautés microbiennes en favorisant les populations qui lui sont bénéfique (Lynch, 1987 ; Cook *et al.*, 1995).

En accord avec Latour *et al.* (1996), Sutra *et al.* (2000), Botelho *et al.* (2006) et Botelho *et al.* (2011), l'influence de la plante se traduit par la réduction de la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents comparativement à celles du sol nu. Les isolats du sol non cultivé sont plus diversifiés (7 classes), contrairement aux isolats du site de Ras el oued où on a eu une unique classe, et le site Dirou avec 11 classes majoritairement des singletons.

Cette différence, entre les sites cultivés pourrait être due à l'âge et aussi la variété de pomme de terre, qui étaient différents, ce qui pourra expliquer la variabilité au niveau des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les isolats du site Dirou sont subdivisés en 11 classes, les différences des profils trophiques illustrent cette variabilité. Cette dernière peut s'expliquer par les propriétés du sol. En effet, le sol de ce site est argileux dont le pH est entre 7.5 à 8 (Beddar, 1990), par contre celui de Ras el oued est légèrement acide (6.42). En comparant les sols de Châteaurenard et de Dijon, Latour *et al.* (1996) ont suggéré que les caractéristiques du sol affectaient les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'une même plante, par le biais de leurs pH (8.05 et 6.91) respectifs. Auparavant, Höper *et al.* (1995), avaient montré qu'une augmentation du pH du sol par amendement en argile (illite), induisait une augmentation significative des populations endogènes de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

En comparant les classes phénotypiques déterminés par les dendrogrammes, et l'identification taxonomique réalisée par les clés dichotomiques de Jacques (1994) et Bossis (1995), ainsi que le schéma général de caractérisation établi par Digat et Gardan (1987), on a noté une divergence importante quand aux affiliations des isolats. Les isolats d'une même espèce ont été retrouvées réparties entre plusieurs classes, à l'exemple de *P. fluorescens*, la même constatation a été faite avec les biovars A et B de *P. putida* ; alors que *P. chlororaphis* est absente du schéma de Digat et Gardan (1987). On a aussi noté le regroupement de souches d'espèces différentes dans la même classe. C'est le cas des isolats du site Ras el oued.

De nombreux rapports, Bossis (2000), Delorme *et al.* (2002), Botelho et Mendonça-Hagler (2006), Bashanov et Yatsevich (2011), ont souligné les limites des méthodes phénotypiques dans la classification des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ramette *et al.* (2011), ont étudié les caractéristiques phénotypiques des *Pseudomonas* producteurs de diacétyl-phloroglucinol. Ils ont remarqué que la différence de ces bactéries avec *P. syringae* n'était du qu'au fait qu'elles soient positives pour l'oxydase et l'arginine dihydrolase, en plus du pouvoir d'assimilation de quelques sources de carbone. Mais elles sont étroitement liées au groupe de *P. chlororaphis*, avec lequel elles forment un même phénon. Cette variabilité phénotypique complétée par des études génotypiques, du segment ADNr 16S a aboutit à l'identification de deux isolats de notre collection (99% de similarité), le premier (isolat P₂) ayant une similarité avec *P. chlororaphis* sb. *aureofaciens* DSM6698, et le second (P₁₀) avec *P. putida* CM5002.

L'isolat 2 du site Dirou présente plusieurs caractéristiques bénéfiques. Loper *et al.* (2011), en analysant les populations de *Pseudomonas* spp. présents sur les surfaces aériennes et souterraines des plantes, qui appartiennent pour la plupart aux espèces *P. fluorescens* et *P. chlororaphis*; de part leurs diversité génétique, protègent les plantes des phytopathogènes.

D'autre part, la phylogénie basée sur l'analyse des segments ADNr 16S, *atpD*, *recA* et *carA* permet la distinction de *P. chlororaphis* sbsp. *aureofaciens* des autres sous espèces de *P. chlororaphis* (Peix *et al.*, 2007).

Selon ses caractéristiques phénotypiques, l'isolat 10 du site Dirou est identifié comme phytopathogène à oxydase positive, mais le séquençage du fragment ADNr 16S a révélée son affiliation à 99% à *P. putida* CM5002. Rainey *et al.* (1994) et Jacques et Morris (1995) ont rapporté le caractère épiphyte de *P. putida* et *P. fluorescens*. Capables d'endommager les feuilles des plantes, ce sont en fait des opportunistes responsables de macérations des légumes (Jacques, 1994).

La clarification de la taxonomie de *P. putida* et *P. fluorescens* requiert des recherches complémentaires qui associent aux méthodes phénotypiques classiques des méthodes génotypiques plus récentes tels que l'étude des gènes de ménage lorsque les espèces étudiées sont étroitement liées. Bossis *et al.* (2000), avait proposé cette taxonomie polyphasique pour différencier ces deux espèces, qui a pu démontrer que la variabilité génomique des isolats de *P. putida* et *P. fluorescens* identifiés par les méthodes phénotypiques, allait de 0 à 100%.

L'analyse de la séquence ADNr 16 S est la base de la classification actuelle des bactéries (Peix *et al.*, 2009). Toutefois, elle n'est pas suffisamment discriminatoire pour permettre une résolution intra-spécifique, due à l'évolution très lente de cette séquence. D'autre part, les résultats obtenus avec cette séquence ne sont pas suffisamment corrélés avec les hybridations ADN/ADN, qui sont des critères de définition des espèces (Yamamoto *et al.*, 2000). Au contraire, les gènes *gyrB* codant la gyrase, *rpoD* la sous unité σ (Yamamoto *et al.*, 2000) et *rpoB* la sous unité β de l'ARN polymérase (Ait-Tayeb *et al.*, 2005) donnent de bonnes corrélations avec ces hybridations. En effet, la résolution obtenue avec les gènes *rpoB* est approximativement trois fois plus importante que celle obtenue avec la séquence ADNr 16 S (Ait-Tayeb *et al.*, 2005).

Ramette *et al.* (2011), en combinant la caractérisation phénotypique (classification numérique) et des études génotypiques (sidérotypage, les séquences ADNr 16S, hybridation ADN/ADN, et l'étude des gènes de ménage : *rpoB*, *rpoD* et *gyr B*), et sur la base d'une approche polyphasique, ont pu regrouper et renommer des souches de *Pseudomonas* producteurs de diacétyl- phloroglucinol. Ces bactéries sont désormais connues sous le nom de *Pseudomonas protegens* sp. nov.

La présence d'ADN plasmidique n'est liée ni aux spécificités trophiques, ni aux origines des isolats. En accord, avec des travaux précédents, Latour *et al.* (1996), ont souligné la très faible présence d'ADN plasmidique chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

5. CONCLUSION

Le schéma d'identification modifié par Digat et Gardan (1987) ainsi que les clés proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995), pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents à oxydase positive, basés sur les caractères phénotypiques décrits par Stanier *et al.* (1966), ne peuvent être utilisés que pour une identification préliminaire. Bossis *et al.* (2000), avaient souligné les limites de ces méthodes, et avaient proposé une approche polyphasique combinant les méthodes phénotypiques avec des études génotypiques. Cette approche polyphasique a d'ailleurs permis de caractériser un grand nombre de bactéries durant les 5 dernières années.

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 où de nombreux isolats n'ont pu être identifiés. Globalement, on a remarqué que les similarités trophiques pour certains de nos isolats ne dépassaient pas 55%, qui taxonomiquement appartiennent à la même espèce ou au même biovar. Ceci, confirme une fois de plus la diversité métabolique au sein de ce groupe de bactéries.

Les isolats étudiés ne proviennent pas de sites assez diversifiés. Les sites étudiés ont soit reçu, soit sont utilisés pour la culture de la pomme de terre. Toutefois, les sites étudiés présentent des diversités (i) caractéristiques physico chimiques du sol (variabilité du pH), (ii) la pluviométrie est fortement variable, (iii) la majorité des sites ont longtemps été à vocation céréalière, le développement de la culture de la pomme de terre est récent. Ces facteurs, peuvent influencer la diversité et constituer une pression écologique déterminante sur ces rhizobactéries.

CHAPITRE III

MÉTABOLITES IMPLIQUÉS DANS LA SUPPRESSION

1. INTRODUCTION

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant le milieu avec des commensaux représentés principalement par les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve partout, particulièrement dans les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Leur capacité à coloniser les racines et d'y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette rhizocompétence vient du fait de leur croissance qui est plus élevée que celle de la plupart des autres rhizobactéries, et de leur capacité à métaboliser les composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire, et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Fenton *et al.*, 1992; Chin-A-Woeng *et al.*, 2001).

Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers permettent une grande compétition pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Iavicoli *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Pourtant, dans la majorité des cas d'inhibitions, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène.

Le premier rapport sur l'utilisation d'un *Pseudomonas* produisant un antibiotique pour le contrôle d'un agent pathogène racinaire, en l'occurrence *Rhizoctonia solani*, est venu de Howell et Stipatovic en 1979. Ces auteurs, identifièrent la pyrrolnitrine produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* comme facteur permettant d'inhiber le pathogène.

Par contre, on doit à Thomashow et Weller, neuf ans plus tard, la première démonstration expérimentale, utilisant une approche génétique, par des mutants déficients en leur capacité à produire l'antibiotique, pour démontrer l'implication d'un antibiotique par une souche de *Pseudomonas* dans la suppression d'un agent phytopathogène.

Ces derniers ont utilisé une souche de *P. fluorescens* productrice de phénazine carboxylate, isolée de la rhizosphère du blé, et fortement antagoniste envers *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Thomashow et Weller, 1988). Ce type de démonstration a depuis lors été réalisé également pour d'autres composés comme le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, la pyoluteorine et l'acide cyanhydrique (Haas et Keel, 2003).

Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont essentiels ni à la croissance ni à la multiplication. Mais, peuvent jouer un rôle important dans les interactions entre les espèces de *Pseudomonas* et/ou avec d'autres organismes, particulièrement durant le biocontrôle et la pathogenèse (Lau *et al.*, 2004).

Dans cette partie, nous avons essayé de mettre en évidence *in vitro* la production de quelques uns de ces métabolites secondaires chez un ensemble d'isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ces isolats proviennent d'un même biotope mais possèdent des caractères différents.

2. MATERIEL ET MÉTHODES

2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les souches de *Pseudomonas* spp. produisant un pigment fluorescent sur King B ont fait l'objet d'une étude quant à leur pouvoir à produire certains métabolites secondaires: d'une part sidérophores, acide indole acétique (IAA), les phosphatases, les cellulases, les lipases, les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE : enzymes ayant une activité protéolytique et chitinases). Et d'autre part, par production d'antibiotique tel que l'acide cyanhydrique (HCN) et les phénazines (La phénazine-1-carboxylate [PCA], utilisée comme standard, nous a été offerte aimablement par le Dr Tomashow, Pullman Whashington, USA).

2.2. PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES

2.2.1. Synthèse des sidérophores

La détection de la synthèse des sidérophores a été réalisée dans le milieu O-CAS (overlayered chrome azurol S) en boîte de Pétri selon les méthodes modifiées décrites par Pérez-Miranda *et al.* (2007). Le milieu CAS est préparé selon Schwyn et Neilands (1987), mais ne contenant pas de substances nutritives et l'agar est remplacée par l'agarose comme substance gélifiante. A cet effet, les bactéries sont cultivées sur gélose au succinate (Meyer et Abdallah, 1978), et sur gélose à l'hydrolysate de caséine (Serino *et al.*, 1995) pendant 18h à 28°C. La détection des sidérophores est accomplie en recouvrant la culture bactérienne de 10ml de milieu CAS modifié. Après, au moins 15 min un changement de couleur dans la couche de gel rajoutée autour des colonies du microorganisme producteur est observé. La couleur vire du bleu vers le pourpre pour les sidérophores de type catéchol, et du bleu vers l'orange pour les sidérophores de type hydroxamate (Schwyn et Neilands, 1987).

L'influence du milieu de culture sur la production des sidérophores a été testée. En plus, du milieu au succinate (MS), quatre autres milieux ont été utilisés: KB (King B), à l'hydrolysate de caséine (CAA), PDB (Potato Dextrose Broth) et le TSB (Tryptic Soy Broth), le pH est ajusté à 7.

L'estimation de la production de sidérophores a été effectuée par la méthode de Jacques *et al.* (1995). Toute la verrerie a été rincée à l'acide chlorhydrique concentré, puis à l'eau bidistillée avant stérilisation. Les bactéries provenant de cultures de 18h sont transférées dans 50ml de milieu liquide au succinate (MS), incubées en agitation continue (150 rpm) pendant 40h à 28°C.

Le taux de croissance est évalué par spectrophotométrie à 540nm, où une unité d'absorbance équivaut à 5.10^8 (U.F.C). Après centrifugation (4000 rpm/15min à 4 °C), l'absorbance du surnageant est déterminée à 400 nm (spectrophotomètre : JENWAY 6300) et la quantité de sidérophores calculée en utilisant le coefficient d'absorbance molaire ($\epsilon = 27000 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$) selon la méthode décrite par Jacques *et al.* (1995). Parallèlement, on a essayé de quantifier la production d'acide salicylique dans le milieu à l'hydrolysate de caséine CAA, dans des conditions de culture similaires à celle décrite pour les sidérophores. L'établissement d'une courbe d'étalonnage avec du 3,5-dinitro-acide-salicylique permet de déterminer la concentration d'acide salicylique produit (Serino *et al.*, 1995).

L'influence de l'effet de l'incorporation de FeCl_3 (100 $\mu\text{m/l}$) dans le milieu MS est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment, et est comparée aux résultats précédents (Georges et Meyer, 1995).

Les surnageants obtenus pour quantifier les sidérophores ont été stérilisés par filtration (0.22 μm). Ont fait l'objet d'une électrophorèse sur papier Wattman n° 3, révélés par la solution CAS selon les conditions décrites par Schwyn et Neilands (1987), et font l'objet d'analyses chimiques pour déterminer la nature des sidérophores produits (Baakza *et al.*, 2004). La synthèse de sidérophores s'accompagne par la synthèse de protéines cytoplasmiques, celles-ci sont réprimées en présence de fer. Les culots cellulaires sont alors récupérés, pour rechercher ces protéines cytoplasmiques (IRCP :Iron Repressed Cytoplasmic Proteins) selon la méthode décrite par Georges et Meyer (1995).

2.2.1.1. Electrophorèse des sidérophores

Une électrophorèse sur papier est appliquée aux surnageants préalablement stérilisés. Le tampon de migration est constitué de 24,3 ml de pyridine et 5,7 ml d'acide acétique glacial complété avec de l'eau distillée à 1l, le pH est de 5.6. La migration se fait à 30V/cm² pendant 1heure. Le papier est séché à l'étuve, est révélé par la solution CAS sur les deux faces. Le développement d'une coloration rose indique la présence de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987).

2.2.1.2. Détermination de la nature chimique des sidérophores

a. Les hydroxamates

- **Test au FeCl_3 (Neilands, 1981):** 1 à 5ml d'une solution de chlorure ferrique à 2 % est rajoutée à 1ml de filtrat. La formation d'une couleur rouge à pourpre indique la présence de sidérophores. Un maximum d'absorbance entre 420 à 450nm indique la présence de sidérophores de type hydroxamate.

- **Test au tetrazolium (Snow, 1954)**: l'ajout de 1 à 2 ml d'NaOH concentrée à 1 ml de filtrat enrichie avec du sel de tetrazolium, donne une couleur rouge en présence d'hydroxamates.

b- Les catécholates

- **Test d'Arnow (Arnow, 1937)** : s'effectue par, l'ajout de 0.1ml de HCl (5N) et 0.5ml de réactif (20% NaNO_2 et 20% de Na_2MoO_4) à 1ml de filtrat. Lorsqu'une couleur jaune se développe, on rajoute alors 0.1ml de NaOH (10N), si une coloration rouge est observée, le volume est complété à 5ml, et l'absorbance est déterminée à 515nm.

- **Test au FeCl_3 (Neilands, 1981)**: 1ml de FeCl_3 à 2% est rajouté à 1ml de filtrat. Un maximum d'absorbance à 495 nm indique la présence de ferri-sidérophores de type catécholate.

c. Les carboxylates

- **Test Shenker *et al.* (1992)**: 1ml de CuSO_4 (250 μM) et 2ml de tampon acétate (pH 4), sont additionnés à 1ml de filtrat. Le complexe cuivreux formé présente un maximum d'absorption entre 190 et 280 nm (spectrophotomètre : Cecil CE3021 UV/Visible 3000series).

2.2.1.3. Synthèse des IRCP (Iron Repressed Cytoplasmic Proteins)

Pour la lyse cellulaire, les culots cellulaires sont suspendus dans 1 ml de tampon phosphate 0.1M (pH 7), et soumis à une sonication (Soniprep 150 MSE) à 10 μ pendant 30s (l'opération est répétée 5 fois).

Pour une purification partielle des protéines solubles, les surnageants sont récupérés après centrifugation (13200 rpm / 45 mn à 4°C). Ces surnageants sont complétés à 1.5ml avec du tampon phosphate auquel on rajoute de la polymine P (concentration finale 0.1%). La précipitation des protéines est alors effectuée par saturation à 50% avec du sulfate d'ammonium, et incubation pendant la nuit à 4°C.

Le précipité protéique fait l'objet d'une dialyse (Vivaspin Concentrators de Millipore), par solubilisation dans 1ml de tampon Tris-HCl 0.125M (pH 6.8). Les protéines sont alors quantifiées par la méthode de Bradford, et font l'objet d'une électrophorèse SDS-PAGE avec un gel à 5% de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970). La détection des bandes protéiques est révélée par la méthode conventionnelle au Bleu Brillant de Coomassie R-250 (Blum *et al.*, 1987).

2.2.2. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)

2.2.2.1. Estimation de la production d'AIA

La production d'IAA est déterminée selon la méthode standard (Bric *et al.*, 1991). Une colonie isolée est étalée sur gélose Luria-Bertani additionnée de : 5 mM de L- tryptophane, 0.06% de SDS, et 1% de glycérol. La gélose est recouverte de papier Whatman n° 1 (80mm de diamètre), puis incubée à 28°C. Le papier est récupéré, puis traité avec le réactif de Salkowski (2% de FeCl₃ à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique). Les disques de papier filtre sont saturés dans une boîte de Pétri en les plongeant directement dans le réactif, après 10 à 30 min. La production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies, et pour les souches productrices d'autres types d'indoles la coloration est jaune à jaune brune (Naik et Sakthivel, 2006).

2.2.2.2. Quantification de l'AIA

La quantification d'AIA et de ses dérivés a été évaluée par une méthode colorimétrique (Loper et Scroth, 1986; Bric *et al.*, 1991; Glickmann et Dessaux, 1995). Un volume de 100µl d'une culture fraîche (Absorbance₆₀₀ = 0.7) sont inoculées dans 100ml de TSB (Tryptic Soy Broth) dilué au demi, et additionné ou non de L-tryptophane (200µg/ml). Après une incubation à 28°C et à l'obscurité pendant 72h et sous agitation permanente (150 rpm), les cellules sont séparées par centrifugation (4000g / 10min), et le surnageant est filtré. A 1ml de filtrat 2ml du réactif de Salkowski sont ajoutés, la suspension est vortexée puis incubée à l'obscurité pendant 20min, l'absorbance est mesurée à 535 nm (Gravel *et al.*, 2007). Le développement d'une coloration rose est l'indicateur de la production d'AIA (Tarnawski *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008). La concentration d'AIA et de ses dérivés, est obtenue par extrapolation des valeurs des souches productrices par rapport à une courbe standard, établie à partir d'une série de dilutions d'AIA (Sigma-Aldrich) à 50µg/ml dans du TSB (Gravel *et al.*, 2007).

2.3. PRODUCTION D'ENZYMES

2.3.1. Phosphatases

La solubilisation des phosphates a été évaluée qualitativement sur milieu de Pikovskaya (Ahmad *et al.*, 2008), selon la méthode décrite par Mehta et Nautiyal (2001). Cette méthode est basée sur la décoloration du Bromo-Phenol-Bleu (BPB) suite à un abaissement du pH du milieu par production de phosphatases. Des aliquotes de 100µl (10⁷ cellule/ml) de cultures fraîches sont inoculées dans le milieu liquide, et/ou déposées sur gélose de Pikovskaya, à raison de trois répétitions, incubés pendant 96h à 28°C (le milieu liquide est incubé sous agitation à 150 rpm).

La décoloration du milieu liquide et autour des spots sont des indicateurs d'une solubilisation des phosphates. Les cultures liquides sont centrifugées (4000g / 10min), et l'absorbance des surnageants est mesurée à 600nm.

2.3.2. Cellulases

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

2.3.3. Lipases

La recherche de lipases est effectuée par la mise en culture des isolats sur TSA additionné de 1% d'acide oléique. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo autour des colonies (Degroot *et al.*, 1991).

2.3.4. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

2.3.4.1. Enzymes protéolytiques

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

2.3.4.2. Chitinases

L'activité chitinolytique est estimée selon la méthode décrite par Reniwick *et al.*, (1991) sur gélose à la chitine additionnée ou non de glucose. La formation d'halos clairs autour des colonies après 5 jours d'incubation à 30° C indique une chitinase positive (Naik et Sakthivel, 2006).

2.4. SYNTHÈSE D'ANTIBIOTIQUES

2.4.1. Production de substances volatiles (HCN)

La cyanogenèse a été évaluée d'une part sur milieu liquide, et d'autre part sur milieu solide. La première a été effectuée selon la méthode décrite par Meena *et al.*, (2001), où les isolats bactériens sont cultivés pendant 48h à 28°C sous agitation (180rpm) dans des Erlenmeyer contenant 50ml de TSB.

Des bandelettes de papier Whatman n° 1 (0.5/10cm) saturées avec une solution de picrate alcaline, sont suspendues verticalement dans ces Erlenmeyer. Le picrate de sodium présent dans le papier change de couleur en fonction de la production d'HCN (Verma *et al.*, 2007).

La seconde est une méthode adaptée de celle de Lorck (1948). Sur une gélose nutritive additionnée de 4.4g/l de glycine, les isolats bactériens sont ensemencés par strie, un disque de papier Whatman n°1 saturé en picrate alcalin sont déposés dans les couvercles des boîtes, ces dernières sont scellées au parafilm et incubées inversées à 28°C pendant 4 jours (Ahmad *et al.*, 2008 ; Trivedi *et al.*, 2008). Le virage de la couleur: du jaune vers le brun clair au rouge brun indique respectivement une production modérée et élevée d'HCN par la bactérie productrice (Trivedi *et al.*, 2008). Dans les deux cas, trois répétitions ont été effectuées, le témoin négatif est représenté par un milieu sans inoculum, alors que le témoin positif est représenté par la souche de référence *P. fluorescens* CHAO.

2.4.2. Production de substances diffusibles : Phénazines

2.4.2.1. Sélection des souches antagonistes *in vitro*

La détection d'éventuelles activités antifongiques et antibactériennes, a été effectuée chez 14 souches sélectionnées. Ces souches ont été confrontées à une collection de phytopathogènes composée de six isolats fongiques (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Fusarium solani*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Phytophthora infestans*) et trois isolats bactériens (*Escherichia coli* M400, *Pseudomonas diminuta*, *Micrococcus paratrophus*).

Le pouvoir antimicrobien des isolats est déterminé par la mise en culture duelle des isolats avec des champignons et bactéries phytopathogènes. Les méthodes utilisées sont respectivement celles décrites par Vincent *et al.* (1991) et Veselova *et al.* (2008).

Pour la première, les isolats bactériens sont étalés sur un front d'une boîte de Pétri contenant du PDA et incubés pendant une nuit à 28°C, à l'opposé un disque fongique de 8mm venant d'une culture de 7 jours est déposé. Les boîtes sont alors incubées pendant une semaine à température ambiante, et la distance séparant les bactéries du mycélium est mesurée, et est comparée au témoin ne contenant que le disque fongique inoculé sur un front de la boîte.

Le pouvoir antibactérien est évalué sur gélose LB. Les isolats y sont ensemencés pendant 48h à 28°C. Les bactéries sont alors tuées par les vapeurs de chloroforme, et recouvertes ensuite par 3ml d'une gélose (0.6% d'agar) en surfusion contenant 10^7 cellules indicatrices.

Après incubation de 18 à 20 h à 28°C, l'activité antibactérienne se traduit par des halos clairs autour des colonies des bactéries testées. Le témoin est représenté par la culture de la souche de bactérie indicatrice sur une gélose préalablement exposée au chloroforme.

2.4.2.2. Détection et extraction des métabolites à effet antibiotique

La recherche de métabolites à effet antibiotique a été effectuée chez les souches ayant manifestées un pouvoir antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes fongiques et bactériennes. La production d'antibiotique de nature phénazinique se manifeste par des colonies pigmentées aussi bien sur King B, sur gélose à l'extrait de levure (NYA), que sur PDA; qui lorsqu'elles sont examinées sous UV à 365nm révèlent des zones sombres autour des colonies produisant des phénazines (Thomashow et Weller, 1988).

La production des phénazines, *in vitro*, a été recherchée dans le milieu NBY (nutrient broth yeast extract) additionné de glucose à 2% (James et Gutterson, 1986). Les composés phénaziniques ont été extraits selon la méthode décrite par Thomashow et Weller (1988) et modifiée par Bonsall *et al.* (1997), les isolats bactériens sont mis en incubation pendant 72 h à 28°C, sous agitation permanente (180 rpm). Les cultures sont acidifiées (pH2) avec du HCl concentré, puis extrait deux fois avec le même volume de benzène ou d'acétate d'éthyle. La phase organique contenant les phénazines, est d'abord filtrée à travers du sulfate d'ammonium anhydre, ensuite évaporée sous vide dans un rotavapor à 55° C (James et Gutterson, 1986), et l'extrait sec est remis en suspension dans du méthanol ou dans de l'acétonitrile à 0.1% d'acide tri-fluoro-acétique (Delanay *et al.*, 2001).

2.4.2.3. Quantification des phénazines

Une courbe standard établie avec la phénazine-1-carboxylate (PCA) purifié qui nous a été offert par le Dr Thomashow (Université de Pullman Washington, USA); les absorbances des extraits sont déterminées par spectrophotométrie à 364 et 251 nm (Spectrophotomètre: Cecil CE3021 UV.Visible 3000series), et les valeurs correspondantes sont déduites en microgramme.

2.4.2.4. Analyse des composés à effet antibiotique: phénaziniques

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

a. Chromatographie en couche mince

La première étape consiste alors à fractionner l'extrait par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice (0.25 mm d'épaisseur). Le volume de dépôt est de 150µl à (le standard étant la PCA), et plusieurs phases de migration ont été essayées et celui qui a été retenu est composé de chloroforme/acétate d'éthyle (1/1). Après migration et évaporation du solvant, les plaques sont visualisées sous UV (365 nm) et les différentes fractions de l'extrait brut sont délimitées, et leurs rapports frontaux calculés (*R_f*).

Chaque bande de silice est gratée puis mise en suspension dans du méthanol, et est énergiquement agitée afin d'en extraire le composé. Cette opération est répétée 5 fois. Les fractions organiques collectées pour chaque bande sont soumises à une concentration par évaporation (dans les mêmes conditions que précédemment). Ces fractions ont été balayées par spectroscopie UV (dans une solution à 0.1N NaOH) afin de les déterminer les fractions ayant une activité antifongique. Cette méthode a été adaptée par Pierson et Thomashow (1992) selon Toohey *et al.* (1965).

b. Spectroscopie UV-visible

Parallèlement, une spectroscopie UV-visible (Spectrophotomètre: Cecil CE3021 UV.Visible 3000 series) a été menée, où plusieurs longueurs d'ondes ont été utilisées pour essayer de déterminer la composition de l'extrait brut (afin de déterminer les pics d'absorptions maximales). Le choix de ces longueurs d'ondes (237, 246, 251, 259, 313, 364, 367 et 376 nm), a été fait en fonction des maximums d'absorbance de composés phénaziniques connus (Fernandez et Pizzaro, 1997; Delanay *et al.*, 2001; Mavrodi *et al.*, 2001; Veselova *et al.*, 2008).

c. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Pour confirmer la présence et la quantification des composés phénaziniques, l'extrait brut a fait l'objet d'une analyse par HPLC. Un protocole général d'HPLC a été développé pour ces métabolites par Delanay *et al.* (2001). Le système utilisé, est le système Agilent 1100 series doté d'un détecteur spectrophotométrique UV-visible DAD (Diode Array detector G1315A), et une colonne ACE C18 (4.6x250 mm). Les expérimentations ont été réalisées en phase inverse, la phase stationnaire de la colonne C18 est constituée de groupements organiques apolaires, et la phase mobile (solvant) est polaire, elle consiste en un mélange d'ACN à 0.1% TFA dans de l'eau bi distillée avec un gradient continu (linéaire 35 :65). L'extrait est remis en suspension dans 0.6 ml de méthanol pur et filtré (0.45µm). Le débit du solvant est de 0.7 ml /min, et la longueur d'onde de détection est comprise entre 250-450 nm. Les composés phénaziniques sont identifiés par leurs temps de rétention et leurs spectres UV (Delanay *et al.*, 2001 ; Veselova *et al.*, 2008).

d. Determination du poids moléculaire des molécules actives par GC/MS

Cet extrait a fait l'objet d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectroscopie de masse (GC/MS) afin de déterminer : le poids moléculaire et confirmer l'identité des molécules. Les conditions de la GC/MS effectuée sont celles décrites par Saosoong *et al.* (2009) avec un chromatographe de type Hewlett Packard 6890 couplé à un spectrophotomètre de masse quadripôle modèle 5973. Des aliquotes de 5µl de l'extrait méthanolique sont injectés en mode splitless avec l'hélium comme gaz vecteur ayant un débit de 1 ml/min, dans une colonne capillaire HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). La température de l'injecteur est de 250°C (60°-250° pente 6°/ min). Alors que les températures du Spectromètre de masse sont : interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C). Les spectres sont enregistrés en mode SCAN en considérant la variation m/z de 5 à 280, avec une énergie d'ionisation de 70eV.

3. RESULTATS

3.1. PRODUCTION DE SIDEROPHORES

La recherche de la production de métabolites secondaires a été testée sur les 14 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents issus de la rhizosphère de pomme de terre (Tableau XI).

Tableau XI: Nombre et taux des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents producteurs de métabolites secondaires

	Sid	AS	IAA	Pases	CWDE	HCN	PHZ
Nombre de souches	14	8	5	5	3	4	1
Pourcentage*	100	57.14	35.71	35.71	21.4	28.57	7.14

Sid: sidérophores, AS: acide salicylique, IAA: acide indole acétique, CWDE: enzymes dégradant les paroi cellulaires, HCN: acide cyanhydrique, PHZ: phénazines, Pases: phosphatases, *: pourcentage par rapport aux 14 isolats testés.

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 sur le milieu O-CAS indiquant la production de sidérophores (Fig. 13).

La quantification et caractérisation de la production des sidérophores ont été faites avec plusieurs souches de *Pseudomonas*. La production maximale de sidérophores a été observée dans le milieu succinate (MS) avec des quantités atteignant 71.11 µg/l chez la souche P₂, alors qu'elle est modérée 7.03 µg/l chez la souche P₁₅. Le milieu King B arrive en deuxième position avec une production de 65.14 µg/l chez la souche P₂. Alors que dans le milieu PDB et TSB la production de sidérophores était relativement très faible, pour toutes les souches (Tableau XII).

Les souches étudiées ont montré des niveaux de synthèse de sidérophores appréciables sur MS, mais leur croissance était relativement faible. Dans le milieu KB on a noté une production appréciable de sidérophores (Annexe III A), avec une bonne croissance. Alors que dans le milieu PDB et TSB où la croissance était relativement importante, la production de sidérophores était pratiquement négative.

L'incorporation des ions Fe²⁺, apportés sous forme de FeCl₃, a influencé la production de sidérophores chez les souches étudiées. A croissances relativement égales de souches dans le milieu MS et MS+ FeCl₃, la synthèse de sidérophores a nettement régressée dans ce dernier (Tableau XIII), de même que le type de sidérophores (Tableau XIV).



Figure 13: Production de sidérophores sur milieu au succinate O-CAS

T : témoin ; P₂ , P₅, et P₁₀ : isolats de *Pseudomonas* 2, 5 et 10.

Tableau XII: Influence des milieux de culture sur la production de sidérophores.

Isolat	MS	King B	PDB	TSB
P ₁	66.92 ^a (1.12) ^b	54.44(1.528)	6.18(0.499)	6.05(0.655)
P ₂	71.11(1.207)	65.14(1.759)	3.75(1.389)	4.5(1.015)
P ₅	44.14(1.12)	33.17(1.257)	9.07(0.348)	10.2(0.453)
P ₇	65.48(1.064)	37.92(1.224)	5.4(0.321)	5.78(0.538)
P ₈	48.74(1.079)	52.25(1.431)	4.6(1.354)	5.01(1.257)
P ₁₀	66.33(0.877)	36.22(1.491)	10.4(0.608)	9.17(0.589)
P ₁₁	23.7(0.608)	27.14(1.267)	1.49(0.644)	2.3(0.688)
P ₁₂	nd	33.51(1.433)	nd(0.495)	nd
P ₁₃	27.92(0.298)	30.22(1.112)	1.26(0.564)	nd
P ₁₄	nd	33.88(1.151)	2.15(0.677)	nd
P ₁₅	7.03(0.400)	36.22(1.373)	3.4(1.036)	nd
P 30-84	58.37(1.028)	70.62(1.435)	5.2(1.380)	nd

P₁, 2,15: *Pseudomonas* isolées, P 30-84: *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, MS: milieu au succinate, PDB: potato dextrose broth, TSB: tryptic soy broth a: quantité de sidérophores en µg/l, b: DO₅₄₀ de la croissance bactérienne, nd: non déterminé.

La sensibilité de l'électrophorèse, nous a permis d'analyser le contenu en sidérophores des surnageants des cultures bactériennes. La révélation par la solution CAS, a permis d'obtenir des spots de couleur rose de mobilité relative similaire. L'intensité de cette couleur était variable d'un isolat à un autre, la valeur la plus élevée a été observée chez la souche P₂, qui était plus intense que celle des souches de référence 30-84 et CHAO.

Tableau XIII: Production de sidérophores sur milieu au Succinate en absence et en présence de FeCl₃

isolat	Croissance ^a	Concentration ^b	Concentration ^c	Fluorescence ^d
P ₁ ^e	5.6	4.3	66.92	++
P ₁ ^f	4.255	4.5	21.48	-
P ₂ ^e	6.035	4.1	71.11	++
P ₂ ^f	5.08	5.5	34.33	-
P ₄ ^e	1.46	nd	Nd (0.4)	±
P ₅ ^e	5.6	4.5	44.14	++
P ₅ ^f	4.08	5	20.81	-
P ₆ ^e	3.15	nd	14.11	++
P ₇ ^e	5.32	6.7	65.48	Nd
P ₇ ^f	4.535	7.7	23	
P ₈ ^e	5.395	6.2	48.74	+
P ₈ ^f	4.65	7.2	24	-
P ₁₀ ^e	4.385	6.4	66.33	++
P ₁₀ ^f	4.925	6.0	27.51	-
P ₁₁ ^e	3.04	nd	23.7	++
P ₁₁ ^f	3.795	nd	Nd	-
P ₁₃ ^e	1.49	nd	27.92	+
P ₁₅ ^e	2	nd	Nd(7.03)	+
P ₃₀₋₈₄ ^e	5.14	nd	58.37	++
P ₃₀₋₈₄ ^f	4.765	nd	14.59	-

a : croissance bactérienne x10⁸ UFC à 540 nm, b : concentration des protéines cytoplasmiques (µg/µl), c : concentration du surnageant en sidérophores (µg/ml), d : fluorescence du surnageant (- : absente, + : légère, ++ : intense), P1, 2, 15: *Pseudomonas* isolées, P 30-84 : *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, e : en absence de FeCl₃, f : en présence de FeCl₃, Nd : non détectable, nd : non déterminé.

Les souches sélectionnées pour cette étude produisent différents types de sidérophores (Tableau XIV), et qui ont été recherchés sur milieu MS en absence et en présence de 100µM de FeCl₃ (Tableau XIII; Annexe III B1). Alors que, la plus part des souches produisent des sidérophores de type hydroxamates, quelques unes seulement produisent les sidérophores de type catécholates (5/6 isolats), et carboxylates (4/6 isolats*). Chez la plupart des souches étudiées la concentration de protéines cytoplasmiques solubles était plus élevée dans le milieu supplémenté en fer (Tableau XIII) toutefois on a observée l'absence de certaines bandes protéiques en présence de ce dernier (Figure 14; Annexe III C).

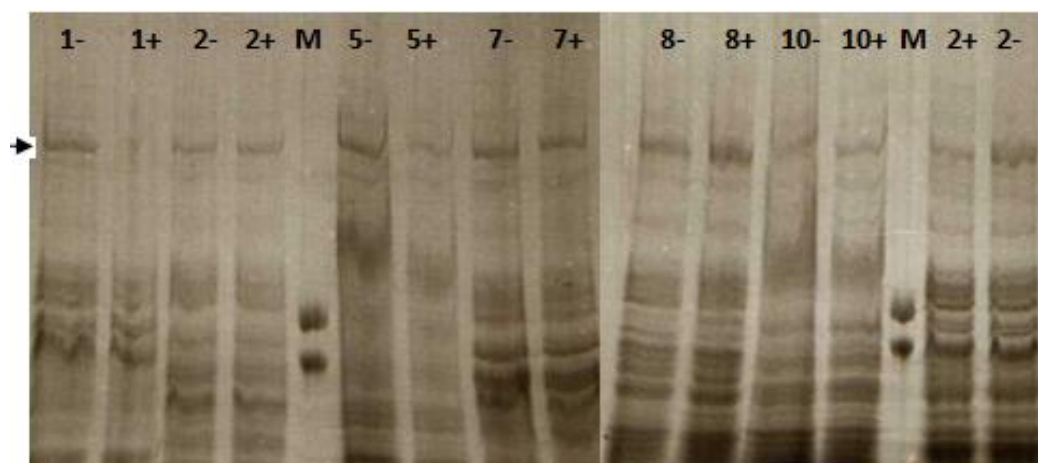


Figure 14: Electrophorèse SDS-PAGE des protéines cytoplasmiques solubles.

M : marqueur de taille, 1-, 1+,10-,10+ : correspondent aux isolats de *Pseudomonas* cultivées en absence(-) et en présence(+) de FeCl_3 , la flèche indique la bande qui est absente ou moins intense en présence de FeCl_3 .

Tableau XIV: Détection de la nature chimique des sidérophores produits par les *Pseudomonas* spp.

Isolats	Hydroxamates				Catécholates		Carboxylates	
					Pic à 495 nm	Test d'Arnow		Test de Shenker
	Test au FeCl_3	Pic à 420 nm	Pic à 450 nm	Test au tétrazolium		couleur	Pic à 515 nm	Pic à 250nm
P 1 ^a	-	Nd	0.331	Rouge++	Nd	-	Nd	0.500
P 1 ^b	-	Nd	0.135	-	Nd	-	Nd	0.198
P 2 ^a	-	Nd	0.478	Rose	0.401	-	Nd	0.190*
P 2 ^b	-	Nd	0.290	-	0.103	-	Nd	0.493
P 5 ^a	-	Nd	0.730	-	0.205	-	Nd	0.500
P 5 ^b	-	Nd	0.415	-	Nd	-	Nd	0.190
					(0.003)			
P 7 ^a	-	0.225	0.464	Rose	0.092	-	0.010	0.197*
P 7 ^b	-	0.110	0.387	-	0.033	-	0.008	0.465
P 8 ^a	-	0.330	0.530	Rouge	0.383	-	0.122	0.197*
P 8 ^b	-	0.130	0.330	-	0.246	-	0.037	0.343
P 10 ^a	-	Nd	0.316	-	0.197	-	0.400	0.081*
P 10 ^b	-	Nd	Nd	-	Nd	-	0.264	0.266
					(0.006)			

^a : culture sans FeCl_3 , ^b : culture en présence de FeCl_3 , 420, 450.... : longueur d'ondes à laquelle sont déterminés les densité optique, Nd : non détectable, - : absence de coloration, * : coloration jaune verte (témoin négatif bleu), P1, 2, 15: *Pseudomonas* isolées.

3.2. PRODUCTION DE L'ACIDE SALYCILIQUE

Plusieurs souches déjà sélectionnées pour leur pouvoir à produire des sidérophores, produisent de l'acide salicylique sur milieu au CAA (Annexe III B2), parmi les quelles on retrouve celles ayant produit de l'IAA et de l'HCN, avec des concentrations variant de 57 à 89 µg/ml (Tableau XV; Annexe III D1 et D2).

Tableau XV: Détection de la production d'acide salicylique.

Isolats	Taux de	[Ac. Sal] µg/ml
P 1	5.825	82.5
P 2	5	57
P 4	6.35	89
P 5	Nd	Nd
P 6	1.356	58
P 7	Nd	Nd
P 8	9.295	77
P 10	Nd	Nd
P 11	8.905	72
P 12	Nd	Nd
P 13	7.795	78
P 15	5.595	61.5
P 30-84	8.235	87
P CHAO	7.9	80.5

* : croissance bactérienne x10⁸ UFC à 540 nm, P1, 2, 15: *Pseudomonas* isolées, P 30-84 : *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, P CHAO : *Pseudomonas fluorescens* CHAO, Nd : non détectable, [Ac. Sal] µg/ml : Concentration d'acide salicylique en µg/ml.

3.3. PRODUCTION DE L'ACIDE-INDOLE-ACETIQUE

La production qualitative de l'acide indole acétique et/ou de ses composés apparentés a été observée chez la plus part des isolats testés (Fig.15). Toutefois, seulement 5 de ces derniers soit 35,71%, ont montré un degré de production appréciable (quantitatif), en présence de tryptophane, alors qu'en son absence seulement 3 souches ont produits l'AIA (Tableau XVI; AnnexeIII E1 et E2). Les isolats producteurs de ces métabolites ont développé une coloration rose à la suite de l'addition du réactif révélateur (de Salkowski) après 20mn d'incubation. Et dont la concentration varie de 31.5 à 57.5µg/ml.



Figure 15 : Production d'acide indole acétique

T : témoin ; 2, 4, 5, 6, 11, et 15 : Isolats de *Pseudomonas*

Tableau XVI: Production qualitative et quantitative d'Acide Indole Acétique (AIA) en présence et en absence de tryptophane.

	a	Présence de tryptophane		Absence de tryptophane	
		AIA en µg/ml	a ₁	AIA en µg/ml	a ₂
P 1	+	37.52	++	Nd	-
P 2	+++	56.5	+++	52.6	++
P 4	+++	39.5	+++	Nd	-
P 5	+	Nd	-	Nd	-
P 6	+++	Nd	-	Nd	-
P 7	++	Nd	-	28.5	+
P 8	+	Nd	-	Nd	-
P 9	+	Nd	-	Nd	-
P 10	+	Nd	-	Nd	-
P 11	++	57.5	+++	45.7	++
P 12	+	Nd	-	Nd	-
P 13	+++	31.5	+++	Nd	-
P 14	++	Nd	-	Nd	-
P 15	++	Nd	-	Nd	-

P1, 2, 15: *Pseudomonas* isolées, a : production qualitative d'AIA , a₁ : production d'AIA en présence de tryptophane,
a₂ : production d'AIA en absence de tryptophane, - : absence de coloration rose, + : légèrement rose, ++ : rose, +++ :rose virant vers le rouge, Nd : non détectable.

3.4. PRODUCTION D'ENZYMES

Le nombre de souches solubilisatrices des phosphates est de 8 (57.14 %), il est plus élevé que celui des souches positives pour l'AIA. Le développement de halos clairs autour des colonies phosphatases positives n'est devenu net qu'après 96h d'incubation. Alors que sur milieu liquide seulement 2 souches se sont révélées productrices de phosphatases après 96h d'incubation (virage du milieu vers le bleu très clair), celles-là même chez les quelles on avait observée des halos plus tôt que les autres.

Concernant les autres enzymes étudiées, on a noté une absence totale de production de cellulases, alors que les enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques tels les protéases et chitinases (Fig. 16) sont produites par 3 souches qui produisent aussi des phosphatases, dont 2 sont productrices d'HCN et une productrice d'AIA.

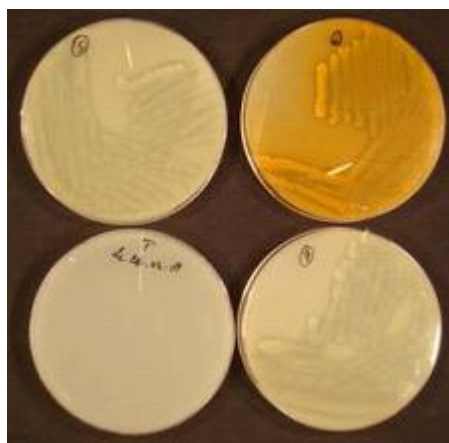


Figure 16: Production de protéases

T : témoin ; 2, 5 et 7 : Isolats de *Pseudomonas*.

3.5. CYANOGENESE

Parmi les souches testées, quatre sont productrices d'acide cyanhydrique (Tableau X), avec des taux variables selon les isolats. Après 24h d'incubation, un léger virage du papier filtre (du jaune vers l'orangée) imprégné d'acide picrique a été observé chez ces souches, pour devenir net entre 48 à 72h. Montrant que la production va en s'intensifiant après 48h, révélée par le virage du papier qui pour certaines souches devient presque rouge brique (Fig. 17).

3.6. PRODUCTION DES COMPOSES A EFFET ANTIBIOTIQUE

La détection de l'activité antagonique *in vitro*, a été réalisée sur la totalité des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents, seulement une a montré une activité antagonique à l'encontre de tout les agents phytopathogènes fongiques testés, avec cependant des degrés variables d'inhibition allant de 55.56 % dans le cas de *Pythium ultimum* jusqu'à 77.78 % dans le cas du FOA.



Figure 17 : Production d'HCN sur milieu à la glycine
T : témoin ; 1, 2, 7 et 8: Isolats de *Pseudomonas*.

Le degré d'antagonisme varie selon que les interactions soient avec les bactéries ou les champignons, l'inhibition a été plus nettement observée vis-à-vis des espèces cryptogamiques. La souche P₂ a montrée un spectre d'antagonisme dépassant celui de la souche de référence *Pseudomonas auréofaciens* 30/84 (actuellement reclassée *P. chlororaphis* 30/84), connue pour ses potentialités inhibitrices et la diversité de ses métabolites à effet antagonique, notamment vis-à-vis de *Gaeumanommyces graminis* var. *tritici*.

Les essais de production des phénazines *in vitro* ont montré que seulement la souche possédant l'activité antagonique *in vitro* synthétise des composés phénaziniques au même titre que la souche de référence 30/84. La production de phénazines a atteint une concentration de 0.05mg/ml de culture bactérienne dans le milieu NBY (avec une concentration finale en glucose de 2%). Les effets antibactériens ont été observés à l'encontre des grams positifs tels que *Salmonella enteridis*, alors que l'activité antifongique est observable aussi bien sur PDA, sur NYA que sur KB.

3.6.1. Caractérisation des phénazines

3.6.1.1. Extraction

Pour choisir le meilleur solvant d'extraction des composés à effet antibiotique, les souches ayant fait l'objet d'essais préliminaires ; et qui étaient dotées d'un pouvoir antimicrobien en culture duelle avec des champignons phytopathogènes ; à savoir l'isolat P2 et la souche de référence *Pseudomonas chlororaphis* 30/84 ont été cultivées sur NBY avec une concentration finale en glucose de 2%. Les meilleurs solvants d'extraction étaient l'acétate d'éthyle et le benzène mais ce dernier a été délaissé pour des raisons de toxicité.

Les activités de la souche P₂ sont plus importantes par rapport à celles de la souche de référence 30/84. Les microorganismes testés sont principalement des champignons et quelques bactéries à gram positifs, il en est ressorti que l'activité de la souche P₂ est plus intense vis à vis du FOA que la souche de référence 30/84.

3.6.1.2. Bio autographie et révélation chimique

Pour la souche P₂, le nombre de composés à effet antibiotique détecté sur benzène/acide acétique (BA ; 95/5) était supérieur à celui détecté sur chloroforme/acétate d'éthyle (CA ; 1/1) et sur acétate d'éthyle/dichlorométhane (AD ; 5/5). A partir de cultures sur milieu NBY, trois tâches actives ont pu être mises en évidence parmi les huit obtenues après CCM sur BA ; par contre sur CA 2 tâches actives ont pu être mises en évidence parmi les trois obtenues alors que sur AD seulement une parmi les quatre obtenues était active.

Ces résultats ont permis de retenir le premier mélange (BA) comme solvant de migration pour la séparation et la détection des composés à effet antimicrobien dans les extraits des surnageants de culture de la souche P₂.

L'extrait de surnageant de la culture de la souche P₂ sur milieu NBY a donné 8 tâches dont 3 sont des composés actifs T₁, T₂, et T₃. Le composé T₁ avec un rapport frontal de 0.20, a montré une efficacité supérieure aux deux autres vis-à-vis des champignons testés, est de couleur jaune qui devient noir sous UV à 365nm.

Le composé T₂ avec un R_f de 0.3 a montré une activité moyenne, de couleur orange aussi bien à l'œil nu que sous UV à 365nm. Alors que, le composé T₃ était le moins actif des trois avec un R_f de 0.08, de couleur marron clair à l'œil nu montrant une fluorescence orange sous UV. Alors que, la révélation chimique de ces extraits par la ninhydrine était négative.

Les bioautographies effectuées sur les extraits CA des surnageants de cultures provenant du milieu NBY (à 2% de glucose) de la souche P₂ ont montré une ressemblance de la tâche 1 avec la molécule standard phénazine-1-carboxylate (Fig. 18).

3.6.1.3. Spectres UV-Visible

Les composés T₁, T₂ et T₃ ont été semi purifiés par chromatographie sur gel de silice, leurs spectres d'absorption (UV-Visible) ont été déterminés après dissolution dans du NaOH à 0.1 N. Les résultats ont montré, d'une manière générale, une similarité entre les spectres des composés des extraits du surnageant de l'isolat P₂ avec ceux de la souche de référence 30-84 (Figure 19).

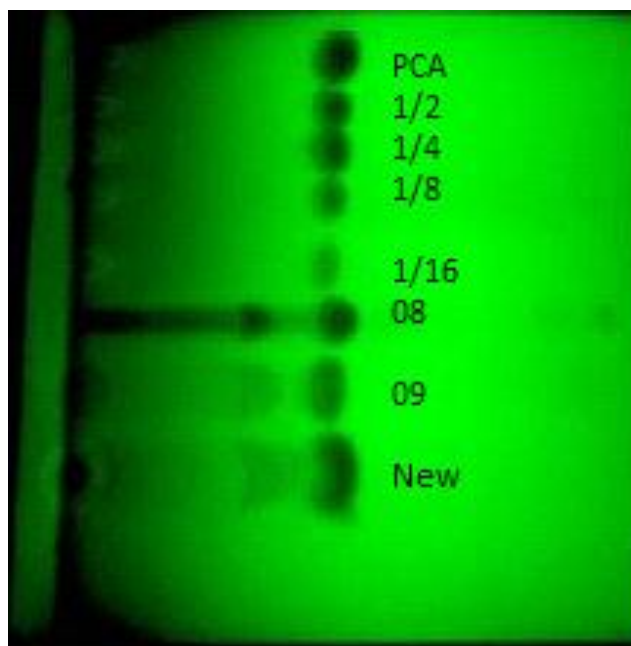


Figure 18: Bioautographie des extraits chloroforme/acétate d'éthyle cellulaires de l'isolat P₂.

PCA : phénazine 1 carboxylate (1,3 mg/ml) ; ½, ¼, 1/8 et 1/16 : dilutions du témoin PCA ; 08 , 09 et New : numéros donnés aux extraits.

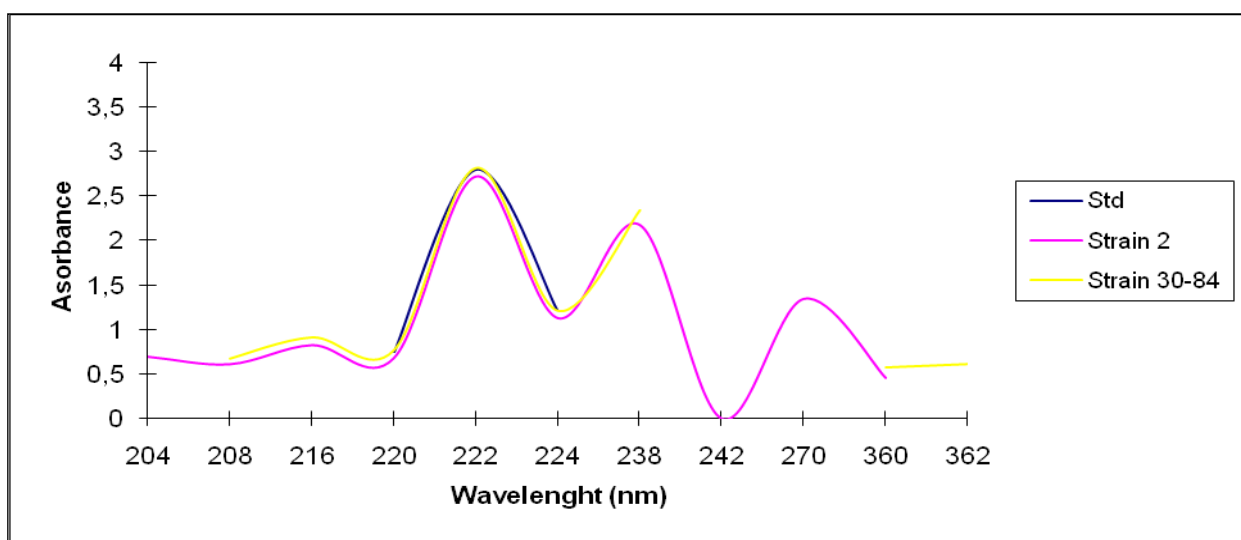


Figure 19: Superposition des spectres à balayage UV/Visible.

Standard (Std ; PCA), isolat *Pseudomonas* P₂ et 30-84 (strain2 et 30-84).

3.5.1.4. Analyse HPLC

Les extraits actifs de l'isolat P₂ ont fait l'objet d'une analyse par HPLC. Après la dissolution de l'extrait brut dans du méthanol, cet extrait ayant une couleur orange foncée, celui-ci est injecté (0.05 mg/ml de méthanol). La phase mobile est constituée d'un gradient continu méthanol/eau de 35/65 dans du TFA à 0.1%, avec un débit de 0.7 ml/min à 25 °C. la superposition du chromatogramme de l'isolat P₂ avec le composé purifié de la PCA, révèle l'identité de l'un des composés en l'occurrence (T₁) avec cette substance (Figure 20 ; Annexe IV F1 et F2).

3.5.1.5. Analyse GC/MS

Le spectre de masse de l'extrait méthanolique a révélé la présence de fragments ioniques importants m/z à 180 et deux autres d'importance moindre à m/z 153 et 196, ce qui suppose la présence de résidus phénazines dans la molécule d'antibiotique. Les résultats de la composition chimique relative de l'extrait méthanolique brut sont représentés dans le tableau (XVII), regroupant le temps de rétention (**tr**) du composé, le taux de présence calculé en pourcentage surfacique du pic (**%**), le nom proposé par la banque de données NIST 98 (**Composé**) ainsi que le taux de reconnaissance du composé par la banque des spectres (**Q**). Le profil chromatographique de l'extrait méthanolique pour le fragment $m/z = 180$ est représenté par la figure 21.

Tableau XVII : Composés phénaziniques révélés par GC/MS pour un fragment $m/z = 180$

tr (min)	%	Composé	Q
22,88	22,94	Phenazine	96
23,00	21,93	Phenazine	96
34,41	3,32	Phenazine	53

tr : temps de rétention en minutes, %: pourcentage surfacique du pic, Q: taux de reconnaissance

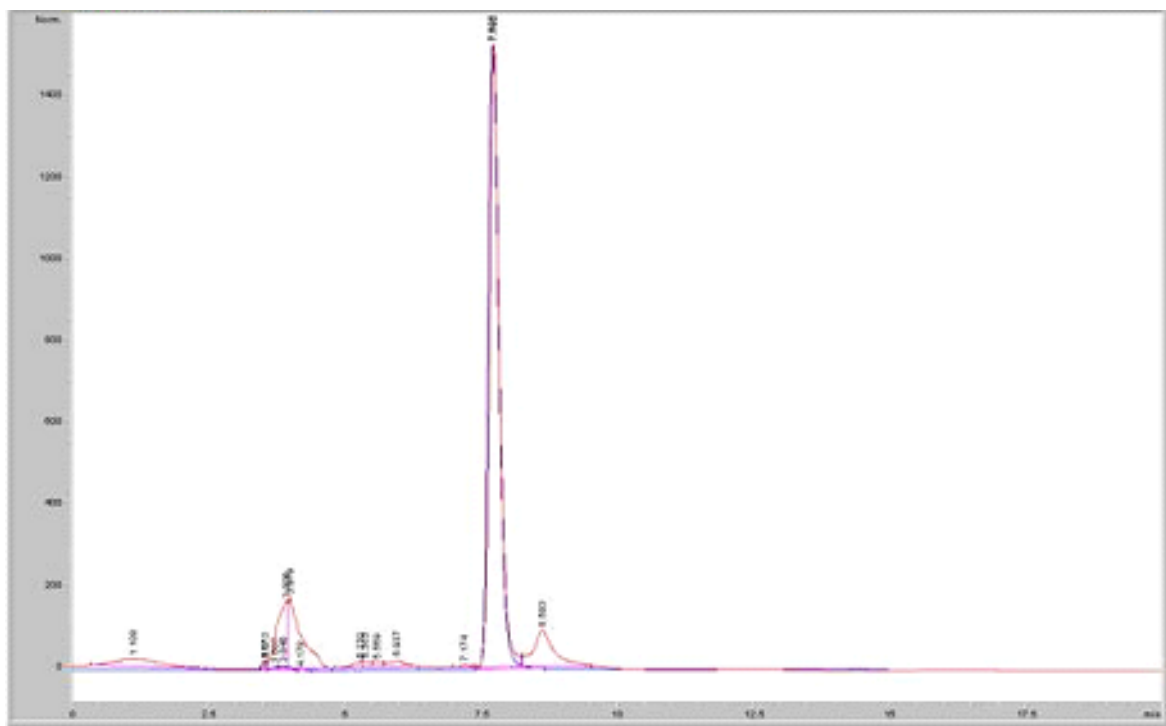


Figure 20 : Superposition des chromatogrammes de l'extrait actif de P₂ (rouge), et du standard PCA (bleu).

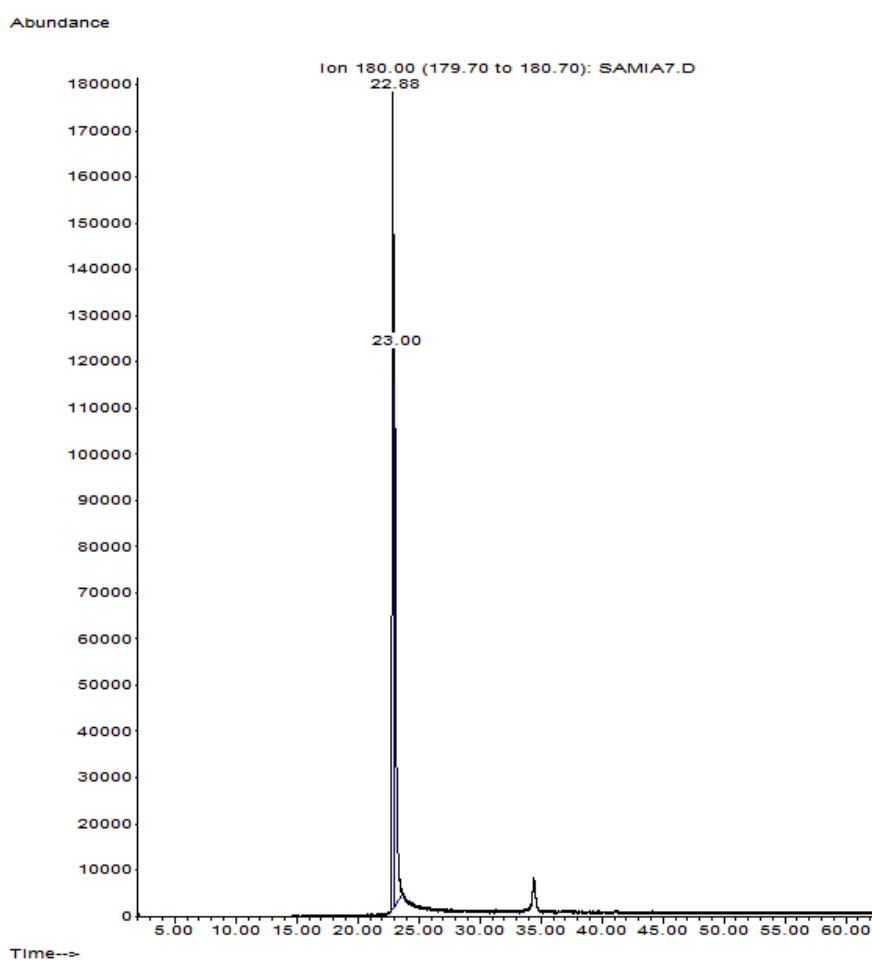


Figure 21 : Profil chromatographique de l'extrait méthanolique pour un m/z = 180.
Time : temps de retention.

4. DISCUSSION

Le fer joue un rôle crucial dans la plupart des enzymes d'oxydoréduction intervenant dans la chaîne de transport d'électrons du métabolisme intermédiaire, et malgré son abondance dans la nature sa biodisponibilité reste extrêmement faible, cependant, les seuils de concentration ferriques à pH 7.0 ne dépassent pas 10^{-18} M. A cet effet la majorité des organismes doivent réagir à ce problème, pour la capture et l'assimilation de fer de leur environnement (Dreschel et Winkelmann 1997). Les bactéries ont alors élaborées des systèmes de capture complexes, via la sécrétion de sidérophores et la capture des complexes ferri-sidérophores (Bagg et Neilands, 1987).

La synthèse de sidérophores n'a été révélée que dans les milieux MS et KB, considérés comme déficients en fer, à travers la production d'un pigment fluorescent diffusible dans le milieu. Le milieu King B est considéré comme sélectif pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents (King *et al.*, 1954). La croissance de *P. fluorescens* dans le milieu MS s'accompagne par l'excrétion de pyoverdines, cette excrétion débute lorsque la culture bactérienne entre en phase stationnaire (Meyer et Abdallah, 1978). Les milieux synthétiques sont recommandés pour la synthèse des sidérophores. Meyer et Abdallah (1978), ont par ailleurs remarqués que la substitution de l'acide succinique par l'acide citrique ou malique, abolissait l'excrétion de pyoverdines par les souches étudiées, alors que le prétraitement du MS par des chélateurs ferriques tel que le 8-OH-quinoline n'avait aucun effet sur cette synthèse. Certains auteurs avaient attribué le pouvoir de cette synthèse à la nature de la source de carbone et d'énergie, et qui influencerait la synthèse de ces pigments, de tels substrats avaient été classés chromogéniques ou antichromogéniques (Gouda et Chodat, 1963). Tel est le cas des milieux complexes, pouvant contenir des traces de fer inhibitrices de la synthèse des sidérophores, et c'est ce qu'on a vérifié avec les milieux PDB et TSB.

La synthèse de sidérophores est déreprimée uniquement lorsque les cellules microbiennes sont en conditions de déficience en fer (Meyer et Hornsperger, 1978; Meyer *et al.*, 1990), ceci dit ils ne seraient produits que lorsque le milieu est carencé en fer, aussi bien par les bactéries les champignons et même les monocotylédones (Ratledge et Dover, 2000). Meyer et Abdallah (1978) ont rapporté que cette production a aussi été observée chez d'autres souches de *Pseudomonas* fluorescents tel que : *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et *P. syringae*.

Pour la plupart des souches étudiées la synthèse de pyoverdine était appréciable sur le milieu MS, alors que le rajout de 100µg/ml de FeCl₃ réprimait cette synthèse.

Meyer et Abdallah (1978), avaient auparavant rapporté que l'addition de 1mg/l de FeCl_3 réprimait la production de pyoverdines, et que la concentration de celle-ci était inversement proportionnelle à la concentration ferrique du milieu, lorsque la phase exponentielle est achevée et que la phase stationnaire est entamée. La derepression de la synthèse de pyoverdine par la limitation en fer pourrait expliquer le rôle que jouerait le pigment dans le transport et le métabolisme du fer, en effet ces pigments peuvent complexer le fer Fe^{3+} avec une constante d'affinité élevée $K=10^{32}/\text{M}$. Les pyoverdines produites par les espèces de *Pseudomonas* contiennent deux groupes fonctionnels (Hydroxamate et Catécholate). Il existe d'autres types de sidérophores non fluorescents, et qui jouent un rôle dans la survie des bactéries (Meyer et Hornsperger, 1978; Meyer et Stintzi, 1998).

Les hydroxamates sont produits aussi bien par les bactéries que par les champignons, alors que les catécholates sont exclusivement produits par les bactéries, et comprennent deux groupements l'un catéchol et l'autre hydroxyle ayant une fonction de ligand. Les carboxylates sont produits par un groupe fongique (mucorales), et très peu de bactéries comme *Rhizobium meliloti* et *Staphylococcus hyicus*, se liant au fer par deux groupements l'un hydroxyle et l'autre carboxyle (Dreschel *et al.*, 1995; Baakza *et al.*, 2004). Dans le but de détecter ce type de composés, plusieurs techniques basées sur les propriétés chimiques ont été utilisées. Tous les isolats produisent des hydroxamates révélés sur milieu CAS (Schwyn et Neilands, 1987) et sur O-CAS (Perez-Miranda *et al.*, 2007), et confirmé par une électrophorèse sur papier (Schwyn et Neilands, 1987). Alors que, la production de catécholates et de carboxylates n'a été observée que chez quelques isolats.

En parallèle, on a recherché les protéines cytoplasmiques de haut poids moléculaires réprimés par le Fer (IRCP). Quand les protéines solubles des isolats produisant des pyoverdines ont été analysées par SDS-PAGE (à 5% de polyacrylamide), on a observé des protéines de haut poids moléculaire. Dépendant des conditions de culture, et de la quantité de protéines déposée sur le gel, des bandes protéiques (supérieures à 175 KDa) ont été révélées par le réactif brillant bleu de Coomassie. Celles-ci n'étaient pas visibles lorsque le gel était chargé par des quantités de protéines inférieures à 100 μg ; ne devenaient détectables et leur intensité n'augmentait, que lorsque la concentration des protéines déposées était élevée (400 μg). Ces bandes n'ont été observées que lorsque les bactéries étaient cultivées sur MS déplétif en Fer, mais pas lorsque l'on enrichissait le milieu (MS) de 100 μM de ce dernier sous forme de FeCl_3 .

Georges et Meyer (1995), en analysant les protéines cytoplasmiques solubles de *P. aeruginosa* ATCC 15692 (PAO1), étaient parvenus aux mêmes constatations, mais avaient obtenu 5 bandes de haut poids moléculaires. Toutefois on a observé ces bandes que chez quelques isolats.

Ils avaient rapporté que 400 μg de protéines étaient suffisantes pour observer les IRCP formées chez la majorité des producteurs de pyoverdines autres que PAO1. Mais chez certaines souches comme *P. putida* 12633, les bandes protéiques étaient diffuses ou très fines, et que même lorsqu'ils augmentaient la concentration protéique, ou utilisaient une méthode plus sensible (révélation à l'argent ou révélation au Coomassie modifiée par Neuhoﬀ *et al.*, 1985), parvenaient au même résultat. En comparant les profils des IRCP des souches de *Pseudomonas* productrices de pyoverdines qui diffèrent par leur chaînes peptidiques, présentent un nombre différent de IRCP.

L'activité du salicylate comme sidérophore a été démontrée, chez les *Pseudomonas* comme *P. fluorescens* (Meyer *et al.*, 1992), *P. cepacia* (Sokol *et al.*, 1992), et *P. aeruginosa* (Meyer *et al.*, 1992; Visca *et al.*, 1993; Serino *et al.*, 1995; Serino *et al.*, 1997; Reimmann *et al.*, 1998). Le salicylate est le précurseur de la pyochéline un autre sidérophore dont l'affinité pour le fer est réduite, mais une haute affinité pour les ions bivalents tel que le cuivre et de zinc (Reimmann *et al.*, 1998).

Le tryptophane est naturellement sécrété dans les exsudats racinaires, et la plus part des auxines retrouvées dans la rhizosphère proviennent de l'activité biosynthétique des microorganismes (Kamilova *et al.*, 2006). Parmi les souches productrices d'AIA, la souche P₂, P₇ et la souche P₁₁ ont produits de l'AIA même en absence de tryptophane et à des concentrations appréciables. Par contre en présence de tryptophane la souche P₇ n'en produit pas, alors que les souches P₁ P₂, P₄, P₁₁ et P₁₃ ont produits des quantités importantes en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Karnwal (2009), a montré que *P. aeruginosa* AK2 produisait quatre fois plus d'AIA que la souche *P. fluorescens* AK1 en absence de tryptophane, alors qu'en augmentant la concentration de ce dernier de 50 à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, voyait la concentration d'AIA triplait ou quadruplait. La synthèse d'AIA est largement réponde chez les rhizobactéries (Forlani *et al.*, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Nos observations sont en accord avec celles de Naik et Sakthivel (2006), qui avaient suggéré l'induction de la production d'AIA en phase stationnaire de croissance, probablement due à l'induction d'enzymes clé impliquées dans la biosynthèse d'AIA (Oberhansli *et al.*, 1991; Garcia de Salmone *et al.*, 2001).

Le phosphore, est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote. Et même dans des sols qui en sont riches, le phosphore se trouve sous une forme insoluble: oxydes de fer et d'aluminium dans les sols acides, et oxydes de calcium dans les sols basiques, et seulement une faible proportion (0.1%) est assimilable par les plantes (Stevenson et Cole, 1999). En plus les $\frac{3}{4}$ du phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol se précipitent en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Goldstein, 1986).

Les bactéries solubilisant le phosphore (PB) secrètent des acides organiques et des phosphatases, qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates soluble monobasique (H_2PO_4^-) et dibasique (HPO_4^{2-}). Ce phénomène est attribué à la solubilisation minérale du phosphate (MP). Quelques uns de nos isolats solubilisent le phosphate, mais cette solubilisation n'est pas due à une production d'acides organiques, mais plutôt à une production d'enzymes.

Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les bactéries de la rhizosphère est facilitée par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques (CWDE: cell wall degrading enzymes). Les chitinases, sont des enzymes hydrolytiques d'importance majeure, puisque la chitine (polymère linéaire de β -(1,4)-N-acétylglucosamine) est le constituant majeure de la majorité des parois cellulaires des champignons phytopathogènes (Kishore *et al.*, 2005). L'activité chitinolytique de *Pseudomonas* spp. souche PUP6 (Naik et Sakthivel, 2006), et des souches de *Pseudomonas* spp. (Verma *et al.*, 2007) a été rapportée comme activité antifongique. Des chitinases purifiées de *Bacillus subtilis* AF1 (Manjula *et al.*, 2004), *Serratia marcescens* (Kishore *et al.*, 2005), *Serratia plymuthica* (Frankowski *et al.*, 2001) sont hautement antifongiques.

En plus des chitinases, les *Pseudomonas* produiraient d'autres types d'enzymes lytiques en l'occurrence des protéases, c'est ainsi que la souche PUP6 produirait des protéases ayant une activité CWDE (Naik et Sakthivel, 2006).

Certains PGPR produisent des antibiotiques volatiles, dont le plus important est l'HCN qui inhibe la cytochrome oxydase de nombreux organismes. Les souches productrices possèdent une cytochrome oxydase alternative résistante à l'HCN, et sont relativement insensibles à ce dernier (Voisard *et al.*, 1989). On ne lui connaît pas de rôle comme métabolite primaire (Blumer et Haas, 2000). Le cyanure d'hydrogène est un métabolite secondaire produit par les bactéries à Gram négatifs *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, et *Chromobacterium violaceum* (Askeland et Morisson, 1983). L'HCN et le CO_2 se forment à partir d'un acide aminé en l'occurrence la glycine (Castric, 1977) par l'HCN synthétase (Castric, 1994). Chez les *Pseudomonas* sp. cette enzyme oxyde la glycine en présence d'accepteurs d'électrons, comme le méthosulfate phénazine (Wissing, 1974). *P. fluorescens* CHAO est une bactérie aérobie, agent de biocontrôle, colonisant les racines et protégeant de nombreuses plantes des maladies causées par les champignons telluriques (Voisard *et al.*, 1994). La production d'HCN par la souche CHAO est suppressive vis-à-vis de la pourriture noire du tabac causé par *Thielaviopsis basicola* (Sacherer *et al.*, 1994). GacA⁻ mutant de la souche CHAO, défectueux en la production d'HCN, d'antibiotiques et d'exo enzymes, perd son habilité à protéger le tabac de la pourriture

noire. D'autres parts, des mutants CHAO défectueux en HCN, sont moins effectifs dans le contrôle du take-all du blé. Alors, que la complémentation de ce mutant par des gènes *hcn*⁺ clonés à partir de la souche sauvage restore l'habilité de biocontrôle (Voisard *et al.*, 1989).

Les métabolites secondaires isolés des microorganismes et qui exhibent soit une activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique ou antiprotozoaire), antitumorale et/ou antivirale, sont dits antibiotiques (Berdy, 2005). Les antibiotiques incluent un groupe organique chimiquement hétérogène, de faible poids moléculaire, produits par des microorganismes, à de faibles concentrations, ayant une activité délétère sur la croissance et les activités métaboliques d'autres microorganismes (Fravel, 1988; Thomashow *et al.*, 1997).

Parmi les procaryotes, les bactéries unicellulaires des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont les producteurs les plus fréquents, rejoints depuis peu par les Cyano et Myxobactéries. La souche de *Pseudomonas chlororaphis* a produit entre deux et trois produits à effet antibiotique retrouvés dans le surnageant de culture. Leur activité à la fois antifongique et antibactérienne et leur spectre UV-visible laisserait supposer que ces composés sont de nature non polyénique. En effet, les polyènes sont produits exclusivement par les espèces d'actinomycètes (Bérdy, 2005). Bérdy, (2005) a rapporté que parmi le groupe des bactéries unicellulaires, les producteurs de métabolites bioactifs les plus fréquents sont les espèces *Bacillus* (avec 800 composés) et *Pseudomonas* (prés de 800 composés dont 610 sont des antibiotiques) suivi de loin par les entero- lactobacilles et les streptocoques, qui ne produiraient qu'une centaine de métabolites. Ces bactéries produisent communément des peptides modifiés ou non, de simples hétérocycles (phénazines) et des composés aliphatiques (dérivés d'acides gras), par contre l'occurrence d'autres composés chimiques plus complexe reste relativement rare.

Les antibiotiques produits par les différents PGPR possèdent un large spectre d'activité (Fernando *et al.*, 2005). Leur détection peut être empêchée par des facteurs biotiques et abiotiques, instabilité chimique, fixation irréversible aux colloïdes ou à la matière organique du sol, ou encore à la décomposition microbienne (Thomashow *et al.*, 1997). La première constatation du large spectre d'activité des antibiotiques des PGPR dérive des filtrats de culture ou des antibiotiques purifiées de celles-ci (Howell et Stipanovich 1979 ; Kang *et al.*, 1998 ; Nakayama *et al.*, 1999). Les souches de *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 ainsi que l'isolat P₂ secrètent dans le milieu de culture des substances actives extraites par le benzène ou l'acétate d'éthyle. L'efficacité de ces solvants a été déjà rapportée dans l'extraction des phénazines (Gurusiddiah *et al.*, 1986 ; Anjaiah *et al.*, 1998, Delanay *et al.*, 2001), du 2,4-diacétyl phloroglucinol (Bonsall *et al.*, 1997).

L'acide chikimique est le précurseur de la plus part des phénazines, utilisant l'acide chorismique comme carrefour (Byng et Turner, 1977). Deux molécules d'acide chorismique sont condensées asymétriquement pour former la structure basale du cycle des phénazines, utilisant la glutamine comme acide aminé donneur d'azote (Pierson et Pierson, 1996). La production de phénazines a été mieux caractérisée chez les souches de référence *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (Gurusiddaiah *et al.*, 1986 ; Brisbane *et al.*, 1987) *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 et PGS12. Les colonies de *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 et PGS12 sont caractérisées par une couleur orange due à la production de phénazines (Pierson et Thomashow, 1992 ; Georgakopoulos *et al.*, 1994). Selon Pierson et Thomashow (1992), la souche 30-84 produit principalement deux antibiotiques majeurs de nature phénazinique : la phénazine-1-carboxylate (PCA) et le 2-hydroxy-phénazine-1-carboxylate (2-OH-PCA), et un troisième mineur le 2-hydroxy-phénazine (2-OH-PZ). Alors que *Pseudomonas fluorescens* 2-79 ne produit que la PCA (Gurusiddaiah *et al.*, 1986 ; Brisbane *et al.*, 1987).

Delanay *et al.* (2001), ont clairement démontré que l'opéron *phzXYFABCD* responsable de la synthèse de phénazines chez la souche 30-84 (Pierson *et al.*, 1995 ; Mavrodi *et al.*, 1998), n'était en fait responsable que de la synthèse de PCA. Un nouveau gène désigné *phzO* identifié immédiatement en aval de cet opéron serait responsable de la synthèse de composés hydroxy-phénazine ; en transformant des souches non productrices de phénazines ou ne produisant que de la PCA comme *Pseudomonas fluorescens* 2.79. En conséquence, la décarboxylation de la 2-OH-PCA en 2-OH-PHZ survient spontanément et en absence de toute enzyme, lorsque les concentrations de celles-ci atteignent 74% dans un tampon phosphate pH 7. Cette dernière constatation rejoint l'hypothèse émise par Flood *et al.* (1972), qui avaient spéculés que la synthèse des phénazines chez *P. auréofaciens* suivait un schéma hypothétique dans cet ordre PCA→2-OH-PCA→2-OH-PHZ.

Nos résultats montrent la production par 30-84 et par la souche P₂ de composés colorés dans le NBY à 2% de glucose (Pierson et Thomashow, 1992). Les substances actives produites par P₂ sont vraisemblablement des phénazines dont les caractéristiques de migration sur TLC et leur révélation sous rayonnement UV (2pics) sont identiques à celles décrites par Pierson et Thomashow, (1992). Les composés produits par P₂ qui, de part leur R_f, leur absorption de la lumière ultraviolette, leur activité antimicrobienne, la superposition des spectres (UV visible) d'absorption de ces substances actives avec celles produites par la souche 30-84 montre qu'il s'agit bien des mêmes substances ; de même, que la superposition du profil chromatographique en HPLC avec celui du standard PCA.

La présence de résidus phénaziniques dans l'extrait méthanolique a aussi été confirmée par la détermination du spectre de masse des antibiotiques présents, dont le composé le plus abondant ($M^+ - CO_2$) est celui ayant un m/z à 180 (Gurusiddaiah *et al.*, 1986 ; Brisbane *et al.*, 1987), celui-ci est couplé avec l'existence d'un fragment ionique m/z à 153 correspondant à la PCA (Glandorf *et al.*, 2001 ; Mavrodi *et al.*, 2001), résultant de la perte d'une unité HCN du fragment m/z à 180 (Gurusiddaiah *et al.*, 1986). Un autre fragment ionique (m/z 196) a été révélé et correspondant au 1-OH-PHZ (Mavrodi *et al.*, 2001) et aux phénazines jaunes décrites par Saosoong *et al.* (2009). Les spectres d'ions compris entre 153 et 196 m/z correspondent aux molécules protonées (MH^+ , m/z 196), et leurs fragmentation consécutive déjà décrites par Gurusiddaiah *et al.* (1986) et Brisbane *et al.* (1987).

Parmi les bactéries associées aux plantes, les systèmes les mieux caractérisés sont ceux incluant une association résultant en une meilleure santé de la plante. Communément appelé biocontrôle. L'exemple le plus décrit reste l'interaction plante microbe dans la suppression par *P. auréofaciens* 30-84 du take all des racines de blé causé par *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Thomashow et Weller, 1995). *P. auréofaciens* colonise les racines du blé et protège indirectement celles-ci du take all en inhibant la croissance du champignon par la production d'antibiotiques de type phénazine (Mazzola *et al.*, 1992 ; Pierson et Thomashow, 1992). La souche P₂ s'est révélée apte à inhiber différents champignons phytopathogènes telluriques *in vitro*. On a d'ailleurs observé que la souche P₂ produisait le pigment (avec une intensité élevée) révélateur des phénazines lorsque la densité cellulaire était élevée en milieu liquide (NBY), mais spécialement sur le front la séparant du pathogène inhibé en culture duelle. Par contre, cette coloration intense est absente en présence de pathogène moyennement inhibé.

Les antibiotiques de type PCA et autres phénazines sont les déterminants majeurs dans le contrôle biologique des phytopathogènes telluriques par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Thomashow et Weller, 1996).

La production de phénazines est impliquée aussi bien dans la survie de la bactérie que dans l'inhibition du pathogène. Ces antibiotiques sont produits vers la fin de la phase exponentielle et pendant de la phase stationnaire (Turner et Messenger, 1986).

Chez les *Pseudomonas* fluorescents impliqués dans le biocontrôle, le contrôle de la biosynthèse des phénazines est dépendant du quorum sensing (Mavrodi *et al.*, 2006). Les phénazines elles mêmes peuvent agir comme des signaux tardifs du quorum sensing (QS), dans le sens où elles régulent bon nombre de gènes qui ne sont pas directement impliqués dans leur biosynthèse, durant les dernières phases de croissance (Dietrich *et al.*, 2006).

Un régulateur positif de cette biosynthèse en l'occurrence *phzR* est exprimé en réponse à la densité cellulaire (Pierson *et al.*, 1994). PhzR est un activateur transcriptionnel des opérons *phz*, et PhzI est un autoinducteur d'une synthétase produisant les homo sérines lactones (HSL) impliqués dans le QS, en fait ces HSL activent aussi PhzR (Wood et Pierson, 1996 ; Khan *et al.*, 2005). Ces HSL régulent l'expression des gènes des phénazines au niveau des racines (Wood *et al.*, 1997), et peuvent jouer le rôle de signaux entre les populations au niveau de la rhizosphère (Pierson *et al.*, 1998), mais on ne sait pas s'ils ont un impact sur les souches de biocontrôle dans la rhizosphère.

Une interférence avec ces signaux HSL a été observée. Chez *P. Chlororaphis* PCL1391, la dégradation de ces HSL par des rhizobactéries abouti à la perte de sa capacité à protéger la tomate vis-à-vis des pourritures dues aux *Fusarium* (Molina *et al.*, 2003). De même, des molécules produites par une sub population de bactéries associées à la rhizosphère du blé affecte négativement l'expression des gènes des phénazines chez la souche 30-84 (Morello *et al.*, 2004).

D'autres interférences peuvent provenir des champignons telluriques qui sont des réservoirs potentiels de QS quenchers. L'acide fusarique, est un métabolite fongique qui réprime la biosynthèse du phénazine-1-carboxamide ainsi que les HSL chez la souche PCL1391 (van Rij *et al.*, 2005).

5. CONCLUSION

Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production de métabolites secondaires chez 14 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 culture. L'incorporation des ions Fe^{+3} influe sur la synthèse des sidérophores, alors que leurs absences stimulent leur production, leurs présences par contre semblent la réprimer. Selon les souches certaines ont en produit un seul type alors que d'autres ont produits plusieurs.

L'acide salicylique est produit par la plus part de nos souches, son rôle dans la compétition rhizosphérique n'a pas été bien élucidé, mais ce métabolite est corrélé aux réaction de défense de la plante en stimulant la résistance systémique acquise (SAR), mais il est aussi considéré comme sidérophore.

La capacité de solubilisation des phosphates, ainsi que la synthèse d'AIA et les produits apparentés, sont retrouvées chez quelques souches. Ces caractéristiques, en plus de ceux sus citées, pourraient avantager la souche dans sa compétition et son adaptation à divers écosystèmes.

La production d'enzymes protéolytiques (qui peuvent intervenir dans le parasitisme) n'a été retrouvée que chez 3 des souches étudiées. Alors que la cyanogénèse, a été retrouvée chez 4 souches. Ce métabolite est un produit du métabolisme secondaire, qui peut avantager les souches productrices au sein des communautés microbiennes rhizosphériques.

Parmi les métabolites secondaires, la production de substances à activité antibiotique procure un atout majeur dans l'antagonisme microbien pour la souche productrice. D'après nos résultats, certains composés à effet antibiotique retrouvés chez la souche P₂, peuvent être des dérivés phénaziniques. Ces derniers, sont des composés impliqués activement dans les mécanismes de lutte biologique vis à vis de nombreux agents phytopathogènes telluriques.

Certains dérivés phénaziniques produits par la souche P₂ présentent les caractéristiques de la PCA et des dérivés produits par la souche de référence 30-84. Leurs analyses GC/MS a montré qu'il y avait bien un résidu phénazine, en plus d'autres dérivés phénaziniques.

CHAPITRE IV

COMPÉTITION RHIZOSPHERIQUE

1. INTRODUCTION

Les bactéries se trouvent dans des environnements hautement compétitifs, comme l'interface sol / racines (rhizosphère). Dans de telles niches, elles sont en compétition perpétuelle pour les nutriments, aussi bien que pour l'espace écologique (gîte et couvert). En conséquence, elles ont développé plusieurs moyens offensifs pour cette compétition intra et interspécifiques, comme des substances antibiotiques, des enzymes bactériolytiques (Hancock et Chapple, 1999) et des toxines de nature protéique (Riley et Wertz, 2002) communément connues sous le terme de bactériocines.

Les bactériocines représentent la classe d'agents antimicrobiens la plus abondante, constituant un groupe fonctionnel et structurel diversifié (Jack et Jung, 2000; Hechard et Sahl, 2002). Produites par la majorité des groupes bactériens (Riley et Wertz, 2002) et capables de tuer les bactéries compétitives (Hancock et Chapple, 1999) étroitement liées (Dykes, 1995; Riley et Wertz, 2002) sans pour autant affecter la bactérie productrice. En effet, celle-ci possède un mécanisme d'immunité, et/ou parce que ces bactériocines subissent des modifications post-transcriptionnelles (Hancock et Chapple, 1999). Leur production a même été décrite chez les *Halobacteriaceae* une famille extrêmement halophile des *Archaea* (Li *et al.*, 2003).

Deux grands groupes ont été décrits (Bradley, 1967 ; Daw et Falkner, 1996) (i) les bactériocines de faible poids moléculaire et (ii) les bactériocines de haut poids moléculaire (Fredericq, 1963). Allant des petits peptides, comme les microcines des *Enterobacteriaceae* et les antibiotiques sécrétés par les bactéries à Gram+ contenant peu de bases GC (Bradley, 1967; Daw et Falkner, 1996). Aux polypeptides de taille moyenne comme les colicines d'*E.coli* (Lakey et Slatin, 2001), et leurs homologues les pyocines S chez *P. aeruginosa* (Michel-Briand et Baysse, 2002). Les complexes multiprotéiques de taille semblable aux phages (large phage tail-like) comme la syringacine produite par *P. syringae* (Smidt et Vidaver, 1982) et les pyocines R et F de *P. aeruginosa* (Michel-Briand et Baysse, 2002).

Le mode d'action des bactériocines est variable, elles agissent soit par la formation de pores membranaires, la dégradation non spécifique de l'ADN cellulaire, le clivage des ARNr 16S ou des ARNt, ou encore l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane résultant ainsi en une lyse cellulaire (Riley, 1998). L'exemple des colicines et des pyocines S qui parasitent des récepteurs membranaires spécifiques sur les cellules cibles, résultant en un spectre d'activité plus étroit (Riley, 1998; Michel-Briand et Baysse, 2002).

Il a d'ailleurs été proposé que les bactériocines pourraient jouer un rôle clé dans les dynamiques des populations bactériennes (Riley et Gordon, 1999; Riley et Wertz, 2002).

Utilisées dans le contrôle biologique, pour leurs propriétés bactéricides spécifiques avantageuses vis-à-vis de pathogènes bactériens sensibles (Lavermicocca *et al.*, 2002). L'agrocin 84, est utilisée comme traitement biologique préventif contre le « crown gall », est une bactériocine produite par *Agrobacterium radiobacter* (Kerr et Tate, 1984).

Concernant les *Pseudomonas* associées aux plantes, la recherche s'est plutôt focalisée sur les souches de phytopathogènes comme *P. syringae* (Smidt et Vidaver, 1982 ; Iacobellis *et al.*, 1995 ; Kairu, 1997). Parret et De Mot (2002), ont démontré que les souches de *P. fluorescens* et *P. putida* producteurs de bactériocines sont abondantes dans diverses rhizosphères des sols tropicaux, aussi bien que dans des sols des régions tempérées. La LIpA (lectin-like putidacin-A) est une bactériocine sécrétée par une souche de *Pseudomonas sp.* BW11M1 est active aussi bien sur *P. putida* GR12-2R3 que sur d'autres *Pseudomonas* phytopathogènes, incluant les pathovars de *P. syringae* (Parret *et al.*, 2003).

Nous avons d'abord essayé de mettre en évidence la production de ces substances par le groupe d'isolats d'un des sites étudiés. Purifiées par filtration, on a essayé de déterminer leurs appartenances et leurs activités par rapport à d'autres isolats.

2. MATERIEL ET MÉTHODES

2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les 14 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents identifiées, en plus de deux souches de référence (*P.fluorescens* CHAO et *P. aureofaciens* 30-84, aimablement offertes par Le Pr HAAS, Lausanne Suisse) ont été analysées quant à leurs aptitude à produire des substances antibactériennes entre elles, et vis à vis d'autres souches appartenant à d'autres genres.

2.2. DETECTION DE LA PRODUCTION DE BACTERIOCINES

La production de bactériocines a été mise en évidence par la méthode décrite par Govan (1978). Les souches sélectionnées pour cette production sont étalées sur TSA (Tryptic-soy-agar), en une bande d'une largeur approximative de 2 à 3 cm. Après une croissance de 18h à 28°C, les bactéries sont irradiées pendant 1 min à 254nm, ensuite elles sont remises en incubation pendant 3h30 min. La couche de bactéries est alors raclée par un coton tige saturé en chloroforme, les boîtes sont exposées aux vapeurs de chloroforme pour tuer les bactéries récalcitrantes. Des aliquotes de 15 µL d'une culture en phase de croissance, dans du TSB (tryptic-soy-broth) des souches indicatrices, sont alors étalées perpendiculairement à la souche présumée productrice. Un témoin négatif est préparé par étalement de souches sensibles sur une boîte préalablement traitée au chloroforme, dans des conditions similaires aux précédentes, pour se persuader que ce dernier (dans ce cas) n'intervient pas dans la mort cellulaire.

2.3. PRODUCTION DE BACTERIOCINES PAR INDUCTION

Alternativement, un protocole standard a été utilisé pour induire la production de bactériocines. Les souches testées sont cultivées dans 10ml de bouillon Luria Bertani (LB) pendant 18 h à 28°C sous agitation permanente à 220 rpm. C'est alors qu'un aliquote de 100 µL de culture en phase de croissance est transféré dans 5ml de bouillon LB et remis en incubation (dans les mêmes conditions que précédemment). Après 1h30min d'incubation, on atteint une absorbance de l'ordre de 0.2 à 625 nm, c'est alors que de la mitomycine C est rajoutée (SIGMA; 0.05µg/ml). La mitomycine C induit l'expression des gènes des bactériocines (Pugsley et Oudega, 1987).

L'incubation est poursuivie pendant 5h sous agitation à 28°C, c'est alors que 100 µL de chloroforme sont rajoutés par ml de culture. Les lysats sont alors vortexés pendant 15 s et centrifugés pendant 10 min à 14000 rpm (Riley *et al.*, 2003).

Après centrifugation la phase aqueuse (surnageant) est filtré à travers des membranes de 0.45µm (pour éliminer les débris cellulaires et les cellules), et est ensuite transféré dans un nouveau tube et stocké à 4°C jusqu'à son utilisation (Parret *et al.*, 2003).

2.4. ACTIVITE BACTERICIDE DES LYSATS

La méthode appliquée ici est celle de la double couche. Où l'on fait une culture en masse par incorporation de la souche indicatrice, qui est préparée par addition de 50µL de cellules d'une culture en phase de croissance (10^9 cellule/ml) à 3.5 ml d'agar semi solide (0.8%). Cette préparation est répartie sur une gélose LB, et est laissée pour solidifier. C'est alors que 2 µL de chaque lysat sont déposés à la surface du gel à raison de 2 répétitions. Sachant que dans l'étude de production de bactériocines, les lysats sont testés sur des souches de même espèce (Riley *et al.*, 2003). La production de bactériocines se traduit par la détection de zones d'inhibition au site de dépôt (Richard *et al.*, 2003).

2.5. DETERMINATION DU TYPE DE BACTERIOCINE

Le pH des lysats présumés contenant des bactériocines est mesuré afin d'écarter l'éventualité de la présence d'acides organiques qui pourraient être à l'origine de l'inhibition (le pH doit être aux alentours de 7). En effet, certaines bactéries produisent du H_2O_2 qui serait à l'origine d'une activité antimicrobienne (Drider *et al.*, 2006). Ces lysats font l'objet de plusieurs analyses (digestion trypsique, filtration et enfin congélation) pour distinguer : les bactériocines de faible poids moléculaire (S-pyocine-like), des bactériocines bactériophage-tail like de haut poids moléculaire (R- et F-pycine-like) et bactériophages (Pugsley et Oudega, 1987 ; Riley *et al.*, 2003). Pour cette étude, quatre aliquotes sont préparés à partir de chaque lysat.

2.5.1. Digestion trypsique

La digestion trypsique est effectuée par addition de 5 µL de trypsine (SIGMA, 5mg/ml) à 50 µL de lysat, incubé à température ambiante pendant 30 min (Pugsley et Oudega, 1987). Cette digestion inhiberait l'activité de la plus part des bactériocines, mais pas celle des phages (Riley *et al.*, 2003).

2.5.2. Filtration

La filtration par contre va séparer les phages des bactériocines de nature protéique, et le filtrat obtenu sera inactif si le lysat contenait des phages (Riley *et al.*, 2003). En effet, 50 µL de lysat sont filtrés par centrifugation à 14000 rpm pendant 15 min à travers des filtres (Microcon 100 kDa) micro concentrateur (Pugsley et Oudega, 1987).

2.5.3. Congélation

La congélation à -70° C détruit le plus souvent les phages (Pugsley et Oudega, 1987), par contre les bactériocines de nature protéique ne sont pas affectées (Riley *et al.*, 2003).

2.5.4. Traitement thermique

Le traitement par la chaleur à 80° C annihile l'activité des protéases thermolabiles (Drider *et al.*, 2006), sachant que ce sont les HMW qui sont thermolabiles (Fredericq, 1963).

- Le surnageant non traité est utilisé comme témoin positif.
- Le témoin négatif est de l'eau bidistillée stérile.

Les lysats traités ainsi que les témoins, sont déposés sur les couches bactériennes sensibles (comme il est décrit plus haut). Ces traitements permettent la mise en évidence de la nature de l'agent responsable de l'activité antimicrobienne, qui a été décelée dans chaque lysat (Pugsley et Oudega, 1987).

Les boîtes de tous les essais sont incubées à 28°C, et les résultats répertoriés pour la présence (+) ou l'absence (-) d'inhibition après 12 et 24h. Chaque souche productrice est testée à raison d'une fois par expérience, alors que l'ensemble de celles-ci est répété 2 fois. Les résultats collectés sont combinés, un isolat est considéré comme antagoniste seulement s'il répond aux deux essais (Riley *et al.*, 2003 ; Validov *et al.*, 2005)

3. RESULTATS

3.1. DETECTION DE BACTERIOCINES

Sur les 14 isolats testés (mis à part les souches de référence), seulement 6 sont capables de produire des substances antibactériennes, et inhibent donc la croissance d'autres isolats (Fig. 22a ; Tableau XVIII). Cette capacité inhibitrice est plus importante chez certains isolats comme P₂ et P₅, mais aussi chez les souches de référence P. CHAO et P. 30-84, qui ont la capacité d'inhiber aussi bien des isolats de même genre que des isolats appartenant à d'autres genres comme *Escherichia*, d'importance moindre chez P₇ P₈ et P₁₀, et très faible ou pratiquement indécélable comme chez P₆ P₁₃ P₁₄ et P₁₅. Cette capacité d'inhibition persiste dans le temps, elle est toujours présente après 12, 24 jusqu'à 96h et plus. Les zones d'inhibition sont toujours les mêmes, elles ne s'étalent pas mais plutôt régressent dans le temps, où l'on observe que certaines bactéries reprennent leurs croissances (Fig. 22b).

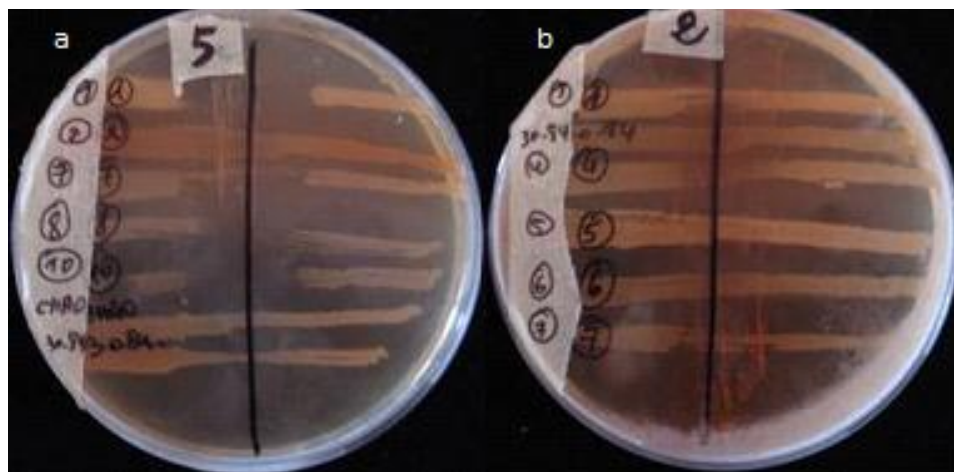


Figure 22 : Production de bactériocines par les isolats de *Pseudomonas*. **a :** par l'isolat 5 ; **b :** par l'isolat 2 (après 48h).

Sur la verticale les isolats producteurs 5 et 2 ; horizontalement les isolats sensibles **a :** 1, 2, 7, 8, 10, CHAO et 30-84 pour *Pseudomonas* 1, 2, 7, 8, 10, *Pseudomonas fluorescens* CHAO et *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, **b :** 1, 4, 5, 6, 7 et 30-84 pour *Pseudomonas* 1, 4, 5, 6, 7 et et *Pseudomonas aureofaciens* 30-84

3.2. DETERMINATION DU TYPE DE BACTERIOCINES

Les isolats ayant fait l'objet de cette étude sont au nombre de six, ce sont ceux qui ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs isolats indicateurs (souches sensibles). Des zones d'inhibition nettement observables après incubation (Fig.23), sont la preuve de la présence de substances de nature bactéricide dans les surnageants suite à l'induction par la mitomycine C. Les 6 isolats ont fait l'objet de traitements supplémentaires afin d'essayer de les déterminer, et résumées dans le Tableau XIX.

Tableau XVIII : Antagonisme *in vitro* entre les *Pseudomonas* spp. fluorescents par production de substances antibactériennes.

Souches Sensibles	Souches productrices													
	1	2	4	5	6	7	8	10	11	13	14	15	CHAO	30-84
P ₁	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
P ₂	-	-	+	±	-	±	±	±	±	±	-	-	+	±
P ₄	Nd	+	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	+	±
P ₅	+	-	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	+	-
P ₆	-	+	Nd	-	-	-	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd
P ₇	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Nd	Nd	+	+
P ₈	-	-	Nd	+	Nd	±	-	±	Nd	Nd	Nd	Nd	+	Nd
P ₉	-	-	Nd	-	Nd	-	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd	-	Nd
P ₁₀	+	+	-	+	Nd	-	-	-	±	Nd	Nd	Nd	+	+
P ₁₃	-	±	Nd	-	Nd	-	-	-	Nd	-	-	Nd	Nd	Nd
<i>E.coli</i>	-	±±	±±	±	±	±	±	±	±	-	±	-	+	-
<i>E.coli</i> M400	-	+	Nd	-	Nd	-	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
St	-	+	±±	±	+	+	+	±	±	-	-	±	+	-
30-84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
<i>P. diminutus</i>	-	-	Nd	-	Nd	-	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>M. paratrophus</i>	-	-	Nd	-	Nd	-	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

1,2....etc: numéro des souches donné aux *Pseudomonas* isolées, CHAO et 30-84: *Pseudomonas fluorescens* CHAO et *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 respectivement. P: *Pseudomonas*, *E. coli* et *E. coli* M400: *Escherichia coli* et *Escherichia coli* M400 respectivement. *P. diminutus* : *Pseudomonas diminutus*, *M. paratrophus* : *Micrococcusparatrophus*. Nd:non déterminé, +:activité bactéricide,-:absence d'activité bactéricide, ± : les bactéries repoussent après 24h d'incubation.

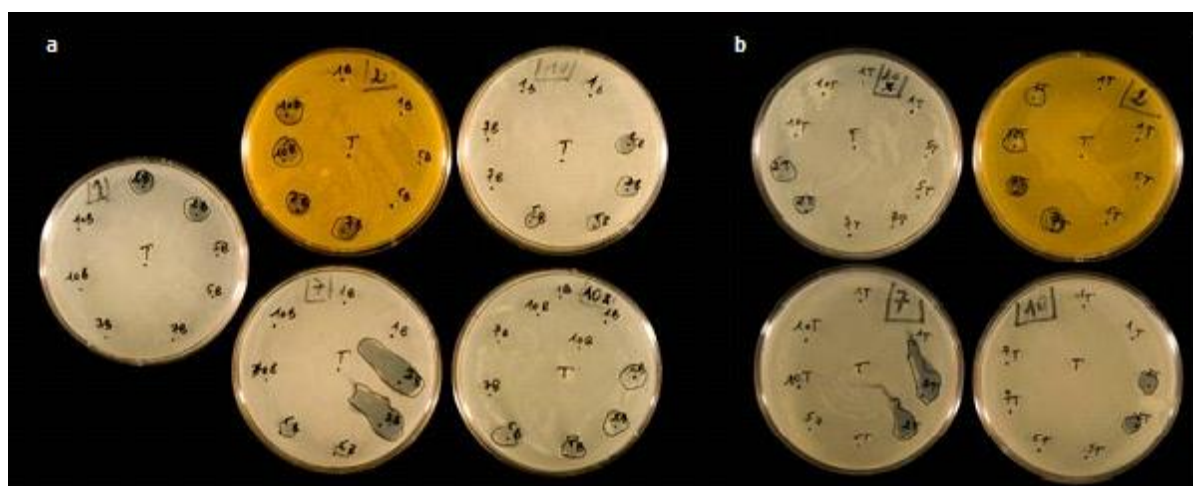


Figure 23 : Activité bactéricide des surnageants.

a : Surnageant non traité ; **b :** Surnageant traité à la trypsine.

a : 1, 2, 7, 10 et 10x : isolats bactériens étalés ; 1B.....10B : surnageant correspondant aux isolats ; T : témoin. **b :** 2, 7, 10, et 10x : isolats bactériens étalés ; 1T.....10T : surnageant traité à la trypsine correspondant aux isolats ; T : témoin

Tableau XIX : Activité bactéricide des surnageants traités.

Souches sensibles		Souches productrices de bactériocines																											
		P ₁				P ₂				P ₅				P ₇				P ₈				P ₁₀				P _{CHAO}			
		s	c	t	f	s	c	t	f	s	c	t	f	s	c	t	f	s	c	t	f	s	c	t	f	s	c	t	f
traitement		1	-	-	+	+	+	-			-			-			-				-	+	+	+	-				
		2	-	-			-			-	+	+	+	-			-	+	+	+	-								
		5	+	-	+	-	+	+	+	-			-	+	+	+	-			-	+	+	+	-	+	+	+	-	
		7	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-			-			-			-	+	+	+	-			
		8	-	-			-			-			-			-			-			-	+	+	+	-			
		10	-	-	+	+	+	-	+	+	-			-			-			-			-	+	+	+	-		
		10c	±	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-			-			-			-	+	+	+	-			

P₁..... et 1,2.....: isolats de *Pseudomonas*, P_{CHAO}: *Pseudomonas fluorescens* CHAO, S : surnageant non traité, C : surnageant ayant subi une congélation à -70° C, t : surnageant traité à la trypsine, f : surnageant filtré à travers des filtres 100kd. + : activité bactéricide par la présence de zones d'inhibition au point de dépôt. - : activité bactéricide négative.*10c : souche de *Pseudomonas* 10 traitée à la ciprofloxacine, * : les cases vides ne sont pas déterminées.

Sur les 6 isolats étudiés en plus de la souche de référence, seulement 5 ont montré une activité antibactérienne après induction par la mitomycine C. Suite aux traitements subis par les lysats, nous avons fait les constatations suivantes :

- Tous les filtrats sont dépourvus d'activité antibactérienne (bactéricide), de même que les surnageants ayant subi le traitement à 80 °C. Ceci est probablement dû à la taille des agents responsables de cette inhibition, qui ont été retenus par le filtre et détruits par le traitement thermique.

- Sur les 6 lysats ayant montré une activité antibactérienne (bactéricide) 5 d'entre eux n'ont pas vu leurs activités annihilées par le traitement trypsique.

- Les mêmes résultats ont été obtenus concernant le traitement à - 70°, où l'on a aussi observé que 5 des lysats (différents des précédents), sont toujours actifs après ce traitement.

L'activité inhibitrice a persisté après 12h 24h et même après 48h, ces zones n'ont ni régressées ni augmenter de taille.

4. DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent qu'en plus de leur capacité à produire des substances antifongiques (phenazines, sidérophores, HCN...), les isolats rhizosphériques sont aussi capables de produire des substances antibactériennes. Validov *et al.* (2005), ont décrits la production de substances antibactériennes par des *Pseudomonas* spp. fluorescents produisant le 2,4 diacétyl phloroglucinol (DAPG). D'autre part, Parret *et al.* (2005) ont observés, qu'en plus d'un arsenal de gènes codant pour des substances antifongiques, *P. fluorescens* Pf-5 serait dotée d'au moins deux gènes antibactériens fonctionnels. Et que le résultat de l'expression de chaque gène chez *E. coli* est la production de bactériocines de 31- kDa qui seront ensuite libéré dans le milieu.

Les tests d'inhibition *in vitro* ont révélé que l'activité bactéricide par production de bactériocines est distribuée « retrouvée » chez les souches produisant des substances de nature antibiotique tel que : *P. fluorescens* CHAO, *P. aureofaciens* 30-84 mais aussi parmi les différentes espèces du genre *Pseudomonas* isolées, on retrouve: *P. chlororaphis* sbsp. *aureofaciens* DSM 6689 (P_2 produisant des phénazines), *P. fluorescens* (P_5 et P_7 isolats stimulant la croissance) et *P. Putida* (P_{10} isolat LOPAT+) qui interagissent entre elles (activité bactéricide mutuel entre les souches productrices). Et que sur les 14 isolats rhizosphériques (mis à part les souches de référence) seulement 6 produisent des substances ayant une activité bactéricide.

De nombreuses études ont montré que la production de bactériocines variait entre 10 et 50 % chez les entérobactéries étudiées (Riley et Gordon, 1992 ; Chakraborty et Nag, 1998 ; Gordon *et al.*, 1998 ; Riley *et al.*, 2003). Validov *et al.* (2005) ont par ailleurs rapporté, que les inhibitions dues à une activité antagonique *in vitro* étaient largement distribuées chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisant le phloroglucinol, et que parmi les 47 souches testées, seulement 11 pouvaient être des antagonistes avec une autre souche.

Les résultats reflètent l'ampleur du déséquilibre dans la nature des isolats de notre collection, dans laquelle certaines espèces sont représentées par plusieurs souches, alors que d'autres ne sont représentés que par une seule. De nombreuses études sur la production de bactériocines ont été menées. Toutefois, il est difficile de les comparer car les stratégies d'échantillonnage varient considérablement (James et Tagg, 1986 ; Tagg, 1991 ; Podschun et Ullmann, 1993 ; Riley *et al.*, 2003).

Très peu d'études sur la production de bactériocines, ont été effectuées chez des souches provenant d'un groupe étroitement lié isolées dans les mêmes conditions et en même temps sur le même type d'hôte (Riley *et al.*, 2003). L'activité antagoniste (production de sidérophores, antibiotiques et autres substances) est aussi positivement corrélée avec le pouvoir bactéricide (Validov *et al.*, 2005).

A l'intérieur d'une même espèce des dizaines voir des centaines de bactériocines différentes sont produites (James *et al.*, 1991; Riley et Gordon, 1992). Selon Klaenhammer (1988), 99% des bactéries produiraient au moins une bactériocine et la seule raison pour laquelle on ne les aurait pas mises en évidence, est que peu de chercheurs s'y sont intéressés. Cette activité bactéricide serait le premier mécanisme de défense bactérien (Riley et Wertz, 2002 ; Riley *et al.*, 2003). Les bactériocines ont une certaine fonction dans les communautés microbiennes, cette constatation vient du fait que la détection de la production de bactériocines est retrouvée chez toutes les lignées phénotypiques étudiées.

Cette compilation est le résultat d'une sélection positive et forte. Une théorie s'est développée et expliquant le rôle potentiel des bactériocines dans le maintien de la diversité microbienne dans une population et au niveau communautaire (Chao et Levin, 1981; Frank, 1994; Gordon et Riley, 1999; Kerr *et al.*, 2002).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents colonisant les racines, et produisant des antibiotiques (ATB) sont les agents de biocontrôle les plus étudiés, et c'est ce qui en fait des PGPR (McSpadden Gardener *et al.*, 2000).

La plupart des souches que nous avons testé antagonisent avec d'autres *Pseudomonas* spp. fluorescents *in vitro* après induction (par les rayons UV ou par la mitomycine C), et spécialement entre les souches productrices. Cette activité ne peut être due à la production d'ATB puisque la plus part des souches ont été précédemment évalué pour la production de substances antimicrobiennes en culture duelle avec des bactéries et des champignons, et une seule souche s'avère productrice d'ATB ayant une activité antifongique et antimicrobienne (*P. chlororaphis* sbsp. *aureofaciens* DSM 6689).

Selon Pugsley et Oudega(1987), l'induction de la production des bactériocines chez les bactéries à Gram négatif est médiée par le régulon SOS (Save Our Selves). Plusieurs protocoles ont été développé pour l'induction des bactériocines chez les entérobactéries (Atkinson, 1973 ; Buffenmyer *et al.*, 1976; Chhibber et Vadehra,1989 ; Daw *et al.*, 1992 ; Podschun et Ullmann, 1993).

Le protocole développé par Pugsley et Oudega (1987), permet la détection d'un nombre considérable de producteurs de bactériocines, et spécialement chez les quels cette production est codée par des gènes induits par le régulon SOS (Riley *et al.*, 2003). Il est clair que notre étude est peu représentative, de la fréquence réelle de cette production. Parce que nous avons utilisé peu de méthodes et qui ne sont peut être pas très sensibles.

Aussi nous avons considéré l'antagonisme comme trait phénotypique unique et qui pouvait être du à l'activité de plusieurs bactériocines agissant en chœur : les bactériocines de faible poids moléculaire PM et/ou bactériocines phage-tail like (Parret et De mot, 2002 ; Validov *et al.*, 2005). En fait des analyses génétiques de *P. fluorescens* ont indiqué que celle-ci avait le potentiel de produire plusieurs bactériocines (Parret et De mot, 2002).

Pour distinguer entre les bactériocines de faible PM des bactériocines phage tail like des bactériophages, les lysats obtenus suite à une induction par la mitomycine C ont montrés une activité antagonique. Dans la plupart, des cas cette activité est associée à des substances de haut PM résistantes aux protéases impliquant des bactériocines phage tail like ou bien des bactériophages, et seul la microscopie électronique nous permettra de révéler la nature réelle de ces bactériocines. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisant le 2-4 DAPG, produisent après induction par la mitomycine C des bactériocines Pyocine-like révélées par microscopie électronique (Validov *et al.*, 2005). Les bactériocines des *Pseudomonas* sont mieux caractérisées chez *P. aeruginosa*. Alors, que les pyocines S sont sensibles aux protéases et tuent les cellules sensibles par leurs activités RNase DNase ou encore la formation de pores membranaires. Les pyocines HMW (haut poids moléculaire) tuent les cellules sensibles par la dépolarisation de la membrane cytoplasmique (Parret et DeMot, 2000).

Comme il a déjà été rapporté, pour les bactériocines HMW (Coetzee *et al.*, 1968 ; Gratia, 1989 ; Boemare *et al.*, 1992 ; Strauch *et al.*, 2001 ; Jabrane *et al.*, 2002), les bactériocines produites par nos isolats sont actives vis-à-vis de souches étroitement liées à la souche productrice mais aussi vis-à-vis des souches phytopathogènes (P₁₀). La seracine P, une bactériocine phage-tail-like produite par *Serratia plymthicum* J7 peut inhiber *in vitro* des souches importantes :

*en medecine vétérinaire (*Serratia marcescens* 230, *Serratia marcescens* 170),

*en santé humaine (*Klebsiella pneumoniae*),

*et en phytopathologie vis-à-vis de 24 souches pathogènes d'*Erwinia amylovora* venant d'endroits et de pays différents (Jabrane *et al.*, 2002).

Plusieurs souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents, isolées des racines de cultures tropicales (bananes et riz) et tempérés (blé et maïs) produisent une ou plusieurs bactériocines avec un spectre d'activité relativement étroit (Parret et DeMot, 2000).

Les bactériocines sont considérées comme des facteurs compétitifs entre les espèces (intra-espèces) dans leurs environnement (Riley et Gordon, 1999 ; Parret et DeMot, 2000; Riley et Wertz, 2002), qui peuvent aider des souches productrices à envahir de nouvelles niches écologiques et/ou de déloger des souches déjà installées (Riley et Gordon, 1999 ; Riley et Wertz, 2002). Cependant, outre les études *in vitro*, le rôle des bactériocines *in vivo* est très peu exploré, et très peu d'études ont portées sur l'activité bactério-cinogénique des *Pseudomonas spp.* associées aux plantes (Parret et DeMot, 2000 ; Validov *et al.*, 2005).

Toutefois la production de bactériocines n'est cependant pas le facteur déterminant majeur dans la colonisation des racines (Validov *et al.*, 2005). Mais nos résultats suggèrent qu'elles pourraient contribuer dans la compétition entre des *Pseudomonas spp.* fluorescents étroitement liés.

5. CONCLUSION

Nous avons montré par cette approche que les isolats producteurs de substances antifongiques tels que les phenazines, les sidérophores, l'HCN, mais aussi les stimulateurs de croissance comme l'AIA, sont aussi capables de synthétiser des substances antibactériennes lorsqu'elles sont soumises à des conditions stressantes. A côté de ces isolats, l'isolat 10 identifié comme phyto-pathogène est lui aussi capable de synthétiser de telles molécules.

Parmi les 14 isolats du biotope étudié, six en plus de la souche de référence ont la capacité de synthétiser des substances bactéricides lorsqu'ils sont irradiés par UV. Mais uniquement cinq ont montré cette capacité en présence de mitomycine C.

L'absence d'activité des filtrats de surnageant laisse supposer qu'il s'agit de molécules de haut poids moléculaire, mais dont les zones d'inhibition ne s'étalent pas, ce qui infirme leur appartenance aux bactériophages.

La capacité de ces isolats à synthétiser des molécules bactéricides, leurs permettraient de persister comme inoculant pour la protection des plantes des maladies telluriques.

CHAPITRE V
CAPACITÉS
D'ANTAGONISME ET
STIMULATION DE LA
CROISSANCE

1. INTRODUCTION

Durant les dernières décennies du siècle dernier, des recherches considérables ont maintes fois démontré que plusieurs microorganismes de diverses origines phylogénétiques sont capables d'inhiber différents agents pathogènes.

Les microorganismes à l'origine de cette inhibition utilisent plus d'un mécanisme pour la suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies à savoir: compétition, antibiose ou parasitisme (Chet, 1987 in Chet *et al.*, 1990). Ils agissent en partie, par la sécrétion de substances antimicrobiennes ayant soit une activité antifongique (James et Guttererson, 1986; Smirnov et Kiprianova, 1990) soit une activité antibactérienne (Smirnov et Kiprianova, 1990; Veselova *et al.*, 2008).

Au niveau de la rhizosphère, et du contrôle des agents pathogènes telluriques, la lutte se fait principalement via des bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas* et des champignons tels que le genre *Trichoderma* (McSpadden et Fravel, 2002). La majorité des études montrent que peu d'isolats du sol (1 à 10%) sont dotés d'un pouvoir antagoniste *in vitro* (McSpadden et Fravel, 2002; Kamilova *et al.*, 2005), et encore très peu d'entre eux ont la capacité de supprimer les agents phytopathogènes dans divers sols et conditions de croissance, mais encore un plus petit nombre est capable d'inhiber un large spectre d'espèces phytopathogènes (McSpadden *et al.*, 2002).

L'idée que des rhizobactéries peuvent être utilisées pour lutter contre des phytopathogènes d'origine tellurique vient en partie des études effectuées sur les sols suppressifs (Keel *et al.*, 1996; Raaijmakers *et al.*, 1998; Mazzola, 2002). Certains facteurs comme le pH, la proportion d'argile et de matière organique peuvent influencer la suppression, mais cette dernière est généralement directement liée à la communauté microbienne. Cook *et al.* (1995) ont postulé que les plantes auraient développées une autre stratégie que la résistance, pour se défendre contre les agents pathogènes telluriques. Cette stratégie implique l'habilité de ces plantes au maintien et à la stimulation sélective de populations de microorganismes de la rhizosphère et du sol, qui seraient des antagonistes de leurs pathogènes.

Les sols suppressifs ont été décrits pour bon nombre de pathogènes telluriques, citons à titre d'exemples des champignons tels que : *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *G. graminis* , *Phytophthora cinammomi*, *Phytophthora infestans*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum* ; et des bactéries : *Streptomyces scabies* et *Ralstonia solanacearum* (Weller *et al.*, 2002).

Le travail de ce chapitre a porté sur l'étude du pouvoir antagoniste *in vitro* de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescentes contre des champignons telluriques, ainsi que l'analyse de certains caractères qui peuvent être déterminants dans la compétence rhizosphérique ; ces caractères sont principalement l'utilisation de sidérophores, la promotion de la croissance végétale et la protection des tubercules.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents provenant du biotope **Dirou**, ont été utilisés dans les essais d'antagonisme. Les quatorze isolats ont été retenus sur la base de leurs biotope et la production de métabolites secondaires, qui pourraient jouer un rôle dans la biostimulation, notamment : l'AIA, l'HCN et les phosphatases ; ainsi que dans l'antagonisme notamment par production : de sidérophores, d'enzymes de dégradation (CWDE) et des phénazines (Tableau XX).

Tableau XX: Isolats de *Pseudomonas* fluorescents testés.

Isolats	Cractéristiques
P ₁	Sid ⁺ , HCN ⁺ , AIA ⁺⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁻ , Phz ⁻
Ps ₂	Sid ⁺ , HCN ⁺ , AIA ⁺⁺⁺ , CWDE ⁺ , Phos ⁺⁺⁺ , Phz ⁺
P ₄	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺⁺⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁺ , Phz ⁻
P ₅	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺ , CWDE ⁺ , Phos ⁺ , Phz ⁻
P ₆	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁺ , Phz ⁻
P ₇	Sid ⁺ , HCN ⁺ , AIA ⁺⁺ , CWDE ⁺ , Phos ⁻ , Phz ⁻
P ₈	Sid ⁺ , HCN ⁺ , AIA ⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁺⁺⁺ , Phz ⁻
P ₉	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁻ , Phz ⁻
P ₁₀	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁺ , Phz ⁻
P ₁₁	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺⁺⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁻ , Phz ⁻
P ₁₂	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁻ , Phz ⁻
P ₁₃	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺⁺⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁺ , Phz ⁻
P ₁₄	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁻ , Phz ⁻
P ₁₅	Sid ⁺ , HCN ⁻ , AIA ⁺ , CWDE ⁻ , Phos ⁺ , Phz ⁻
P ₃₀₋₈₄	Phz ⁺ , Rif ⁺ (Pierson et Thomashow 1992) Souche de référence de biocontrôle offerte par Le Pr Haas(Suisse)

P₁, ..., P₁₅ : Isolats de *Pseudomonas*, P₃₀₋₈₄ : *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 : Sid : synthèse de sidérophores ; HCN : cyanure d'hydrogène ; AIA : production d'AIA ; CWDE : enzymes dégradant les paroi cellulaires ; Phos : Phosphatases ; Phz : phénazines, Rif : résistance à la rifampycine .

Le pouvoir antagoniste de ces isolats a été étudié *in vitro* contre : deux formes spéciales de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* sp., *Fusarium solani* var. *coeruleum*, *Rhizoctonia solani* et deux oomycètes *Phytophthora infestans* et *Pythium ultimum*. Et contre les isolats bactériens (Tableau XXI).

Tableau XXI: Origine des microorganismes utilisés dans l'antagonisme

	Microorganismes	Origine
Isolats fongiques	Fo	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
	Foa	Souche de référence INRA Alger
	Fol	Dr Aissat Université de Béjaia
	Fs	LMA de Sétif
	Fsc	Souche de référence
	Fsul 18	Mme Abdelaziz LMA de Sétif
	Fr	Mme Abdelaziz LMA de Sétif
	Pi	LMA de Sétif Pr Larous
	Pu	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
	Rs	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
Isolats bactériens	<i>E. coli</i> MC 4100	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
	<i>B. subtilis</i>	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
	<i>P. diminutus</i>	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
	<i>Pa. paratrophus</i>	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
	<i>M. luteus</i>	Dr Nicklin, Birkbeck College, London UK
	<i>S. enteridis</i>	LMA de Sétif

*Fo: *Fusarium oxysporum*; Foa: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*; Fol: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Fs: *Fusarium solani* sp.; Fsc: *Fusarium solani* var. *coeruleum*; Fsul18: *Fusarium sulphureum* 18; Fr: *Fusarium roseum* sp.; Pi: *Phytophthora infestans*; Pu: *Pythium ultimum*; Rs: *Rhizoctonia solani*.

*E.coli: *Escheichia coli* MC 4100; B.subtilis: *Bacillus subtilis* ; P.diminutus : *Pseudomonas diminutus* ; Pa. paratrophus: *Paracoccus paratrophus* ; M. luteus : *Micrococcus luteus* ; S.enteridis : *Salmonella enteridis*.

2.2. ANTAGONISME *IN VITRO*

2.2.1. Inhibition de la croissance microbienne

Le pouvoir antagoniste des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été testé d'une part : par l'inhibition de la croissance mycélienne d'isolats cryptogamiques, et d'autre part : par l'inhibition de la croissance bactérienne, en milieux de culture solides. Neuf isolats cryptogamiques ont été testés parmi les quels citons les plus importants: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (**Fol**) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (**Foa**), responsables des fusarioses vasculaires de la tomate et du palmier dattier ; *Fusarium solani* var. *coeruleum* (**Fsc**) responsable de la pourriture sèche de la pomme de terre ; deux oomycètes *Pythium ultimum* (**Pu**) et *Phytophthora infestans* (**Pi**) le premier étant un agent polyphage des fontes de semis et de nécroses racinaires de même que *Rhizoctonia solani* (Basidiomycète, **Rs**), alors que le second est l'agent du mildiou de la pomme de terre.

2.2.2.2. Activité antifongique

*Les tests d'antagonisme fongique ont été réalisés sur des milieux de culture solides (PDA et King B), selon la méthode décrite par Vincent *et al.* (1991). Les isolats sélectionnés sont étalés sur une moitié d'une boîte gélosée, alors qu'un disque fongique de 8 mm provenant d'une culture d'au moins cinq jours est déposé à l'opposé sur l'autre moitié. Ce dernier est placé suivant un axe diamétral équidistant des bactéries (Fig. 24A). Cette confrontation des bactéries avec les champignons cryptogames est suivie pendant 1 semaine à température ambiante, la distance entre l'extrémité des colonies et celle du mycélium fongique est alors mesurée, et est comparée au témoin ne contenant que le mycélium fongique.

- Une étape préliminaire où l'isolat fongique a été confronté aux différents isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents, les observations ont portées sur l'existence ou l'absence d'une inhibition de la croissance mycélienne. Cette dernière a été estimée par la mesure du diamètre moyen de la colonie fongique.

- Dans une deuxième étape, la souche bactérienne ayant montrée une activité antagoniste notable, a été d'une part comparée à une souche de référence en l'occurrence la souche 30-84 quand à son activité inhibitrice. Et d'autre part, subie une série de tests pour mettre en évidence et évaluer la substance à l'origine de cet antagonisme.

- La troisième étape a consisté à extraire la substance douée de cette activité antagoniste (chapitre métabolites secondaires), ensuite tester son activité antimicrobienne selon les méthodes décrites par James et Gutterson (1986) et Harrison *et al.* (1993).

*D'autre part, l'antagonisme fongique par production de substances volatiles en l'occurrence l'acide cyanhydrique a été recherché. Pour ce fait, les bactéries sont d'abord inoculées en nappe sur TSA (tryptic soy agar), et incubées à 28° C pendant 24h. C'est alors que le couvercle de la boîte est remplacé par un autre fond contenant un disque fongique de 7mm sur PDA. Les deux boîtes sont scellées par du parafilm. Le témoin est préparé de la même manière, sauf absence de bactéries dans la boîte du bas (Fig. 24B). Les boîtes sont incubées à 28° C, et les observations sont notées après 24 à 120 h d'incubation. L'inhibition de la croissance fongique est calculée en utilisant la formule ci-après, où r_1 représente la croissance radiale du champignon témoin, alors que r_2 représente celle avec bactérie (Trivedi *et al.*, 2008).

$$\frac{(r_1 - r_2)}{r_1} \times 100$$

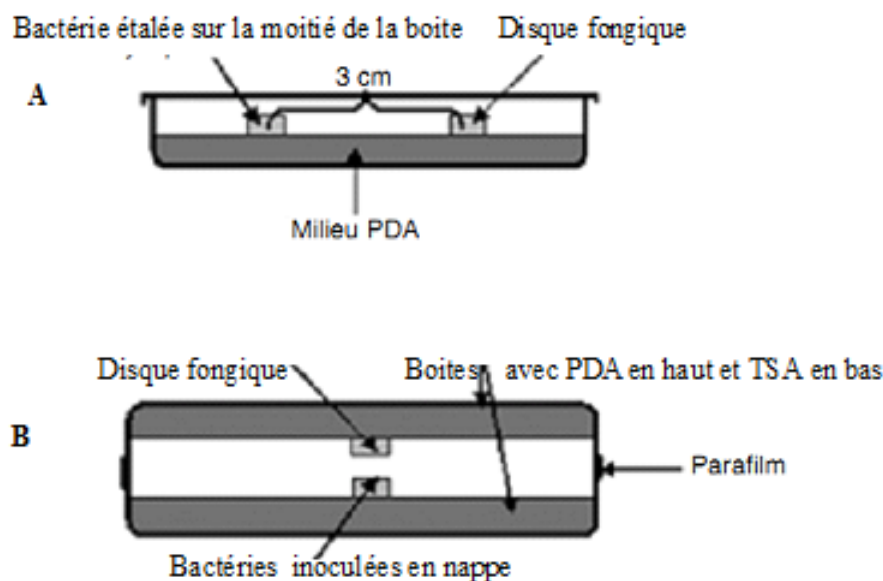


Figure 24 : Confrontations **A** : équidistante par contact direct sur PDA, **B** : à distance.

2.2.1.2. Activité antibactérienne

Les tests d'antagonisme bactérien ont été réalisés selon la méthode décrite par Veselova *et al.* (2008). Pour cela, les souches présumées douées d'activité antagonique ont été étalées sur TSA, en une bande de 2cm de diamètre, incubées à 28°C pendant 72h, c'est alors qu'une suspension bactérienne ($10^5 \times \text{UFC}$) supposée sensible est incorporée dans 3ml de soft agar (0.8%) et est coulée par-dessus. Le résultat est positif lorsque apparaît, après incubation un halo clair de part et d'autre de la bande de la bactérie productrice.

2.2.2. Activité antimicrobienne des surnageants

L'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des surnageants de l'isolat P₂ (phase organique séchée et suspendue dans du méthanol) a été déterminée en utilisant deux types de techniques : la première utilisant la méthode des disques, et la seconde utilisant l'incorporation de la substance active dans le milieu de culture.

2.2.2.1. Activité antibactérienne

Des suspensions bactériennes (100µl) provenant d'une culture d'une nuit, ont été étalées sur des boîtes contenant du TSA. C'est alors que des disques de papier whatmann imprégnés de 20 µl de surnageant (correspondant à 0.31 ml de surnageant) équidistants ont été placés à la surface des boîtes inoculées. Les boîtes sont d'abord mises à 4° C pendant la nuit ensuite incubées à 37° C pendant 24h (Barry et Thornsberry, 1985).

2.2.2.2. Activité antifongique

Cette activité a été évaluée par l'utilisation de plaques dotées de 24 puits, d'un volume de 2ml. A partir de l'extrait méthanolique brut, une série de dilutions au 1/2 a été réalisée dans de l'eau. C'est alors que, 200 µl de ces dilutions sont rajoutés à 800 µl de PDA en surfusion (1,2 % d'agar) contenus dans les puits. Lorsque la gélose est solidifiée, un disque fongique de 3mm des champignons telluriques testés est alors déposé à la surface, et les plaques incubées à 28° C pendant 48h. La concentration minimale de substance inhibant toute croissance fongique est définie comme une unité d'activité, est déterminée (James et Guttererson, 1986).

2.2.3. Utilisation des sidérophores

La compétition pour le fer via les sidérophores dans les rhizosphères est un déterminant majeur dans les interactions entre les microorganismes pathogènes et bénéfiques. L'aptitude de différentes souches de *Pseudomonas* à utiliser des sidérophores hétérologues, a été testée dans le cadre de leur pouvoir antagoniste. Dans un premier temps on a évalué la capacité de ces souches à utiliser les sidérophores hétérologues d'une souche productrice sur un milieu dépleté en fer par adjonction d'EDDA (Ethylenediamine di (o-hydroxyphenyl) acetic acid) ; ensuite on a testé leur pouvoir d'utilisation de sidérophores semi-purifiés.

2.2.3.1. Évaluation de la capacité d'utilisation des sidérophores

Pour déterminer la capacité d'une souche à utiliser le sidérophore d'une autre souche pour l'obtention de fer ferrique, les souches en question sont cultivées sur une gélose sucrose-asparagine (SA) contenant de l'EDDA 0 et 3.0 µM). La souche productrice est inoculée en une ligne médiane, et est incubée à 28°C pendant 36h, pour permettre la diffusion des sidérophores dans le milieu.

Les souches à tester sont alors inoculées (de part et d'autre) parallèlement à la souche productrice à deux distances différentes de l'inoculat primaire, à proximité du sidérophore ayant diffusé, et à distance (Figure 25). Les boîtes sont alors incubées à 28 °C pendant 24h, la croissance relative des deux lignes est alors comparée, afin de déterminer la capacité d'utilisation des sidérophores hétérologues par les isolats testés (O'sullivan *et al.*, 1990).

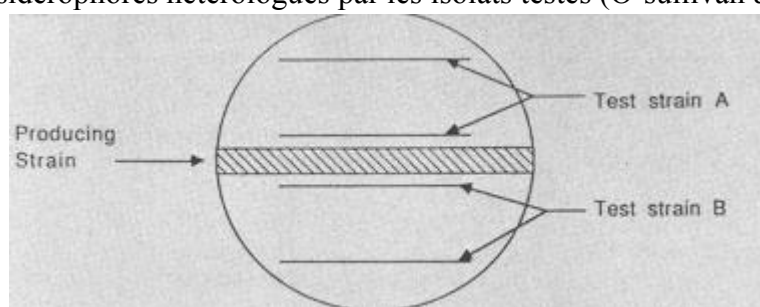


Figure 25 : Utilisation des sidérophores hétérologues (O'sullivan *et al.*, 1990).

Au centre isolat bactérien producteur, de part et d'autre isolats utilisateurs.

2.2.3.2. Utilisation des sidérophores hétérologues

Dans un deuxième temps, on a d'abord purifié les sidérophores (i), ensuite testé la capacité des bactéries à les utiliser (ii).

(i) Les bactéries sont cultivées dans 10ml de milieu liquide au CAA ou au succinate pendant 40h à 28 ° C, sous agitation permanente. Les cultures sont alors acidifiées à pH 1.5 à 2 par de l'acide chlorhydrique. Les sidérophores sont alors extraits (semi purifiés) par le même volume d'acétate d'éthyle, après évaporation, le résidu sec est alors dissout dans 1ml de méthanol (Serino *et al.*, 1995). Pour l'analyse qualitative une électrophorèse nous a permis de vérifier la présence ou l'absence de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987)

(ii) D'autre part les mêmes bactéries sont cultivées comme précédemment, mais après 24h de croissance un aliquot (Absorbance 0.3 à 0.5 à 540nm) est étalé sur gélose SA. Ces dernières sont dotées de puits de 3mm de diamètre, qui recevront extemporanément 40µl d'extrait méthanolique de sidérophores (le puits témoin ne contient que du méthanol). Et sont incubées pendant 8h à 28 ° C, la croissance des bactéries autour des puits signifie l'utilisation de sidérophores hétérologues (Jacques *et al.*, 1995).

2.2.4. Tests d'enrobage des tubercules

Pour démontrer la capacité des isolats de *Pseudomonas* à protéger les tubercules de la pourriture sèche lors de l'entreposage, des essais de bactérisation inspirés des travaux d'El banna *et al.* (1984) ont été effectués.

*Les tubercules sont désinfectés selon la méthode décrite par Kim *et al.* (1992), débarrassés des poussières par lavage à l'eau du robinet, sont ensuite immergés pendant 10 mn dans un bain de désinfection (70% éthanol/ 1% hypochlorite de sodium/ 29% eau distillée stérile), c'est alors qu'un deuxième rinçage à l'eau distillée stérile s'impose. Les tubercules sont séchés aseptiquement ensuite traités.

*Les tubercules ont été traités par immersion dans des suspensions de spores (*Fusarium solani* var. *coeruleum*) et bactériennes (P₂, P₅, P₁₀ et P₁₂), respectivement 10⁴spores et 10⁸cellules /ml. A cet effet deux lots en plus du témoin non traité, en vu d'être entreposés à 4°C pendant 75 jours (dont les 6 derniers jours sont incubés à température ambiante ; El-banna *et al.*, 1984), ont été préparés comme suit:

Pour le premier lot: les tubercules sont immergés dans une suspension de bactéries pendant 30s, ensuite séché et entreposé dans un sac en plastique stérile.

Pour le deuxième lot: les tubercules sont d'abord immergés dans une suspension bactérienne pendant 30s, séchés ensuite enrobés par quelques ml de suspension de spores, après séchage les tubercules sont entreposés dans un sac en plastique stérile.

2.3. TESTS D'ANTAGONISME *IN SITU*

Après les tests d'antagonisme *in vitro* (inhibition de croissance du champignon et production de métabolites secondaires tel que le cyanure par les souches bactériennes) des tests d'antagonisme *in situ* (en terreau stérile et non stérile et en conditions contrôlées) ont été effectués en vue de repérer des souches de *Pseudomonas* fluorescents efficaces contre les attaques précoces d'un des pathogènes étudiés.

2.3.1. Préparation des terreaux

Le sol utilisé pour les essais *in situ* a été prélevé sur le campus universitaire, partagé en deux lots : le premier lot a été stérilisé (noté S) à l'autoclave (à 121° C pendant 1h, l'opération étant répétée 3 fois après refroidissement) alors que le second est utilisé directement (Chao *et al.*, 1986).

2.3.2. Traitement des tubercules

Après désinfection des tubercules selon Kim *et al.* (1992), deux lots sont alors préparés, ensuite empotés.

Dans le premier lot: les tubercules sont traités uniquement par immersion dans 9 ml de suspension bactérienne (P₂, P₅, P₁₀ et P₁₂) à 10⁸ cellule/ml ; avant d'être plantés dans un sol stérile ou non, le témoin recevant un tubercule désinfecté (Yigal *et al.*, 1985).

Dans le deuxième lot: les tubercules sont traités par immersion dans 9 ml de suspension bactérienne (P₂, P₅, P₁₀ et P₁₂) à 10⁸ cellule/ml, additionnés d'un ml de suspension de spores (10⁴ spores/ml) de *Fusarium solani* var. *coeruleum* ou de *Fusarium oxysporum* sp. avant d'être plantés dans un sol stérile ou non, le témoin recevant un tubercule traité par 1ml de suspension de spores (10⁴ spores/ml) uniquement (Yigal *et al.*, 1985).

La culture des plants est réalisée au laboratoire sous une température d'environ 23°C et une photopériode de 12h. Les plants sont irrigués régulièrement avec de l'eau stérilisée. La croissance de ces plants a été suivie pendant huit semaines, et l'indice de maladie (I%) est déterminé comme suit : (Total des plants malades/Total des plants observés) x 100. La détermination de cet indice a été effectuée selon la symptomatologie de la fusariose (flétrissement fusarien). L'échelle adoptée est typique à la maladie (mais aussi appliquée pour les bactéries phytopathogènes). *0 : pas de symptômes. *1 : léger flétrissement. *2 : flétrissement unilatéral avec nécroses foliaires. *3 : flétrissement généralisé *4 : mort du plant.

3. RESULTATS

3.1. ANTAGONISME *IN VITRO*

3.1.1. Inhibition de la croissance microbienne

Le screening des isolats a permis de mettre en évidence une souche particulièrement antagoniste par production de phénazines sur PDA, il s'agit en l'occurrence de la souche P₂ identifiée comme *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*. Cette activité antagoniste est plus importante vis-à-vis du **Foa**, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* sp., (Fig. 26A), *Phytophthora infestans* (Fig.26B) , *F. solani* var. *coeruleum* (Fig. 26C) et *Rhizoctonia solani*, et est de moindre importance vis-à-vis de *P. ultimum* et *F. solani* (Fig. D₂). La croissance mycélienne enregistrée chez les témoins est nettement supérieure à celle des interactions *Pseudomonas*/isolat fongique. Le diamètre moyen des colonies enregistré était de 7±0,2 cm pour **Fsc** et 8,5 ±0.1cm pour les autres isolats fongiques.

Globalement, la croissance mycélienne en culture duelle était nettement moins efficiente par rapport à celle des témoins respectifs. En effet, le taux d'inhibition varie de 41,17 % pour **Fs** et 77,78 pour le **Foa** (Tableau XXII ; Annexe IVA1). Ce test d'inhibition a montré que le **Foa** et le **Fol** sont les plus sensibles aux actions des bactéries antagonistes.

Tableau XXII : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne.

<i>Pseudomonas</i>	Taux d'inhibition (%)							
	Fs	Fsc	Fo	Foa	Fol	Pi	Pu	Rs
2	41,17	64,28	70,58	77,78	75	62,35	55,56	62,5
30-84	47,05	52,85	nd	41,17	nd	55,29	nd	nd

% : taux d'inhibition en pourcentage, nd : non déterminé, 2 et 30-84 : *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* et *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, **Fs** : *F. solani*, **Fsc** : *F. solani* var. *coeruleum*, **Fo** : *Fusarium oxysporum* sp., **Foa** : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, **Fol** : *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, **Pi** : *Phytophthora infestans*, **Pu** : *Pythium ultimum*, **Rs** : *Rhizoctonia solani*.

L'activité antagoniste de cet isolat est fonction de la production de substances antimicrobiennes qu'on peut apprécier sur gélose. Ces substances sont produites de manières constitutives observables sur PDA, où les colonies sont nettement colorées en orange, et où la coloration est plus accentuée lors de confrontations fongiques à proximité du mycélium (Fig. 26D₁). Par contre, la présence de substances antimicrobiennes varie considérablement avec le milieu (plus importante sur NBY que sur King B et PDA ; Annexe IV A2) et l'âge de la culture (plus importante à 72 h qu'à 24).

La fraction benzénique des surnageants de P₂ inhibe la croissance fongique des phytopathogènes étudiés à des degrés différents. Alors que 20µg/ml (correspondant respectivement à 0.31 ml de surnageant bactérien et donc à 20µl d'extrait brut rajouté dans le puits) sont suffisants pour inhiber toute croissance fongique chez *F. oxysporum*(Fig. 26F), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* et *F. sulphereum* 18, le double est nécessaire pour inhiber *P. ultimum* (Fig. 26E) et *F. roseum* sp., et 100 µl n'inhibent la croissance de *F. solani* que de moitié (Tableau XXIII, Annexe IV A3).

Tableau XXIII: Quantités d'extrait requises pour l'inhibition fongique.

Champignon phytopathogène	Extrait brut de surnageant rajouté par puits (en µl)
<i>F. oxysporum</i> sp.	20
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	20
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	20
<i>F. roseum</i> sp.	40
<i>F. solani</i>	> 100
<i>F. sulphereum</i> 18	20
<i>P. ultimum</i>	40
<i>R. solani</i>	60

L'antagonisme bactérien direct n'a pu être observé qu'avec *Salmonella enteridis*. Alors que des concentrations du produit brut de l'ordre de 20 et 10 µg (correspondant respectivement à 0.31 et 0.15 ml de surnageant bactérien), inhibent respectivement *Bacillus subtilis* et *Paracoccus paratrophus* avec des zones d'inhibition de 25 et 15 mm (Fig. 27). Mais les mêmes concentrations sont moins actives vis-à-vis de *Micrococcus luteus* et *Pseudomonas diminutus*.

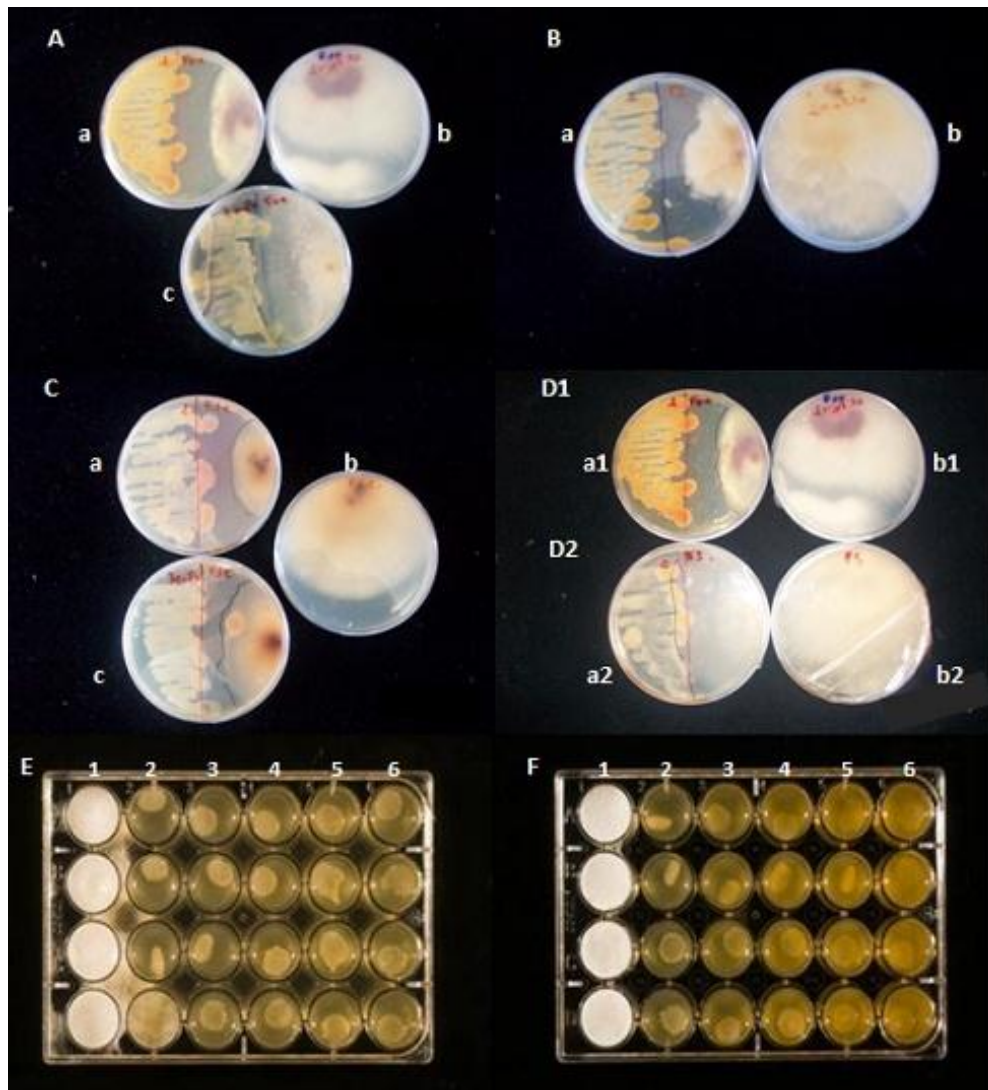


Figure 26: Antagonisme fongique *in vitro*

A, B, C, et D₂ : Confrontations avec *F.oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans*, *F. solani* var. *coeruleum*, *Fusarium solani* respectivement; a, a₁, a₂ : avec P₂, c : avec la souche 30-84, b, b₁, b₂ : témoin. **D₁ (a₁)** : intensité de la coloration avec Foa par rapport à Fs (D₂ a₂).

E et F : inhibition de la croissance fongique par incorporation de l'extrait brut actif (1 : 0 µl ; 2 : 20 µl ; 3 : 40 µl ; 4 : 60 µl ; 5 : 80 µl et 6 : 100 µl) respectivement avec *Pytium ultimum* et *Fusarium oxysporum*.

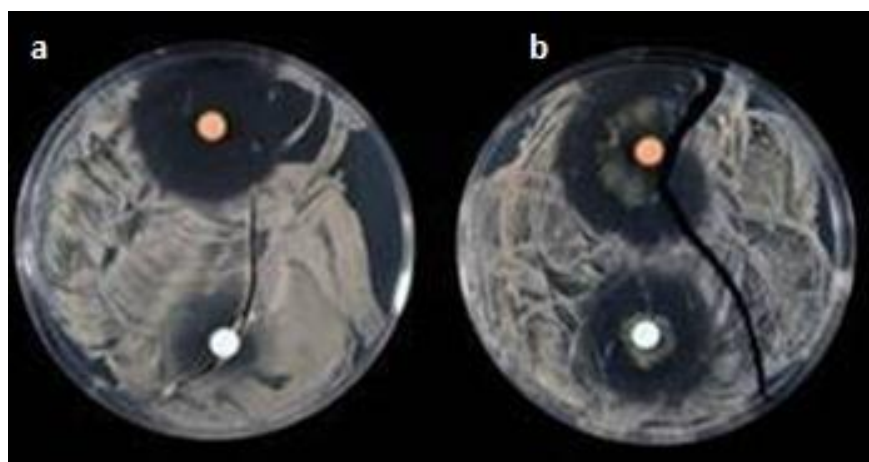


Figure 27: Antagonisme bactérien indirect par l'extrait brut de P₂.

a : *Bacillus subtilis* b : *Paraoccus paratrophus* ; en haut avec 20 µl et en bas avec 10 µl d'extrait.

A côté de l'isolat de *Pseudomonas* 2, d'autres isolats sont doués d'activité antagoniste mais par la production d'autres métabolites. En effet, l'antagonisme fongique observé par production de substances volatiles, est retrouvé chez les souches ayant produits des quantités appréciables d'HCN. Cet antagonisme va en décroissant de la souche CHAO aux isolats P₂, P₁, P₈, et enfin P₇ sur le milieu TSA additionné de glycine (Fig. 28), et presque inexistant sur King B (Annexe IV A4). Les isolats producteurs de sidérophores ont eux aussi montré un niveau d'antagonisme appréciable sur le milieu B de King, c'est ainsi que les isolats P₂, P₁, P₅, P₇, et même P₁₀ ont inhibés, par ordre décroissant, les agents cryptogamiques.

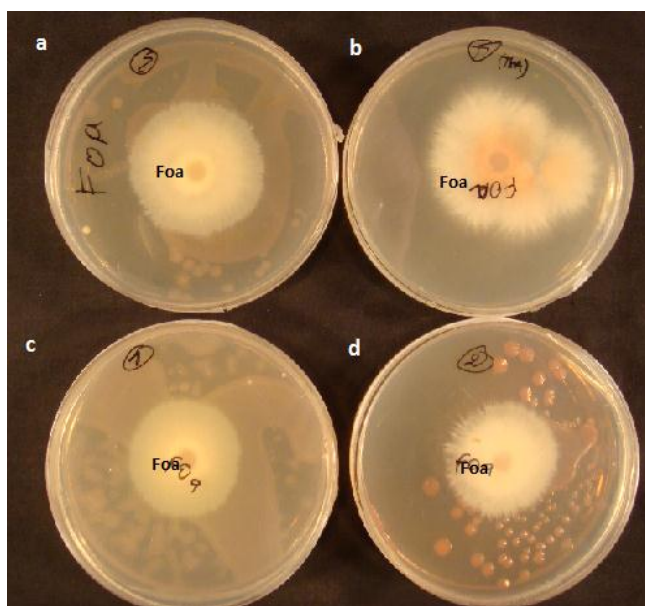


Figure 28: Antagonisme par production de substances volatiles.

a: P₈, c: P₁, d: P₂, b: témoin sans bactérie, Foa: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

3.1.2. Utilisation des sidérophores

Certaines bactéries étudiées ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, c'est le cas de P₂ (Fig. 29 a et b). Alors que certaines comme les isolats P₁ et P₅ ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore produits par d'autres isolats (Fig. 29 b' et f'). En effet, certains isolats utilisent les sidérophores hétérologues directement sur le milieu dans le quel ils sont produits (Fig. 29 a, b, c, d, e et f; Annexe IV B1), ou encore les sidérophores semi purifiés (Fig. 30, 2s, 2Su, 7 C et 12 C, Annexe IV B2 et B3).

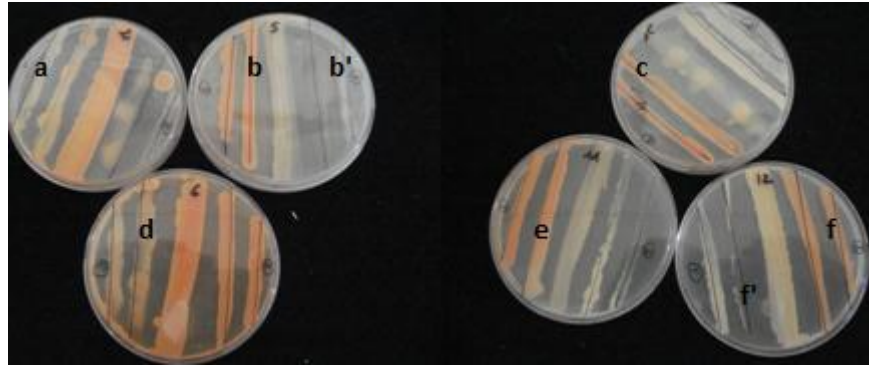


Figure 29: Utilisation des sidérophores hétérologues sur Sucrose/Asparagine
a, b, c, d, e, et f : les isolats peuvent utiliser des sidérophores hétérologues produits par les isolats ensemencés au centre ;
b' et f' : les isolats P5 et P1 ne peuvent pas utiliser les sidérophores hétérologues.

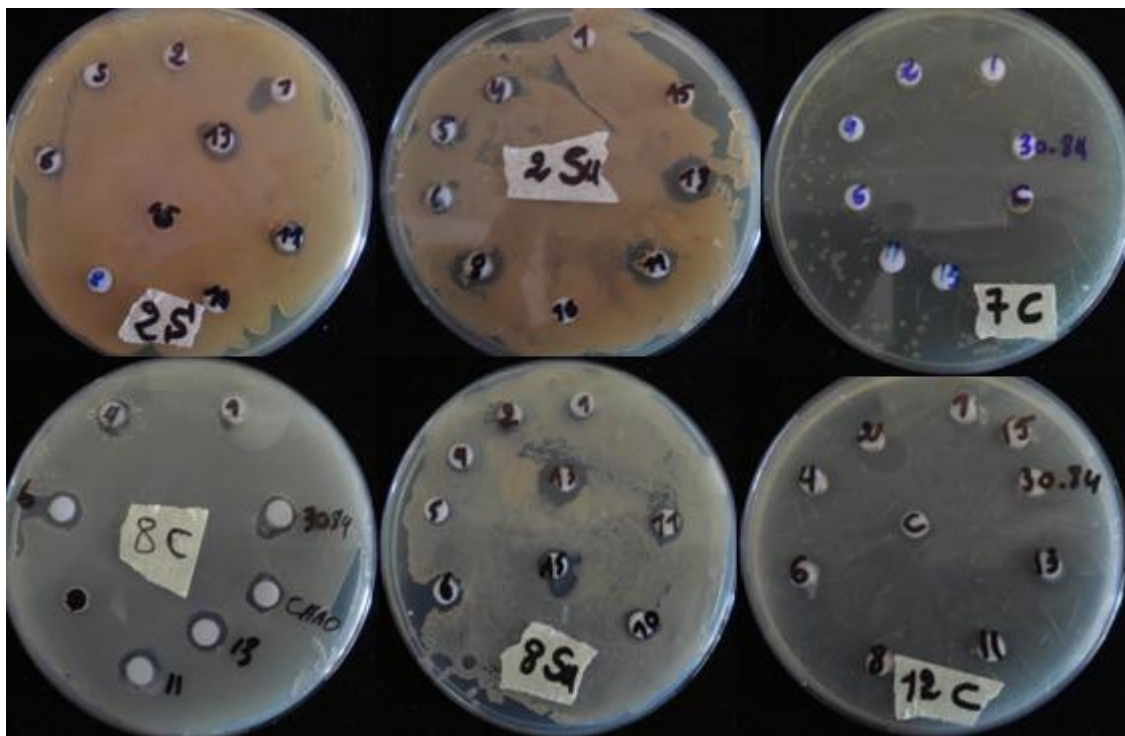


Figure 30 : Utilisation de sidérophores semi purifiés.

2_S, 2_{Su}, 7_C, 8_C, 8_{Su}, et 12_C : les numéros correspondent à la souche étalée (utilisatrice) et l'indice correspond au milieu (Su : succinate et C : CAA) de production des sidérophores semi purifiés mis dans les puits. Les numéros dans les puits correspondent aux souches productrices de sidérophores.

3.1.3. Enrobage des tubercules

Le traitement des tubercules par immersion successives dans les suspensions bactériennes et de spores, a montré la capacité de ces dernières à protéger les tubercules pendant l'entreposage, des pourritures occasionnées par *Fusarium solani* var. *coeruleum* (FSC). En effet, cette protection va en décroissant : P₂, P₅, P₁₀, par contre l'isolat P₁₂ n'a eu aucune activité protectrice à l'encontre de ce champignon (Fig. 31).



Figure 31: Pouvoir protecteur des isolats de *Pseudomonas*.

T₄ : témoin non traité, 10⁴C : témoin traité avec une suspension fongique de FSC, B_{2,5,10 et 12}+10⁴C : *Pseudomonas* (2,5,10 et 12) et suspension fongique de FSC.

3.2. ANTAGONISME *IN PLANTA*

3.2.1. Stimulation de la croissance des plantes

L'induction de la stimulation de la croissance, par bactérisation des tubercules avant plantation a été plus marquante dans un sol non stérilisé, en comparaison avec le témoin non traité. En effet, les plantes ont mieux poussées dans un sol non stérile, où l'on a remarqué que la stimulation la plus élevée est obtenue avec l'isolat 2 suivit de près par l'isolat 5 (Fig.32A).

Alors que dans le sol non stérile on a uniquement observé un ralentissement de croissance des plantes traitées avec les isolats 10 et 12 (Fig. 32A). Dans le sol stérile ces bactéries ont provoqué respectivement un niveau de symptomatologie de l'ordre de 3 et 4. D'autre part, les isolats ayant stimulé la croissance des plants dans un sol naturel, n'ont pas eu d'effet significatif dans un sol stérile (Fig. 32B).

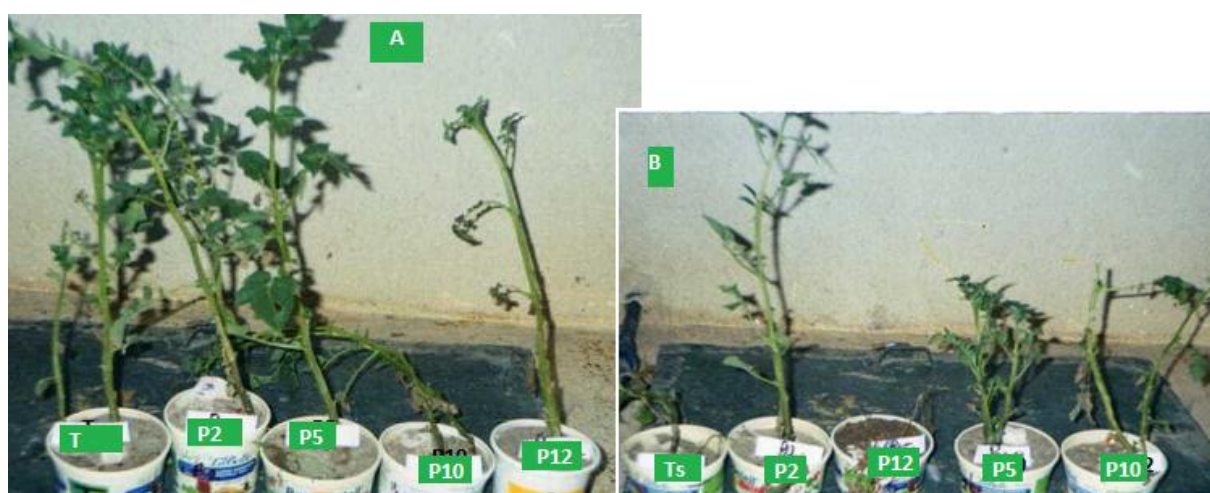


Figure 32 : Effet de la bactérisation sur la croissance des plantes, après 3 semaines d'inoculation.

A : dans un sol non stérilisé, T : témoin, P₂,..., P₁₂ : isolats de *Pseudomonas* utilisés pour la bactérisation.
B : dans un sol stérilisé, Ts : témoin, P₂,..., P₁₂ : isolats de *Pseudomonas* utilisés pour la bactérisation.

3.2.2. Pouvoir pathogène des isolats de *Pseudomonas* 10 et 12

Les isolats 10 et 12 ont ralenti la croissance des plants dans un sol naturel, mais ont engendrés de nombreux dommages aux plantes dans le sol stérilisé, après trois semaines d'inoculation. En poursuivant l'expérience dans le sol naturel pendant 5 semaines supplémentaires, tous les plants inoculés avec les isolats 10 et 12 ont montré un niveau de symptomatologie d'ordre 4, à quelques jours d'intervalle (Fig. 33). Alors, que les plants inoculés avec les isolats 2 et 5 n'ont montré aucun signe et les plants étaient plus grands que le témoin non bactérié.

3.2.3. Antagonisme *in Planta*: inhibition de *Fusarium oxysporum* sp.

La symptomatologie observée après deux semaines de l'inoculation du pathogène et dans un sol non stérilisé, a montré que les plants infestés par *Fusarium oxysporum* sp. avaient développé des nécroses foliaires en plus du flétrissement (Fig.34). L'évolution du taux d'infection a été très rapide chez les plants non bactériés (témoin inoculé avec le champignon), suivit de près par les plants bactériés par les isolats 10 et 12 (>50%). Tandis que pour les plants bactériés avec les isolats de *Pseudomonas* 2 et 5, les taux d'infection sont significativement moindres (entre 0 et 10%).

L'évolution de la maladie a été ensuite rapide pour les plans bactériés avec les isolats 10 et 12, pour atteindre un niveau de symptomatologie 4 au bout de la cinquième semaine (Fig. 35A) ; de même que pour le témoin positif. Par contre, pour les plants bactériés avec les isolats 2 et 5, une stabilité des symptômes a été observée à partir de la 3^{ème} semaine.

Dans le sol stérile par contre, parmi les plants bactériés le taux d'infection a été plus marqué avec l'isolat 12 ; où l'on a observé un flétrissement en plus du témoin positif dont le plant a atteint le niveau 4 après deux semaines d'inoculation (Fig. 35B).

La bactériation des plants a induit une bio protection des plants *in situ*, révélatrice d'un pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* sp. A la fin des observations, soit huit semaines après la bactériation, une inhibition appréciable de la maladie a été constatée chez les plants bactériés avec les isolats 2 et 5 ; pour les quels les taux d'infection restaient très faibles, respectivement, 12,6 et 19,3%, avec des symptômes atténués (principalement des nécroses foliaires). Alors que, les plants bactériés avec les isolats 10 et 12 ont développé la maladie avec un niveau 4 bien avant la huitième semaine (Annexe V). Toutefois, les taux d'inhibition de la maladie ont été meilleurs dans un sol non stérile.



Figure 33 : Effet de la bactérisation par les isolats 10 et 12 après 8 semaines d'inoculation.

T : témoin dans un sol non stérile, P₁₀ et P₁₂ : pseudomonas utilisés pour la bactérisation.



Figure 34: Nécroses foliaires après 20 jours d'inoculation.

Nf : nécroses foliaires ; T : témoin négatif ; B₂+C, B₁₀+C et B₁₂+C : co-inoculation *Pseudomonas* / *Fusarium oxysporum* sp.

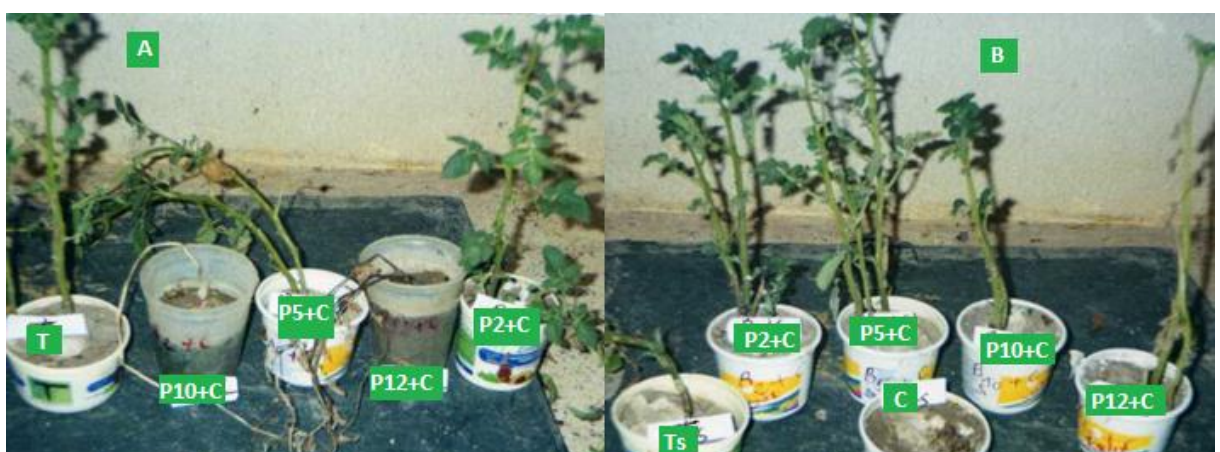


Figure 35 : Effet de la bactérisation sur le développement de la maladie, après 5 semaines d'inoculation.

A : dans un sol non stérilisé, T : témoin, P₂+ C.....P₁₂+C : co-inoculation isolat *Pseudomonas*/ *Fusarium oxysporum* sp.

B : dans un sol stérilisé, Ts : témoin, P₂+ C.....P₁₂+C : co-inoculation isolat *Pseudomonas*/ *Fusarium oxysporum* sp., C : témoin positif (*Fusarium oxysporum* sp.).

4. DISCUSSION

Un effet antagoniste, *in vitro*, vis-à-vis de quatre deutéromycètes (Fo, Foa, Fol et Fr), dont deux formes spéciales de *F. oxysporum* (*albedinis* et *lycopersici*), trois ascomycètes (Fs = *Haematonectria haematococca*, Fsc = *Selenosporium caeruleum* et *F. sambucinum* = *Gibberella pulicaris* ; [http://www.cybertruffle.org.uk/cyberliber/credits.htm#Index of Fungi](http://www.cybertruffle.org.uk/cyberliber/credits.htm#Index%20of%20Fungi)), un basidiomycète (Rs) et deux oomycètes (Pi et Pu), a été observé pour l'isolat *Pseudomonas* 2 du site Dirou. Les effets majeurs ont été obtenus contre le Foa qui se présente comme le plus sensible.

L'inhibition de la croissance mycélienne par l'isolat P₂ observée sur milieu PDA suggère qu'elle n'est pas due à l'action des sidérophores, mais à d'autres mécanismes développés par la bactérie, à la différence de l'inhibition sur le milieu B de King, qui peut être liée à la synthèse de sidérophores.

L'action antagoniste de cet isolat ne semble pas être spécifique de l'agent pathogène, elle est indépendante du milieu de culture et elle peut être à large spectre, agissant sur presque tous les agents cryptogamiques testés. Alors que pour les autres isolats, cet antagonisme dépend du milieu de culture mais est indépendant de l'agent pathogène. Cette variabilité dans l'expression de l'activité antagoniste des isolats de *Pseudomonas* suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le biocontrôle. Nos résultats soulignent la possibilité d'un effet à large spectre affectant des champignons appartenant à toutes les classes fongiques. D'une manière générale, l'isolat de *Pseudomonas* P₂ est le plus actif, ses performances peuvent être corrélés à son pouvoir métabolique, notamment secondaire.

La plupart des *Pseudomonas* spp. fluorescents dont l'efficacité a été prouvée dans le biocontrôle des maladies de plantes, produisent un ou plusieurs antibiotiques autre que les sidérophores (Haas et Défago, 2005).

Le rôle attribué à ces antibiotiques dans le biocontrôle des pathogènes telluriques, vient de la corrélation de leur production et de l'inhibition des pathogènes *in vitro*, et de la suppression de la maladie *in vivo*. Ces antibiotiques (pyoluteorine et pyrrolnitrine), appliqués après purification aux graines (Howel et Stipanovic, 1979 ; 1980), ou aux fruits (Janisiewicz et Roitman, 1988) sont à l'origine de la suppression de la maladie (Keel *et al.*, 1992).

In vitro, ces antibiotiques sont capables d'inhiber les champignons pathogènes, mais peuvent avoir une activité antibactérienne, et dans certains cas peuvent avoir une activité vis-à-vis des organismes supérieurs.

Parmi ces composés antibiotiques, six ont prouvé leur efficacité dans le biocontrôle des maladies racinaires. Les phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine et les lipopeptides cycliques sont diffusible, alors que l'acide cyanhydrique est volatile (Haas et Défago, 2005). Alternativement, les phénazines sont des antibiotiques oxydo-réducteurs de pointe agissant vis-à-vis du pathogène *F. oxysporum* par l'accumulation de radicaux d'oxygène toxiques (Mavrodi et al., 2006).

Le mode d'action de ces antibiotiques est partiellement élucidé (Haas et Défago, 2005). Les phénazines produites par *P. aeruginosa* modulent la morphologie des colonies bactériennes (Dietrich et al., 2008), ce sont des analogues des coenzymes flavines, inhibant le transport d'électrons et possédant de nombreux effets pharmacologiques sur les cellules animales (Ran et al., 2003). Le 2,4-diacétyl phloroglucinol (DAPG), agit par l'altération des membranes de *Pythium* spp. inhibe particulièrement les zoospores de cet oomycète (deSouza et al., 2003) ; et est hautement toxique à fortes doses (Keel et al., 1992). Le mode d'action de la pyolutéorine n'a pas encore été élucidé alors que la pyrrolnitrine a été décrite comme inhibitrice des chaînes respiratoires fongiques (Tripathi et Gottlieb, 1969). Cette dernière a même été utilisée comme antimycotique topique en médecine humaine, et certains de ses analogues comme fongicide à usage agricole (Ligon et al., 2000). L'acide cyanhydrique est un inhibiteur potentiel des métallo-enzymes, spécialement les oxydases à cytochrome *c* contenant du cuivre (Blumer et Haas, 2000).

Pour une germination complète et une pénétration réussie des extrémités racinaires de leurs hôtes, les formes spéciales pathogènes de *F. oxysporum*, requièrent du fer (Baker, 1986). L'introduction de *Pseudomonas* dans le sol induit une suppression par production de sidérophores de type cathécol-hydroxamate (Teintze et al., 1980).

Les fusaria aussi produisent des sidérophores de type hydroxamate, mais ceux-ci sont moins efficaces que ceux produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Et donc, sous des conditions limitantes en fer, retrouvés dans les sols alcalins, le pathogène est privé de formes de fer assimilable, due à l'activité des *Pseudomonas* spp. fluorescents rhizo-compétents (Baker, 1986).

Les PGPR exerceraient leurs pouvoirs par la privation des pathogènes en fer (Kloepper et al., 1980a, Schroth et Hancock, 1982). C'est le cas de *P. putida* B10, à l'origine de la suppression du flétrissement fusarien et du piétin échaudage, cette suppression est perdue par ajout de fer qui réprime la synthèse de sidérophores par cette bactérie (Kloepper et al., 1980b). De même, que les *Pseudomonas* spp. fluorescents pyoverdine-négatives, qui protégeraient les plantes avec moins d'efficacité que les souches parentales (Keel et al., 1989 ; Loper et Buyer, 1991).

Toutefois, sous certaines conditions ces pyoverdines peuvent fonctionner comme des substances antibiotiques bactériostatiques ou fongistatiques diffusibles, alors que les ferri-pyoverdines en sont incapables (Kloepper *et al.*, 1980b; Scher et Baker, 1982). Et par conséquent, le producteur d'un aussi puissant sidérophore, en l'occurrence la pyoverdine, peut entrer en compétition à distance avec d'autres microorganismes qui possèdent des systèmes de capture de moindre affinité pour le fer (Haas et Défago, 2005).

Certaines souches de *Pseudomonas* sont capables d'utiliser des sidérophores hétérologues lorsqu'elles ont besoin de fer (Bakker *et al.*, 1988; Jurkevitch *et al.*, 1992; Mirleau *et al.*, 2000). La souche PGPR *P. putida* WCS358 (Geels et Schippers, 1983) est capable d'utiliser son propre sidérophore (la pseudobactine-358), par le biais d'un récepteur hautement spécifique (Bitter *et al.*, 1991); mais peut aussi utiliser une large gamme de sidérophores hétérologues (Koster *et al.*, 1993). Alors que la pseudobactine-358 ne peut être utilisée que par un petit nombre de *Pseudomonas* (Marugg *et al.*, 1989; Bakker *et al.*, 1990; Raaijmakers *et al.*, 1994).

Les isolats P₁₀ et P₁₂ identifiés comme phytopathogènes, sont capable d'utiliser des xéno-sidérophores. Comme facteur limitant la croissance pour la plupart des organismes, le fer joue un rôle critique dans cette compétition (Weinberg, 2008). Les bactéries et champignons pathogènes disposent de nombreux mécanismes pour l'acquisition de fer des cellules hôtes. Soit par la sécrétion de sidérophores qui sont capable de récupérer le fer de n'importe quelle matière organique ou minérale, l'expression de réductases membranaire ou encore de transporteurs membranaires spécifiques (utilisation de l'hème) chélatant le fer; et la synthèse de toxines ou d'enzymes hydrolytiques (Litwin et Calderwood, 1993). Jones *et al.* (2007) ont rapporté, le rôle des yersinia-bactines et pyoverdines de *P. syringae* pv. *tomato* comme facteur de virulence.

Weller et Cook (1983) avaient auparavant rapporté, que malgré l'importance de la production de sidérophores dans le biocontrôle, ce n'est probablement pas le seul mécanisme impliqué dans l'antagonisme.

L'origine rhizosphérique des isolats de *Pseudomonas* ne semble pas jouer un rôle dans leur pouvoir antagoniste *in vitro*. Ainsi, les isolats provenant de la rhizosphère de la pomme de terre ont présenté un antagonisme diversifié vis-à-vis de champignons affectant d'autres plantes et provenant d'autres biotopes exemple le Foa. Haas et Défago (2005), ont rapporté qu'à l'exception de la pyrrolnitrine, les antibiotiques produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents montrent une sélectivité réduite par rapport aux champignons.

Les essais d'antagonisme par enrobage des tubercules, ont mis en évidence le pouvoir protecteur des isolats P₂ et P₅ vis-à-vis du Fsc. Cette protection s'est traduite par la réduction du taux d'infection (nombre de tubercules ayant développé la maladie) et de la sévérité des symptômes. D'autre part, les essais d'antagonisme conduits *in situ* vis-à-vis des fusarioses (Fo), ont eux aussi mis en évidence une action similaire à celle de l'enrobage. Cette action s'est traduite par la réduction du taux d'infection (nombre de plants malades) et celle de la sévérité de la maladie. Les isolats considérés présentent un profil de synthèse de métabolites secondaires qui les prédisposent à un pouvoir de bio protection.

L'application de microorganismes bénéfiques aux graines de carottes peut contrôler les maladies telluriques dues à *Alternaria* spp. (Jensen *et al.*, 2001 et 2004). Bennett et Whipps (2008), ont rapporté l'efficacité de l'application par enrobage de microorganismes bénéfiques (tel *P. chlororaphis* MA342 ou *P. CHAO*) aux bulbes d'oignons et aux graines de carottes durant l'emmagasinerage précédant la plantation, qui protégeaient celles-ci des pathogènes telluriques. Ces microorganismes persistent plus de 8 semaines après la plantation, sont retrouvés au niveau des endroits cruciaux de stimulation de la croissance, et du développement de la maladie durant les premières étapes de l'émergence.

Aliye *et al.* (2008) ont rapporté, l'activité antagoniste de PF9 et de *P. fluorescens* PF20 *in vivo* (sous serre), dans un sol stérile. En effet, ces bactéries sont à l'origine de la réduction du flétrissement, de l'augmentation de la biomasse des plants de pomme de terre (hauteur et poids sec), et de la suppression significative de la croissance du pathogène et de ses perturbations. L'augmentation de la hauteur des plants ainsi que celle du poids sec survient aussi bien en présence qu'en absence du pathogène.

Rajkumar *et al.* (2008), ont démontré que les *Pseudomonas* fluorescents (SE21 et RD41) appliqués aux graines de poivron rouge, diminuaient considérablement l'incidence de la maladie due à *R. solani*, et stimulaient l'augmentation de la croissance des plantes par rapport à un témoin non traité. Sous serre et dans un sol naturellement infesté de *F. oxysporum* f.sp. *raphani*, Leeman *et al.* (1995) ont montré la capacité de suppression du flétrissement et l'augmentation du rendement de radis par *P. fluorescens* WCS374.

Auparavant Fridlender *et al.* (1993), ont observé qu'un isolat de *P. cepacia* diminuait l'incidence de trois maladies fongiques chez trois plantes différentes, dans un sol non stérile. Cattalan *et al.*, (1999), en prospectant les capacités de PGPR dans un sol non stérile, ont remarqué que quatre isolats augmentaient significativement la longueur et le poids sec des racines ainsi que celui des tiges.

5. CONCLUSION

Les isolats de *Pseudomonas* spp.fluorescents ont montré une activité antagoniste appréciable, *in vitro*, sur la croissance des formes spéciales de *Fusarium oxysporum*. Les meilleurs résultats d'antagonisme ont été obtenus dans un sol naturel par rapport à un sol stérilisé. Cet antagonisme a été moins spécifique pour l'isolat 2, dont l'activité s'est exprimée sur les trois milieux de culture utilisés, et avec tous les isolats fongiques testés. Toutefois *F. oxysporum* fsp. *albedinis* est le plus sensible aux actions de ces *Pseudomonas*.

Les essais d'enrobage des tubercules ont révélé une inhibition du principal agent phytopathogène de stockage, se traduisant par une réduction du taux d'infection ou absence de symptômes. Ce qui prédispose ces bactéries au rôle d'antagoniste.

Les essais d'antagonisme, *in situ*, par bactérisation des tubercules ont révélé :

- *D'une part, la capacité de stimulation de la croissance par rapport à un témoin non bactérisé.

- *D'autre part, une inhibition du flétrissement fusarien à des degrés variable.

- *Et la propriété des isolats 10 et 12 comme phytopathogènes.

Ces effets antagonistes sont retrouvés chez les isolats ayant synthétisé des métabolites secondaires tels que les : phénazines, sidérophores, HCN.....

Ces résultats montrent que les isolats de *Pseudomonas* spp.fluorescents, sélectionnés sur la base de leurs propriétés phénotypiques, métaboliques et écologiques reconnus dans l'antagonisme peuvent constituer un moyen de lutte biologique efficace dans un sol naturel, pour limiter l'utilisation d'intrants chimiques.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION GENERALE

Les espèces de *Pseudomonas* sont fréquemment isolées de différentes niches écologiques. Certaines peuvent agir comme des pathogènes des animaux des plantes ou des champignons, alors que d'autres sont des bactéries bénéfiques vivant librement dans le sol (Achouak *et al.*, 2000).

Le screening des prélèvements effectués à partir des deux biotopes étudiés ont permis de constater l'existence d'une diversité appréciable en populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents. L'adaptation de ces bactéries aux différents biotopes dont les caractéristiques pédoclimatiques sont très différentes. Toutefois, la colonisation des sols cultivés a été plus importante que celle des sols nus. Les fréquences de ces bactéries sont variables en fonction du biotope considéré.

Globalement, l'aptitude des *Pseudomonas* spp. fluorescents à tirer parti des milieux riches en composés organiques grâce à leur métabolisme leur confère un avantage compétitif dans ces environnements. Cet avantage se traduit en particulier par leur vitesse de division cellulaire. Ainsi, les cellules de *Pseudomonas* spp. se divisent en moyenne toutes les 5 h dans la rhizosphère de *Pinus radiata* et uniquement toutes les 77 h dans le sol non rhizosphérique (Bowen et Rovira, 1976). Cette différence conduit à un développement des *Pseudomonas* spp. fluorescents significativement plus élevé dans la rhizosphère que dans le sol nu. Ces microorganismes sont donc considérés comme des rhizobactéries (Schroth *et al.*, 1992).

La structure des communautés bactériennes de la rhizosphère est déterminée par les espèces de plantes (Lemanceau *et al.*, 1995 ; Marschner *et al.*, 2004). Les racines des plantes et leurs alentours sont extrêmement attractifs pour les bactéries bénéfiques et les bactéries délétères telluriques. En effet les racines et la rhizosphère offrent une niche écologique qui fournit une large gamme de nutriments. Les différences de composition ainsi que les taux des exsudats racinaires sont probablement responsables de cette diversité des populations microbiennes (Goddard *et al.*, 2001).

Les exsudats racinaires offrent aux microorganismes rhizosphériques un régime carboné riche : des acides organiques (citrate, malate, succinate, pyruvate, fumarate, oxalate et acetate), des sucres (glucose, xylose, fructose, maltose, sucrose, galactose et ribose) constituant le plat de résistance ; alors que des quantités variables d'acides α -aminés, de nucléobases et des vitamines (la thiamine et la biotine) constituent le dessert (Haas et Défago, 2005). Cette habilité des rhizobactéries à utiliser les acides organiques comme source de carbone est corrélée avec leur compétence rhizosphérique (Goddard *et al.*, 2001).

L'identification taxonomique a permis de retrouver les principales espèces du groupe avec une nette dominance de *P. fluorescens* dans la totalité des échantillons analysés. Même si les autres espèces sont moins présentes, ceci souligne encore une fois le caractère ubiquitaire de ces espèces ainsi que leurs capacités d'adaptation aux différents environnements.

De nombreuses études sont dédiées à l'écologie des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les bactéries appartenant à ces espèces présentent en effet un intérêt potentiel pour l'environnement. Certaines améliorent la croissance et la santé des plantes, et contribuent donc à réduire l'utilisation d'intrants de synthèse en agriculture. D'autres sont capables de réduire les oxydes d'azote et de dégrader les composés xénobiotiques (Bossis *et al.*, 2000).

L'identification précise des souches bactériennes utilisées lors de ces études d'écologie est nécessaire. Nous avons adopté les méthodes décrites par : Digat et Gardan (1987 ; inspirée de Stanier *et al.*, 1966), ainsi que les clés dichotomiques proposés par Jacques (1994) et Bossis (1995).

Dans les trois méthodes utilisées les espèces types retrouvées, sont souvent rapportées par les études relatives à la taxonomie des *Pseudomonas* spp. fluorescents. De plus la comparaison des résultats obtenus par ces méthodes fait ressortir les divergences entre elles. En se basant sur les caractères phénotypiques proposés, cette identification reste incomplète et imprécise.

Bossis *et al.*(2000), ont proposé une approche poly-phasique pour la clarification de cette situation taxonomique. Cette divergence pour la caractérisation taxonomique de ce groupe, a fait l'objet de nombreux travaux appliquant cette approche poly-phasique et proposant de nouvelles espèces. *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolées de la rhizosphère de l'herbe (Peix *et al.*, 2003, 2004 et 2005) .

La reclassification de certaines espèces comme *P. aurantiaca* et *P. aureofaciens* respectivement *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov. et *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov. (Peix *et al.*, 2007). Ou encore le regroupement en une nouvelle classe avec une nouvelle nomenclature, proposée pour les souches protégeant les plantes des phytopathogènes telluriques. Cette classe désormais appelée *P. protegens* sp. nov. a pour espèce type la souche 'CHAO' (Ramette *et al.*, 2011).

Les techniques d'identification des microorganismes telluriques ont évolué, c'est ainsi que l'analyse numérique des résultats des tests des profils trophiques des souches par rapport à l'assimilation des sources de carbone a mis en évidence une forte hétérogénéité des profils trophiques chez les 48 isolats de *Pseudomonas* issues des deux biotopes étudiés.

Il en est ressorti une absence de corrélation entre l'identification spécifique et infraspécifique des isolats et leur regroupement sur le dendrogramme construit à partir des profils obtenus. Des isolats appartenant à la même espèce sont retrouvées réparties dans différents groupes, du à la variabilité de leur profils trophiques et de leur éloignement. La compréhension des profils trophiques est donc nécessaire pour mieux comprendre le rôle de ces bactéries dans le sol et la rhizosphère.

Des travaux complémentaires ont donc pris en compte, en plus des caractères phénotypiques, certains caractères génotypiques tels que l'analyse phylogénétique des séquences 16S rRNA (Anzai *et al.*, 2000), à coté de certains caractères chémo-taxonomiques tels que le Sidérotypage (Delorme *et al.*, 2002), l'analyse phylogénétique des gènes de ménage *gyrB*, *rpoD* (Yamamoto *et al.*, 2000) et *rpoB* (Ait-tayeb *et al.*, 2005).

L'efficacité des isolats de *Pseudomonas* dans la lutte biologique repose sur la convergence d'une multitude de propriétés physiologiques, métaboliques et écologiques. De cette première partie du travail, il en est ressorti des isolats présentant des caractéristiques qui en font des candidats potentiels dans la lutte biologique. En effet, de nombreux isolats sont capables de synthétiser une multitude de métabolites secondaires reconnus comme importants dans le biocontrôle (Pyoverdines, Phénazines et HCN), l'induction de la résistance systémique (acide salicylique) ou encore de phytostimulation (AIA et Phosphatases). Ces isolats se caractérisent par leurs résistances aux antibiotiques (Annexe VI), et leur capacité protectrice en présence d'agents pathogènes telluriques. En effet les isolats P₂ et P₅ protègent les tubercules pendant 2 mois à 4°C, ou encore dans le sol ; et la synthèse de substances bactéricides traduit une compétitivité rhizosphérique.

Dès le début des années 1980, Kloepper (1983) proposa d'utiliser les capacités antagonistes de certaines bactéries vis-à-vis des *Pectobacteria* pour protéger les tubercules et les plants de pomme de terre. Les bactéries protectrices ciblées étaient qualifiées de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et appartenaient au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes ou PGPR, sont un groupe de microorganismes diversifié présentant deux caractéristiques principales: la capacité de coloniser la rhizosphère d'une part et une influence positive sur la croissance de la plante à laquelle elles sont associées d'autre part (Loper et Gross, 2007).

La compréhension des interactions de ces rhizobactéries avec les plantes et les autres communautés microbiennes présentes à beaucoup évoluée durant les deux dernières décennies, en partie grâce aux approches moléculaires (Loper et Gross, 2007).

Les espèces bactériennes de ce groupe se caractérisent par un métabolisme versatile et par une capacité élevée à extraire le fer du sol pour leurs besoins nutritionnels, grâce à des sidérophores particulièrement affines. Ces caractéristiques expliquent en grande partie leur aptitude à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines (Latour et Lemanceau, 1997).

Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des siderophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe^{3+} . En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Plusieurs isolats de notre collection produisent des sidérophores ; inhibent, *in vitro*, la croissance fongique des phytopathogènes telluriques sur un milieu pauvre en fer, et sont même capable d'utiliser des sidérophores hétérologues.

Près de 6% du génome de *P. fluorescens*-5 (*Pf*-5) sont responsable de la biosynthèse de métabolites secondaires, incluant les antibiotiques toxiques aux champignons telluriques et oomycètes infectant les racines des plantes, et deux sidérophores impliqués dans l'acquisition du fer (Loper et Gross, 2007).

Les isolats P_{10} et P_{12} identifiés comme pathogènes, ont produits des sidérophores. Ces isolats sont capables d'utiliser des sidérophores hétérologues, de plus l'isolat P_{10} a ralenti l'apparition de la maladie chez la plante contaminée par le champignon. Ce ralentissement pourrait être le résultat de l'utilisation par l'isolat des sidérophores fongiques.

Auparavant, Buyer et Leong (1986) avaient démontré que la résistance des bactéries délétères était due à leurs capacités d'utiliser les sidérophores hétérologues des bactéries bénéfiques. La pyoverdine et la pyochéline contribuent à la virulence du pathogène opportuniste humain *P. aeruginosa* (Cox, 1982; Meyer *et al.*, 1996); en particulier la pyochéline qui accroît la formation de radicaux hydroxyles à l'origine des dommages épithéliaux (Britigan *et al.*, 1997). Par ailleurs, ces bactéries peuvent acquérir le fer en utilisant des sidérophores hétérologues appartenant à d'autres bactéries et champignons (Poole et McKay, 2003).

Plusieurs de nos isolats ont produits de l'acide salicylique, en plus de la pyoverdine. La pyochéline est un sidérophore ayant pour précurseur l'acide salicylique (Serino *et al.*, 1995). Malgré son affinité plus faible pour le Fe^{3+} , la pyochéline est un bon chélateur des ions bivalents de cuivre et de Zinc (Cuppels *et al.*, 1987; Visca *et al.*, 1992); privant ainsi les champignons de ces éléments. Cet exemple montre que la distinction entre les sidérophores et les antibiotiques typiques n'est pas claire.

Les sidérophores font parti du métabolisme primaire car le fer est un élément essentiel. Par la même occasion ces métabolites jouent un rôle d'antibiotiques, ces derniers sont des métabolites secondaires (Haas et Défago, 2005).

La production d'acide salicylique est un caractère recherché dans les fonctions physiologiques de défense des plantes. Chez quelques plantes, comme le tabac et le concombre, l'apport de salicylate exogène induit la résistance systémique acquise (SAR). Cette dernière est un mécanisme par lequel la plante entière développe une amplification de sa résistance aux virus bactéries et champignons pathogènes. En outre, ces plantes répondent au pathogène par l'augmentation du niveau de salicylate endogène, localement (au niveau du site d'infection) et de manière systémique (Malamy *et al.*, 1990 ; Métraux *et al.* 1990 ; Yalpani et Raskin, 1993; Loper et Lindow, 2001), par bactérisation des racines ou du sol (Maurhofer *et al.*, 1992 ; Leeman *et al.*, 1996 ; Van loon *et al.*, 1998 ; Mercado-Blanco *et al.*, 2001).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont aussi fréquemment isolés des sites pollués contenant de hauts niveaux de polluants tels que : les métaux lourds, les composés poly-chlorés ou encore les hydrocarbures poly-aromatiques (Achouak *et al.*, 2000). Les sidérophores seraient aussi induits par les métaux toxiques, ceci suggère que ces chélateurs pourraient jouer un rôle dans la tolérance des bactéries aux métaux lourds. La liaison de ces métaux aux sidérophores diminueraient leurs concentrations extracellulaires, probablement en diminuant leur diffusion et donc leur toxicité (Schalk *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyochéline est plus résistante à la toxicité par les métaux que son mutant défectueux (Braud *et al.*, 2010).

L'excès de fer réprime aussi bien la production de pyoverdines, pyochélines, et de l'acide salicylique (Visca *et al.*, 1993). Et pourtant, il a déjà été démontré que l'antagonisme persistait en présence de fer. Impliquant ainsi l'existence d'antibiotiques ou de bactériocines comme second mode d'action (Buyer et leong 1986).

La biosynthèse de métabolites secondaires tel que l'HCN a été démontré chez un petit nombre d'espèces bactériennes, comme *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Chrobacterium violaceum* (Askeland et Morrison, 1983; Knowles et Bunch, 1986). La cyanogénèse est maximale durant la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Castric *et al.*, 1979; Askeland et Morrison, 1983); et est influencée par plusieurs facteurs environnementaux incluant le fer, le phosphate et les concentrations en oxygène (Knowles et Bunch, 1986). Le fer est un stimulateur de la cyanogénèse chez les trois bactéries citées (Askeland et Morrison, 1983; Voisard *et al.*, 1989). Askeland et Morrison (1983), ont démontré une relation linéaire entre la production d'HCN et la concentration en fer (3 à 300 μ M) chez *P. fluorescens*. Cette production est induite en conditions limitantes en oxygène chez *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (Laville *et al.*, 1998).

L'HCN synthase, enzyme responsable de la production d'HCN et de CO₂ à partir de la glycine (Castric, 1977), transfère quatre électrons à la chaîne respiratoire, avec pour accepteur final l'oxygène moléculaire. D'autre part l'enzyme est très sensible à l'oxygène moléculaire, et est rapidement inactivée en sa présence même moment (Castric, 1994). Alors que son rôle dans la physiologie bactérienne reste obscur, la cyanogénèse possède un rôle écologique. C'est le cas de la bactérie bénéfique colonisant les racines *P. fluorescens* CHA0 (Voisard *et al.*, 1989), qui protège de nombreuses plantes des maladies racinaires fongiques (Voisard *et al.*, 1994; Schnider *et al.*, 1995). La production d'HCN par la souche CHA0 est en partie responsable de ses capacités de biocontrôle, comme la suppression de la pourriture noire du tabac causée par *Thielaviopsis basicola* (Voisard *et al.*, 1989; Laville *et al.*, 1998). Et le fer est à la fois indispensable pour la production d'HCN et la suppression de la maladie (Keel *et al.*, 1989 ; Voisard *et al.*, 1989).

L'HCN étant volatile, d'autres substances volatiles pourraient être produites par nos isolats, mais n'ont pas été identifiées. La production de substances volatiles inhibitrices pourrait augmenter le taux de survie des bactéries dans le sol, par l'élimination de compétiteurs potentiels pour les nutriments (Mackie et Wheatley, 1999). Ces substances volatiles bactériennes ont pour rôle de promouvoir la croissance des plantes, exemple le 2,3-Butadienol inhibe la croissance d'*Erwinia carotovora* (Ryu *et al.*, 2003a), et stimule *Arabidopsis thaliana* (Ryu *et al.*, 2003b).

En plus de la production de sidérophores et d'HCN, quelques uns de nos isolats produisent de l'AIA, des phosphatases et autres enzymes hydrolytiques; augmentant ainsi leurs capacités d'antagonistes.

La production par les microorganismes de régulateurs des plantes est un mécanisme important souvent associé à la stimulation de la croissance (Vessey, 2003). La balance entre la croissance végétative et reproductrice est contrôlée par un signal hormonal à l'intérieur de la plante et pourrait être hautement influencé par celle-ci (Taiz et Zeiger, 1991). Lorsque les concentrations d'auxines naturelles comme l'AIA sont très faibles, elles stimuleraient la germination et l'induction des racines (production de poils racinaires et des racines latérales) (Arshad et Frankberg, 1991), mais lorsque celles-ci sont élevées par contre réduiraient l'élongation de ces dernières (Tanimoto, 2005). Pour la plante ceci résulterait en une augmentation d'assimilation ionique (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Abbass et Okon (1993), ont constaté que l'AIA ainsi que d'autres phytohormones seraient responsables de l'augmentation de la croissance de canola du blé et de la tomate.

L'AIA est impliqué dans le développement de la tomate, spécialement durant la phase finale du développement du fruit (Srivastava et Handa, 2005). Des études préalables, ont démontré que la production d'auxines est souvent associée avec la stimulation de croissance par les microorganismes, incluant des souches tel que *P. putida* (Xie *et al.*, 1996; Patten et Glick, 2002). Gravel *et al.* (2007), ont montré que la croissance des semis augmentait avec l'augmentation de la concentration de L-tryptophane. Ceci suggère que la synthèse d'AIA dépendante du tryptophane par *P. putida* sous groupe B affecterait la croissance des semis de tomate.

Dans la rhizosphère, la synthèse de phosphatases mène à une augmentation de la disponibilité du phosphore, et en contrepartie son assimilation par les plantes (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Donc, les activités enzymatiques des *Pseudomonas* rhizosphériques peuvent contribuer, particulièrement en l'absence de formes assimilables de phosphore dans le sol, à la supplémentation de la plante en cet élément. Bon nombre de souches de *Pseudomonas* solubilisent modérément les phosphates organiques et inorganiques (Chabot *et al.*, 1993 ; Rodriguez et Fraga, 1999), et sont à l'origine de l'augmentation de la croissance et des rendements de canola (De Freitas *et al.*, 1997), et du soja (Cattelan *et al.*, 1999).

La production d'enzymes hydrolytiques a été décrite chez de nombreuses bactéries impliquées dans le biocontrôle (Friedlender *et al.*, 1993 ; Viswanathan et Samiyappan, 2001). Toutefois chez les *Pseudomonas*, elles n'ont pas été décrites comme étant des traits importants du biocontrôle (Bagnasco *et al.*, 1998), et de telles activités ne sont toujours pas en corrélation avec l'inhibition fongique (Sindhu et Dadarwal, 2001).

Certains de nos isolats ont produits des bactériocines thermolabiles, résistantes à l'hydrolyse trypsique, et retenues par les filtres. Ce qui suppose qu'elles pourraient appartenir aux bactériocines de haut poids moléculaire (HMW). Ces bactériocines sont actives vis à vis de nombreuses bactéries appartenant à la même espèce ou non. Les HMW sont des bactériocines thermolabile, résistent à l'hydrolyse trypsique, sédimentent par ultracentrifugation et peuvent être induites par des agents chimiques activant le système SOS (Fredericq, 1963). Ces HMW ont été identifiées chez les entérobactéries (Hamon et Peyron, 1961 ; Coetzee *et al.*, 1968 ; Strauch *et al.*, 2001), les *Pseudomonas* spp. (Nakayama *et al.*, 2000), *Rhizobium lupini* (Lotz et Mayer, 1972), *Bacillus* spp. (Brenner et Horne, 1959, Ito *et al.*, 1986), et *Flavobacterium* spp. (Jabrane *et al.*, 1994). Des similarités entre ces bactériocines et les bactériophages ont été établie sur la base de leur morphologie par microscopie électronique, complémentation, leurs caractères antigéniques (antigenic cross-reactivity), et l'hybridation de leurs ADN.

La pyocine R possède d'ailleurs une queue contractile ressemblant à celle des coliphages de la série T. Alors que la pyocine F possède une courte queue flexible ressemblant au phage lambda (Nakayama *et al.*, 2000).

Les bactériocines des bactéries lactiques ont reçu une attention considérable, par leur rôle potentiel de conservateurs dans l'industrie alimentaire (O'sullivan *et al.*, 2002 ; Papagiani, 2004). Alors que celles produites par les bactéries telluriques ont reçu une moindre considération. Validov *et al.* (2005), ont suggéré la contribution des bactériocines, produites par les *Pseudomonas* spp. producteurs de DAPG, à la compétition rhizosphérique avec d'autres microorganismes ; et qui pourraient permettre leur stabilité lorsqu'elles sont introduites dans le sol.

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques.

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 isolats P₂ et P 30-84, mais variable pour les autres isolats. Il s'agit d'un large spectre 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. Et c'est ce qu'on a pu démontrer pour la plupart des isolats.

La production de métabolites secondaires, impliqués dans l'antagonisme microbien et sous l'effet du milieu de culture (Loper et Schroth 1981 ; Buyer et Leong, 1986). L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces des isolats testés, mais aussi de la composition du milieu de culture. En effet Haas et Keel (2003), avaient rapporté que la production de ces composés était hautement influencée par la disponibilité qualitative et quantitative des nutriments.

En plus des métabolites déjà cités, l'isolat P₂ synthétise une substance hautement active, *in vitro*, sur la plupart des champignons testés. Cette substance n'est autre que la PCA, dont l'activité a déjà été prouvée chez d'autres bactéries et sur un autre continent.

Effectivement, la production de PCA est plus importante sur NBY (2% glucose) sur LB (1,5% glucose), que sur PDA ou KB ; et cela se traduit par une inhibition par confrontation plus importante sur les deux premiers milieux.

Il est admis que les bactéries excrètent dans les milieux des pigments doués d'activités oxydo-réductrices comme antibiotiques pour être compétitives dans leur habitats, ces substances ne sont pas celles utilisés dans le stress oxydatif (Dietrich *et al.*, 2008).

Les phénazines sont des pigments hétérocycliques contenant de l'azote (Laursen et Nielsen, 2004), inhibant la croissance des bactéries et des champignons par leur capacité oxydo-réductrices cellulaires ; en présence d'oxygène et d'agents réducteurs (incluant le NADH et le NADPH), causant ainsi l'accumulation de superoxydes et de peroxyde d'hydrogène toxiques (Mavrodi *et al.*, 2006).

L'isolat P₂ a protégé les tubercules emmagasinés enrobés de Fsc pendant deux mois, a aussi prévenu l'apparition de symptômes de la fusariose chez les plants co-inoculés, et a stimulé la croissance de plants de pomme de terre. En plus de la PCA, cet isolat produit aussi le 2 OH-PCA (2 hydroxy phénazine carboxylate).

Dans les sols naturels, les *Pseudomonas* fluorescents producteurs de phénazines sont doués d'une compétitivité pour la survie, supérieure aux mutants non-producteurs (Mazzola *et al.*, 1992). Madulla *et al.* (2008) ont démontré que des concentrations élevées de 2-OH-PCA permettrait un attachement irréversible des bactéries par la production de biofilms. Et donc une meilleure adhésion aux racines ou aux graines. Si en plus les phénazines permettent la mobilisation du fer dans le sol (Hernandez *et al.*, 2004), elles pourraient être considérés comme des auxiliaires des sidérophores et ceci pourrait expliquer l'importance écologique des producteurs de phénazines (Haas et Défago, 2005).

Les phénazines jouent le rôle de transporteur d'électrons aux minéraux et peuvent donc être utilisés par les espèces non-productrices. Ceci suggère que les antibiotiques cyclique doués d'activité oxydo-réductrice pourraient compléter les bactéries et les plantes en fer et une multitude d'autres nutriments comme le phosphate, les oligo éléments et certaines substances organiques associés aux phases minérales. La mobilisation de tels nutriments pourrait fournir aux souches productrices un avantage écologique (Hernandez *et al.*, 2004).

Mazurier *et al.* (2009), ont démontré pour la première fois, l'évidence que les *Pseudomonas* producteurs de phénazines sont nombreux dans le sol de Château-renard suppressif aux fusaria.

Lorsqu'ils sont combinés avec la souche de *F. oxysporum* non-pathogène, augmentent significativement la suppression de la maladie soit directement par antibiose ou indirectement par la compétition pour le fer.

Alors que les producteurs de DAPG ne semblent pas augmenter la suppression de la maladie. D'autres part, ces auteurs ont postulé que les antibiotiques phénaziniques oxydo-réducteurs joueraient un rôle dans le contrôle du pathogène *F. oxysporum* par les *Pseudomonas* fluorescents indigènes. Et quand par une synergie, sont couplés à la compétition pour le carbone et le fer, ceci contribuerait à l'établissement d'une suppression durable au flétrissement fusarien.

Chez les plantes, les phénazines activent l'ISR (induction de la résistance systémique). En effet, l'ISR est répandue et peut être induite par de nombreux composés bactériens, incluant les composés membranaires externes, les lipopolysaccharides, les flagelles, les sidérophores et les composés volatiles (Van Wees *et al.*, 2008). L'ISR dépend de l'expression chez la plante des voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique, conduisant à une expression systémique rapide d'une résistance aux pathogènes à large spectre (Verhagen *et al.*, 2004).

En plus de toutes les caractéristiques exogènes citées, les phénazines régulées par les signaux QS, œuvrent à l'intérieur des cellules productrices comme signaux régulateurs et modulant l'expression des gènes. En effet, la régulation des gènes de *P. chlororaphis*, est soit augmentée soit réprimée par production de phénazines (Pierson et Pierson, 2010).

Et enfin, concernant l'antagonisme *in situ*, la bactérisation des tubercules après infestation par le pathogène a été assez significative, puisqu'elle a permis la protection des tubercules pendant huit semaines dans un sol naturel, alors que le témoin positif a présenté un niveau de maladie d'ordre 4 depuis près de trois semaines.

Expert et Digat (1995), ont montré que l'on obtient une protection significative du tournesol vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum* par une bactérisation des semences avec des *P. fluorescens* ou avec des *P. putida*. Dans les tests *in situ* une protection satisfaisante est acquise en utilisant au moins 1×10^6 bactéries par semence dans des essais au champ. Même si aucune corrélation entre les tests *in vitro* et *in situ* n'a été établie, une bonne corrélation existe entre les tests *in situ* et les essais au champ.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GENERALE

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. Certaines bactéries associées aux plantes particulièrement les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont fait l'objet d'explorations suppressives des maladies des cultures par antagonisme direct entre la bactérie et les phytopathogènes du sol.

Nous avons pu isoler de biotopes différents 65 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent. Ce résultat montre l'ubiquité et l'adaptation de ce groupe bactérien, en particulier dans les sols cultivés (effet rhizosphère). Les espèces retrouvées sont : l'espèce type du genre *Pseudomonas aeruginosa* en plus de *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. chlororaphis* ; avec une prédominance de l'espèce *P. fluorescens* avec la présence de quelques souches LOPAT+. La détermination des profils trophiques des isolats a mis en évidence une grande diversité dans leur métabolisme carboné, et qui n'était pas corrélé avec les résultats de l'identification. Ce qui confirme une fois de plus les limites de l'identification phénotypiques des *Pseudomonas*. Les espèces de *Pseudomonas* se répartissent de manière aléatoire par rapport aux biotopes, mais par contre il semblerait que la plante influe sur les souches en les sélectionnant.

Parmi ces isolats, certains ont montré un pouvoir antagoniste, *in vitro*, vis-à-vis de bactéries et de phytopathogènes fongiques. Ces isolats, se sont en effet révélés producteurs de métabolites secondaires (sidérophores, HCN, phosphatases, acide salicylique, AIA, bactériocines et d'autres composés antimicrobiens). Un seul isolat a produits des substances de nature phénazinique. Ces composés jouent un rôle dans l'antagonisme et la biostimulation végétale par l'induction de l'ISR ou la SAR, la capacité de colonisation racinaire indiquant une compétence rhizosphérique. Ces caractères ont été retrouvés dans les sols cultivés. Et la compétence rhizosphérique s'exprime mieux dans un sol naturel. Toutes ces caractéristiques retrouvées dans des combinaisons variables selon les isolats.

Etant donné que la sélection, *in vitro*, des souches bénéfiques œuvre 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 essais *in situ* conduits dans un sol naturel, ont montré que les isolats sélectionnés protégeaient, de manière évidente et à des degrés variables, la plante bactérisée contre le flétrissement fusarien. Cette protection se traduit par la capacité de promouvoir la croissance végétale, la réduction du taux et les symptômes de la maladie et en stimulant la levée. Cette performance de protection est corrélée avec les performances métaboliques.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents possèdent un énorme potentiel d'amélioration des rendement des cultures, mais le succès de leur exploration reste limité au niveau des champs. Ceci est en partie dû à l'incompréhension de la dynamique des populations au niveau de leur environnement. Si ces *Pseudomonas* sont des PGPR, il est crucial de comprendre comment ces inoculas compétent avec les populations indigènes rhizosphérique. L'introduction de ces bactéries échoue le plus souvent, car ces organismes ne peuvent pas recoloniser les racines, ou encore colonisent les racines, mais sont incapable de produire les métabolites impliqués dans le biocontrôle dans la nouvelle niche. Cette impossibilité de l'activité de biocontrôle, peut être en partie dû, à la production de bactériocines par les *Pseudomonas* endogènes actives à l'encontre des souches introduites. Quelques uns de nos isolats sont capables de produire des bactériocines contre des bactéries du même genre ou de genre différents, ces composés joueraient un rôle significatif dans la dynamique des populations rhizosphérique et peut contribuer à leur compétence rhizosphérique.

Globalement les principaux déterminants identifiés sont :

- *Les sidérophores facteurs impliqués dans la pathogénèse et la suppression.
- *L'acide salicylique impliqué dans la SAR.
- *L'AIA comme stimulateur de croissance.
- *Phosphatases comme stimulateur de croissance.
- *Les enzymes hydrolytiques impliquées dans le parasitisme
- *Les bactériocines comme facteurs de compétence écologique
- *Et enfin les phénazines qui englobent l'activité de plusieurs facteurs.

Ces isolats pourraient trouver leurs places dans les applications biotechnologiques visant une amélioration des rendements et la préservation de l'environnement pour un développement durable. De nombreux travaux ont pu mettre en évidence des souches modèles, toutefois il faut garantir la stabilité et la reproductibilité des effets bénéfiques de ces rhizobactéries à l'échelle de pratiques agronomiques. Et bien que des biopesticides à base de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont déjà commercialisés en Europe et en Amérique, leurs application à grande échelle n'est pas encore concrétisée. Les difficultés de formulation et d'utilisation, ainsi que des problèmes relatifs à la manutention et principalement le cout de ces microorganismes sont parmi les obstacles ayant retardé leur vulgarisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarons, S., Abbas, A., Adams, C., Fenton, A., and O’Gara, F., 2000. A regulatory RNA (*PrrB* RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **182**: 3913-3919.
- Abbass, Z. and Okon, Y., 1993. Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **25**:1075–1083.
- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R. and Gardan, L., 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* **50** : 9–18.
- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* **163**: 173-181.
- Ait-Tayeb, L.A., Ageron, E., Grimont, F. and Grimont, P.A.D., 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res. Microbiol.* **156**: 763–773.
- Alexander, M., 1977. Ecological interrelationships: Microbiology of rhizosphere. In: (eds). *Soil microbiology*. Wiley Eastern Limited, New York, pp.423-437.
- Alfano, J.R. and Collmer, A., 1997. Type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **179**: 5655-5662.
- Aliye N., Fininsa C. and Hiskias Y., 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioproject potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Bio. Contr.* **47**: 282-288.
- Althaus, E.W., Outten, C.E., Olson, K.E., Cao, H. and O’Halloran, T.V., 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metallo protein. *Biochem.* **38**:6559-6569.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J., 1997. Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Ameziane, N., Bogard, M. and Lamoril. J., 2005. Extraction et purification de L’ADN et de l’ARN. In : *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Dragos Bobu (ed), Elsevier Masson, Trento Italie, pp. 215-226.
- Anderson, A.J., Tari, P. H. and Tepper, C. S., 1988. Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:375-380.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodriguez-Quinones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 215–237.
- Anjaiah, V., Koedam, N., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., Hofte, M., Tambong, J. T. and Cornelis, P., 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5

derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**:847–854.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.-Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H., 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1563–1589

Arnow, L.E., 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**: 531.

Arshad, M. and Frankenberger, W.T., 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant Soil.* **133**:1–8.

Askeland, R. A. and Morrison, S. M., 1983. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1802-1807.

Atkinson, N., 1973. Colicin-like antibiotics of 100 strains of *Salmonella*. *Ajebak* **51**: 435-444.

Auling, G., Busse, H.J., Pilz, F., Webb, L., Kneifel, H. and Claus, D., 1991. Rapid differentiation, by polyamine analysis, of *Xanthomonas* strains from phytopathogenic pseudomonads and other members of the class Proteobacteria interacting with plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 223–228.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmen, Z.G. and Smith, 1991. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, NY. [Links]. Mak, Y.M., Sornarajah, R. and Ho, K.K, p.1.6.1 and 1.6.4.

Baakza, A., Vala, A.K., Dave, B.P. and Dube, H.C., 2004. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **311**: 1–9.

Bagg, A. and Neilands, J.B., 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.* **51**: 509–518.

Bagnasco, P., De La Fuente, L., Gualtieri, G., Noya, F. and Arias, A., 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1317–1322

Bahme, J. B. and Schroth, M. N., 1987. Spatial- temporal colonization pattern of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathol.* **77**: 1093-1100.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233-66.

Baker, R., 1986. Biological control: an overview. *Can. J. Plant pathol.* **8**: 218-221.

Bakker, P. A. H. M., Schippers, B. and Weisbeek, P. J., 1988. Siderophore production by plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *J. Plant Nutr.* **11**: 925–933

Bakker, P. A. H. M., van Peer, R. and Schippers, B., 1990. Specificity of siderophore receptors and biocontrol by *Pseudomonas* spp. In: *Biological*

control of soil-borne plant pathogens. Hornby, D. (ed). CAB International, Wallingford, pp. 131–479.

Bangera, M. G. and Thomashow, L. S., 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:83–90.

Bano N. and Musarrat J., 2003. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Cur. Microbiol.* **46**: 324–328.

Barazani, O. and Friedman, J., 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J. Chem. Ecol.* **25**:2397-2406.

Barrett, E.J., Solanes, R.E., Tang, J.S. and Palleroni, N.J., 1986. *Pseudomonas fluorescens* biovar V: its resolution into distinct groups and relationships of these groups to other *P. fluorescens* biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic pseudomonads associated with food spoilage. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2709–2721.

Barry, A.L. and Thornsberry, C., 1985. Susceptibility tests: Diffusin tests procedures. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Lennette E.H., Ballows, A. W., Shadomy J.R.H. (ed). Washington, pp. 1000-1008.

Bassler, B.L., 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 582–587.

Battle, S.E., Rello, J. and Hauser, A.R., 2009. Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**: 70–78.

Bazhanov, D. P. and Yatsevich, K. K., 2011. Taxonomic Heterogeneity of the Collection Strains of Fluorescent Pseudomonads. *Microbiol.* **80** (1): 89–95.

Becker, J.O. and Cook, R.J., 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* **78**:778–782.

Beddar N., 1990. Analyse de l'effet de l'inoculation par différentes souches de *Rhizobium* sur l'élaboration du rendement du pois chiche (*Cicer arietinum* L. variété ILC3279), Sétif, Algeria. Engineer thesis. University of Sétif, ALGERIA, 81 p.

Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M and Spröer, C., 2007. *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57** (5): 979-985.

Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva, V.A., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz, K. J. and Stepanok, V.V., 2001. Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can. J. Microbiol.* **47**: 642–652.

Benizri, E., Courtade, A. , Picard, C. and Guckert, A., 1998. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biol. Biochem.* **30**(10):1481-1484.

Bennett, A.J. and Whipps, J.M., 2008. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during durum priming. *Biolog.Control*, **44**: 349-361.

Bérdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* **58**(1): 1–26.

Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. and Hallmann, J., 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**: 215-229.

Birnboim, H. C., 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* **100** : 243-255.

Birnboim, H. C. and Doly, J., 1979. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** : 1513-1522.

Bitter, W., Marugg, J.D., de Weger, L.A., Tommassen, J. and Weisbeek, M. P. J., 1991. The ferric-pseudobactin receptor PUPA of *Pseudomonas putida* WCS358 : homology to TonB-dependent *Escherchia coli* receptors and specificity of the protein. *Mol. Microbiol.* **5**: 647-655.

Bloemberg, G. and Lugtenberg, B. 2001. molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.

Blum, U., Weed, S.B. and Dalton B.R., 1987. Influence of various soil factors on the effects of ferulic acid on leaf expansion of cucumber seedlings. *Plant Soil.* **98**:111-130.

Blumer, C. and Haas, D., 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **173**: 170-177.

Boemare, N.E., Boyer-Giglio, M.H., Thaler, J.O., Akhurst, R.J. and Brehelin, M. 1992. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3032-3037.

Bonsall, R. F., Weller, D. M. and Thomashow, L. S., 1997. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 951-955.

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 de doctorat, Université de Nantes, France, 143p.

Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .**20**: 51-63.

Botelho, G. R., Cardoso Fonseca, M. C., Prata Neves, M. C., Xavier, G. R. and Rumjanek, N. G., 2011. Profile of fluorescent *Pseudomonads* for biocontrol use isolated from a brazilian agroecological Production system. *UNICiências.* **15**(1): 333-354.

Botelho, G. R. and Mendonça-Hagler, L. C., 2006. Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops - an overview. *Braz. J. Microbiol.* **37**: (4):401- 416.

Bourgault, A.M. and Lamothe, F., 1988. Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2144-2146.

Bowen, G.D. and Rovira, A.D., (1976). Microbial colonization of plant roots. *Annu. Rev. Phytopathol* **14**: 121-144.

Bozal, N., Montes, M.J. and Mercade, E., 2007. *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2609–2612.

Bradley, D. E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**: 230-314.

Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G.L.A. and Schalk, I.J., 2010. Thesiderophores pyoverdine and pyochelin are involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance against metals: Another biological function of these two siderophores. *Environ. Microbiol. Report*, **2**: 419–425.

Braun, V., 1997. Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biol. Chem.* **378**: 779–786.

Braun, V., Mahren, S. and Sauter, A., 2006. Gene regulation by transmembrane signaling. *Biometals* **19**:103-113.

Brenner, S. and Horne, R.W., 1959. A negative staining method for the high resolution electron microscopy of viruses. *Bioch. Biophys. Acta* **34**: 103-110.

Bric, J. M., Bostock, R. M. and Silverstone, S. E., 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 535–538.

Brisbane, P.G., Janik, L.J., Tate, M.E. and Warren, R.F.O., 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 1967-1971.

Britigan, B. E., Rasmussen, G. T. and Cox, C. D., 1997. Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect. Immun.* **65**: 1071-1076.

Budzikiewicz, H., 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 209–228.

Budzikiewicz, H., 1997. Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z. Naturforsch* **52** (C): 713–720.

Buffenmyer, C., Rycheck, R. and Yee, R. 1976. Bacteriocin (klebicin) sensitivity typing of *Klebsiella*. *J. Clin. Microbiol.* **4**: 239-244.

Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R., 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3663-3668.

Buyer, J. S. and Leong, J., 1986. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. *J. Biol. Chem.* **261**:791-794.

Byng, G. S. and Turner, J. M., 1977. Incorporation of [14C] shikimate into phenazines and their further metabolism by *Pseudomonas phenazinum*. *Biochem. J.* **164**:139-145.

Camara, B., Strompl, C., Verbarg, S., Sproer, C., Pieper, D.H. and Tindall, B.J., 2007. *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 923–931.

Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S. and Sorensen, J., 1995. Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **18**: 51-62.

Carcanague, D.R., 1997. Novel derivatives of pseudomonic acid. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* **7**(21): 2805-2808.

Castric, P.A., 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **130**: 826-831.

Castric, P.A., 1994. Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase. *Curr. Microbiol.* **29**: 19-21.

Castric, P.A., Ebert, R.F. and Castric, K.F., 1979. The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* **2**: 287-292.

Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J., 1999. Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**:1670–1680.

Chabot, R., Antun, H. and Cescas, M., 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* **39**: 941-947.

Chakraborty, D. and Nag, N.C., 1998. Colicinogenicity and enteropathogenicity of *Escherichia coli* associated with gastro-enteritis in man. *J. Communic. Dis.* **30**: 263-265.

Chao, L. and Levin, B.R., 1981.structured habitats and evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 6324-6328.

Chao, W.L., Nelson, E.B., Harman, E.G, and Hoch, H.C., 1986. Colonisation of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathol.* **76**: 60-65.

Chet, I., 1987. Trichoderma - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, I. Chet (ed.), John Wiley & Sons: New York. pp. 137-160.

Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. and Oppenheim, A., 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant and Soil*, **129**: 85-92.

Chhibber, S. and Vadehra, D.V. 1989. Effect of medium on the bacteriocin production by *Klebsiella pneumoniae*. *Folia. Microbiol.* **34**: 1989.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J., 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*. **157**:503–523.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Van der Bij, A., Van der Drift, K., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R., Keel, C., Bakker, P., Tichy, H., De Bruijn, F., Thomas-Oates, J. and Lugtenberg, B.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.

Chin-A-Woeng, T. F.C., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J.J. and Bloemberg, G. V., 2001. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1006-1015.

Chipperfield, J.R. and Ratledge, C., 2000. Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* **13**: 165–168.

Clays-Josserand, A., Lemanceau, P., Philippot, L. and Lensi, R., 1995. Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1745-1749.

Coetzee, H. L., Deklerk, H. C., Coetzee, J. M. and Smit, J. A. 1968. Bacteriophage-tail-like particles associated with intraspecies killing of *Proteus vulgaris*. *J. General Virol.* **2**: 29-36.

Colwell, R.R., Citarella, R.V. and Ryman, I., 1965. Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads. *J. Bacteriol.* **90**: 1148–1149.

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

Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D.K., Mazzola, M., Banger, G. and Kim, D.S., 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**: 4197–4201.

Cooksey, D.A., H.R., Azad, Cha, J.S. and C.K. Lim. 1990. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 431-435.

Cottyn, B., Heylen, K., Heyrman, J., Vanhouteghem, K., Pauwelyn, E., Bleyaert, P., Van Vaerenbergha, J., Hofte, M., De Vos, P. and Maes, M., 2009. *Pseudomonas cichorii* as the causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butterhead lettuce in Flanders. *Sys Appl Microbiol.* **32** : 211–225.

Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J. and Moenne-Lochoz, Y., 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **48** 505–512.

Cox, C.D., 1982. Effect of pyochelin on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **36**: 17-23.

Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L. and Cook, J.C., 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **78**: 302-308.

Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. and Stalon, V., 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352.

Cuppels, D.A., Stipanovic, R.D., Stoessl, A. and Stothers, J.B., 1987. The constitution and properties of a pyochelin–zinc complex. *Can. J. Chem.* **65**: 2126–2130.

Curtis, T.P., Sloan, W.T. and Scannell, J.W., 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 10494-10499.

Daw, M.A. and Falkiner, F.R. 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, **27**: 469-479.

Daw, M., Corcoran, G., Falkiner, F. and Keane, C. 1992. Application and assessment of cloacin typing of *Enterobacter cloacae*. *J. Hospital Infec.* **20**: 141-151.

De Freitas, J.R., Banerjee, M.R. and Germida, J. J. 1997. Phosphate-solubilising rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertiliz. Soils*, **24** : 358-364.

de Groot, A., Filloux, A. and Tommassen, J., 1991. Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 278-284.

de Salamone, G.I.E., Hynes, R.K. and Nelson, L.N., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.*, **47**: 103-113.

de Souza, J.T., Weller, D.M. and Raaijmakers, J.M., 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathol.* **93**: 966–975.

de Weger, L.A., Dekkers, L.C., van der Bij, A.J. and Lugtenberg, B.L.L., 1994. Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 32-38.

de Weger, L.A. and Lugtenberg, J.J., 1990. Plant growth stimulating rhizobacteria. In : Proceedings of the 6 th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Heslot, H., Bobichon, L., Durand, G., and Penasse, L.,(ed.). Vol.2. société Française de Microbiologie, Paris, pp. 827-837.

Défago, G., Berling, C.H. and Burger, U., 1990. Suppression of Black Root Rot of Tobacco and Other Root Diseases by Strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential Applications and Mechanisms. In: *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. Hornby D, (ed). Oxon, UK: CAB International, Wellingford, pp. 93–108.

Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X. and Ferroni, A., 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3361–3367.

Delaney, S.M., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F. and Thomashow, L.S., 2001. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *J. Bacteriol.* **183**:318-327.

Delany, I., Sheehan, M. M., Fenton, A., Bardin, S., Aarons, S. and O'Gara, F., 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. *Microbiol.* **146** (2): 537-543.

Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, J.M. and Gardan, L., 2002. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 513–523.

Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Bateman, A., Macleod J., Dell, A., Albrecht, A.M. and Abdallah, M.A., 1989. Pseudomonas siderophores: structure and physicochemical properties of pyoverdins and related peptides. In: *Second Forum on Peptides*, Colloque INSERM. A. Aubry, M. Marraud and B. Vitoux (ed). Montrouge, France: *J. Libbey Eurotext.* **174** : 96-98.

Descamp P. and Véron M., 1981. Une méthode de choix des caractères d'identification basée sur le théorème de Bayes et la mesure de l'information. *Ann. Microb.* **132** (B):157–170.

Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U. and von Dohren, H., 2005. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 539–548.

Dietrich, L.E.P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M. and Newman, D.K., 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **61**: 1308–1321.

Dietrich, L.E.P., Teal, T.K., Price-Whelan, A. and Newman, D.K., 2008. Redox-Active Antibiotics Control Gene Expression and Community Behavior in Divergent Bacteria. *Sci.* **321**: 1203-1206.

Digat, B. and Gardan, L., 1987. Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP.* **17**: 559-568.

Doudoroff, M. and Palleroni, N.J., 1974. Genus I: *Pseudomonas* Migula 1894, 237Nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 121. In: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.(Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp. 217–243.

Dowling, D.N. and O'Gara, F., 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**: 133-140.

Drechsel, H., Tschierske, M., Thieken, A., Jung, G., Zahner, H. and Winkelmann, G., 1995. The carboxylate type siderophore rhizoferrin and its analogs produced by direct fermentation. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 105–112.

Drechsel, H. and Winkelmann, G., 1997. Iron chelation and siderophores. In: *Transition Metals in Microbial Metabolism*, Winkelmann, G. and Carrano, C.J. (eds) Amsterdam: Harwood Academic. pp. 1–49.

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., Mc Mullen, L.M. and Prévost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **70**: 564-582.

Dubuis, C. and Haas, D., 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 650-654.

Dwivedi, D. and Johri, B.N., 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr. Sci.* **85**(12): 1693-1673.

Dykes, G. A. 1995. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. *Trends Ecol. Evol.* **10**: 186-189.

Elander, R.P., Mabe, J.A., Hamili, R.H. and Gorman, M., 1968. Metabolism of tryptophane by *Pseudomonas aureofaciens*. VI. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* **16**: 753-758.

El-Banna, A.A., Scott, P.M., Lau, P.Y., Sakuma, T., Platt, H.W. and Campbell, V., 1984. Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in Potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 1169-1171.

Elhassan, G.A., Abdelgani, M.E., Osman, A.G., Mohamed, S.S. and Abdelgadir, B.S., 2010. Potential production and application of biofertilizers in Sudan Pakistan. *J. Nutrition.* **9**: 926-934.

El-Sayed, A.K., Hothersall, J. and Thomas, C.M., 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiol.* **147**: 2127-2139.

Escolar, L., Perez-Martin, J. and de Lorenzo, V., 1999. Opening the iron box: transcriptional metallo regulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**: 6223-6229.

Euzeby, J.P., 2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.

Expert, D., 1999. With holding and exchanging iron: interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 307-334.

Expert, J.M. and Digat, B., 1995. Biocontrol of Sclerotinia wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains. *Can. J. Microbiol.* **41**(8): 685-691.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.

Fernandez, R.O. and Pizarro, R.A., 1997. High performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *J. Chromatogr.* **771**(A): 99-104.

Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J. O'Callaghan, M. and O'Gara, F., 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.

Fernando, W.G.D., Ramarathnam, R., Akkanas, Krishnamoorthy, S. and Savchuk, S. C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Bio. Biochem.* **37**: 955-964.

Flood, M.E., Herbert, R.B. and Holliman, F.G., 1972. Pigments of *Pseudomonas* species. Part V; Biosynthesis of pyocyanin and the pigments of *Ps.aureofaciens*. *J. C. S. Perkins Transactions*. **1**:622–627.

Forlani, G., Pastorelli, R., Branzoni, M. and Favilli, F., 1995. Root colonization efficiency, plant growth promoting activity and potentially related properties in plant associated bacteria. *J. Gen. Breeding*, **49**: 343–352.

Frank, S. 1994. Spatial polymorphism of bacteriocins and other allelopathic traits. *Evol. Ecol.* **8**: 369–386.

Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schnid, R., Berg, G. and Bahl, H., 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch. Microbiol.* **176**: 421–426.

Fravel, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**: 75–91.

Fredericq, P., 1963. Colicine et autres bactériocines. *Ergeb. Microbiol. Immunol. Exp. Ther.* (Berlin) **37**: 114–161.

Fridlender, M., Inbar, J. and Chet. I., 1993. Biological control of soil-borne plant pathogens by a b-1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**:1211–1221.

Gamble, T.N., Betlach, M. R. and Tiedje, J.M., 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 926–939.

Garbaye, J., 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **128**: 197–210.

Garcia de Salmone, I. E., Hynes, R. K. and Nelson, L., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* **47**: 404–411.

Garcia, M.G., O'Connor, J.E., Garcia, L.L., Martinez, S.I.,Herrero, E. and del Castillo, A.L., 2001. Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to URA3, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae* *aft1* mutation. *Yeast* **18**: 301–311.

Gardan L., Bollet C., Abu Ghorrah M., Grimont F. and Grimont P.A.D., 1992. DNA relatedness among pathovar strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* Janse(1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 606–612.

Gardan, L., Bella, P., Meyer, J.M., Christen, R., Rott, P., Achouak, W. and Samson, R., 2002. *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 2065–2074.

Geels, F.P. and Schippers, B., 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathol. Z* **108**: 193–206.

Georgakopoulos, D. G., M. Hendson, Panopoulos, N. J. and Schroth. F. G., 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2931–2938.

Georges, C. and Meyer, J-M., 1995. High-molecular-mass, iron-repressed cytoplasmic proteins in fluorescent *Pseudomonas*: potential peptide-synthetases for pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 9–15.

Ghiglione, J.F., Gourbiere, F., Potier, P., Philippot, L. and Lensi, R., 2000. Role of respiratory nitrate reductase in ability of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to colonize the rhizosphere of maize. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4012–4016.

Glandorf, D.C., Verheggen, P., Jansen, T., Jorritsma, J.W., Smit, E., Leeftang, P., Wernars, K., Thomashow, L.S., Laureijs, E., Thomas-Oates, J.E., Bakker, P.A. 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. J. Microbiol.* **41**: 109-117.

Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M.K. and Pasternak, J.J., 1994. 1-Aminocyclopropane-l-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* **40**: 911-915.

Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.

Glick, B.R., Patten, C.L, Holguin, G. and Penrose, D.M., 1999. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK, 267 p.

Glickmann, E. and Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 793-796.

Goddard, V.J., Bailey, M.J., Darrah, P., Lilley, A.K. and Thompson, I.P., 2001. Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: a community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. *Plant and Soil*, **232**: 181–193.

Goldstein, A. H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspectives and future prospects. *Am. J. Alternate Agric.* **1**: 51-57.

Golovleva, L.A., Maltseva, O.V. and Solyanikova, I.P., 1992. Metabolism of foreign compounds in *Pseudomonas* spp. In: *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology (Galli, E., Silver, S., Witholt, B.,eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 231-238.

Gordon, D.M, Riley, M.A. and Pinou, T. 1998. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiol.* **145**: 655-661.

Gordon, D.M. and Riley, M.A. 1999. A theoretical and empirical investigation of the invasion dynamics of colicinogeny. *Microbiol.* **145**: 655-661.

Gouda, S. and Chodat, F., 1963. Glyoxylate et succinate, facteurs determinant respectivement l'hypochromie et l'hyperchromie des cultures de *Pseudomonas fluorescens*. *Pathologia e Microbiol.* **26**: 655-664.

Govan J.R.W., 1978. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Meth. Microbiol.* **10**: 61–91.

Gratia, J.P., 1989. Products of defective lysogeny in *Serratia marcescens* SMG 38 and their activity against *Escherichia coli* and other enterobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 23-35.

Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of Indole Acetic Acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* **39**: 1968-1977.

Grichko, V.P. and Glick, B.R., 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 11-17.

Grimont, P.A.D., Vancanneyt, M., Lefèvre, M., Vandemeulebroecke, K., Vauterin, L., Brosch, R., Kersters, K. and Grimont, F., 1996. Ability of Biolog and Biotype 100 systems to reveal the taxonomic diversity of the Pseudomonads. *Syst. Appl. Microbiol.* **19** : 510-527.

Guerinot, M. L., 1994. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 743–772.

Gurtler, V. and Stanisich, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiol.* **142**: 3–16.

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.

Gutterson, N., Ziegler, J.S., Warren, G.J. and Layton, T.L., 1988. Genetic determinants for catabolite induction of antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *J. Bacteriol.* **170**: 380-385.

Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J. and Poole, P.S., 2002. Role of soil microorganisms in improving nutrition of plants. *Plant and Soil.* **245**: 83-93.

Haas, D. and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 307–319.

Haas, D., Galimand, M., Gamper, M. and 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, pp. 303-313.

Haas, D. and Keel, C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:117–153.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation an update. *FEBS Lett.* **307**: 108–112.

Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., Van Pee, K.H. and Ligon, J.M., 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2147-2154.

Hamon, Y., Peron, Hamon, Y. and Peron, Y., 1961. Etude de la propriété bactériocinogène dans le genre *Serratia*. *Ann. Institut Pasteur* **100**: 818-821.

Hancock, R.E.W. and Chapple, D.S., 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1317-1323.

Hantke, K., 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:172–177.

Hantke, K. and Braun, V., 2000. The art of keeping low and high iron concentrations in balance. In: *Bacterial Stress Responses*. Storz G, Hengge-Aronis R(ed). Washington, DC: ASM Press, pp. 275-288.

Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S. and van Elsas, J.D., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**(10): 463-471.

Harrison, L.A., Letendre L., Kovacevich P., Pierson E.A. and Weller D.M., 1993. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* produced by a biocontrol agent, *Pseudomonas aureofaciens*. *Soil Biol. Bioch.* **25**: 215-221

Hassan, H.M. and Fridovich, I., 1980. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J. Bacteriol.* **141**: 156–163.

Hay, A.G., Dees, P.M. and Sayler, G.S., 2001. Growth of bacterial consortium on triclosan. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**: 105–112.

Hechard, Y. and Sahl, H.G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**: 545-557.

Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U. and Heinaru, A., 2000. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbio. Ecol.* **31**(3): 195-205.

Hernandez, M.E., Kappler, A. and Newman, D.K., 2004. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 921–928.

Hernandez-Lucas, C., Royo, J., Paz-Ares, J., Ponz, F., Garcia-Olmedo, F. and Carbonero, P., 1986. Polyadenylation site heterogeneity in mRNA encoding the precursor of the barley toxin a-hordothionin. *FEBS Lett.* **200**: 103-105.

Hersman, L., Lloyd, T. and Sposito, G., 1995. Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **59**: 3327-3330.

Hettwer, U., Gross, M. and Rudolph, K., 1995. Purification and Characterization of an Extracellular Levan sucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **177**(10): 2834–2839.

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

Hildebrand, D.C., 1988. Pectate and pectin gel for differentiation of

Pseudomonas sp. And other bacterial plant pathogens. *Phytopathol.* **61**: 1430-1439.

Hiltner, L., 1904. Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft.* **98**: 59-78.

Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B. and Yoder, J.I. , 2003. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecol.* **84**: 858-868.

Höfle, M.G., 1988. Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Meth.* **8**: 235–248.

Höfle, M.G., 1990. Transfer RNAs as genotypic fingerprints of eubacteria. *Arch. Microbiol.* **153**: 299–304.

Höfte, M. and de Vos, P., 2006. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant-associated bacteria*. Part. 3, Gnanamanickam, S.S. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 507-533.

Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. and Read, D.J., 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature.* **411**: 789-792.

Hoisington, D., Khairallah, M. and Gonzalez-de-Leon, D., 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Biotechnology Center. Second Edition, Mexico, D.F.: CIMMYT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**: 1562-1566.

Holloway, B. W., 1992. *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (E Galli, S Silver, B Witholt,eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1-8.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994. Genus *Pseudomonas*. In: Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A;Staley, J.T.; Williams, S.T. (Eds) Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, pp. 93-94.

Homma, Y., Kato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H. and Suzui, T., 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* **21**:723-728.

Höper, H., Steinberg, C. and Alabouvette, C., 1995. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to fusarium wilt of flax. *Soil Biol. Biochem.* **27**:955–967.

Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. and Bohannon, B.J.M., 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* **6**: 613-622.

Howard, D.H., 1999. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 394–404.

Howell, C. R. and Stipanovich, R. D., 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathol.* **69**: 480-482.

Howell, C.R. and Stipanovic, R.D., 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* **70**: 712-715.

Iacobellis, N.S, Contesini, A.M. and Surico, G., 1995. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Phytopatol. Mediterr.* **34**: 15-22.

Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. and Métraux, J.P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to rootinoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:851–858

Inbar, J. and Chet, I., 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 973-978.

Ito, S., Nishimune, T., Abe, M., Kimoto, M. and Hayashi, R., 1986. Bacteriocin-like killing action a temperate bacteriophage ϕ BA1 of *Bacillus aneurinolyticus*. *J. Virol.* **59**: 103-111.

Jabrane, A., Destain, J., Compere, P., Ledoux, L., Calberg-Bacq, C.M. and Thonart, P., 1994. A screening technique to isolate bacterial strains producing high molecular weight bacteriocins. *Biotech. Techniques* **8**: 751-754.

Jabrane, A., Sabri, A., Compère, P., Jacques, P., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J. and Thonart, P., 2002. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora* the fire blight pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11): 5704-5710.

Jack, R.W. and Jung, G. 2000. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Curr. Opin. Chemic. Biol.* **4**: 310-317.

Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J.L., Latour, J.M. and Michaud-Soret, I., 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochem.* **37**: 2564-2571.

Jacques, J.F., Jang, S., Prevost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J. and Massé, E., 2006. RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **62**: 1181–1190.

Jacques, M. A., 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.

Jacques, M.A. and Morris, C.A., 1995. Review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere, *FEMS Microbiol. Ecol.* **18** : 1–14.

Jacques, P., Ongena, M., Gwose, I., Seinsche, D., Schröder, H., Delfosse, P., Honart, P., Taraz, K. and Budzikiewicz, H., 1995. Structure and characterization of isopyoverdin from *Pseudomonas putida* BTP1 and its relation to the biogenetic pathway leading to pyoverdines. *Z. Naturforsch.* **50**: 622–629.

James, D.W. and Gutterson, N.I., 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:1183–1198.

James, R., Lazdunski, C. and Pattus, F., 1991. *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics* .pp.519. NATO ASI series, Springer- Verlag, New-York, 519 p.

James, S. and Tagg, T., 1986. The typing of *Enterococcus* strains according to their production of bacteriocin-like inhibitory activity. *Proc. Univ. Otago Medic. School* **64**: 65-66.

Janisiewicz, W.J. and Roitman, J., 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* **78**: 1697-1700.

Janse, J.D., Derks, J.H.J., Spit, B.E. and Van Der Tuin, W.R., 1992. Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria, including *P. Marginalis* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **15** : 538 -553.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Madsen, M. and Jensen, D.F., 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seed borne *Alternaria* spp. *Phytopathol.* **94**: 551–560.

Jensen, B., Poulsen, F.V., Knudsen, I.M.B. and Jensen, D.F., 2001. Combining microbial seed treatment with priming of carrot seeds for control of seed borne *Alternaria* spp. Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. *IOBC WPRS Bull.* **24**: 197–201.

Johnsen, K., Andersen, S. and Jacobsen, C.S., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3818–3825.

Johnson, J.L. and Ordal, E.J., 1968. Desoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *J. Bacteriol.* **95**: 893–900.

Johnson, J.L. and Palleroni, N., 1989. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** : 230–235.

Johnson, L., 2008. Iron and siderophores in fungal–host interactions. *Mycol. Res.* **112**: 170–183.

Jones, A.M., Lindow, S.E. and Wildermuth, M.C., 2007. Salicylic acid, yersiniabactin, and pyoverdinin production by the model phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: Synthesis, regulation, and impact on tomato and Arabidopsis host plants. *J. Bacteriol.* **189**: 6773–6786.

Jonhson, J. and Palleroni, N.J., 1989. Desoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 230-235.

Jurkevitch, E., Hadar, Y. and Chen, Y., 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:119–124.

Kairu, G.M., 1997. Biochemical and pathogenic differences between Kenyan and Brazilian isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. *Plant pathol.* **46**:239-246.

Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N. and Lugtenberg, B.J.J., 2006. Effects of the Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the Biocontrol Bacterium *Pseudomonas*

fluorescens WCS365 on the Composition of Organic Acids and Sugars in Tomato Root Exudate. *MPMI* **19**(10): 1121–1126.

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

Kampfer, P., Falsen, E. and Busse, H.J., 2008. Reclassification of *Pseudomonas mephitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthino bacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley et al. 1978. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 136–138.

Kang, Y., Carlson, R., Tharpe, W. and Schell, M.A., 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in the biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3939-3947.

Karnwal, A., 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent pseudomonas in the presence of l-tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* **91** (1): 61-63.

Katz, E. and Demain, A. L., 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **40**: 449–474.

Keel, C., U. Schinder, M. Maurhofer, C. Voissard, J. Laville, P. Burger, P. Wirthner, Haas, D. and Défago, G., 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 4-13.

Keel, C., Voissard, C., Berling, C.-H., Kahr, G. and Défago, G., 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for suppression of tobacco black root rot in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathol.* **79**: 584-589.

Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R.J. and 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.

Kerr, A. and Tate, M.E. 1984. Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiol. Sci.* **1**: 1-4.

Kerr, B., Riley, M.A., Feldman, M. and Bohannan, B. 2002. Local dispersal and interaction promote coexistence in a real life game of rock-paper-scissors. *Nature*, **418**: 171-174.

Kerstens K., Ludwig W., Vancanneyt M., Devos P., Gillis M. and Schleifer K.H., 1996. Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 465–477.

Khan, S.R., Mavrodi, D.V., Jog, G.J., Suga, H., Thomashow, L.S. and Farrand, S.K., 2005. Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog *phzI*, and a cis-acting *phz* box. *J. Bacteriol.* **187**: 6517-6527.

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

Kim, M.S., Kim, Y.C. and Cho, B.H., 2004. Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biol.* **6**(2):105-108.

Kim, S.I., Shim, J.O., Shin, H.S., Choi, H.J. and Lee, M.W., 1992. Suppressive mechanism of soil borne disease development and its practical application. *Korean Mycol.* **20**: 337-346.

King, E.D., Ward, M.K. and Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 301-307.

Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L.J., Lanahan, M., van Pée, K.H. and Ligon, J.M., 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **180**(7): 1939-1943.

Kishore, G.K., Pande, S. and Podile, A.R., 2005. Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with chitinolytic bacteria. *Phytopathol.* **95**:123–132.

Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**: 337-349.

Kleinkauf, H. and von DGHren, H., 1996. A non ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **236**:335-351.

Klement, Z., 1982. Hypersensitivity. In: *Phytopathogenic prokaryotes*. vol. 2, Mount, M.S. and Lacy, G.H. (Eds). Academic Press, Inc., New York, USA, pp. 149-177.

Klement, Z., 1963. Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic Pseudomonads. *Nature*, **199**: 299–300.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N., 1980a. Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, **286**: 885–886.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N., 1980b. Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr. Microbiol.* **4**: 317–320.

Kloepper, J.W., 1983 Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathol.* **73**: 217-219.

Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: 4th Int. Conf. Plant Pathogen. Bacteria. Angers France, **2**: 879-882.

Knowles, C. J. and Bunch, A. W., 1986. Microbial cyanide metabolism. *Adv. Microb. Physiol.* **27**: 73-111.

Koster, M., van de Vossenbergh, J., Leong, J. and Weisbeek, P.J., 1993. Identification and characterization of the pupB gene encoding an inducible

ferric-pseudobactin receptor of *Pseudomonas putida* WCS358. *Mol. Microbiol.* **8**: 591–601.

Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178-703.

Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R., 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**: 485-529.

Kowalchuk, G.A., Yergeau, E., Leveau, J.H.J., Sessitsch, A. and Bailey M., 2010. Plant-associated microbial communities. In: *Environmental molecular microbiology*. Liu, W-T. and Jansson, J.K. (Eds). Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 131-148.

Krewulak, K.D. and Vogel, H. J. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake *Biochim. Biophys. Acta* **1778**:1781–1804.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680–683.

Lai, Q. and Shao, Z., 2008. *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1911–1915.

Lakey, J.H. and Slatin, S.L., 2001. Pore-forming colicins and their relatives. *Curr. Topic Microbiol. Immun.* **257**: 131-161.

Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I. and Vasil, M.L., 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7072–7077.

Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. and Lemanceau, P., 1996. The composition of fluorescent Pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449-2456.

Latour, X., Delorme, S., Mirleau, P. and Lemanceau, P., 2009. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. In: *Sustainable agriculture*. Part. 3, Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, D., Souchère, V. and Alberola, C. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 285-296.

Latour, X. and Lemanceau, P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*, **17**: 427–443.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran H. and Kong, F., 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* **10**: 599–606.

Laursen, J.B. and Nielsen, J., 2004. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem. Rev.* **104**:1663–1685.

Lavermicocca, P., Lonigro, S.L., Valerio, F., Evidente, A. and Visconti, A. 2002. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1403-1407.

Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C. and Haas, D., 1998. Characterization of the *hcn* ABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* **180**: 3187-3196.

Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. and Read, D.J., 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* **82**: 1016-1045.

Leeman, M., Den Ouden, F.M., Van Pelt, J.A., Dirkx, F.P.M., 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*. *Phytopathol.* **86**: 149–155.

Leeman, M., Van Pelt, J.A., Hendrickx, M.J., Scheffer, R.J., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1995. Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathol.* **85**: 1301–1305.

Leisinger, T. and Margraff, R., 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* **43**(3): 422–442.

Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. In: T.F. Preece (Ed.). Methods in Plant pathology. Vol 2: Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell. Oxford. UK, 212 p.

Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* **29**: 470–489.

Lemanceau, P., 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449-2456.

Lemanceau, P., 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants : exemple of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, **12**: 413-437.

Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J.M. and 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**(3) :1004-1012.

Lemanceau, P., Alabouvette, C. and Couteaudier, Y., 1988. Recherches sur la résistance des sols aux maladies, modification du niveau de réceptivité d'un sol résistant et d'un sol sensible aux fusarioses vasculaires en réponse à des apports de fer ou de glucose. *Agronomie*, **8**: 155-162.

Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J.M. and Alabouvette, C., 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *App. Environ. Microbiol.* **61**: 1004-1012.

Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P.A.H.M. and Briat, J.F., 2009. Role of iron in plant–microbe interactions. *Adv. Bot. Res.* **51**: 491-549.

Lemanceau, P., Offre, P., Mougel, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. and Berta, G., 2006. Microbial ecology of the rhizosphere. In: *Microbiological methods for assessing soil quality*. Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, pp. 228-230.

Leoni, L., Ciervo, A., Orsi, N. and Visca, P., 1996. Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *J Bacteriol.* **178**: 2299–2313.

Lesuisse E and Labbe P, 1989. Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 257–263.

Levy. E., Eyal. Z., Chet. I. and Hochman, A., 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **40**:163-71.

Lewis, T.A., Cortese, M., Sebat, J., Green, T., Lee, C.H. and Crawford R.L., 2000. A *Pseudomonas stutzeri* gene cluster encoding the biosynthesis of the CCl₄-dechlorination agent pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid). *Environ. Microbiol.* **2**: 407–416.

Li, Y., Xiang, H., Liu, J., Zhou, M. and Tan, H., 2003. Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* **7**: 401-407.

Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D. and Kempf, H. J., 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag. Sci.* **56**: 688–695.

Lim, H.S., Kim, Y.S. and Kim, S.D., 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 510-516.

Lindsay, W.L., 1979. Chemical equilibria in soils. Wiley, Chuchester, 449 p.

Litwin, C. M. and Calderwood, S. B., 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 137–149.

Liu, R., Liu, H., Feng, H., Wang, X., Zhang, C.X., Zhang, K.Y. and Lai, R., 2008. *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1404–1408.

Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Ratledge, C. and Bitter, W., 2008. Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol. Microbiol.* **67**: 458–472.

Locatelli, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Rossi, P., Aragno, M. and Fromin, N., 2002. Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 30 half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 220–227.

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

Loper, J. E. and Gross, Æ. H., 2007. Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:265–278.

Loper, J. E. and Lindow, S. E., 2001. Reporter gene systems useful in evaluating in situ gene expression by soil- and plant-associated bacteria. In: *Manual of Environmental Microbiology*, 2nd ed. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter, (eds). American Society for Microbiology Press, Washington DC, pp. 627-637.

Loper, J.E. and Schroth, M.N., 1981. Factors affecting antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* **70**: 871-891.

Loper, J.E. and Schroth, M.N., 1986. Importance of siderophores in microbial interactions in the rhizosphere. In *Iron, Siderophores and Plant Diseases*. (ed). Swinburne, T.R. Plenum Publishing Company.

Loper, J.E., 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathol.* **78**:166–172.

Loper, J.E., Hassan, K.H., Davis, E.W., Mavrodi, D., Lim, C. and Liam, E., 2011. Genomic diversity of *Pseudomonas* spp. isolated from aerial or root surfaces of plants. *Pseudomonas 2011. 13th International Conference abstract book*. pp. 10.

Lorck, H., 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* **1**: 142–146.

Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. and Kubicek, C.P., 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* **178**: 6382–6385.

Lotz, W. and Mayer, F. 1972. Isolation and characterization of a bacteriophage tail-like bacteriocin from a strain of *Rhizobium*. *J. Virol.* **9**: 160-173.

Lugtenberg, B.J., Chin, A. W.T.F. and Bloemberg, G.V., 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**:373-383.

Lynch, J.M., 1987. The rhizosphere. Chichester: Wiley Interscience, pp. 35–57.

Lynch, J.M., 1990. The rhizosphere. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 458p.

Mackie, A. E. and Wheatley, R. E., 1999. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 375–385.

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

Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F. and Raskin, I., 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Sci.* **250**: 1004-1002.

Manaia, C.M. and Moore, E.R., 2002. *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermo-tolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 2203–2209.

Maniatis, T., Fritsch E.F. and Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 2, Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, New York, 545p.

Manjula, K., Kishore, G.K. and Podile, A.R., 2004. Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved effective than cell free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Can. J. Microbiol.* **50**: 737–744.

Marmur, J., 1961. Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208.

Marschner, P., Crowley, D. and Yang, C. H., 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil*, **261**: 199–208.

Martin, F. N. and Loper, J. E., 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**:111-181.

Marugg, J.D.D., deWeger, L.A., Nielander, H.B., Oorthuizen, M., Recourt, K., Lugtenberg, B., van der Hofstad, G.A.J.M. and Weisbeek, P.J., 1989. Cloning and characterization of a gene encoding an outer membrane protein required for siderophore uptake in *Pseudomonas putida* WCS358. *J. Bacteriol.* **171**:2819–2826.

Massé, E. and Arguin, M., 2005. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 462–468.

Massé, E., Escorcia, F.E. and Gottesman, S., 2003a. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Developm.* **17**: 2374-2383.

Massé, E., Majdalani, N. and Gottesman, S., 2003b. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 120–124.

Massé, E., Salvail, H., Desnoyers, G. and Arguin, M., 2007. Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **10** : 140–145.

Matsubara, T. and Zumft, W. G., 1982. Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads. *Arch Microbiol.* **132**: 322-328.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. and Défago, G., 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathol.* **84**: 139–146.

Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. and Défago, G., 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathol.* **82**(2): 190–195.

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

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

Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* **91**: 35–43.

Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P. and Raaijmakers, J. M., 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wil . *ISME J.* **3**: 977–991.

Mazzola, M., 2002 Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**: 557–564.

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

McGregor, C.H., Wolff, J.A., Arora. S.K., Hylemon, P.B. and Phibbs, P.V., 1992. Catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (E Galli, S Silver, B Witholt, eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, pp. 198-207.

McSpadden Gardener, B.B. and Fravel, D.R., 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.

McSpadden Gardner, B.B., Schroeder, K.L., Kalloger, S.E., Raaijmakers, J.M., Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1939-1946.

Meena, B., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P. and Velazhahan, R., 2001. Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Dis. Protect.* **108**: 369–381.

Mehta, S. and Nautiyal, C. S., 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* **43**: 51-56.

Mercado-Blanco, J., van der Drift, K. M.G.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M., 2001. Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* **183**:1909–1920.

Mercenier, A., Simon, J. P., Van der Wauven, C., Haas, D. and Stalon, V., 1980. Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **144**: 159-163.

Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B., 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance. *Sci.* **250**: 1004–1006.

Meyer, J-M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. and Holder, J.A., 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **64**: 518-523.

Meyer, J.M. and Stintzi, A., 1998. Iron metabolism and siderophores in *Pseudomonas* and related species. In: Montie, T.C. (Ed.), *Biotechnology Handbooks*, vol. 10: *Pseudomonas*. Plenum Publishing Co., New York, N.Y., pp. 201–243.

Meyer, J.M. and Abdallah, M.A., 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 319-328.

Meyer, J.M., Azelvandre, P. and, Georges, C., 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Biofactors*, **4**: 23–27.

Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. and Palleroni, N., 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2745–2753.

Meyer, J.M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M. and Budzikiewicz, H., 2008. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdinin siderotyping method. *Biometals*, **21**: 259–271.

Meyer, J.M., Gruffaz, C., Tulkki, T. and Izard, D., 2007. Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2543–2556

Meyer, J.M., Hohnadel, D., Khan, A. and Cornelis, P., 1990. Pyoverdinin-facilitated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: immunological characterization of the ferripyoverdinin receptor. *Mol. Microbiol.* **4**(8): 1401-1405.

Meyer, J.M. and Hornsperger, J.M., 1978. Role of pyoverdinin, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 329-331.

Michel- Briand, Y. and Baysse, C. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, **84**: 499-510.

Michel, L., Gonzalez, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T. and Reimann, C., 2005. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol. Microbiol.* **58**: 495–509.

Miethke, M. and Marahiel, M.A., 2007. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**(3):413-451.

Miller, J.H., 1974. *Experiments in Molecular Genetics*, second ed. Cold Spring Harbor, New York, p. 31-36.

Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J-M., Mazurier, S. and 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.

Misaghi, I. and Grogan, R. G., 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* **59**: 1436-1450.

Misko, A.L. and Germida, J.J., 2002 Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42** : 399-407.

Missiakas, D. and Raina, S., 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* **28**: 1059-1066.

Molina L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B. and Défago, G., 2003. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Eco.* **45** (1): 71-81.

Morello, J.E., Pierson, E.A. and Pierson, L.S.III, 2004. Negative cross-communication among wheat rhizosphere bacteria: effect on antibiotic production by the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3103–3109.

Mossialos, D., Meyer, J.M., Budzikiewicz, H., Wolff, U., Koedam, N. and Baysse, C., 2000. Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 487–492.

Mulet, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E., 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* **12**(6):1513–1530.

Munsch, P., Alatosava, T., Marttinen, N., Meyer, J.M., Christen, R. and Gardan, L., 2002. *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1973–1983.

Naik, P. R. and Sakthivel, N., 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* **157**: 538–546.

Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H. and Hayashi, T. 2000. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Molecular Microbiology* **38**: 213-231.

Nakayama, T., Homma, Y. Hashidoko, Y., Mizutani, J. and Tahara, S., 1999. Possible role of xanthobaccins produced by *Pseudomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4334-4339.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. and Valori, F., 2008. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. In: Soil biology: molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. vol. 15, Nautiyal, C.S. and Dion, P. (Eds). Springer, Berlin Heidelberg, Deutchland, pp. 339-365.

Natsch, A., Keel, C., Pfirter, H.A., Haas, D. and Défago, G., 1994. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2553-2560.

Neilands, J.B., 1981. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**: 715–731.

Neilands, J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem.* **270**: 26723–26726.

Neilands, J.B., Konopka, K., Schwyn, B., Coy, M., Francis, R.T., Paw, B.H. and Bagg, A., 1987. Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. In: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*. Winkelmann G, Van Der Helm D, Neilands JB (eds), Vch Publishers, New York, pp. 3–34.

Neuhoff, R., Stamm A. and Eibl, H., 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**: 427–448.

Nguyen, C., 2009. Rhizodeposition of organic C by plant: mechanisms and controls. In: *Sustainable Agriculture*. Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchère, V. and Alberola, C. (Eds). Springer, Netherlands, pp. 375-396.

Nielsen, M.N. and Sørensen, J., 1999. Citinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 217-227.

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

Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 80-90.

Nielsen, T.H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., 2000. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 992-1001.

Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. and Wakabayashi, H., 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 83–89.

Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J. and Loper, J. E., 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **181**: 2166–2174.

Nowak-Thompson, B., Gould, S.J. and Loper, J.E., 1997. Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene*, **204**:17–24.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, **84**: 593-604.

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. Microbiol.* **137**: 2273–2279.

Ochsner, U., Wilderman, P.J., Vasil, A. and Vasil, M., 2002. Gene Chip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* **45**: 1277–1287.

Oguiza, J.A., Kiil, K. and Ussery, D.W., 2005. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas syringae*. *Trends Microbiol.* **13**: 565–568.

Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, L., 1988. The Role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* **78**: 84-88.

O'Sullivan, D. J., Morris, J. and O'Gara, F., 1990. Identification of an additional ferric-siderophore uptake gene clustered with receptor, biosynthesis, and fur-like regulatory genes in fluorescent *Pseudomonas* sp. strain M114. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2056-2064.

Pacheco, C.C., Passos, J.F., Moradas-Ferreira, P. and De Marco, P., 2003. Strain PM2, a novel methylotrophic fluorescent *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **227** : 279-285.

Palleroni, N. J., 2010. The *Pseudomonas* Story. *Environ. Microbiol.* **12**(6): 1377–1383.

Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B., 2004. Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44.

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

Palleroni, N.J., 1992. Present situation of the taxonomy of the aerobic Pseudomonads. In: Galli, E., Silver, S., Wiltholt, B. (Eds.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 105–1105

Palleroni, N.J., 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**: 231–251.

Palleroni, N.J., 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Part B: The Proteobacteria. Springer, New York, pp. 323–379.

Palleroni, N.J., 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.

Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F., 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43** : 606–609.

Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M., 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 333–339.

Papagiani, M., 2004. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biological Adv.* **21**: 465–499.

Parret, A.H.A. and De Mot, R. 2000. Bacteriocin production by rhizosphere- colonizing fluorescent *Pseudomonas*. In: *Proceedings of the 5th international PGPR Workshop*. Auburn University. Web Site [Online] <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/parret.pdf>

Parret, A.H.A. and De Mot, R. 2002. Bacteria killing their own kind: Novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trends Microbiol.* **10**:107–112.

Parret, A.H.A., Schoofs, G., Proost, P. and De Mot, R. 2003. A plant lectin-like bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **185**: 897–908.

Parret, A.H.A., Temmerman, K. and De Mot, R. 2005. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(9): 5197–5204.

Pascal, M. and Dedonder, R., 1972. Purification et propriétés de la lévane sucrase exocellulaire de *Bacillus subtilis* marburg. *Carbohydrate Res.* **24**(2): 365–377.

Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Can. J. Microbiol.* **48**: 635–642.

Peix, A., Berge, O., Rivas, R., Abril, A. and Velazquez, E., 2005. *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1107–1112.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, **9**: 1132–1147.

Peix, A., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C. and Velazquez, E., 2003. *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 2067–2072.

Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C. and Velazquez, E., 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate solubilizing bacterium isolated from rhizosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 847–850.

Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Ramírez-Bahena, M.H., Mateos, P.F., Santa-Regina, I., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E.

and Velazquez, E., 2007. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* into *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp.nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov. and *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1286–1290.

Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S. and Fernández, F.J., 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods.* **70** : 127–131.

Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. and Robaglia, C., 2003. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* **26**: 189–199.

Pessi, G. and Haas, D., 2001. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiol. Lett.* **200**:73-78.

Philippot, L., Clays-Josserand, A. and Lensi, R., 1995. Use of Tn5 mutants to assess the role of the dissimilatory nitrite reductase in the competitive abilities of two *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1426–1430.

Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A., 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 948–955.

Pierson, L. S. III, Kappenne, V. and Wood, D., 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.III and Pierson, E.A., 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 101–108.

Pierson, L.S.III and Thomashow, L.S., 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant Microbe-Interact.* **5**: 330-339.

Pierson, L.S.III, Wood, D.W. and Pierson, E.A., 1998. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 207–225.

Pierson, L.S.III, Gaffney, T., Lam, S. and Gong, F., 1995. Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**: 299–307.

Pierson, L.S.III. and Pierson, E. A., 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**:1659–1670.

Pieterse, C.M.J., Ton, J. and Van Loon, L.C., 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *Ag. Biotech. Net.* **3**: ABN 068.

Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., and Lin, J.S., 2003. Microorganism identification by matrix-

assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Ann. Chem.* **75**: 3817–3822.

Podschun, R. and Ullmann, U., 1993. Bacteriocin typing of environmental *Klebsiella* strains. *Zbl. hyg.* **195**:22-26.

Poole, K. and McKay, G. A., 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front Biosci.* **8**: d661–d686.

Potvin, E., Sanschagrin, F. and Levesque, R. C., 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 38–55.

Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. and Newman, D. K., 2006. Rethinking ‘secondary’ metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 71–78.

Pugsley, A.P. and Oudega, B. 1987. Methods for studying colicins and their plasmids. In: Plasmids, a Practical Approach (Hardy, K.G. ed). IRL. Press, Oxford, pp: 105-161..

Raaijmakers J.M. and Weller D.M., 1998. Natural plant protection by 2,4 diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **11**: 144-152.

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.

Rainey, P.B., Bayley, M.J. and Thompson, I.P., 1994. Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonads isolated from field-grown sugar beet. *Microbiol.* **140**: 2315-2331.

Rajkumar, M., Lee, K.J. and Freitas, H., 2008. Effects of chitin and salicylic acid on biological control activity of *Pseudomonas* spp. against damping off of pepper. *South African J. Botany*, **74**: 268–273.

Ramalho, R., Cunha, J., Teixeira, P. and Gibbs, P. A., 2002. Modified pseudomonas agar: new differential medium for the detection/ enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. *J. Microbiol. Meth.* **49** : 69–74.

Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffac, C., Meyer, J.M., Défago, G., Sutra, L. and Moënne-Loccoz, Y., 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* **34** : 180–188.

Ran, H., Hassett, D.J. and Lau, G.W., 2003. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**: 14315–14320.

Ratledge, C. and Dover, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 881–941.

Reimann, C., Serino, L., Beyeler, M. and Haas, D., 1998. Dihydroaeruginic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **144**: 3135–3148.

Renwick, A., Campbell, R. and Coe, S., 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathol.* **40**: 523-532.

Richard, C., Brillet, A., Pilet, M.F., Prévost, H. and Drider, D. 2003. Evidence on inhibition of *listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 288-292.

Richardson, A.E., 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants *Aus. J. Plant Physiol.* **28**(9): 897–906.

Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 117-137.

Riley, M.A., 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 255-278.

Riley, M.A., Goldstone, C.M., Wertz, J.E. and Gordon, D., 2003. A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J. Evol. Biol.* **16**: 690–697.

Riley, M.A. and Gordon, D.M., 1992. A survey of col plasmids in natural strains of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of col-plasmids lineages. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1345-1352.

Riley, M.A. and Gordon, D.M., 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* **7**: 129-133.

Rillig, M.C. and Mummey, D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* **171**: 41-53.

Rodríguez, H. and Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* **17**:319–339.

Romanenko, L.A., Uchino, M., Tebo, B.M., Tanaka, N., Frolova, G.M. and Mikhailov, V.V., 2008. *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 706–710.

Roussel-Delif, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Philippot, L., Aragno, M. and Fromin, N., 2005. Frequency and diversity of nitrate reductase genes among nitrate dissimilating *Pseudomonas* in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. *Microb. Ecol.* **49**: 63-72.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Pare, P.W. and Kloepper, J.W., 2003a. Volatiles produced by PGPR elicit plant growth promotion and induced resistance in Arabidopsis, Proceedings of the Sixth International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria 2003, pp. 436–443.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Pare, P.W. and Kloepper, J.W., 2003b. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc. Natl. Aca. Sci.USA.* **100**: 4927–4932.

Sacherer, P., Défago, G. and Haas, D., 1994. Extracellular protease and phospholipase-C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.* **116** (2): 155-160.

Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evolution*. **4**: 406-425.

Sakthivel, N. and Gnanamanickal, S.S., 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for Suppression of Sheath Rot Disease and for Enhancement of Grain Yields in Rice (*Oryza sativa* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(9):2056-2059.

Salisbury, F.B., 1994. The Role of Plant Hormones. In: *Plant-Environment Interactions*. Wilkinson, R.E. (ed.). Marcel Dekker, New York, USA., pp. 39-81.

Sands, D.C. and Rovira, A.D., 1971. Fluorescent *Pseudomonads* a Residual Component in the Soil Microflora? *J. Appl. Microbiol.* **34**(1): 253-259.

Saosoong, K., Wongphathanakul, W., Poasiri, C. and Ruangviriyachai, C., 2009. Isolation and Analysis of Antibacterial Substance Produced from *P. aeruginosa* TISTR 781. *KKU Sci. J.* **37**(2): 163-172.

Schalk, I.J., Hannauer, M. and Braud, A., 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**(11): 2844-2854.

Scher, F.M. and Baker, R., 1980. Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathol.* **70**: 412-417.

Scher, F.M. and Baker, R., 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* **72**:1567-1573.

Schnider, U., Keel, C., Blumer, C., Troxler, J., Défago, G. and Haas, D., 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* **177**: 5387-5392.

Schroth, M.N. and Hancock, J.G., 1981. Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**:453-476.

Schroth, M.N. and Hancock, J.G., 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Sci.* **216**: 1376-1381.

Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. and Panopoulos, N., 1992. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. In: *The Prokaryotes* (MP Balows, ed), Springer-Verlag, New York, pp. 3104-3131.

Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* **160**: 47- 56.

Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P. and Haas, D., 1995. Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 217-228.

Serino, L., Reimann, C., Visca, P., Beyeler, M., Della Chiesa, V. and Haas, D., 1997. Biosynthesis of pyochelin and dihydro aeruginosic acid requires the iron-regulated *pch* DCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**: 248-257.

Shah, S., Li, J., Moffatt, B.A. and Glick, B.R., 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* **44**: 833-843.

Shenker, M., Oliver, I., Helmann, M., Hadar, Y. and Chen, Y., 1992. Utilization tomatoes of iron mediated by siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *J. Plant Nutr.* **15**: 2173–2182.

Shoesmith, J. G. and Sherris, J. C., 1960. Studies on the mechanism of arginine-activated motility in a *Pseudomonas* strain. *J. Gen. Microbiol.* **22**: 10-24.

Sindhu, S.S. and Dadarwal, K.R., 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *cicer* in chickpea (*Cicer arietinum*). *Microbiol. Res.* **156**: 353-358.

Smibert, R.M. and Krieg, N.R., 1994. Phenotypic characterization. In: *Methods for general and molecular bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg(ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.607–654

Smidt, M.L. and Vidaver, A.K., 1982. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW-1 in plant tissue. *Can. J. Microbiol.* **28**: 600-604.

Smirnov, V.V. and Kiprianova, E.A., 1990. Bakterii roda *Pseudomonas* (Bacteria of the Genus *Pseudomonas*), Kiev: *Naukova Dumka*, pp. 100-111.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification, W.H. Freeman, San Fransisco, 573 p.

Snow, G.A., 1954. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*: II. Degradation and identification of fragments. *J. Chem. Soc.* 2588–2596.

Sokol, P.A., Lewis, C.J. and Dennis, J.J., 1992. Isolation of a novel siderophore from *Pseudomonas cepacia*. *J. Med. Microbiol.* **36**: 184-189.

Sørensen, J., Skouv, J. and Nybroe, O., 1991. Rapid identification of environmental isolates *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* by SDS PAGE analysis of whole- cell protein patterns. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**: 41-50.

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

Srivastava, A. and Handa, A.K., 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *J. Plant Growth Reg.* **24**: 67–82.

Stackebrandt, E., Ludwig, W., Weizenegger, M., Dorn, S., McGill, T.J., Fox, G.E., Woese, C.R. and Schubert, W., Schleifer, K.H., 1987. Comparative 16S rRNA Oligonucleotide Analyses and Murein Types of Round Spore Forming Bacilli and Non Spore Forming Relatives. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2523-2529.

Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271

Stevens, A.M., Dolan, K.M. and Grencberg, E.P., 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *fax* promoter region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **91**:12619-12623.

Stevenson, F.j. and Cole, M.A.,1999. The phosphorus cycle. In: *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley and Sons, pp.279-329.

Stewart, M., 1988. Computer image processing of electron micrographs of biological structures with helical symmetry. *J. Electron. Microsc. Tech.* **9**(4):325-358.

Storz, G. and Imlay, J.A., 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:188–194.

Strauch, E., Kaspar, H., Schaudinn, C., Dersch, P., Madela, K., Gewinner, C., Hertwig, S., Wecke, J. and Appel, B. 2001. Characterization of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5634-5642.

Suslow, T.V. and Schroth, M.N., 1982. Rhizobacteria of sugar beet: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathol.* **72**:199-206.

Sutra, L., Rise Áde, J.M. and Gardan, L., 2000. Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 289-293.

Sutra, L., Siverio, F., Lopez, M. M., Hunault, G., Bollet, C. and Gardan, L., 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis: emended description of *Pseudomonas corrugate* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 1020-1033.

Tagg, J., 1991. BLIS production in the genus *Streptococcus*. In: *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics* (James, R.; Lazdunski, C.; Pattus, F. Eds), pp: 417-420. Springer- Verlag, New- York, pp: 417-420.

Taiz, L. and Zeiger, E., 1991. Auxins: growth and tropisms. In: *Plant Physiology*. Zeiger, E.(Ed.), Hardcover. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, pp. 398–425.

Tamaoka, J., Ha, D.-M. and Komagata, K., 1987. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosterone* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int. J. Syst.Bacteriol.* **37**: 52–59.

Tamietti, G. and Pramotton, R., 1990. La réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires: rapports entre résistance et microflore autochtone avec référence particulière aux *Fusarium* non pathogènes. *Agronomie*, **10**: 69-76.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evolution.* **24**:1596-1599.

Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **101**:11030-11035.

Tanimoto, E., 2005. Regulation of root growth by plant hormones roles for auxin and gibberellin. *Crit. Rev. Plant Sci.* **24**: 249–265.

Tarnawski, S., Hamelin, J., Jossi, M., Aragno, M. and Fromin, N., 2006. Phenotypic structure of *Pseudomonas* populations is altered under elevated pCO₂ in the rhizosphere of perennial grasses. *Soil Biol. Biochem.* **38**: 1193–1201.

Teintze, M., Hassain, M. B., Baines, C. L., Leong, J. and van der Helm, D., 1980. Structure of ferric Pseudobactin a sidérophore from plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochem.* **20**: 6446-6457.

Thane, C., Nielsen, T. H., Neiendam, M., Sørensen, J. and Olsson, S., 2000. Viscosinamid-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**: 139–146.

Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. and Pierson, L.S., 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.* **56**: 908-912.

Thomashow, L.S., and Weller, D.M., 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **170**:3499-3508.

Thomashow, L.S. and Weller, D. M., 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant-microbe interactions*, vol. 1. G. Stacey and N. T. Keen (ed.), Chapman and Hall, London, United Kingdom, p. 187–236.

Thomashow, L.S. and Weller, D.M., 1995. Current Concepts in the Use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites, *Plant–Microbe Interactions*, Stacy and Keen, Eds., vol. 1, pp. 187–235.

Thomashow, L.S., Bonsall, R. and Weller, D.M., 1997. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, D.C, pp. 493–499.

Thornley, M.J., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 37-52.

Toohey, J.I., Nelson, C.D. and Krotkov, G., 1965. Toxicity of phenazine carboxylic acid to some bacteria, algae, higher plants, and animals. *Can. J. Bot.* **43**:1151–1155.

Tourkya, B., Boubellouta, T., Dufour, E. and Leriche, F., 2009. Fluorescence Spectroscopy as a promising tool for a polyphasic approach to Pseudomonad Taxonomy. *Curr.Microbiol.* **58**: 39–46.

Tripathi, R.K. and Gottlieb, D., 1969. Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *J. Bacteriol.* **100**: 310–318.

Trivedi, P., Pandey, A. and Palni L.M.S., 2008. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. *Microbiol. Res.* **163** : 329-336.

Turner, J.M. and Messenger, A.J., 1986. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv. Microb. Physiol.* **27**:211–275.

Validov, S., Mavrodi, O., De La Fuente, L., Borinin, A., Weller D.M., Thomashow, L.S. and Mavrodi; D. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. lett.* **242**: 249-256.

van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. and van Straalen N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* **11**: 296-310.

van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453–483.

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

van Oeffelen, L., Cornelis, P., Van Delm, W., De Ridder, F., De Moor, B. and Moreau, Y., 2008. Detecting cis-regulatory binding sites for cooperatively binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **36**: 46-68.

van Rij, E.T., Girard, G., Lugtenberg, B.J.J. and Bloemberg, G.V., 2005. Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391. *Microbiol.* **151**: 2805–2814.

van Wees, S.C., van der Ent, S. and Pieterse, C.M., 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opinion Plant Biol.* **11**:443–448.

Vansuyt, G., Souche, G., Straczek, A., Briat, J.F. and Jaillard, B., 2003. Flux of protons released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants: effect of phosphorus and iron nutrition. *Plant Phys. Biochem.* **41**: 27-33.

Vela, A.I., Gutierrez, M.C., Falsen, E., Rollan, E., Simarro, I., Garcia, P., Dominguez, L., Ventosa, A. and Fernandez-Garayzabal, J.F., 2006. *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2671–2676.

Verhagen, B.W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., van Loon, L.C. and Pieterse, C.M., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**:895–908.

Verma, M., Satinder, K. Brar, R.D., Tyagi, R.Y., Surampalli, J. and Valero R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* **37**: 1–20.

Veselova, A., Klein, S.H., Bass, I.A., Lipasova, V.A., Metlitskaya, A.Z., Ovadis, M.I., Chernin, L.S. and Khmel, I.A., 2008. Quorum Sensing Systems of Regulation, Synthesis of Phenazine Antibiotics, and Antifungal Activity in Rhizospheric Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Rus. J. Genetics*, **44**: 1400–1408.

Veselova, M.A., Klein, Sh., Bass, I.A., Lipasova, V.A., Metlitskaya, A.Z., Ovadis, M.I., Chernin, L.S. and Khmel, I. A., 2008. Quorum Sensing Systems of Regulation, Synthesis of Phenazine Antibiotics, and Antifungal Activity in Rhizospheric Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Rus. J. Gen.* **44**(12): 1400–1408.

Vessey, K. J., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**: 571–586.

Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K. and Vasumathi, K., 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Bio. Control*, **8**: 166–171.

Vincent, M.N., Harrison, L.A., Brackin, J.M., Kovacevich, P.A., Mukerji, P. and Weller, D.M., 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2928–2934.

Visca, P., Ciervo, A., Sanfilippo, V. and Orsi, N., 1993. Iron- regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1995–2001.

Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Versili, D., Orsi, N. and Chiancone, E., 1992. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore–metal complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2886–2893.

Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**: 22–30.

Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J. and Lamont, I.L., 2002. Iron transport and regulation, cell signaling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1177–1190.

Viswanathan, R. and Samiyappan, R., 2001. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went. *Causing red rot disease in sugarcane. Microbiol. Res.* **155**: 309–314.

Vogelstein, B. and Gillespie, D., 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**: 615.

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

Voisard, C., Bull, C.T., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Schnider, U., Défago, G. and Haas, D., 1994. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. In: *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*,. Edited by F. O'Gara, D. Dowling and B. Boesten. Weinheim: VCH, pp. 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.

Wandersman, C. and Delepelaire, P., 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 611–647.

Weinberg, E.D., 1997. The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* **40**(4):578–83.

Weinberg, E.D., 2008. Iron availability and infection. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**: 600–605.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697–703.

Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with Bacteria, *Annu.Rev. Phytopathol.* **26**: 379–407.

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

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden-Gardener, B. B. and Thomashow, L. S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 309–348.

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

Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. and Thomashow L.S., 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol.* **9**: 4–20.

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

Whistler, C.A., Stockwell, V.O. and Loper, J.E., 2000. Lon protease influences antibiotic production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2718–2725.

Wilderman, P.J, Sowa, N.A, FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A. and Vasil, M.L. 2004. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 9792–9797.

Willems, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Jantzen, E., Hose, B., Gillis, M., Kersters, K., Auling, G. and De Ley, J., 1989. *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov.(formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 319–333.

Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J., 1990. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 384–398.

Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K. and de Ley, J., 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 107–119.

Winkelmann, G., 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* **30**:691–696.

Wissing, F., 1974. Cyanide formation from oxidation of glycine by a *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **117**: 1289-1294

Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H. and Fox, G.E., 1984. The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 315–326.

Wood, D.W. and Pierson, L.S.III., 1996. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene*, **168**: 49–53.

Wood, D.W., Gong, F.C., Daykin, M.M., Williams, P. and Pierson, L.S.III., 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.

Xie, H., Pasternak, J.J. and Glick, B.R., 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that over produce indoleacetic acid. *Curr. Microbiol.* **32**: 67–71.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M., 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immun.* **36**: 1251–1275.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y., 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov., Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immun.* **39**: 897–904.

Yalpani, N. and Raskin, I., 1993. Salicylic acid: a systemic signal in induced plant disease resistance. *Trends Microbiol.* **1**: 88–92.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S., 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenetic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiol.* **146**: 2385–2394.

Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J., 2009. Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*, **38** (5): 1447-59.

Yigal, E. and Ralph, B., 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.* **75**(9): 1035-1059.

Young, J.M., Takikawa Y., Gardan L. and Stead D.E., 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 67–105.

Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D. and Storz, G., 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* **181**: 4639-4643.

ANNEXES

Annexe I. Principaux Milieux de culture (Composants g/ litre)

King B : (King et al., 1954) pH 7,2 Agar purifié 12,0 Peptone bactériologique 20,0 Glycérol 10,0 K ₂ HPO ₄ (anhydre) 1,5 MgSO ₄ . 7H ₂ O 1,5	PDA (Potato Dextrose Agar) : pH 7 Saccharose 20,0 Agar 15,0 Pommes de terre 200
Milieu LB : pH 7 Tryprone 10 Extrait de levure 5 NaCl 5 Agar 15	NBY à 2% de glucose : Bouillon nutritif (Difco) 8 Extrait de levure (Difco) 2 K ₂ HPO ₄ 2 KH ₂ PO ₄ 0.5 Glucose 2 MgSO ₄ -7H ₂ O 0.25
Milieu de Pikovskaia (solubilisation des phosphates) pH7 Sucrose 10 Ca ₃ (PO ₄) ₂ 5 MgCl ₂ .6 H ₂ O 5 MgSO ₄ . 7 H ₂ O 0,25 KCl 0,2 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 BPB 0,25	Milieu au succinate (MS) K ₂ HPO ₄ 6 KH ₂ PO ₄ 3 MgSO ₄ -7H ₂ O 0.2 (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 Acide succinique 4
Milieu pour production de levane pH7,2 Extrait de levure (Difco) 2 Bactopeptone 5 NaCl 5 Sucrose 20 Agar 15	Milieu au CAA CAA 5 K ₂ HPO ₄ 0,9 MgSO ₄ -7H ₂ O 0,25
Milieu pour réduction des nitrates Bouillon nutritif à 0,2 % de KNO ₃	Milieu pour production d'HCN TSA ou TSB à 4,4 g de glycine
Milieu pour production d'AIA LB à 5 mM de tryptophane et 0,06% de SDS	Milieu pour les enzymes protéolytiques CAA 5 Extrait de levure 2,5 glucose 1 Agar 15 Solution de lait écrémé 100ml(7%)

Annexe II.A. Aligement de l'ADNr 16 S de l'isolat P₂ avec *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* DSM 6698 (Genbank accession number NR_042939.1).

```
Query 2
TAAGGAGGTGATCCAGGCGCAGGTTCCCCTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGT 61
      |||||||||||||||
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1530
TAAGGAGGTGATCCAGCCGCAGGTTCCCCTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGT 1471

Query 62
CATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAAC 121
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1470
CATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAAC 1411

Query 122
CCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACAT 181
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1410
CCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACAT 1351

Query 182
TCTGATTGCGGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCG 241
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1350
TCTGATTGCGGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCG 1291

Query 242
GACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGA 301
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1290
GACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGA 1231

Query 302
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCA 361
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1230
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCA 1171

Query 362
CCTTCCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACCATGACGTGCTGGTAAC 421
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1170
CCTTCCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACCATGACGTGCTGGTAAC 1111

Query 422
TAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC 481
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1110
TAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC 1051
```

Query	482	
GACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTT	541	
Sbjct	1050	
GACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTT	991	
Query	542	
CATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCC	601	
Sbjct	990	
CATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCC	931	
Query	602	
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTAGATTTTAAACCTTGC GGCCGTACTCCCCA	661	
Sbjct	930	
ACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTAGATTTTAAACCTTGC GGCCGTACTCCCCA	871	
Query	662	
GGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTT	721	
Sbjct	870	
GGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTT	811	
Query	722	
GACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCG	781	
Sbjct	810	
GACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCG	751	
Query	782	
CACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTATAT	841	
Sbjct	750	
CACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTATAT	691	
Query	842	
CTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTCG-CC	900	
Sbjct	690	
CTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTCCTCC	631	
Query	901	
AGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACGAACCAC	960	
Sbjct	630	
AGTTTTAGATGCAGTTTCCAGGATGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACGAACCAC	571	
Query	961	
CTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACGCGG	1020	

Sbjct 570
CTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGG 511

Query 1021
CTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTCGGTAACGTCAAATACTCACGTATT 1080

|||||
Sbjct 510
CTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTCGGTAACGTCAAATACTCACGTATT 451

Query 1081
AGGTAAGTACCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACA 1140

|||||
Sbjct 450
AGGTAAGTACCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACA 391

Query 1141
CGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG 1200

|||||
Sbjct 390
CGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG 331

Query 1201
TAGGAGTCTGGACCGTGTATCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACG 1260
|||||

|||||
Sbjct 330
TAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACG 271

Query 1261
GATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTG 1320

|||||
Sbjct 270
GATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTG 211

Query 1321
ATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTC 1380

|||||
Sbjct 210
ATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTC 151

Query 1381
CGTTTCCGAACGTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGC 1440

|||||
Sbjct 150
CGTTTCCGAACGTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGC 91

Query 1441
CGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTTCTCTCTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGC 1500

|||||
Sbjct 90
CGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTTCTCTCTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGC 31

Query 1501 CAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAATC 1530
|||||

Sbjct 30 CAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAATC 1

Annexe II.B. Alignement de l'ADNr 16 S de l'isolat P₁₀ avec *Pseudomonas putida*
souche CM5002 (Genbank accession number EF529517.1)

```

Query 1
GGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGT 60

|||||
Sbjct 1452
GGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGT 1393

Query 61
GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACGCGACATTCTGATTTCGCGATTA 120

|||||
Sbjct 1392
GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACGCGACATTCTGATTTCGCGATTA 1333

Query 121
CTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTT 180

|||||
Sbjct 1332
CTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTT 1273

Query 181
TATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTG 240

|||||
Sbjct 1272
TATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTG 1213

Query 241
TGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTG 300

|||||
Sbjct 1212
TGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTG 1153

Query 301
TCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTG 360
          |||||
Sbjct 1152
TCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTG 1093

Query 361
CGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA 420

|||||
Sbjct 1092
CGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA 1033

Query 421
CCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGG 480

|||||
Sbjct 1032
CCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGG 973

```

Query 481
CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC 540

|||||
Sbjct 972
CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC 913

Query 541
CCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAAT 600

|||||
Sbjct 912
CCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAAT 853

Query 601
GCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGC 660

|||||
Sbjct 852
GCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGC 793

Query 661
GTGGACTACCAGGGTATATAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGT 720

|||||
Sbjct 792
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGT 733

Query 721
ATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTTCCTTCTATATCTAAGCATTTACCG 780

|||||
Sbjct 732
ATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCG 673

Query 781
CTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTT 840

|||||
Sbjct 672
CTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTT 613

Query 841
CCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACG 900

|||||
Sbjct 612
CCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACG 553

Query 901
CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCAACCCTCTGTATTACGCGGCTGCTGGCACAGAGTT 960

|||||
Sbjct 552
CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCAACCCTCTGTATTACGCGGCTGCTGGCACAGAGTT 493

Query 961
AGCCGGTGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAAATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCC 1020

|||||
Sbjct 492
AGCCGGTGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAAATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCC 433

Query 1021
TCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGAT 1080

|||||
Sbjct 432
TCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGAT 373

Query 1081
CAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGT 1140

|||||
Sbjct 372
CAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGT 313

Query 1141
GTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTG 1200

|||||
Sbjct 312
GTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTG 253

Query 1201
AGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGA 1260

|||||
Sbjct 252
AGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGA 193

Query 1261
AGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTGAAACGTTGT 1320

|||||
Sbjct 192
AGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTGAAACGTTGT 133

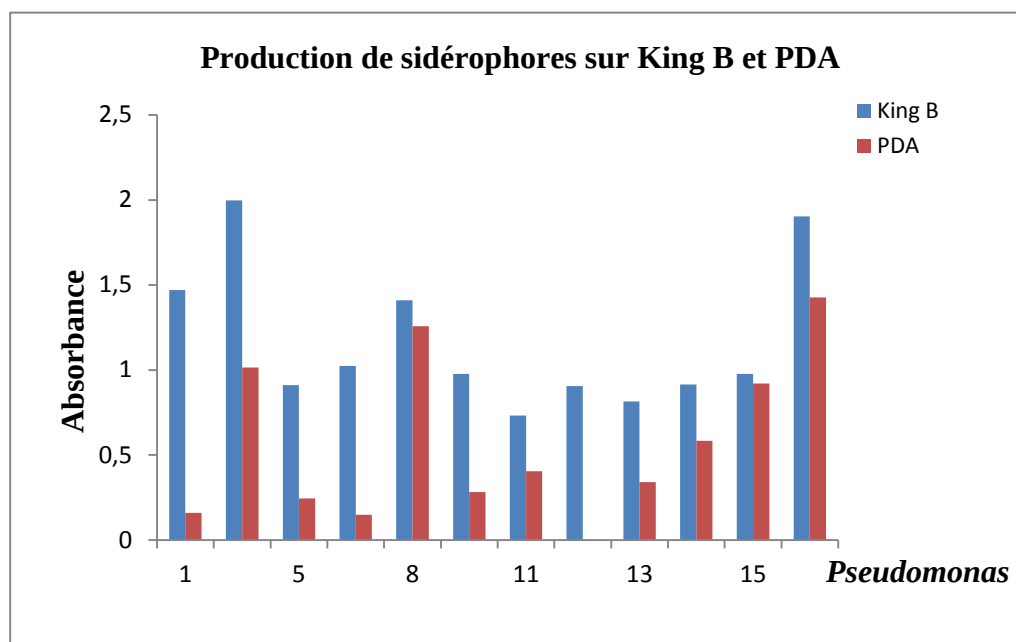
Query 1321
CCCCACTACCAGGCAGATTTCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTGAATCCAGGAGC 1380

|||||
Sbjct 132
CCCCACTACCAGGCAGATTTCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTGAATCCAGGAGC 73

Query 1381 1433 AAGCTCCTCTCATCCGCTCGACTTGATGTGTTATGCCTGACGCCATCGTTCA

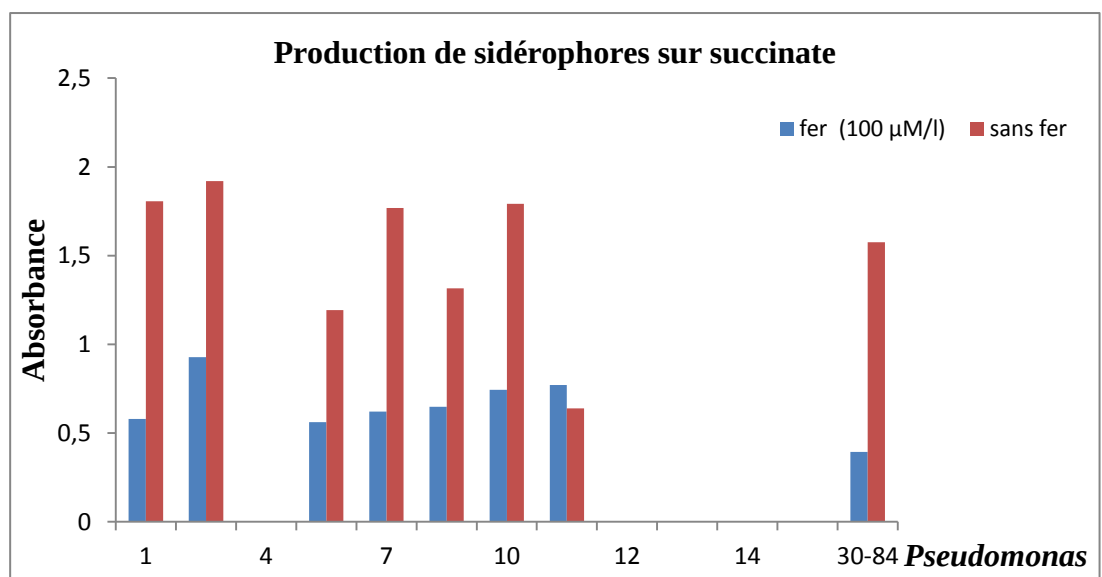
Sbjct 72 AAGCTCCTTTCATCCGCTCGACTTGATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCA 20

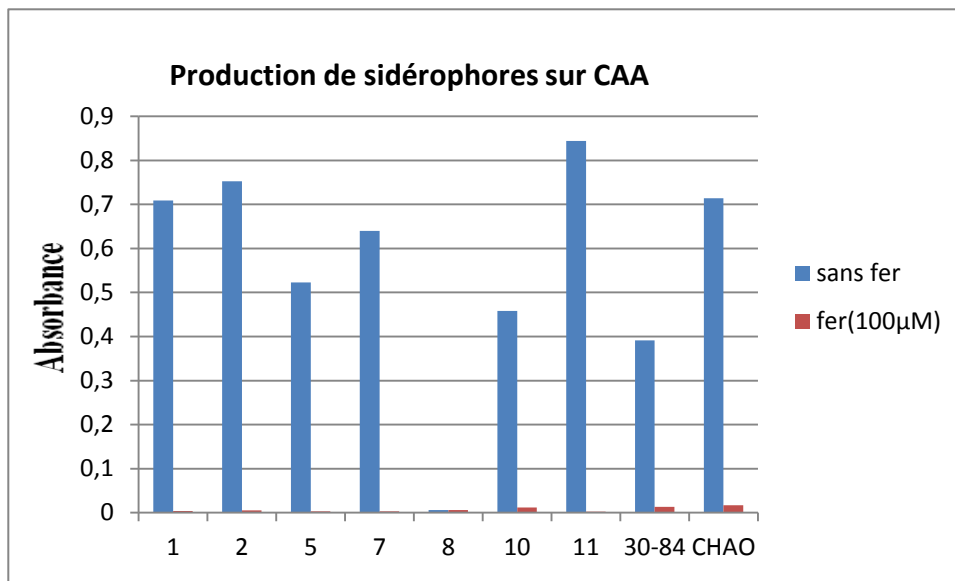
Annexe III. A.



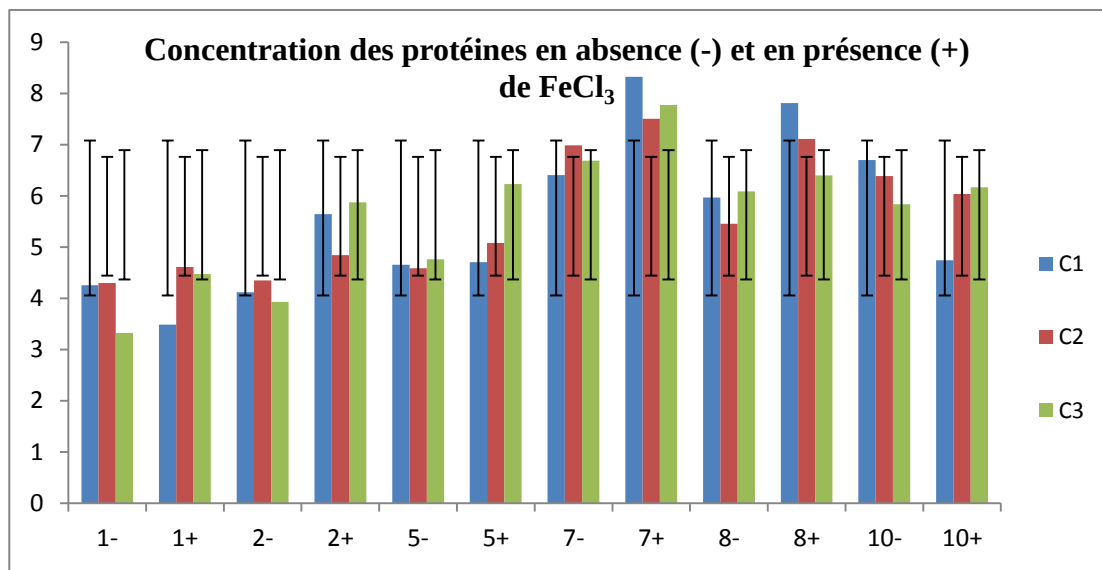
Annexe III. B.

1





Annexe III. C.

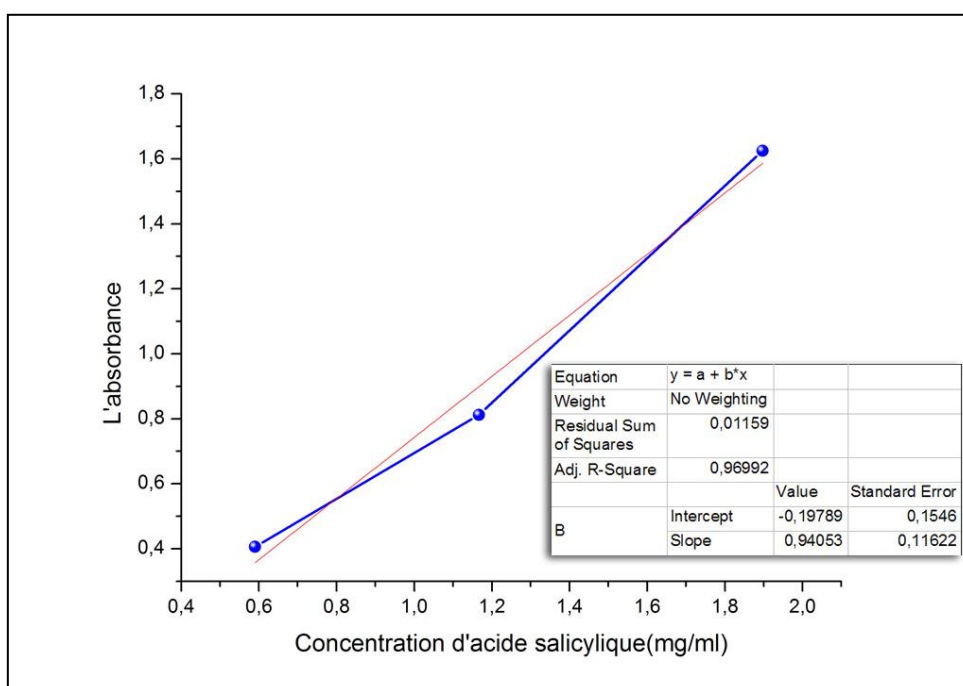


Annexe III. D.

1- Concentration d'acide salicylique en mg/ml.

Concentration d'acide salicylique (mg/ml)	Absorbance	Concentration d'acide salicylique (mg/ml)
1,625	1,897	
0,812	1,167	
0,406	0,590	
	0,511	0.7537133
	0,394	0.6293154
	0,011	0.2220982
	0,678	0.9312727
	0,381	0.6154934
	0,066	0.2805758
	0,667	0.9195772
	1,07	1.348059
	0,754	1.012078
	0,190	0.4124164

2. Détermination graphique de la concentration d'acide salicylique.

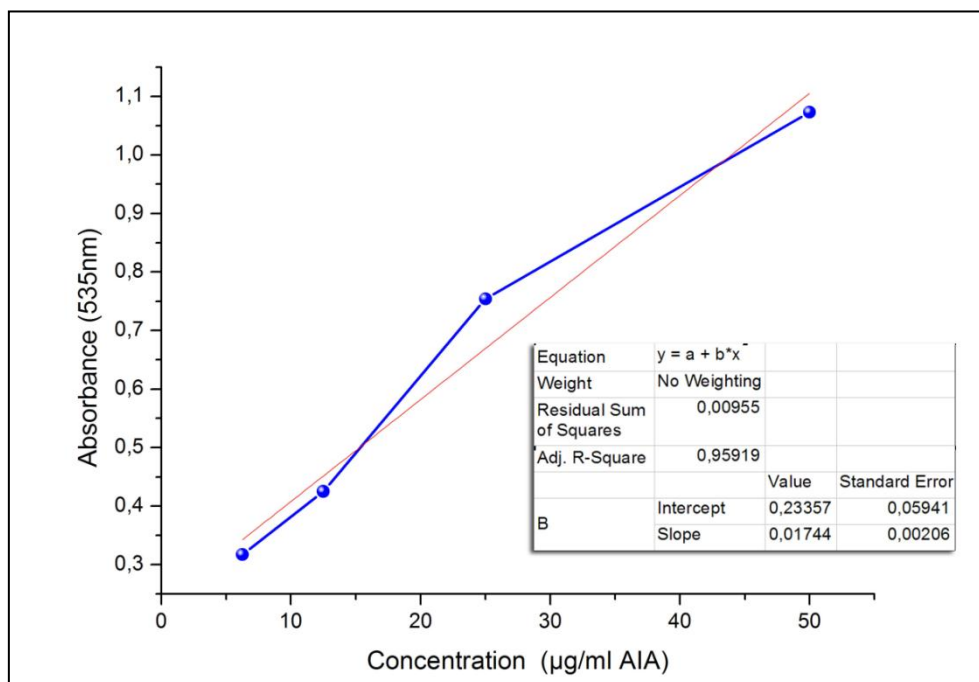


Annexe III. E.

1. Concentration d'AIA en µg/ml.

Isolats	Concentration (µg/ml AIA)	Absorbance (535nm)	Absorbance (535nm) sans TRP	Absorbance (535nm) avec TRP
	6,25	0,317	9.337328	8.632052
	12,5	0,425	3.110264	5.661869
	25	0,754	7.106823	8.740997
	50	1,073	6.871732	4.165309
PS2			1,862	1,739
PS4			0,776	1,221
PS11			1,473	1,758
PS14			1,432	0,960

2. Détermination graphique de la concentration d'AIA (µg/ml)

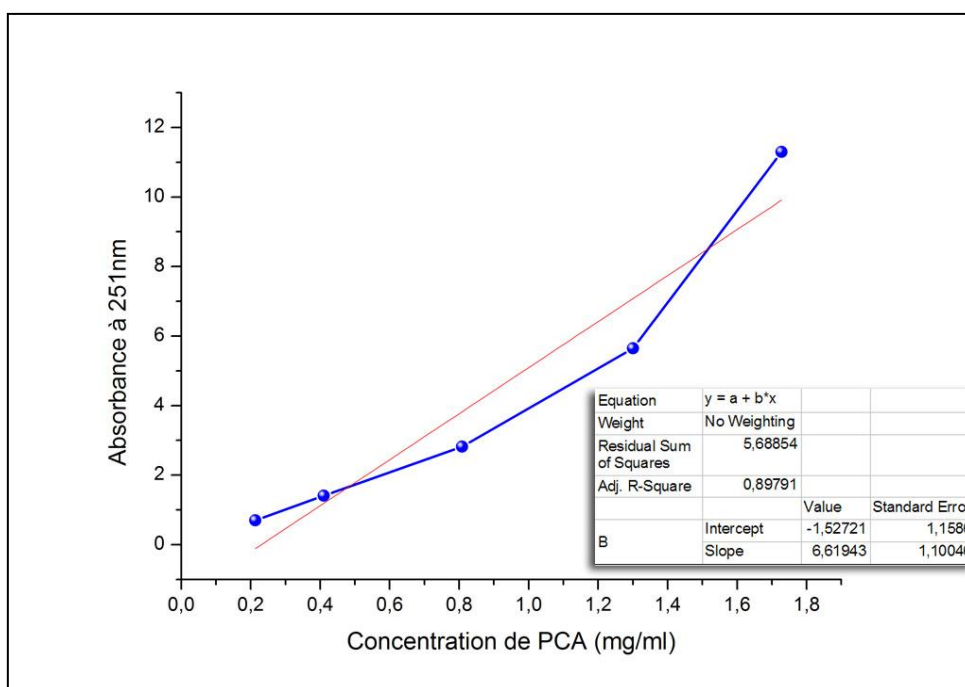


Annexe III. F.

1. Concentration de PCA en mg/ml.

Concentration de PCA standard (mg/ml)	Absorbance à 251nm	Absorbance à 364nm	251	Concentration de PCA de P ₂ (mg/ml)	364	Concentration de PCA de P ₂ (mg/ml)
11,3	1,728	0,538	1,470	0.4527898	0,755	2.8683951-2
5,65	1,3	0,282	0,859	0.3604857	0,173	6.8036187-4
2,82	0,808	0,168	1,524	0.3098771	0,371	1.0207356-2
1,41	0,410	0,100				
0,7	0,213	0,003				

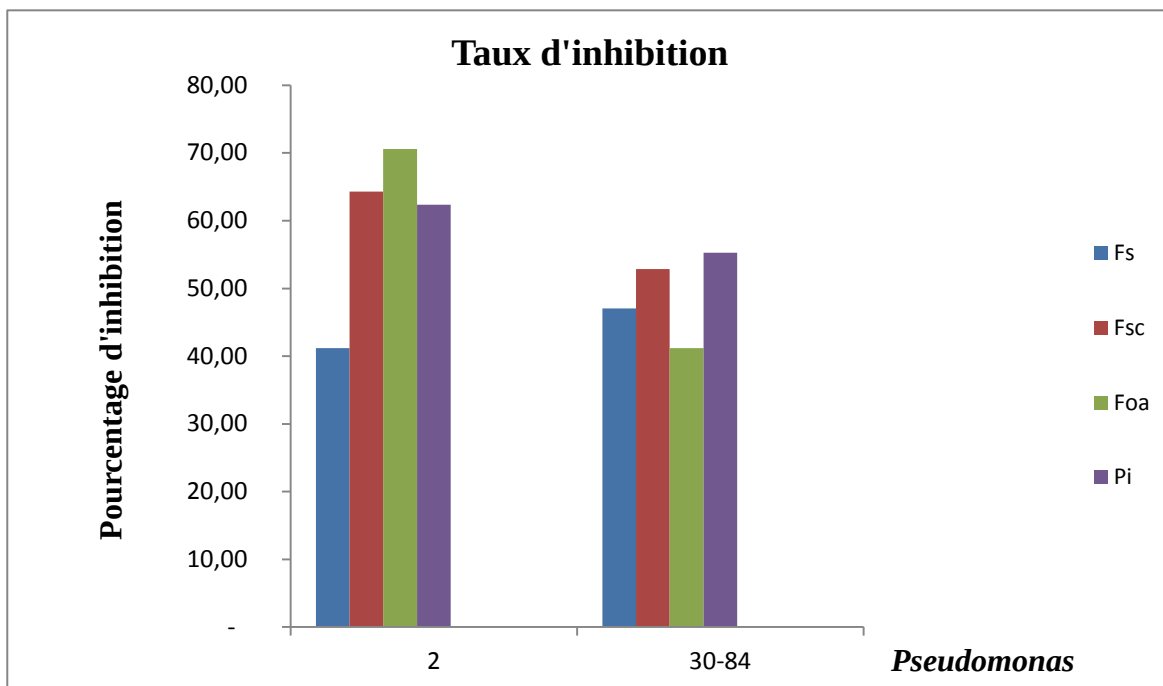
2. Détermination graphique de la concentration de PCA (mg/ml)



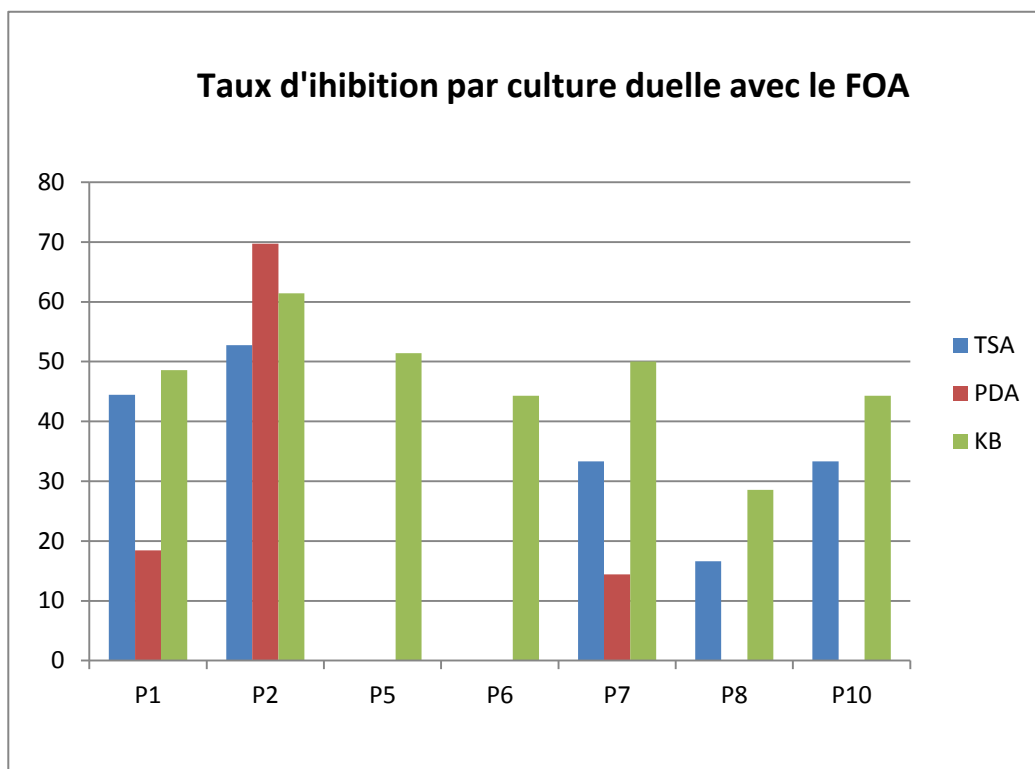
Annexe IV. A.

Taux d'inhibition fongique par confrontation

1

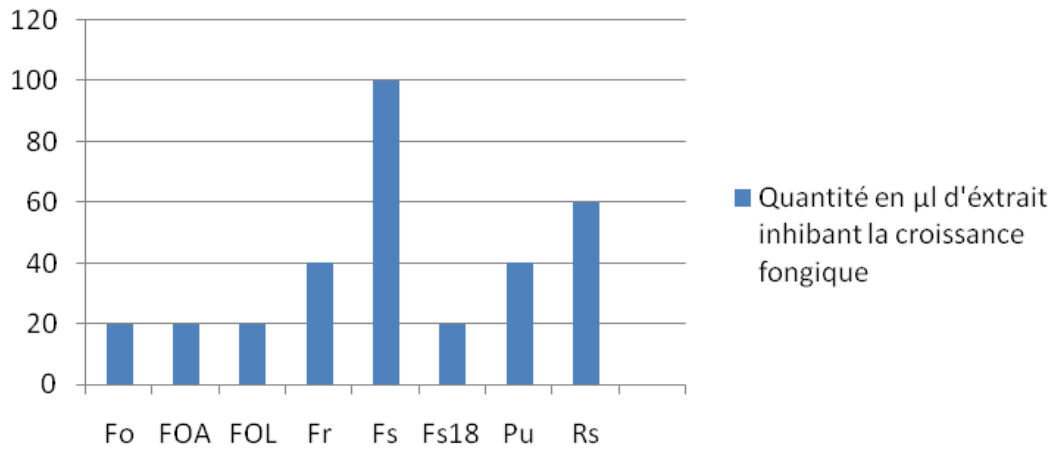


2



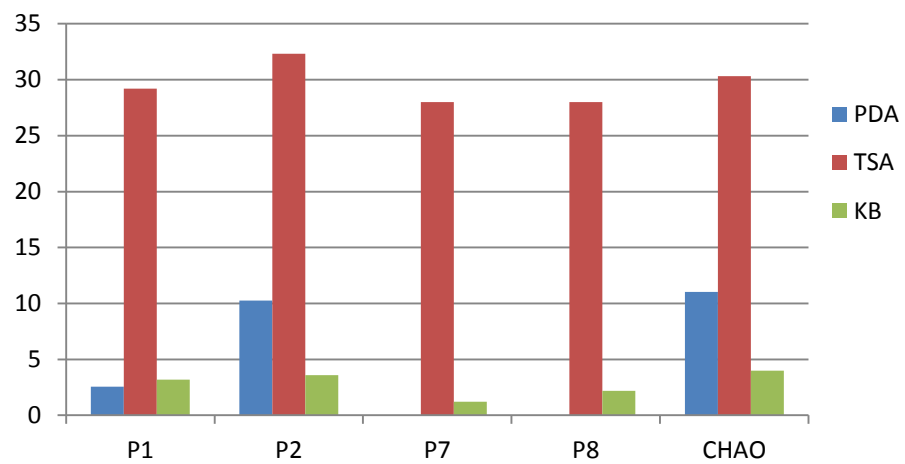
3

Quantité d'extrait (µl) inhibant la croissance fongique



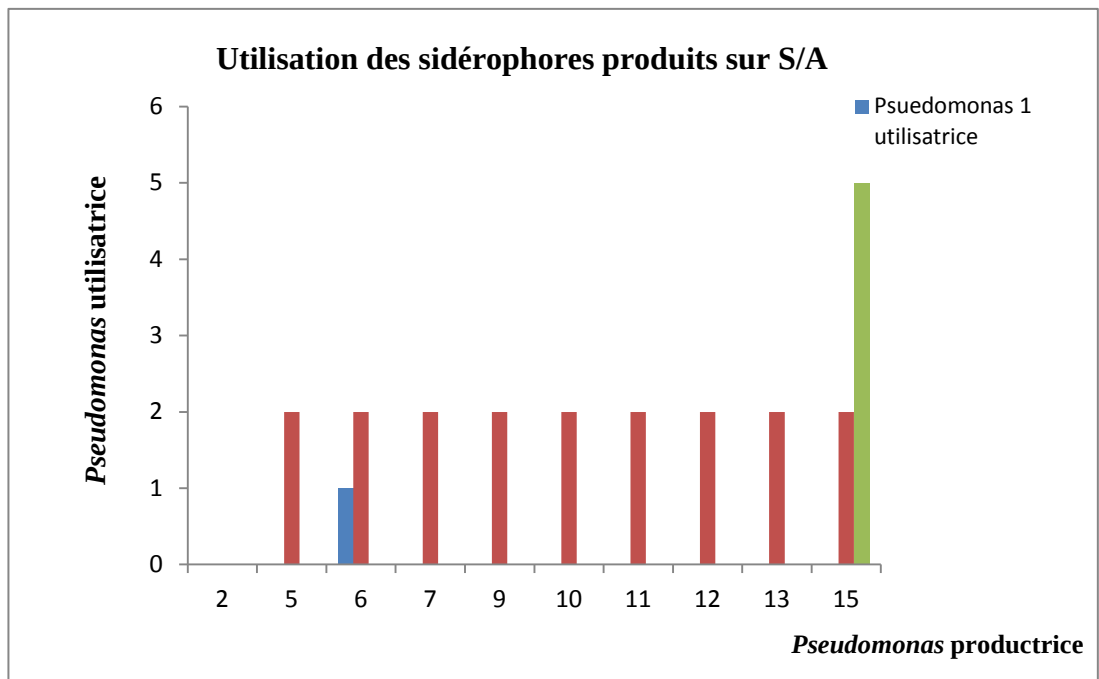
4

Antagonisme par production d'HCN

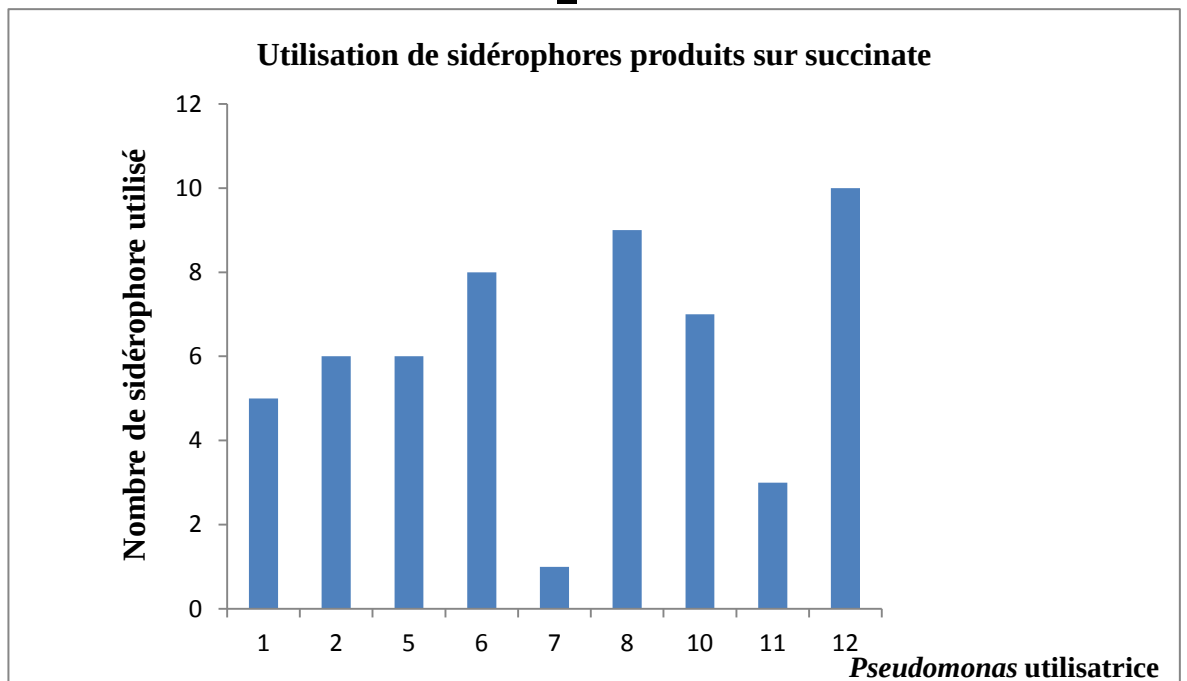


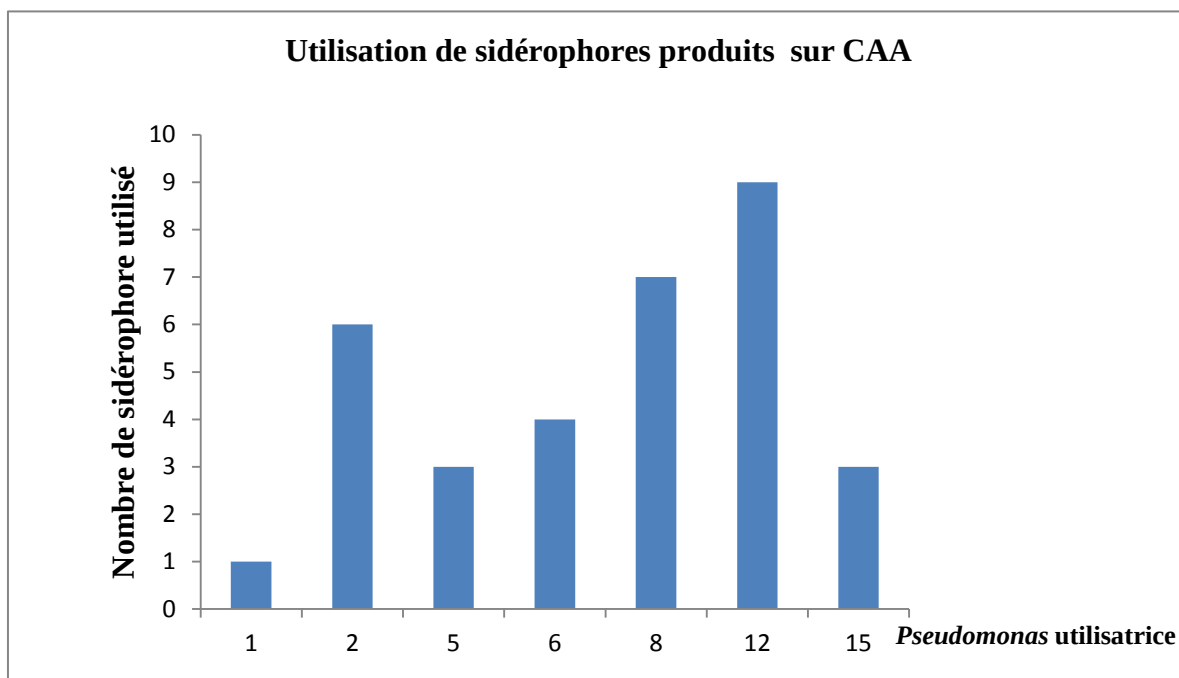
Annexe IV. B.

1



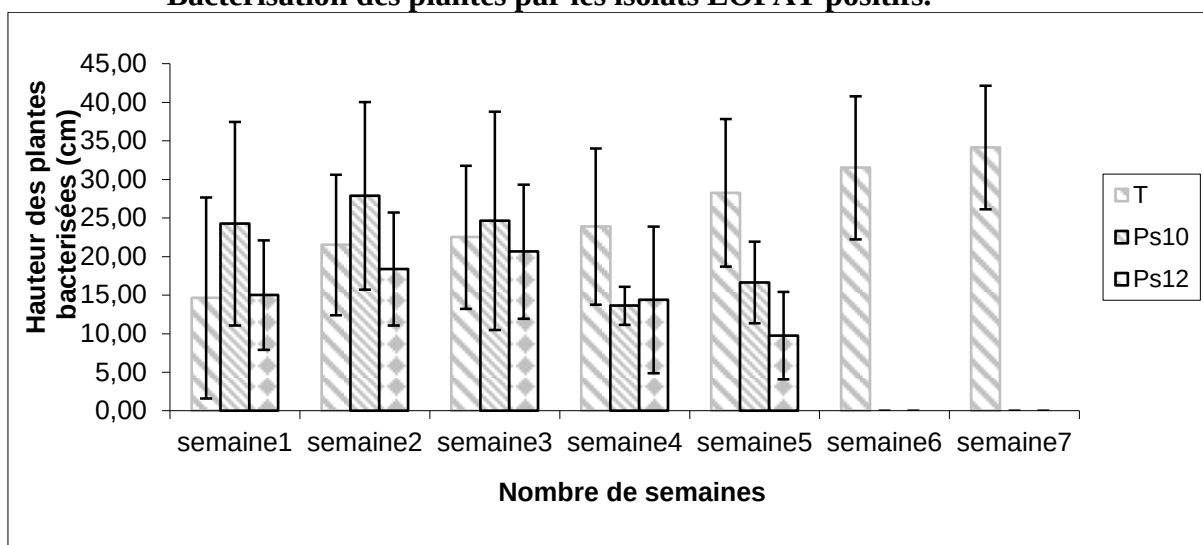
2





Annexe V.

Bactérisation des plantes par les isolats LOPAT positifs.



Annexe VI.

Résistance des *Pseudomonas* spp. fluorescents du site Dirou aux antibiotiques

Antibiotiques	Nombre d'isolats		
	R	I	S
Ampicillin (10mg/ml)	14		
Cephalosporin (1mg/ml)	13	1	
Oxacillin (10mg/ml)	14		
Kanamycin (5mg/ml)	14		
Streptomycin (100µg/ml)	13	1	
Chloramphenicol (1mg/ml)		1	13
Tetracycline (50µg/ml)		2	12
Bactrim (500µg/ml)	3	6	5
Ciprofloxacin*(100µg/ml)	6		3

*: non déterminé pour tous les isolats. R: résistant. I: intermédiaire. S: sensible.