

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE Présentée par

M^{le} LARADJ ZAZOU Khalida

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Moléculaire et Protéomies

Thème

**Isolement et caractérisation des rhizobactéries
promotrices de la croissance des plantes capables de
lutter contre le *Fusarium***

Soutenu le :22/05/2017

Devant le Jury composé de :

Président :

Mr. BENALI Mohamed (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Examineurs :

Mr. BELABID Lakhdar (Professeur, Université de Mascara).

M^{me}. HARIR Noria (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Directeur de thèse :

Mr. ABBOUNI Bouziane (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

Ce travail, qui s'intéresse à l'étude des petites créatures invisibles qui protègent les plus grosses, ne s'est pas fait tout seul et quelques personnes ont contribué de près ou de loin à cette étude. Je souhaiterais donc débiter ce manuscrit en les remerciant.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon encadreur Pr. ABBOUNI Bouziane pour avoir dirigé ce travail et surtout pour sa grande patience, sa confiance et ses précieux et inestimables conseils.

Je remercie également le Pr. Slim TOUNSI, directeur de laboratoire d'amélioration et de protection des plantes au centre de biotechnologie de Sfax pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire, qu'il m'avait accordé sa confiance et me donné accès aux ressources nécessaires pour mes recherches, sans lesquelles ces lignes ne seraient probablement pas écrites aujourd'hui. Ainsi, à son personnel du laboratoire pour leur disponibilité et ses précieuses aides.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements au Pr. BENALI Mohammed d'avoir accepté de nous faire l'honneur de présider le jury, pour son abnégation, sa disponibilité ainsi que pour ses qualités humaines.

Je remercie très chaleureusement Pr. BELABID Lakhder et Pr. Noria HARIR pour avoir eu l'amabilité d'examiner ce travail et pour le temps qu'ils vont consacrer, d'une part à la lecture de la thèse et d'autre part, à la soutenance.

I would like to express my big gratitude to Pr. Yalçın Kaya, President of Turkish Plant Breeders Union and the president of International Sunflower Association for his guidance, his generous help and his full support that he offered me during this past 3 years.

Je remercie enfin mes parents, ma famille et mes amis pour leur soutien et leur présence.

RESUME

L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes (Plant Growth Promoting Rhizobactéria, PGPR) en tant que biopesticides est une technologie émergente et écologiquement compatible considérée comme alternative prometteuse aux pesticides de synthèse. L'objectif de ce présent travail est l'isolement d'une large gamme de bactéries rhizosphériques manifestant une activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici* et promotrices de la croissance de cultures de la tomate. Le screening primaire effectué à partir de la rhizosphère de tomate, prélevée dans la région de Mehdia (Tunisie), sur un milieu de culture gélosé a permis l'isolement de vingt deux (22) souches bactériennes. Le screening secondaire des souches isolées à partir de la rhizosphère a permis la sélection de quatre souches bactériennes stimulatrices de la croissance de la culture de la tomate *in vivo*.

L'identification phénotypique, moléculaire des quatre souches bactériennes, sélectionnées stimulatrices de la croissance de la tomate *in vivo* et la caractérisation de leur potentiel PGPR *in vitro* par l'étude de la production de l'acide salicylique, de l'acide indole acétique, la solubilisation du phosphate, la fixation de l'azote atmosphérique et l'activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici* a été effectué. L'amplification du fragment d'ADN codant la région 16S ARN des quatre souches bactériennes, sélectionnées stimulatrices de la croissance de la tomate *in vivo* et leur séquençage ont révélé leur appartenance aux espèces suivantes : MR1 : *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, ME1 : *Pseudomonas putida*, MS3 : *Microbacterium arthrosphaerae* et MR6 : *Rahnella aquatilis*. Par ailleurs, les quatre souches ont manifesté une activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici* *in vivo*.

L'étude de la résistance systémique des cultures de la tomate, traitée par le *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici* et induite par les quatre souches sélectionnées est basée sur la réduction des symptômes de maladie et l'accumulation d'un composé de type phytoalexine dans les tissus des tomates traitées, analysé par (HPLC). L'inoculation des cultures de la tomate avec les quatre souches sélectionnées a montré une excellente résistance de la tomate vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici*, traitées par les deux isolats *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* et *Pseudomonas putida*. A cet effet, les bactéries sélectionnées stimulatrices de la croissance pourront substituer l'utilisation courante des engrais chimiques xénobiotiques et nocifs.

Mots clés: PGPR, biopesticides, tomate, *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici*.

ABSTRACT

The use of beneficial microorganisms (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) as biopesticides is an emerging biotechnology, ecologically compatible and safe to be used as an alternative replacing the use of chemical fertilizers.

The aim of this study is to isolate rhizobacterial strains with an antifungal potential against the *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici* (FORL) and with promoting activity of growth of tomato. The primary screening performed from tomato rhizospheres in Mehdia region in Tunisia allowed to isolate twenty two bacterial strains (22). The secondary screening of bacteria isolated from tomato rhizosphere allowed the selection of 4 bacterial isolates most powerful improving tomato growth *in vivo*. Phenotypical and molecular identification of the 4 bacterial isolates improving tomato growth followed by characterization of some of their PGPR traits *in vitro*: salicylic acid production, indole acetic acid production, phosphate solubilization, nitrogen fixation and antagonistic activity against FORL were performed.

The amplification and sequencing of the fragment DNA coding 16S RNA region of the 4 isolates improving tomato growth was performed and revealed their belonging to the strains: MR1 : *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, ME1 : *Pseudomonas putida*, MS3 : *Microbacterium arthrosphaerae* and MR6 : *Rahnella aquatilis*.

The study of systemic resistance of tomato treated with *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici* and induced by the 4 isolated bacterial strains was done on the basis of disease symptoms reduction and the accumulation of phytoalexin compound in tomato tissues analysed with HPLC. The inoculation of tomato with the most 4 powerful strains showed an excellent resistance induced by the 2 isolates MR1: *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae* and ME1: *Pseudomonas putida*.

Thereby, the use of these bacteria or their elicitor molecules for inducing resistance of plants could be a sustainable alternative of harmful chemical fertilizers.

Key words: PGPR, biopesticides, tomato, *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici*.

المخلص

إن استخدام نوع خاص من البكتيريا المفيدة للنمو النباتي (PGPR: البكتيريا الجذرية المحسنة للنمو النباتي) كلقاح بيولوجي يعتبر تكنولوجيا نامية مناسبة ايكولوجيا و أمنة للاستعمال كبديل عن المواد الكيميائية الضارة على مستوى المحاصيل الزراعية.

يهدف عزل بكتيريا الجذور النباتية المالكة لخاصية المعادة الفطرية ضد *Fusarium oxysporum f. sp. radidis* و *lycopersici* و المالكة أيضا لخاصية تزكية النمو النباتي لنبته الطماطم، تم عزل 22 عينة بكتيرية من مجالات جذرية للطماطم من منطقة المهدية بتونس، و تم اختبار قدرتها على تحسين نمو هته النبته بعد معالجة بذورها بالتركيبات البكتيرية المعزولة و التي أسفرت عن عزل 4 عينات بكتيرية كانت الأكثر فعالية في تحفيز المردودية النباتية.

و قد تم إجراء اختبار تحليل الهويات البكتيرية الظاهري و الجزيئي متبوعا باختبار القدرة التحفيزية للنمو النباتي لهته العينات البكتيرية من خلال اختبار قدراتها على إنتاج جزيئات فعالة خاصة (حمض الساليسيليك، حمض الاندول أسيتيك، القدرة على تحليل الفوسفات، القدرة على تثبيت الأزوت الهوائي وكذا القدرة على المعادة الفطرية على المستوى المخبري). تبعا للتحليل التسلسلي الجزيئي للحمض النووي الريبوزومي S16 تم تحديد الهويات البكتيرية كالتالي:

MR1 : *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*, ME1 : *Pseudomonas putida*,

MR6 : *Rahnella aquatili* و MS3 : *Microbacterium arthrosphaerae*

و على اثر ذلك، تم تحديد القدرة على حماية نبته الطماطم المعالجة بهذه التركيبات البكتيرية ضد الفطر الممرض و قد أظهرت قدرة على حمايتها في ظروف حيوية.

كما تم اختبار قدرة هذه البكتيريا على تفعيل قدرة الحماية الذاتية للطماطم المعالجة بالتركيبات البكتيرية ضد الفطر الممرض عن طريق تحديد قدرتها أولا على إنقاص الأعراض المرضية و ثانيا قدرتها على إنتاج مركب الألكسين النباتي في أنسجة الطماطم عن طريق تحليل بيوكيميائي، و قد أثبتت هذه البكتيريا قدرتها على حماية الطماطم عن طريق تفعيل الحماية الذاتية و لكن بنسب متفاوتة تبعا لكل عنصر بكتيري حيث لوحظت حماية كلية ضد الفطر الممرض عند

النباتات المعالجة بالتركيبات البكتيرية التابعة ل *Pseudomonas putida* و *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* و عليه، فإن استعمال هذه التركيبات البكتيرية بالإضافة إلى جزيئاتها المحفزة للحماية الذاتية للنباتات يعتبر البديل الأمثل عن استعمال اللقاحات الكيميائية الضارة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الجذرية المحسنة للنمو النباتي، لقاح بيولوجي، الطماطم،

Fusarium oxysporum f. sp. radidis lycopersici

Table des Matières

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Partie I. Etude bibliographique

Chapitre 1. Interactions plantes - microorganismes 5

1.1 Interactions microorganismes/plantes dans la rhizosphère 5

1.1.1 Plant Growth-Promoting Fungi 6

1.1.2 Les PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) et les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) 7

1.2 Différents types d'interactions plantes microorganismes 7

1.2.1 Interaction non-hôte 7

1.3 Activités microbienne et la diversité fonctionnelle dans la rhizosphère 7

1.3.1 Méthodes pour étudier l'activité et la diversité fonctionnelle dans la rhizosphère..... 7

Chapitre 2. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) 9

2.1 Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère 9

2.1.1 Rhizobia..... 9

2.1.2 PGPR diazotrophes 10

2.1.3 *Bacillus* 11

2.1.4 *Pseudomonas* 11

2.2 Compétence rhizosphérique et la colonisation des racines par les PGPR.... 11

2.3 Mécanismes impliqués dans l'activité des PGPR 12

2.3.1 Contribution des rhizobactéries à la nutrition des plantes 12

2.3.2 Fixation biologique de l'azote atmosphérique 12

2.3.3 Solubilisation du phosphate 12

2.3.4 Production des métabolites stimulant la croissance des plantes ...13

2.3.4.1 Production des phytohormones 13

2.3.4.2 Régulation de taux de l'éthylène 13

2.3.5 Contrôle des microorganismes phytopathogènes 14

Chapitre 3. Maladies de tomate : Pathologie fusarienne 15

3.1 La culture de tomate en Algérie.....15

3.2. Pathologie et ravageurs de tomate.....	16
3.2.1 Pathologies fongiques.....	16
3.2.2 Pathologie bactériennes.....	16
3.3 <i>Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici</i> : biologie et pathogénicité de tomate	17
3.3.1 Généralités.....	17
3.3.2 <i>Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici</i>	18
3.3.2.1 Biologie et taxonomie	18
3.3.2.2 Isolement	18
3.3.2.3 Identification	19
3.3.3 Infection de tomate par <i>Fusarium oxysporum f.sp radicis</i> <i>lycopercisi</i>	20

Chapitre 4. Lutte biologique : biopesticides et défences induites par les PGPR ..21

4.1 Les biopesticides microbiens	21
4.2 Défenses induites et la résistance systémique associée aux PGPR.....	22
4.2.1 Reconnaissance des PGPR.....	22
4.2.2 Signalisation	22
4.2.3 Induction ou non de gènes codants des protéines PR	23
4.2.4 Les résistances systémiques	24
4.2.4.1 La résistance systémique acquise.....	24
4.2.4.2 La résistance systémique induite.....	25

Partie II. Etude Expérimentale

Chapitre 5. Matériel et méthodes 30

5.1 Objectif.....	30
5.2 Matériels Biologiques	30
5.2.1 Echantillons végétaux	30
5.2.2 Microorganismes utilisés.....	30
5.3 Stratégie d'isolement	31
5.4 Isolement des souches bactériens	31
5.4.1 Isolement à partir du sol rhizosphérique.....	31
5.4.2 Isolement des bactéries de la surface racinaires	32
5.4.3 Isolement des bactéries endophytes	32
5.5 Expérience de la promotion de la croissance de tomate <i>in vivo</i>	32
5.5.1 Traitement et semis des graines	32
5.5.2 Arrosage et rappel bactérien	33
5.5.3 Récupération des données numérique de croissance	33
5.6 Identification des souches sélectionnées promotrices de la croissance des plantes	33
5.6.1 Identification morphologique.....	33
5.6.2 Identification moléculaire	34

5.7	Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des traits PGPR isolés <i>in vitro</i>	36
5.7.1	Production de l'acide salicylique	36
5.7.2	Fixation de l'azote atmosphérique	37
5.7.3	Test de solubilisation de phosphate	37
5.7.4	Production des auxines (acide indole acétique).....	38
5.8	Mise en évidence de l'effet antagoniste des souches PGPR isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate contre le <i>Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici</i>	38
5.8.1	Mise en évidence de l'effet antagoniste des souches isolées et sélectionnées <i>in vitro</i>	39
5.8.2	Mise en évidence de l'activité protectrices des souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici in vivo</i>	39
5.8.2.1	Préparation et traitement des graines de tomate ...	39
5.8.2.2	Préparation de la suspension fongique et infescion des graines par l'agent phythogène	40
5.8.2.3	Semis des graines traitées	40
5.8.2.4	Récupération des paramètres de croissance	40
5.9	Expérience d'induction de la résistance systémique chez les plants de tomate <i>in vivo</i> par les souches sélectionnées promotrices de la croissance.....	40
5.9.1	Inoculation et semis des graines	41
5.9.2	Infection des plants de tomate par le <i>Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici</i>	41
5.9.3	Evaluation de la maladie	42
5.9.4	Récupération du matériel végétal pour analyse HPLC	42
5.9.5	Extraction et dosage des phytoalexines par HPLC	42
5.9.5.1	Préparation de l'échantillon des phytoalexines.....	42
5.9.5.2	Analyse des extraits méthanoliques.....	43
Chapitre 6.	Résultats	45
6.1	Screening des rhizobactéries à traits PGPR.....	45
6.2	Evaluation du potentiel de promotion de croissance des plants de tomate <i>in vivo</i> par les isolats bactériens sélectionnés.....	46
6.3	Sélection et identification moléculaire des souches sélectionnées promotrices de la croissance de tomate.....	50
6.3.1	Sélection des souches promotrices de la croissance	50
6.3.2	Le séquençage de l'ADNr 16S et l'identification génétique des souches isolées promotrices de la croissance de tomate	50
6.3.2.1	Identification génétique des souches sélectionnées promotrices de la croissance de tomate	50
6.3.2.2	Analyse et construction de l'arbre phylogénétique.....	54

6.4 Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance <i>in vitro</i> des traits PGPR sélectionnés	56
6.4.1 Production de l'acide salicylique	56
6.4.2 Fixation de l'azote atmosphérique	57
6.4.3 Test de solubilisation du phosphate	57
6.4.4 Production de l'acide indole acétique	58
6.5 Activité antagoniste des souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici</i>	58
6.5.1 Mise en évidence de l'activité antifongique <i>in vitro</i>	58
6.5.2 Mise en évidence t de l'effet protecteur <i>in vivo</i> des souches isolées sélectionnées promotrices de la croissance des plantes vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici</i>	59
6.6 Expérience d'induction de résistance systémique chez les plants de tomate <i>in vivo</i> par les isolats sélectionnés promoteurs de la croissance de tomate.....	62
6.6.1 Evaluation de l'induction de la résistance chez la tomate	62
6.6.2 Caractérisation du mécanisme de la résistance induite chez la tomate par les bactéries isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate	64
Discussion générale	68
Conclusion	76
Références bibliographique	77
Annexes	91

Liste des Tableaux

- Tableau 1** Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlés par les PGPR.
- Tableau 2** Classification de *Fusarium oxysporum f.sp radicislycopersici*.
- Tableau 3** Présentation du programme d'élution des phytoalexines analysés par HPLC.
- Tableau 4** Origine des prélèvements, caractères morphologiques des espèces bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de tomate.
- Tableau 5** Evaluation du degré de flétrissement des plantes inoculées avec les souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) et en présence de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, après 5 et 8 jours d'infection.

Liste des Figures

- Figure 1** Représentation de la boucle de rétrocontrôle décrivant les interactions plantes microorganismes dans la rhizosphère.
- Figure 2** Colonisation racinaire par la souche de *Bacillus subtilis* S499.
- Figure 3** Évolution de la production de la tomate en Algérie 1962-2016.
- Figure 4** Aspect macroscopiques et microscopiques des cultures de *Fusarium oxysporum*.
- Figure 5** Dommages internes et externes causés par *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*, sur des cultures de tomates infectées.
- Figure 6** Présentation des différentes phases du phénomène d'induction de résistance chez les plantes par les rhizobactéries.
- Figure 7** Les résistances systémiques (SAR et ISR) selon **van Loon (2006)**.
- Figure 8** Mise en place de la résistance systémique induite (ISR) par des PGPRs.
- Figure 9** Présentation des sites de prélèvements des échantillons de culture de tomate.
- Figure 10** Courbe d'étalonnage standard de dosage de l'acide salicylique par méthode colorimétrique au chlorure de fer (FeCl₃).
- Figure 11** Courbe d'étalonnage standard du dosage de l'acide indole acétique.
- Figure 12** Evaluation du poids frais des plantes traitées avec les 22 isolats de cultures de tomate.
- Figure 13** Evaluation de la longueur des racines principales des plantes traitées avec les 22 isolats de cultures de tomate.
- Figure 14** Evaluation de la longueur de la tige des plantes traitées avec les 22 isolats de cultures de tomate.
- Figure 15** Evaluation de nombre des feuilles des plantes traitées avec les 22 isolats de cultures de tomate.
- Figure 16** Evaluation des longueurs des feuilles des plantes traitées avec les 22

isolats de cultures de tomate.

- Figure 17** Evaluation des largeurs des feuilles des plantes traitées avec les 22 isolats de cultures de tomate.
- Figure 18** Promotion de la croissance de tomate des souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6), après 24 jours de culture.
- Figure 19** Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate MS3.
- Figure 20** Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate MR6.
- Figure 21** Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate ME1.
- Figure 22** Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate MR1.
- Figure 23** Présentation d'une partie de l'alignement de séquences des 4 souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate (ME1, MR1, MR6 et MS3) sur le logiciel MEGA.
- Figure 24** Arbre phylogénétique présentant la distance évolutive entre les souches sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (ME1, MR1, MR6 et MS3) et d'autres taxons (la barre 0,1 indique la substitution par position de nucléotide).
- Figure 25** Détermination de la concentration de l'acide salicylique ($\mu\text{g/ml}$), par dosage colorimétrique avec FeCl_3 , produite chez les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6).
- Figure 26** Détermination de la concentration de l'acide indole acétique ($\mu\text{g/ml}$), par réactif de Salkowsky, chez les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6).
- Figure 27** L'étude de l'activité antifongique des souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici* (Dual Plate Assay).

- Figure 28** Evaluation de la longueur de la tige de la tomate, inoculée avec les souches, sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6), en présence *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, après 24 jours de culture.
- Figure 29** Evaluation de la longueur des feuilles de la tomate, inoculée avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6), en présence *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, après 24 jours de culture.
- Figure 30** Evaluation de la largeur des feuilles après 24 jours de culture sur la tomate en présence des bactéries testées et le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*.
- Figure 31** Evaluation de la longueur des racines de la tomate, inoculée avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6), en présence *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, après 24 jours de culture.
- Figure 32** Présentation des taux de réduction de la maladie des plantes inoculées avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR1, MS3, ME1 et MR6), infectées avec le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, après 5 et 8 jours d'infection.
- Figure 33** L'étude de l'activité protectrice de la tomate *in vivo* par les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*.
- Figure 34** Extraits méthanolique des plantes de tomate témoins et des plantes traitées par le FORL et les 4 souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate (MS3, MR1, MR6 et ME1).
- Figure 35** Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes témoins par chromatographie.
- Figure 36** Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes traitées avec la souche isolée, sélectionnée promotrice de la croissance MS3 par Chromatographie.

- Figure 37** Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes traitées avec la souche isolée, sélectionnée promotrice de la croissance MR 6 par Chromatographie.
- Figure 38** Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes traitées avec la souche isolée, sélectionnée promotrice de la croissance MR 1 par Chromatographie.
- Figure 39** Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes traitées avec la souche isolée, sélectionnée promotrice de la croissance ME 1 par Chromatographie.

Liste des abréviations

A :	Absorbance
ACC :	Acide-1-aminocyclopropane carboxylique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNr :	ADN recombinant
AFM :	Anti-Fungal Metabolite
AHL :	Acyl Homocerine Lactone
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
DGGE :	PCR-denaturing gradient gel electrophoresis
DO :	Densité Optique
EC :	Enzyme Commission
FORL :	<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici</i>
HCN :	Cyanure d'hydrogène
HR :	Réponse hypersensible
ISR :	Résistance systémique induite
JA :	Acide jasmonique
LPS :	Lipopolisaccharides
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PGPR :	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PR :	Pathogenesis Related
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
SA :	Acide salicylique
SAR :	Résistance systémique acquise
SDN :	Stimulateur de défenses naturelles
UV :	Ultraviolet

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Animaux ravageurs, plantes parasites, micro-organismes pathogènes (bactéries, champignons, mycoplasmes, virus), insectes et nématodes sont responsables de la perte de 20-40% du rendement des cultures (OMS).

Actuellement, les pesticides de synthèse chimique sont largement utilisés dans la lutte contre les ravageurs. Cependant, ces substances ont exercé des conséquences néfastes sur l'environnement par accumulation des résidus et la pollution des sols, le développement des mécanismes de résistance chez les pathogènes et l'apparition d'un déséquilibre écologique est due principalement au large spectre d'action des composés de synthèse (**Kouassi, 2001 ; Thakore, 2006**).

Le développement des biopesticides constitue un sujet d'actualité et fait l'objet de nombreuses recherches récentes car les biopesticides microbiens sont écologiquement plus compatibles que les produits chimiques et ont manifesté une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés.

La culture de la tomate occupe une place prépondérante dans l'économie agricole algérienne et près de 33 000 ha sont consacrés annuellement à sa culture (maraîchère et industrielle), donnant une production moyenne de 11 millions de quintaux et des rendements moyens d'environ 311 Qx/ha, ce rendement reste toujours faible par rapport aux rendements enregistrés dans d'autres pays du bassin méditerranéen (Tunisie, Maroc, Espagne, France, Italie) où les rendements varient entre 350 Qx/ha à 1500 Qx/ha (**FAO, 2008**). De nombreux agents pathogènes, peuvent affecter considérablement les cultures des tomates, dont le *Fusarium oxysporum f.sp radialis lycopersici* qui reste un pathogène potentiel. Dans le but de lutter contre le *F. oxysporum f. sp radialis lycopersici* et afin de palier un certain nombre de contraintes, liées principalement à l'utilisation abusive des pesticides, la lutte biologique constitue une alternative prometteuse. A cet effet, une stratégie de lutte est adoptée par l'immunisation de la plante lors de l'inoculation de certaines bactéries stimulatrices de leur système de défense.

Les microorganismes présents librement dans la rhizosphère peuvent avoir des effets bénéfiques sur la croissance de la plante (**Van der Heiden et al., 2008**), influencent la disponibilité des éléments nutritifs. Les bactéries nommées PGPR (pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria ; **Kloepper et Schorth, 1978**), appartiennent essentiellement

aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium*, représentent environ 2-5% des bactéries rhizosphérique (**Ahmad et al., 2008**).

Les bactéries PGPR sont capables d'induire une résistance chez les plantes contre les attaques des pathogènes et développent un mécanisme de protection.

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

1. L'isolement des bactéries à partir de la rhizosphère de plantes de tomate et le criblage des isolats promotrices de la croissance *in vivo*.
2. La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches sélectionnées promotrices de la croissance vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici in vitro* et *in vivo*.
3. L'identification moléculaire des 4 souches sélectionnées promotrices de la croissance par l'amplication de fragment d'ADN codant la région ARN16S.
4. L'évaluation du potentiel d'induction de la résistance systémique des souches isolées, sélectionnées, promotrices de la croissance de tomate et l'exploration des molécules responsables des activités antifongiques, accumulées dans les tissus des plantes, lors du traitement combiné de l'agent phytopathogène *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* et les souches sélectionnées.

PARTIE I.

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre1

Interactions Plantes Microorganismes

1.1. Interactions entre microorganismes et plantes dans la rhizosphère

Dans les écosystèmes naturels et cultivés, diverses interactions s'établissent entre les plantes et les micro-organismes. Les relations entre les plantes et les micro-organismes ont toujours suscité un très grand intérêt. Dans un premier temps, l'homme a exploité les interactions entre les plantes et les micro-organismes pour l'amélioration de leur rendement et l'approfondissement de leurs connaissances **(Compant, 2007)**. Des recherches récentes ont montré qu'au sein d'une population bactérienne, les cellules se communiquent entre elles afin de coordonner certaines activités, ces communications sont les clefs de leurs survie puisque la performance microbienne dépend de la capacité à percevoir et à réagir rapidement aux échanges environnementaux alors que les bactéries ont développé un mécanisme complexe de communication afin de contrôler l'expression de certaines fonctions par un dispositif dépendant de la densité cellulaire appelé le *quorum sensing* **(Ahmed et al., 2008)**.

Le *quorum sensing* confère aux bactéries de nombreux avantages compétitifs par l'amélioration des chances de survie et la colonisation des niches écologiques, et implique l'envahissement de certaines plantes par des bactéries pathogènes telles que *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas syringae* **(Bingle et al., 2008 ; Filloux et al., 2008)**.

Les communications bactériennes par le *quorum sensing* sont basées essentiellement sur la production et la sécrétion des molécules signales dans le milieu des auto-inducteurs, dont leur concentration est proportionnellement liée à la densité de biomasse cellulaire, quand une bactérie détecte la molécule signal à une concentration donnée, la transcription de certains gènes régulée par ce mécanisme est induite ou réprimée. A cet effet, de nombreux processus microbiens sont régulés par le *quorum sensing*, qui engendrant le transfert de l'ADN par la conjugaison, la production des siderophores, la bioluminescence, la formation de biofilms **(Baron et Coombes, 2007 ; Cianciotto, 2005)**.

Des études récentes réalisées ont rapporté sur l'importance de mécanismes de régulation chez les bactéries bénéfiques des plantes telles la promotion de la croissance, la protection contre les bactéries pathogènes et le stress de salinité, avec la libération de certaines molécules telles que l'acyl homoserine lactone (AHL), composé similaire aux

molécules bactériennes. Des études antérieures ont rapporté sur la capacité de ces molécules de stimuler la défense contre les bactéries pathogènes et le blocage des interactions entre les bactéries (**Ahmed *et al.*, 2008**).

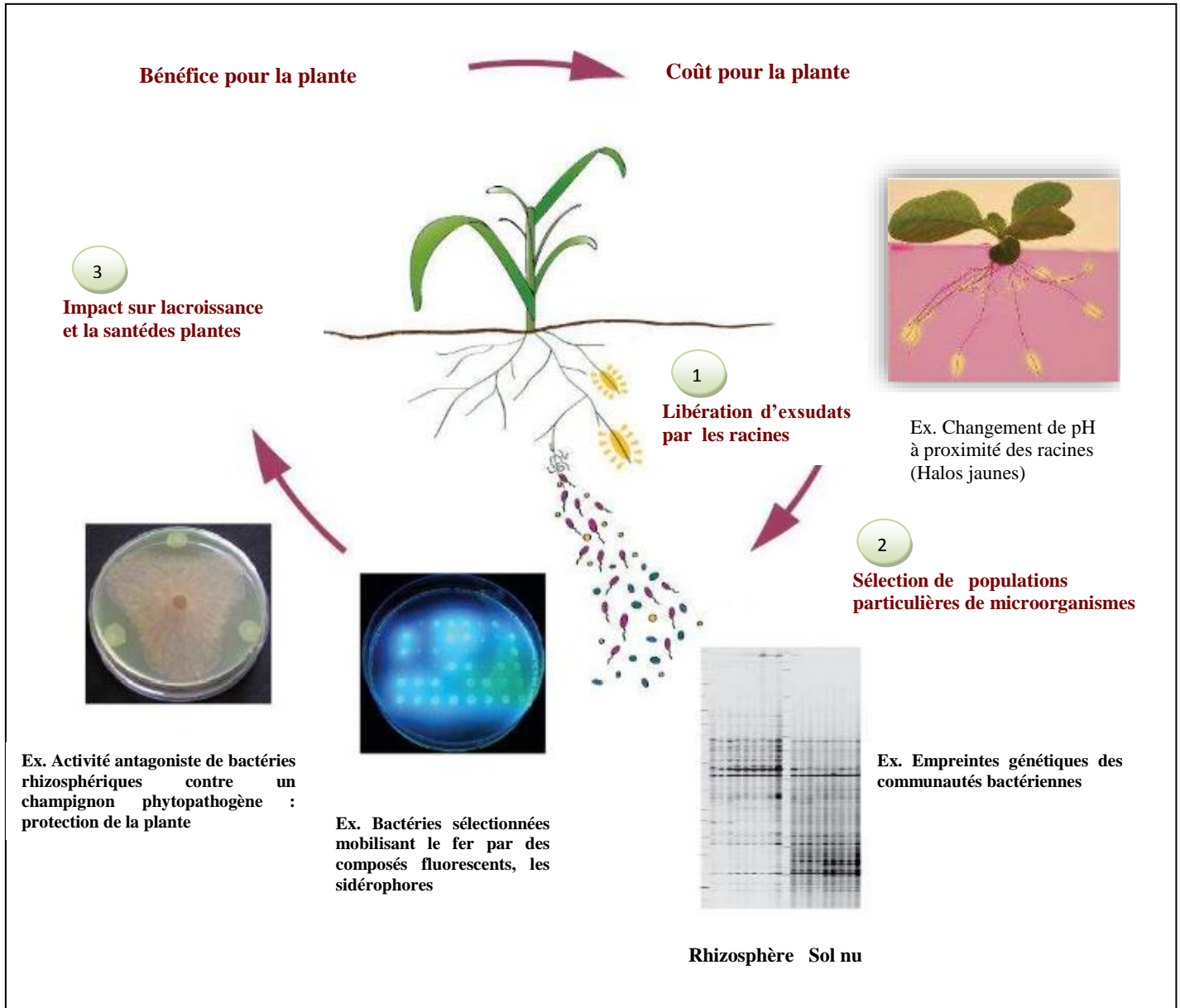


Figure 1. Représentation de la boucle de rétrocontrôle décrivant les interactions entre plantes microorganismes dans la rhizosphère (**Viollet, 2010**).

1.1.1. Plant Growth-Promoting Fungi

Certains champignons stimulent la croissance et la défense de la plante, accompagnée avec une activité antagoniste envers différents phytopathogènes appelés récemment PGPF “ Plant Growth-Promoting Fungi” (**Whipps, 2001**). Les PGPF “ Plant Growth-

Promoting Fungi”, peuvent être des champignons filamenteux voire même des levures également appelées PGPY pour “Plant Growth-Promoting Yeasts”, présents naturellement chez des plantes herbacées que chez les plantes ligneuses et sont à l’origine de symbioses remarquables telles que les mycorrhizes (**Harman *et al.*, 2004**).

1.1.2. Plant Growth-Promoting Bacteria ou Rhizobacteria

Parallèlement aux PGPF, les bactéries bénéfiques sont également utilisées pour la protection de la plante contre les infections par les agents pathogènes, dont certaines peuvent stimuler la croissance de leur hôte végétal et présentent un grand intérêt pour l’agriculture. Ces micro-organismes bénéfiques ou PGPB proviennent de différentes niches écologiques telle que la rhizosphère, la spermosphère, la phyllosphère, l’anthosphère ou la carposphère (**Compant, 2007**).

1.2 Différents types d’interactions entre plantes et microorganismes

1.2.1 Interaction non-hôte

Dans cette interaction, le microorganisme potentiellement pathogène est incapable de pénétrer et de reproduire à l’intérieure de la plante. Une des raisons de cette résistance peut être due à l’absence des éléments nécessaires à la colonisation efficace par l’agent pathogène. La plupart des interactions entre les plantes et les agents pathogènes sont des interactions non-hôte. Par ailleurs, la résistance non hôte est définie comme l’immunité d’une espèce présentée par la plante entière contre toutes les variantes génétiques de l’agent pathogène, ce type d’immunité, parfois limitée dans le temps est très fréquent dans la nature mais n’est pas encore très bien connue en comparaison avec la résistance spécifique à la maladie chez certains génotypes de plantes hôtes qui sont habituellement sensibles (**Gerber *et al.*, 2004**).

1.3 Activités microbiennes et diversité fonctionnelle dans la rhizosphère

1.3.1 Méthodes d’étude de l’activité et la diversité fonctionnelle dans la rhizosphère

L’approche classique de la détermination de la diversité fonctionnelle consiste à l’utilisation des bactéries cultivées sur boîtes de Pétri, soumises à des tests biochimique. Une autre méthode consiste à l’analyse du taux de croissance bactérienne sur des boîtes de Pétri, considéré comme un indicateur de l’état physiologique de la bactérie dans l’environnement, la disponibilité des nutriments et la stratégie d’adaptation. **Baath, (1996)** a rapporté sur l’incorporation de précurseurs radioactifs de l’ADN ([³H] thymidine) pour l’évaluation de la croissance et les protéines (L- [¹⁴C] leucine) et l’activité de la population microbienne dans les différentes fractions de filtrats du sol

(Barriuso *et al.*, 2008). Ces recherches ont suggéré que la fraction des bactéries cultivables (la plus grande taille) est responsable majoritairement de la croissance et l'activité des communautés du sol, tandis que la fraction de cellules de moins de 0,4µm, considéré comme non cultivables, a eu peu d'importance dans les activités du métabolisme et du sol. Par ailleurs, l'utilisation de la technique PLFA a démontré l'absence d'une différence significative entre les acides gras des phospholipides de bactéries dans le sol et les bactéries cultivables de ce sol **(Kotlar *et al.*, 1996)**.

En revanche, d'autres auteurs ont rapporté sur la présence de certaines difficultés dans les groupes de bactéries présentes en faible densité, métaboliquement très actif en culture, capables de synthétiser des quantités importantes de protéines, lors de l'utilisation de différents substrats. Ces bactéries appelées espèces « keystone », dont certaines appartiennent au genre *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, jouent un rôle très important dans le cycle de l'azote.

Actuellement, la mesure de l'activité enzymatique constitue un paramètre largement utilisé dans la détermination de la diversité microbienne. Une autre approche consiste l'utilisation des plaques Biolog, qui permettent la caractérisation des communautés microbiennes en fonction de leur profil physiologique (Profil physiologique au niveau communautaire ou "community-level physiological profile" CLPP), calculé à partir des différents schémas sur les voies de l'utilisation de nombreuses sources de carbone et d'azote **(Grayston *et al.*, 2001)**.

Chapitre 2

Les Rhizobactéries Promotrices de la Croissance des Plantes

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines en raison de la rhizosphère qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Les micro-organismes trouvent dans le milieu extérieur des sources énergétiques nécessaires à leur métabolisme (sucres, acides aminés, acides organiques et hormone), libérées par les racines.

Les bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencées de manière bénéfique la plante par stimulation de leur croissance et leur protection contre les agents phytopathogènes (**Ahmad et al., 2008**). La définition originale des rhizobactéries était restreinte sur les bactéries vivant librement dans la rhizosphère fixatrices d'azote atmosphériques. Les *Rhizobia* et les *Frankia* ne sont pas considérées comme des PGPR. **Kloepper et ses collaborateurs (1978)** ont rapporté sur la stimulation de la croissance, résultant de la fixation biologique de l'azote par les *Rhizobia* dans les nodules des légumineuses ou par *Frankia* dans les nodules d'*Alnus* spp., est loin d'être caractérisée comme effet PGPR. Cependant, les bactéries fixatrices d'azote n'entraînant pas des modifications morphologiques sur leurs plantes hôtes sont considérées PGPR. Toutefois, les *Rhizobia* peuvent se comporter comme PGPR lors de l'interaction avec des plantes non légumineuses et être même des endophytes (**Antoun et Prévost, 2005**).

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

2.1 Biodiversité des PGPR dans la rhizosphère

2.1.1. Les Rhizobia

La mise en place d'une interaction non spécifique des *Rhizobia* avec les racines des plantes non légumineuses a favorisé les espèces de ce genre de devenir des PGPR, outre leurs activité fixatrice de l'azote atmosphérique, les *Rhizobia* contribue considérablement à l'amélioration de la disponibilité des phosphates pour la plante par mobilisation de formes organiques et inorganiques (**Saharan et Nohra, 2011**). Elles peuvent produire des phytohormones, des siderophores et de l'HCN, avec la capacité de

coloniser les racines de plusieurs types de plantes non légumineuses. Les Rhizobia ont manifesté un grand intérêt lors de leur utilisation comme agents de bio-control. Les espèces de *Sinorhizobium meliloti* ont manifesté une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* et de *F. solani f.sp. phaseoli* (**Antoun et Prévost, 2005**).

2.1.2. Les PGPR diazotrophes

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont préalablement utilisées pour la stimulation de la croissance des plantes (**Ahmad et al., 2008**). La disponibilité d'une source d'énergie pour l'établissement du processus de fixation de l'azote constitue une principale limitation, compensée par le rapproche vers l'intérieur de la plante. *Azoarcus sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum sp.* et *Azotobacter sp* forment un groupe bactérien non symbiotique fixateur d'azote.

2.1.2.1. Azotobacter

Azotobacter paspali, décrite par **Dobereiner et Pedrosa, (1987)** est une bactérie aérobie stricte, non symbiotique, fixatrice de l'azote atmosphérique, isolée à partir de la rhizosphère de *Paspalum notatum*, une herbe tropicale qui possède une grande spécificité d'hôte.

Azotobacter paspali affecte positivement la germination des graines et leur développement, il est noté que l'inoculation des cultures de blé par ce genre augmente le rendement de 30% (**Saharan et Nohra, 2011**).

2.1.2.2 Azospirillum

Les espèces d'*Azospirillum*, isolées à partir des rhizosphères de plusieurs céréales à travers le monde principalement dans des régions tropicales et tempérées sont utilisées depuis les années 1970. Cette bactérie initialement sélectionnée par sa capacité fixatrice de l'azote atmosphérique représente un bon candidat PGPR (**Antoun et Prévost, 2005**).

2.1.2.3. Azoarcus

Azoarcus a gagné une grande attention due principalement à sa grande diversité génétique et métabolique, divisé en trois genres : *Azovibrio*, *Azospira* et *Azonexus*, qui se différencient des autres genres par leur capacité de se développer lors de l'utilisation des acides carboxyliques et de l'éthanol au lieu des sucres avec une température optimale de croissance comprise entre 37-42°C (**Reinhold et al., 1986**). *Azoarcus* est une bactérie endophyte du riz et est considérée comme un modèle de bactéries endophytes fixatrices d'azote (**Ahmad et al., 2008**).

2.1.3. *Bacillus*

L'utilisation de la technique DGGE (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis) dans l'étude de la diversité de *Bacillus* a montré que 95% des bactéries du sol à Gram positif appartiennent aux différentes espèces de *Bacillus* formant des endospores, qui leurs permettent de survivre des longues périodes dans des conditions environnementales défavorables (**Genin et Boucher, 2004**). Certaines espèces de ce groupe sont des diazotrophes, notamment *B. subtilis*, isolée à partir des rhizosphères de diverses plantes à des concentrations supérieures à 10^7 bactéries par gramme de sol rhizosphérique (**Antoun et Prévost, 2005**).

2.1.4. *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* et les *Pseudomonas* fluorescentes sont des bactéries ubiquistes, rencontrées souvent dans les sols, classées comme étant les meilleurs candidats PGPR (**Saharan et Nohra, 2011**). Les effets bénéfiques de la bactérisation des graines sont observés lors de l'inoculation des graines de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) par *P. fluorescens* et *P. putida* (**Bur et al., 1978**).

Alabouvette et al (1993) ont démontré que lors de l'utilisation de *Fusarium oxysporum* non pathogène, *P. fluorescens* et *P. putida* se manifestent comme principales candidates de contrôle biologique du flétrissement fusarien, avec une application bénéfique pour la suppression des fusarioses chez plusieurs espèces des plantes (**Chung et al., 2005**).

2.2 Compétence rhizosphérique et colonisation des racines par les PGPR

Une des particularités intéressantes des PGPR réside dans leur compétence rhizosphérique, qui correspond à leur capacité de colonisation de la rhizosphère, notamment sur les surfaces racinaires pendant une période considérable en présence ou non d'une microflore existante. Diverses études antérieures ont permis de faire la constatation que les PGPR colonisent la rhizosphère, la surface racinaire (rhizoplan) de leur hôte végétal où sont présentes des molécules exsudées par la plante (Sucres, acides aminés, acides organiques, vitamines et mucilage) nécessaires à leur développement (**Bais et al., 2006**). Les PGPR peuvent coloniser et se rencontrer au niveau de zones riches en ces macromolécules, principalement dans la zone d'émergence des racines secondaires, la zone pilifère, la zone d'élongation, l'apex racinaire et leurs portions de sols associés (**Hansen et al., 1997 ; Benizri et al., 2001 ; Humphris et al., 2005**). Dans ces endroits, les PGPR sont attirées chimiotactiquement par des sources nutritives puis

s'attachent aux surfaces racinaires par le biais des poils bactériens et de lectines (Bashan et De Bashan, 2005).

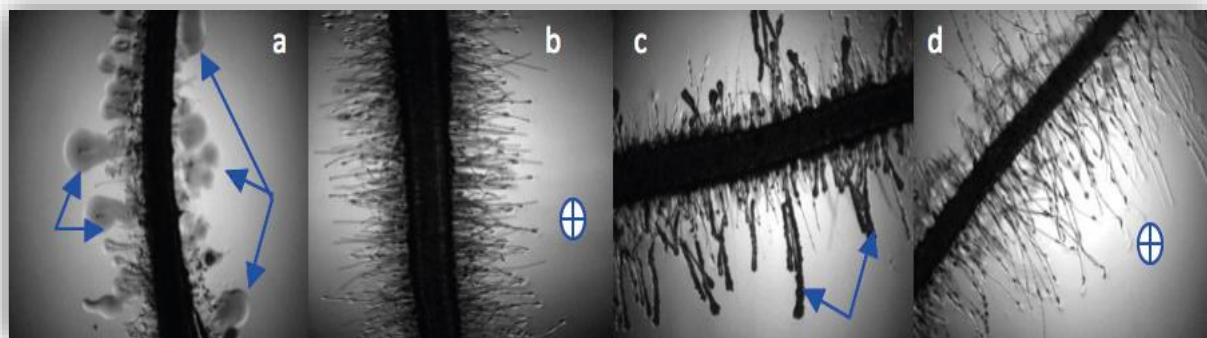


Figure 2. Colonisation racinaire par la souche de *Bacillus subtilis* S499 (Nihorimbere *et al.*, 2010). La visualisation par microscopie des racines de: a- Salade traitée, b - Salade non traitée; c - Tomate traitée, d- Tomate non traitée, les flèches en a et c indiquent la formation de biofilm. Les croix entourées en b et d indiquent l'absence de formation de biofilm sur le système racinaire par la souche, les graines de tomate et de salade stérilisées sont suspendues dans une solution bactérienne de 10^8 cellules/ml⁻¹ et mises en germination sur un milieu de culture nutritif, pendant un intervalle de temps de deux semaines dans une chambre d'air conditionnée Murashige et Skoog (1962).

2.3 Mécanismes impliqués dans l'activité des PGPR

2.3.1. Contribution des rhizobactéries à la nutrition des plantes

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

2.3.2. Fixation biologique de l'azote atmosphérique

L'azote est un élément nutritif essentiel pour les plantes, sa disponibilité réduite due à sa forte émission dans l'air compose un facteur limitant dans les systèmes agricoles. Les bactéries fixatrices de l'azote jouent un rôle essentiel chez les plantes, cependant, la capacité de certaines bactéries à fixer l'azote *in vitro* est démontrée facilement sous serre et en pleine champ d'études. Néanmoins, les études sur le sorgho, le maïs et le blé inoculés par des souches d'*Azospirillum* ont révélé une contribution maigre de 5 kg d'N/he/an (Okon et Lanbandera- Gonzalez, 1994).

2.3.3. Solubilisation du phosphate

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

2.3.4 Production des métabolites stimulant la croissance des plantes

2.3.4.1 Production des phytohormones

La production des phytohormones par les PGPR est un mécanisme essentiel, auquel plusieurs rhizobactéries approuvent la croissance des plantes **(Spaepen et al., 2007)**. Les phytohormones, molécules organiques signales agissant comme des messagers chimiques et régulateurs de la croissance, se trouvent en très faibles concentrations, influencent des processus biochimiques, physiologiques morphologique et leur synthèse est finement régulée **(Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado, 2006)**.

L'aptitude à produire des phytohormones est largement distribuée parmi les bactéries associées aux plantes et à leurs rhizosphères, les PGPR stimulent la croissance des plantes par la production des auxines (Acide indole acétique), les gibbérellines et des cytokinines **(Cianciotto, 2005)**.

2.3.4.2 Régulation de taux de l'éthylène

Les PGPR influencent positivement la croissance des plantes par la régulation des taux de l'éthylène produit chez les plantes dans des conditions de stress, conduisant à l'inhibition du développement des racines et une sénescence prématurée **(Li et al., 2005)**, lors de la dégradation de l'ACC (acide-1-aminocyclopropane carboxylique), précurseur de la production de l'éthylène par l'ACC désaminase, qui intervient dans sa dégradation en alphakétobutyrate et en ammonium **(Mayak et al., 2004)**.

2.3.5 Contrôle des microorganismes phytopathogènes

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

pathogènes aux composés chimiques nécessitant ainsi le développement de nouveaux pesticides (**Fernando et al., 2006**). Dans ce contexte, les rhizobactéries ont la capacité d'assurer un biocontrôle des maladies causées par des phytopathogènes ou par des insectes (Biopesticides) (**Zahir et al., 2004**).

Plusieurs outils sont impliqués dans le biocontrôle dont les mécanismes directs comprenant l'antagonisme *via* la production d'antibiotiques (2,4-diacetyl phloroglucinol DAPG, les butyrolactones, pyoluteorin, pyrrolnitrin), les sidérophores, le HCN ou des enzymes lytiques (Chitinases, protéases et lipases) ou des mécanismes indirectes par lesquels les organismes de biocontrôle agissent comme des probiotiques par la compétition avec les pathogènes pour l'occupation des niches écologiques. Le biocontrôle peut aussi s'interposer par l'activation de la résistance systémique acquise (SAR), l'induction de la résistance systémique (ISR) ou par la modification des niveaux hormonaux des plantes (**Palleroni, 2009**).

Tableau 1: Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlées par les PGPR (**Martinez-Viveros et al., 2010**).

Terme	Définition	Mécanismes	Référence
Biofertiliseur	Une suspension contenant des microorganismes vivants qui, une fois appliquée sur des graines, sur une plante ou dans le sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et promeuvent la croissance par l'augmentation de la disponibilité des nutriments principaux pour la plante hôte.	<ul style="list-style-type: none"> - La fixation biologique de l'azote. - L'utilisation des formes insolubles de phosphore. 	Vessey, 2003; Somers et al., 2004; Fuentes-Ramírez et Caballero-Mellado, 2006.
Phytestimulateur	Des microorganismes qui ont la capacité de produire ou de changer la concentration des régulateurs de la croissance comme l'acide indole acétique, l'acide gibbérellique, les cytokinines ou l'éthylène.	<ul style="list-style-type: none"> - Production des phytohormones (Les auxines, les cytokinines et les gibbérellines) - Réduction de la concentration de l'éthylène à l'intérieur de la plante. 	Lugtenberg et al., 2002; Somers et al., 2004.
Biopesticide ou agent de biocontrôle	Des microorganismes qui stimulent la croissance d'une plante <i>via</i> le contrôle des agents phytopathogènes, principalement par la production des antibiotiques et des métabolites antifongiques.	<ul style="list-style-type: none"> - Production des antibiotiques (Siderophores, HCN, métabolites antifongiques) - Production des enzymes qui dégradent les membranes des cellules fongiques - La compétition - L'ISR et l'ASR 	Vessey, 2003; Somers et al., 2004; Chandler et al., 2008.

Chapitre3

Maladies de Tomate : Pathologie Fusarienne

3.1 La culture de tomate en Algérie

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) est originaire des Andes d'Amérique du Sud, dans une zone allant du sud de la Colombie au nord du Chili et de la cote Pacifique, aux contreforts des Andes (Equateur, Pérou). Elle fut domestiquée au Mexique, puis introduite en Europe au XVIème siècle par les Espagnols avant même la pomme de terre et le tabac (Shankara, 2005).

En Algérie, ce sont les cultivateurs du Sud de l'Espagne (Tomateros), qui l'ont introduit en raison des conditions climatiques qui sont propices pour sa culture. Quant à sa consommation, elle a commencée dans la région d'Oran en 1905 puis, elle s'étendit vers le centre, notamment au littoral algérois (Latigui, 1984).

La tomate occupe une place privilégiée dans le secteur maraîcher en Algérie, considérée à juste que la pomme de terre, l'ail et l'oignon, qui forment un groupe d'espèces prioritaires. Sa production est en pleine expansion (Figure 3) occupant une place prépondérante dans l'économie agricole algérienne. Près de 33 000 ha sont consacrés annuellement à la culture de tomate (maraîchère et industrielle), donnant une production moyenne d'environ 7 millions de quintaux et des rendements moyens d'environ 311 Qx/ha. Cette culture est en pleine expansion à la faveur de nombreux programmes mis en place par le Ministère de l'agriculture et du développement rural. A cet effet, de nouvelles techniques de productions sont introduites ces dernières années permettant plus de rendement à l'hectare (Toufouti, 2013).

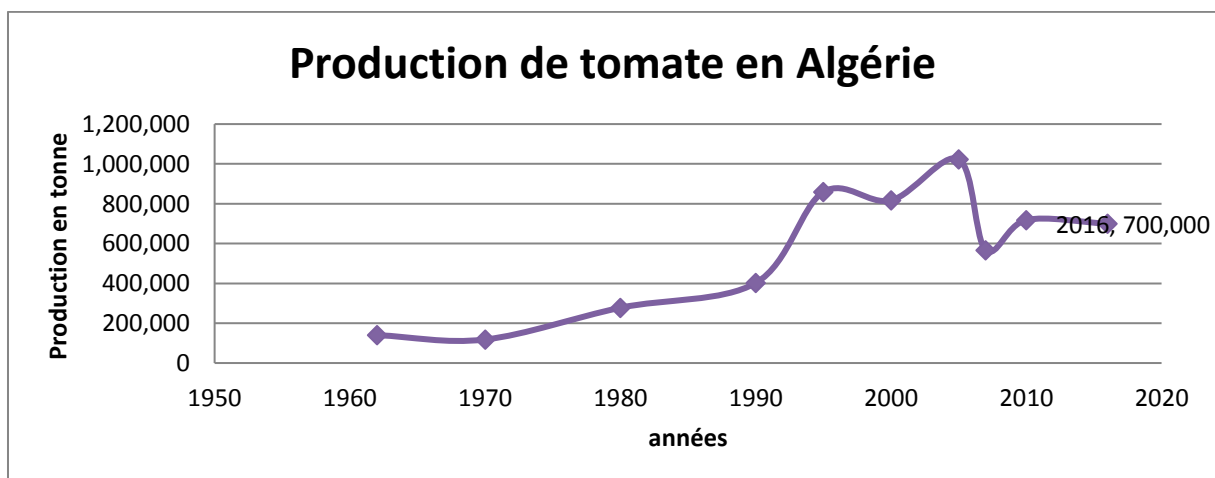


Figure 3. Évolution de la production de la tomate en Algérie 1962-2016.

3.2 Pathologie et ravageurs de la tomate

3.2.1. Pathologies fongiques

- **Le Mildiou:** causé par *Phytophthora infestans*, anciennement classé parmi les mycètes. Cette maladie peut dévaster les cultures de tomate durant les périodes fraîches et pluvieuses. Le mildiou s'attaque à tous les organes aériens de la plante et se manifeste par des taches nécrotiques, irrégulières, d'extension rapide, entourées d'une marge livide. Des plages brunes sont observées sur les tiges et les fruits mildioués bruns marbrés, irrégulièrement bosselés en surface (**Blancard, 1991**).
- **L'alternariose :** le mycète responsable est *Alternaria tomatophila*, s'attaque à tous les organes aériens de la tomate et à tous les stades de croissances de la plante et occasionne surtout, des taches foliaires vert sombre, puis deviennent rapidement brunes à noire. Des taches assez comparables sont constatées sur les tiges et concaves, sur les fruits qui peuvent se couvrir d'une moisissure noire, veloutée. Les lésions sur fruits peuvent engendrer leur chute (**Blancard, 2009**).
- **Moisissure grise :** causée par *Botrytis cinerea*, la pourriture grise est une maladie répandue dans les cultures de tomate sous abris. Les symptômes observables sur fleurs, fruits, tiges, feuilles, se traduisent généralement par un pourrissement des tissus infectés, suivi par l'apparition d'un feutrage gris due a une production importante de spores. *Botrytis cinerea* peut entraîner des pertes de rendements importantes en affaiblissant les plantes et en les détruisant.
- **Fusariose :** provoquée par *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*. Les plantes infectées par ce mycète du sol présentent un jaunissement des feuilles et un flétrissement se propageant à partir de la base de la tige et de racine. Au départ, les symptômes ne sont visibles que sur une seule moitié de la surface des feuilles, des branches ou des plantes, avant de se propager à l'ensemble de la plante.

3.2.2. Pathologies bactériennes

La tomate a, souvent, fait l'objet d'attaque de plusieurs bactéries qui développent des symptômes multiples, parmi les plus graves :

- **La tache bactérienne**

La tache bactérienne de la tomate causée par *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* est l'une des maladies les plus graves dans de nombreux domaines. Elle est considérée comme une importante contrainte à la production de tomates dans le monde entier, les symptômes de la maladie apparaissent sur les feuilles, les fleurs, les tiges et les pétioles.

- **Le chancre bactérien**

Le chancre bactérien de la tomate causé par le *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*, est une maladie importante et répandue, causant des pertes économiques graves dans les cultures de tomates dans le monde, qu'elles soient en serre ou en plein champ, provoque sur la tomate une maladie vasculaire qui se traduit par un flétrissement et chlorose des organes aérien.

- **La moucheture bactérienne**

Cette maladie causée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* est aujourd'hui largement répandue dans les zones de la production de la tomate et très destructive dans le monde entier. Les lésions de la moucheture bactérienne peuvent apparaître sur le feuillage, les tiges ou les fruits. La présence de la moucheture sur les feuilles, se manifeste par des petites taches graisseuses, sombres, prenant rapidement une teinte brune à noire. Ces lésions sont circulaires ou légèrement angulaires d'un diamètre de 2 à 3 mm et présentent un halo jaune plus ou moins large et marqué. En présence d'humidité, elles peuvent s'étendre et confluer altérant de larges secteurs du limbe qui finissent par se nécroser et se dessécher. Ces taches peuvent également se développer sur les tiges et les sépales floraux (**Blancard, 2009**).

3.3 *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*: biologie et pathogénicité de tomate

3.3.1. Généralités

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (**Hibar et al., 2005**), Le *Fusarium* est connu pour ses grandes maladies de fusariose typiques et pour le pied noir qu'il cause chez entre autres les tomates, les concombres, les poivrons et le blé.

Les *Fusarium* infectant la tomate (*Lycopersicon esculentum*) sont classés en deux formes spéciales (*forma speciale* ou *f. sp*) : *f.sp lycopersici* et *f.sp radicis lycopersici* (**Hibar et al., 2005**). *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, est connue comme étant l'agent de la fusariose des racines et du collet de la tomate qu'est une maladie très destructive (**Benhamou et al., 1989**).

3.3.2 *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici*

Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici est responsable du flétrissement des plants de tomate suite à la pourriture de la racine et du collet. Ce champignon envahit les plantes par les plaies et les ouvertures naturelles provoquées par la création de nouvelles racines. La propagation de l'agent pathogène s'effectue via le xylème, provoquant le brunissement des vaisseaux vers le haut, sans affecter la moelle.

F. oxysporum f. sp. radicum-lycopersici a été rapporté pour la première fois au Japon en 1969 et s'est rapidement répandu mondialement. Avant le développement de variétés et de porte-greffes résistants, *F. oxysporum f. sp. radicum lycopersici* était responsable de pertes économique importantes dans de nombreux pays (**Benhamou 1992**).

3.3.2.1 Biologie et taxonomie

L'agent pathogène, *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici*, appartient à l'ordre des *Hyphales*, dans la classe des *Hyphomycètes*, dans le groupe des *Deutéromycètes*. Il produit trois types de spores asexuelles: les microconidies uni- ou bicellulaires, seule présentes dans la plante-hôte; les macroconidies, en forme de croissant, comprenant trois à cinq cellules, formées sur des débris de plantes mortes; les chlamydospores, formées à partir de mycélium ou de macroconidies, représentant les spores de résistance du champignon. En l'absence de plante hôte, le pathogène, parasite facultatif, survit dans le sol sous forme de mycélium ou plus fréquemment de chlamydospores en présence de la plante hôte (**Fushs, 1994**).

Tableau 2. Classification de *Fusarium oxysporum f.sp radicum lycopersici*.

Classification	
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous-classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Nectriaceae</i>
Genre	<i>Fusarium</i>
Espèce	<i>Fusarium oxysporum (Schltdl.) (1824)</i>
Forme spéciale (f. sp.)	<i>f. sp. radicum-lycopersici</i>

3.3.2.2 Isolement

- **Isolement à partir de l'hôte:** se fait en fondant longitudinalement la base de la tige d'une plante malade afin de révéler le xylème juste en dessous de l'épiderme. Ensuite, les feuilles et les racines secondaires doivent être enlevées en ne laissant que la tige principale, les hypocotyles et les racines principales suivé par une stérilisation

de la surface des racines en les trempant dans une solution d'eau de javel à 10% (5 minutes) et séchage de la tige sur un papier absorbant. En conditions aseptiques, de minces morceaux (2-4 mm d'épaisseur) doivent être coupés d'un côté de la tige près de la racine/tige de jonction en veillant à inclure le xylème, placés sur des géloses PDA et incubés sous lampes fluorescentes. Une fois un développement suffisant, à partir des fragments précédents, un transfert des isolats frais sur de nouvelles géloses PDA doit être établi suivi par une incubation pendant 10-14 jours. Les colonies de *F. oxysporum* sont pigmentées avec une couleur rouge-pourpre, surmontées d'un mycélium aérien blanc-rosâtre.

- **Isolation du sol (Milieu de Komada) :** Des dilutions du sol sont réalisées, ensuite étalées sur un milieu sélectif. Les boîtes de Pétri sont maintenues sous des lampes fluorescentes pour l'incubation. Des colonies similaires de celles décrites plus haut sont observées (Davet et Rouxel, 2000).

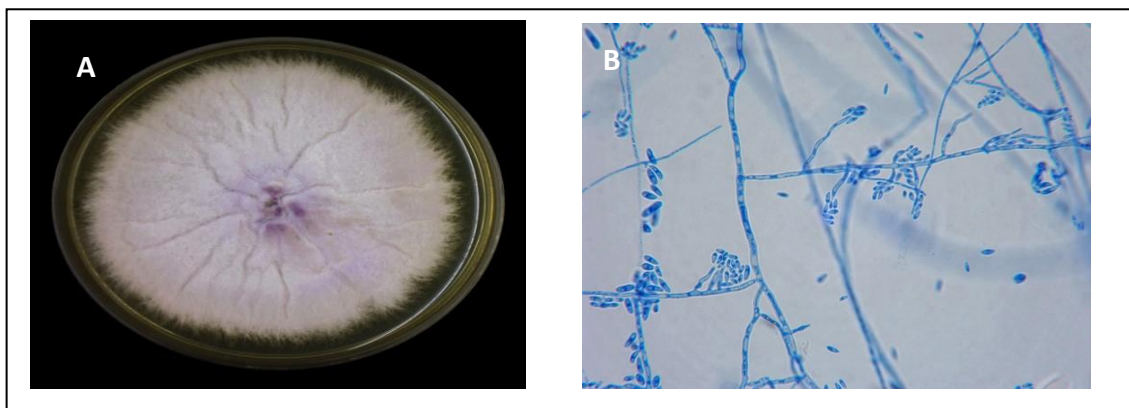


Figure 4. Aspect macroscopiques et microscopiques des cultures de *Fusarium oxysporum*. **A :** Culture de *Fusarium oxysporum* provenant des fibres vasculaires brunes d'une tige sur milieu PDA. **B :** agrandissement 400 x du *Fusarium oxysporum* par par DMD microscope-camera, les microconidies peuvent être vues accumulées autour des bouts des phialides (Silva *et al.*, 2014).

3.3.2.3 Identification

Les espèces de *Fusarium* sont traditionnellement différenciées par leurs caractéristiques morphologiques sur les milieux de cultures sélectifs. Cependant, l'identification types pathogènes, ou *formae speciales* et autres races de *Fusarium oxysporum* par l'utilisation des caractéristiques morphologiques est impossible. La détermination des *formae speciales* de *F. oxysporum*, malheureusement, se repose sur la longue procédure de contrôle de la pathogénicité chez les différentes espèces végétales. Le test d'inoculation par l'utilisation des plantes d'essai constitue une approche largement connue pour l'identification des *formae speciales* (une approche nécessitant beaucoup de temps et de

patience ; d'où le besoin de développement d'autres méthodes plus rapides, et moins fastidieuses (Balogun, 2007).

3.3.3 Infection de la tomate par le *F. oxysporum f. sp. radicis lycopersici*

La première description de la fusariose vasculaire des plantes de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill., date de 1886. En l'absence de plante hôte, le pathogène, parasite facultatif, survie dans le sol sous forme de mycélium ou plus fréquemment de chlamydospores; en présence de la plante hôte, des hyphes ou des tubes germinatifs pénètrent à l'intérieure des racines dans la zone d'élongation ou par des blessures; une fois dans le xylème, le champignon produit des microconidies qui envahissent toute la plante. La plante présente un stress hydrique qui provient soit des vaisseaux qui se bouchent sous l'action combinée du mycélium, des microconidies et de substances mucilagineuses produites par la plante en réponse à l'attaque du champignon, soit de toxines produites par le champignon, comme l'acide fusarique , soit de ces causes combinées. Environ deux mois après le repiquage, les plantes de tomate présentent alors des symptômes typiques de jaunissement et de flétrissement des feuilles, brunissement des vaisseaux et rejet des fruits. Les *F. oxysporum* pénètrent directement les racines non-blessées dans leur zone d'élongation. Cependant, l'efficacité de cette pénétration peut être augmentée par la microflore et la microfaune du sol. Ainsi, dans de la terre naturelle, **Kerr (1963)** a démontré que *Pythium sp.* peut permettre à *F. oxysporum f. sp. pisi* de pénétrer dans les racines de petits pois et ainsi détruire les plantes, alors que ni le *Pythium* ni le *Fusarium* seuls ne causent de dommage aux plantes. Les nématodes *Meloidogyne sp.* sont également caractérisés par leur aptitude à favoriser la pénétration des *Fusarium spp.* dans les plantes (**Fushs, 1994**).



Figure 5. Dommages internes et externes causés par *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, sur des cultures de tomates infectées (**Roberts, 2007**).

Chapitre 4

Lutte biologique : biopesticides et défenses induites par les PGPR

L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes en tant que biopesticides constitue une technologie émergente et écologiquement compatible. Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal. Certaines rhizobactéries non pathogènes peuvent en effet initier l'expression de mécanismes de défense s'établissant dans tous les organes de la plante, lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une agression ultérieure (Jourdan, 2007).

4.1. Les biopesticides microbiens

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

Les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes. De plus, les biopesticides sont souvent efficaces en faibles quantités et leurs activités protectrices peuvent relever de mécanismes multiples et déclenchent donc rarement des phénomènes de résistance chez le pathogène à cause d'une faible pression de sélection. En outre, ils peuvent compléter les pesticides conventionnels une fois utilisés dans les programmes intégrés de la gestion des parasites (IPM) (Fravel 2005; Thakore 2006). Par exemple, l'intégration du contrôle biologique avec des fongicides, les pratiques culturales, et d'autres mesures peuvent contribuer au contrôle des maladies sur la tomate. Les biopesticides peuvent donc être complémentaires au traitement chimique, mais peuvent aussi être utilisés dans des situations pour lesquelles aucune solution de contrôle utilisant des produits de synthèse n'est actuellement disponible. Ces agents microbiens sont utilisés à travers le monde dans les champs et dans les serres (Ji *et al.*

2006; Lee *et al.* 2006; Minuto *et al.* 2006; Saravanakumar *et al.* 2007), pour combattre un grand nombre de maladies causées par des pathogènes du sol, foliaires ou de post-récoltes.

4.2 Défenses induites et résistance systémique associée aux PGPR

Une des propriétés intéressantes des PGPR, réside dans leur capacité à induire ou non des réactions de défense lors de leur colonisation des plantes. Ces réactions de défense peuvent être à l'origine d'une résistance systémique induite ou ISR conférant une protection de la plante vis à vis des agents pathogènes (**Figure 6**).

4.2.1 Reconnaissance des PGPR

Lors de l'interaction plante/PGPR, une reconnaissance entre l'hôte végétal et le micro-organisme bénéfique peut se mettre en place, néanmoins, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de données concernant la traduction des gènes d'avirulence chez les PGPR. Cependant, des éliciteurs généraux de type MAMPs (profil moléculaire associé aux microbes) ont pu être mis en évidence lors d'études portant sur les déterminants moléculaires de l'ISR (**van Loon et Bakker, 2005**). C'est le cas pour les LPS, les sidérophores, le composé volatile 2,3-butanediol (**Ryu *et al.*, 2004**) ou des antibiotiques comme le 2,4 diacetylphloroglucinol (DAPG) et la pyocyanine (**Audenaert *et al.*, 2002**) provenant des PGPR. Ces composés sont nécessaires à l'ISR et peuvent donc être considérés comme des MAMPs (**van Loon et Bakker, 2005**).

4.2.2 Signalisation

Lors de l'interaction plante-PGPR, une signalisation intracellulaire puis intercellulaire se met en place. Des événements précoces tels que le influx de Ca^{2+} , la production d' H_2O_2 et de NO ont pu être mis en évidence chez le tabac avec les LPS (lipopolisaccharides) de la PGPR endophytique *Burkholderia cepacia* (**Gerber *et al.*, 2004**). En outre, **Vleeschauwer *et al.*, (2006)** ont démontré que le sidérophore pyocheline et l'antibiotique pyocyanine induisent la production d' H_2O_2 au niveau des racines du riz.

Au niveau de la signalisation intercellulaire, une accumulation de SA a pu être constatée dans les racines lors de l'interaction entre diverses PGPR et leurs plantes hôtes.

C'est notamment le cas chez la tomate ou le haricot avec *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Toutefois, il est généralement admis qu'il n'y a pas de production de l'acide salicylique (SA) lors de l'interaction entre une plante et une PGPR (**Van Loon et Bakker, 2005**).

Au niveau systémique, le SA ne semble pas non plus impliqué mais il serait remplacé par l'éthylène (ET) et l'acide jasmonique (JA) (Pieterse *et al.*, 2001 ; 2007 ; van Loon *et al.*, 2006a ; Pieterse et van Loon, 2007). Il existe néanmoins des exceptions. Une augmentation de SA au niveau systémique est constatée après application racinaire de l'endophyte *P. fluorescens* souche CHAO sur le tabac (Maurhofer *et al.*, 1994) ou de *P. aeruginosa* souche 7NSK2 sur la tomate (Meyer *et al.*, 1999), ce qui souligne que des différences peuvent survenir lors de l'interaction entre les plantes et les PGPR.

4.2.3 Induction ou non de gènes codants des protéines PR

De nombreux travaux ont rapporté que lors de l'interaction plante-PGPR, l'expression de gènes codants des protéines PR aux niveaux local et systémique est absente.

Des travaux antérieurs réalisés par Hoffland *et ces collaborateurs* (1995) ont rapporté sur l'absence de l'expression des gènes *PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-4* et *PR-5* chez *Raphanus sativus*. Par ailleurs, Pieterse *et al.*, (1996) et Duijff *et al.*, (1998) ont rapporté sur l'absence de l'expression des gènes *PR-1*, *PR-2*, et *PR-5* chez *A. thaliana* et la synthèse de protéines *PR-1* et de chitinases chez *Lycopersicon esculentum*.

En revanche, ces défenses sont potentialisées lors de l'infection ultérieure de la plante par un agent pathogène telle que l'infection d'*A. thaliana* par *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Van Wees *et al.*, 1999). A cet effet, la colonisation de la plante par les PGPR est généralement inassociée à l'accumulation de protéines PR en l'absence d'un agent pathogène (Van Loon *et al.*, 1998). Ongena *et al.* (2005) ont rapporté sur l'absence de l'expression de *PR-1* chez la tomate ni de *PR-8* chez le concombre lors de l'inoculation de *Bacillus subtilis* souche M4.

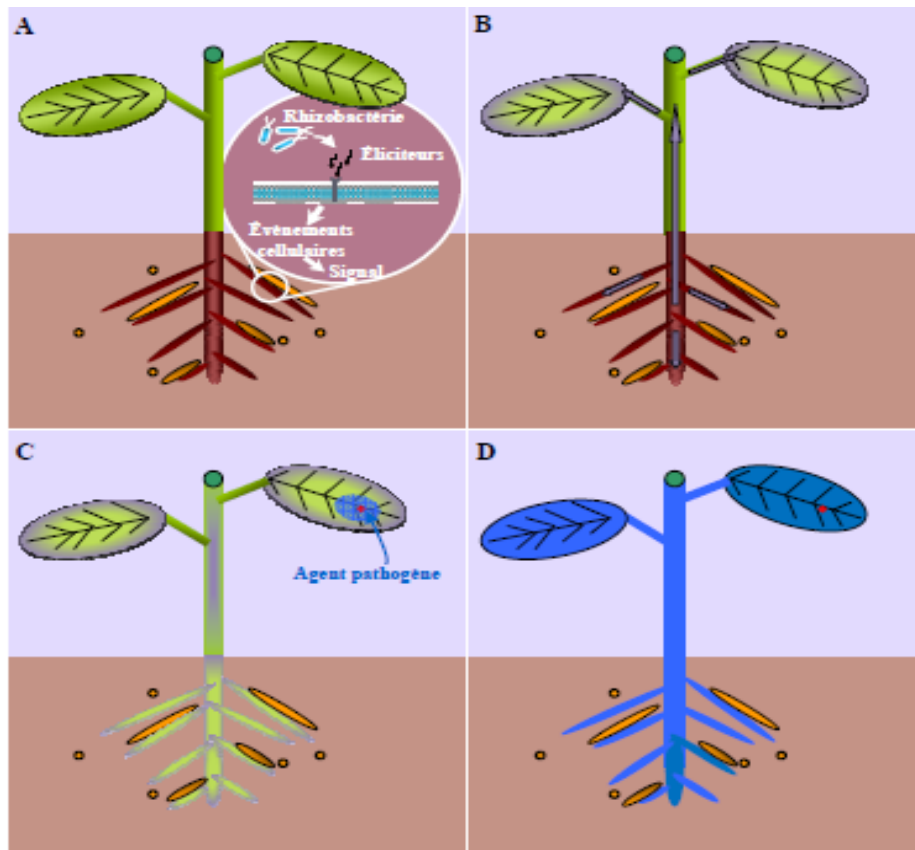


Figure 6. Présentation des différentes phases du phénomène d'induction de résistance chez les plantes par les rhizobactéries. La perception de la bactérie par l'hôte végétal via un (des) éliciteur(s) moléculaire(s) est la première étape (A). Suite à ce dialogue moléculaire, il y a émission d'un signal à travers toute la plante menant à un état « induit » systémique alors que la bactérie inductrice ne migre pas (B). Cet état induit n'est que peu perceptible d'un point de vue moléculaire mais permet à la plante de réagir rapidement et de limiter une infection ultérieure d'abord localement autour du site d'attaque (C). Il s'en suit une réaction systémique menant à un renforcement de tous les organes qui permet une certaine résistance vis-à-vis d'une agression future (D) (Jordan, 2010).

4.2.4 Les résistances systémiques

La SAR et l'ISR sont les deux types de résistance systémique mis en place par la plante à la suite d'un stress. Récemment, la SAR est dépendante de la voie de l'AS et l'ISR de la voie AJ/ET (Pieterse & van Loon, 2007). Cependant, de études récentes ont démontré que ce concept doit être modulé (Truman *et al.*, 2007 ; Van der Ent *et al.*, 2009). En effet, la définition de la SAR comme la résistance systémique mise en place par la plante suite à une attaque par un agent pathogène, et que l'ISR est mise en place par la plante en réponse à la présence de micro-organismes bénéfiques.

4.2.4.1 La résistance systémique acquise

La SAR fait suite à l'infection d'agents pathogènes avirulents, lors d'expression de symptômes de maladies ou suite à l'application d'éliciteurs. Elle conduit à la protection

systémique de la plante vis à vis de nouvelles infections. La SAR peut protéger les différents organes de la plante telles que la tige, les feuilles voire même les fleurs ou les fruits contre une attaque ultérieure par un phytopathogène. Son activité protectrice peut durer plusieurs semaines après le premier contact entre la plante et l'agent pathogène **(Van Loon et al., 2006)**. Le phénomène de SAR est associé à l'expression de différents gènes de défenses et a signalisation impliquant la SA. La SAR est généralement activée par des pathogènes nécrotiques et peut être induite suite au traitement par des molécules purifiées issues d'autres pathogènes (Cérébrosides, *Lipid transfer protein*, Oligosaccharides) et par certains composés synthétiques (acide salicylique (AS), acide β -amino-butyrique, acide 2,6-dichloro-isonicotinique (AIN) ou acibenzolar-S-methyl-benzothiadiazole, (BTH)) **(Sticher et al., 1997)**. La résistance conférée par ce phénomène persiste dans le temps et est effective sur une multitude de plantes et contre un large spectre de pathogènes incluant virus, bactéries, champignons et nématodes.

4.2.4.2 La résistance systémique induite

L'expression de mécanismes de défense systémiques chez les plantes peut également être initiée suite à l'interaction avec certaines rhizobactéries non pathogènes lors d'un phénomène appelé « résistance systémique induite » (ISR). Tout comme dans le cas de la SAR, ces réactions de défense leur permettent de mieux se défendre vis-à-vis d'une agression ultérieure.

L'expression phénotypique du phénomène de l'ISR peut être divisée en quatre étapes principales **(Figure 8)**. Ces étapes sont i) la perception par la plante des molécules bactériennes responsables de l'élicitation du phénomène, ii) la transmission du signal nécessaire à la systémisation du phénomène dans la plante, iii) la mise en alerte de la plante au niveau systémique qui, dans la plupart des cas, n'est pas accompagnée de modifications majeures de l'activité transcriptionnelle avant l'attaque du pathogène et iv) l'expression du ou des mécanisme(s) de défense *sensu stricto* induits permettant de limiter voire inhiber la pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte végétal.

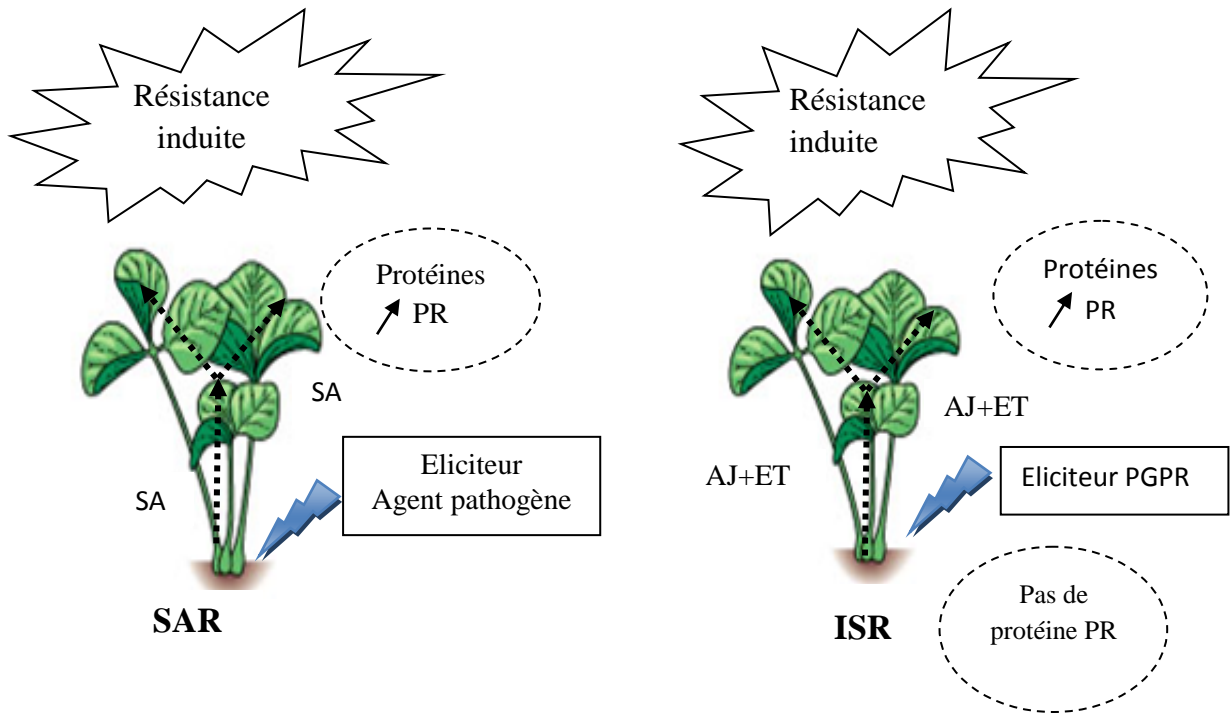


Figure 7. Les résistances systémiques (SAR et ISR) selon **van Loon *et al.* (2006 ; Schéma modifié de Vallad & Goodman, 2004).**

AJ : acide jasmonique ; AS : acide salicylique ; ET : éthylène ; ISR : résistance systémique induite ; PGPR : plant growth-promoting rhizobacterium ; PR : pathogenesis-related ; SAR : résistance systémique acquise.

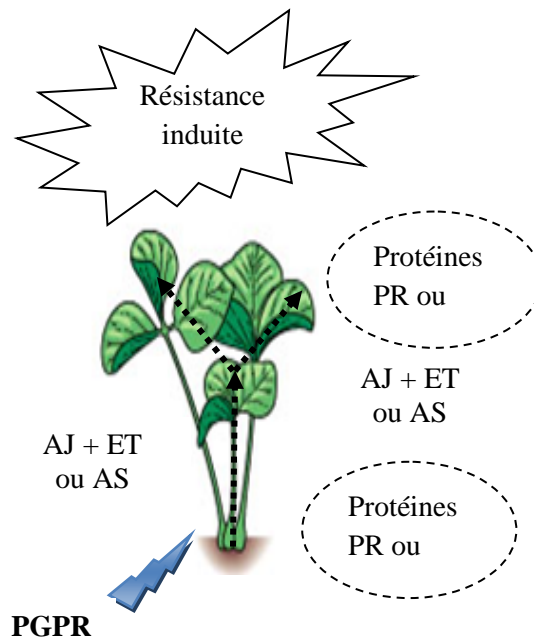


Figure 8. Mise en place de la résistance systémique induite (ISR) par des PGPRs (Plant growth-promoting rhizobacterium) (**JORDAN, 2010**).

1) Les éliciteurs de l'ISR

Les éliciteurs produits chez les PGPR, impliqués dans l'ISR sont moins bien connus, Cependant, les recherches menées ont permis l'identification de nombreuses molécules intéressantes.

2).1 Les composants de la surface des cellules

Les flagelles bactériens sont nécessaires pour la mobilité et l'adhérence des bactéries sur les racines et interviennent dans une colonisation efficace. **Persello-Cartieaux et al. (2003)** ont rapporté que la flagelline (protéine du filament flagellaire des Eubactéries) de la rhizobactérie *P. putida* WCS358 intervient dans résistance systémique chez *Arabidopsis* contre *P. syringae*.

2).2 Les sidérophores

Les sidérophores, produits chez les PGPR dans des conditions de carence en fer, peuvent déclencher l'ISR dans certaines plantes. Par ailleurs, les pyoverdines, appelées pseudobactines et la pyocheline sont des sidérophores synthétisés typiquement par certaines souches appartenant au genre *Pseudomonas* (**Budzikiewicz 2004**). Par exemple, la souche *P. putida* WCS358 peut induire l'ISR dans différentes plantes telles que *Arabidopsis*, le haricot, la tomate ou l'eucalyptus grâce à la production des pseudobactines.

2).3 L'acide salicylique

Certaines souches de PGPR sont capables de produire de l'acide salicylique (SA), dans des conditions de limitation en fer. Dans certains cas, ce SA produit d'origine bactérienne joue le rôle d'éliciteur de l'ISR.

Par exemple, le SA produit par la souche *P. aeruginosa* 7NSK2 élicite l'ISR dans quelques pathosystèmes tels que tabac/virus de mosaïque du tabac (TMV) (**De Meyer et al. 1999**), haricot/*Botrytis cinerea* et *Colletotrichum lindemuthianum* (**De Meyer et Höfte 1997; Bigirimana et Höfte 2002**). Un mutant dérivé de *P. aeruginosa* 7NSK2 incapable de produire le SA, a perdu sa capacité de stimulation de l'ISR chez le haricot (**De Meyer et Höfte 1997**). Par contre, certaines des études antérieures ont montré que la production de SA chez d'autres souches reste loin d'être déterminant de l'ISR (**Press et al. 1997**).

2).4 Les antibiotiques

Certains composés synthétisés par les PGPR, caractérisés par leur activité antifongique sont également inducteurs de l'ISR. L'induction de l'ISR de la pyocyanine est rapporté

lors du traitement de plantes de tomate par *P. aeruginosa* 7NSK2 (**Audenaert et al. 2002**). De même, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) produit par *P. fluorescens* CHA0 et Q2-87 est essentiel pour l'induction des réactions de défense chez *Arabidopsis* et chez la tomate (**Audenaert et al. 2002; Siddiqui et Shaukat 2002; Iavicoli et al. 2003; Weller et al. 2004**). D'autre part, certaines bactéries Gram positives telles que *Bacillus* spp. ont démontré leur capacité de stimuler des mécanismes de défense chez la plante (**Kloepper et al. 2004**).

PARTIE II.

ETUDE

EXPERIMENTALE

Chapitre 5

Matériels et Méthodes

5.1 Objectifs

L'objectif de ce travail est l'isolement et la sélection des bactéries stimulatrices de la croissance des plantes et inhibitrices de la prolifération de *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici*, agent responsable de la fusariose des racines et de collet de la tomate, et la sélection des bactéries inductrices d'une résistance chez la plante testée afin d'être exploitées à des fins industriels comme agents de biocontrôle.

Quatre points principaux ont été fixés pour la réalisation de ce travail :

1. L'isolement des souches bactériennes à partir de rhizosphère des plantes de tomate et le criblage des isolats promoteurs de la croissance de la culture de tomate *in vivo*.
2. La mise en évidence l'activité inhibitrice des souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de la culture de tomate vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*.
3. L'identification moléculaire des souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de la culture de tomate.
4. L'évaluation de l'induction d'une résistance systémique chez la tomate, par la caractérisation des molécules accumulées dans les tissus des plantes traitées avec les souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance en présence l'agent phytopathogène *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*.

5.2 Matériels Biologiques

5.2.1 Echantillon végétal

Cinq échantillons de plantes de tomates seines et entières, sont prélevés au mois d'Avril à partir de la région de Chebba, située à environ 200 km de la Wilaya de Mahdia (Tunisie) dans leur 8^{ème} semaines de croissance (**Figure 9**). Les échantillons proviennent des cultures des tomates non traitées. Les prélèvements sont conservés dans des sachets stérils à 4°C.

5.2.2 Micro-organismes utilisés

Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici fournis par le laboratoire de l'université HASSIBA BEN BOUALI de Chlef, est récupéré et conservé dans un milieu de culture incliné, contenant le milieu de culture de PDA et incubés à une température de 4°C. Les souches fongiques utilisées sont soumises à des repiquages successifs sur le milieu de culture de PDA, incubées à une température de 25 °C pendant un intervalle de temps de

5-7 jours à l'obscurité. Les souches bactériennes isolées à partir des échantillons de culture de tomate sont conservées à une température de -20°C dans un bouillon nutritif contenant 20% de glycérol.



Figure 9. Présentation des sites de prélèvements des échantillons de culture de tomate.

5.3 Stratégie d'isolement

La stratégie d'isolement des souches promotrices de la croissance des cultures de la tomate choisi est basée sur leur prédominance dans la rhizosphère des plantes de tomate, partant du principe que la plante crée un microenvironnement très favorable aux bactéries bénéfiques.

5.4 Isolement des souches bactériennes

Trois groupes bactériens distincts colonisant la rhizosphère des plantes sont isolés sur la gélose nutritive, dont les bactéries présentant un aspect dominant sont sélectionnées.

5.4.1 Isolement à partir du sol rhizosphérique

Une pesée de 1 g du sol, prélevé des échantillons est récupérée par agitation des racines dans un récipient stérile et homogénéisation avec une solution stérile d'eau distillée contenant 0.85 % de NaCl et des dilutions décimales sont préparées. Les aliquots des dilutions décimales sont étalées sur la surface des boîtes de Pétri contenant une gélose

nutritive, incubées une température de 30 °C pendant un intervalle de temps de 24 à 48 heures (Nautiyal et Das Gupta, 2007).

5.4.2 Isolement des bactéries de la surface racinaire

Dans le but d'éliminer l'excès du sol et la libération des les bactéries adhérentes, les racines sont lavées dans un premier temps avec de l'eau de robinet pendant 2 minutes et une solution saline stérile (0.85 %) (Annexe 2), trempées dans une solution tampon phosphate stérile PBS (Phosphate Buffer Solution). Les racines sont ensuite déposées sur la surface de la surface d'une gélose nutritive, incubées à une température de 30 °C jusqu'à l'apparition de croissance visible des colonies bactériennes (Bashan *et al*, 1993).

5.4.3 Isolement des bactéries endophytes

Les racines sont désinfectées dans un premier temps par trempage dans une solution d'éthanol à une concentration de 70 % pendant 5 minutes, ensuite dans une solution de hypochlorite de sodium à une concentration de 6,25 % pendant 10 minutes, lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Les racines désinfectées sont lavées une deuxième fois avec une solution 0.1 M de MgSO₄. Les racines sont ensuite coupées longitudinalement et placées sur la surface de la gélose nutritive, incubées à 30°C jusqu'à la détection d'une croissance visible (Bashan *et al*, 1993).

5.5 Expérience de promotion de la croissance *in vivo* des plants de tomate

5.5.1 Traitement et semis des graines

Toutes les expériences sont menées sur une variété standard de tomate non résistante et non modifiée génétiquement. Les graines de tomates *Lycopersicon esculentum* Mill., cv. sont désinfectées avec une solution de 2,4% de sodium hypochlorite (NaOCl) pendant un intervalle de temps de 2-3 minutes, rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile et séchées sous un air filtré pendant 2 heures (Landa *et al*, 2001). Les 22 isolats bactériens utilisées pour inoculer les graines de tomates sont obtenus suite à une culture sur milieu gélose nutritive, leur densité optique est mesurée à 600 nm, ajustées à 10⁸ cellules/ml après dilution appropriée (des colonies bactériennes diluées dans une solution de 0,01 M de MgSO₄). Les graines des plants témoins sont trempées dans un volume de 30 ml d'une solution de 0,01 M de MgSO₄ stérile pendant 10 minutes. Les graines des plants traités, sont immergées dans un volume 30 ml de suspensions bactériennes ajustées à 10⁸ cellules/ml pendant 10 minutes. Après stérilisation 20 minutes à 121°C, le terreau est humidifié avec une solution stérile de 0,01M de MgSO₄

soit 1 litre pour 3 kg de terreau pour les plants témoins et avec une suspension bactérienne à 3×10^7 cellules/ml pour les plants traités. Les graines sont semées dans des pots individuels (4 graines/pot de 10 cm), recouvertes de terreau tamisé stérile, placés ensuite dans une chambre de croissance à une température de 27°C avec une photopériode longue soit 16 heures de lumière par jour (Adam, 2008).

5.5.2 Arrosage et rappel bactérien

Les plants sont maintenus humides par arrosage quotidien avec de l'eau de robinet stérile et une fois par semaine avec de la solution nutritive. Quinze jours après le semis des graines, on procède à un rappel bactérien sur les plants traités, chaque pot est arrosé avec 20 ml de chaque suspension bactérienne ajustée à 1×10^8 cellules/ml obtenue d'une culture en liquide de bouillon nutritif. Les plants témoins sont arrosés par une solution de 0.01 M de $MgSO_4$. Le rappel s'effectue à la base des tiges afin de faire rapprocher les bactéries des racines des plantules.

5.5.3 Récupération des données numériques de croissance

Les paramètres de croissances suivants sont retenus après 24 jours de semis : longueur, largeur et le nombre des "vraies" feuilles, longueur de la tige, longueur de la racine principale et poids frais. A cet effet, un lavage préalable est effectué avec de l'eau de robinet dans un bac en plastique d'environ 75cm x 50cm. Les pots sont immergés dans le bac pendant 5 min, vidés du terreau et les plantes sont ensuite retirées très délicatement, placées dans des pots en plastique, remplie à la moitié avec de l'eau de robinet. Les racines, sont alors récupérées du terreau avec de l'eau courante et à l'aide d'une pissette. Ensuite, les plantes sont pesées après un séchage sur du papier ordinaire et les moyennes des poids frais sont calculées. Ensuite, les paramètres suivants : (longueur, largeur des trois premières feuilles, longueur de la racine primaire et la longueur de la tige) sont calculés à l'aide d'une règle à graduation millimétrique.

5.6 Identification des souches sélectionnées promotrices de la croissance des plantes

5.6.1 Identification morphologique

- **Aspect des colonies**

Les souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance (ME1, MR1, MR6 et MS3) sont soumises à des observations à l'œil nu, sous une loupe binoculaire et sous une lampe UV à une longueur d'onde 366 nm afin d'explorer la présence et l'absence d'une fluorescence.

- **Coloration de Gram et l'observation microscopique**

La purification des souches isolées sélectionnées promotrices de la croissance (ME1, MR1, MR6 et MS3) est précédée par des repiquages successifs. La coloration de Gram et l'observation microscopique permet de distinguer deux grands groupes bactériens ; des bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs avec la détermination de la forme, la taille, et le mode de regroupement. Cependant, l'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes.

5.6.1 Identification moléculaire

5.6.1.1 Extraction et amplification par PCR de l'ADNr 16S

Les 4 souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6, ME1) sont inoculées dans un Erlènmeyer Fiole de 500 ml, contenant un volume de 100 ml de TSB, incubées sous agitation (250 rpm), à une température de 30°C pendant 24 heures.

L'extraction de L'ADN est effectuée selon la méthode décrite par **Liu *et al.* (2000)**, qui consiste à introduire un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL, un volume de 500 µL de la solution de lyse [Tris-HCl [pH 8,0]: 400 mM, EDTA [pH 8,0]: 60 mM, NaCl: 150 mM, Sulfate de sodium dodecyl: 1 %].

Un volume de 150 µL d'acétate de potassium 5 M, 11,5 µL d'acide acétique glacial et 28,5 µL d'eau distillée (Le pH final de cette solution est de 4,8) est ajouté une colonie bactérienne préalablement incubée à température ambiante pendant 10 min. Le mélange est ensuite homogénéisé à l'aide d'un Vortex, centrifugé à une vitesse 0000 g pendant 1 min. Le surnageant est transféré dans un nouvel Eppendorf. Un volume de 'isopropanol est ajouté, homogénéisé et centrifugé à une vitesse 0000 g pendant 2 min.

L'ADN obtenu est lavé avec un volume de 300 µL d'éthanol à une concentration de 70 %, centrifugé à une vitesse de 10 000 g pendant 1 min. Le surnageant est ensuite éliminé, ADN est séché à l'air, et le culot est resuspend dans un volume de 50 µL d'eau bidistillée stérile.

Le fragment de L'ADN, codant la région 16S ARN est amplifié par la technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant un kit Invitrogen et les deux amorces :

fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rD1 (5'AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Un volume réactionnel de 50 µl est préparé en mélangeant : 5 µl du Tampon de PCR 10 x (Tris- HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 9,0 à 25 °C), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 100 pM de chaque amorce, 2 µl de la solution d'ADN et 1,25 U de Taq polymérase.

L'ADNr 16S a été amplifié dans un thermocycleur (De type Stratagene RoboCycler Gradient 96) selon le profil suivant: Dénaturation de l'ADN à 98 °C pendant 3 min, suivi par 35 cycles de 94°C pendant 45 sec, un anelage d'amorce à 53 °C pendant 1 min et une extension d'amorce à 72°C pendant 5 min. Après amplification, le mélange réactionnel est maintenu à 72 °C pendant 5 min et refroidi ensuite à 4 °C.

5.6.1.2 Electrophorèse et visualisation des produits de la PCR

L'amplicon obtenu est visualisé sur gel d'agarose (240 mg d'agarose, Euromedex), dilué dans un volume de 30 ml d'une solution tampon de TAE (Tris Acétate EDTA; Euromedex). Le mélange est ensuite porté à ébullition, additionné d'un volume 10 µl d'une solution de bromure d'éthidium (10 mg/ml). Le gel est coulé sur la plaque d'électrophorèse et les puits de dépôt des échantillons sont formés par positionnant un peigne sur le gel en surfusion.

Après la solidification du gel, les échantillons d'ADN additionné d'une solution tampon contenant 0,25 % de bleu de bromophénol, 40 % (w/v) de saccharose sont déposés dans des puits immergé dans la solution tampon. Un marqueur de taille de 1 Kb DNA Ladder est utilisé pour la détermination des tailles des fragments d'ADN obtenus.

Le générateur d'électrophorèse utilisé est ajusté à 50 V et une température ambiante.

Après la migration des échantillons, le gel est déposé sur un transilluminateur (table UV) et les bandes d'ADN séparées sont visualisées sous une lame ultraviolette UV à 254 nm.

5.6.1.3 Purification des amplifia d'ADN

Les amplicons d'ADNr 16 S sont purifiés à partir du gel d'agarose en utilisant un kit de purification d'ADN Favor Prep Gel/PCR *purification mini kit* (**Annexe 3**) selon les étapes suivantes :

- Les amplicons des 4 souches sélectionnées promotrices de la croissance visualisés sous une lampe à UV et les bandes d'ADN sont coupées minutieusement à l'aide d'un scalpel stérile, transférées dans des microcentrifuge tubes.
- L'élimination du gel est effectuée par l'ajout d'un volume de 500 µl d'ue solution tampon de FADF, incubé à une température ambiante pendant 15 minutes.
- Un volume de 800 µl du gel dilué introduit dans une colonne filtrante, contenue dans un microcentrifuge est centrifugé à une vitesse de 15000 rpm, pendant 30 secondes.

- Ensuite, un volume de 750 μl d'une solution tampon de lavage est ajouté dans la colonne filtrante, et les amplifons d'ADN, sont collectés et la colonne est séchée par centrifugation à sec pendant 30 secondes. Un volume de 40 μl de la solution tampon d'éluion est ajouté sur la colonne, centrifugé pendant 30 secondes et l'ADN est récupéré, conservé à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.6.1.4 Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage de l'ADN amplifié et purifié a été réalisé dans le centre de biotechnologie de Sfax (Tunisie) en utilisant un séquenceur automatique et le même couple d'amorces que lors la PCR.

Les séquences d'ADN, codant la région 16S DNAr des souches sélectionnées promotrices de la croissance sont analysées à l'aide d'un l'outil BLAST (basic local alignment search tool), publiés sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information).

5.7 Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance des traits PGPR isolés *in vitro*

5.7.1 Production de l'acide salicylique

Une courbe standard est initialement préparée en utilisant des concentrations variées de l'acide salicylique (de 2×10^{-4} à 8×10^{-4} M/L), la formule de la droite obtenue est $y = 0,053x + 0,078$ (**Figure 10**) avec un coefficient de détermination R^2 de 0,989 dont : y est la DO à 527 nm et x est la concentration de l'acide salicylique recherchée.

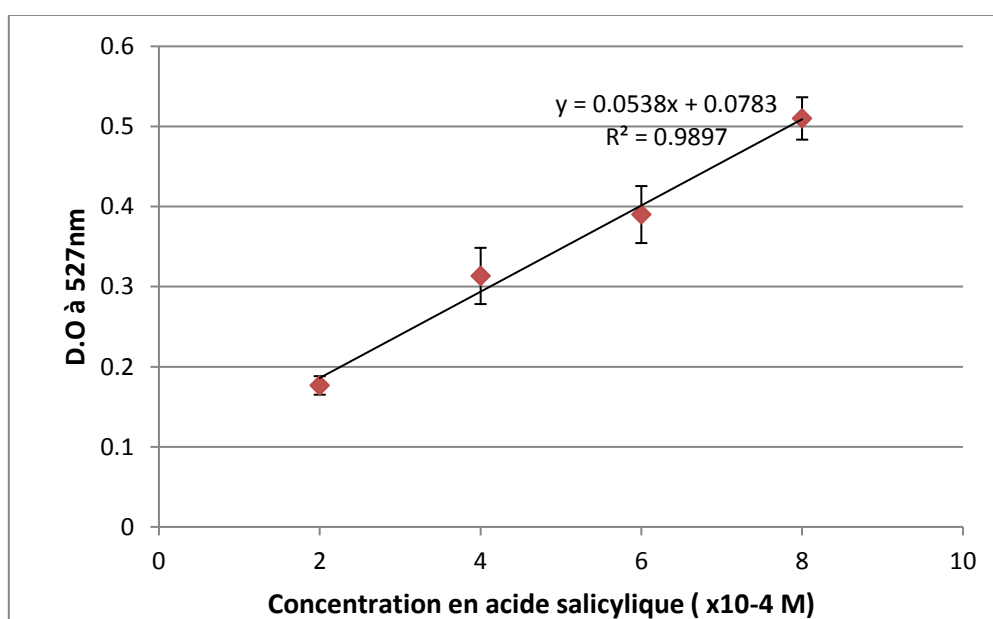


Figure 10. Courbe d'étalonnage standard du dosage de l'acide salicylique préparée par méthode colorimétrique au chlorure de fer (FeCl_3).

La biomasse bactérienne des souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6, ME1) est ajustée à 10^8 cellules/ml. Ensuite, les souches sélectionnées sont ensuite inoculées dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant un volume de 50 ml du milieu de culture de succinate (**Annexe 1**), incubées avec une agitation de 100 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures. La biomasse bactérienne est ensuite récupérée par centrifugation à une vitesse de 6000 g pendant 5 minutes et un volume de 4 ml du surnageant est acidifié avec une solution de 1 N d'HCl à une valeur de pH comprise entre 1.5-2. L'acide salicylique extrait à l'aide d'un volume de 4 ml du chloroforme est ajouté à un volume de 4 ml de l'eau distillée et de 5 µl de FeCl₃. L'absorbance du complexe pourpre fer-acide salicylique est mesurée à une longueur d'onde de 527 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Meyer et al., 1993**). La quantité de l'acide salicylique produite dans la culture est déduite à l'aide de la courbe d'étalonnage standard déjà établie est exprimée en µg/ml.

5.7.2 Fixation de l'azote atmosphérique

La mise en évidence de la fixation de l'azote atmosphérique est effectuée après l'inoculation d'une suspension bactérienne de 1% de chaque une des souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6, ME1) dans des milieux de culture peptoné dépourvus de toute source de l'azote et incubées avec une agitation de 100 rpm à une température de 30°C pendant 72 heures. Un volume de 0,5 ml du réactif de Nessler (**Annexe 2**) est ajouté à chaque tube. La lecture positive de la production d'ammonium se manifeste par le développement d'une couleur brune (**Cappuccino et Sherman, 1992**).

5.7.3 Test de la solubilisation de phosphate

La solubilisation de phosphate inorganique est déterminée qualitativement sur le milieu de culture de Pikovskaya agar (**Annexe 1**), additionné de tricalcium phosphate comme une source insoluble de phosphate. Les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6 et ME1) sont inoculées dans l'eau distillée stérile pendant un intervalle de temps de 5 minutes, pour l'élimination des débris du milieu de conservation. Ensuite, un volume de 10µl des suspensions bactériennes est inoculé dans des puits sur Pikovskaya agar, incubée à une température de 30°C pendant 7 jours. Une lecture positive de la solubilisation du phosphate se manifeste par la formation d'une zone claire autour des colonies (**Alam et al., 2002**). La mesure de l'index de solubilisation du phosphore est effectuée selon la formule suivante :

$SI = \frac{\text{diametre de la colonie} + \text{diametre de la zone claire}}{\text{Diametre de colonie}}$

Diametre de colonie

SI (solubilisation index) : Index de solubilisation.

5.7.3 Production des auxines (acide indole acétique)

La courbe d'étalonnage standard de l'acide indole acétique est établie par l'utilisation des étalons dilués et traités avec le réactif de Salkowsky (**Annexe 1**). La lecture de leurs absorptions est effectuée à une longueur d'onde de 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, les valeurs obtenues sont utilisées pour tracer une courbe de tendance dont la formule de la droite obtenue est $y = 0.0059x + 0.0312$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,998$ (y : DO 535, x : concentration en acide indole acétique).

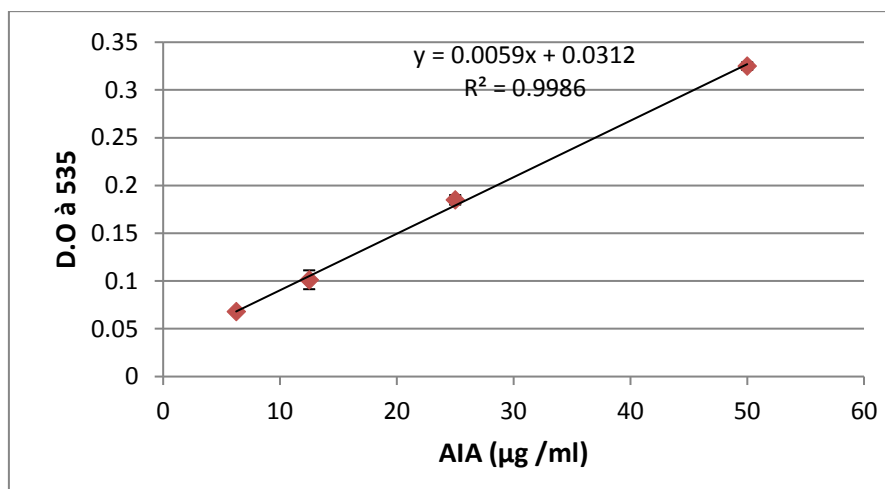


Figure 11. Courbe d'étalonnage standard du dosage de l'acide indole acétique.

Les suspensions bactériennes des 4 souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6 et ME1) sont ajustées à 10^8 cellules/ml, inoculées dans des Elenmeyers de 250 ml contenant un volume de 50 ml de bouillon LB (**Annexe 1**), supplémenté d'un volume de 100 µg/ml de tryptophane comme précurseur de l'acide indole acétique, incubées à 30°C avec une agitation de 75 rpm pendant 7 jours. Un volume de 1 ml du surnageant récupéré par centrifugation à une vitesse de 15000 rpm pendant 10 minutes, additionné de 2 gouttes d'acide orthophosphorique et un volume de 4 ml du réactif de Salkowsky (**Annexe 2**). Le mélange est conservé pendant un intervalle de temps de 20 minutes à l'abri de la lumière et l'absorbance du complexe rose développé est mesurée à une longueur d'onde de 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Khakipour et al.,2008**).

5.8 Mise en évidence de l'effet antagoniste des souches PGPR isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate contre le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*

5.8.1 Mise en évidence de l'effet antagoniste des souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate *in vitro*

L'activité antifongique des souches sélectionnées promotrices de croissance vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* sur la gélose PDA (**Annexe 1**) est mise en évidence par la technique « *Dual Plate Assay* » (**Lee et al., 2010**). A cet effet, un fragment de mycélium fongique ($\varnothing = 6$ mm) âgé de 7 jours est sectionné, est prélevé à l'aide d'une pièce métallique à partir de la gélose PDA, déposé au centre d'une nouvelle boîte de Pétri. Un volume de 5 μ l de suspension bactérienne est introduit dans le bouillon nutritif, incubé à une température de 25°C pendant un intervalle de 5 à 7 jours. Le témoin est incubé avec de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* en absence des souches sélectionnées promotrices de croissance.

Le taux d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{(x - y)}{y} \times 100$$

Sachant que:

X : Diamètre du mycélium control (en mm).

Y : Diamètre du mycélium en présence de la bactérie (mesuré sur l'axe « champignon-colonie bactérienne, en mm).

5.8.2 Mise en évidence de l'activité protectrice des souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici in vivo*

5.8.2.1 Préparation et traitement des graines de tomate

Les graines de tomate *Lycopersicon esculentum* sont désinfectées dans un premier temps par trempage dans une solution de 2,4 % de sodium hypochlorite (NaOCl) pendant 2-3 pendant 5 minutes, rincées avec de l'eau distillée stérile et séchées avec air filtré pendant 2 heures (**Landa et al., 2001**).

Les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6 et ME1) sont ensemencées dans un bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures, ajustées à une densité optique initiale de 1, mesurée à une longueur d'onde de 570 nm. Les graines de tomates sont inoculées par immersion avec les suspensions

souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6 et ME1), pendant une heure. Par ailleurs, les graines des lots « témoins » sont immergées dans de l'eau physiologique stérile pendant une heure (Lee et al., 2010).

5.8.2.2 Préparation de la suspension fongique et infection des graines par l'agent phytopathogène

Une suspension fongique est préparée à partir des cultures sur un milieu PDA de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* en grattant la surface du mycélium fongique à l'aide d'une pipette pasteur stérile en râteau, les spores sont ensuite collectées par remplissage des boîtes de Pétri avec de l'eau distillée stérile, récupérées ensuite dans des béchers stériles après un intervalle de temps d'une heure (Johansson, 2003). Les graines de tomate inoculées avec les suspensions bactériennes sont récupérées et placées dans des béchers contenant une suspension fongique.

5.8.2.3 Semis des graines traitées

Le semi des graines de tomate inoculée avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance, infectées avec *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* est effectué dans des godets en plastique de 3 trous pour 3 graines, contenant du terreau humide stérile et les pots sont ensuite placés dans une chambre de croissance à 27°C avec une photopériode longue soit 16 heures de lumière par jour.

5.8.2.4 Récupération des paramètres de croissance

La lecture est effectuée après 24 jours de culture des plants afin d'explorer l'efficacité du traitement bactérien et fongique. Dans un pot en plastique rempli d'eau, les plantes sont enlevées soigneusement, émergées dans l'eau pour l'élimination de toutes les traces de terreau restant jointes des racines. Un nettoyage final avec de l'eau du robinet et un séchage sont procédés avant de mesurer les paramètres de croissance (la longueur de la tige, la longueur de la racine principale, la longueur et largeur de la feuille).

5.9 Expérience d'induction de résistance systémique chez les plants de tomate *in vivo* souches sélectionnées promotrices de la croissance

L'effet protecteur des souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6, ME1) via l'induction d'une résistance systémique (ISR) dans le pathosystème : tomate/*Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, est évalué sur les plants âgés de 5 semaines lors de l'infection avec *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, afin de permettre aux bactéries d'établir des interactions moléculaires compatibles avec la plante hôte avant l'application de l'agent pathogène.

Une approche biochimique est mise en oeuvre pour l'étude des réponses chez les tomates inoculées avec souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6, ME1), et infectées avec *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* et l'exploration des molécules associées aux réactions d'élicitation de la résistance (ISR) chez la tomate.

5.9.1 Inoculation et semis des graines

Les graines de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill., cv. ont subi une désinfection avec une solution de sodium hypochlorite (NaOCl) à une concentration de 2,4%, pendant 2-3 minutes, rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile, séchées avec de l'air filtré pendant 2 heures (**Landa et al., 2001**). Les graines des lots témoins sont trempées dans un volume de 30 ml d'une solution de 0,01 M MgSO₄ stérile pendant 10 minutes. Les plants traités sont immergés dans un volume de 30ml des suspensions bactériennes sélectionnées promotrices de la croissance (ME3, MR1, MR6, ME1), ajustée à 10⁸ cellules/ml avec une solution de 0,01 M MgSO₄, pendant un intervalle de temps de 10 minutes. Le semis des graines est ensuite réalisé dans des pots en plastique de 10 cm, contenant le terreau stérile humidifié avec une solution stérile de 0,01 M MgSO₄.

Les lots sont organisés comme suit :

- Le premier lot des graines inoculées avec la souche MS3.
- Le deuxième lot des graines inoculées avec la souche MR1.
- Le troisième lot des graines inoculées avec la souche MR6.
- Le quatrième lot des graines inoculées avec la souche ME1.
- Le cinquième lot des graines témoins non inoculées avec les isolats.
- Le sixième lot des graines non inoculées avec les suspensions bactériennes, infectées avec *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*.

Les lots sont ensuite incubés dans une chambre de croissance à 27°C avec une photopériode de 16 heures de lumière par jour, arrosés quotidiennement avec de l'eau distillée stérile, et chaque semaine par une solution nutritive. 15 jours après le semis, un rappel bactérien sur les plants inoculés est procédé, chaque pot est arrosé avec un volume de 20 ml des suspensions bactériennes de chaque souche ajustées à 10⁸ cellules/ml.

5.9.2 Infection des plants de tomate par le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*

La suspension fongique est préparée à partir des cultures âgées de 7 jours de *Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici*, sur un milieu de culture PDA en grattant avec une pipette pasteur stérile en râteau la surface du mycélium fongique. Les spores sont ensuite collectées en remplissant les boîtes de Pétri avec de l'eau distillée stérile qui est ensuite récupérée dans des tubes stériles. Les plants de tomate âgés de 24 jours sont infectés avec *Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici* par l'ajout d'un volume de 5µl de la suspension fongique à l'aide d'une micropipette dans chaque lot de graines traitées par les souches bactériennes et le lot des plants témoins non traités (Lee et al., 2010).

5.9.3 Evaluation de la maladie

L'infection est évaluée 5 jours, et 8 jours après l'infection, le taux des plantes infectées est estimé par l'examen du brunissement vasculaire. L'indice de flétrissement basé sur les symptômes foliaires observés sur chaque plante donne une évaluation du degré de flétrissement des plantes et le taux de réduction de la maladie :

0 : Absence de symptôme

1 : Jaunissement d'une foliole ou d'une feuille

2 : Jaunissement sur 1 à 2 feuilles

3 : Jaunissement sur plus de 2 feuilles

4 : Jaunissement et dessèchement de la majorité des feuilles.

5. La mort de la plante.

5.9.4 Récupération du matériel végétal

Les plants sont enlevés après une période de 28 jours après le semis et l'infection. Les feuilles récoltées de chaque lot, gelées dans de l'azote liquide, conservées à une température -80°C pendant 24 heures, sont broyées dans un mortier refroidi à l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

5.9.5 Extraction et dosage des phytoalexines par HPLC

L'extraction des phytoalexines est procédée selon le protocole décrit par Adam, (2008). La poudre des feuilles inoculées avec des souches sélectionnées récupérées, est analysée pour la détermination des teneurs en phytoalexines par HPLC.

5.9.5 .1 Préparation de l'échantillon des phytoalexines

Extraction au méthanol

Un volume de 10 ml de méthanol à une concentration de 80 % est ajouté à une pesée de 1 g de la poudre végétale. Le mélange obtenu est incubé avec une agitation à température ambiante et à l'ombre pendant 20 heures, filtré sur papier Whatmann n° 1.

Ensuite, le filtrat récupéré est conservé à température 4°C. Une seconde extraction est précédée à l'aide par l'ajout d'un volume de 10 ml de méthanol sur les tissus pendant 4 heures. Les deux filtrats obtenus sont rassemblés, séchés à l'aide d'un rotavapor et le résidu sec est resuspend dans un mélange de 2 ml de MeOH pur et 2 ml d'eau.

- **Extraction liquide liquide**

Dans le but d'éliminer les molécules très apolaires non désirées, une extraction à l'hexane est effectuée. A cet effet, un volume de 4 ml de l'échantillon est ajouté à un volume d'hexane. Le mélange obtenu est incubé avec une agitation à température ambiante et à l'ombre plusieurs fois, décanté. La phase d'hexane est récupérée. De la même manière, une extraction avec l'éther diéthylique est effectuée pour la récupération des phytoalexines libres. L'hydrolyse acide sur la phase aqueuse permet la libération des phytoalexines, rencontrées sous forme conjuguée. A cet effet, un volume de 4 ml de 4 N de l'acide chlorhydrique est ajouté au mélange, incubé au bain marie à une température de 100°C pendant un intervalle de 90 min, puis refroidi et les différents extraits obtenus sont séchés à l'aide d'un Speed-Vac.

5.9.5.2 Analyse des extraits méthanoliques

Les échantillons hydrolysés et non hydrolysés obtenus sont analysés par HPLC, technique appropriée aux analyses de composés phénoliques. Les échantillons sont centrifugés à une vitesse de 8000 rpm pendant un intervalle de temps de 10 minutes et un volume de 20 µ est injecté sur une colonne analytique (C18). L'élution est effectuée à l'aide de deux solvants : - A (équilibration) : eau milliQ + acide acétique 0,1 %.

- B (élution) : acetonitrile, à une température ambiante. Les molécules élués sur la colonne sont détectées à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes avec balayage et l'absorbance est effectuée à des longueurs d'onde comprise entre 200-500 nm. Le programme d'élution est illustré sur le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Présentation du programme d'élution des phytoalexines analysés par HPLC.

Temps	% A	% B	Débit (ml/min)
0	95	5	0,25
2	95	5	0,25
2,5	95	5	1
5	95	5	1
15	70	30	1
25	60	40	1
40	55	45	1
50	40	60	1

60	35	65	1
65	5	95	1
75	5	95	1
76	95	5	1
83	95	5	1

Chapitre 6 : Résultats

6.1 Screening des rhizobactéries à traits PGPR

L'étalement des prélèvements racinaires et rhizosphériques effectués sur la gélose nutritive, et l'incubation à une température de 30°C pendant un intervalle de 48 heures a permis l'isolement de 22 souches bactériennes, sélectionnées sur la base de leur abondance. Les souches isolées sont purifiées par des repiquages successifs sur la gélose nutritive. Une coloration de Gram des souches isolées et l'observation microscopique a permis de visualiser la forme, la couleur et l'aspect des colonies isolées. Les résultats illustrés dans le **Tableau 4**, ont montré que la majorité des souches isolées appartiennent aux bactéries à Gram positive. Les 6 isolats bactériens obtenus à partir de rhizosphère de tomate sont désignés (MR1, MR2, MR3, MR4, MR5, MR6). Cependant, les 8 isolats obtenus à partir de la surface racinaire sont désignés de MS1 à MS8. Par ailleurs, les 8 isolats endophytiques sont désignés de ME1 à ME8.

Tableau 4: Origine des prélèvements, caractères morphologiques des espèces bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de tomate.

Isolats	Origines	Forme des colonies	Couleurs des colonies	Réaction de Gram
MR1	RH	Petite, arrondie	Beige	-
MR2	RH	Petite, arrondie	Blanche	-
MR3	RH	Large, arrondie	Blanche	-
MR4	RH	Moyenne, arrondie	Beige	+
MR5	RH	Petite, arrondie	Jaune	+
MR6	RH	Petite, arrondie	Beige	-
MS1	RS	Petite, arrondie	Blanche	-
MS2	RS	Moyenne, arrondie	Blanche	+
MS3	RS	Petite, arrondie	Beige	+
MS4	RS	Petite, arrondie	Blanche	+
MS5	RS	Petite, arrondie	Blanche	-
MS6	RS	Petite, arrondie	Beige	-
MS7	RS	Moyenne, irrégulière	Jaune	+
MS8	RS	Large, irrégulière	Beige	+
ME1	RE	Large round	Blanche	-
ME2	RE	Petite, arrondie	Blanche	+
ME3	RE	Petite, arrondie	Jaune	+
ME4	RE	Moyenne, arrondie	Jaune	+
ME5	RE	Petite, arrondie	Beige	+
ME6	RE	Moyenne, arrondie	Beige	+
ME7	RE	Moyenne, arrondie	Beige	+
ME8	RE	Petite, arrondie	Jaune	+

RH : rhizosphère RS : Surface racinaire RE : bactéries endophytes

6.2 Evaluation de potentiel de promotion de la croissance des plants de tomate *in vivo* par les isolats bactériens sélectionnés

L'étude de l'effet promoteur de la croissance des tomates traitées avec les 22 souches bactériennes issues du premier screening est mise en évidence *in vivo* afin de sélectionner les souches les plus pertinentes.

L'effet promoteur des 22 souches bactériennes sélectionnées est évalué par le traitement des graines de tomate par chaque isolat bactérien, après 24 jours de semis dans des conditions de cultures contrôlées, les paramètres de croissance suivants tels que le nombre, longueur et largeur des "vraies" feuilles, longueur de la tige, longueur de la racine principale et poids frais et les taux d'amélioration de la croissance sont déterminés.

- **Pois frais**

Un taux d'amélioration très important du poids frais des plants inoculés avec les isolats, sélectionnés promotrices de la croissance de la tomate est observé par rapport aux plants non traités (qui ont marqué un taux de 0,53 g).

Les plants de tomate traités avec la souche MS3, ont montré une amélioration de 224% (1,72 g) par rapport aux témoins non traités. Par ailleurs, le traitement des plants de tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (ME7, ME8) ont montré des taux d'amélioration de 200 % (1,59 g), de 181 % (1,49 g) respectivement (**Figure 12**).

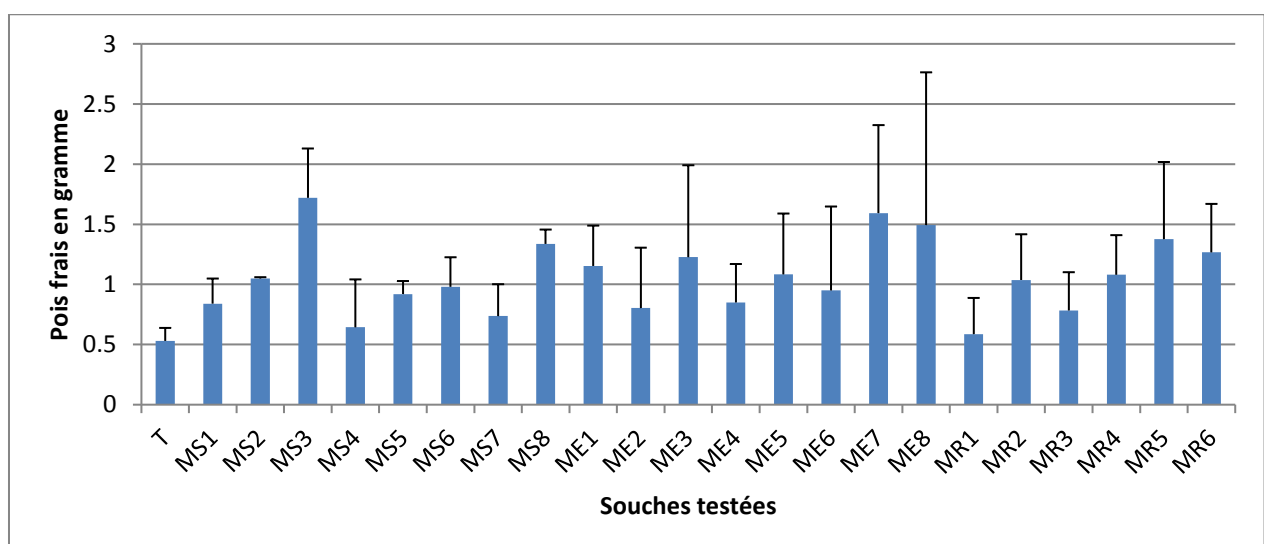


Figure 12. Evaluation du poids frais des plantes traitées avec les 22 isolats de culture de tomate.

- **Longueur de la racine principale**

La longueur moyenne des racines principales a révélé une bonne progression chez la majorité des plantes inoculées par rapport à celle des témoins (7,76 cm), accompagnée avec une intensification de la densité de la chevelure racinaire, une meilleure amélioration est observée chez les souches MS2 et ME6 (121 %, soit 17,5 cm). Le traitement des plants de la tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (ME1, MS3) a montré des taux d'amélioration de la longueur moyenne des racines de (121%, 17 cm), (191%, 22,33 cm) respectivement. Cependant, un raccourcissement de la longueur moyenne des plantes traitées avec les souches (MR3, MR1) de (-15 %, 6,5 cm) et (-8 %, 7 cm) est observé par rapport à la longueur du lot control non traité, accompagné avec une intensification de la masse de la chevelure racinaire (**Figure 13**).

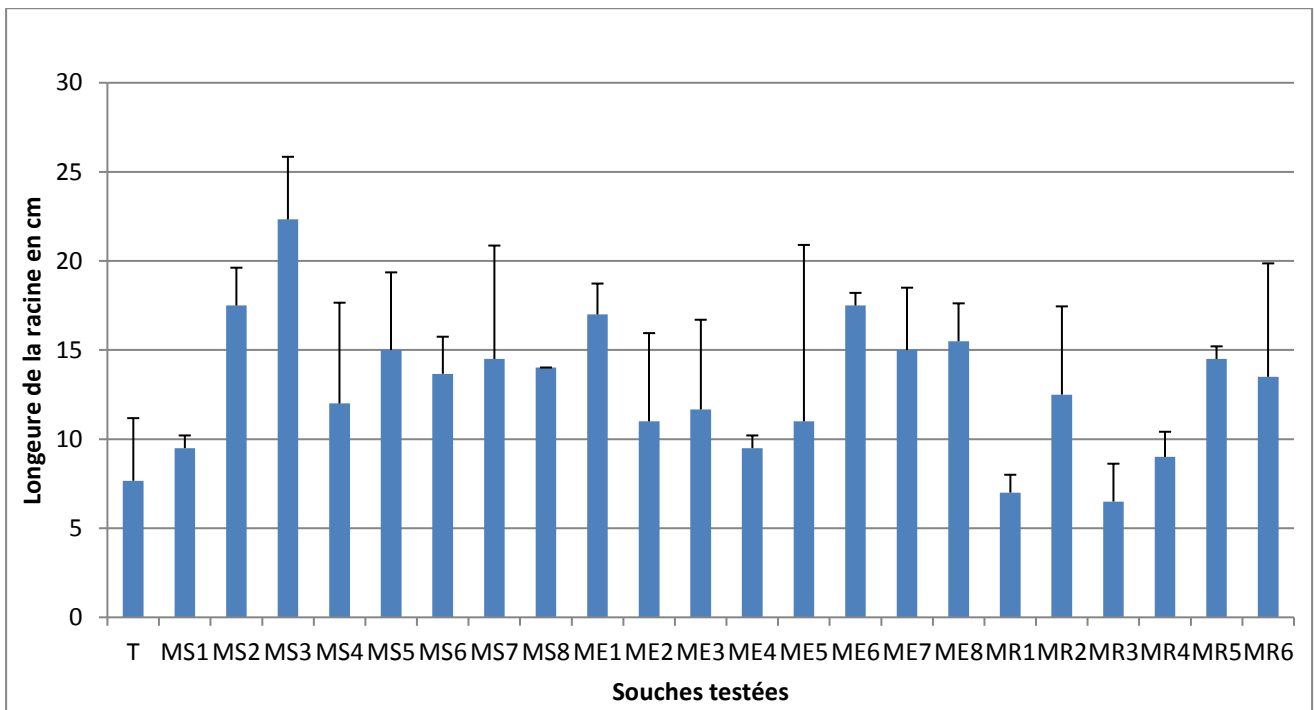


Figure 13. Evaluation de la longueur des racines principales des plantes traitées avec les 22 isolats de culture de tomate.

- **Longueur de la tige**

Le traitement des plants de la tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR6, MS3, MR4) a montré des taux d'amélioration de la longueur de la tige de (97, 80, 77 cm) respectivement par rapport aux contrôles non inoculés, accompagné avec une excellente amélioration de l'épaisseur et du volume de la tige (**Figure 14**).

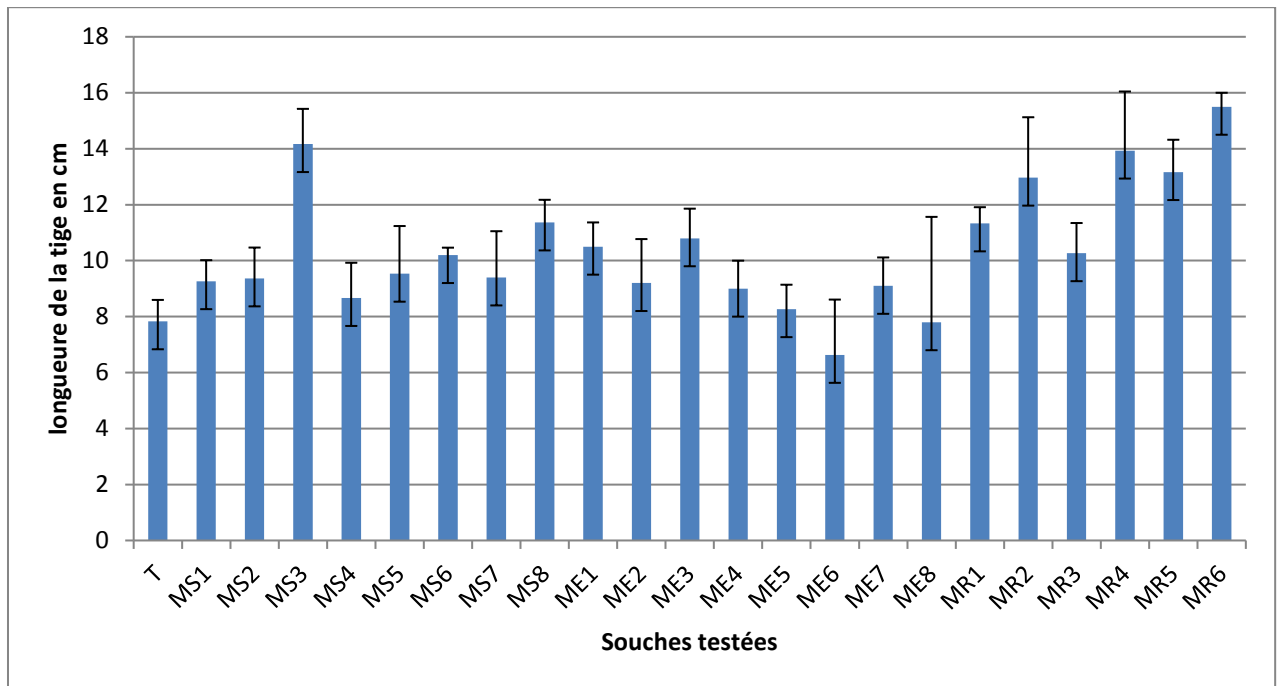


Figure 14. Evaluation de la longueur de la tige des plantes traitées avec les 22 isolats de culture de tomate.

- **Le nombre des vraies feuilles**

Le traitement des plants de la tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR6, MR4) a montré une amélioration des nombre des feuilles de 77 % jusqu'à 233 % respectivement par rapport aux témoins non inoculés, accompagné avec le développement de 3 vrai feuilles après 24 jours d'incubation. Par ailleurs, le traitement des plants de la tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS1 et MS3) a montré le développement de 10 vrai feuilles après la même période d'incubation (**Figure 15**).

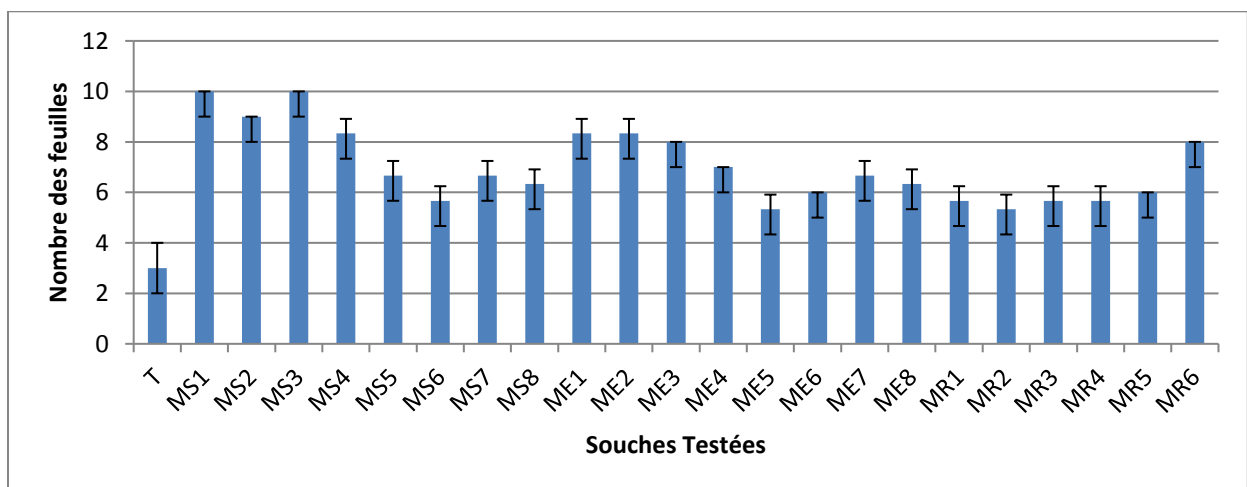


Figure 15. Evaluation de nombre des feuilles des plantes traitées avec les 22 isolats de culture de tomate.

- **Longueur des feuilles**

Le traitement des plants de la tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance a montré une nette amélioration de la longueur des feuilles chez la totalité des lots traités. Cependant, les lots traités avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR1, ME1 et MS7) a montré une moyenne respective de (3,84, 3,8, 3,8 cm) par rapport au lot témoin (2,6 cm).

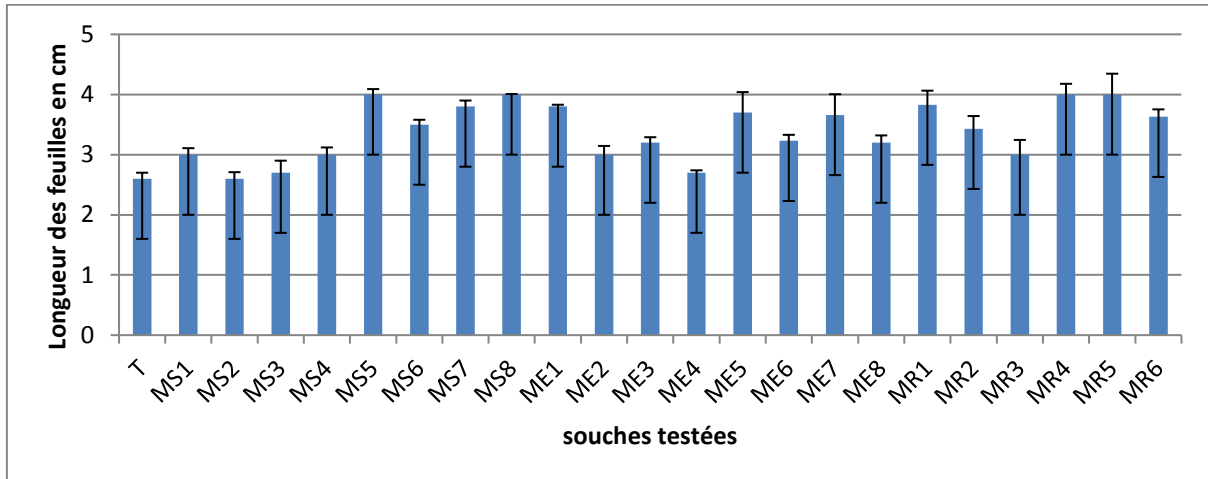


Figure 16. Evaluation des longueurs des feuilles des plantes traitées avec les 22 isolats de culture de tomate.

- **Largeur des feuilles**

Lors de la mesure de la largeur des premières vraies feuilles, une amélioration considérable chez la totalité des lots inoculés avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance est observée. Les plantes traitées avec les souches (ME1 et MS4) ont montré une moyenne des feuilles de 4 cm, représentant un avantage par rapport aux moyennes des feuilles de 2 cm du lot témoin (**Figure 17**).

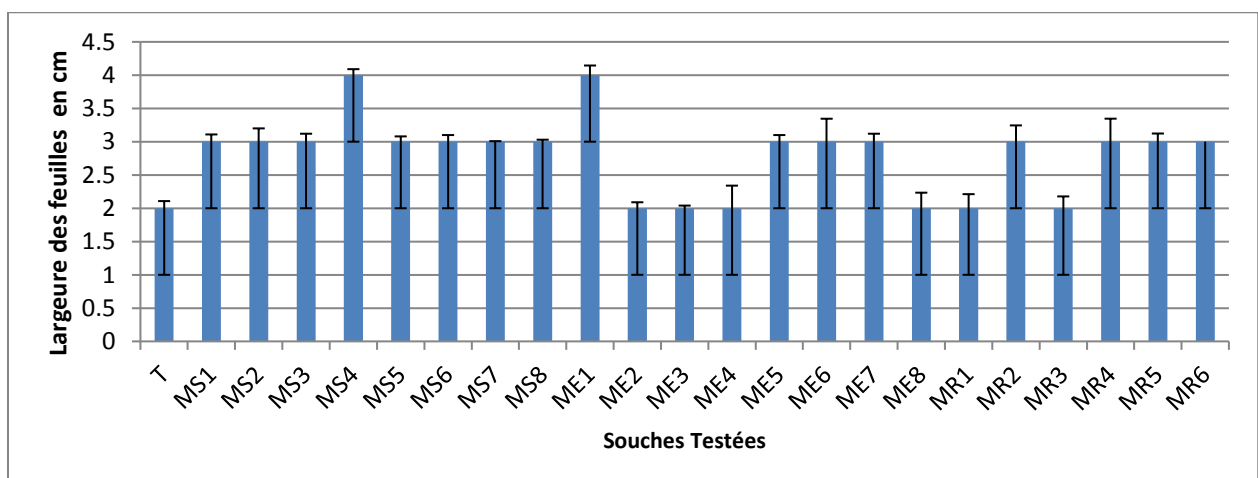


Figure 17. Evaluation des largeurs des feuilles des plantes traitées avec les 22 isolats de culture de tomate.

6.3 Sélection et identification moléculaire des souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance

6.3.1 Sélection des souches promotrices de la croissance de la tomate

A l'issue du test de promotion de la croissance effectués *in vivo*, les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6, et ME1) ont révélé des taux d'amélioration très élevés, avec une nette accélération de la germination et la croissance des plantes de tomates par rapport aux autres isolats et aux témoins (**Figure 18**). A cet effet, les 4 souches sont retenues pour la caractérisation de leurs potentiel PGPR, une éventuelle identification moléculaire, et l'exploration de leur potentiel d'induction de la résistance systémique dans le pathosystème tomate/ *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*.

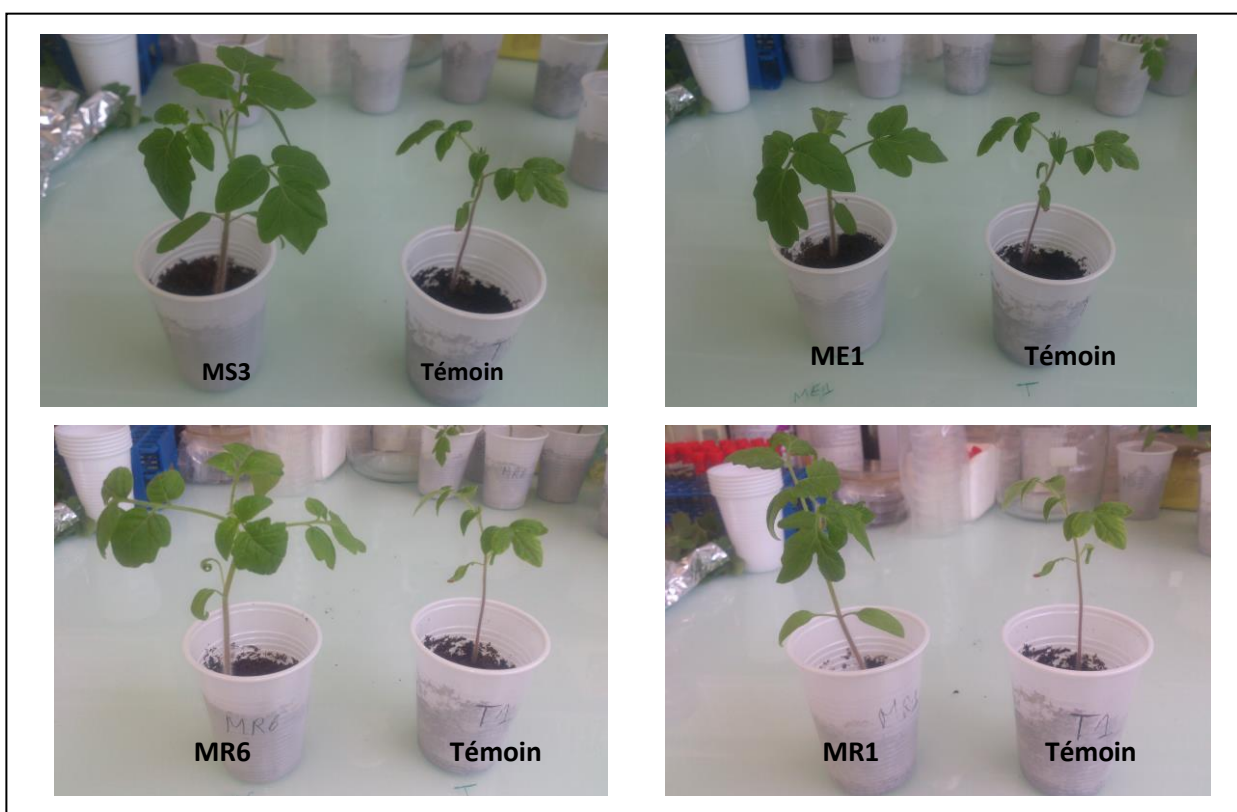


Figure 18. Promotion de la croissance de tomate par les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, MR1, MR6, et ME1), après 24 jours de culture.

6.3.2 Le séquençage de l'ADNr 16S et l'identification génétique des souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate

6.3.2.1 Identification génétique des souches sélectionnées promotrices de la croissance de tomate

Les séquences (reverse et forward) de l'amplicon de 779 pb (**Figure 19**) de la souche sélectionnée promotrice de la croissance de tomate MS3 amplifiées par PCR et purifiées ont montré un degré d'homologie de 96 % avec la séquence de l'espèce bactérienne *Microbacterium arthrosphaerae* strain CC-VM-Y 16S ribosomal RNA gene déposée dans la banque de données GenBank accessible avec l'identité NR_117046.1.

>MS3-FD1

```
GTCTGTGGATAGTGGCGACGGGTGAGTAACCGTGAGCACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGC
TGGAAACGGCGTCTAATACTGGATACGAACCGCGAAGGCATCTTCAGTGGTTGGAAAGATTTT
TTGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCCG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTC
AGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGTTTGTGCGGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCA
ACCTCGGGCCTGCATGGGTACGGGCAGACTAAAGTGCGGAGGGAATTGGGAATTCCTGGTGTGTA
ACGTGGAATGCCAATATCAGAGAAACCCATGGCGAAGCATCTCTG.
```

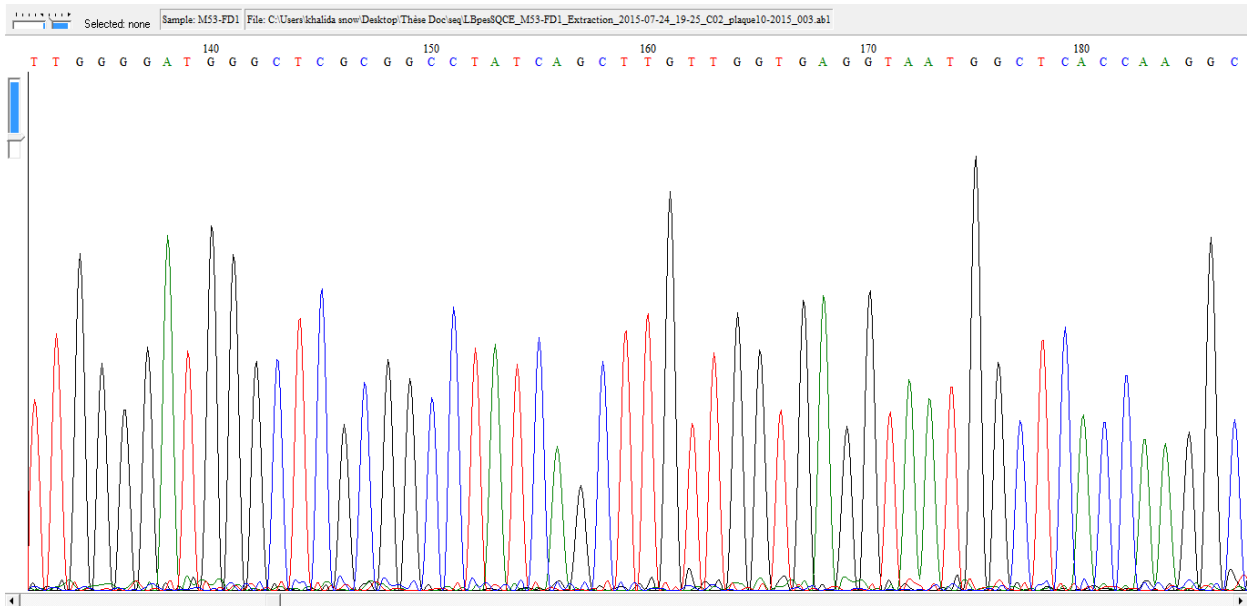


Figure 19. Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate MS3.

Les séquences de l'ADNr 16 S de la souche isolée promotrice de la croissance de tomate MR6 de 773 pb (**Figure 20**) amplifiées par utilisation des primers fD1 et rD1 sont analysées par l'outil blast et ont montré un degré d'homologie de 99 % avec l'espèce

Rahnella aquatilis Strain DMS 4594 16S ribosomal RNA gene, déposée dans le GenBank avec l'identité NR_025337.1.

>MR6-RD1

```
ACTTTCCCAGCTATGAATACAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTT
TTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTA
GCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCC
GGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTCGCTTCTCTTTGTATATGCC
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATA
AGGTTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC
AGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACTAAGCCATCTCTGGCGAATTCCGTGGATGTCAAG
AGTAGGTAAGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTT
AGTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGG
GGCCCCGCTTTCGCAC.
```

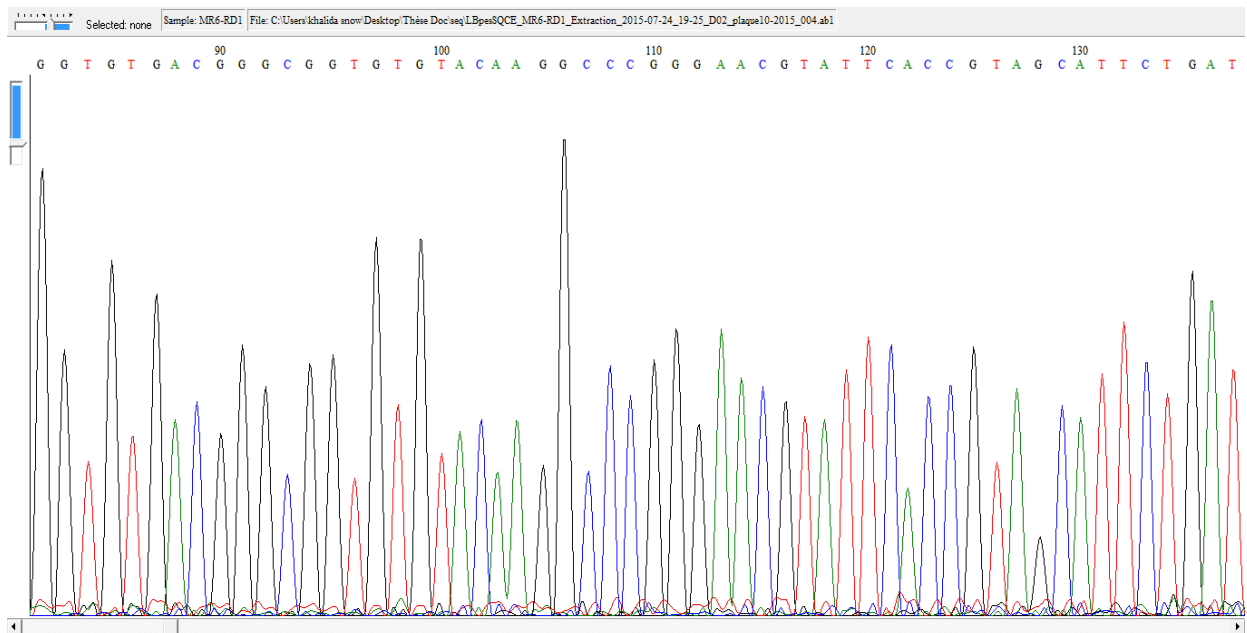


Figure 20. Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate MR6.

La séquence ADNr 16S de la souche sélectionnée promotrice de la croissance de tomate ME1 de 821 pb (**Figure 21**) a montré un degré d'homologie de 92 % avec la séquence de la souche *Pseudomonas putida* KT2440 déposé dans le GenBank accessible avec l'identité NC_002947.4.

>ME1-RD1

GACTTACCCCTCATGAATCACACCGTGGTAACCCCTCCCGAAGGTTAACTACTACTTCTTGC
 AACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCACATT
 CTGATGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCAGAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGA
 TCGGTTTTGTGAGATTAGCTCTCGCGGCTTGGCACCTTGTAACCATTGTAGCACGTGTGTAGC
 CCRGCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTC
 TCCTTAGAGTGCCACTACSTGTGGTAACTAAGGACAAGGGTGCTCGTTACGGATTAACCCAA
 CTTACGACACRAGTGACACAGCCATGCACACTGTGTCAAAGTTCCCAAGGCACCAATCCATC
 TCTGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCA
 CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTC
 CCCAGGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAGGGATTCCACGCTATTGAC
 ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCACGCTTCCACCTCAG
 TGTCAGTATCAGTCCAGGGTCCCTTCCACGGTGTCTTCTATATCTACGCATTTTCMCCGCT
 CCGGAAA.

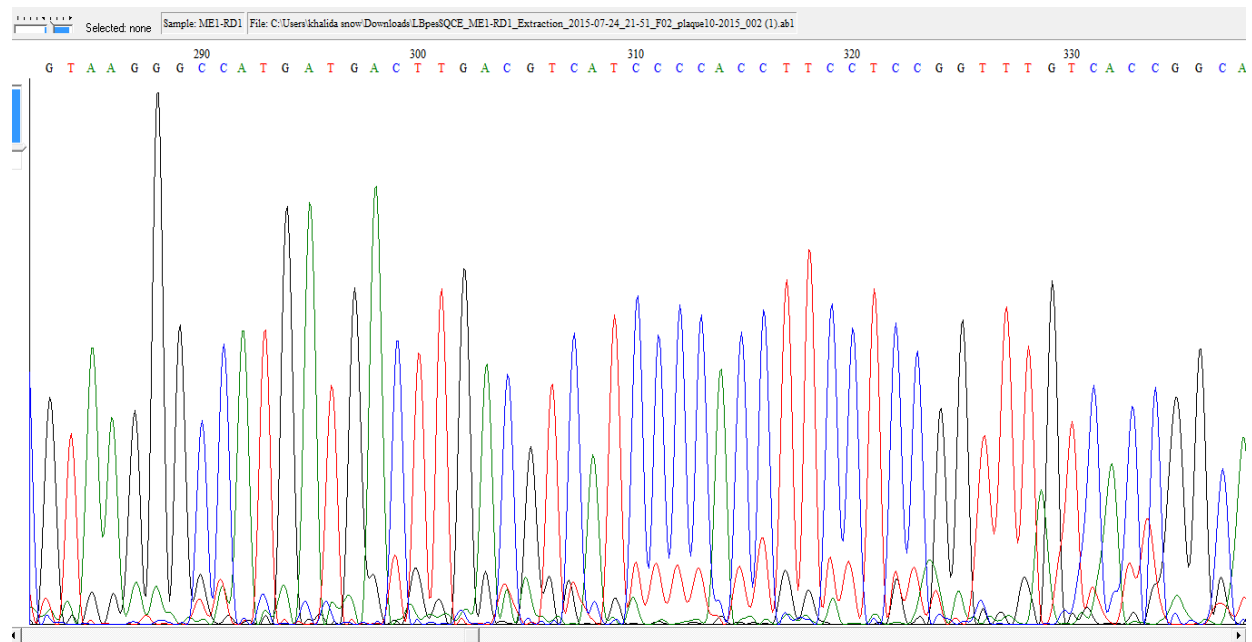


Figure 21. Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate ME1.

La séquence de la souche sélectionnée promotrice de la croissance de tomate MR1 de 767 pb (**Figure 22**) a montré un pourcentage d'homologie de 99% avec la séquence de la souche *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ATCC 19860 déposée dans le GenBank avec l'identité NC_015138.1.

>MR1-RD1

```

AGCACGRAACCCTGCCGTGGTAATCGCCCTCCTTGCGGTTAGGCTAACTACTTCTGGCAGAAC
CCGCTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCT
GATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTAC
GACTGGCTTTATGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTAT
GACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTCCTCCGGT
TTGTCACCGGCAGTCCCATTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAATGGCAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTAT
GGCTCTCTTTCGAGCACTCCTCTATCTCTAAAGGATTCCATACATGTCAAAGGTGGGTAAGGT
TTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTC AATTCCT
TTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACT
GAGTCAGTGAAGACCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGACTACCGGGTATCTAATC
CTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCA
TCGGTGT.

```

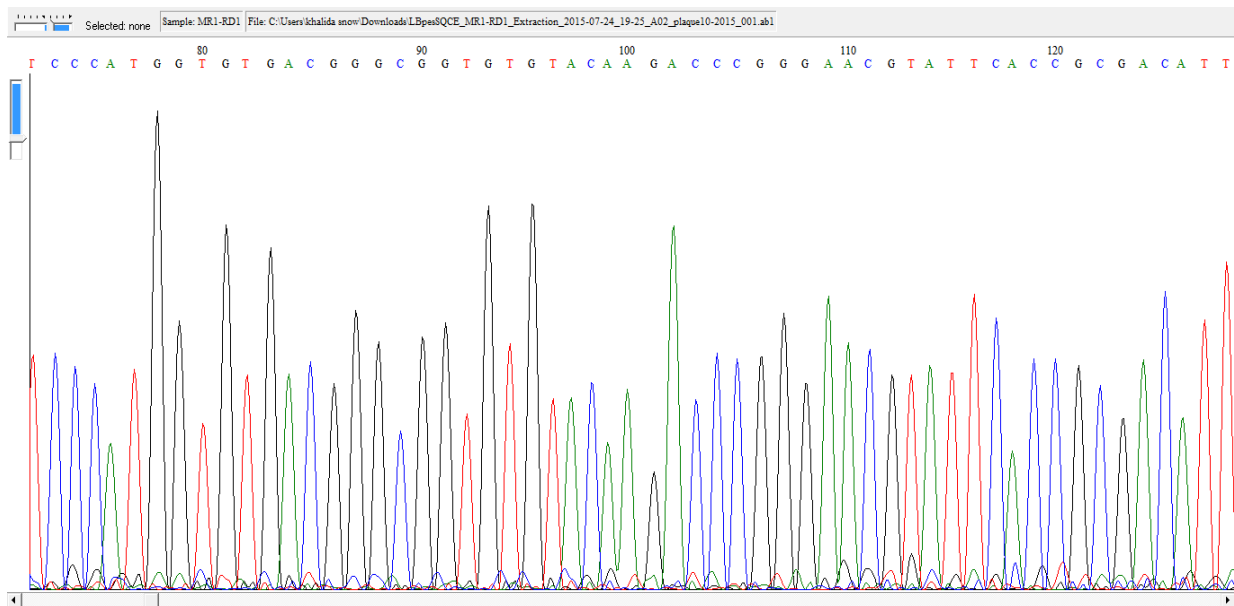


Figure 22. Présentation d'une séquence partielle d'ADNr 16 S de la souche isolée, sélectionnée et promotrice de la croissance de tomate MR1.

6.3.2.2 Analyse et construction de l'arbre phylogénétique

L'utilisation de l'alignement multiple des séquences consensus des souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate (ME1, MR1, MR6 et MS3) avec des espèces apparentées (**Figure 23**) a permis la construction de l'arbre phylogénétique à l'aide du programme MEGA 7 par l'utilisation de la méthode de *Neighbor-joining*,

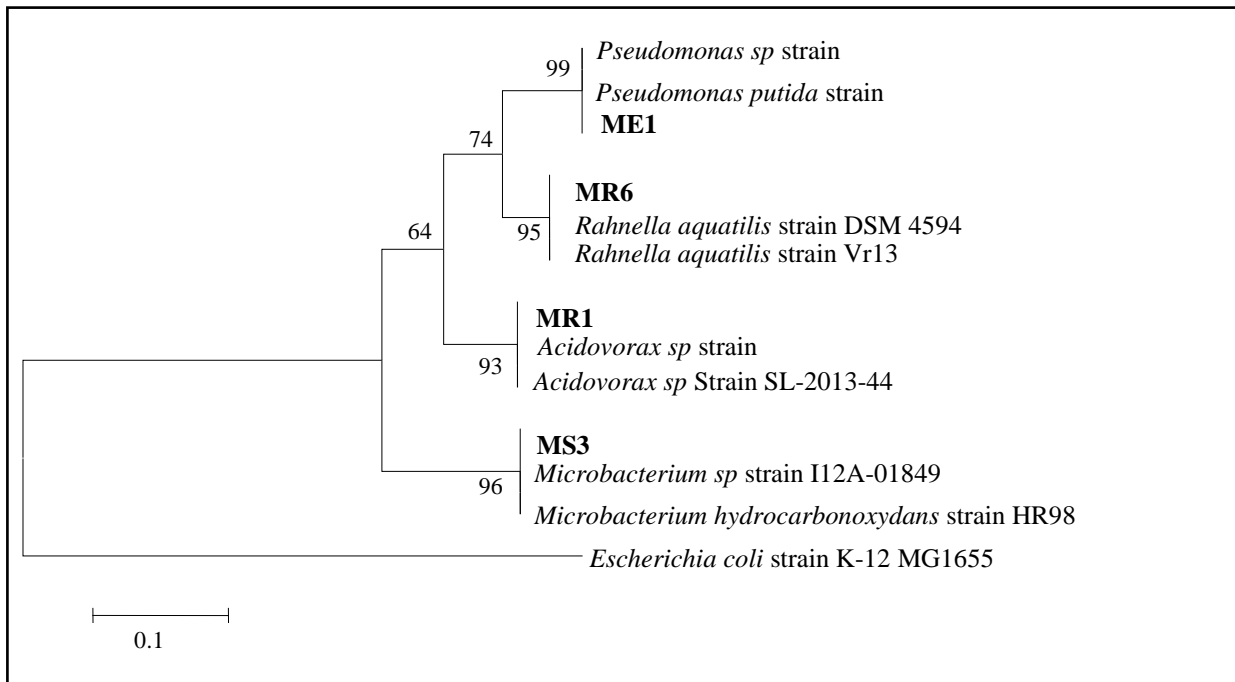


Figure 24. Arbre phylogénétique présentant la distance évolutive entre les souches sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (ME1, MR1, MR6 et MS3) et d'autres taxons (la barre 0,1 indique la substitution par position de nucléotide).

6.4 Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance *in vitro* des traits PGPR sélectionnés

L'étude des propriétés PGPR, a montré que les rhizobactéries sélectionnées se comportent comme des PGPR. De façon intéressante, ces bactéries peuvent synthétiser l'AIA et l'ammonium et également solubiliser le phosphate et produire l'acide salicylique. Ces propriétés confèrent donc la caractéristique de PGPR à ces rhizobactéries.

6.4.1 Production de l'acide salicylique

L'étude de la production de l'acide salicylique est d'un intérêt particulier, expliqué par son rôle majeur dans les différentes voies métaboliques complexes conduisant à la production de certains antibiotiques impliqués dans l'induction de la résistance systémique chez les plantes. La quantité de l'acide salicylique produite chez les 4 souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de plantes, inoculées sur milieu de culture de succinate, incubées pendant 48 heures est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 529 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration de l'acide salicylique produit ($\mu\text{g/ml}$) est déduite à partir de la courbe d'étalonnage standard (**Figure 25**). Les résultats obtenus ont montré une production

maximale de l'acide salicylique de (27.74 ± 0.09 , 25.39 ± 0.4 , $\mu\text{g/ml}$) chez les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR1, MS3).

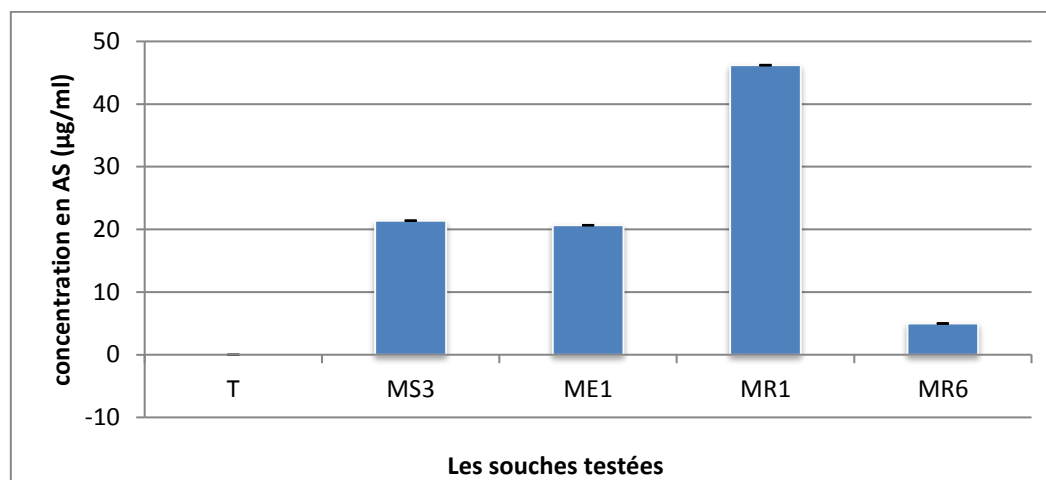


Figure 25. Détermination de la concentration de l'acide salicylique ($\mu\text{g/ml}$), par dosage colorimétrique avec FeCl_3 , produite chez les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6).

6.4.2 Fixation de l'azote atmosphérique

La mise en évidence de la fixation de l'azote atmosphérique chez les souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de plantes via la production de l'ammonium, est révélée par réaction colorimétrique sur milieu de culture péptoné. Le développement d'une couleur brunâtre après l'ajout du réactif de Nessler dans les tubes inoculés avec les deux souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de plantes (MS3 et MR1, ++) a montré une excellente production d'ammonium. Par ailleurs, les deux autres souches (MR6 et ME1) ont montré une moyenne production d'ammonium dans l'eau peptonée, traduite par le virage de la couleur au jaune foncé.

6.4.3 Test de solubilisation du phosphate

L'étude de la solubilisation du phosphate inorganique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, chez les souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de plantes a montré la formation des zones claires sur milieu de culture gélosé de Pikovskaya, ce qui explique la libération des molécules de phosphates à partir de tricalcium phosphate. Le développement des zones claires sur la surface de la gélose est observé après 4 jours d'incubation à une température 30°C . La solubilisation du phosphate inorganique chez les souches (MS3, ME1, MR1 et MR6) a montré des indices de solubilisation de (11.2, 10.9, 9.7, 8.9) respectivement.

6.4.4 Production de l'acide indole acétique

Les auxines sont des phytohormones qui induisent la formation des poils racinaires et des racines latérales et augmentent la capacité des plantes à absorber les nutriments à partir du sol. Les auxines produites chez les souches isolées et sélectionnées promotrices de la croissance de plantes sont révélées par l'utilisation du réactif de Salkowsky. La production de l'acide indole acétique est réalisée à partir de différentes voies métaboliques. La présence de l'indole dans le milieu de culture, est fortement liée à l'intensité de la coloration rose, due principalement au réactif de Salkowsky.

La quantité de l'acide indole acétique produite chez les 4 souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de plantes, inoculées sur milieu de culture LB, additionné de tryptophane comme précurseur de l'acide indole acétique et incubées pendant 48 heures est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 525 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats obtenus ont montré une production maximale de l'acide indole acétique de ($58,87 \pm 0,6$, $53,5 \pm 0,1$, $36,73 \pm 0,4$, $36 \mu\text{g/ml}$) chez les souches sélectionnées promotrices de la croissance (ME1, MR6, MR1, MS3) respectivement (**Figure 26**).

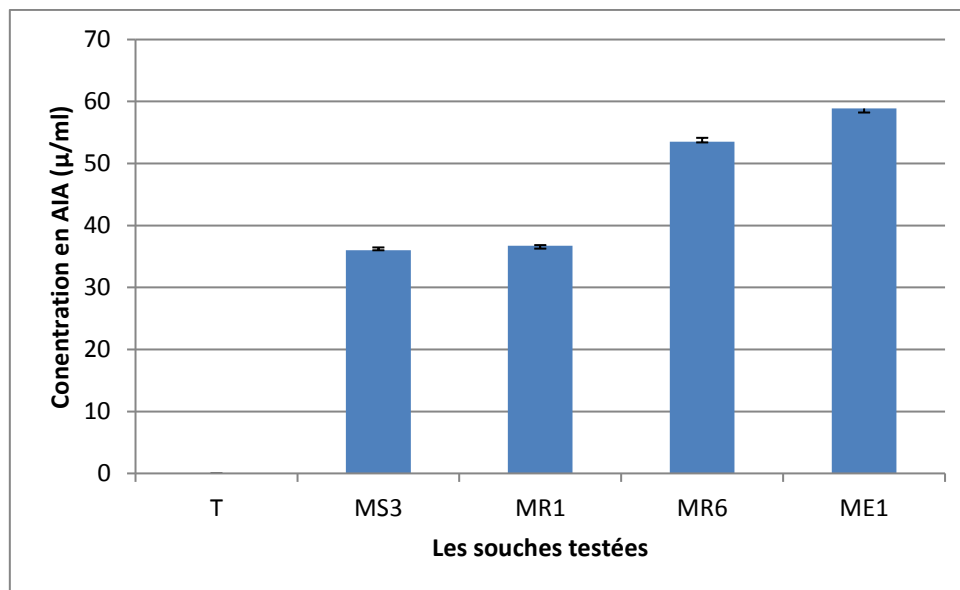


Figure 26. Détermination de la concentration de l'acide indole acétique ($\mu\text{g/ml}$), par réactif de Salkowsky, chez les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6).

6.5 Activité antagoniste des souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*

6.5.1 Mise en évidence de l'activité antifongique *in vitro*

L'étude de l'activité antifongique des souches sélectionnées promotrices de la croissance est mise en évidence *in vitro* par la mesure de la zone d'inhibition formée autour champignon inoculés sur le milieu de culture gélosé de PDA. Les résultats obtenus ont montré que les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR1, MS3, ME1, et MR6) ont manifesté une faible activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, avec des taux d'inhibition de (15.12, 9.44, 9, 8,66 %) respectivement (Figure 27).

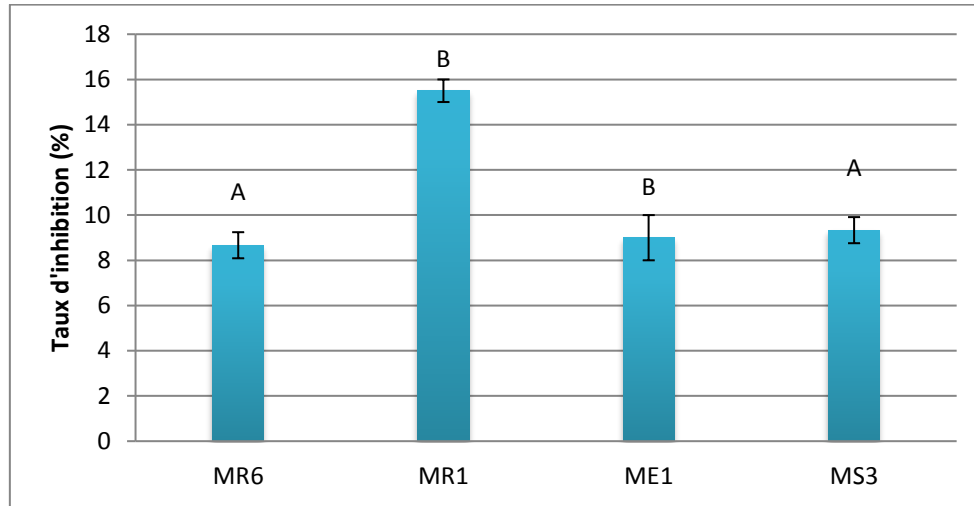


Figure 27. L'étude de l'activité antifongique des souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* (Dual Plate Assay).

6.5.2 Test de l'effet protecteur *in vivo* des souches sélectionnées promotrices de la croissance des plantes vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*

L'étude de l'effet protecteur *in vivo* des 4 souches sélectionnées promotrices de la croissance, inoculées sur les plants de tomates est effectué via une confrontation directe avec l'agent phytopathogène le FORL. L'activité de biocontrôle est évaluée après 24 jours de culture dans des conditions de croissance contrôlées. Les résultats obtenus ont montré que le lot « Témoin+ », inoculé avec FORL, a révélé un faible développement par rapport au lot « Témoin- » non infecté, accompagné avec un flétrissement complet, ce qui explique l'agressivité de l'agent phytopathogène.

Toutefois, une amélioration de la réponse de la plante à l'attaque de l'agent pathogène chez les lots traités avec les bactéries sélectionnées promotrices de la croissance des plantes, traduite par une progression de rendement de la plante est observée. Les paramètres de croissance pris en considération après le traitement des plantes avec les

bactéries sélectionnées et fusarien sont :

- **La longueur de la tige**

Les résultats de la détermination de la longueur de la tige après 24 jours de culture sur les plants de tomate traités avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance et le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, sont illustrés sur la **Figure 28**.

Les résultats obtenus ont montré que le témoin a affiché une longueur moyenne de la tige de 4,5 cm. Par ailleurs, Le traitement des plants de tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR1, MS3, MR6, ME1) a montré une amélioration de 24,44% (5.6 cm), 14,44% (5.15 cm), 22,2% (4. cm), 13,33 % (3,9) respectivement par rapport au lot témoin.

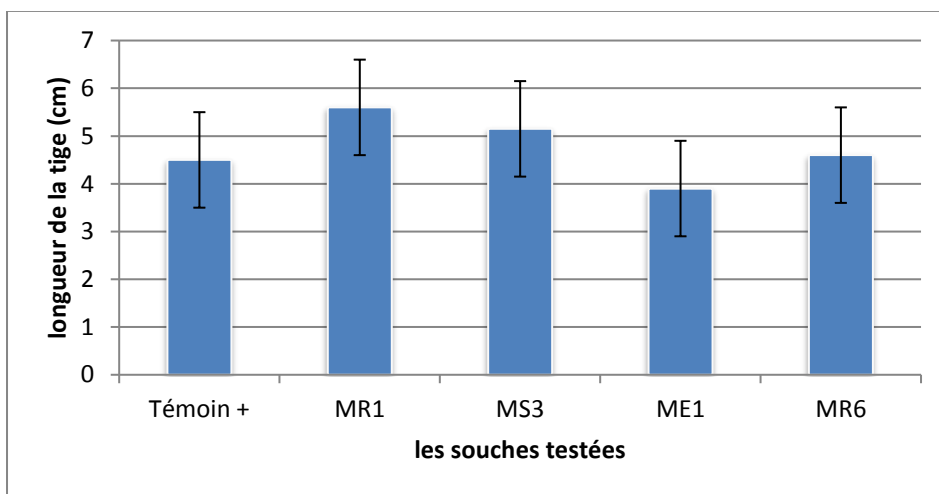


Figure 28. Evaluation de la longueur de la tige de la tomate, inoculée avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) en présence de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, après 24 jours de culture.

- **longueur des feuilles**

Les résultats obtenus ont montré que le lot témoin (**Figure 29**) a affiché une longueur moyenne des feuilles de 1,5 cm. Le traitement des plants de tomate avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR1, MR6, MS3, ME1) a montré une amélioration de la longueur moyenne des feuilles de (1,9cm, 1,7cm, 1,5cm, 1,33 cm) avec des améliorations de (26,66%, 14%, 10,34%) respectivement par rapport au lot témoin. Les résultats obtenus (**Figure 23**) ont montré une longueur moyenne des feuilles de 1,9 cm du lot traité avec la souche MR1.

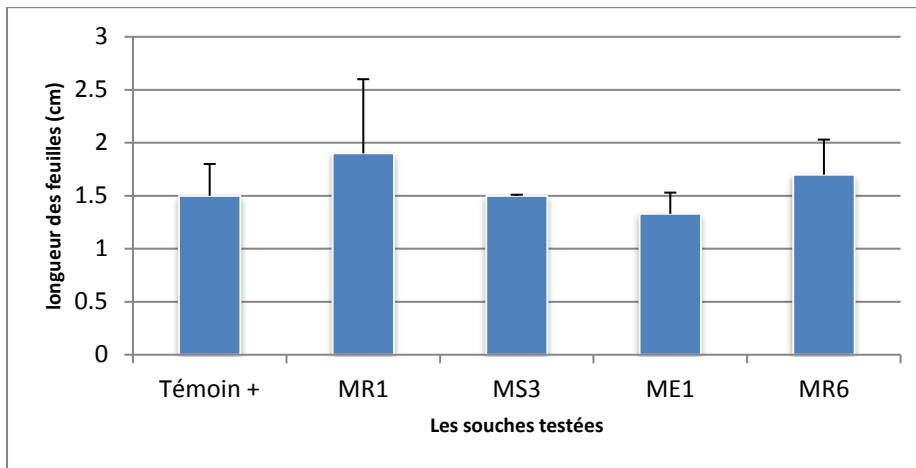


Figure 29. Evaluation de la longueur des feuilles de la tomate, inoculée avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6), en présence *Fusarium oxysporum f.sp radices lycopersici*, après 24 jours de culture.

- **Largeur des feuilles**

Les résultats obtenus (**Figure 30**) ont montré que le lot témoin a affiché une largeur moyenne des deux feuilles de 0.46 cm. Le traitement des plants de tomate avec la souche sélectionnée promotrice de la croissance (MR1) a montré une moyenne de 0.4 cm, avec une amélioration de 33,33 %.

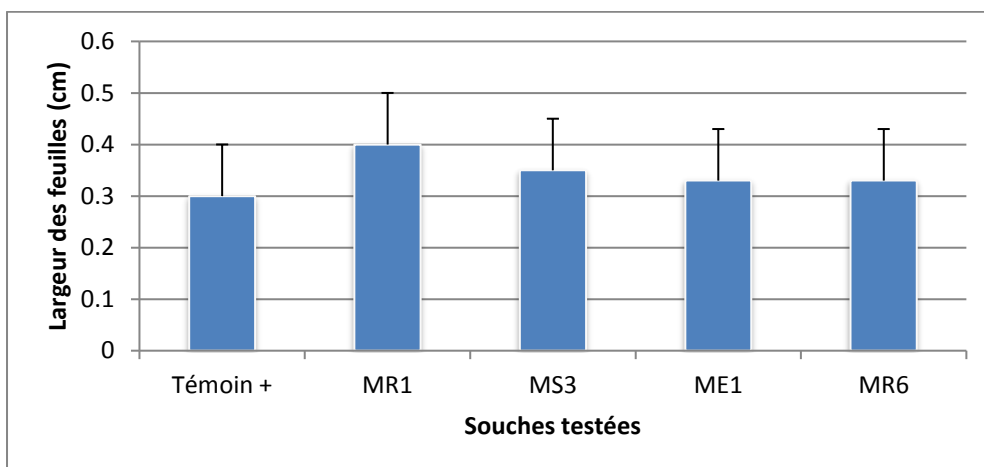


Figure 30. Evaluation de la largeur des feuilles de la tomate, inocuées avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) et le *Fusarium oxysporum f.sp radices lycopersici*, après 24 jours de culture.

- **Longueur de la racine principale**

Les résultats obtenus ont montré que le lot témoin (**Figure 31**) a affiché une longueur moyenne de la racine de 2,9 cm. Cependant, Le traitement des plants de tomate avec les souches promotrices de la croissance (MR6, MS3, ME1, MR6) a montré une amélioration de la longueur de la racine principale de (20,68, 18,27, 10,34 %) respectivement.

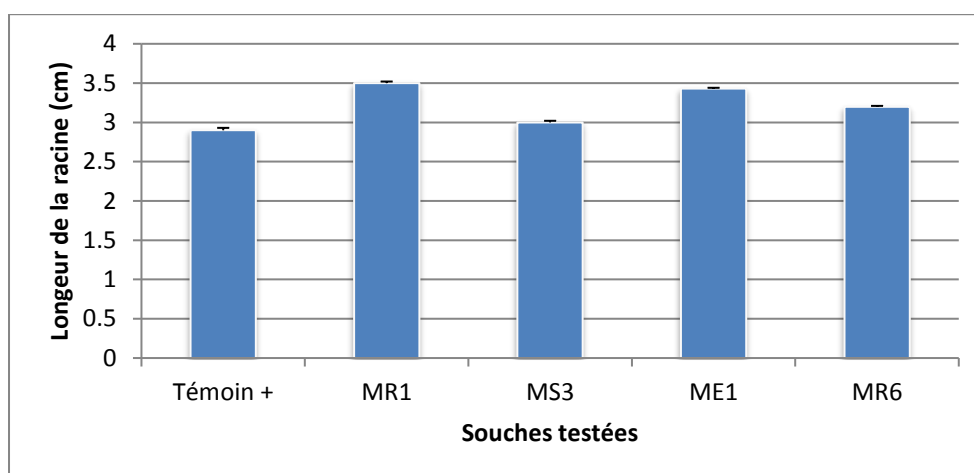


Figure 31. Evaluation de la longueur des racines de la tomate, inoculées avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) et le *Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici*, après 24 jours de culture.

6.6 Expérience d'induction de résistance systémique chez les plants de tomate *in vivo* par les isolats sélectionnés promoteurs de la croissance

6.6.1 Evaluation de l'induction de la résistance chez la tomate

L'effet protecteur *in vivo* des bactéries isolées, sélectionnées des racines de tomate dans le pathosystème Tomate/*Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici* par induction d'une résistance systémique est évalué. L'effet protecteur des souches sélectionnées promotrices de la croissance des plants de tomate âgés de quatre semaine, infectées avec le FORL est mis e évidence. Par ailleurs, l'incidence de la maladie est évaluée par l'utilisation de l'indice de flétrissement, allant d'une valeur de 0 qui présente une plante saine jusqu'à 5 qui présente une plante morte 5 et 8 jours après l'infection (**Tableau 6**), le taux de la réduction de la maladie est déterminé.

Tableau 5: Evaluation du degré de flétrissement des plantes inoculées avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6), en présence *Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici*, après 5 et 8 jours d'infection.

Souches Testées	Degré de flétrissement	
	Résultat après 5 jours d'infection	Résultat après 8 jours d'infection
Témoin +	4	4
MR1	1	1
MS3	1	2
ME1	2	3
MR6	2	2

0 : pas de symptôme, **1** : jaunissement d'une foliole ou d'une feuille, **2** : jaunissement sur une à deux feuilles, **3** : jaunissement sur plus de deux feuilles, **4** : jaunissement et dessèchement de la majorité des feuilles, **5** : plante morte.

Les résultats obtenus ont montré une réduction considérable de la maladie chez les plantes traitées avec les souches sélectionnées (MR1, MS3) avec un taux de 85 % (**Figure 32**), accompagné avec un développement après 5 jours de l'infection par le FORL et un léger jaunissement des folioles, situées à la base de la plante lors de la comparaison avec les plants témoins, gravement affectées par l'agent pathogène et leur mort complète après environ 9 jours d'infection .

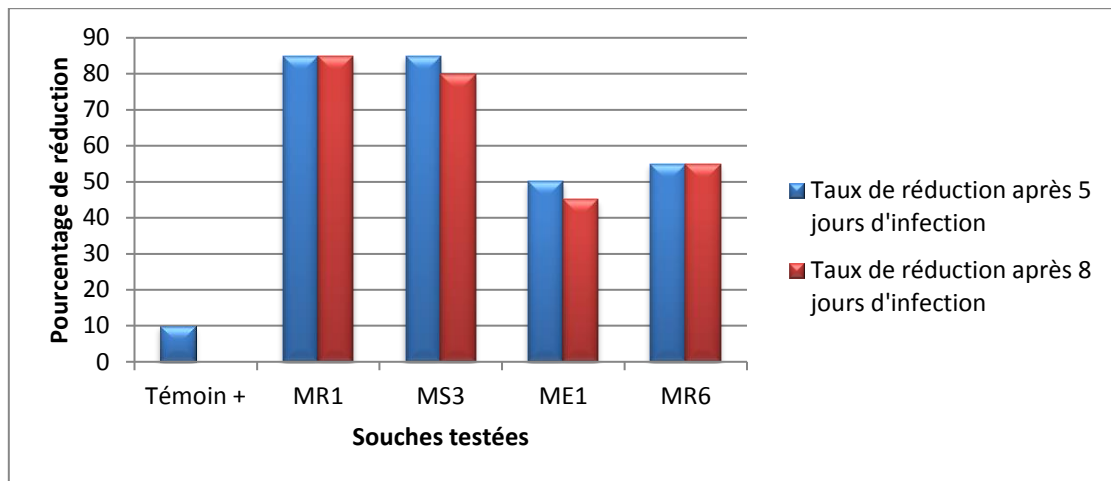


Figure 32. Présentation des taux de réduction de la maladie des plantes inoculées avec les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MR1, MS3, ME1 et MR6), infectées avec le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*, après 5 et 8 jours d'infection.

Les résultats obtenus ont montré que le traitement des plants avec les souches (MR6, ME1) ont réduit considérablement la maladie de 56 % et 45 % respectivement, accompagné avec un développement après 8 jours d'infection et un jaunissement unilatéral de la tige et des feuilles, qui correspondent aux symptômes classiques causés par l'infection par le FORL (**Figure 33**). En outre, une forte progression de la croissance des plantes inoculées par les souches (MR1, MS3) est constatée après le traitement par le phytopathogène. Cette stimulation de la croissance lors de l'inoculation de la plante avec le *Fusarium*, traduite par l'amélioration du volume foliaire, le développement du nombre de feuilles et l'élongation de la tige est observée par rapport aux résultats obtenus des traitements des plantes avec les bactéries.

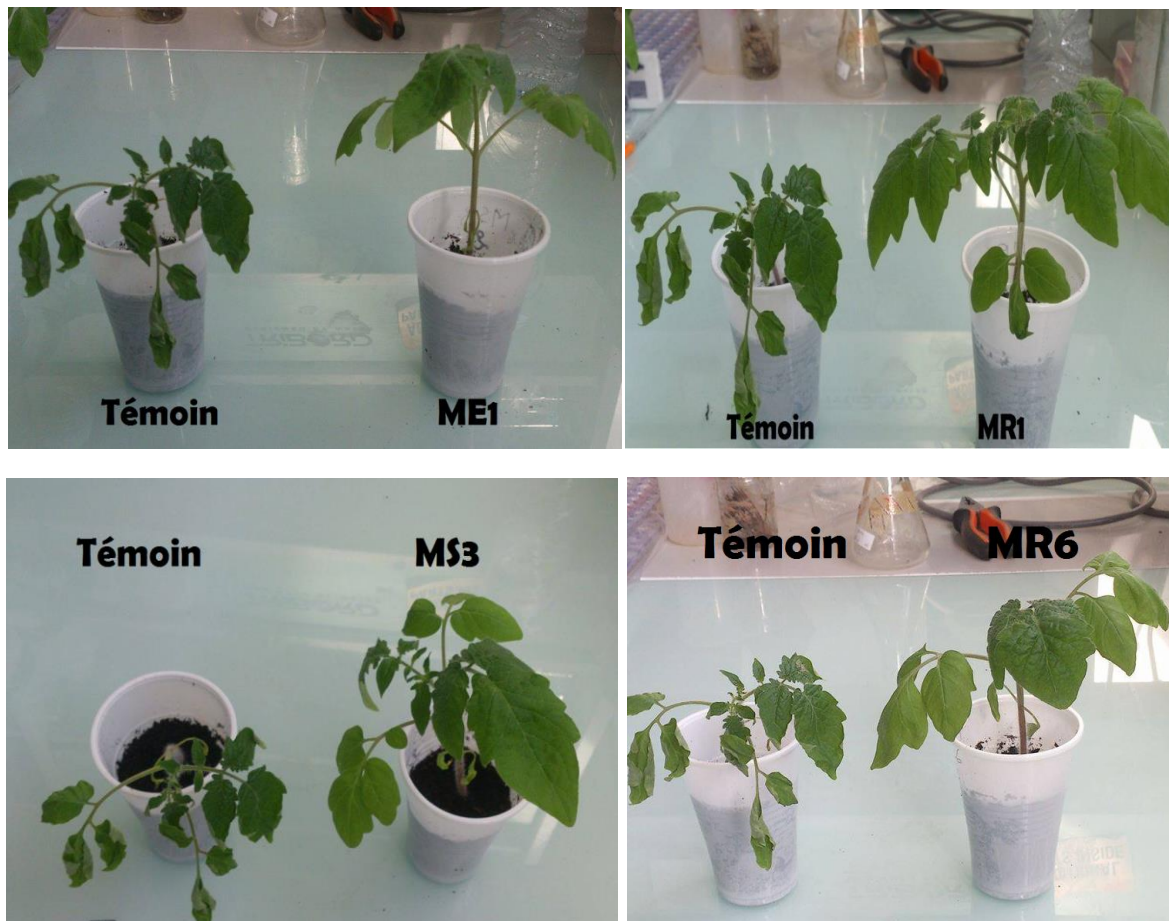


Figure 33. L'étude de l'activité protectrice de la tomate *in vivo* par les souches sélectionnées promotrices de la croissance (MS3, ME1, MR1 et MR6) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici*.

6.6.2. Caractérisation du mécanisme de la résistance induite chez la tomate par les bactéries isolées, sélectionnées et promotrice de la croissance de tomate

La détermination du type de la résistance induite par les bactéries des plantes vis-à-vis de FORL est réalisée par l'analyse des composés fongitoxiques appelés les phytoalexines, accumulés dans les tissus des plantes traités par les souches (MR1, MS3, ME1 et MR6) et infestées par le *Fusarium oxysporum f.sp radidis lycopersici*.

L'éventuelle stimulation de la synthèse des phytoalexines chez la tomate en réponse à l'inoculation bactérienne est évaluée. A cet effet, des extraits méthanoliques (**Figure 34**) de feuilles préparés ont subi une extraction liquide-liquide à l'hexane pour l'élimination des molécules très hydrophobes. La phase aqueuse restante a subi une extraction à l'éther diéthylique pour l'extraction des composés de polarité intermédiaire. L'hydrolyse acide effectuée par HCl 4N sur la phase aqueuse a permis la libération des molécules

accumulées sous des formes conjuguées. Ensuite, une nouvelle extraction avec l'éther diéthylique est réalisée comme la précédente.



Figure 34. Extraits méthanolique des plantes de tomate témoins et des plantes traitées par le FORL et les 4 souches isolées, sélectionnées et promotrices de la croissance de tomate (MS3, MR1, MR6 et ME1).

Ensuite, les composés fongitoxiques récupérés sont analysés par HPLC avec un appareillage équipé d'un détecteur à barrettes de diodes. Les résultats obtenus ont montré la présence d'une quantité très élevée d'un composé, élué à un temps de rétention de 19.46 minutes. Les chromatogrammes obtenus (**Figures 35, 36, 37, 38, 39**) ont montré que ce composé accumulé dans tous les plantes traitées avec les souches isolées, sélectionnées promotrice de la croissance est absent chez les extraits témoins.

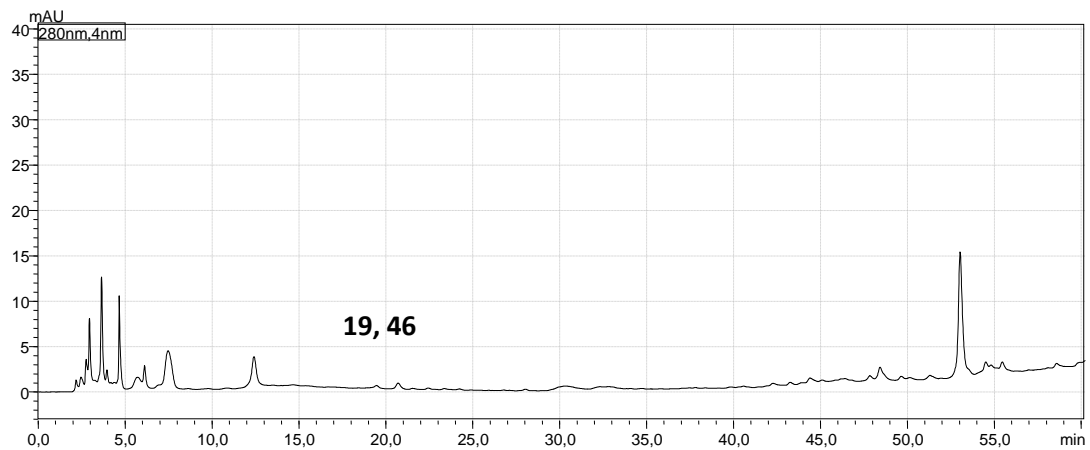


Figure 35. Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes témoins par chromatographie.

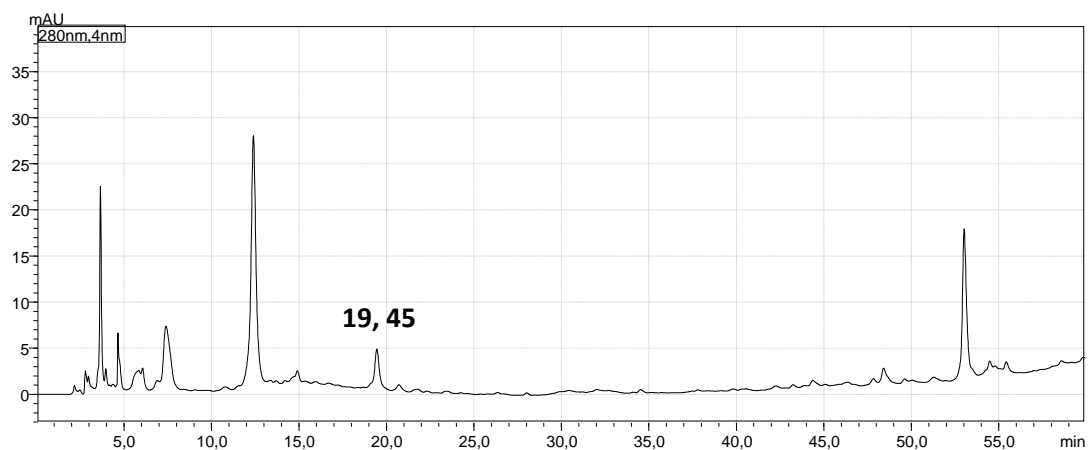


Figure 36. Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes avec la souche isolée, sélectionnée promotrice de la croissance MS3 par chromatographie.

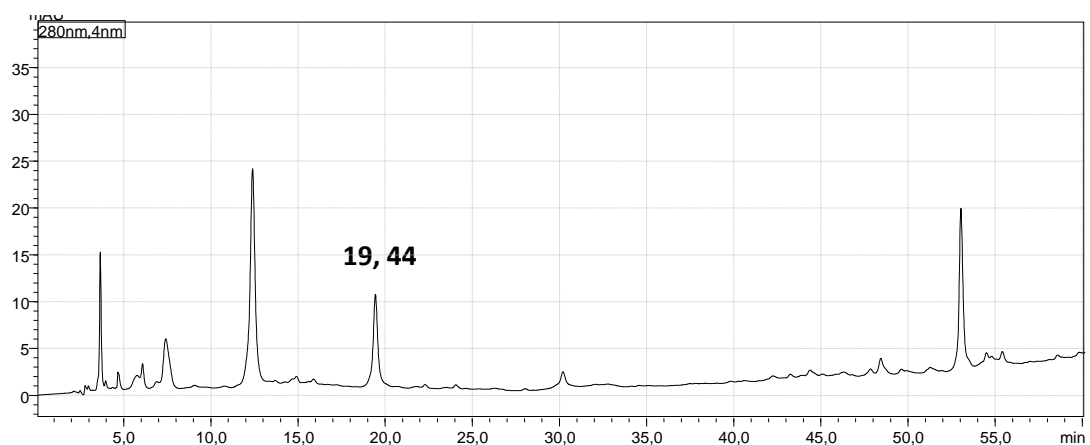


Figure 37. Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes traitées avec la souche isolée, sélectionnée promotrice de la croissance MR6 par Chromatographie.

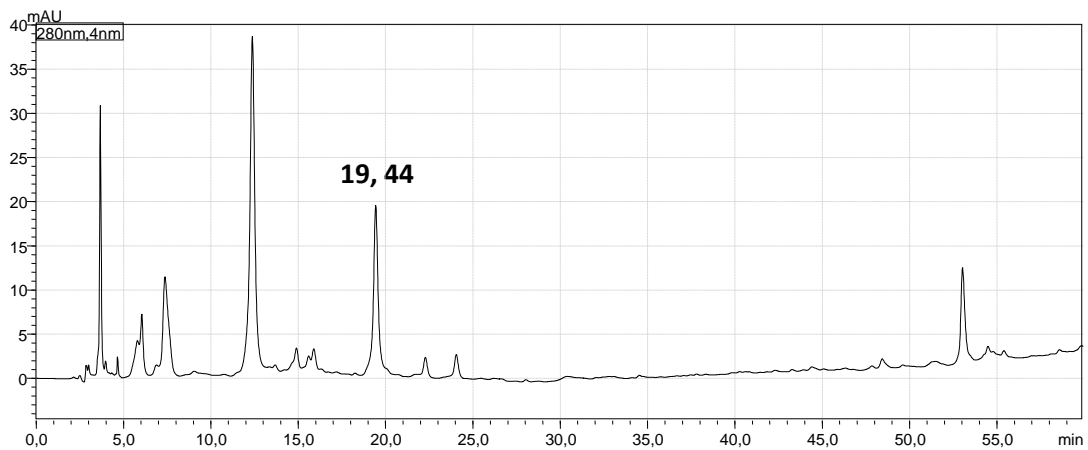


Figure 38. Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes traitées avec la souche isolée, sélectionnée promotrice de la croissance MR1 par Chromatographie.

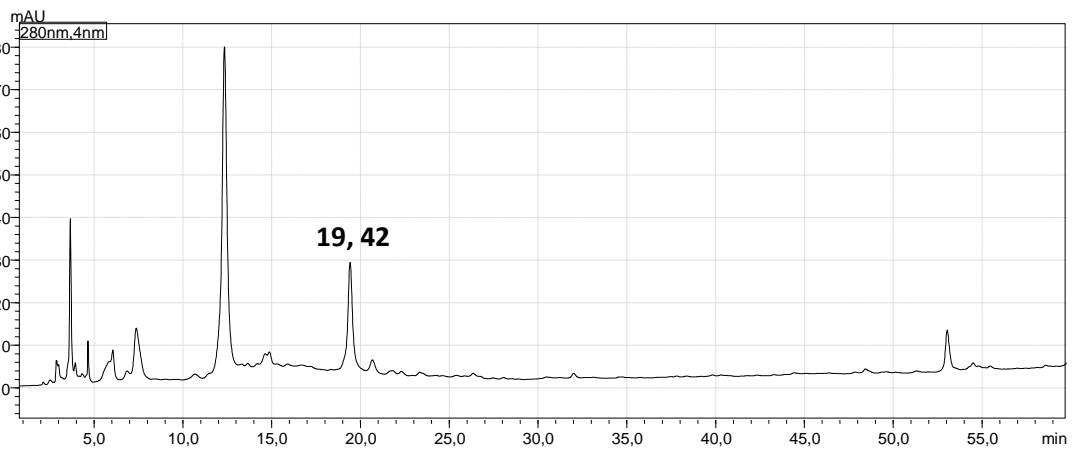


Figure 39. Caractérisation des phytoalexines extraites à partir des plantes traitées avec la souche sélectionnée promotrice de la croissance ME1 par chromatographie.

DISCUSSION GENERALE

Discussion Générale

L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes (Plant Growth Promoting Rhizobactéria, PGPR) en tant que biopesticides est une technologie émergente et écologiquement compatible considérée comme alternative prometteuse aux pesticides de synthèse.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement et la caractérisation d'une large gamme de bactéries rhizosphériques manifestant une activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. radicum* et promotrices de la croissance de cultures de la tomate.

Le screening primaire effectué à partir de la rhizosphère de tomate de la région de Mehdia (Tunisie), sur le milieu de culture gélosé a permis l'isolement de vingt deux souches bactériennes (22).

Le screening secondaire des souches isolées a permis la sélection de quatre souches bactériennes stimulatrices de la croissance de la culture de la tomate et identifiées comme étant MR1 : *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, ME1 : *Pseudomonas putida*, MS3 : *Microbacterium arthrosphaerae* et MR6 : *Rahnella aquatilis*.

Cette stratégie est choisie sur la base de la forte pression de sélection exercée par la plante dans cette zone par modulation de leurs exsudats racinaires afin d'avantager les bactéries les plus bénéfiques, le but était donc d'« extraire » les bactéries bénéfiques déjà recrutées par la plante (**Ahmed et al., 2008**).

Gardener et Fravel, (2002) ont rapporté que le screening constitue une étape cruciale dans le développement d'agents de lutte biologique. Le succès de toutes les étapes subséquentes est fortement lié à la capacité de développer des procédures de screening des souches promotrices de la croissance et inhibitrices de la prolifération *Fusarium oxysporum f. sp. radicum* (**Gardener et Fravel, 2002**).

La stimulation de la croissance lors du traitement de la tomate avec les 22 souches bactériennes isolées lors du screening primaire est traduite par l'amélioration de germination et de rendement de biomasse végétale des plantes traitées par rapport aux témoins non traités.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux rapportés par **Digat et al., (1990)** découvrant que certaines souches PGPR ont stimulé la germination des graines de tomate même lorsque les conditions d'environnement semblent défavorables.

Bashan et al., (1993) ont rapporté que la meilleure méthode de sélection des traits PGPR est effectuée suite à un test *in vivo* à cause de ressemblance des conditions aux quelles les bactéries isolées vont être exposées une fois introduites dans les cultures en plein champs.

Les résultats obtenus lors du screening secondaire ont permis la sélection de 4 souches bactériennes stimulatrices de la croissance de la tomate (ME1, MR1, MS3 et MR6), qui ont entraîné une importante amélioration du rendement de la biomasse de tomate après 24 jours de cultures. Des études antérieures réalisées par **Kloepper et al. (1978)** ont rapporté que cette amélioration est due principalement à la capacité des bactéries PGPR à faciliter l'assimilation des nutriments chez la plante par la production des phytohormones agissant comme des régulateurs de la croissance. A cet effet, les résultats obtenus ont révélé l'efficacité de la stratégie adoptée pour la sélection des bactéries rhizosphériques à traits PGPR.

L'identification phénotypique et moléculaire des 4 souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MS3 et MR6) est effectuée en se basant sur la réalisation de certains tests conventionnels et l'amplification du fragment d'ADN codant la région 16S ARN.

Renvoise et ses collaborateurs, (2012) ont rapporté que l'utilisation de la technique de PCR pour l'amplification du fragment d'ADN codant la région 16S ARN a permis l'exploration de nouvelles espèces bactériennes, contribuant à la stimulation de la croissance des plantes.

L'utilisation des techniques de la biologie moléculaire a permis l'identification de 4 souches stimulatrices de la croissance des plants de tomate comme étant :

- La souche MR1 : *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* avec un pourcentage de similarité de 99 %.
- La souche ME1 : *Pseudomonas putida* avec un pourcentage de similarité de 92 %.
- La souche MS3 : *Microbacterium arthrosphaerae* avec un pourcentage de similarité de 96 %.
- La souche MR6 : *Rahnella aquatilis* avec un pourcentage de similarité de 99 %.

Les *Pseudomonas* des bactéries ubiquistes, rencontrées souvent dans les sols agricoles et sont classées comme étant les meilleurs candidats PGPR.

Saharan et Nohra, (2011) ont rapporté que l'espèce *Pseudomonas putida* est un agent efficace de biocontrôle et de stimulation de croissance des plantes.

Des études antérieures réalisées par **Bur et al. (1978)** ont été les premières études qui ont rapporté sur les effets bénéfiques de la bactérisation des graines de pomme de terre (*Solanum tuberosum*), lors de l'inoculation avec les souches *P. fluorescens* et *P. putida*, traduite par une augmentation considérable du rendement de (14-33 %) chez les 5 lots de culture par rapport aux 9 lots établis en Californie et Idaho (**Antoun et Prévost, 2005**).

Les espèces du genre *Microbacterium* sont des bacilles aérobies stricts, à coloration de Gram positif, oxydase-positifs et appartenant à la famille de *Microbacteriaceae* (**Euzéby et al., 2010**). Des travaux antérieurs réalisés par **Won-Il et al., 2011; Schwachtje et al., 2012; Shrivastava and Kumar, 2013** ont rapporté sur les effets bénéfiques des bactéries rhizosphériques exercés sur les plantes par solubilisation du phosphore, la production des auxines, des sidérophores et l'activation de l'enzyme de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (**Dastage et al., 2010**).

Rahnella aquatilis forme des espèces relativement rare à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, caractérisées par leur pouvoir de stimulation de la défense naturelles des plantes et leur activité antagoniste vis-à-vis des agents phytopathogènes (**Martins et al., 2015**).

Les résultats obtenus dans ce présent travail se concordent avec les travaux antérieurs réalisés par **Blancard et ces collaborateurs (2009)**, avec l'utilisation de cette bactérie comme agent de suppression et de réduction des maladies de tomate et stimulateur de sa croissance.

Le genre *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (précédemment nommée *Pseudomonas avenae*) est une espèce pathogène des *Graminea* et présente des difficultés accrues lors de son isolement mais facilement cultivable sur le milieu de culture gélosé (**Willems et al., 2009; Anan et al., 2013**).

L'inoculation des plantes de tomate avec la souche MR1 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* a manifesté une amélioration considérable des différents paramètres de la croissance tels que longueur et volume des tiges, des racines et des feuilles et la protection vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. radicum lycopersici*.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux rapportés par **Che et al., (2002)** lors du traitement de certaines plantes avec *Acidovorax avenae*, par stimulation d'une réaction de défense chez la plante accompagnée avec une amélioration de leur rendement.

La production de l'acide salicylique chez les souches bactériennes isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MS3 et MR6) est effectuée par mesure de l'intensité du complexe coloré formé lors de l'interaction de l'acide salicylique avec les ions de Fe^{+3} (**Meyer et al., 1992**).

Les résultats obtenus ont montré que le taux de l'acide salicylique chez les souches bactériennes isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MS3 et MR6) a atteint la production 16 mg/ml. Par ailleurs, **Nagara et al.,(2004)** **Soltani et al., (2011)** ont rapporté sur des taux de production de l'acide salicylique maximale de 10.91 mg/ml. **Dihazi et al., (2006)** ont suggéré que l'acide salicylique a donné un signal d'activation de la voie de phenylalanine ammonia lyase (PAL), qui intervient dans la synthèse de nombreux composés phénoliques impliqués dans l'induction de la résistance systémique.

Les résultats obtenus ont montré que les 4 souches, isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MR6 et MS3) ont manifesté une excellente production de l'acide indole acétique lors de la comparaison avec d'autres souches PGPR isolées et testées dans les études de **Ahmed et al.,(2004)**; **Khakipour et al., (2008)** et **Karnwal, (2009)**.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux réalisés par **Kapoor et al., (2012)**, lors du traitement des plantes avec des isolats producteurs des auxines, traduite par une amélioration considérable du volume et de la densité du chevelure racinaire, due principalement à la modulation positive de son système hormonal.

Des travaux antérieurs réalisés par **Miller et ses collaborateurs (2008)** ont rapporté sur le mécanisme de solubilisation du phosphore chez bactéries est la synthèse des acides organiques *via* l'oxydation extracellulaire de glucose entraînant son acidification et la libération des molécules de phosphate par chélation des molécules associées telles que Ca^{+2} , le Al^{+3} et le Fe^{+3} . Les 4 souches bactériennes isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MS3 et MR6) ont montré un excellent potentiel de solubilisation de phosphate, traduit par la formation des zones claires sur la surface de la gélose du milieu Pikovskaya additionné de TCP comme source de phosphate insoluble.

Des travaux antérieurs réalisés par **Ruchi et al., (2012)** ont rapporté sur des résultats similaires chez 26 souches isolées du genre *Pseudomonas*, avec une activité de solubilisation de phosphate chez la souche appartenant au genre d' *Acidovorax*.

Par ailleurs, **Rivas et al., (2004); Malboobi et al., (2009); Marra et al., (2012)** ont rapporté que le genre *Microbacterium* a manifesté une excellente activité de solubilisation de phosphate.

Les résultats obtenus ont montré que les 4 souches, isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MR6 et MS3) ont manifesté une excellente activité de fixation d'azote, révélée par la croissance sur milieu de culture dépourvu de nitrogène et l'induction des gènes, codant la production de l'enzyme de la nitrogénase.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux réalisés par **Shabayev, (2010)**, qui ont rapporté que les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* et *Acidovorax* ont présenté une activité excellente activité fixatrice de l'azote atmosphérique.

Berge et ces collaborateurs (1991) ont rapporté sur *Rahnella aquatilis* comme bactérie associée à la rhizosphère et fixatrice d'azote atmosphérique. Par ailleurs, **Zakhia et al. (2006)** ont rapporté sur la présence des gènes *nifH*-like, responsables à la fixation de l'azote atmosphérique chez le genre *Microbacterium*.

Vincent (1947) a décrit le test du Dual Plate Assay comme étape initiale dans l'évaluation de l'activité antagoniste des souches bactériennes vis-à-vis de champignons pathogènes.

Les 4 souches, isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MR6 et MS3) ont manifesté que une excellente activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp. radicum lycopersici*, accompagnée avec la formation des diamètres zones d'inhibition de la croissance moyennes.

Weller et ces collaborateurs (2007) ont suggéré la production de nombreux métabolites antifongiques chez le genre *Pseudomonas* notamment les phénazines, la pyrrolnitrine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol). Par ailleurs, ce genre bactérien est également capable de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines (**Lemanceau et al., 2009**).

Lee et al., (2010), ont rapporté sur l'isolement des souches PGPR appartenant au genre *Pseudomonas spp.* manifestant un excellent pouvoir d'inhibition des champignons, avec des taux d'inhibition de 0 à 45 %.

Les travaux de **F. P. Hu et Young, (1998)** ont confirmé que les bactéries appartenant au genre *Rahnella* et à l'espèce *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* possèdent une activité antifongique les facilitant la compétition dans le milieu environnant.

Irshad et ces collaborateurs (2013) ont rapporté que les bactéries appartenant au genre *Microbacterium* ont présenté une importante cascade de molécules bioactives, intervenant dans l'inhibition de la croissance fongique.

Toutefois, l'utilisation du test Dual Plate Assay pour la détermination de l'activité protectrice de la plante vis-à-vis le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* reste insuffisant, car les bactéries présentes dans la nature sont conditionnées par leur environnement.

A cet effet, l'effet protecteur 4 souches bactériennes isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MS3 et MR6) vis-à-vis le *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* est évalué *in vivo* pendant un intervalle de temps de 24 jours.

L'inoculation des plantes de tomate avec la souche MR1 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* a manifesté une excellente production de la biomasse, accompagnée avec l'absence de pathogénicité de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici*.

Les PGPR utilisés interviennent dans l'élimination des agents pathogènes par différents mécanismes tels que la production des sidérophores, la production des enzymes lytiques (Chitinase, cellulase...), la colonisation de la rhizosphère (compétence rhizosphérique), lors de l'assimilation des nutriments (phosphate, azote...) et la modulation de la croissance par la production des phytohormones.

Le pouvoir d'induction d'une résistance systémique dans le pathosystème tomate, *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* chez les 4 souches, isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MR6 et MS3) est évalué *in vivo*.

Les résultats obtenus ont montré que le traitement du sol et des graines de tomate avec les souches : *Microbacterium arthrosphaerae*, *Pseudomonas putida*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* et *Rahnella aquatilis* a conféré à la plante une diminution de la susceptibilité vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp radicis*. Les résultats obtenus se concordent avec les travaux rapportés par **Thonart et al., (2008)** qui ont suggéré la capacité de *Pseudomonas putida* à induire une résistance systémique dans les plantes de tomate, déclenché par la production d'une molécule dérivée de la benzylamine de la bactérie.

Des études antérieurs réalisés par **Hirai et al.,(2004); Che et al., (2002)** ont rapporté sur la capacité de certaines souches d'*Acidovorax avenae* subsp. *avenae* d'induire des ISR dans différents pathosystèmes. Cette résistance est due principalement à la protéine du

flagelle : la flagelline, une molécule intervenant dans le déclenchement d'une résistance chez la plante hôte.

Toutefois, des travaux antérieurs réalisés par **Kamal Abo-Elyousr et al., (2008)** et **Laux, et al., (2006)** ont rapporté que l'action combinée de l'espèce *Rahnella aquatilis* et l'acibenzolar-S-méthyl des pommes vis-à-vis de l'agent du feu bactérien *Erwinia amylovora* a diminué le taux de la maladie 62%, sans identification la nature de la molécule produite par *Rahnella aquatilis* responsable au déclenchement de l'ISR.

Kishimoto et al. (2006) ont suggéré que la voie de transmission du signal responsable de la systémicité lors de l'ISR exige généralement une réponse à l'acide jasmonique et à l'éthylène.

Cependant, l'induction de la résistance déclenchée par les rhizobactéries chez les plantes est fortement liée à l'accumulation d'acide salicylique (SA) et/ou l'expression des protéines PR après traitement. Par ailleurs, la résistance induite chez les plantes de tomate inoculées avec les souches, isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate (MR1, ME1, MR6 et MS3) est de type ISR, traduite par l'accumulation des composés dénommés les phytoalexines rapportés dans le cas de l'ISR après le traitement fongique.

Les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse effectuée à l'aide de HPLC ont permis de faire la constatation sur l'accumulation des phytoalexines chez les plantes de tomate inoculées avec la souche MR1 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* et la souche ME1 *Pseudomonas putida*.

Des travaux antérieurs réalisés par **Ongena et al. (2002)** ont confirmé que le PGPR et le pathogène restent géographiquement séparés sur la plante lors de l'ISR, par conclusion, la suppression de la maladie dans cette expérience par la souche ME1 *Pseudomonas putida* et la souche MR1 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* est assurément due à l'accumulation des phytoalexines et l'induction de la résistance systémique chez la plante hôte.

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux réalisés par **Adam et al., (2008)**, qui ont rapporté que la souche *P. putida* BTP1 a entraîné une ISR, traduite par l'accumulation des composés antifongiques sur les feuilles de tomate, uniquement lors de l'inoculation de *Botrytis cinerea*. **Hirai et al., (2004)** ; **Che et al., (2002)** ont rapporté que la souche *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* a induit une ISR chez la plante hôte par la fraction protéique de son flagelle appelée la flagelline.

CONCLUSION

Conclusion

Dans le but d'isoler des rhizobactéries à potentiel de promotion de la croissance de tomate et de protection contre le *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici*, 22 souches bactériennes ont été obtenues par isolement à partir de la rhizosphère de tomate. Après le screening secondaire, 4 souches bactériennes à pouvoir promoteur de la croissance de tomate *in vivo* ont été sélectionnées et identifiées phénotypiquement et par la technique de biologie moléculaire, accompagnée d'une caractérisation de leur pouvoir PGPR.

L'amplification des fragments d'ADNr 16 S et leurs séquençage ont permis l'identification des 4 souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate comme étant: MR1 : *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, ME1 : *Pseudomonas putida*, MS3 : *Microbacterium arthrosphaerae* et MR6 : *Rahnella aquatilis*.

Outre, les 4 souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de tomate ont témoigné d'une importante activité protectrice de la tomate *in vivo* contre le *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici*. L'étude de la capacité des souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de la tomate à induire une résistance systémique est mise en évidence. Les résultats obtenus ont montré que les souches *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* et *Pseudomonas putida* ont manifesté une importante induction de la résistance chez les plants de tomate vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici*, caractérisée par l'accumulation des phytoalexines dans les tissus des tomates traitées par les souches isolées, sélectionnées promotrices de la croissance de la tomate infectée par le FORL. La souche *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* a induit un excellent effet bénéfique de promotion et de protection de la croissance de tomate (antibiose et induction d'une ISR).

Cette étude peut être accomplie par :

- Une caractérisation des molécules accumulées dans les tissus de la plante de tomate traitées avec des PGPR suite à l'infection par le phytopathogène.
- Une caractérisation des molécules bactériennes élicitrices de la résistance chez la plante de tomate, qui permettraient en outre la détermination de la nature chimique et les bases moléculaires impliquées dans l'interaction entre les plantes et les PGPR lors du phénomène de l'ISR.
- Pour une éventuelle application, une purification, accompagnée avec un bon conditionnement de ces molécules élicitrices peut être envisagé afin d'être exploitées comme étant des formules immunisantes des plantes.

REFERENCES

- Abdelhi DIHAZI, F. Jaiti, M. A. Serghini et I. El Hadrami** (2006) Effet de l'acide slycylique et de l'inoculation par *fusarium oxysporum* sp *albedinis* sur les composés phenoliques et l'activité phenylalanine ammonia-lyase des racines du palmier dattier. Laboratoire de Biotechnologie et de Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir-Maroc.
- Abouseoud M., R. Maachi, A. Amrane, S. Boudergua, A. Nabin** (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Elsevier B.V., 143-151.
- Afshan Majeed, M. Kaleem Abbasi , Sohail Hameed, Asma Imran and NasirRahim** (2015) Isolation and characterization of plant growth promotin rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology* volume 6 Article 198.
- Aftab Afzal et Asghari Bano** (2008). *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal Of Agriculture & Biology*, 85-88.
- Ahmad, I., Pichtel, J., & Hayat, S.** (2008). *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Akram Adam** (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Liège: Faculty of Agricultural Sciences of Gembloux-liège, Belgique.
- Alam S., S. Khalil, N. Ayub and M. Rashid** (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *Intl. J. Agric. Biol.* 4:454-458.
- Ali-Ashraf Soltani, Kazem Khavazi et Hadi Asadi-Rahmani** (2011). Evaluation of biological control traits in some isolates of fluorescent *Pseudomonads* and *Flavobacterium*. *Journal of Agricultural Science*, 164-170.
- Amandine Viollet** (2010). Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante *Pseudomonas spp.* Fluorescents non pathogènes. Université de Bourgogne, France.
- Ana Patrícia Graça, Flávia Viana, Joana Bondoso, Maria Inês Correia, Luis Gomes, Madalena Humanes** (2015). The antimicrobial activity of heterotrophic bacteria isolated from the marine sponge *Erylus deficiens* (*Astrophorida, Geodiidae*). *Front Microbiol.*, 6: 389.

- Antoine Blanchard et Flora Limache** (2005). Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). DAA protection des plantes et environnement.
- Ariane Faille** (2010). Identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp., un champignon pathogène en aquaculture. Université de Montréal.
- Armelle Braud** (2007). Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par du chrome, du mercure et du plomb. Université de haute-alsace.
- Arvind Gulati, Praveen Rahi , Pratibha Vyas** (2007). Characterization of Phosphate-Solubilizing fluorescent *Pseudomonads* from the Rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the Cold Deserts of Himalayas. *Curr Microbiol*, 73–79.
- Azouaoui-ait kettout T., B. Boucenna, M. Amgoud, F. Rahmania** (2007). Essai De Lutte *In Vitro* Par Le Glyphosate Contre Des Champignons Telluriques Phytopathogenes : *Fusarium* Et *Pythium*. *Sciences & Technologie*, 75-80.
- Badr Satrani, Nouhad El Ouadihi, Abdelhamid Guedira, et Pascale Frey-Klett** (2009). Effet de la bactérisation des graines sur la croissance des plants de *Cedrus atlantica* Manetti. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 367-372.
- Bakker P.A.H.M, L.X. Ran, C.M.J. Pieterse, et L.C. van Loon** (2003). Understanding the involvement of rhizobacteriamediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.*, 5–9.
- Barriuso J, Ramos Solano B** (2008) plant bacteria interactions: Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Belimov A.A, N. Hontzea , V.I. Safronova et S.V. Demchinskaya** (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry*, 241-250.
- Bender C.L., Alarcon-Chaidez F. et Gross D.C.** (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 266-292.
- Bhavdish N. Johri · A. Sharma1 · J. S.Virdi** (2003). Rhizobacterial diversity in india and its influence on soil and plant health. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 49-89.
- Blanca B. Landa, Henricus A. E. de Werd, Brian B. McSpadden Gardener, and David M. Weller** (2002). Comparison of three methods for monitoring populations of different

genotypes of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. The American Phytopathological Society, 129-137.

Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Candresse T. (2009). Les maladies de la tomate. ed. INRA.

C.S. Nautiyal and S.M. DasGupta (2007) Screening of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. A. Varma, R. Oelmüller (Eds.). Advanced Techniques in Soil Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Cappuccino, J.C. and Sherman, N. (1992). In: Microbiology: A Laboratory Manual, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co. New York, pp. 125–179.

Chankara ,van Dam, Barbara, Goffau, Marja de, van Lidt de Jeude, Joep, Naika (2005). Cultivation of tomato: production, processing and marketing, Agrodok;17. Agromisa/CTA, Wageningen. The Netherlands.

Cherif Hafsa (2014). Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides, Université Sétif 1, Algérie.

Chloé Marchive (2006). Identification et caractérisation fonctionnelle d'un gene codant un facteur de transcription de type wrky chez la vigne, vvwrky1. Implication dans les mecanismes de defense. L'universite Bordeaux.

Coutinho F., H. Peres, I. Guerreiro, P. Pousão-Ferreira, A. Oliva-Teles Dietary protein requirement of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) juveniles Aquaculture, 37 (2012), pp. 391–397.

Davet, P. & Rouxel, F (2000). Detection and Isolation of Soil Fungi. Enfield, Science Publishers. 17-57

Dilantha Fernando W. G., S. Nakkeeran et Yilan Zhang (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases . Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization, 67- 109.

Doguiet K. Denis Dalie (2010). Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs. L'université de Bordeaux .

Emmanuel Jordan, Marc Onega, Philippe Thonart (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnol.Agron.Soc.Environ. 437- 449 .

- Emmanuel Jourdan** (2008). Dialogue moléculaire entre les rhizobactéries et leur hôte végétal : deux nouveaux éliciteurs impliqués dans l'induction de résistance aux pathogènes. Université Liège, Belgique.
- Euzéby, J. P.** (2010). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. Int. J. Syst. Bacteriol., 47.
- Fabiola Fernández-Silva, Javier Capilla, Emilio Mayayo, Deanna Sutton, Josep Guarro** (2014). In Vitro Evaluation of Antifungal Drug Combinations against *Sarocladium (Acremonium) kiliense*, an opportunistic Emergent Fungus Resistant to Antifungal Therapies. Antimicrob. Agents Chemother, vol. 58 no. 2 1259-1260.
- Faina Kamilova, Lev V. Kravchenko, Alexander I. Shaposhnikov, Nataliya Makarova, et Ben Lugtenberg** (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 exudates. The American Phytopathological Society, 1121–1126.
- Fang-Sik Che , Tetsuyuki Entani, Taizou Marumoto, Masatoshi Taniguchi, Seiji Takayama, Akira Isogai** (2001), Identification of novel genes differentially expressed in compatible and incompatible interactions between rice and *Pseudomonas avenae*, Plant Science 162, 449-/458.
- Farah Ahmad, Iqbal Ahmad, Mohd Saghir Khan** (2004) Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the Presence and Absence of Tryptophan . Turk J Biol 29 : 29-34.
- Fatiha Bensaid, Dalila Toua Et Messaoud Benchabane** (2007). Antagonisme microbien et sols résistants aux fusarioses vasculaires. Sciences Agronomiques – Laboratoire de Phytopathologie, 163- 167.
- Françoise Rocher** (2004). Lutte chimique contre les champignons phytopathogènes des plantes: évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effets fongicides et d'activateurs des réactions de défenses. Université de Poitiers.
- Fuchs Jacques-Gabriel** (1994). Paramètres influençant la lutte biologique contre la fusariose vasculaire de la tomate et la pourriture noire des racines de concombre: du laboratoire à la pratique. Université de Zurich. Suisse.
- Geert De Meyer and Monica Höfte** (1997). Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. The American Phytopathological Society, 588-593.

- Grayston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, J.L., Campbell, C.D. and Bardgett, R.D.** (2001). *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 533–551.
- Guido V. Bloemberg** (2007). Microscopic analysis of plant–bacterium interactions using auto fluorescent proteins. *Eur J Plant Pathol*, 301–309.
- Haffaf H., Benkherbache N., Benniou R. et Saoudi M.** (2016). Étude de la fertilisation azotée appliquée pour la production de semences du blé dur *Triticum durum* (variété waha) en zone semi-aride (M’sila), *Revue Agriculture*. Numéro spécial 1.
- Hani Antoun et Danielle Prévost** (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria . *Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 1- 38.
- Hasnuri Mat Hassan, Petra Marschner and Ann McNeill** (2010). Growth, P uptake in grain legumes and changes in soil P pools in the rhizosphere. *Soil Solutions for a Changing World*, 179-182.
- Hibar K., Mejda Daami-Remadi et M. El Mahjoub** (2007). Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l’agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *TROPICULTURA*,146-152.
- Hiroyuki Hirai, Ryota Takai, Machiko Kondo, Takehito Furukawa, Takayuki Hishiki, Seiji Takayama, and Fang-Sik Che** (2014). Glycan moiety of flagellin in *Acidovorax avenae* prevents the recognition by rice that causes the induction of immune responses, *Plant Signaling & Behavior* 9:11.
- Huang, X., Kiefer, E., von Rad, U., Ernst, D., Foissner, I. and Durner, J.** (2002). Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. *Plant Physiol. Biochem.*
- Ismaël B. Kebe, Joseph Mpika, Kouamé F. N’guessan Et Prakash K. Hebbar** (2009). Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d’Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature*, 71 – 82.
- Ittidetch Anan, Wilawan Chuaboon and Dusit Athinuwat** (2013). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in commercial corn seeds and its correlation with seedling transmission, *African journal of biotechnology*, 6376-6381.
- J. Caron, L. Laverdière, P.O. Thibodeau Et R.R. Bélanger** (2002). Utilisation d’une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec . *Phytoprotection*, 73-87.

- Javed Asghar Tariq** (2008). Bioantagonistic activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) against *Meloidogyne javanica* for the control of root knot disease of tomatoes. University of agriculture Faisalabad.
- Jeremy M Berg, John L Tymoczko, and Lubert Stryer** (2002). Responding to Environmental Changes. Biochemistry, 5th edition, New York: W H Freeman.
- Jos M. Raaijmakers , Timothy C. Paulitz , Christian Steinberg, Claude Alabouvette** (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil, 341- 361.
- Joseph B, R. Ranjan Patra, R. Lawrence** (2007) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum L.*). International Journal of Plant Production (2) 1 : 141-152.
- Jourdan, E.** (2008). Dialogue moléculaire entre les rhizobactéries et leur hôte végétal : deux nouveaux éliciteurs impliqués dans l'induction de résistance aux pathogènes. Liège: Faculty of Agricultural Sciences of Gembloux-liège.
- Kampfer P., P. D. Rekha, P. Schumann, A. B. Arun, Chiu-Chung Young, Wen-Ming Chen and K. R. Sridhar** (2010) *Microbacterium arthrosphaerae* sp. nov., isolated from the faeces of the pill millipede *Arthrosphaera magna* Attems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61, 1334–1337.
- Karnwal A.** (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of l-tryptophan and rice root exudates. Journal of Plant Pathology, 61-63.
- Khakipour N., K. Khavazi, H. Mojallali, E. Pazira and H. Asadirahmani** (2008) Production of auxin hormone by fluorescent *Pseudomonads*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 4 (6): 687-692.
- Kim Heylen, Liesbeth Lebbe and Paul De Vos** (2008). *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 73–77.
- Kloepper J.W and M.N Schrot** (1978) Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. phytopathology 71: 642-644.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S.A.** (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94(11):1259-1266.

- Kotlar, E., Tartakovsky, B., Argaman, Y. and Sheintuch, M. (1996).** Strategies and Techniques to Promote Plant Growth. *Journal of Biotechnology*, 51, 251–258.
- Landa, B., Navas-Cortés, J., Hervás, A., & Jiménez-Díaz, R. (2001).** Influence of Temperature and Inoculum Density of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* on Suppression of Fusarium Wilt of Chickpea by Rhizosphere Bacteria. *The American Phytopathological Society*, 807.
- Laux, P., Zeller, W. (2006).** *Rahnella aquatilis* Ra39 - a bacterial antagonist against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Journal of Plant Diseases and Protection*, Vol. 110, No. 4.
- Leandro Marciano Marra, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Silvia Maria de Oliveira, Paulo Ademar Avelar Ferreira, Bruno Lima Soares, Renato de Fráguas Carvalho, José Maria de Lima, Fatima Maria de Souza Moreira (2012)** Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, Volume 357, Issue 1, pp 289-307.
- Lemanceau P (1992).** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, 413- 437.
- Linda S. Thomashow, David M. Weller, Olga V. Mavrodi, et Dmitri V. Mavrodi (2007).** Selecting, monitoring, and enhancing the performance of bacterial biocontrol agents: principles, pitfalls, and progress. M. Vurro and J. Gressel (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, 87–105.
- Liu Y, Steward, R., Luo, L. (2000)** Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of *Schizosaccharomyces pombe Chk1* involved in DNA-damage-induced M-phase arrest. *Mol Gen Genet* 262(6):1132-46.
- Luis E. Fuentes-Ramirez et Jesus Caballero-Mellado (2005).** Bacterial biofertilizers. *Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 143-172.
- Mallesh S. B. (2008).** Plant growth promoting rhizobacteria, their characterization and mechanisms in the suppression of soil borne pathogens of coleus and ashwagandha. University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Marc Cazaux (2009).** Etude de la résistance de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* à *Colletotrichum trifolii*, agent de l’antracnose. Ecole Doctorale Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, et Bioingénieries. Toulouse-France.
- Marc Lateur (2002).** Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d’une résistance systémique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 67- 77.

- Marcella Franco Correa** (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rhizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Universidad de Granada. España.
- Marie Turner** (2009). Plusieurs niveaux de contrôle sont mis en jeu lors du flétrissement bactérien chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*. L'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Mario Vanechoutte, Michele Janssens, ronique Avesani, Michel Delme and Pieter Deschaght** (2013). Description of *Acidovorax wautersii* sp. nov. to accommodate clinical isolates and an environmental isolate, most closely related to *Acidovorax avenae*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 2203–2206.
- Martínez-Viveros O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo et M.L. Mora** (2009) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr, 293 – 319.
- Maxime Ferrero** (2009). Etude de la variabilité des comportements alimentaires du prédateur et conséquences pour la lutte biologique, université de Montpellier, France.
- Meyer, J-M., Azelvandre, P., and Georges, C** (1992). Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. BioFactors 4:23-27.
- Mohammad Abdus Sattar, Mohammad Fazlar Rahman et Dipak Kumar Das** (2006). Prospects of using *Azotobacter*, *Azospirillum* and cyanobacteria as supplements of urea nitrogen for rice production in Bangladesh, 59-99.
- Mohammad Ali Malboobi, Parviz Owlia, Mandana Behbahani, Elaheh Sarokhani, Sara Moradi, Bagher Yakhchali, Ali Deljou, Kambiz Morabbi Heravi** (2009) Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World J Microbiol Biotechnol 25:1471–1477.
- Munees Ahemad, Mulugeta Kibret** (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University, 20-26.
- Munusamy Madhaiyan, Selvaraj Poonguzhali, Jung-Sook Lee, Keun-Chul Lee, Venkatakrishnan Sivaraj Saravanan and Palani Santhanakrishnan** (2010) *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant growth- promoting actinobacterium isolated from the rhizoplane of neem seedlings. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 1687–1692.

- Nakkeeran S., W. G. Dilantha Fernando Et Zaki A. Siddiqui** (2005). Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 257-296.
- Nicole Benhamou, Joseph W. Kloepper, Sadik Tuzun** (1997). Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 153-168.
- Nicole Benhamou, François-P. Chalifour** . Indirect evidence for cellulase production by *Rhizobium* in pea root nodules during bacteroid differentiation: cytochemical aspects of cellulose breakdown in rhizobial droplets *Canadian Journal of Microbiology*, 1989, 35(9): 821-829, 10.1139/m89-138
- Niranjan Raj, S., Shetty, H. S., Et M. S. Reddy** (2005). Plant growth-promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity. *Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 197-216.
- Nnenna Esther Ike-Izundu (2007)**. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbial populations in the rhizosphere. Rhodes University.
- Odile Berge, Thierry Heulin, Wafa Achouak, Claude Richard, Rene Bally, Jacques Balandreau** (1991). *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Revue canadienne de microbiologie*, 37(3): 195-203.
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.-L. and Thonart P. (2007)**. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*. 9:1084-1090.
- Ongena, M., Jacques, P., Delfosse, P. and Thonart, P. (2002)**. Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals*. 15(1):1-13. *Microorganisms: Elicitation and Defense Responses*. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues*, edited by A. Jaime and T. d. Silva. Japan: Global Science Books.
- Petra Maria Johansson (2003)**. Biocontrol of *Fusarium* in wheat introducing bacteria to a system of complex interactions. Swedish University of Agricultural Sciences, Suède.
- Philippe Jacque, Philippe Delphosse, Marc Ongena, Philippe Lepoivre, et Pierre Cornélis (1993)**. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas*

fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. Cahier agricole, 301-307.

Pikovskaya R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17 362–370.

Press C. M., M. Wilson, S. Tuzun, and J. W. Kloepper (1997). Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. The American Phytopathological Society, 761-786.

Press, C.M., Loper, J.E. and Kloepper, J.W. (2001). Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology*. 91(6):593-598.

Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M. (1995). Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. **85**(10):1075-1081.

Radha T. K. (2007). Studies on methylotrophs and their beneficial effects on soybean (*Glycine max* (l.) merrill). University of agricultural sciences, Dharwad.

Ran L. X., L. C. van Loon, and P. A. H. M. Bakker (2005). No Role for Bacterially Produced Salicylic Acid in Rhizobacterial Induction of Systemic Resistance in *Arabidopsis*. The American Phytopathological Society, 1349-1355.

Raul Rivas, Martha E. Trujillo, Manuel Sanchez, Pedro F. Mateos, Eustoquio Martinez-Molina and Encarna Velazquez (2004) *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 513–517.

Rekibi Fouzi (2015). Analyse compétitive de la filière tomate sou serre dans la région de biskra. Université Mohammed Khdira, Biskra, Algérie.

Ritika Kapoor, Ruchi , Ajay Kumar, Amit Kumar, Sandip Patil et Amit Pratush (2012). Indole Acetic Acid production by fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizospheric soils of Malus and Pyrus. Recent Research in Science and Technology, 6-9.

Rock Chabot , Hani Antoun et Michel P. Cesca (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar, *phaseoli*. *Plant and Soil*, 311-321.

Ruchi, Ritika Kapoor, Ajay Kumar, Amit Kumar , Sandip Patil , Shobit Thapa et Mohinder Kaur (2012). Evaluation of plant growth promoting attributes and lytic enzyme production by fluorescent *Pseudomonas* diversity associated with Apple and Pear. International Journal of Scientific and Research Publications.

- Sabannavar S.J. and H.C.Lakshman** (2009). Effect of rock phosphate solubilization using mycorrhizal fungi and phosphobacteria on two high yielding varieties of *Sesamum indicum* l. World Journal of Agricultural Sciences, 470-479
- Sadia Alam et Samina Khalil** (2002). *In vitro* Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. International Journal Of Agriculture & Biology, 454-458.
- Saharan BS. et V. Nehra** (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sciences and Medicine Research, Volume 2011: LSMR-21.
- Samia Mezaache** (1997). Etude des Propriétés suppressives d'une souche de *Pseudomonas* isolée de la rhizosphère de la pomme de terre sur la croissance de deux bactéries et de deux champignons phytopathogènes. Université Abu Baker Belkaid, Tlemcen, Algérie.
- Sarma M.V.R.K, Krishna Saharan, Lalit Kumar, Ashwani Gautam, Avhijeet Kapoor** (2010). Process optimization for enhanced production of cell biomass and metabolites of fluorescent *Pseudomonad* R81. World Academy of Science, Engineering and Technology.997- 1001.
- Schwachtje J, Karojet S, Kunz S, Brouwer S, van Dongen JT** (2012) Plant-growth promoting effect of newly isolated rhizobacteria varies between two *Arabidopsis* ecotypes. Plant signaling and behavior 7(6):623-7.
- Shouan Zhang, Anne-Laure Moyne, M.S. Reddy, et Joseph W. Kloepper** (2002). The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. Biological Control, 288–296.
- Si Mhammed Abdeslam** (2010). Etude de la comptabilité végétative chez les popularion de *Fusarium oxysporum* isolé de l'Ouest Algérien. Université Mohammed Boudiaf, oran, Algérie.
- Siegrid Steinkellner, Roswitha Mammerler et Horst Vierheilig** (2005). Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. Journal of Plant Interactions, 23-/30.
- Slim Smaoui** (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. L'Université de Toulouse.
- Snissi A., L. Ezouhri et B.D Rossi** (2006). Contrôle biologique de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Biochimie, substances naturelles et envirennoment, 352- 356.

- Sophie Bordiec** (2010). Interaction entre la vigne (*Vitis vinifera* L.) et une bactérie PGPR, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN : mécanismes de défense impliqués lors de la perception de la bactérie par la plante, et lors de l'établissement de la protection contre le froid et la pourriture grise. Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Stéphane Compant** (2007). Interaction entre la vigne, *Vitis vinifera* L., et une bactérie endophytique, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN : colonisation, induction de défenses et résistance systémique contre *Botrytis cinerea*. Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Stijn Spaepen , Sofie Dobbelaere, Anja Croonenborghs , Jos Vanderleyden** (2008). Effects of Azospirillum brasilense indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil, 15–23.
- Sumera Yasmin1, Fauzia Y. Hafeez, Michael Schmid and Anton Hartmann** (2013). Plant beneficial rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizers. Pak. J. Bot., 45(2): 655-662.
- Takakura Y, Che FS, Ishida Y, Tsutsumi F, Kurotani K, Usami S, Isogai A, Imaseki H** (2008). Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants. Mol Plant Pathol, 9(4):525-9
- Toufouti Zabida Hadjer** (2013). Contribution à l'étude des maladies bactériennes de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivée en serres dans l'Est Algérien. Université Constantine 1, Algérie.
- Ulrike Jana** (2009). Etude des interactions entre la plante *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh et le ver de terre *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) : Application à la phytoremédiation de l'arsenic et de l'antimoine. Université Paris Est.
- Umesh P. Shrivastava, Ashok Kumar** (2013) Characterization and optimization of 1-Aminocyclopropane1Carboxylate Deaminase (ACCD) activity in different rhizospheric PGPR along with *Microbacterium* sp. strain ECI12A. International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, Vol 1 1(1): 11-15
- Valerie Gravel, Hani Antoun, Russell J. Tweddell** (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 Biology & Biochemistry, 1968–1977.

Venant Nihorimbere , Marc Ongena, Maïté Smargiassi, Philippe Thonart (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 327- 337.

Weisburg W G, S M Barns, D A Pelletier, and D J Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173(2): 697–703.

Yoav Bashan, Gina Holguin, and Ran Lifshitz (1993) Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Inc.

Zakhia F , Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P (2006) Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH-like* gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb Ecol.* 51(3):375-93.

Annexe 1. Milieux de culture**Pikovskaya Agar** (compositions par litre)

Extrait de levure	0.50g
Glucose	10g
Tricalcium phosphate	5g
Sulfate d'ammonium	0.50g
Chloride de potassium	0.20g
Sulfate de magnésium	0.10g
Sulfate de manganèse	0.0001g
Sulfate de fer	0.0001g
Agar	15g

pH 7.2 ± 0.2 à 25°C

Gélose nutritive (compositions par litre)

Peptone	5.0g
Extrait de viande bovine	3.0g
Agar	15 g

pH 7.0 ± 0.2 à 25°C

Gélose PDA (compositions par litre)

Agar	20.0g
Pomme de terre épluchée	200.0g
Dextrose	20.0g

pH 7.0 ± 0.5 à 25°C

Bouillon Luria Bertani (LB) (compositions par litre)

Tryptone	10.0g
Extrait de levure	5.0g
NaCl	10.0g

pH 7.0 ± 0.2 à 25°C

Milieu succinate : (compositions par litre)

Acide succinique	4g
K ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (traces)	0.2g

pH 7.0 ± 0.2 à 25°C

Annexe 2. Solutions Préparées**Réactif de salkowsky**

35% Acide perchlorique 50 ml

0,5 M de FeCl₃ 1 ml

Gardé à l'abri de la lumière.

Eau peptonée

Peptone 10 g

NaCl 5 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7

Réactif de Nessler

KI 3,5 g

HgI₂ 1,3 gH₂O 70 ml

NaOH 30% 30 ml

Solution tempon phosphate (PBS)K₂PO₄-KH₂PO₄ 10 mM

M NaCl 0.14M

pH 7.2

Annexe 3. FavorPrep Gel/PCR Purification Kit



FavorPrep™ GEL/ PCR Purification Kit

- For extraction of DNA fragments from agarose gel
 - For purification of PCR products or reaction mixtures
 (concentration and desalination of reaction mixtures)

Cat. No.: FAGCK 000
 FAGCK 001
 FAGCK 001-1
 (For Research Use Only)

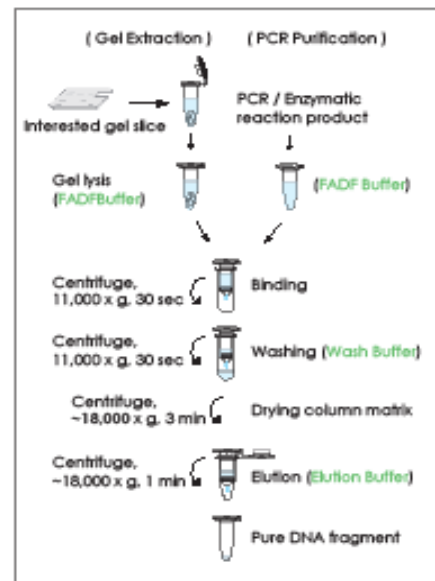
Kit Contents:

Cat. No.	FAGCK 000 (4 preps_sample)	FAGCK 001 (100 preps)	FAGCK 001-1 (300 preps)
FADF Buffer	3 ml	80 ml	240 ml
Wash Buffer (concentrate) ^a	1 ml	25 ml	50 ml
Elution Buffer	0.5 ml	6 ml	30 ml
FADF Column	4 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	4 pcs	100 pcs	300 pcs
User Manual	1	1	1
Preparation of Wash Buffer by adding ethanol (96 ~ 100%)			
Ethanol volume for Wash Buffer ^a	4 ml	100 ml	200 ml

Specification:

Principle: spin column (silica matrix)
 DNA Binding capacity of spin column: 20 µg
 Sample size: up to 300 mg of agarose gel
 up to 100 µl of reaction solution
 DNA size: 65 bp ~ 10 kbp
 Recovery: 70% ~ 85% for Gel extraction
 90% ~ 95% for PCR clean-up
 Operation time: 10 ~ 20 min
 Elution volume: 40 µl

Brief procedure:



Important Notes:

1. Buffer provided in this kit contain irritants. Wear gloves and lab coat when handling these buffer.
2. Add the required volume of ethanol (96~100%) to Wash Buffer before use.
3. Centrifugation steps are done by a microcentrifuge capable of the speed at 11,000 ~1,8000 x g.

Gel Extraction Protocol: For extraction of DNA fragments from agarose gel

Please Read Important Notes Before Starting Following Steps.

HINT: Prepare a 55 °C dry bath or water bath for step 4.

1. Excise the agarose gel with a clean scalpel.
 - Remove the extra agarose gel to minimize the size of the gel slice.
2. Transfer up to 300 mg of the gel slice into a microcentrifuge tube. (not provided).
 - The maximum volume of the gel slice is 300mg.
3. Add 500 µl of FADF Buffer to the sample and mix by vortexing.
 - For > 2% agarose gels, add 1000 µl of FADF Buffer.
4. Incubate at 55 °C for 5 ~ 10 minutes and vortex the tube every 2 ~ 3 minutes until the gel slice dissolved completely.
 - During incubation, interval vortexing can accelerate the gel dissolved.
 - Make sure that the gel slice has been dissolved completely before proceed the next step.
 - After gel dissolved, make sure that the color of sample mixture is yellow. If the color is violet, add 10 µl of sodium acetate, 3M, pH 5.0. Mix well to make the color of sample mixture turned to yellow.
5. Cool down the sample mixture to room temperature. And place a FADF Column into a Collection Tube.
6. Transfer 800 µl of the sample mixture to the FADF Column. Centrifuge at 11,000 x g for 30 seconds, then discard the flow-through.
 - If the sample mixture is more than 800 µl, repeat this step for the rest of the sample mixture.
7. Add 750 µl of Wash Buffer (ethanol added) to the FADF Column. Centrifuge at 11,000 x g for 30 seconds, then discard the flow-through.
 - Make sure that ethanol (96-100 %) has been added into Wash Buffer when first use.
8. Centrifuge again at full speed (~ 18,000 x g) for an additional 3 minutes to dry the column matrix.
 - Important step ! The residual liquid should be removed thoroughly on this step.
9. Place the FADF Column to a new microcentrifuge tube (not provided).
10. Add 40 µl of Elution Buffer or ddH₂O to the membrane center of the FADF Column. Stand the FADF Column for 1 min.
 - Important step ! For effective elution, make sure that the elution solution is dispensed onto the membrane center and is absorbed completely.
 - Important : Do not elute the DNA using less than suggested volume (40 µl). It will lower the final yield.
11. Centrifuge at full speed (~ 18,000 x g) for 1 min to elute the DNA.