

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Laboratoire d'Ecologie Microbienne

**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie    **Filière :** Sciences biologiques  
**Spécialité :** Microbiologie

Présentée par  
**BENSLIM Asma**

*Thème*

**Identification de microorganismes à caractère antagoniste :  
Détermination des métabolites impliqués**

**Soutenue le : 09/01/2019**

**Devant le Jury composé de :**

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>		
<b>Mr Touati Abdelaziz</b>	Professeur	Univ. de Béjaïa	Président
<b>Mme Mezaache-Aichour Samia</b>	MCA	Univ. de Sétif 1	Rapporteur
<b>Mr Aissat Kamel</b>	Professeur	Univ. de Batna 2	Co-rapporteur
<b>Mme Boulila Farida</b>	MCA	Univ. de Béjaïa	Examineur
<b>Mr Khenchouche Abdelhalim</b>	MCA	Univ. de Sétif 1	Examineur

**Année Universitaire : 2018/2019**

## *Dedications*

This work is dedicated to the memory of my dear baba-jedou "*Lahcène*"

To my dearest Ommi "*Khadija*"

To my dear parents "*Zeineb*" and "*Lemnaouer*"

You made me what I am.

To the family's shiny star "*Chaïma*"

Thank you for making my daily entertaining and exciting.

In the memory of a sacred *April*,

To whom I love the most!!!

## ***Remerciement***

En préambule à ce manuscrit, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de cette thèse.

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux Dr. ***Farida BOULILA*** et Dr. ***Abdelhalim KHENCHOUCHE*** d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit, ainsi qu'au Pr. ***Abdelaziz TOUATI*** d'avoir accepté de présider le jury ; je suis convaincue que votre contribution assurera la réussite de ce travail.

Un énorme merci aux directeurs de ma thèse. ***Mme Samia MEZAACHE-AICHOOR***, au-delà de votre rôle de directeur de thèse, l'amour et la tendresse que vous m'aviez donnée ressemblaient davantage à l'amour d'une mère, aucun mot ne sera suffisant pour vous remercier. ***Pr. Kamel AISSAT***, je n'oublierai jamais que vous étiez la première personne qui m'a chaleureusement accueilli là où je ne savais personne, vous m'avez ouvert la porte de fortune.

Un grand merci aux docteurs ***Chrisoph ENGL***, chef de l'équipe « Molecular Microbiology » et ***Fuquan LIU*** chef de l'équipe « Plant Molecular Biochemistry » à Queen's University Belfast ; de m'avoir ouvert les portes de leurs laboratoires, je n'oublierai jamais leur soutien pendant mon séjour.

Ma profonde reconnaissance au Pr. ***Mohamed Mihoub ZERROUG*** et à Mme ***Nora HAICHOOR***, merci pour votre disponibilité et vos encouragements ; c'est grâce à vous que j'ai appris le vrai esprit d'équipe.

Je suis également très reconnaissante à toutes les personnes que j'ai rencontré durant mon parcours de doctorat à Béjaïa, en particulier : ***Yousra BOUAOUD*** et ***Hamza AIT SEDDIK***; et de Sétif : ***Leila, Mimi*** et ***Ines***.

Merci à tous...

***Asma BENSLIM***

## Liste des abréviations

AA: Acide Aminé

ACC: Aminocyclopropane carboxylate

AIA: Acide Indole Acétique

AJ : Acide Jasmonique

ANK: Ankyrin

AS : Acide salicylique

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

*bmy* : Bacillomycine

cLPs: cyclic Lipopeptides, Lipopeptides cyliques

DMSO: Diméthyle sulfoxyde

*fen*: Fengycine

GRXC9: Glutaredoxin

ISR : Induced systemic resistance (Résistance Systémique Induite)

LLP1: Legume Lectine Protein 1

LPS : Lipopolysaccharides

MeJa : Méthyle-jasmonate

*myc* : Mycosubtiline

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NIMIN1: Non Immunity 1-interacting 1

NPR1: Non-expressor of Pathogenesis-Related Gene 1

qRT-PCR :

PR1: Pathogenesis-Related Protein 1

ROS: Reactive Oxygen Species (Espèce Oxygénées réactives)

SAR : Systemic Aquired Resistance (Résistance Systémique Acquise)

*stf* : Surfactine

UGT76B1: UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase

TMV : Tobacco Mosaic Virus

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure de la viscosine	5
<b>Figure 2</b> : Structure de (A) massétolide A et de (B) le cLPs purifié par de Bruijn <i>et al.</i> (2007)	6
<b>Figure 3</b> : Structure de l'amphisine	7
<b>Figure 4</b> : Structure de l'orfamide A	7
<b>Figure 5</b> : Structures des putisolvines	8
<b>Figure 6</b> : Structure des tolaasines	9
<b>Figure 7</b> : Structures des syringomycines	9
<b>Figure 8</b> : Structure primaire de l'iturine	10
<b>Figure 9</b> : Structure de la bacillomycine D	11
<b>Figure 10</b> : Structure de la mycosubtiline	11
<b>Figure 11</b> : Structure primaire la surfactine	12
<b>Figure 12</b> : Structure des fengycines	13
<b>Figure 13</b> : Structure de l'éthylène, l'acide jasmonique, le méthyle-jasmonate (MeJa) et l'acide salicylique	19
<b>Figure 14</b> : Transduction du signal dans les cas de la SAR et l'ISR chez <i>Arabidopsis</i>	25
<b>Figure 15</b> : Confrontations à distance bactérie/champignon	36
<b>Figure 16</b> : Confrontation directe bactérie/champignon	40
<b>Figure 17</b> : (A) Profil électrophorétiques des produits de PCR chez 24 souches antagonistes, criblés pour les quatre gènes de biosynthèse des cLPs, (B) diagramme de Venn montrant la prévalence des gènes de biosynthèse de cLPs chez les 20 bacilles à Gram positif.	46
<b>Figure 18</b> : Corrélation linéaire entre le taux d'inhibition de <i>P. infestans</i> et le nombre de cLPs	49
<b>Figure 19</b> : Concentrations de l'acide salicylique produit par les souches <i>B. amyloliquefaciens</i> A16, <i>B. oryzaecorticis</i> XI44, <i>B. pumilus</i> B10 et <i>P. plecoglossicida</i> XI39	49
<b>Figure 20</b> : Régulation des gènes induits par l'acide salicylique chez <i>Arabidopsis</i>	51
<b>Figure 21</b> : Réponse des gènes de défense dépendents du salicylate chez <i>Arabidopsis</i> aux quatre isolats bactériens	53
<b>Figure 22</b> : Confrontation à distance des souches vis-à-vis de <i>P. infestans</i>	56

<b>Figure 23 :</b> Inhibition de la croissance des champignons par production de substances volatiles	58
<b>Figure 24 :</b> Capacité de formation des biofilms sur milieu TSB par les souches testées	60
<b>Figure 25A:</b> Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de la levée après traitement avec les Gram-positives	63
<b>Figure 25B:</b> Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de la levée après traitement avec les Gram-négatives	64
<b>Figure 26A :</b> Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de tallage après traitement avec les Gram-positives	65
<b>Figure 26B :</b> Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de tallage après traitement avec les Gram-négatives	66
<b>Figure 27 :</b> Symptômes causés par <i>F. graminearum</i> sur les plantules de blé	70
<b>Figure 28A :</b> Taux de déclin enregistré après inoculation par <i>F. graminearum</i> chez les plantules de blé traitées avec les Gram-positives	71
<b>Figure 28B :</b> Taux de déclin enregistré après inoculation par <i>F. graminearum</i> chez les plantules de blé traitées avec les Gram-négatives	72
<b>Figure 29 :</b> (A) Symptômes de la brûlure des semis sur les feuilles infectées, (B) comparaison entre une plantule saine (traitée avec <i>P. protegens</i> XII11) et des plantules atteintes (traitées avec <i>B. amyloliquefaciens</i> A16 et <i>P. plecoglossicida</i> 29INH)	73
<b>Figure 30A :</b> Pourcentage des feuilles infectées et non-infectées issues des plantes infectées après inoculation avec des rhizobactéries Gram-positives	74
<b>Figure 30B :</b> Pourcentage des feuilles infectées et non-infectées issues des plantes infectées après inoculation avec des rhizobactéries Gram-négatives	75
<b>Figure 31 :</b> Croissances bactériennes sur milieu minimum (M9) additionné des fongicides : Vapcotop (A)	80
<b>Figure 31 :</b> Croissances bactériennes sur milieu minimum (M9) additionné des fongicides : (B) Curatine V, (C) Kazir et (D) Propicone	81
<b>Figure 32 :</b> Production d'enzymes lytiques par les souches pathogènes sur milieux spécifiques	83
<b>Figure 33 :</b> Activité antifongique par confrontation directe des souches pathogènes contre des champignons résistants aux fongicides.	85
<b>Figure 34 :</b> Inhibition de la croissance des souches fongiques résistants aux fongicides par les isolats pathogènes	86

<b>Figure 35 :</b> Activité antifongique par confrontation indirecte des souches pathogènes contre <i>P. infestans</i>	87
<b>Figure 36 :</b> Inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par production de substances volatiles	88
<b>Figure 37 :</b> Effet de <i>A. calcoaceticus</i> XI22 et ses combinaisons sur la croissance du blé durant les phases de la levée (A) et du tallage (B et C)	93
<b>Figure 38 :</b> Effet de <i>H. alvei</i> XI47 et ses combinaisons sur la croissance du blé durant les phases de la levée (A) et du tallage (B et C)	94
<b>Figure 39 :</b> Effet de <i>S. maltophilia</i> P29 et ses combinaisons sur la croissance du blé durant les phases de la levée (A) et du tallage (B et C)	95

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I</b> : Différentes souches fongiques testées	27
<b>Tableau II</b> : Réactifs et conditions des réactions PCRs utilisées pour l'amplification des ADNr 16S et la préparation pour le séquençage	29
<b>Tableau III</b> : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes de biosynthèse des cLPs.	30
<b>Tableau IV</b> : Réactifs et conditions de PCR pour amplification des gènes de biosynthèses des cLPs.	30
<b>Tableau V</b> : Mélange réactionnel et conditions de la transcription inverse	33
<b>Tableau VI</b> : Amorces utilisées pour l'amplification et des gènes de défense d' <i>Arabidopsis</i> .	33
<b>Tableau VII</b> : Mélange réactionnels et conditions de la réaction q-PCR	34
<b>Tableau VIII</b> : Familles chimiques et matières actives des fongicides utilisés.	39
<b>Tableau IX</b> : Concentrations des solutions de fongicides utilisées.	39
<b>Tableau X</b> : Identification moléculaire des souches Gram-positives et Gram-négatives isolées de la région de Sétif	44
<b>Tableau XI</b> : Activité enzymatiques des trois souches pathogènes	83
<b>Tableau XII</b> : Effets de <i>A. calcoaceticus</i> (XI22), <i>H. alvei</i> (XI47) et <i>S. maltophilia</i> (P29) seules ou en combinaison sur la croissance du blé	90

# *Introduction*

## Introduction

Le défi pressant, actuellement, est de produire plus de nourriture et assurer la sécurité alimentaire, afin d'améliorer la santé et le bien-être des humains. La production alimentaire pourrait être augmentée par plusieurs moyens, seuls ou combinés entre eux. L'augmentation de la superficie des terres agricoles, la gestion des sols et des ressources d'eau, l'utilisation de produits agrochimiques et des organismes génétiquement modifiés (OGM) résistants; sont les stratégies d'amélioration du rendement de cultures les plus pratiquées. La réponse immédiate à la nécessité d'augmenter la production était l'utilisation intensive des composés agrochimiques. Ces deniers comprennent deux grands groupes: les engrais et les pesticides chimiques (Carvalho, 2006).

L'utilisation de pesticides chimiques, y compris les herbicides, les rodenticides, les insecticides et les fongicides, semble le régime le plus efficace pour protéger les cultures des ravageurs et des maladies (Gerhardson, 2002; Carvalho, 2006). Ils ont permis de réduire les pertes significativement et d'améliorer le rendement des cultures de maïs, légumes, pomme de terre, coton,... (Carvalho, 2006; Aktar *et al.*, 2009).

Cependant, Les pesticides synthétiques persistent et se dégradent lentement dans l'environnement, ont une faible solubilité dans l'eau et s'adsorbent aux molécules des sédiments et du sol (Carriger *et al.*, 2006). Ils représentent une menace pour la santé publique et l'environnement, en plus de l'apparition de populations ciblées résistantes aux pesticides (Gerhardson, 2002).

Plusieurs échecs et problèmes de santé chez l'homme et autres espèces sont dus à l'exposition aux produits phytosanitaires de synthèse. Les pesticides chimiques sont des perturbateurs de la fonction endocrinienne. Ils seraient impliqués dans l'altération du fonctionnement normal des systèmes nerveux, immunitaire et endocrinien (Crisp *et al.*, 1998) ; causant des tumeurs se développant en cancers (Hurley *et al.*, 1998). De plus, ils sont incriminés dans des cas d'intoxication des animaux domestiques (Caloni *et al.*, 2016), et peuvent même réduire la densité bactérienne dans les sols provenant de champs de production conventionnelle (Bulluck III *et al.*, 2002).

Au regard des inconvénients des pesticides synthétiques, il est important de trouver des solutions alternatives permettant de lutter contre les phytopathogènes tout en diminuant les risques. Ceci fait appel à la rationalisation des pratiques agricoles (fumigation-stérilisation, désinfection des graines, rotation des cultures, contrôle des vecteurs de la maladie, etc.), à l'utilisation de variétés végétales résistantes (croisements sélectifs, insertion de gènes, etc.) ou au développement des biopesticides.

La lutte intégrée et l'agriculture biologique peuvent réduire la dépendance aux apports agrochimiques tout en maintenant des rendements de cultures élevés, améliorant l'économie agricole et en rendant l'agriculture environnementalement saine. Le but de l'agriculture biologique est d'augmenter les processus écologiques qui favorisent la nutrition des plantes tout en conservant les sols et les ressources hydriques (Pimentel *et al.*, 2005). La commercialisation et l'utilisation pratique des microorganismes bénéfiques tels que les agents fixateurs d'azote, les supprimeurs des pathogènes des plantes et autres, dans les systèmes de culture n'est pas récente ; ils ont probablement été utilisés pendant très longtemps (Gerhardson, 2002).

Les PGPR pour « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » peuvent persister, au fil du temps, dans les sols pulvérisés avec des pesticides chimiques en les utilisant comme substrats pour leur métabolisme (Haney *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004; Mandal *et al.*, 2013; Anzuay *et al.*, 2015). Ainsi, ces microorganismes servent de bioremédiateurs des sols contaminés par les pesticides synthétiques.

Des PGPR appartenant à plusieurs genres bactériens sont connus pour leur stimulation de la croissance des plantes (Kloepper *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2010; Upadhyay et Srivastava, 2010; Carlos *et al.*, 2016). Cette stimulation peut se produire directement *via* des molécules stimulatrices et régulatrices telles que les auxines (Glick *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 2010, Khan *et al.*, 2016), ou par l'augmentation de la disponibilité des nutriments (Raaijmakers *et al.*, 2009) *via* la production d'enzymes telles que les phosphatases hydrolysant les composés phosphatés insolubles (Vacheron *et al.*, 2013) ou de sidérophores séquestrant le fer (Rasouli Sadaghiani *et al.*, 2008).

En outre, la stimulation de la croissance peut résulter indirectement de l'effet protecteur des PGPRs en diminuant la sévérité des maladies (Raaijmakers *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). La phytoprotection se produit par la biosynthèse de métabolites secondaires antimicrobiens (Grover *et al.*, 2010; Couillerot *et al.*, 2011; Hua et Höfte, 2015), d'enzymes hydrolytiques et compétition pour les nutriments (Mezaache-Aichour *et al.*, 2014); colonisation des racines des plantes (Raaijmakers et Weller, 2001; Landa *et al.*, 2002; Kamilova *et al.*, 2005); et l'induction des défenses des plantes (Kamilova *et al.*, 2005; Cawoy *et al.*, 2014).

L'objectif de ce travail est d'apporter un plus dans la lutte biologique par :  
Une première approche de biologie moléculaire consistant en :

1. L'identification génotypique de bactéries rhizosphériques ayant la capacité d'inhiber *in vitro* des champignons phytopathogènes,
2. Le screening des isolats sélectionnés pour des gènes codant pour des cLPs probablement impliqués dans l'activité antagoniste de ces isolats,
3. L'évaluation de l'effet régulateur de l'expression des gènes de défense d'*Arabidopsis* par certains isolats.

Ensuite les capacités de bioprotection, bioremédiation, de stimulation de la croissance et de la persistance ont été estimées par :

4. L'évaluation de (i) l'activité antifongique des isolats par production de composés volatils, (ii) l'activité antifongique des isolats pathogènes pour l'homme vis-à-vis de champignons phytopathogènes résistants aux fongicides.
5. Mise en évidence de la capacité des souches à former le biofilm et à dégrader les fongicides,
6. Evaluation de la performance stimulatrice et protectrice des souches isolées sur le blé dur.

Pour cela, une synthèse bibliographique a été réalisée, et plusieurs approches expérimentales ont ensuite été retenues.

Le présent travail a été soutenu par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de la république algérienne, dans le cadre du projet PNR n°:1/u19/332 intitulé «Contribution dans la lutte contre les maladies cryptogamiques: Recherche de sols à caractères suppressifs».

# *Chapitre I*

## **Lipopeptides cycliques «Cyclic lipopeptides ou cLPs»**

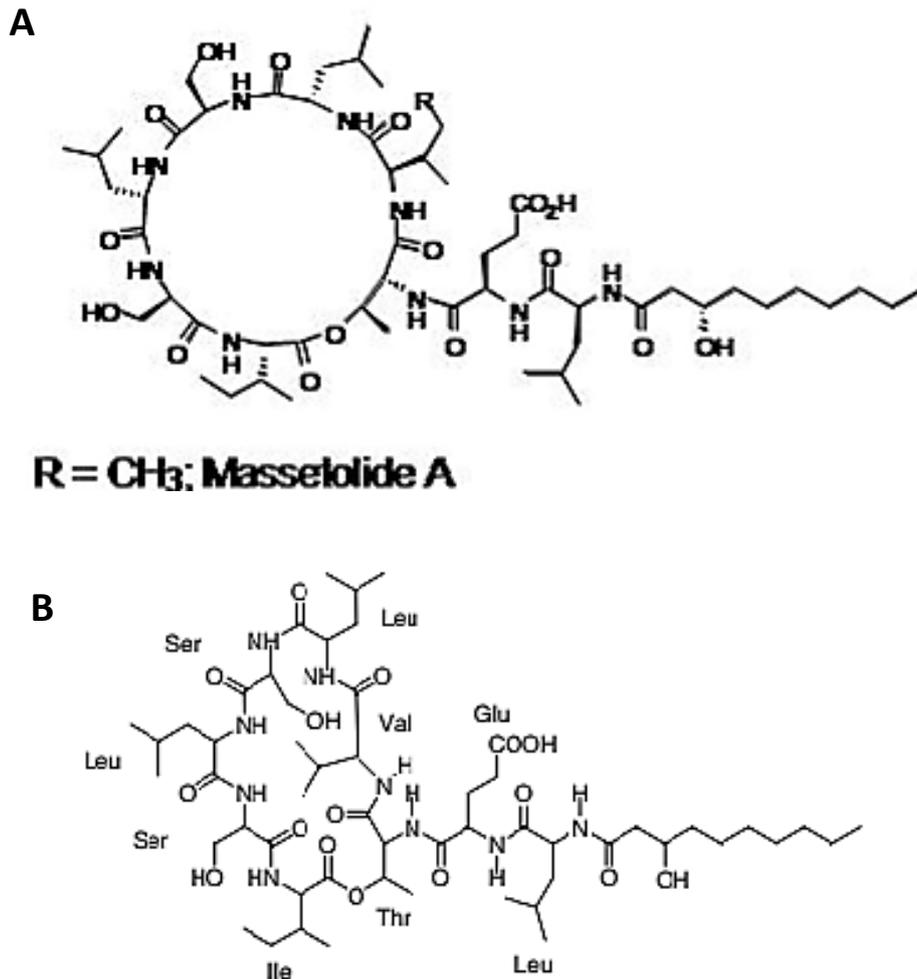
Les espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas* associées aux plantes sont connues pour jouer un rôle clé dans la stimulation de la croissance et de la santé des plantes grâce à différents mécanismes antagonistes. Une partie de ces activités est due à des métabolites secondaires non ribosomiques appelés lipopeptides cycliques (Hua et Höfte, 2015; Yang *et al.*, 2017).

Les surfactants microbiens ou bien les «biosurfactants», sont des molécules tensioactives produites par un grand nombre de microorganismes. Ces composés tensioactifs ont la capacité de réduire la tension superficielle et interfaciale entre deux phases fluides non miscibles (Das *et al.*, 2008). Les lipopeptides sont parmi les biosurfactants répandus les plus populaires. Ils sont composés d'un acide gras lié à une fraction peptidique cyclique ou linéaire (Das *et al.*, 2008 ; Raaijmakers *et al.*, 2010, Mnif et Ghribi, 2015). C'est un groupe d'isoformes qui diffèrent entre eux par : (i) la séquence des acides aminés du peptide, (ii) la longueur de la chaîne lipidique et (iii) par la liaison établie entre ces deux parties (Mnif et Ghribi, 2015). Les lipopeptides cycliques sont produits par les champignons tels que *Aspergillus*, et par des bactéries telles que les espèces des genres *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Bacillus* (Kuiper *et al.*, 2004; de Bruijn *et al.*, 2007 ; Grover *et al.*, 2010 ; Raaijmakers *et al.*, 2010). Plusieurs isoformes peuvent être produites par la même souche bactérienne (Mnif et Ghribi, 2015).

### **1.1. Structure des lipopeptides cycliques**

Les lipopeptides cycliques sont synthétisés par une voie de synthèse non-ribosomique dite «non-ribosomal peptide synthetases ou NRPSs» impliquant plusieurs enzymes (Finking et Marahiel, 2004 ; Stein, 2005). La synthèse des peptides ribosomiques est soumise à plusieurs mécanismes de « proof-reading » qui sont absents dans le système non-ribosomique. Cependant, la synthèse ribosomique est limitée par l'ensemble des 20 acides aminés essentiels comme unités formant les peptides, contrairement à la NRPS qui implique des résidus supplémentaires (Marahiel *et al.*, 1997). Ainsi, la diversité structurelle est une caractéristique prédominante des peptides non-ribosomiques. Ils contiennent des acides aminés non conventionnels et d'autres molécules non-protéogéniques qui ne sont pas utilisées dans la synthèse ribosomique (Finking et Marahiel, 2004).



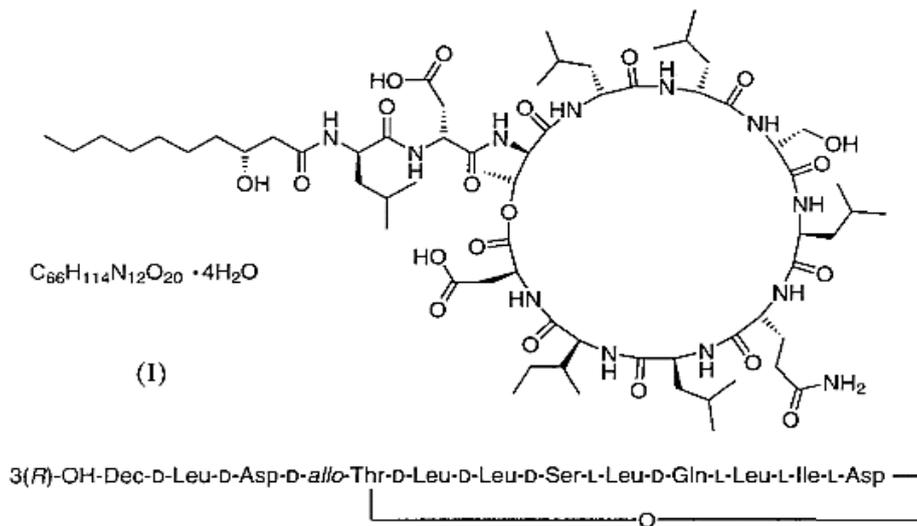


**Figure 2.** Structure de (A) massétoïdide A (Gerard *et al.*, 1997 ; Mazzola *et al.*, 2009) ; et de (B) le cLPs purifié par de Bruijn *et al.* (2007).

Le résidu *allo*-isoleucine du massétoïdide A est remplacé par la valine en position AA4.

### ***b. Les amphisines***

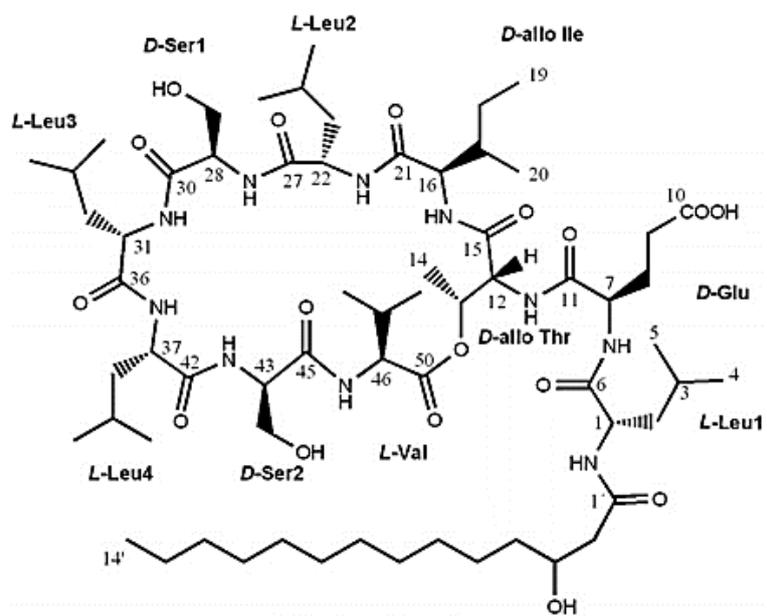
Les membres du groupe des amphisines contiennent onze acides aminés, liés au 3-HDA (Figure 3). De même que pour les viscosines, le cycle des amphisines se forme entre l'acide aminé C-terminal et le résidu thréonine en troisième position (Sørensen *et al.*, 2001; Raaijmakers *et al.*, 2006 ; Raaijmakers *et al.*, 2010).



**Figure 3.** Structure de l'amphisine (Sørensen *et al.*, 2001)

**c. Les orfamides**

Cette classe comprend des cLPs produits par *P. fluorescens* Pf-5 intermédiaires des viscosines et des amphisines, nommés les orfamides (Figure 4 ; Gross *et al.*, 2007). Les orfamides (A à G) contiennent une fraction peptidique de 10 acides aminés et une chaîne lipidique de 12 à 16 carbones. L'orfamide A et l'orfamide B diffèrent seulement par la substitution de la valine en position AA4 par l'isoleucine dans l'orfamide B. Ce dernier a la même séquence peptidique que l'orfamide G mais une chaîne lipidique plus courte: 14 carbones pour l'orfamide B et 16 carbones pour l'orfamide G (Ma *et al.*, 2016).

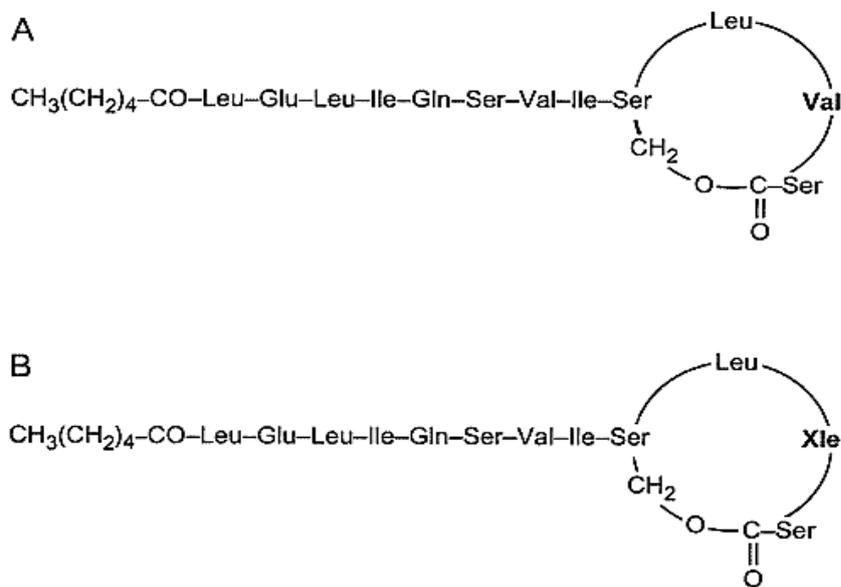


**Figure 4.** Structure de l'orfamide A (Gross *et al.*, 2007)

#### *d. Les putisolvines*

Cette classe a été décrite pour la première fois par Kuiper *et al.* (2004). Les lipopeptides sont formés d'une fraction peptidique de 12 acides aminés liée par son extrémité N-terminale à un acide gras hexanoïque. L'acide carboxylique C-terminal du peptide forme un ester avec le groupement hydroxyle de la chaîne latérale du résidu sérine en position AA9, formant un anneau.

Cette classe comprend deux membres : les putisolvine I et II, qui diffèrent par la substitution du résidu valine dans la putisolvine I, par un résidu leucine ou isoleucine dans la putisolvine II (Figure 5 ; Kuiper *et al.*, 2004).

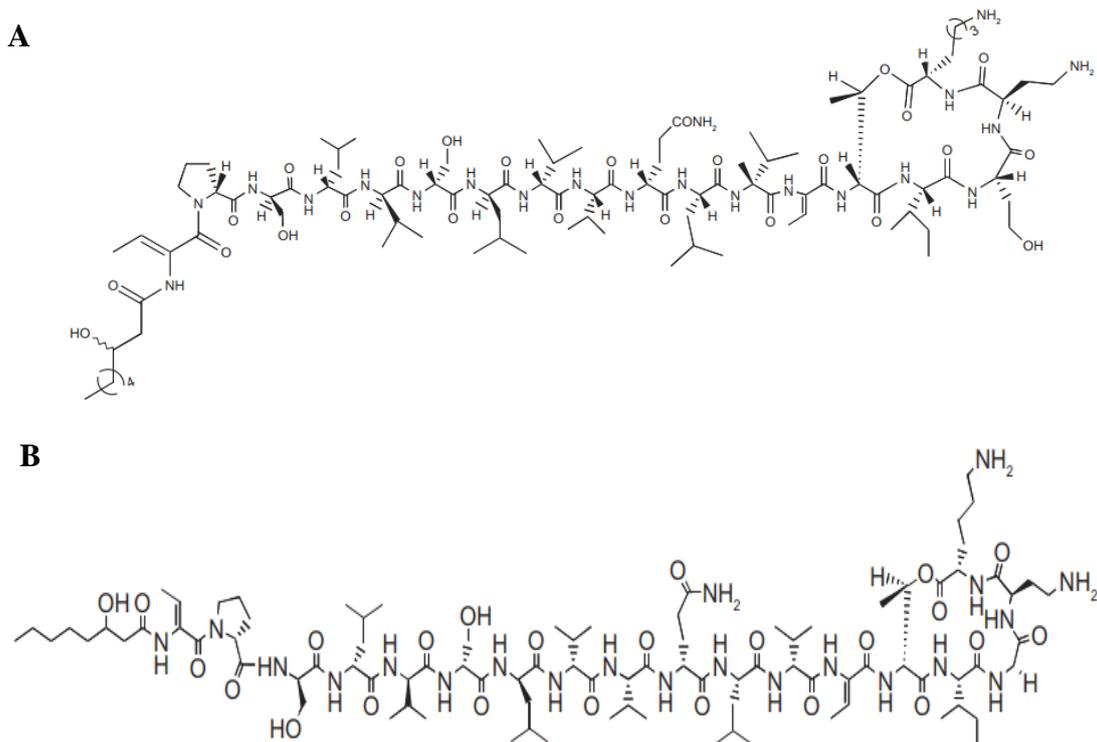


**Figure 5.** Structures des putisolvines (Kuiper *et al.*, 2004).

(A) putisolvine I, (B) putisolvine II.

#### *e. Les tolaasines*

Les cLPs appartenant au groupe des tolaasines sont plus diversifiés grâce aux variations de la composition et de la longueur du peptide (19 à 25 acides aminés) et de la chaîne lipidique (acides 3-hydroxydécanoïque ou 3-hydroxyoctanoïque). La fraction peptidique de ces cLPs contient plusieurs acides aminés non conventionnels, tels que l'acide 2,3-dihydro-2-aminobutyrique (Dhb) et l'homosérine (Hse). Le cycle de la chaîne peptidique contient 5 acides aminés, et est formé entre l'acide aminé C-terminal et le résidu *allo*-Thréonine en position AA14 (Figure 6 ; Nutkins *et al.*, 1991; Raaijmakers *et al.*, 2006).

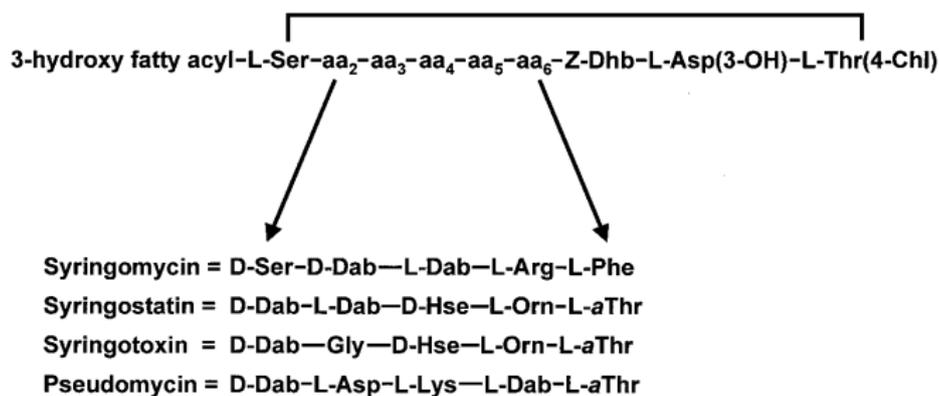


**Figure 6.** Structure des tolaasines (Andolfi *et al.*, 2008).

(A) tolaasine I, (B) tolaasine II.

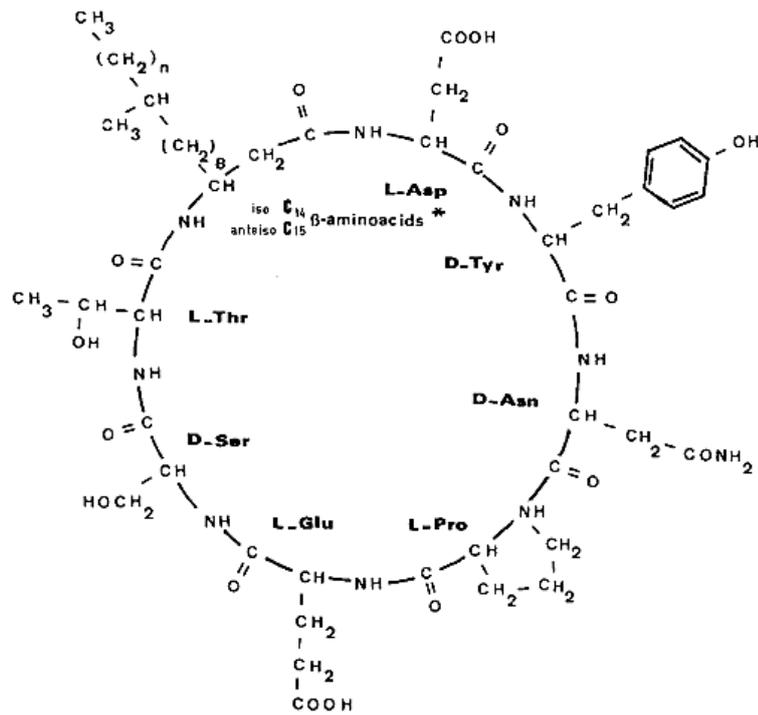
### *f. Les syringomycines*

Les syringomycines sont des nonapeptides (Segre *et al.*, 1989), structurellement similaires aux viscosines (Raaijmakers *et al.*, 2006). Cependant, les syringomycines contiennent des acides aminés inhabituels tels que: l'acide 2,3-dihydro-2-aminobutyrique, l'acide 2,4-diaminobutyrique et le 4-chlorothréonine (Thr 4-Chl) en position C-terminale (Figure 7). L'anneau se forme entre le résidu sérine N-terminal et le résidu thréonine C-terminal (Ballio *et al.*, 1988; Segre *et al.*, 1989; Ballio *et al.*, 1990).



**Figure 7.** Structures des syringomycines (Bender *et al.*, 1999)

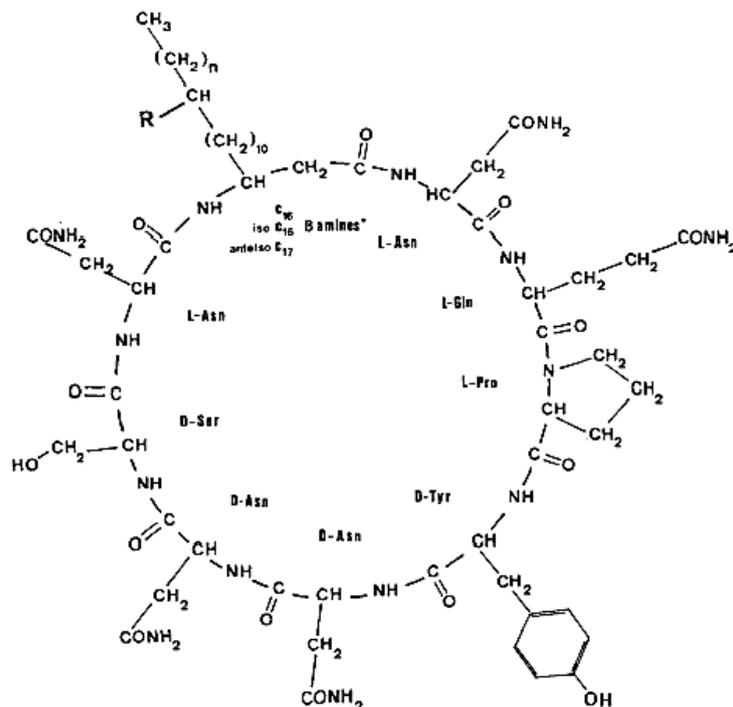




\*n = 0, 3-amino-12-methyl-tri-décanoic acid; n = 1, 3-amino 12-méthyl tétradécanoic acid

**Figure 9.** Structure de la bacillomycine D (Peypoux *et al.*, 1981)

La mycosubtiline ne présente aucune migration par électrophorèse et donne une réaction négative à la ninhydrine; ce qui confirme l'absence de groupements carboxyle et amine libres dans sa structure cyclique (Figure 10 ; Peypoux *et al.*, 1976).

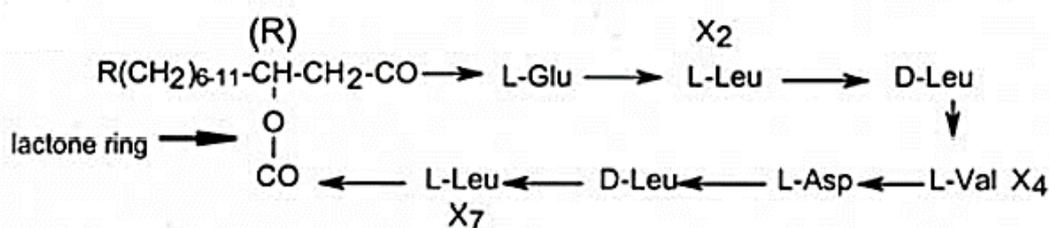


Formule 1. \* R = H, n = 1 : acide amino-3 hexadécanoïque; R = CH<sub>3</sub>, n = 0 : acide amino-3 méthyl-14 pentadécanoïque; R = CH<sub>3</sub>, n = 1 : acide amino-3 méthyl-14 hexadécanoïque

**Figure 10.** Structure de la mycosubtiline (Peypoux *et al.*, 1976)

### b. Les surfactines

Les surfactines sont aussi composées d'un heptapeptide (Arima *et al.*, 1968), attaché à une chaîne d'acide gras  $\beta$ -hydroxylé de 12 à 16 carbones formant un cycle lactone (Kakinuma *et al.*, 1969a ; Kakinuma *et al.*, 1969b; Das *et al.*, 2008; Ongena et Jacques 2008). L'heptapeptide est constitué des acides aminés: L-Glutamate, L-Leucine, D-Leucine, L-Valine, L-Aspartate, D-Leucine et L-Leucine; où les acides aminés hydrophobes occupent les positions AA2, AA3, AA4, AA6 et AA7, tandis que le résidu aspartyl se trouve en position AA5 (Figure 11 ; Baumgart *et al.*, 1991; Bonmatin *et al.*, 2003).



**Figure 11.** Structure primaire de la surfactine A (Bonmatin *et al.*, 2003).

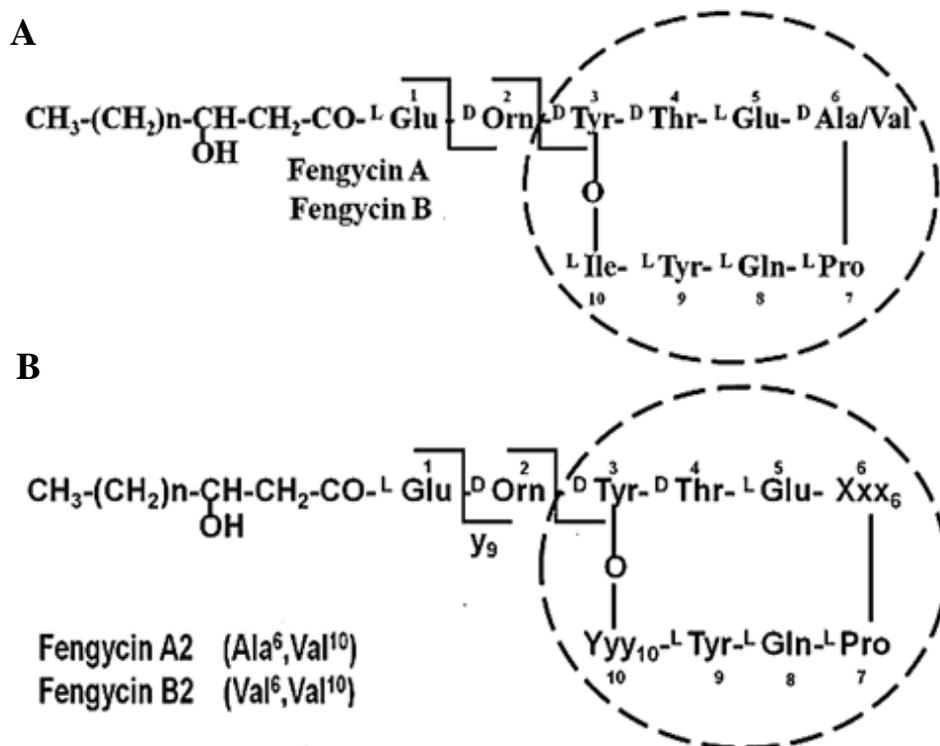
Les résidus X sont variables selon la souche étudiée ou la voie de biosynthèse.

Plusieurs homologues naturels ou synthétiques de ces lipopeptides ont été mis en évidence ; tel que la [Ala4]surfactine dans laquelle la valine en position AA4 de la surfactine est remplacée par l'alanine (Peypoux *et al.*, 1994). Les surfactines B et C dérivent de la surfactine A par substitution de la leucine C-terminale par la valine et l'isoleucine, respectivement (Baumgart *et al.*, 1991).

### c. Les fengycines

La troisième famille de cLPs, comprend les fengycines A et B. Ces deux membres diffèrent d'un seul acide aminé: où la fengycine A possède un résidu D-Alanine en position AA6, alors que la fengycine B possède un résidu D-Valine (Pathak *et al.*, 2012). Dans le cas où le résidu L-Tyrosine en position AA9 est configuré en D-Tyrosine, les fengycines sont alors appelées plipastatines (Volpon *et al.*, 2000).

Les fengycines sont des lipodécapeptides liés à une chaîne lipidique  $\beta$ -hydroxylée de 15 à 19 carbones saturée ou non saturée (Vanittanakom et Loeffler, 1986). Le cycle lactone se forme entre le groupement hydroxyle de la chaîne latérale phénolique de la tyrosine en position AA3 et le groupement carboxyle de l'acide aminé C-terminal en position AA10 (Figure 12 ; Pathak *et al.*, 2012). Ces mêmes auteurs ont mis en évidence deux nouvelles variantes dans la famille des fengycines. La variante de la fengycine A nommée fengycine A2, avec une substitution de l'isoleucine par la valine en position AA10. Cependant la fengycine B2 (variante de la fengycine B) contient deux résidus valine en positions AA6 et AA10 (Figure 12).



**Figure 12.** Structure des fengycines (Pathak *et al.*, 2012).

(A) Fengycines A et B, (B) Fengycines A2 et B2

## 1.2. Rôle des lipopeptides cycliques

La diversité structurelle des cLPs produits par les *Bacillus* et les *Pseudomonas* confère différents rôles à ces métabolites et à leurs producteurs (Raaijmakers *et al.*, 2010).

### 1.2.1. Rôle dans la nutrition

Certains cLPs confèrent un avantage à persister et à croître dans des niches écologiques spécifiques aux souches *B. subtilis* productrices. La production de biosurfactants est influencée par le type et la quantité de substrats hydrophobes dans le milieu. Ces derniers induisent des changements de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires, et par conséquent, améliorent l'utilisation de substrats spécifiques (Mukherjee et Das, 2005). La souche *B. subtilis* DM-04, produisant des taux élevés de surfactine, a montré une plus grande hydrophobicité de la surface ainsi que la réduction de la tension superficielle par rapport à *B. subtilis* DM-03 produisant majoritairement des iturines (Mukherjee et Das, 2005).

### 1.2.2. Rôle dans la cytotoxicité/pathogénèse

Les lipopeptides peuvent entraîner l'hémolyse des érythrocytes chez les mammifères comme les humains, les lapins, les moutons (Scaloni *et al.*, 2004), et le cheval (Rainey *et al.*, 1991). Ils peuvent aussi être impliqués dans la pathogénèse de la souche productrice; comme la tolaasine produite par *P. tolaasii*. Les filtrats bactériens de cette dernière causent des perforations et des taches brunes dans les tissus sectionnés des carpophores de champignons (Rainey *et al.*, 1991).

Cependant, la syringomycine et la syringopeptine produites par *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* seraient impliquées dans le pouvoir phytotoxique de la souche sur les plantes du tabac et du blé (Vassilev *et al.*, 1996). Les nécroses sur les feuilles du tabac causées par la cormycine A purifiée sont similaires à celles causées par les filtrats de *Pseudomonas corrugata*; confirmant que ce lipopeptide est responsable de la pathogénèse de la bactérie (Scaloni *et al.*, 2004).

### 1.2.3. Rôle dans l'antagonisme

Dans les habitats naturels, les cLPs sont impliqués dans les interactions avec les autres microorganismes. Les cLPs de *Pseudomonas* et de *Bacillus* exercent, *in vitro*, un effet inhibiteur de la croissance de plusieurs microorganismes, y compris les virus, les mycoplasmes, les bactéries, les champignons et les oomycètes (Raaijmakers *et al.*, 2010).

La concentration minimale inhibitrice du massétolide A vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis* est moins faible par rapport à la viscosine. Bien que les deux soient membres de la même famille, la différence de l'activité antibactérienne est due à la différence structurelle de leurs chaînes aliphatiques (Gerard *et al.*, 1997). Les cLPs des *Pseudomonas* ont un effet immobilisant et sporocide sur les zoospores de *Phytophthora infestans*, de *P. ramorum* Pr-102, de *P. porri* CBS 127099 et de *Pythium ultimum* (de Souza *et al.*, 2003; de Bruijn *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2016). Cependant, le massétolide A est impliqué dans le biocontrôle de *Pseudomonas fluorescens* SS101 vis-à-vis de *P. infestans* responsable du mildiou chez la tomate (Tran *et al.*, 2007). En effet, les mutants de SS101 déficients en surfactants, sont incapables d'immobiliser et de lyser les zoospores des trois oomycètes cités (de Souza *et al.*, 2003).

La viscosinamide produite par *P. fluorescens* DR54 augmente le taux d'enkystement alors qu'elle diminue le taux de production de zoospores chez *Pythium* (Thrane *et al.*, 2000). D'autre part, les orfamides A, B, et G produites par *Pseudomonas* sp. CMR5c ont bloqué la formation des appressoria chez *Magnaporthe oryzae* VT5M1 (Ma *et al.*, 2016). Une inhibition significative de la croissance de *Botrytis cinerea* et de *Rhizoctonia solani* a été observée lorsque les deux pathogènes ont été mis en culture sur milieu gélosé contenant des concentrations croissantes de biosurfactants produits par *Pseudomonas putida* 267 (Kruijt *et al.*, 2009).

Malgré son effet inhibiteur sur la croissance des champignons et des bactéries à Gram-positif, la tolaasine produite par *P. tolaasii* PT106 n'a aucun effet sur les bactéries à Gram-négatif. Cependant, la souche mutante en tolaasine perd son activité (Rainey *et al.*, 1991). Par contre, la syringomycine et la syringopeptine produites par *P. syringae* pv. *atropaciens* ont inhibé la croissance de la levure *Geotrichum candidum* (Vassilev *et al.*, 1996).

#### **1.2.4. Rôle dans la formation de biofilm et dans la colonisation des racines des plantes**

La synthèse des cLPs est un facteur très important dans la formation de biofilms et dans le swarming par les *Pseudomonas* (Roongsawang *et al.*, 2003; de Bruijn *et al.*, 2007; de Bruijn et Raaijmakers, 2009 ; D'aes *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2016).

Les mutants déficients en viscosines, en massétolides et en orfamides des souches *P. fluorescens* SBW25 et SS101 et *Pseudomonas* sp. CMR5c respectivement, perdent leurs capacités: (i) de formation de biofilms sur les surfaces artificielles et (ii) d'essaimage « swarming » sur surface d'agar semi-solide. Ces activités ont été restaurées après ajout des cLPs purifiés dans le milieu de culture (de Bruijn *et al.*, 2007; de Bruijn *et al.*, 2008; de Bruijn et Raaijmakers, 2009 ; Ma *et al.*, 2016).

La production de la viscosine est plus importante chez les cellules formant les biofilms que chez les cellules planctoniques (Bonnichsen *et al.*, 2015). Par contre, il a été démontré que les putisolvines I et II produites par *P. putida* PCL1445 inhibent la formation de biofilms des *Pseudomonas* et altèrent la structure de ceux déjà existants (Kuiper *et al.*, 2004).

Par leur capacité à induire la formation de biofilms, les cLPs jouent un rôle crucial dans la colonisation des racines des plantes par le PGPR producteur. Le massétolide A est impliqué dans la colonisation des racines et des cotylédons de la tomate par *P. fluorescens* SS101. Cependant, la suppression de l'expression du lipopeptide chez la souche diminue sa capacité à coloniser les racines (Tran *et al.*, 2007).

## *Chapitre II*

## II. Résistances systémiques chez les plantes

Les plantes possèdent en plus des barrières physiques et chimiques, des systèmes de reconnaissance et de réponse induites qui sont déclenchées immédiatement après le premier contact avec des molécules étrangères et sont renforcées par l'interaction prolongée avec les agents pathogènes (Göhre et Robatzek, 2008).

Chez la plante, deux types de résistance systémique ont été rapportés : une résistance systémique acquise « **SAR** » qui résulte d'une interaction avec un microorganisme pathogène (Durrant et Dong, 2004); et une résistance systémique induite « **ISR** » qui est stimulée par certaines rhizobactéries non-pathogènes. Ces bactéries sont capables de stimuler des mécanismes de défense inductibles systémiques chez la plante et donc de réduire la pathologie (van Loon *et al.*, 1998). Le traitement des racines par des PGPRs produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries stimulatrices à travers le système vasculaire ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.*, 2001). Au cours des dernières années, plus d'attention est assignée à l'utilisation de bactéries rhizosphériques comme inducteurs des défenses naturelles chez les plantes (Dutta *et al.*, 2008; Ramarathnam *et al.*, 2011; Tonelli et Fabra, 2014; Kim *et al.*, 2015).

### 2.1. Eliciteurs bactériens de l'ISR

Les déterminants bactériens de l'ISR sont souvent les composants de la membrane externe, les antibiotiques, les sidérophores et l'acide salicylique bactérien (van Loon *et al.*, 1998).

#### 2.1.1. Composants de surface

Certains éléments de la surface cellulaire bactérienne ont été décrits comme des inducteurs. Plusieurs études ont démontré l'implication des flagelles dans l'induction des défenses des plantes. C'est le cas des flagelles de *P. putida* WCS358 agissant comme éliciteurs de la résistance systémique chez *Arabidopsis* contre *P. syringae* (Meziane *et al.*, 2005); alors qu'une souche mutante d'*Escherichia coli* O157:H7 dépourvue de flagelles, n'induit pas l'expression des gènes de défense chez *Arabidopsis* (Seo et Matthews, 2012).

Cependant, une activité élicitrice des lipopolysaccharides (LPS) ou, plus spécifiquement, de la chaîne latérale O-antigénique, a été démontrée chez différentes plantes (Reitz *et al.*, 2002; Meziane *et al.*, 2005; Desaki *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2015).

Les parois cellulaires de *P. putida* WCS358 contenant les LPS ont induit une résistance systémique contre *Colletotrichum lindemuthianum* et *B. cinerea* lorsque appliquées sur les racines du haricot (Meziane *et al.*, 2005) ; alors que les mutants dépourvus d'antigène O n'ont pas induit la résistance contre le flétrissement fusarien chez le radis (Leeman *et al.*, 1995). D'autre part, les LPS obtenus de différentes bactéries phytopathogènes à Gram-négatif tels que *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ; ou non-phytopathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* ont induit la formation des espèces réactives oxygénées (ROS) chez le riz (Desaki *et al.*, 2006). Ces ROS sont connues pour leur rôle dans la restriction de la pénétration des agents pathogènes (Peng et Kuc, 1992), mais aussi impliqués dans l'induction des nécroses au niveau des tissus infectés (Sutherland, 1991).

### **2.1.2. Métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires comme : les sidérophores (Buysens *et al.*, 1996 ; Meziane *et al.*, 2005), l'acide salicylique (De Meyer et Höfte, 1997 ; Ran *et al.*, 2005), les composés volatils (Ryu *et al.*, 2004 ; Han *et al.*, 2006), et les antibiotiques conférant à l'organisme producteur son pouvoir antimicrobien, peuvent aussi être impliqués dans l'ISR comme stimulateurs. C'est le cas de la phénazine et de la pyrrolnitrine (Upadhyay et Srivastava, 2011), du DAPG (Keel *et al.*, 1992; Velusamy *et al.*, 2006) et des lipopeptides cycliques (Tran *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2016).

#### **a. Les lipopeptides**

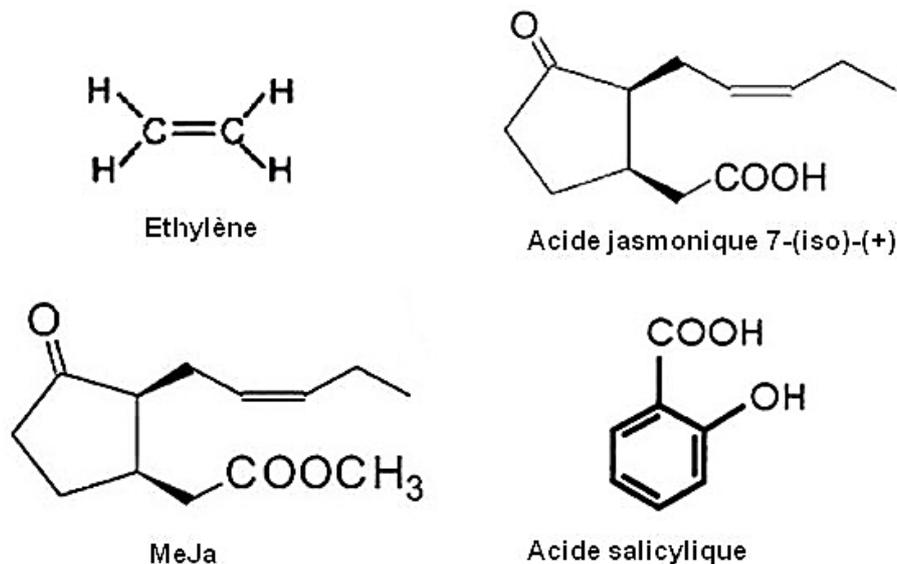
Plusieurs travaux ont démontré l'implication des cLPs des *Pseudomonas* et des *Bacillus* comme éliciteurs de l'ISR. Ainsi, le massétolide A produit par *P. fluorescens* SS101 induit la résistance de la tomate contre *P. infestans* (Tran *et al.*, 2007). L'application du cLP purifié sur les feuilles et les racines de la tomate, réduit significativement l'incidence de la maladie et l'extension des zones de lésion sur les feuilles (de Souza *et al.*, 2003). A différentes concentrations, les orfamides A, B et G ont un effet protecteur vis-à-vis des spores de *M. oryzae* VT5M1. Les trois homologues réduiraient le nombre de lésions sporulantes sur les feuilles du riz (Ma *et al.*, 2016). En outre, la fengycine produite par *B. subtilis* NCD-2 joue un rôle majeur dans la restriction de la population de *R. solani* dans la rhizosphère du coton et la suppression de la maladie de fonte du coton (Guo *et al.*, 2014).

## 2.2. Mécanismes de signalisation

La résistance induite n'est pas la mise en place d'une résistance là où il n'y en a pas, mais l'activation de mécanismes de résistance latents qui sont exprimés lors de l'inoculation avec un agent pathogène (van Loon, 1997). Ce mécanisme se fait par la perception des signaux émis lors de la rencontre avec les éliciteurs.

### 2.2.1. Transduction du signal

La perception des éliciteurs induit une cascade qui aboutit à la transduction du signal intracellulaire responsable de la mise en place des défenses efficaces (Nürnberger, 1999). La transduction du signal de l'éliciteur implique une reconnaissance moléculaire et une interaction physique entre les molécules élicitrices et les récepteurs spécifiques de la plante (Yoshikawa *et al.*, 1993). Parmi les molécules signales de la plantes conférant un rôle primordial dans la régulation des voies de transduction du signal : les phytohormones telles que l'éthylène (ET), l'acide jasmonique (AJ) et l'acide salicylique (AS ; figure 13 ; Ramírez-Suero, 2009).



**Figure 13.** Structure de l'éthylène, l'acide jasmonique (jasmonate), le méthyle-jasmonate (MeJa) et l'acide salicylique (salicylate ; Ramírez-Suero, 2009).

#### *a. Signalisation par l'acide jasmonique et l'éthylène*

La voie de signalisation de l'ISR n'est généralement pas associée à l'accumulation de l'acide salicylique (Pieterse *et al.*, 2000) ; mais elle est plutôt liée à la perception de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Pieterse *et al.*, 2001; Ton *et al.*, 2001).

La signalisation par l'acide jasmonique peut être induite par une gamme d'éliciteurs tels que: les stress abiotiques, y compris le stress osmotique (Kramell *et al.*, 1995), les blessures, la sécheresse, les insectes ; et l'exposition aux éliciteurs des pathogènes qui comprennent des chitines et des oligosaccharides (Doares *et al.*, 1995).

Les PGPRs tels que *Bacillus*, *Serratia* et *Pseudomonas* induisent une résistance systémique indépendante de l'acide salicylique chez des plantes de tabac transgéniques déficientes en AS contre *Peronospora tabacina* agent de la pourriture bleue chez le tabac (Zhang *et al.*, 2002). De même, l'ISR induite par *P. fluorescens* WCS417r vis-à-vis de *P. syringae* pv. *tomato* sur les feuilles d'*Arabidopsis* ; est indépendante de l'accumulation de l'AS et des PRs (Pathogenesis-related proteins ou protéines liées à la pathogénèse ; Pieterse *et al.*, 1996 ; Pieterse *et al.*, 2000). En effet, la souche WCS417r a induit l'ISR chez le mutant d'*Arabidopsis* non-accumulateur du salicylate mais non pas chez les mutants non-sensible à l'éthylène ; confirmant que la résistance élicitée par WCS417r est indépendante du salicylate mais dépendante de l'éthylène (Ran *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la production du jasmonate et de l'éthylène a été stimulée après inoculation des feuilles d'*Arabidopsis* avec la bactérie virulente *P. syringae* pv. *tomato* (Pieterse *et al.*, 2000) ; tandis que le mutant *jar1-1* non sensible à l'AJ et le mutant *etr1-1* non sensible à l'ET ont été très susceptibles à l'infection par *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pieterse *et al.*, 2000 ; Ton *et al.*, 2002).

### ***b. Signalisation par l'acide salicylique***

L'induction de l'ISR chez les plantes par des PGPRs est souvent indépendante du salicylate (Iavicoli *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2004). Toutefois, certains exemples de l'ISR liée à l'acide salicylique ont été rapportés (Maurhofer *et al.*, 1998; De Meyer *et al.*, 1999).

White (1979), a été le premier à prêter attention au salicylate en tant qu'inducteur de la résistance aux maladies chez les plantes. En effet, l'injection des feuilles de tabac avec l'aspirine a augmenté la résistance à l'infection subséquente par le virus de la mosaïque du tabac (TMV ; White, 1979; Antoniow et White 1980). Cependant, une augmentation de la concentration de l'AS endogène chez les feuilles de tabac inoculées avec l'AS et exemptes du virus de la mosaïque a été rapportée (Enyedi *et al.*, 1992).

L'implication du salicylate dans la transduction du signal a été confirmée par les phénotypes de plantes transgéniques porteuses du gène *NahG* codant pour la salicylate hydroxylase de *P. putida*, qui convertit l'AS en catéchol (Delaney *et al.*, 1994). La transformation génétique causée par *Agrobacterium tumefaciens* chez *Arabidopsis* est plus élevée chez le mutant *NahG* non-accumulateur et le mutant *sid2* non-producteur, contenant de faibles teneurs en AS; par contre elle est réduite chez les plantes avec des défenses activées dépendantes du salicylate et déficientes en jasmonate tel que le mutant *coi1* (Rosas-Díaz *et al.*, 2017).

D'autre part, aucune protection n'a été induite par la souche *P. aeruginosa* 7NSK2 contre le TMV chez les plantes de tabac transgénique (tabac-*NahG*); indiquant que la résistance induite par cette dernière dépendrait de l'accumulation du salicylate *in planta* (De Meyer *et al.*, 1999). Ces mêmes auteurs ont démontré que la résistance systémique dépendante de l'AS induite par 7NSK2 est médiée par la voie de la SAR. Des résultats similaires ont été obtenus par Zhang et ses collaborateurs (2004), qui ont démontré que la résistance systémique acquise ne s'est pas établie chez la plante de tabac n'accumulant pas l'AS.

### **2.3. Mécanismes de défense des plantes**

En réponse aux attaques microbiennes, les plantes activent une série complexe de réponses qui mènent à l'induction locale et systémique d'un large spectre de défenses antimicrobiennes. La résistance induite est basée sur la régulation de l'expression des gènes liés à la défense chez la plante. Un état défensif se produit lorsque les gènes sont induits ou réprimés, entraînant des changements dans les métabolites et les défenses systémiques de la plante; par conséquent, la plante survit à l'infection par des agents pathogènes (Ahmad *et al.*, 2014).

#### **2.3.1. Réponse hypersensible et mort cellulaire**

La réponse hypersensible (HR) est une réaction de défense souvent observée au cours des interactions plante/microbe. Elle se caractérise, en cas d'infection, par une mort cellulaire programmée rapide autour du site initial de la pénétration des agents pathogènes (Lam, 2004). Elle est associée à la restriction de la prolifération du pathogène (Lam *et al.*, 2001), et à l'activation de la résistance aux maladies (Lam, 2004) par génération des espèces réactives de l'oxygène (Ren *et al.*, 2002).

Le modèle spatio-temporel de l'accumulation de l'acide salicylique durant la réponse hypersensible suggère qu'il contribuerait à contrôler le timing et l'ampleur de la mort cellulaire. L'accumulation du salicylate survient à la suite de la mort cellulaire par contre le développement de cette dernière n'est pas affecté par les niveaux du salicylate dans les tissus végétaux (Alvarez, 2000).

Des plantes de tabac-*NahG* transgéniques ont présenté un développement tardif de la réponse hypersensible après infection par le TMV (Mur *et al.*, 1997), ainsi que l'atténuation du « burst oxydatif » après inoculation avec des bactéries avirulentes (Mur *et al.*, 2000). Ce dernier est liée à la production rapide des espèces réactives de l'oxygène, déclenchant, ainsi, une mort programmée locale des cellules infectées (Levine *et al.*, 1994).

Un gradient de salicylate s'établi dans les tissus de tabac infectés par le TMV, et est maintenu pendant la formation des lésions tissulaires. Les plus hauts niveaux de salicylate se trouvent au centre des lésions, diminuant vers les frontières. Tandis que, dans les tissus environnants sains entourant la lésion, les niveaux sont légèrement plus élevés que dans les plantes non infectées (Enyedi *et al.*, 1992).

Dans le stade final de la réponse hypersensible, les niveaux de l'AS sont très faibles pour induire la mort cellulaire mais suffisants pour activer les réponses antioxydantes et les suppresseurs de la mort cellulaire (Alvarez, 2000).

### **2.3.2. Mécanismes de défense dépendants de l'acide salicylique**

Il est maintenant admis que les niveaux de l'AS augmentent dans les tissus végétaux à la suite d'une infection par un agent pathogène ou suite à l'application de l'AS exogène; entraînant ainsi une résistance accrue contre un large spectre de pathogènes. La voie de l'acide salicylique met en jeu différents gènes de défense et d'entretien précoces et tardifs inductibles par l'acide salicylique (Blanco *et al.*, 2009; Ahmad *et al.*, 2011; Armijo *et al.*, 2013, Herrera-Vásquez *et al.*, 2015a).

#### ***a. Interaction entre l'acide salicylique et le régulateur NPR1***

Le co-régulateur transcriptionnel protéique NPR1 (Non-expressor of Pathogenesis-Related Gene 1) aussi connu sous le nom NIM1 (Non Immunity 1) ; joue un rôle crucial dans la résistance systémique. Il agit comme récepteur spécifique de la molécule signale « AS », et comme régulateur central positif de la cascade de signalisation qui mène à l'expression des gènes de défense (Blanco *et al.*, 2009 ; Maier *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2012).

Les plantes d'*Arabidopsis* mutantes en *npr1*, ne répondent plus à l'induction de la résistance par l'acide salicylique, et les symptômes de l'infection par *P. syringae* sont plus sévères par rapport aux souches sauvages (Cao *et al.*, 1994).

L'introduction de l'AS dans le milieu de culture, ainsi que l'induction de l'ISR et de la SAR, ne causent aucune augmentation dans la quantité du NPR1 d'*A. thaliana*; signifiant que les gènes *npr1* sont constitutivement exprimés chez *Arabidopsis* (van Wees *et al.*, 2000 ; Maier *et al.*, 2011). Par contre, l'activité transcriptionnelle du NPR1 chez le tabac était en effet plus élevée en présence du salicylate (Maier *et al.*, 2011).

Le régulateur NPR1 agit indirectement pour induire la transcription des PRs et d'autres gènes dépendants du NPR1 en se liant aux facteurs de transcription TGA. Lorsque activés, ces derniers se lient au promoteur de certains gènes *pr* et induisent leur transcription (Fan et Dong, 2002 ; Johnson *et al.*, 2003 ; Blanco *et al.*, 2009). Ainsi, l'interaction des NPR1s avec les facteurs transcriptionnels TGA est dépendante de l'acide salicylique (Fan et Dong, 2002 ; Johnson *et al.*, 2003) ; et semble être améliorée en présence de ce dernier (Maier *et al.*, 2011).

#### ***b. Accumulation des protéines liées à la pathogénèse (PRs)***

Plusieurs gènes liés à la pathogénèse codant pour des PRs (Pathogenesis Related proteins), dont l'expression dépend du salicylate, sont couramment utilisés comme indicateurs des défenses dépendantes de l'AS chez la plante (Uknes *et al.*, 1992; van Loon et van Strien, 1999; Fan et Dong, 2002, Johnson *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2004 ; Zwicker *et al.*, 2007). L'expression des *pr1* est dépendante de l'accumulation de l'AS et de l'activation du NPR1 par ce dernier. Glazebrook *et al.* (1996), ont démontré que les taux d'induction des *pr1* ARNm étaient élevés chez les plantes de tabac cultivées en présence du salicylate, alors qu'ils sont significativement moins faibles chez les plantes mutantes en *npr1* et inoculées avec *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 et celles non inoculées.

#### **2.3.3. Mécanismes de défense dépendants de l'acide jasmonique et de l'éthylène**

Bien que les mécanismes de résistance soient induits par accumulation du salicylate *in planta* (De Meyer *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2004 ; Rosas-Díaz *et al.*, 2017) ; de nombreuses études ont montré que ces mêmes mécanismes sont régulés par l'éthylène et le jasmonate (Pieterse *et al.*, 1998 ; Ton *et al.*, 2001 ; Ran *et al.*, 2005). Ce dernier, contribue aux défenses des plantes vis-à-vis des champignons nécrotrophes (Makandar *et al.*, 2010).

Comme dans les défenses dépendantes de l'acide salicylique, le gène *npr1* est impliqué dans les défenses dépendantes de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Aucune protection n'a été induite par le PGPR WCS417r contre *P. syringae* pv. *tomato* chez les mutants d'*Arabidopsis* déficients en *npr1* ; signifiant que l'ISR induite par WCS417r est médiée par le jasmonate et est dépendante du NPR1 (Pieterse *et al.*, 1998 ; van Wees *et al.*, 2000).

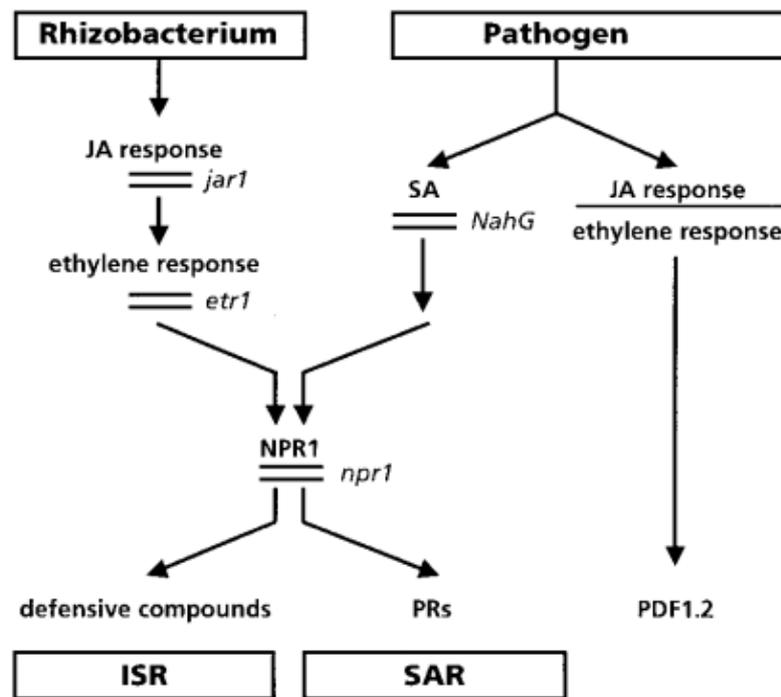
L'induction de l'ISR par le méthyle jasmonate (MeJA) chez *Arabidopsis* est bloquée chez les mutants, *etr1-1*, *jar1-1* et *npr1-1*. Par contre, l'induction de l'ISR par le précurseur de l'éthylène (ACC) est bloquée chez les mutants *etr1-1* et *npr1-1*, mais non pas chez les mutants *jar1-1* (Pieterse *et al.*, 1998). Ceci indique que les deux molécules de signalisation (AJ et ET) sont impliquées dans la régulation de l'expression de l'ISR contre *P. syringae* pv. *tomato* successivement et en amont du NPR1 ; et que la perception du jasmonate est nécessaire avant celle de l'éthylène (Pieterse *et al.*, 1998).

L'augmentation de la production de la protéine antifongique PDF1.2 (Plant Defensin 1.2), est induite chez *Arabidopsis* par l'augmentation des niveaux du jasmonate et de l'éthylène endogènes dans les tissus infectés avec *Alternaria brassicicola* (Penninckx *et al.*, 1996 ; Penninckx *et al.*, 1998) ; ou par l'application exogène du MeJA et de l'éthylène. L'expression systémique du gène de la défensine *pdf1.2* au cours de la réponse de type SAR est indépendante de l'AS et du NPR1, et est dépendante de l'AJ et de l'ET. En effet, ce gène est réprimé chez les plantes non sensibles à l'AJ et à l'ET, mais non pas chez les plantes déficientes ou non accumulatrices de l'AS (Penninckx *et al.*, 1996).

Le traitement des mutants d'*Arabidopsis*, non-sensibles au jasmonate et ceux non-sensibles à l'éthylène, par le MeJA et l'ET n'a entraîné aucune induction de l'expression du *pdf1.2*. Ce qui suggère, que la production de la défensine à la suite de l'infection par l'agent pathogène, nécessite l'activation simultanée des deux voies de signalisation (Penninckx *et al.*, 1998).

Les résultats de Pieterse *et al.* (1998) combinés à ceux de Penninckx *et al.* (1998), suggèreraient que la résistance systémique induite (ISR) par les PGPR nécessiterait l'activation successive de la voie du jasmonate puis celle de l'éthylène ; tandis que la résistance systémique acquise par les agents pathogènes (SAR) dépendrait de la synergie entre ces deux voies ou plutôt une activation simultanée (Figure 14).

La biosynthèse de l'éthylène se produit avant la mort cellulaire. Cette dernière a été retardée chez les plantes d'*Arabidopsis* non-productrices et non-sensibles à l'éthylène. Ceci suggère que la perception de la signalisation de l'éthylène est nécessaire pour accélérer la mort cellulaire (Liu *et al.*, 2008).



**Figure 14.** Transduction du signal dans les cas de la SAR et l'ISR chez *Arabidopsis* (Pieterse *et al.*, 1998).

#### 2.4. Communication entre les voies de défense (SA-JA crosstalk)

Le crosstalk entre les deux types de résistance ISR et SAR, conduit à l'induction soit de la réponse SAR ou ISR, ou les deux simultanément (van Wees *et al.*, 2000). L'acide jasmonique et l'acide salicylique fonctionnent dans la signalisation et dans la défense contre les maladies *via* leurs interactions coopératives et/ou antagonistes (Doares *et al.*, 1995; Seo *et al.*, 1995 ; van Wees *et al.*, 2000 ; Turner *et al.*, 2002; Kunkel et Brooks, 2002).

Il a été rapporté que le jasmonate et le salicylate induisaient l'expression de gènes *pr* par des interactions antagonistes. L'induction de l'expression des gènes *pr* acides par l'acide salicylique et celle des gènes *pr* basiques par l'acide jasmonique pourraient être inhibée par la présence du jasmonate et du salicylate, respectivement (Niki *et al.*, 1998).

Les plantes de tabac blessées accumulent l'acide jasmonique trois heures après la blessure. Par contre, les plantes transgéniques non-sensible à la voie de l'AJ accumuleraient l'AS et les PR1s ; indiquant que la suppression de la voie de jasmonate permet l'induction de la voie de salicylate par la plaie (Seo *et al.*, 1995).

Ainsi, l'inhibition de l'action du jasmonate par le salicylate (abaissement de l'induction des gènes sensibles au jasmonate) pourrait se manifester *via* l'activation du NPR1 (Pieterse et van Loon, 2004). Par contre, l'induction de la voie de signalisation du jasmonate et de l'expression du *pdf1.2* par *F. graminearum* inhibe la voie de salicylate conduisant à l'augmentation de la sévérité de la fusariose chez *Arabidopsis* (Makandar *et al.*, 2010).

D'autre part, les deux types de résistance (ISR dépendante du jasmonate et la SAR dépendante du salicylate) peuvent être induits simultanément en combinant les éliciteurs. Chez *Arabidopsis*. L'induction simultanée de l'ISR par *P. fluorescens* WCS417r et de la SAR par la souche avirulente *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ou l'AS; entraînerait une réduction significative de la gravité de la maladie par rapport aux plantes traitées avec chaque inducteur séparément. Ceci indique une synergie entre les deux voies. Cependant, la perturbation de l'une des voies n'a aucun effet sur le fonctionnement de l'autre (van Wees *et al.*, 2000).

Que ce soit l'interaction entre les molécules de signalisation, ou encore leurs synthèse. En effet, les quantités des acides jasmonique et salicylique accumulés chez les mutants *NahG* non accumulateurs de salicylate et *jar1-1* non producteurs de jasmonate respectivement, ne sont pas affectées (Heck *et al.*, 2003).

## *Chapitre III*

### III. Matériel et méthodes

#### 3.1. Matériel biologique

Les quarante-cinq souches utilisées dans cette étude ont été isolées des sols des rhizosphères du blé et de la pomme de terre de la région de Sétif. Elles ont été précédemment testées et présélectionnées sur la base de leurs activités antifongique contre des champignons telluriques phytopathogènes *Fusarium. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* et *Phytophthora infestans* (Mezaache-Aichour *et al.*, 2013b). Les souches *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* coagulase positive ATCC 25923 (Laboratoire de Microbiologie et de Parasitologie, CHU, Sétif, Algérie) formatrices de biofilm, *Peudomonas protegenes* sp. nov (CHA0, généreusement offerte par le Prof. Haas, Lausanne, Suisse) et la souche *Peudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (S2 ; Mezaache-Aichour *et al.*, 2012) ont servi de contrôles positifs dans les différents tests. Les souches fongiques utilisées dans les expérimentations et leurs origines sont indiquées dans le tableau I.

**Tableau I.** Différentes souches fongiques testées.

<b>Champignon</b>	<b>Référence</b>
<i>Fusarium. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	Institut National de la Recherche Agronomique (Alger, Algérie)
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	Institut Pasteur (Paris, France)
<i>Phytophthora infestans</i>	Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Sétif, Algérie)
<i>Fusarium graminearum</i>	
<i>Sporonema</i> sp.	Mezaache-Aichour <i>et al.</i> , 2018
<i>Sclerotopsis</i> sp.	
<i>Sclerotinia</i> sp.	
<i>Ascochyta</i> sp.	
<i>Stiebium</i> sp.	
<i>Fusarium</i> sp. 29	
<i>Fusarium</i> sp. 2	

Les souches bactériennes utilisées ont été conservées sur gélose nutritive (GN, Himedia) et sont revivifiées sur bouillon nutritif (BN, Himedia). Tandis que les souches fongiques sont cultivées sur milieu gélosé à base de dextrose et de pomme de terre (PDA pour Potato dextrose agar ; Annexe I).

## 3.2. Méthodologie

### 3.2.1. Extraction du matériel génétique

Les souches à identifier ont été cultivées sur BN pendant une nuit à 30°C. L'ADN chromosomique est extrait à partir de cultures bactériennes en utilisant les kits d'extraction QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN). Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 4000rpm/10min et les culots resuspendus dans 180µl de la solution enzymatique (lysozyme à 20mg/ml; 20 mM Tris·HCl, pH 8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton). Les volumes ont été transférés dans des tubes eppendorf de 1.5 ml et incubés à 37°C/30min. 20µl de protéinase K et 200µl du tampon AL (fournis dans le kit) ont été ajoutés dans chaque tube. Ces derniers ont été vortexés, incubés à 56°C/30min puis centrifugés rapidement. 4µl de RNase (100µg/ml) ont été ajoutés. Les tubes vortexés pendant 15min, laissés 2min à température ambiante et centrifugés pour quelques secondes avant l'ajout de 200µl du tampon AL. Le mélange a été vortexé pendant 15s, incubé 10min/70°C et centrifugé pour éliminer les gouttes condensées au niveau du couvercle. Ensuite, 200µl d'éthanol ont été ajoutés et les tubes vortexés pendant 15s puis centrifugés pendant 1min.

A la fin de cette dernière étape, le volume a été transféré aux colonnes de purification de l'ADN extrait «QIAamp Mini spin columns» (fournies dans le kit) ; puis centrifugé pendant 1min/14000rpm. Le premier tube est remplacé par un nouveau, et 500µl du tampon AW1 (fourni dans le kit) sont rajoutés. Les colonnes ont été centrifugées pendant 1min/14000rpm, placées dans de nouveaux tubes, et 500µl du tampon AW2 (fourni dans le kit) ont été ajoutés aux colonnes. Après centrifugation pendant 3min/14000rpm, ces dernières ont été transférées dans d'autres tubes, et une autre centrifugation a été pendant 1min afin d'éliminer l'excès d'éthanol et de tampon ; puis placées dans des tubes eppendorf stériles et 200µl d'eau distillée stérile sont ajoutés. Les colonnes ont été laissées à température ambiante pendant 1 à 8 minutes puis centrifugées. Cette dernière étape a été répétée en utilisant un deuxième tube stérile ; les volumes ont été rassemblés dans un seul tube et l'ADN purifié a été conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure. L'ADN chromosomique extrait est utilisé pour l'identification jusqu'au niveau de l'espèce et pour l'amplification et le criblage des gènes de lipopeptides cycliques.

### 3.2.2. Polymerase chain reaction (PCR)

#### 3.2.2.1. Identification moléculaire des isolats

Les souches bactériennes ont été identifiées en séquençant le gène codant pour l'ARNr 16S. L'amplification a été effectuée en utilisant une PCR gigogne avec les amorces universelles : SD-Bact-0341-bS-17 : 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' (forward) et SD-Bact-0515-aA-19 : 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' (reverse). Les produits de la PCR ont été purifiés en utilisant le kit de purification « QIAquick PCR Purification Kit » (Qiagen ; protocole détaillé en annexe II). Les ADNr 16S amplifiés et purifiés ont été soumis à une deuxième PCR avant d'être séquencés. Les compositions des mélanges réactionnels ainsi que les conditions des réactions PCRs utilisées sont compilés dans le tableau II. Les séquences d'ADNr 16S ont été analysées avec l'outil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); puis déposées dans la base de données « GenBank » pour l'obtention des numéros d'accèsion.

**Tableau II.** Réactifs et conditions des réactions PCRs utilisées pour l'amplification des ADNr 16S et la préparation pour le séquençage.

Réaction PCR	Produit	Volume réactionnel (µl)	Conditions
Pour amplification des ADNr 16S	➤ X2 Dream Taq Green PCR Master Mix (3u/µl Dream Taq ADN Polymérase, 2X Dream Taq Green buffer, dNTPs 0.4mM chacune, et 4mM MgCl <sub>2</sub> ; Thermo Scientific)	25	➤ 1 cycle de dénaturation initiale : 95°C/1min ➤ 30 cycles: dénaturation 95°C/30s, hybridation 60°C/30s, extension 72°C/1min. ➤ 1 cycle d'extension finale : 72°C/5min
	➤ Amorces sens bS-17 (18nmol; Sigma)	2.5	
	➤ Amorces antisens aA-19 (18nmol; Sigma)	2.5	
	➤ ADN matrice	3	
	➤ H <sub>2</sub> O double distillée	17	
Pour séquençage des ADNr 16S	➤ X10 Tampon <i>Pfu</i> (200mM Tris-HCl, 100mM KCl, 100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20mM MgSO <sub>4</sub> , 1.0% Triton et 1mg/ml BSA sans nuclease; Promega)	5	➤ 1 cycle de dénaturation initiale : 95°C/1-3 min ➤ 30 cycles: dénaturation 95°C/45s, hybridation 60°C/30s, extension 72°C/2min. ➤ 1 cycle d'extension finale : 72°C/5min
	➤ <i>Pfu</i> ADN Polymérase (3u/µl ; Promega)	0.41	
	➤ Amorces sens bS-17 (Sigma)	2.5	
	➤ Amorces antisens aA-19 (Sigma)	2.5	
	➤ dNTPs (2mM chacune ; Thermo Scientific)	5	
	➤ ADN matrice	3	
	➤ H <sub>2</sub> O double distillée	31.6	

### 3.2.2.2. Criblage des souches pour les gènes de biosynthèses des cLPs

Les gènes *srfAA*, *myc*, *bmyB* et *fenD*, codant respectivement pour la surfactine synthétase, la mycosubtiline synthétase, la bacillomycine synthétase et la fengycine synthétase ; ont été amplifiés en utilisant les amorces en tableau III. Ces dernière on été conçues par Dr. Engl (Queen Mary University of London, Royaume uni), sur la base des informations de séquence des gènes obtenus à partir de la base de données NCBI et sont fournis par Sigma. Les amplifications d'ADN ont été effectuées dans un volume total de 25µl en utilisant le thermocycleur BIOER thechnology (Tableau IV).

**Tableau III.** Amorces utilisées pour l'amplification des gènes de biosynthèses des cLPs.

Gène	Amorces	Séquences
Surfactine A	<i>srfAA</i> *	F 5'-ACGAATGCGAAAGAAAAGCAGATGC-3' R 5'-CGGTATCCGCGGACTTTGACCT-3'
Bacillomycine	<i>bmyB</i> *	F 5'-GTGAATGAGCTGTTCAAAATGTCC-3' R 5'-GGCAAAGAAATCTCTGATTATATCAAG-3'
Fengycine D	<i>fenD</i> *	F 5'-TCCATCTGGCAATTGTTTTGGTGG-3' R 5'-GCTCTCCTTCAAGCCGCTTCAGC-3'
Mycosubtiline	<i>myc</i> *	F 5'-ACAGGCTCTGGCGAAGGCGTGGCAGC-3' R 5'-AAACGTTCCATCGGGATATCCAC-3'

\* Amorces conçus par Dr Christoph ENGL de séquences adaptées au NCBI.

**Tableau IV.** Réactifs et conditions de PCR pour amplification des gènes de biosynthèses des cLPs.

Réaction PCR	Produit	Volume réactionnel (µl)	Conditions
Pour amplification des gènes de cLPs	➤ X10 tampon Dream Taq (20mM MgCl <sub>2</sub> ; KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Thermo Scientific)	2.5	➤ 1 cycle de dénaturation initiale : 95°C/1min ➤ 30 cycles : dénaturation 95°C/30s, hybridation 60°C/30s, extension 72°C/1min. ➤ 1 cycle d'extension finale : 72°C/5min
	➤ Dream Taq ADN Polymérase (5u/µl; Thermo Scientific).	0.125	
	➤ dNTPs (2mM chacune ; Thermo Scientific)	2.5	
	➤ Amorce sens (Sigma)	1.25	
	➤ Amorce antisens (Sigma)	1.25	
	➤ ADN matrice	2	
	➤ H <sub>2</sub> O double distillée	15.375	

Les concentrations des amorces utilisées et d'autres caractéristiques sont compilées dans l'annexe III.

### ***a. Electrophorèse sur gel d'agarose et visualisation***

10µl de chaque aliquote d'ADN amplifiés et purifiés ont été colorés avec 2µl du colorant GelPilot DNA Loading Dye (X5 ; Qiagen) ; spotés dans les puits d'un gel d'agarose à 1% coloré avec 6µl de colorant Sybr DNA Gel Stain (Invitrogen) ; puis, séparés à 70V pendant 40 minutes. Les gels ont été ensuite photographiés sous lumière UV. Le marqueur de la taille moléculaire était de 1kb d'ADN (O'GeneRuler, Thermo Scientific).

### **3.2.2.3. Induction de l'expression des gènes inductibles par l'acide salicylique chez *Arabidopsis thaliana***

#### **3.2.2.3.1. Culture des plantes**

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* var. *columbia* (*Arabidopsis* Col-0) ont été désinfectées en surface : (i) avec de l'éthanol à 70% pendant 10 minutes, (ii) de l'hypochlorite de sodium dilué à 10% pendant 10 minutes, (iii) rincées deux fois avec de l'eau distillée stérile et re-suspendues dans de l'eau distillée stérile (tel que recommandé par Dr. LIU Fuquan, Queen's University, Belfast, Irlande du nord, Royaume uni). Des boîtes de Pétri stériles contenant 25ml de la gélose semi-solide de Murashige et Skoog (½ MS ; Murashige et Skoog, 1962), ont été recouvertes de disques de papier filtre stériles et imprégnés de 1ml d'eau stérile pour fournir un environnement humide. 200µl de suspension de graines (trop petites pour être dénombrées) ; ont été étalés sur chaque boîte. L'excès d'eau a été éliminé et les boîtes ont été scellées avec un film poreux et incubées à 4°C pendant 24 heures pour stimuler la germination des graines. Les semis ont été ensuite cultivés pendant 10 jours dans une chambre de croissance (MLR-352H-PE Climatic test chamber, Panasonic) à 25°C, 37% d'humidité relative et une intensité lumineuse de 16h/jour à raison de 4000 Lux au niveau de la plante.

Les boîtes contenant les plantules âgées de 10 jours ont été traitées avec : (i) 5ml de bouillon ½ MS (contrôle négatif ; CK), (ii) 2ml d'acide salicylique à 250µM (SA; contrôle positif), et (iii) 5ml de suspensions bactériennes : *B. amyloliquefaciens* A16, *B. oryzaecorticis* XI44, *B. pumilus* B10 et *P. plecoglossicida* XI39 respectivement dans un bouillon ½ MS à une concentration finale de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 24h dans les conditions de croissance sus mentionnées

### **3.2.2.3.2. Réaction PCR en temps réel (qRT-PCR)**

Le pouvoir régulateur des défenses d'*Arabidopsis* par les quatre souches, ainsi que par l'acide salicylique a été mis en évidence en évaluant les niveaux de l'expression relative des ARNm des gènes *pr1*, *grxc9*, *nimin1*, *ank*, *ugt76b1* et *llp1* ;codant respectivement pour les protéines : pathogenesis-related protein I, glutaredoxine, NPR1/NIM1-interacting I, ankyrine, UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase et legume lectine I. L'expression de ces gènes est déclenchée pendant la réponse dépendante de l'acide salicylique chez *Arabidopsis*, de ce fait ce sont des marqueurs de la voie de l'acide salicylique.

#### **a. Extraction des ARNs totaux**

L'ARN total d'*Arabidopsis* a été extrait selon la procédure d'extraction de l'ARN « Mini Hot Phenol *Arabidopsis* RNA extraction » (Mylne *et al.*, 2010). Le contenu en palantules d'*Arabidopsis* de chaque boîte Petri a été divisé sur trois tubes de 1.5ml contenant des billes métalliques (approximativement 0.4ml de tissus des plantes). Les tubes ont été plongés dans un contenant d'azote liquide ; puis agités avec le TissuLyser LT (Qiagen) pendant 1min à 5000rpm afin de broyer les tissus végétaux. Les tubes ont été laissés à température ambiante pour l'évaporation complète de l'azote liquide. La poudre obtenue a subi une extraction suivant le protocole du « phénol chaud » détaillé en annexe IV. Les extraits ont été ensuite traités avec une DNase (Ambion, Life Technologies) afin d'éliminer l'ADN génomique contaminant. La concentration de L'ARN total a été déterminée par spectrophotométrie (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) à 260nm, et la qualité du produit a été vérifiée pour la présence des ADN contaminants par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

#### **b. Transcription inverse**

La transcription inverse a été réalisée en triplicata pour chaque traitement. Des transcriptions inverses en ADNc ont été effectuées dans un volume total de 10µl en utilisant : la transcriptase inverse RevertAid (Thermo Scientific), et un mélange d'amorces et de dNTPs. Les volumes et les concentrations des constituants du mélange, ainsi que les conditions de la réaction RT-PCR sont compilés dans le tableau V.

**Tableau V.** Mélange réactionnel et conditions de la transcription inverse.

Réaction PCR	Produit	Volume réactionnel ( $\mu$ l)	Conditions
Transcription inverse et amplification de ADNc	➤ ARN	2.5 $\mu$ g	1. Mélanger, vortexer et incubé à 65°C/5min, refroidir sur la glace pendant 1min.
	➤ H <sub>2</sub> O	Jusqu'à 4.6 $\mu$ l	
	➤ Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 $\mu$ M ; Invitrogen)	0.5	2. Incuber 25°C/10min, 45°C/60min, et 70°C/10min
	➤ Hexomères aléatoires (50ng/ $\mu$ l ; Invitrogen)	2	
	➤ Tampon de réaction (250mM Tris-HCl, 250mM KCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM DTT ; Thermo Scientific).	2	
	➤ dNTPs (25mM)	0.4	
	➤ RevertAid Transcriptase inverse (200u/ $\mu$ l; Thermo Scientific)	0.5	
➤ H <sub>2</sub> O à chaque tube d'ADNc.	90		

### c. Dosages de la q-PCR

Les séquences de *pr1* ARNm, *nimin1* ARNm, *ank* ARNm, *grxc9* ARNm, *llp1* ARNm et *ugt76b1* ARNm, ont été amplifiées en utilisant des paires d'amorces spécifiques (Tableau VI). Le gène de l'ubiquitine (UBC) a été utilisé comme gène d'entretien (house keeping gene).

**Tableau VI.** Amorces utilisées pour l'amplification et des gènes de défense d'*Arabidopsis*.

Gène	Annotation	AGI	Séquences*
<i>pr1</i>	Pathogenesis-related protein I	At2g14610	F 5'-GGTTAGCGAGAAGGCTAACTAC-3' R 5'-CATCCGAGTCTCACTGACTTTC-3'
<i>nimin1</i>	NPR1/NIM1-interacting I	At1g02450	F 5'-CGTCGTGAGGAGGAAATCTAAC-3' R 5'-CCGTACGACACTGAGAGAAATC-3'
<i>ank</i>	Ankyrine	At1g54610	F 5'-CGTCATCTGCTGGGAAGTTAG-3' R 5'-GCAACGGACTTAACCCATACT-3'
<i>grxc9</i>	Glutaredoxine	At1g28480	F 5'-GATTGATGAGGAGAGGGAAGATG-3' R 5'-CTACATAAACC GCCGTA ACT-3'
<i>llp1</i>	Legume lectine	At5g03350	F 5'-GTTGCTGAGAAAGCTGGTTATT-3' R 5'-GCCTTGACCTCTCTCCATTAC-3'
<i>ugt76b1</i>	UDP-glucosyltransferase	At3g11340	F 5'-ACCGTTAACCTCTCAGCTTTC-3' R 5'-GTGAGTCTGCCTTAGTCTCTTG-3'

\* Amorces conçus par Dr Fuquan LIU; AGI *Arabidopsis* Genome Initiative gene index.

Les dosages ont été réalisés dans le système de qPCR en temps réel Light Cycler 480 Instrument II, en utilisant le Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Life Science) ; suivant les protocoles standards compilés dans le tableau VII.

**Tableau VII.** Mélange réactionnels et conditions de la réaction q-PCR.

Réaction PCR	Produit	Volume réactionnel (µl)	Conditions
PCR quantitative	➤ 2X LightCycler®480 SYBR Green I Master (FastStart Taq ADN Polymérase, tampon de réaction, dNTP avec dUTP à la place de dTTP, colorant SYBR Green et MgCl <sub>2</sub> ; Roche Life Science)	6	➤ Initiation : 95°C/5min ➤ 40 cycles : amplification et quantification : 95°C/10s, 60°C /20s, et 72°C/45s. ➤ Courbe de fusion : 72°C ➤ Finition : 72°C/30s
	➤ Amorces sens (Sigma)	0.03	
	➤ Amorces antisens (Sigma)	0.03	
	➤ ARN matrice	3	
	➤ H <sub>2</sub> O	2.94	

Les concentrations des amorces utilisées et d'autres caractéristiques sont compilées dans l'annexe III.

### 3.2.3. Production de l'acide salicylique

La production de l'acide salicylique par les quatre précédemment testées pour leur capacité à induire les défenses d'*Arabidopsis* ; a été évaluée *in vitro* sur milieu ½ CAA (1/2 casamino acids ; Annexe I) selon la méthode décrite par Serino *et al.* (1995) avec quelques modifications. Cinquante microlitres de chaque culture bactérienne cultivée pendant la nuit dans un bouillon nutritif (10<sup>8</sup> UFC/ml), ont été utilisées pour inoculer 1.4ml de milieu ½ CAA, en triplicatas et un tube contenant le milieu ½ CAA uniquement a été utilisé comme contrôle négatif. Les tubes ont été incubés à température ambiante sous agitation constante (150 tour/min) pendant 40 heures, puis centrifugés à 4000 tour/min pendant 10 minutes ; et les surnageant ont été récupérés pour mesurer les densités optiques (DO) à 540nm. Les concentrations de l'AS produit ont été estimées par extrapolation sur une courbe d'étalonnage obtenu avec le 3-5-dinitro salicylate (Annexe V).

### 3.2.4. Formation de biofilms

L'adhésion des isolats bactériens aux surfaces a été examinée pour tous les isolats par la méthode au crystal violet (CV), décrite par Elhariry (2011) avec quelques modifications. Les puits à fonds plats des plaques de microtitrage stériles ont été remplis avec 230µl de bouillon tryptone soja (TSB, Merck).

Ensuite, les puits ont été inoculés avec 20µl de la suspension de chaque isolat ( $10^8$  UFC/ml), précédemment cultivé pendant 18 heures dans un bouillon nutritif (une colonne entière a été réservée pour les répétitions de chaque souches). Les plaques ont été incubées dans des conditions statiques à température ambiante pendant 48 heures. Les puits du témoin négatif contenaient uniquement du TSB, alors que les témoins positifs consistaient en souches formant le biofilm : *S. aureus* ATCC 25923 coagulase positive, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et la souche PGPR référencée CHA0.

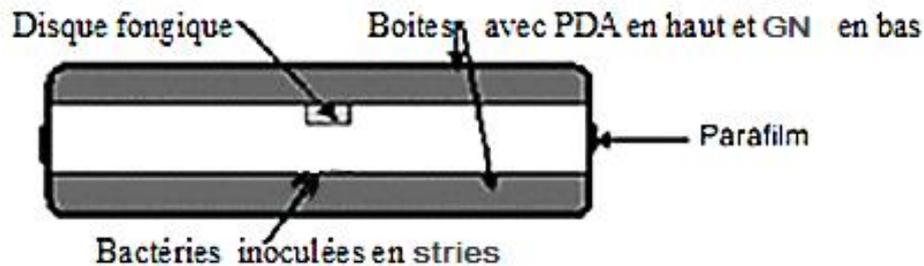
Après 48 heures, le contenu des plaques a été versé, et les puits ont été lavés trois fois avec 300µl du milieu utilisé pour la culture. Les bactéries adhérentes aux parois des puits ont été fixées avec 250µl de méthanol à 99.8% (Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes, puis les puits sont vidés et laissés sécher à l'air ambiant. Les cellules fixées ont été ensuite colorées avec 250µl de cristal violet à 0.5% pendant 5 minutes. L'excès de colorant a été éliminé par rinçage à l'eau courante. Le colorant lié aux cellules adhérentes a alors été extrait avec 250µl de diméthyl sulfoxyde à 99.9% (DMSO, Sigma-Aldrich) ; et les DO du colorant dissous ont été mesurées à 630nm en utilisant un lecteur ELISA (ELx800 Absorbance Reader BioTek Instruments).

### **3.2.5. Production de composés organiques volatiles antifongiques**

Les 24 souches, précédemment criblés pour la présence des gènes de lipopeptides cycliques, ont également été testés pour la capacité à produire des composés organiques volatiles (COV) inhibant la croissance mycélienne des champignons pathogènes : *P. infestans*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. solani* var. *coeruleum* et *F. graminearum*. Cette production a été mise en évidence par la méthode de confrontation à distance ou indirecte selon Jamalizadeh *et al.* (2008).

D'abord, les souches fongiques ont été cultivées à l'obscurité et à température ambiante sur milieu PDA jusqu'à ce que les boîtes soient complètement recouvertes du mycélium. Les isolats bactériens ont étéensemencés sur gélose nutritive en boîtes de Pétri, et incubées à température ambiante pendant 48 heures (jusqu'à la fin de la phase exponentielle). C'est alors que les couvercles de ces boîtes sont remplacés par autres fonds de boîtes contenant un disque fongique de 5mm sur PDA. Les deux fonds sont scellés par du parafilm, en raison de 3 répétitions pour chaque duo (Figure 15). Le témoin est préparé de la même manière, sauf absence de bactéries.

Les boîtes sont incubées à température ambiante, et les observations sont notées lorsque le champignon dans la boîte témoin atteint un maximum de croissance.



**Figure 15.** Confrontations à distance bactérie/champignon.

Les taux d'inhibition de la croissance fongique ont été calculés selon la formule :

$$\text{INH}\% = [(D_c - D_t) / D_c] \times 100$$

INH% : taux d'inhibition

D<sub>c</sub> : diamètre de la croissance fongique dans la boîte du témoin

D<sub>t</sub> : diamètre de la croissance fongique en présence de souches testées

### 3.2.6. Tests *in planta*

Le matériel végétal utilisé dans les tests de stimulation et de protection *in planta* est le blé dur : *Triticum durum* Desf de la variété GTA. Les graines de blé ont été désinfectées en surface selon le protocole de Jetiyanon *et al.* (2008) avec quelques modifications. Les graines ont été immergées dans une solution d'hypochlorite de sodium dilué à 10% pendant 20 min, puis rincées trois fois consécutives avec de l'eau distillée stérile.

Les souches bactériennes utilisées pour l'inoculation ont été cultivées dans du bouillon nutritif et la concentration utilisée estimée à 10<sup>8</sup> UFC/ml. Le champignon pathogène *F. graminearum* utilisé pour l'inoculation des plantules du blé a été cultivé sur milieu PDA à température ambiante et à l'obscurité pendant 8 jours.

### **a. Stimulation de la croissance du blé**

Les graines de blé désinfectées ont été stérilement trempées dans 1ml de chaque suspension bactérienne pendant 30min, transférées dans des pots contenant du sol préalablement stérilisé (trois autoclavages successifs pendant 1h à 121°C et à 1.5bar), à raison de quatre graines par répétition et quatre répétitions par traitement. Les pots ont été mis en culture sous serre dans des conditions contrôlées. Le témoin négatif consistait en graines traitées avec de l'eau distillée stérile, alors que le témoin positif consistait en deux souches de référence : *P. protegens* sp. nov. (CHA0) et *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (S2). Les plantes ont été arrosées un jour sur deux, et la croissance suivie pendant 6 semaines. Le premier prélèvement a été effectué durant la phase de la levée (3 semaines après le semis), et le deuxième après 45 jours (durant la phase de tallage). A chaque prélèvement, les racines ont été retirées du sol, et les longueurs des parties aérienne et souterraine ont été mesurées (cm).

### **b. Protection du blé contre *F. graminearum***

La préparation des graines de blé pour le semis se fait suivant les mêmes étapes que pour le test de stimulation de la croissance à l'exception de la présence de deux témoins non traités. Après sept jours d'incubation, le contenu de chaque boîte de Pétri (9mm) en colonie du champignon pathogène *F. graminearum* a été mélangé avec 50 grammes de sol stérile ; et chaque pot a reçu 1 gramme de sol contaminé. L'un des témoins (T inf) a été inoculé avec le sol contaminé, alors que l'autre témoin sain (Ts) n'a reçu que de l'eau. Les plantes ont été arrosées avec de l'eau de robinet et le test a été suivi jusqu'au déclin du témoin infecté. L'apparition des symptômes a été notée et le pourcentage de mortalité est calculé selon la formule :

$$TM\% = (Pm/Pt) \times 100$$

TM : pourcentage de mortalité

Pm : nombre de plantules mortes par répétition

Pt : nombre total de plantules par répétition

Alors que, le pourcentage d'infection a été calculé chez les plantules restantes après élimination des plantules flétries, selon la formule :

$$TI\% = (F_{inf}/F_t) \times 100$$

TI : pourcentage d'infection

F<sub>inf</sub> : nombre de feuilles infectées par répétition

F<sub>t</sub> : nombre total de feuilles par répétition

Enfin, le pourcentage de feuilles saines, étant le nombre de feuilles qui n'ont montré aucun symptôme de la maladie, a été calculé selon :

$$TS\% = (F_s/F_t) \times 100$$

T<sub>s</sub> : pourcentage de feuilles saines

F<sub>s</sub> : nombre de feuilles non infectées par répétition

F<sub>t</sub> : nombre total de feuilles par répétition

### **3.2.7. Métabolisme des fongicides**

Ce test s'est déroulé en deux phases : (i) un test de survie et (ii) un test de dégradation. Les caractéristiques des fongicides utilisés dans ce test sont détaillées dans le tableau VIII.

#### ***a. Test de survie***

La capacité des isolats à survivre en présence des fongicides a été évaluée en utilisant le bouillon nutritif ajouté de fongicides. Les solutions mères ont été préparées à partir de poudre de fongicides dissout dans de l'eau distillée stérile. Des dilutions successives ont été réalisées afin d'atteindre la concentration finale souhaitée : une première dilution dans de l'eau distillée réalisée à partir de la solution mère ; et une seconde dilution dans du bouillon nutritif (Tableau IX). Le test a été effectué sur des microplaques de 96 puits contenant 230µl de milieu de culture (BN + fongicides) ; et inoculés avec 20µl de suspensions bactériennes en phase exponentielle (10<sup>8</sup> UFC/ml ; 3 puits par souche). Les plaques ont été incubées pendant 72 heures à température ambiante, et les densités optiques des cultures ont été mesurées à 630nm.

**Tableau VIII.** Familles chimiques et matières actives des fongicides utilisés.

<i>Nom commercial</i>	<i>Firme</i>	<i>Nom de groupe</i>	<i>Famille chimique</i>	<i>Matières actives</i>
Propicone	Vapco, Jordanie	<b>MBC</b> fongicides (Methyl Benzimidazole Carbamate)	Benzimidazole	Bénomyl Carbendazime Fubéridazole Thiabendazole
Vapcotop			Thiophanate	Thiophanate Thiophanate-methyl
Kazir		Dithio-carbamates	Dithio-carbamates	Mancozèbe Ferbame Cufranèbe Manèbe Zinèbe Métirame
Curatine V		Dithio-carbamates + Acétamides	Dithio-carbamates + Acétamides	Mancozèbe + Cymoxanil
<i>Références</i>	FRAC (2013)			

**Tableau IX.** Concentrations des solutions de fongicides utilisées.

<i>Fongicide</i>	<i>Solution mère</i>	<i>Concentration finale</i>
<i>Propicone</i>	10g/l	100mg/l
<i>CuratineV</i>	20g/l	100mg/l
<i>Vapcotop</i>	10g/l	100mg/l
<i>Kazir</i>	1g/l	5mg/l

**b. Test de dégradation**

Les souches ayant donné des densités optiques inférieures à 0.4 ont été écartées, tandis que les autres ont été testées pour leur capacité à utiliser les fongicides comme seul substrat nutritif dans le milieu.

Le test a été réalisé suivant la même méthode pour le test précédant sauf que le BN a été remplacé par un milieu minéral minimal M9 (Annexe I), auquel les fongicides ont été ajoutés comme seul substrat nutritif. Les densités optiques des cultures ont été mesurées à 630nm ; et les souches ayant des DO supérieures à 0.4 sont considérés comme capables de dégrader le fongicide.

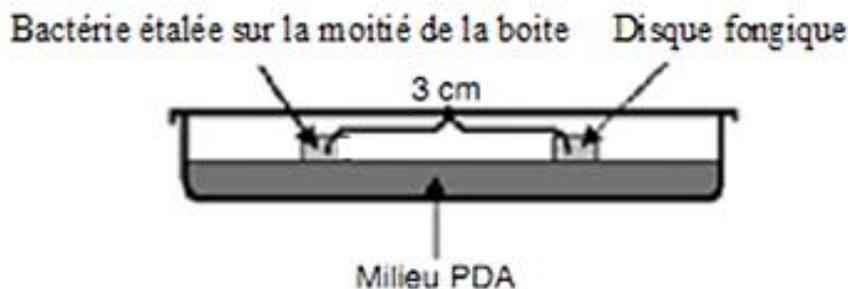
### 3.2.8. Evaluation du potentiel PGP des pathogènes humains à Gram-négatif

#### 3.2.8.1. Activités antifongiques

Les trois souches *Acintobacter calcoaceticus* XI22, *Hafnia alvei* XI47 et *Stenotrophomonas maltophilia* P29 ont été testées pour leurs capacités à inhiber la croissance des souches fongiques locales démontrées résistantes aux fongicides, à savoir : *Sporonema* sp., *Sclerotopsis* sp., *Sclerotinia* sp., *Ascochyta* sp., *Stiebum* sp., *Fusarium* sp. 29 et *Fusarium* sp. 2. Le pouvoir inhibiteur a été évalué selon deux méthodes : la confrontation directe bactérie/champignon et la confrontation indirecte *via* la production de substances volatiles antifongiques.

##### a. Confrontation directe

Cette méthode consiste en une co-culture de la bactérie antagoniste avec le champignon pathogène sur la même boîte de Pétri contenant du milieu PDA. Les boîtes sont divisées en deux compartiments : dont le premier est inoculé avec des stries bactériennes ( $10^8$  UFC/ml), alors que le deuxième est inoculé avec un disque fongique (5mm) provenant de cultures des champignons (Figure 16). Chaque co-culture a été réalisée en triplicata, et les boîtes sont incubées à température ambiante et à l'obscurité jusqu'à ce que la boîte du témoin (ne contenant qu'un disque fongique) soit complètement recouverte du mycélium.



**Figure 16.** Confrontation directe bactérie/champignon

L'inhibition de la croissance résulte en l'arrêt de l'avancement du mycélium vers les colonies bactériennes. Les taux d'inhibition ont été calculés selon la formule :

$$\text{INH}\% = [(D_c - D_t) / D_c] \times 100$$

INH% : taux d'inhibition

D<sub>c</sub> : diamètre de la croissance fongique dans la boîte du contrôle

D<sub>t</sub> : diamètre de la croissance fongique en présence de souches testées

#### ***b. Confrontation à distance.***

L'évaluation de l'inhibition de la croissance par les trois souches pathogènes *via* la production de substances volatiles, se fait selon la méthode de confrontation indirecte précédemment décrite pour les bacilles à Gram positif.

#### **3.2.8.2. Production d'enzymes lytiques par les souches**

##### ***a. Production de protéases***

La capacité des isolats à hydrolyser la caséine du lait a été mise en évidence sur milieu gélosé à base de lait. Cinquante millilitres de lait écrémé stérile ont été rajoutés à 150ml de gélose nutritive en fusion préalablement préparée (Annexe I). Le milieu solidifié conditionné en boîte de Pétri, a été ensemencé par dépôt de gouttelettes (2µl) issue d'une suspension bactérienne en phase exponentielle (10<sup>8</sup> UFC/ml). La production de protéases se traduit par un halo transparent autour de la colonie bactérienne après 48 heures d'incubation à température ambiante.

##### ***b. Production de chitinases***

La production des chitinases dégradant la chitine a été mise en évidence sur milieu minimal gélosé (M9 + agar agar) additionné de la poudre de chitine comme seule source de carbone (Annexe I). L'ensemencement du milieu et les conditions sont similaires à ceux pour le test de production de protéinases. La capacité des isolats à sécréter les chitinases se traduit par l'apparition de colonies bactériennes à la surface de la gélose.

### *c. Production de lipases*

La production de lipases hydrolysant les esters d'acides gras a été mise en évidence sur gélose nutritive additionnée de Tween 80 (monoléate de sorbitol ; Annexe I). Les boîtes ont étéensemencées et incubées comme il a été précédemment décrit. Après incubation, les colonies de souches lipase (+) sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse.

#### **3.2.8.3. Stimulation de la croissance du blé et synergie avec d'autres PGPR**

La capacité des trois isolats à stimuler la croissance du blé dur, seuls ou en synergie avec d'autres espèces bactériennes, a été évaluée *in vivo* suivant le même protocole expérimental précédemment décrit. Dans le cas de la synergie des souches XI22, XI47 et P29 avec les souches (A16, XI44, B10, A1, XI49, XI49, XI39 et S2), les graines de blé ont été trempées dans un mélange de deux volumes équivalents de chaque suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/ml). Les traitements (souches seules ou combinées) et le témoin (ne contenant que des graines désinfectées), ont été répétés trois fois.

Le premier prélèvement a été effectué durant la phase de la levée (mesure des longueurs des feuilles et des racines après 3 semaines) ; alors que durant le deuxième prélèvement (phase de tallage après 6 semaines du semis), le poids des plantules a été mesuré en plus des longueurs foliaires et racinaires.

### **3.3. Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Microsoft Excel 2013. L'analyse de la variance ANOVA à un seul facteur pour la comparaison multiple des moyennes, a été effectuée pour tester les différentes activités des bactéries (taux de signification à  $p < 0.05$ ).

## *Chapitre IV*

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### 4.1. Identification des isolats

Les 45 souches présélectionnées pour leur potentiel inhibiteur de la croissance mycélienne des champignons pathogènes telluriques (Mezaache-Aichour *et al.*, 2013b), ont été soumises à un typage moléculaire. Les séquences des gènes d'ADN codant pour l'ARNr 16S ont permis l'affiliation phylogénétique de 41 souches. Les séquences ont été déposées dans la base de données GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sous les numéros d'accession figurant dans le tableau X. Parmi les 45 souches, 33 étaient Gram-positives et 12 Gram-négatives. Le BLAST a permis l'identification de plusieurs espèces appartenant principalement aux groupes *Bacillus* et *Pseudomonas* ; les souches du genre *Bacillus* étant plus abondantes que celles du genre *Pseudomonas* comme il a été obtenu par Bouaoud *et al.* (2018).

Parmi les Gram-positives, 26 souches appartiennent au genre *Bacillus*, deux souches au genre *Virgibacillus* et une seule souche au genre *Paenibacillus*. *B. amyloliquefaciens* est l'espèce à Gram-positif la plus fréquente (30.30%) suivie par *B. subtilis* (24.24%). *Pseudomonas* sp. sont les plus abondants parmi les espèces Gram-négatives (33.33%). Trois espèces pathogènes humaines potentielles ont été identifiées, il s'agit de: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Hafnia alvei* et *Stenotrophomonas maltophilia* (8.33% chacune) ; alors que quatre isolats (B14, XI16, XI17 et AgN41) n'ont pas pu être identifiés.

**Tableau X.** Identification moléculaire des souches Gram-positives et Gram-négatives isolées de la région de Sétif.

<i>Gram</i>	<i>Code bactérien*</i>	<i>Souche</i>	<i>Pourcentage de similitude %</i>	<i>Numéro d'accèsion</i>
<i>Positif</i>	30INH	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	94	MH393531
	XI45	<i>Bacillus subtilis</i>	98	MH393547
	XI52	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>a</sup>		
	XI54	<i>Bacillus subtilis</i>	97	MH393553
	XI29	<i>Bacillus subtilis</i>	96	MH393546
	XI13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	MH393541
	XI30	<i>Bacillus subtilis</i>	94	MH393526
	XI9	<i>Bacillus subtilis</i>	98	MH393555
	XI44	<i>Bacillus oryzaecorticis</i>	91	MH393530
	B21	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	96	MH393533
	B5	<i>Bacillus subtilis</i>	97	MH393534
	XI15	<i>Bacillus subtilis</i>	97	MH393543
	XI17	<b>Nd</b>		
	A16	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	MH393532
	P35	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	96	MH393522
	XI48	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	MH393550
	XI12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	MH393540
	XI46	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	MH393548
	XI2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	95	MH393524
	30C	<i>Bacillus pumilus</i>	95	MH393528
	B10	<i>Bacillus pumilus</i>	93	MH393525
	37INH	<i>Bacillus pumilus</i>	99	MH393523
	P38	<i>Bacillus pumilus</i>	97	MH393527
	X6	<i>Bacillus velezensis</i>	95	MH393536
	B14	<b>Nd</b>		
	A1	<i>Bacillus sp.</i> <sup>a</sup>		
	XI10	<i>Bacillus sp.</i>		MH393538
	XI16	<b>Nd</b>		
	XI23	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	MH393545
	XI49	<i>Virgibacillus proomii</i>	90	MH393551
	AgN41	<b>Nd</b>		
	XI1	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	95	MH393537
XI5	<i>Paenibacillus sp.</i>		MH393552	
<i>Négatif</i>	XI14	<i>Pseudomonas protegens</i>	97	MH393542
	XI11	<i>Pseudomonas protegens</i>	98	MH393539
	XI6	<i>Pseudomonas sp.</i>		MH393554
	P37	<i>Pseudomonas sp.</i>		MH393535
	XI42	<i>Pseudomonas sp.</i> <sup>a</sup>		
	XI3	<i>Pseudomonas sp.</i> <sup>a</sup>		
	XI20	<i>Pseudomonas sp.</i> <sup>b</sup>		
	XI39	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> <sup>a</sup>		
	29INH	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	96	MH393529
	XI22	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	96	MH393544
	XI47	<i>Hafnia alvei</i>	94	MH393549
P29	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <sup>a</sup>			

\* Les codes se réfèrent aux numéros attribués aux souches dans la collection.

**Nd** non déterminée. L'affiliation des souches XI17, B14, XI16 et AgN41 n'a pas pu être déterminé par l'outil de BLAST.

<sup>a</sup> numéro d'accèsion non attribué, en raison de faible similitude <90%.

<sup>b</sup> numéro d'accèsion non attribué, en raison de séquences nucléotidiques courtes.

#### 4.2. Screening pour les gènes de biosynthèse des cLPs

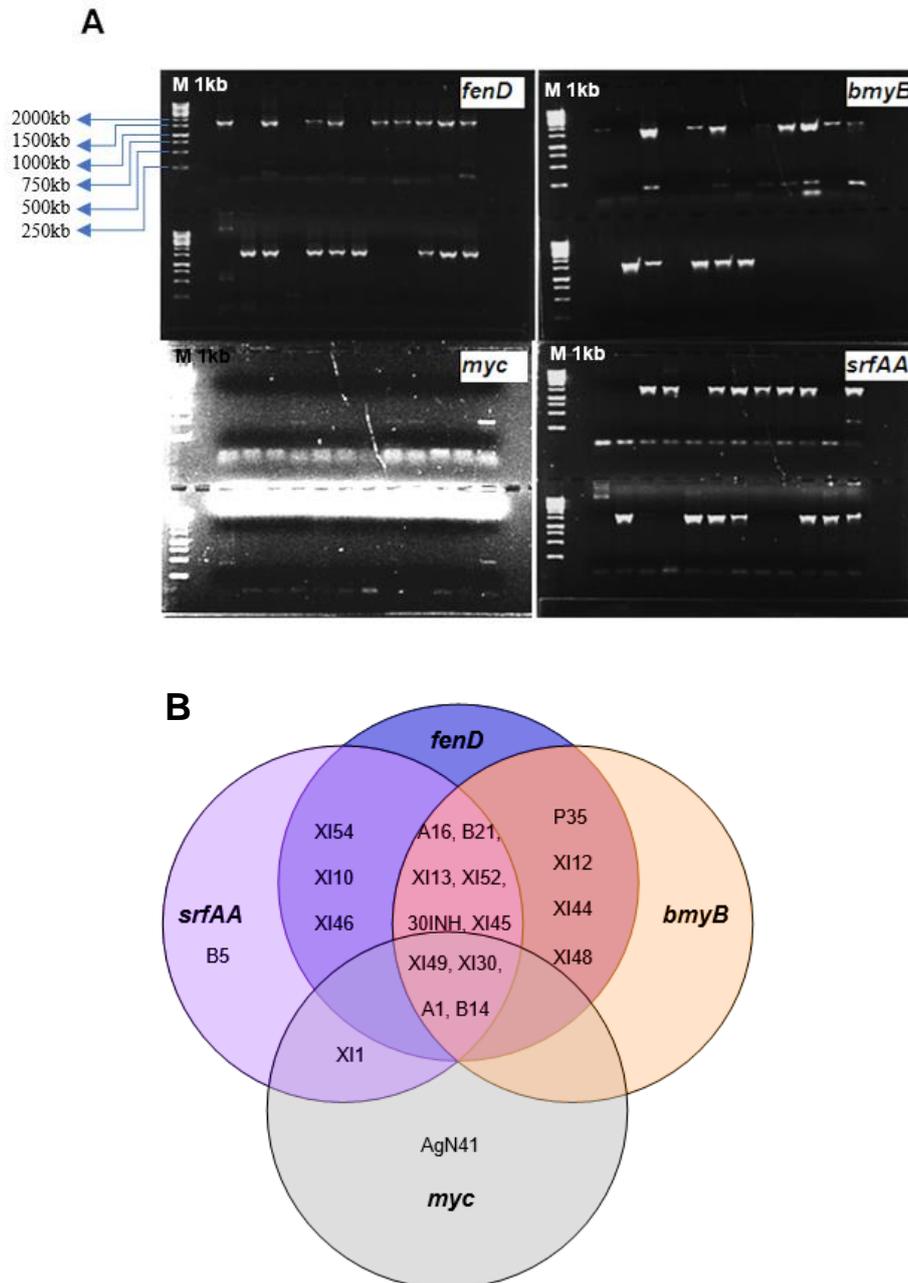
Les 24 isolats à Gram-positifs les plus antagonistes, ont été criblés pour la présence de gènes codants pour les synthétases des cLPs par moyen de la PCR. Le gène le plus répandu est *fenD* d'une taille comprise entre 1500 et 2000kb, retrouvé chez 17 souches (70.33%). Suivi par les gènes *srfAA* et *bmyB* ayant des tailles comprises entre 1500 et 2000kb et codant respectivement pour la surfactine et la bacillomycine ; qui ont été détectés chez 66.66% et 58.33% des isolats criblés. Cependant, le gène *myc* d'une longueur approximative de 500kb; est retrouvé que chez six isolats (25% ; Figure 17A).

Les gènes *srfAA* et *fenD* sont les plus fréquents chez les souches de l'espèce *B. subtilis*, tandis que les gènes *bmyB* et *fenD* sont les plus fréquents chez les souches *B. amyloliquefaciens*. Les souches B14, *B. subtilis* XI30 et *V. proomii* XI49 abritent les quatre gènes ciblés (Figure 17B) ; tandis que *B. subtilis* XI29 et *B. pumilus* (30C, B10 et P38) ne possèdent aucun des gènes des cLPs recherchés.

La fengycine, le plus abondant des lipopeptides, est produite par *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004; Arguelles-Arias *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2013), et *B. subtilis* (Ongena *et al.*, 2005; Dunlap *et al.*, 2011; Pathak *et al.*, 2012). Cependant, la surfactine a été détectée chez *B. subtilis* (Grover *et al.*, 2010; Dunlap *et al.*, 2011; Velho *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2015) et chez *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004 ; Arguelles-Arias *et al.*, 2009; Romano *et al.*, 2013). La bacillomycine est synthétisée par différentes souches de *Bacillus* telles que *B. subtilis* (Moyne *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2015), *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2013) et *Bacillus* spp. (Ramarathnam *et al.*, 2007); alors que, la mycosubtiline est la moins abondante et est détectée chez *B. subtilis* seulement (Duitman *et al.*, 1999; Leclère *et al.*, 2006; Sajitha et Dev, 2016). Toutefois, il faut souligner le fait que la production de ce dernier cLP n'est pas assez recherchée chez les *Bacillus* sp. et les *Virgibacillus* sp.

La mycosubtiline, la bacillomycine, la surfactine et la fengycine s'avèrent responsables de l'activité antagoniste des souches productrices (Leclère *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). La mycosubtiline est impliquée dans l'activité antifongique de *B. subtilis* ATCC 6633 et de son mutant surproducteur de mycosubtiline contre un large spectre de pathogènes fongiques (Leclère *et al.*, 2005).

La bacillomycine, un autre membre de la famille des iturines, est responsable de l'activité antifongique de *B. subtilis* AU195 vis-à-vis de *Aspergillus flavus* (Moyné *et al.*, 2004) ; et de *B. amyloliquefaciens* FZB42 vis-à-vis de *F. graminearum* (Gu *et al.*, 2017).



**Figure 17.** (A) Profil électrophorétiques des produits de PCR chez 24 souches antagonistes, criblés pour les quatre gènes de biosynthèses des cLPs : fengycine synthétase, bacillomycine synthétase, mycosubtiline synthétase et surfactine synthétase. (B) diagramme deVenn montrant la prévalence des gènes de biosynthèse de cLPs chez les 20 bacilles à Gram positif.

M : marqueur de taille

Aussi, la surfactine produite par *B. subtilis* 6051 a un effet antibactérien contre *P. syringae* en culture duelle; par conséquent, elle est impliquée dans l'antagonisme de la souche productrice contre les pathogènes bactériens (Bais *et al.*, 2004). La fengycine est connue pour son pouvoir fongicide. Elle est impliquée dans l'activité antifongique de *B. amyloliquefaciens* FZB42 vis-à-vis de *F. graminearum* (Gu *et al.*, 2017) et de *B. vallismortis* vis-à-vis d'*Alternaria alternata* (Kaur *et al.*, 2017). L'iturine et la fengycine confèrent un pouvoir antifongique à *B. subtilis in vitro* contre *F. oxysporum*. Aussi, la production *in situ* de la fengycine par la même souche a été stimulée par la présence du pathogène (Ongena *et al.*, 2005). L'iturine et la fengycine produites par *B. subtilis* ont également un effet inhibiteur contre *Gibberella zeae*, le téléomorphe de *F. graminearum* (Dunlap *et al.*, 2011)

Il est désormais admis que les familles de lipopeptides agissent de manière synergique, comme le suggèrent plusieurs études sur la surfactine et l'iturine (Maget-Dana *et al.*, 1992), la surfactine et la fengycine (Ongena *et al.*, 2007 ; Gu *et al.*, 2017), ainsi que l'iturine et la fengycine (Koumoutsi *et al.*, 2004, Romero *et al.*, 2007). Il a été démontré que *B. subtilis*, *B. vallismortis* R2 et *B. amyloliquefaciens* JCK-12 produisent trois lipopeptides: l'iturine A, la surfactine et la fengycine (Liu *et al.*, 2014 ; Kaur *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2017) ; tandis que *B. amyloliquefaciens* FZB42 produit la bacillomycine, la fengycine et la surfactine (Koumoutsi *et al.*, 2004). Ainsi, la coexistence de deux ou plusieurs gènes de cLPs a été observée chez de nombreuses souches dans la présente étude.

Les souches XI49, A1, XI30 et B14 abritent les quatre gènes de biosynthèses des cLPs; tandis que, les souches *B. amyloliquefaciens* (A16, XI13, B21 et 30INH) et *B. subtilis* (XI45 et XI52) abritent les trois gènes: *srfAA*, *bmyB* et *fenD*. La combinaison de la fengycine et de la surfactine de *B. subtilis* résulte en une inhibition significative de la germination des spores, indiquant une synergie potentielle (Liu *et al.*, 2014).

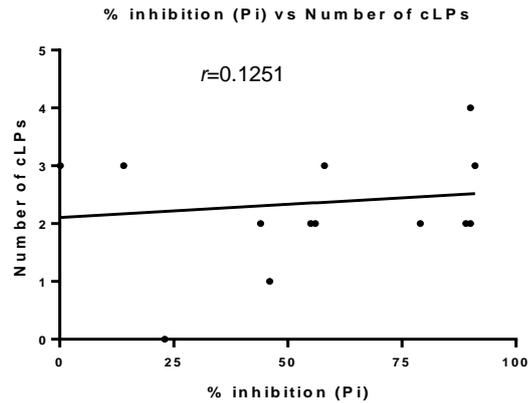
Dans des études précédentes, les souches *V. proomii* XI49 et *B. amyloliquefaciens* B21 ont montré une inhibition totale de la germination des spores de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (Benslim *et al.*, 2016), et des taux d'inhibition mycélienne de 60% et 67% contre deux isolats de *Fusarium* sp. résistants aux fongicides (Challal et Attar, 2016). Ces deux souches hébergent à la fois le gène codant pour la surfactine et celui codant pour la fengycine.

*B. amyloliquefaciens* P35 (*fenD*<sup>+</sup>, *bmyB*<sup>+</sup>) a précédemment montré des inhibitions significatives de la croissance du mycélium (Lahrache et Boulekfouf, 2014) et de la germination des spores de *F. solani* var. *coeruleum* (Benslim *et al.*, 2016). Tandis que, *B. amyloliquefaciens* XI12 (*bmyB*<sup>+</sup>, *fenD*<sup>+</sup>) et *V. halodenitrificans* XI1 (*srfAA*<sup>+</sup>, *myc*<sup>+</sup>) ont inhibé la croissance mycélienne de *F. solani* var. *coeruleum* avec 59% et 61% respectivement (Lahrache et Boulekfouf, 2014); suggérant de nouvelles combinaisons antifongiques possibles entre les cLPs.

Bien que les souches *B. pumilus* (B10, 30C) et *B. subtilis* XI29 ne possèdent aucun des gènes des cLPs criblés, elles ont eu une activité antifongique très considérable. L'isolat B10 a inhibé la croissance des champignons *Didymabotrium* sp. et *Dothichiza* sp. par 46% et 50% respectivement (Bekai et Aggoun, 2016). Alors que, l'isolat 30C a inhibé la croissance de *Fusarium* sp. 2 et une autre souche fongique non identifiée AgF14 par 60% et 81% respectivement (Challal et Attar, 2016). La souche *B. subtilis* XI29 a également montré une inhibition de la croissance mycélienne par 49% (Lahrache et Boulekfouf, 2014) et de la germination des spores par 81% (Benslim *et al.*, 2016) contre *F. solani* var. *coeruleum*. Ceci suggère qu'un mécanisme autre que la synthèse des cLPs pourrait être impliqué dans la capacité antifongique de ces souches. Les protéases et les cellulases seraient impliquées dans l'activité antagoniste de *B. pumilus* JK-SX00 (Ren *et al.*, 2013). Les souches B10 et 30C ont montré leurs capacités à produire des protéases (données non incluses).

Cette hypothèse est soutenue par la corrélation linéaire présentée dans la figure 18 qui montre qu'il n'y a pas de corrélation positive entre le taux d'inhibition de *P. infestans* et les gènes de cLPs retrouvés chez les souches antagonistes. Cela signifie l'implication de métabolites secondaires autres que les cLPs dans l'antagonisme contre cet oomycète.

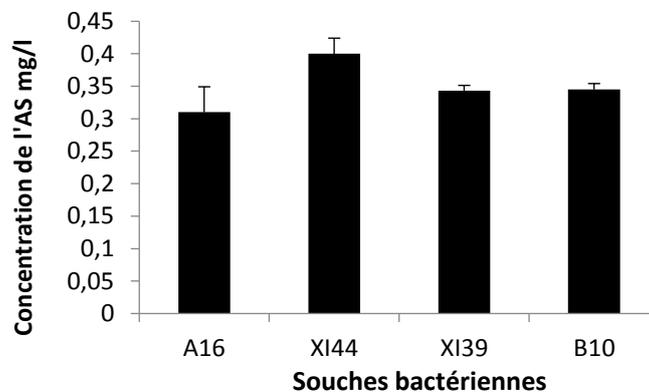
D'autre part, DeFilippi et ses collaborateurs (2018) ont constaté que les variations dans la production de cLPs pourraient s'expliquer, en partie, par les sensibilités globales des champignons phytopathogènes aux lipopeptides bactériens et/ou les taux de croissance relatifs entre le pathogène et les souches productrices. Ainsi la production des cLPs varie considérablement dans le temps en fonction du champignon ciblé.



**Figure 18.** Corrélation linéaire entre le taux d'inhibition de *P. infestans* et le nombre de cLPs.  
 $r$  : coefficient de corrélation

#### 4.3. Production de l'acide salicylique

Le salicylate a été produit par les quatre souches testées *B. amyloliquefaciens* A16, *B. oryzaecorticis* XI44, *B. pumilus* B10 et *P. plecoglossicida* XI39 à des concentrations comprises entre 0.31 et 0.4 mg/ml (Figure 19).



**Figure 19.** Concentrations de l'acide salicylique produit par les souches *B. amyloliquefaciens* A16, *B. oryzaecorticis* XI44, *B. pumilus* B10 et *P. plecoglossicida* XI39.

Les milieux déficients en fer sont utilisés pour induire la production de métabolites secondaires ayant la capacité de séquestrer le fer. Lorsque cultivé dans un milieu riche en fer, *P. aeruginosa* 7NSK2 n'a pas induit la résistance chez le haricot contre *B. cinerea* ; comparé à la souche cultivée sur le milieu KB limité en fer, qui a induit la résistance chez la plante. Ceci suggère que la résistance contre *B. cinerea* est induite par des métabolites régulés par le fer chez *P. aeruginosa* 7NSK2 (De Meyer et Höfte, 1997).

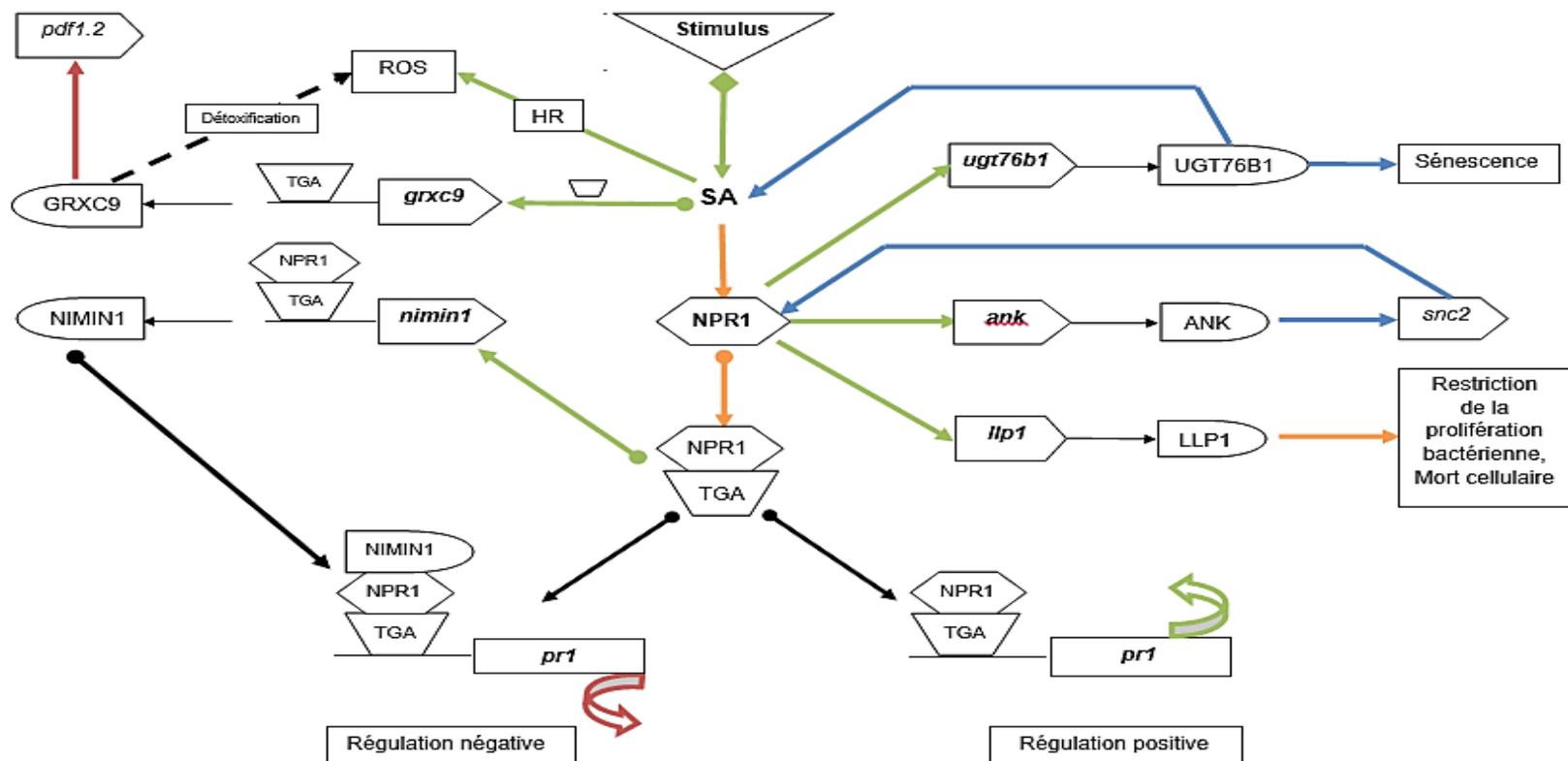
Ici, les souches testées ont produit le salicylate à des niveaux détectables sur le milieu CAA déficient en fer. La production de l'AS par la souche *Serratia marcescens* 90-166 a diminué avec l'augmentation des concentrations du fer ferrique dans le milieu de culture, alors que, la protection du concombre par la même souche contre l'antracnose causée par *Colletotrichum orbiculare* a diminué à mesure que la concentration du  $Fe^{3+}$  augmentait dans le sol (Press *et al.*, 1997). Aussi, ceci suggère que les mécanismes de défense des plantes dépendants de l'acide salicylique pourraient être induits par l'AS bactérien produit dans des conditions limitées en fer.

L'acide salicylique semble être le seul sidérophore impliqué dans la résistance induite par *P. aeruginosa* 7NSK2. Les mutants de la souche déficients en AS, n'ont pas induit la résistance contre *B. cinerea* chez le haricot (De Meyer et Höfte, 1997) ; tandis que, *P. aeruginosa* KMPCH ( $SA^+$ ,  $pyocheline^-$  et  $pyoverdine^-$ ) a induit une résistance chez la tomate. Confirmant l'implication de l'AS dans l'antagonisme contre *B. cinerea* sur les feuilles de la tomate (Audenaert *et al.*, 2002). L'insertion du gène de biosynthèse du AS dans le génome de la souche déficiente *P. fluorescens* P3 a amélioré son pouvoir à induire l'ISR contre le TMV (Maurhofer *et al.*, 1998).

L'ISR a également été stimulée, et la sévérité de la fusariose a été réduite chez le pois chiche après application de l'AS exogène (Saikia *et al.*, 2003). Les concentrations du SA peuvent être augmentées dans les feuilles de tabac en cultivant les plantes avec des bactéries colonisatrices de racines. L'accumulation de l'AS endogène dans les tissus végétaux n'est pas encore confirmée, serait-elle due à l'induction par l'AS bactérien ? Ou à l'assimilation de ce dernier par la plante puis l'accumulation dans les feuilles ? Ceci reste à être révélé.

#### **4.4. Induction de l'expression des gènes inductibles par l'acide salicylique chez *Arabidopsis***

Les protéines PR1, GRXC9, NIMIN1, ANK, UGT76B1 et LLP1 sont des marqueurs de la voie de défense dépendante du salicylate chez *A. thaliana* (Figure 20). Les gènes *nimin1*, *pr1*, *grxc9* et *ank* sont significativement induits en réponse à l'application exogène du salicylate, tandis que les gènes *ugt76b1* et *llp1* ont été fortement réprimés par ce dernier (Figures 21A-21F).



**Figure 20.** Régulation des gènes induits par l'acide salicylique chez *Arabidopsis*, adapté des travaux de Weigel *et al.* (2005); Ndamukong *et al.* (2007); Blanco *et al.* (2009); von Saint Paul *et al.* (2011); Yang *et al.* (2012); Armijo *et al.* (2013) et Herrera-Vasquez *et al.* (2015a).

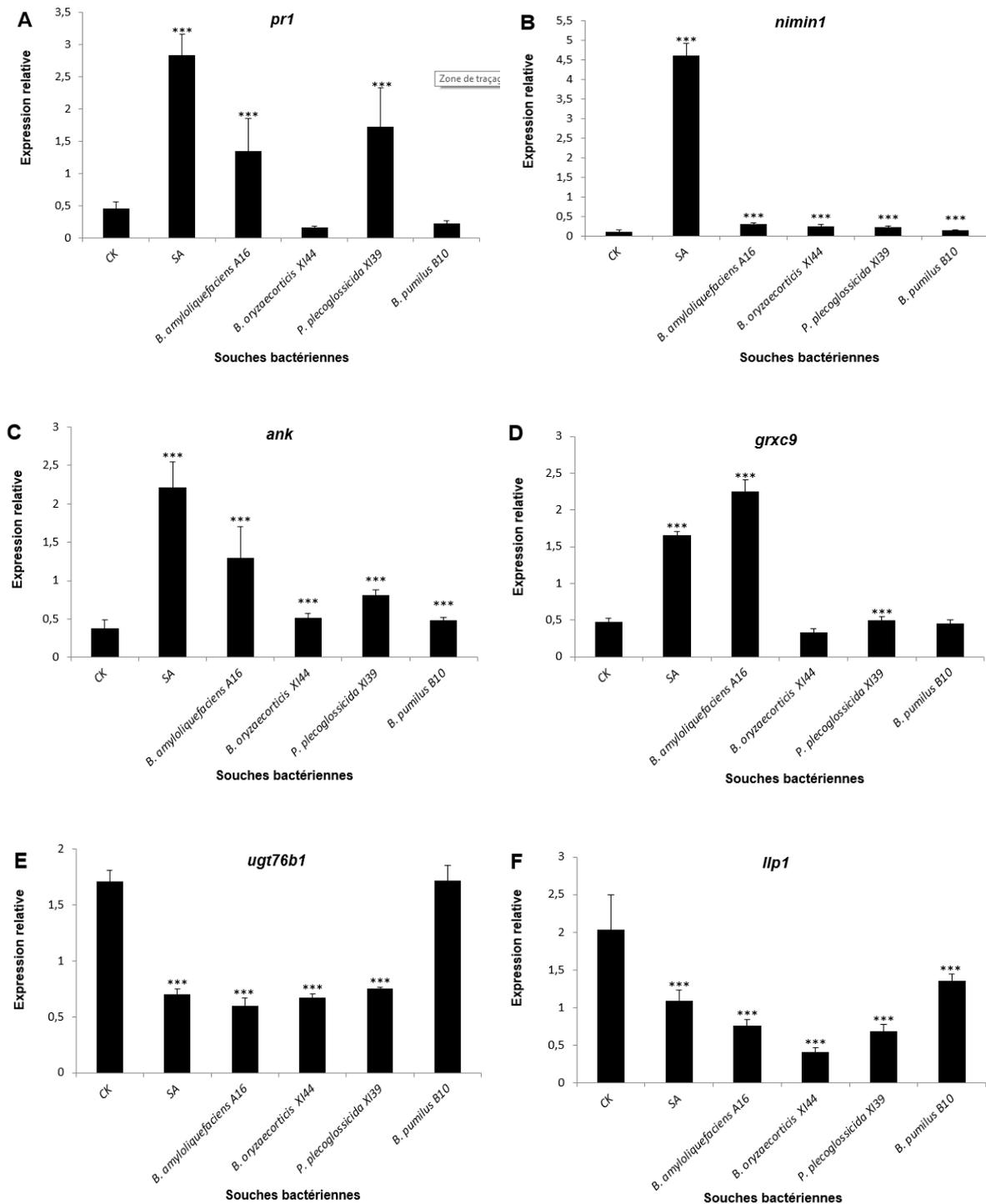
Les six gènes utilisés dans cette étude appartiennent à la voie de défense inducible par l'acide salicylique. L'expression du *pr1* et *nimin1* est dépendante du NPR1 et du facteur transcriptionnel TGA. La liaison de NIMIN1 au complexe NPR1/TGA lié au promoteur du *pr1* réprime l'expression de ce dernier. Les gènes *ugt76b1*, *ank* et *llp1* sont également dépendants du NPR1 tandis que *grxc9* est indépendant de NPR1 et donc indépendant du complexe TGA/NPR1. Les couleurs et les formes indiquent les différents mécanismes de régulation. En vert : induction ; rouge : répression; bleu : régulation positive/négative; orange : activation de la molécule; flèches à tête ronde : fixation; flèche à tête carrée : accumulation . SA : acide salicylique ; HR: réponse hypersensible; ROS: espèces réactives de l'oxygène.

L'application de l'AS exogène sur le pois chiche a stimulé la résistance systémique contre le flétrissement fusarien et a réduit significativement la sévérité de la maladie (Saikia *et al.*, 2003). Ce résultat correspond bien aux résultats obtenus dans le présent travail puisque les gènes *nimin1*, *pr1*, *ank* et *grxc9* d'*Arabidopsis* ont été fortement induits par l'AS exogène.

En ce qui concerne les quatre souches testées, l'induction de l'expression des gènes la plus élevée a été obtenue avec la souche *B. amyloliquefaciens* A16 suivie par *P. plecoglossicida* XI39, *B. oryzaecorticis* XI44 et *B. pumilus* B10. Les isolats *B. amyloliquefaciens* A16 et *P. plecoglossicida* XI39 ont induit l'expression des gènes *grxc9*, *ank* et *pr1*. Les isolats *B. pumilus* B10 et *B. oryzaecorticis* XI44 ont montré le plus bas niveau d'induction des gènes *ank* et *nimin1*, tandis qu'elles n'ont eu aucun effet régulateur (ni induction ni répression) sur l'expression des gènes *grxc9* et *pr1*. Par contre, l'expression du gène *llp1* a été significativement réprimée par les quatre bactéries. La souche *B. pumilus* B10 n'a pas d'effet régulateur sur le gène *ugt76b1*, par contre les autres (A16, XI39 et XI44) l'ont fortement réprimé (Figures 21A-21F).

La contribution des cLPs dans l'induction de l'ISR a été intensivement étudiée. Les souches de *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* productrices de surfactine, ainsi que la surfactine purifiée ont déclenché les défenses chez les plantes de tabac inoculées avec la suspension de spores de *B. cinerea* (Cawoy *et al.*, 2014). Alors que, le mutant Bs2504 produisant seulement la fengycine (dérivé de *B. subtilis* 168 producteur de surfactine et de fengycine), a conservé une certaine capacité à induire la résistance chez le haricot (Ongena *et al.*, 2007).

Bien que *B. amyloliquefaciens* A16 produisait la plus faible concentration en AS (0.31 mg/m), elle a fortement induit l'expression des gènes *nimin1*, *pr1*, *ank* et *grxc9*. Cette induction pourrait être due à la présence des gènes de la surfactine et de la fengycine. D'autre part, *B. oryzaecorticis* XI44 (*srfAA*<sup>-</sup>, *fenD*<sup>+</sup>) et *B. pumilus* B10 (*srfAA*<sup>-</sup>, *fenD*<sup>-</sup>) ont montré des niveaux d'induction très faible pour certains gènes, mais ont réprimé d'autres ; même s'ils ont produit des concentrations élevées de AS. Cette supposition pourrait être compensée par le fait que les plantules d'*Arabidopsis* et les inocula bactériens ont été co-cultivés sur milieu MS (non déficient en fer), ainsi l'ASbactérien peut être exclu comme inducteur de gènes.



**Figure 21.** Réponse des gènes de défense dépendants du salicylate chez *Arabidopsis* aux quatre isolats bactériens. (A) *pr1* (B) *nimin1* (C) *ank* (D) *grxc9* (E) *ugt76b1* et (F) *llp1*. En abscisses : traitements avec *B. amyloliquefaciens* A16, *B. oryzaecorticis* XI44, *B. pumilus* B10 et *P. plecoglossicida* XI39. Le contrôle positif (SA) consiste en 250µM d'AS et le contrôle négatif (CK) consiste en 5ml du milieu ½ MS; En ordonnées: taux de l'expression relative des ARNm des six gènes de défense chez *Arabidopsis*.

\*\*\* Induction/répression significatives ( $p < 0.05$ )

*P. plecoglossicida* XI39 produit une concentration importante en AS, mais a été moins efficace que l'A16 dans la régulation des gènes. En effet, les souches de *Pseudomonas* impliquent différents mécanismes d'induction tels que les lipopeptides (Tran *et al.*, 2007), les lipopolysaccharides (Mohamed *et al.*, 2015) et les flagelles (Meziane *et al.*, 2005).

La protéine PR1 appartenant à la famille des PRs est un indicateur de la résistance systémique induite par les agents pathogènes, mais aussi par l'application de l'AS exogène sur les tissus végétaux (Uknes *et al.*, 1992; van Loon et van Strien 1999; Zwicker *et al.*, 2007). Une accumulation différentielle du PR1 a été détectée dans des feuilles des plantes de tabac infectées par le TMV et non-traitées par le SA, et chez des plantes poussant en présence de l'AS. Dans le présent cas, le gène *pr1* d'*Arabidopsis* a été induit à la fois par le SA et les quatre souches testées, correspondant bien aux résultats de Cao *et al.* (1997).

D'autre part, le gène *nimin1* a été induit à un niveau très élevé par le SA exogène, comme l'ont démontré Blanco *et al.* (2009), mais a été très faiblement induit par les souches testées. L'expression dépendante de l'AS du gène *pr1* est régulée par la protéine NIMIN1 (Maier *et al.*, 2011). Cette dernière peut être un régulateur négatif du *pr1* chez *Arabidopsis*. L'accumulation des ARNm *pr1* était plus considérable chez le mutant d'*Arabidopsis nimin1-1* (NIMIN1 knockout) que chez la plante sauvage (Weigel *et al.*, 2005), par contre la surexpression du gène *nimin1* a entraîné une réduction significative de l'induction du gène *pr1* (Zwicker *et al.*, 2007).

La protéine ANK est impliquée dans la transduction du signal chez *Arabidopsis* (Blanco *et al.*, 2005), et pourrait être impliquée dans la régulation de la différenciation des chloroplastes (Zhang *et al.*, 1992). Dans le présent travail, le gène *ank* a été exprimé à un niveau très élevé chez les plantules d'*Arabidopsis* traitées avec l'AS (Blanco *et al.*, 2005). Suivi par *B. amyloliquefaciens* A16 et légèrement induit par les trois autres souches. Des nécroses sont observées chez les plantes d'*Arabidopsis* contenant de faibles niveaux de la protéine endogène ANK2. Par ailleurs, la répression du gène *ank2* résulte en une accumulation des espèces d'oxygène réactives (ROS) dans le tissu foliaire, suggérant son implication dans le burst oxydatif (Yan *et al.*, 2002).

L'expression du gène *grxc9* est activée par l'AS exogène et/ou suite à l'infection par un agent avirulent (Blanco *et al.*, 2009). Le *grxc9* a été considérablement induit par *B. amyloliquefaciens* A16 suivi par l'AS exogène. Les protéines de la famille des glutarédoxines jouent un rôle dans la détoxification et dans les réponses de défense des plantes vis-à-vis des pathogènes (Ndamukong *et al.*, 2007). GRXC9 est une défense inductible par le stress chez *Arabidopsis*, elle est induite en réponse aux rayonnements UVB (Blanco *et al.*, 2009; Herrera-Vasquez *et al.*, 2015b), et est associée au burst oxydatif cellulaire (Blanco *et al.*, 2009). Le gène *grxc9* s'autorégule *via* son produit GRXC9 qui réprime sa propre expression en se liant aux facteurs transcriptionnels TGA alors qu'ils sont liés à l'ADN (Herrera-Vasquez *et al.*, 2015b).

Le gène *ugt76b1* est lui aussi inductible par l'acide salicylique (Blanco *et al.*, 2009), dont l'expression est aussi induite en réponse au stress. C'est une glucosyl transférase, hautement sensible au stress biotique ainsi qu'aux pathogènes biotrophes et nécrotrophes. Le mutant d'*Arabidopsis* déficient en *ugt76b1* a montré une chlorose des feuilles et une sénescence plus précoces que celles observées chez la plante sauvage ; indiquant l'implication de l'UGT76B1 dans la sénescence chez *Arabidopsis*. Le gène *pr1* a été exprimé dans les feuilles d'*Arabidopsis* déficientes en UGT76B1 ; en revanche le gène *pdf1.2* induit par le jasmonate a été réprimé (von Saint Paul *et al.*, 2011). De ce fait, la perte de l'UGT76B1 a entraîné l'induction des voies de défenses dépendantes de l'acide salicylique et la répression de celles dépendantes de l'acide jasmonique; ce qui suggère que l'UGT76B1 est impliquée dans le crosstalk SA-JA.

La LLP1, une autre protéine dépendante de l'acide salicylique (Blanco *et al.*, 2009), est responsable de la réduction de la prolifération bactérienne et de l'augmentation de la mort cellulaire dans les tissus infectés (Armijo *et al.*, 2013). Le gène *llp1* a été induit 5h après infection de l'*Arabidopsis* par *P. syringae* pv. *tomato* AvrRpm1, indiquant l'implication de la LLP1 dans les défenses antibactériennes (Blanco *et al.*, 2009).

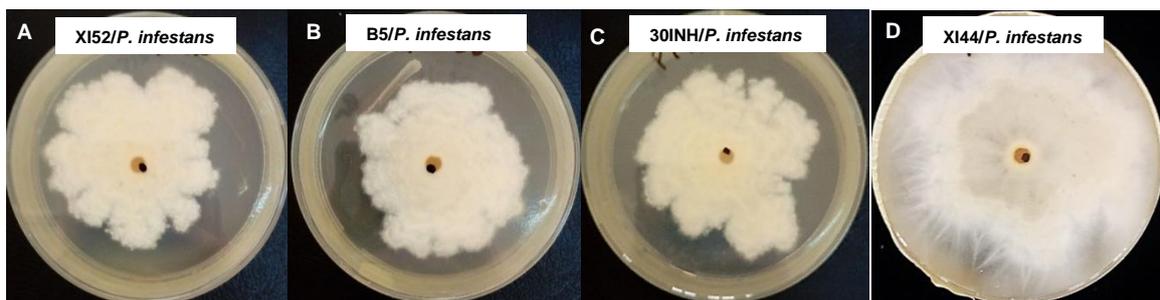
Les gènes *ugt76b1* et *llp1* ont été réprimés suite au traitement par nos souches. Il est connu que l'UGT76B1 est produite en cas de stress biotique, et que LLP est impliquée dans les défenses antibactériennes. De ce fait, les souches testées ne sont pas considérées pathogènes par la plante, puisque les gènes de stress n'ont pas été exprimés.

#### 4.5. Production de substances volatiles

Les champignons utilisés dans ce test sont connus pour provoquer des maladies destructrices telles que : le mildiou et la pourriture sèche de la pomme de terre causées respectivement par *P. infestans* (Haverkort *et al.*, 2008) et *F. solani* var. *coeruleum* (Adams et Lapwood, 1983); le flétrissement fusarien du palmier dattier causé par *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (Fernandez *et al.*, 1995); et la pourriture des racines et la fonte des semis de blé causé par *F. graminearum* (Wang *et al.*, 2006)

Une inhibition significative de la croissance fongique *via* la production de substances volatiles a été obtenue vis-à-vis de *P. infestans* (Figure 22 et 23A) par les isolats *B. subtilis* (XI52, B5), *B. amyloliquefaciens* (30INH, XI46, XI13 et XI48), *Bacillus* sp. XI1 et AgN41. Seules les souches *B. amyloliquefaciens* (B21 et 30INH) et *Bacillus* sp. XI10 ont faiblement inhibé le développement de *F. solani* var. *coeruleum* (Figure 23B) et de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (Figure 23C) respectivement. Tandis que *F. graminearum* n'a été inhibé par aucune des souches (Figure 23D).

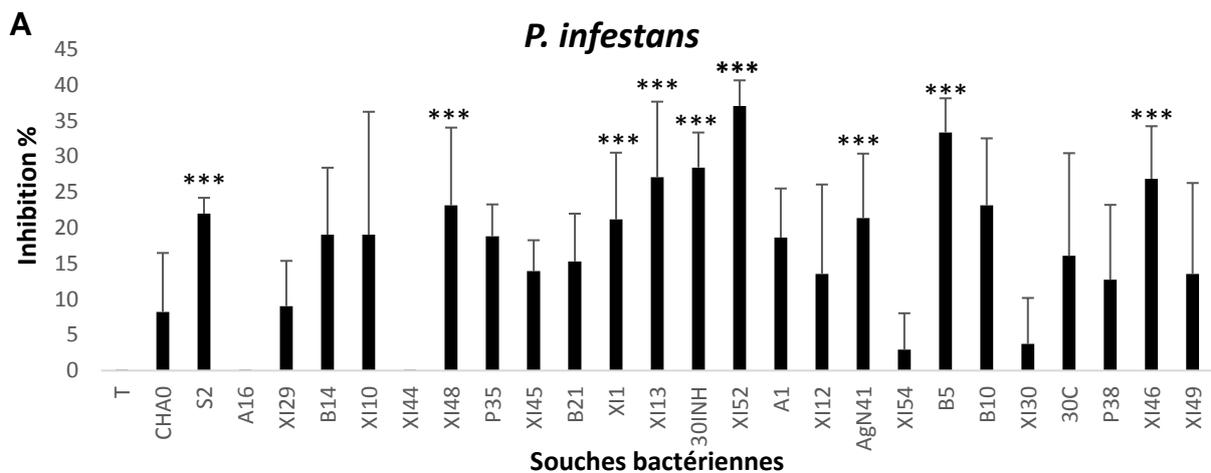
En effet, l'oomycète *P. infestans* a été hautement sensible aux substances volatiles bactériennes où sa croissance a été complètement arrêtée ; contrairement au *F. oxysporum* qui était extrêmement résistant, avec pratiquement aucune inhibition de croissance significative. Les souches cyanogènes de *Pseudomonas* étaient les plus actives, entraînant une inhibition totale de la croissance, mais les souches non-cyanogènes produiraient également des substances volatiles anti-oomycètes (Hunziker *et al.*, 2015).

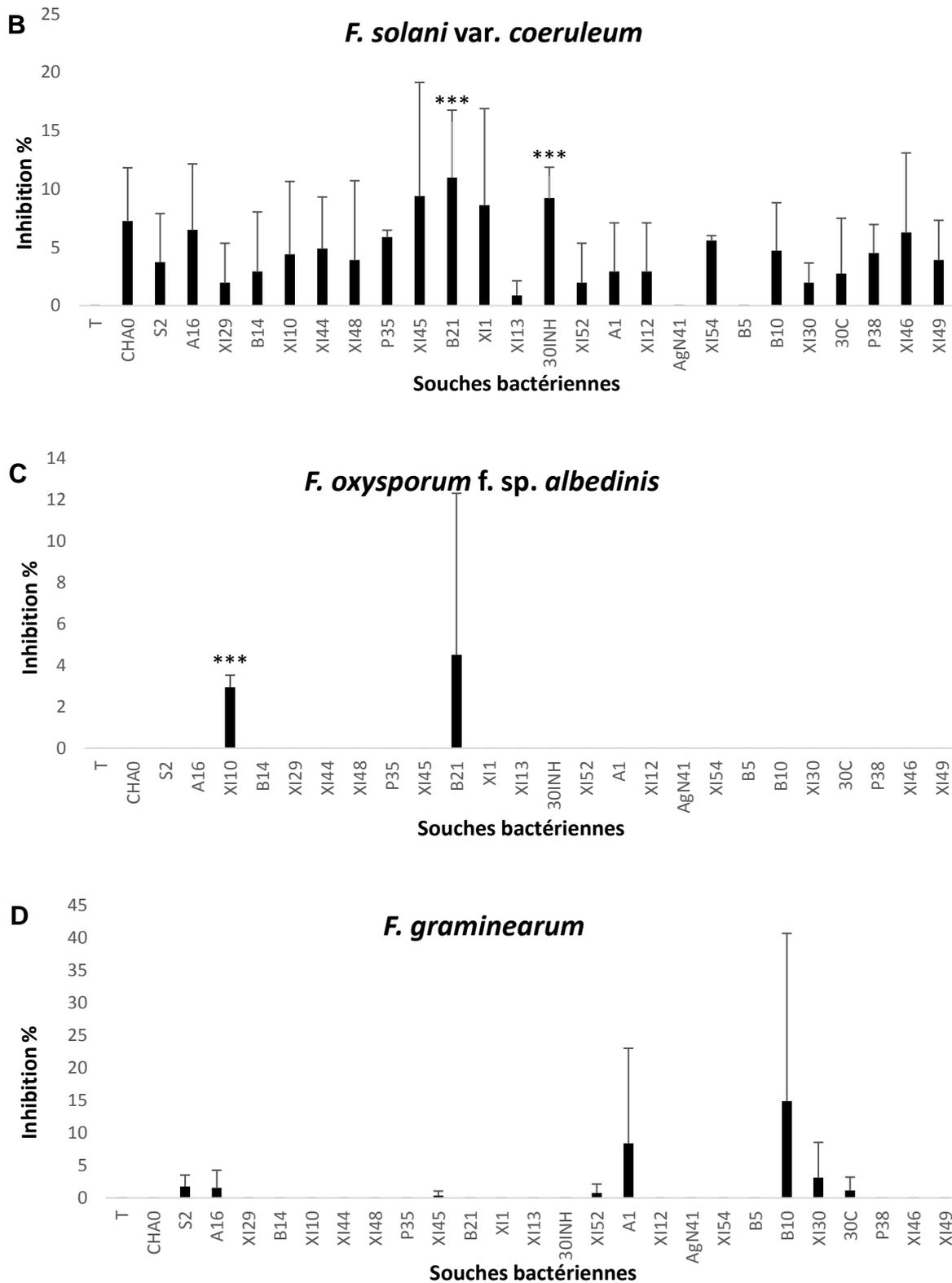


**Figure 22.** Confrontation à distance des souches vis-à-vis de *P. infestans*.  
(A) *B. subtilis* XI52, (B) *B. subtilis* B5, (C) *B. amyloliquefaciens* 30INH et (D) *B. oryzaecorticis* XI44

Dans la présente étude, les taux d'inhibition obtenus avec la souche cyanogène *P. protegens* CHA0 sont significativement plus bas que ceux obtenus avec les souches utilisées. Parmi ces dernières, la souche XI48 est la seule à produire l'HCN (Boukhalfa et Madaci, 2013) ; ce qui suggère l'implication d'autres composés volatils anti-oomycètes.

Dans l'étude de Hunziker *et al.* (2015), l'analyse des composés organiques volatils (COV) émis a révélé que le 1-undécène produit par des isolats rhizosphériques était le composé majeur impliqué dans l'inhibition de la croissance de *P. infestans*. Son application a significativement réduit la croissance mycélienne, la formation des sporanges, la germination et la libération des zoospores d'une manière dose dépendante. Aussi, une souche *B. subtilis* antagoniste a inhibé la croissance d'un autre oomycète *Pythium afertile* par 84%, étant plus importante que le taux d'inhibition de *F. oxysporum* par des substances diffusibles dans le milieu, bien que les deux types de composés ont causé les mêmes changement de structures chez le champignon (Chaurasia *et al.*, 2005).





**Figure 23.** Inhibition de la croissance des champignons par production de substances volatiles.

(A) *P. infestans*, (B) *F. solani var. coeruleum*, (C) *F. oxysporum f. sp. albedinis* et (D) *F. graminearum*.

\*\*\* Inhibition significative ( $p < 0.05$ )

Les composés volatils de la souche *B. velezensis* G341 ont réduit la croissance de *P. infestans* par 30%, alors qu'ils n'avaient aucun effet sur *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* responsable du flétrissement fusarien de la tomate (Lim *et al.*, 2017). Vespermann et ses collaborateurs (2007) avaient également démontré que les souches de *Fusarium* ont été résistantes aux composés volatils produits par les *Bacillus* testés. Ceci concorde bien avec notre résultat, puisque les isolats sont considérablement actifs contre le *Phytophthora* mais très peu ou non actifs contre les trois ascomycètes du genre *Fusarium* testés.

Par contre, les composés volatils produits par *B. amyloliquefaciens* NJN-6 ont été efficaces contre *F. oxysporum* ; ils ont inhibé la croissance mycélienne et la germination des spores du pathogène. L'analyse des composés volatils a détecté la prédominance des benzènes prouvés être responsable de l'activité antifongique (Yuan *et al.*, 2012). Ici, les souches *Bacillus* sp. XI10 et *B. amyloliquefaciens* B21 étaient les seules ayant inhibé la croissance de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*. Il est à démontrer s'il s'agit des mêmes molécules ou d'autres dans le cas de ces deux isolats.

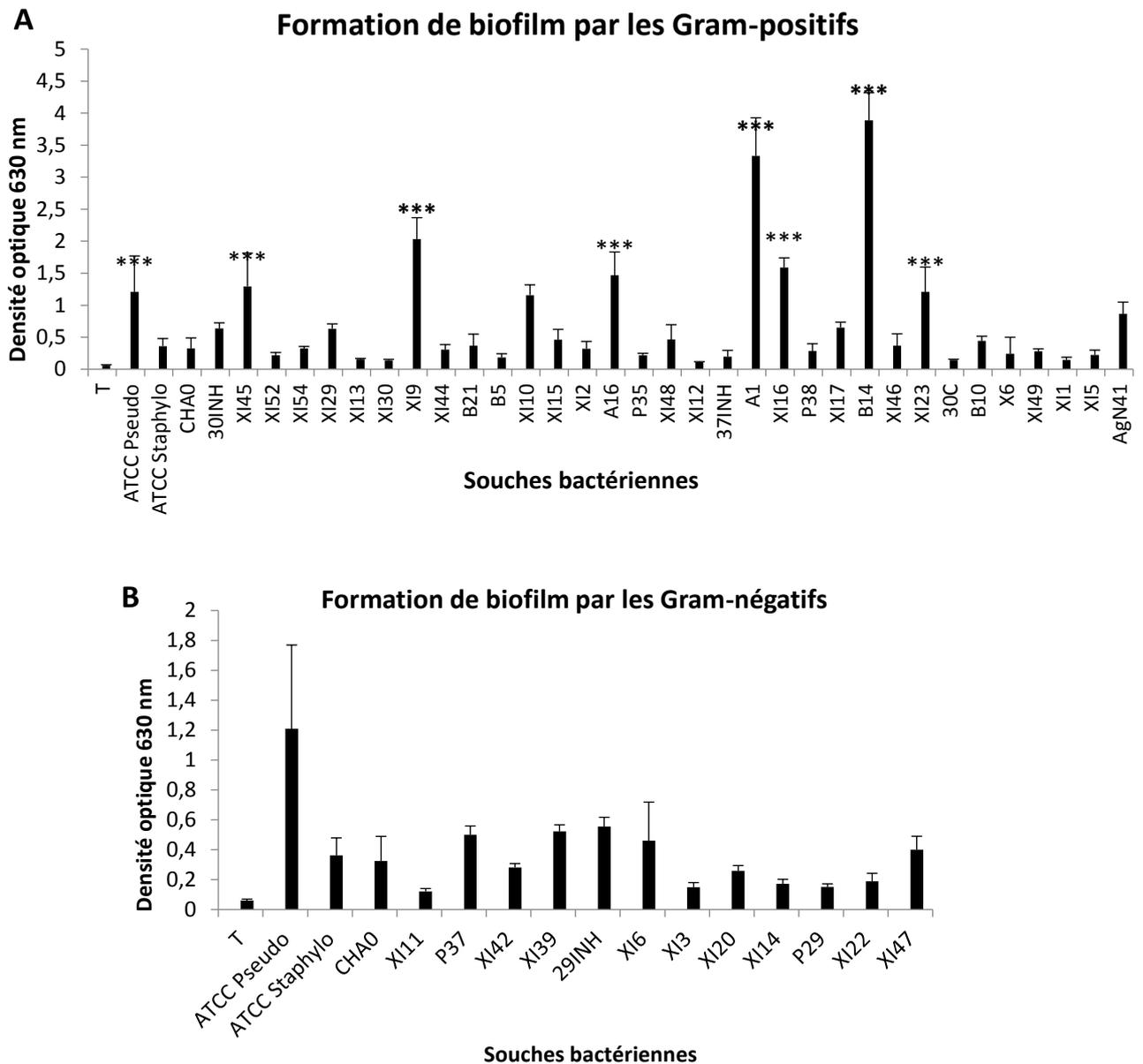
Des études ont rapporté des souches de *B. subtilis* productrices de substances volatiles inhibitrices de *F. graminearum* (Nourozian *et al.*, 2006 ; Abdulkareem *et al.*, 2014), contrairement à ce qu'il a été obtenu dans le présent travail. Ces différences peuvent être dues à la différence de susceptibilité des souches de *F. graminearum* testées aux COV des Gram-positives.

Plus haut, il a été démontré qu'il n'y a aucune corrélation positive entre le nombre de cLPs et l'inhibition de la croissance de *P. infestans*. Cependant, les taux d'inhibition très considérables de l'oomycète par certains isolats à Gram-positif via la production de COV ; suggère que le pouvoir inhibiteur lors de la présélection serait accordé aux composés volatils.

#### **4.6. Formation de biofilms**

Les souches diffèrent dans leur capacité à former le biofilm. Tous les isolats testés ont formé un biofilm assez important par comparaison au témoin négatif. En général, les isolats à Gram-positif avaient une capacité supérieure à former le biofilm que ceux à Gram-négatif.

Aussi, certains isolats Gram-positif ont montré une capacité à former le biofilm significativement plus importante que les souches de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 ; à savoir : l'isolat B14, *Bacillus* sp. A1, *B. subtilis* XI9, XI16, *B. amyloliquefaciens* A16, *B. subtilis* XI45 et *B. amyloliquefaciens* XI23 (Figure 24).



**Figure 24.** Capacité de formation des biofilms sur milieu TSB par les souches testées.

(A) Gram positifs et (B) Gram négatifs.

\*\*\* Capacité significative ( $p < 0.05$ )

Peeters *et al.* (2008) ont réalisé le test de quantification des biofilm en utilisant différentes concentrations du CV. Ils ont conclu que l'absorbance optimale obtenu avec *S. aureus* a été enregistrée en utilisant le CV à 0.1%. Ils ont également conclu que la méthode du CV semblait être moins appropriée pour la quantification de la biomasse du biofilm formé par *P. aeruginosa*. Cela peut s'expliquer par une fixation insuffisante de ces biofilms, en raison des grandes quantités de l'eau présente dans la matrice visqueuse des biofilms de *P. aeruginosa*. Ces résultats peuvent expliquer ceux obtenu dans le présent travail, puisque l'absorbance par *S. aureus* était très faible avec le CV à 0.5% et celle de *P. aeruginosa* était similaire à l'absorbance obtenue par Peeters et ses collaborateurs.

Il est connu que *B. subtilis* ne forme généralement pas de biofilms sur les surfaces inerte même dans un milieu induisant leur formation ; cette capacité nécessite plutôt une activité métabolique active de la plante afin de coloniser les racines (Chen *et al.*, 2012). Par ailleurs, la formation de biofilm par *B. cereus* a été remarquablement améliorée dans les conditions limitantes en nutriments. Les biofilms formés dans le TSB dilué (1: 20 v/v) ont été plus denses que ceux formés sur le TSB, signifiant l'influence de la disponibilité des nutriments sur la formation des biofilms (Elhariry, 2011).

Plusieurs études ont démontré l'implication des cLPs dans la capacité des bactéries à produire le biofilm sur les racines des plantes/et ou sur les surfaces artificielles. Le mutant de *B. amyloliquefaciens* SQRM9 déficient en bacillomycine, a formé une très mince couche de biofilm *in vitro*, et a été incapable de coloniser les racines du concombre et de les protéger contre *F. oxysporum*; indiquant le rôle de la bacillomycine dans la formation de biofilm et la colonisation des racines par la souche productrice (Xu *et al.*, 2013). La surfactine est également impliquée dans ces capacités, vu que le mutant *B. subtilis* 6051 déficient en surfactine a lui aussi perdu son pouvoir à former le biofilm et à coloniser les racines, et donc de protéger *Arabidopsis* contre *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Bais *et al.*, 2004). Dans la présente, parmi les souches qui ont formé le meilleur biofilm certaines ont été testées pour la présence de gènes de biosynthèses des cLPs. Les isolats, B14, A1, A16 et XI45 abritent les gènes de la surfactine et de la bacillomycine, suggérant l'implication de ces dernières dans leur pouvoir à former le biofilm.

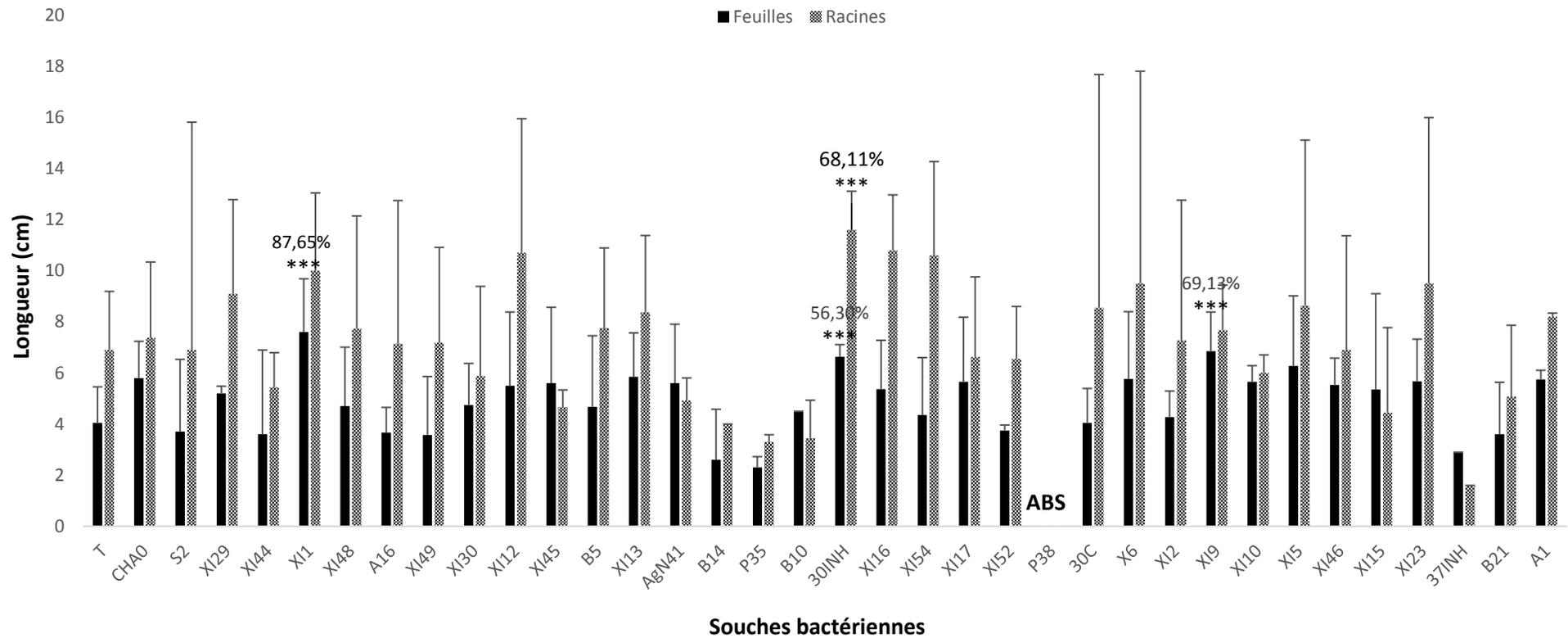
## 4.7. Test *in planta*

### 4.7.1. Stimulation de la croissance du blé

Les longueurs des feuilles et des racines enregistrées durant les phases de la levée et du tallage sont illustrées dans les figures 25 (A et B) et 26 (A et B). Les résultats obtenus ont montré un potentiel stimulateur considérable de la croissance des plantes de blé. La majorité des souches ont donné des résultats plus importants que ceux obtenus avec les deux souches de référence : CHA0 et la souche 2.

Certaines souches ont donné des résultats plus significatifs que ceux obtenus avec la souche référentielle CHA0 dans la phase de la levée. Les longueurs les plus significatives des feuilles ont été enregistrées chez les plantules traitées par *V. halodenitrificans* XI1, *P. plecoglossicida* 29INH, *B. subtilis* XI9, *P. protegens* XI14 et *B. amyloliquefaciens* 30INH par 87, 69, 61 et 56% respectivement. Par contre aucune différence n'a été enregistrée avec le reste des souches. Alors que pour les racines, les souches XI14, 30INH et 29INH ont été les seules qui ont significativement stimulé l'élongation par les taux respectifs de 98, 68 et 57%. Cependant, il n'y avait aucune augmentation significative des longueurs des feuilles et des racines entre les souches testées et le témoin non traité durant la phase de tallage. Il est également à noter que, durant cette phase, certaines souches (XI17, XI15, A1, etc.) étant moins actives durant la phase de levée sont devenues plus actives et ont considérablement augmenté la croissance du blé. Abd El-Azeem et ses collaborateurs (2008), ont démontré que le traitement des graines de blé de la variété *Triticum aestivum* L. avec des souches PGPR a engendré une augmentation par 70,6% pour le rendement en paille et par 57,3% pour le rendement en grains.

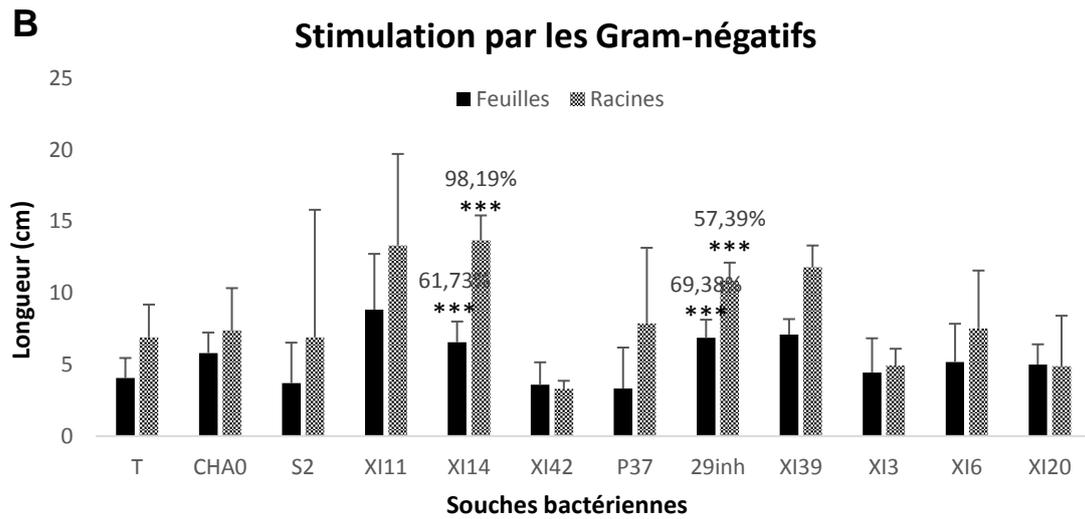
Les rhizobactéries sont connues pour leur effet stimulateur de la croissance de différentes cultures, par la production d'une large gamme de métabolites stimulateurs tels que les auxines y compris l'acide indole acétique (Ahmad *et al.*, 2008 ; Cardinale *et al.*, 2015), et l'ACC désaminase (Cardinale *et al.*, 2015 ; Magnucka et Pietr, 2015). L'augmentation de la disponibilité des éléments nutritifs assimilables par la plante (Ahmad *et al.*, 2008 ; Cardinale *et al.*, 2015), et l'amélioration de la résistance de la plante aux stress (Cardinale *et al.*, 2015 ; Vurukonda *et al.*, 2016) ; sont aussi parmi les mécanismes de stimulation de la croissance exercés par les PGPRs. Il a été précédemment démontré que les souches utilisées dans ce travail sont toutes productrices de phosphatases mais aussi de l'AIA (Boukhalfa et Madaci, 2013).

**A****Stimulation par les Gram-positifs**

**Figure 25.** Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de la levée après traitement avec les Gram-positifs (A).

ABS : absence totale de croissance

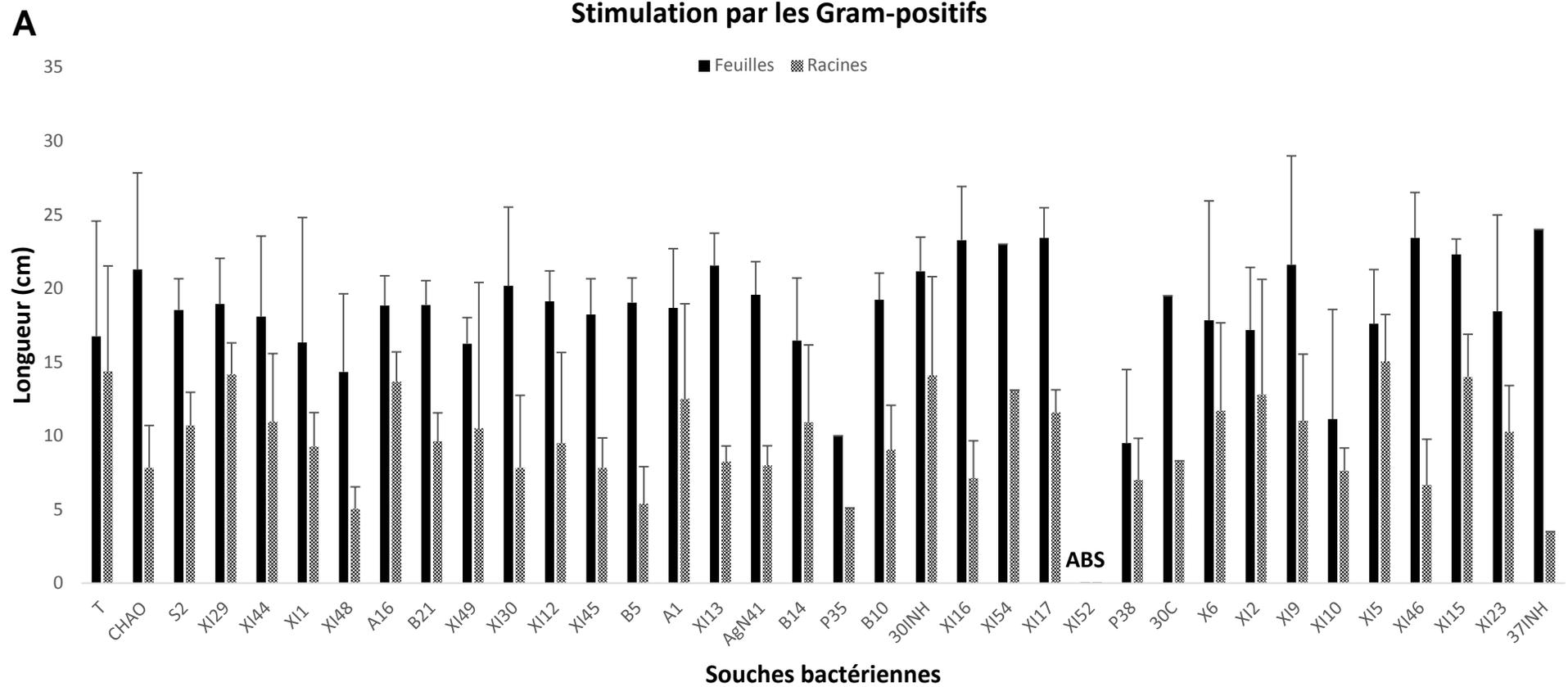
\*\*\* Stimulation significative ( $p < 0.05$ )



**Figure 25.** Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de la levée après traitement avec les Gram-négatifs (B).

ABS : absence totale de croissance

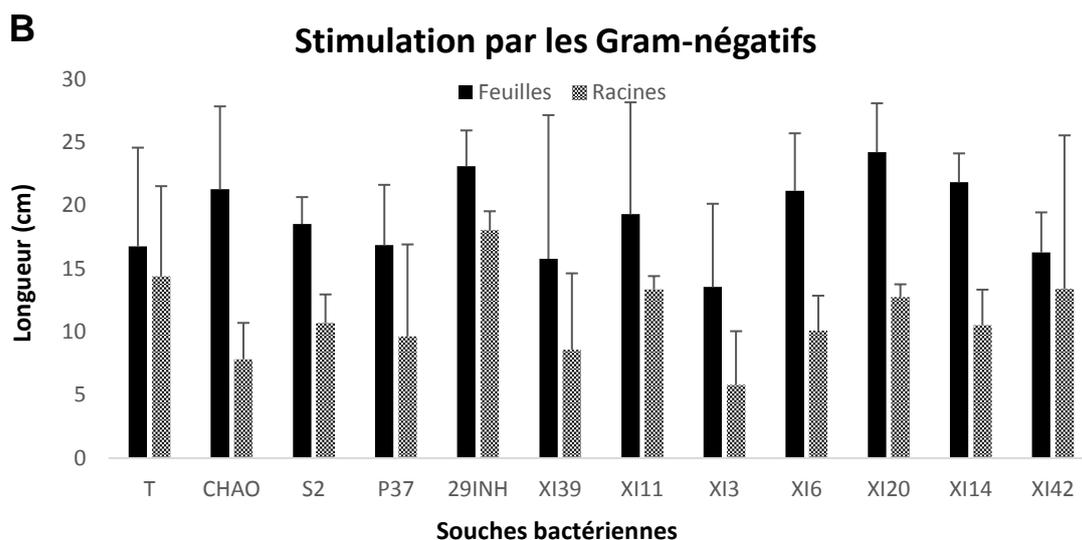
\*\*\* Stimulation significative ( $p < 0.05$ )



**Figure 26.** Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de tallage après traitement avec les Gram-positifs (A).

ABS : absence totale de croissance

\*\*\* Stimulation significative ( $p < 0.05$ )



**Figure 26.** Longueurs des parties aérienne et racinaire durant la phase de tallage après traitement avec les Gram-négatifs (B).

ABS : absence totale de croissance

\*\*\* Stimulation significative ( $p < 0.05$ )

La souche *P. aeruginosa* 7NSK2 productrice de sidéophores, appliquée comme traitement aux graines de blé *T. aestivum* L. cv. Alborz, stimule l'élongation des feuilles et des racines et la synthèse des chlorophylles *a* et *b* ; contrairement au traitement par le mutant de la souche déficient en sidéophores (Rasouli Sadaghiani *et al.*, 2008). Ces mêmes auteurs ont également démontré que l'absorption du fer (introduit comme  $Fe_2O_3$ ) par les racines et sa translocation vers les feuilles étaient plus importantes chez les plantes traitées avec le 7NSK2 (*sid*<sup>+</sup>) par rapport aux plantes traitées avec le mutant MPFM1 (*sid*<sup>-</sup>). Ceci indique que les sidéophores du *Pseudomonas* ont augmenté le taux d'assimilation du fer par le blé. La synthèse de sidéophores par les souches stimulatrices XI14 et 29INH a été déjà mise en évidence par Boukhalifa et Madaci (2013) ; et s'est révélée sur milieu gélosé au lait par production de pigments fluorescents (données non incluses).

En outre, les traitements des graines de blé (*T. aestivum* spp. *vulgare* var. Kirik) avec deux souches PGPR fixant l'azote et solubilisant le phosphate ; a significativement augmenté le rendement en graines, la biomasse, l'assimilation et l'accumulation de macro- et de micro-nutriments dans les différentes parties de la plante (Turan *et al.*, 2010). Deux souches *Bacillus* WS29 et WS31 ont significativement stimulé le développement des racines latérales du blé *T. aestivum* var. Wan33 par 34.9% et 27.6%, mais elles ont aussi augmenté le poids sec des plantes par 25 et 25.6% respectivement (Zhang *et al.*, 2012).

Aussi, l'inoculation des plantules de blé *T. aestivum* avec *K. pneumoniae* (Sachdev *et al.*, 2009) et la variété Inqalab-91 avec des souches bactériennes PGP (Khalid *et al.*, 2004 ; Ali *et al.*, 2009) productrices d'AIA, a montré un effet positif sur le poids frais et la longueur des tiges et des pousses (Ali *et al.*, 2009), la longueur des racines et la hauteur des pousses (Sachdev *et al.*, 2009). Les inoculations bactériennes ont également augmenté le nombre de talles, la longueur des épis et le poids des graines obtenus à la récolte (Khalid *et al.*, 2004 ; Ali *et al.*, 2009).

Les composés organiques volatils bactériens, jouent également un rôle dans la promotion de la croissance des plantes. La co-culture des plantules d'*Arabidopsis* avec les souches *B. subtilis* GB03 et *B. amyloliquefaciens* IN937a, a entraîné une augmentation très significative de la surface totale des feuilles. Cette augmentation est due à l'émission du 2,3-butanediol et de l'acétoïne (Ryu *et al.*, 2003).

Une étude comparative des méthodes de traitement des graines a montré que l'enrobage des graines du poivre et du concombre avec les spores de *B. cereus* RS87 ; et leur trempage dans une suspension de cellules végétatives ont favorisé la levée des graines, la longueur des racines et la hauteur des plantes à des taux presque égaux (Jetiyanon *et al.*, 2008). La méthode utilisée dans la présente étude et celle du trempage, il est donc à prouver si de meilleurs résultats peuvent être obtenus en utilisant un type différent de traitement.

La colonisation des racines par les PGPR pourrait être impliquée dans leur pouvoir de stimulation de la croissance. Un traitement combinant des cyanobactéries avec des PGPR fixatrices d'azote (*Azotobacter*) et solubilisant le phosphate (*Pseudomonas*), ayant la capacité à former des biofilm ; a considérablement augmenté la biomasse des plantes de blé (Swarnalakshmi *et al.*, 2013). La croissance de la tomate traitée avec l'isolat *B. pumilus* WP8, colonisateur des racines, s'est significativement améliorée même en présence d'agents pathogènes. L'introduction d'une souche inhibitrice de la formation de biofilm par *B. pumilus* WP8 a entraîné une diminution significative de l'effet promoteur de cette dernière (Kang *et al.*, 2014).

Dans le présent travail, la formation de biofilm n'est pas impliquée exclusivement comme mécanisme de stimulation de la croissance. Les souches ayant la meilleure activité stimulatrice de la croissance du blé, ont en effet, la plus faible capacité de formation de biofilm. Parmi les souches formant le meilleur biofilm, seule la souche *B. subtilis* XI9 avait une capacité significative de formation de biofilm et de promotion de la croissance du blé.

Bien que les souches PGPR aient un potentiel stimulateur de la croissance des plantes, plusieurs travaux ont démontré un effet opposé sur la croissance du blé. Magnucka et Pietr (2015), ont rapporté un effet négatif de deux *Pseudomonas* fluorescents RZ310 et PO366 sur le développement des racines du blé. Cet effet était lié à la densité cellulaire utilisée pour l'inoculation des grains. La souche RZ310 appliquée à des concentrations de  $10^8$  et  $10^6$  cellules dans 1ml, ont réduit l'allongement des racines par 7.4 et 8%, respectivement. Ce qui correspond aux résultats obtenus avec quelques souches dans cette étude telles que *B. pumilus* 37INH et *B. amyloliquefaciens* P35 qui ont diminué la longueur par 75.65 et 65% respectivement par rapport au témoin non traité ; signifiant que la stimulation de la croissance peut dépendre de la densité de la population bactérienne initiale utilisée.

Les composés volatils produits par les bactéries rhizosphériques peuvent exercer des effets contrastés sur la croissance des plantes ; allant de la promotion de la croissance à la destruction des plantes. L'impact de ces substances est bien documenté, cependant, très peu d'informations sur les mécanismes impliqués dans l'altération de la croissance des plantes est disponible (Bailly et Weiskopf, 2012). C'est le cas du blé *T. aestivum* L., cv. Drabant, pour lequel la longueur des feuilles et des racines ainsi que le nombre de racines ont été significativement réduits suite à l'exposition des graines aux COV émis par *P. fluorescens* A112 et *Pseudomonas* sp. A313 (Aström et Gerhardson, 1989).

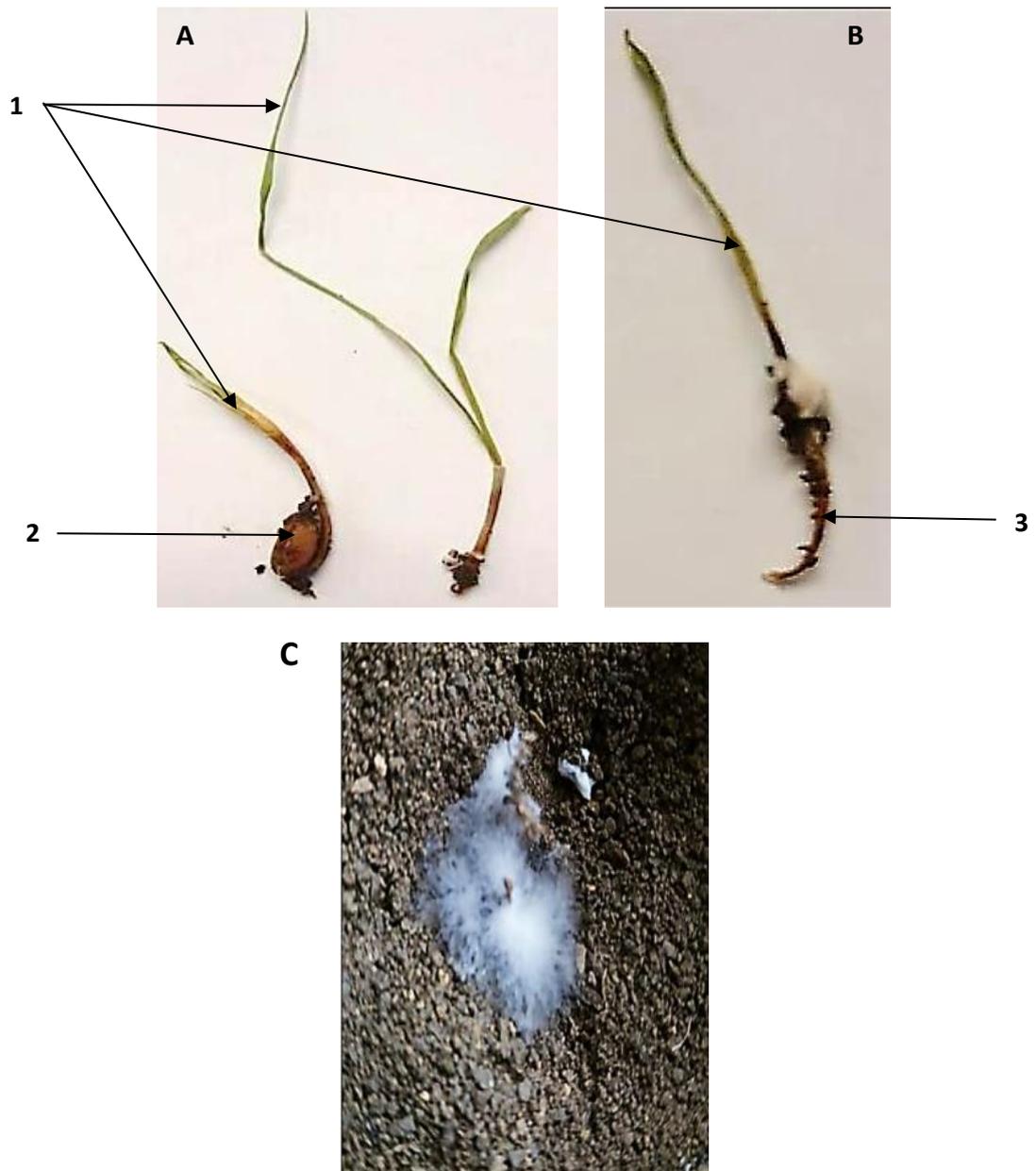
Plusieurs études ont démontré que la phytotoxicité des substances volatiles bactériennes sur *Arabidopsis* est liée à la production du cyanide d'hydrogène (HCN). La souche *P. aeruginosa* PUPa3 isolée de la rhizosphère du riz était moins cyanogène et donc, moins inhibitrice de la croissance d'*Arabidopsis* que la souche clinique *P. aeruginosa* PAO1 (Blom *et al.*, 2011). Alström et Burns (1989), ont également confirmé la contribution de l'HCN produit par *P. fluorescens* S241 dans la diminution de la longueur racinaire et du poids sec de la laitue et du haricot. *P. fluorescens* CHA0 (nommé actuellement *P. protegens* CHA0) provoquerait une diminution significative de la longueur des racines primaires chez *A. thaliana*. Une réduction moins drastique de la longueur a été observée avec le mutant CHA077 déficient en HCN (Rudrappa *et al.*, 2008). Dans le cas de *Serratia odorifera*, l'inhibition de la croissance d'*Arabidopsis* était principalement due à l'émission du diméthylsulfure et de l'ammoniac mais non pas à l'HCN (Kai *et al.*, 2010). Ces résultats ensemble, suggèrent que l'inhibition de la croissance du blé par certaines souches dans ce travail pourrait être due à la production d'une ou de plusieurs substances volatiles inhibitrices.

#### **4.7.2. Protection du blé contre *F. graminearum***

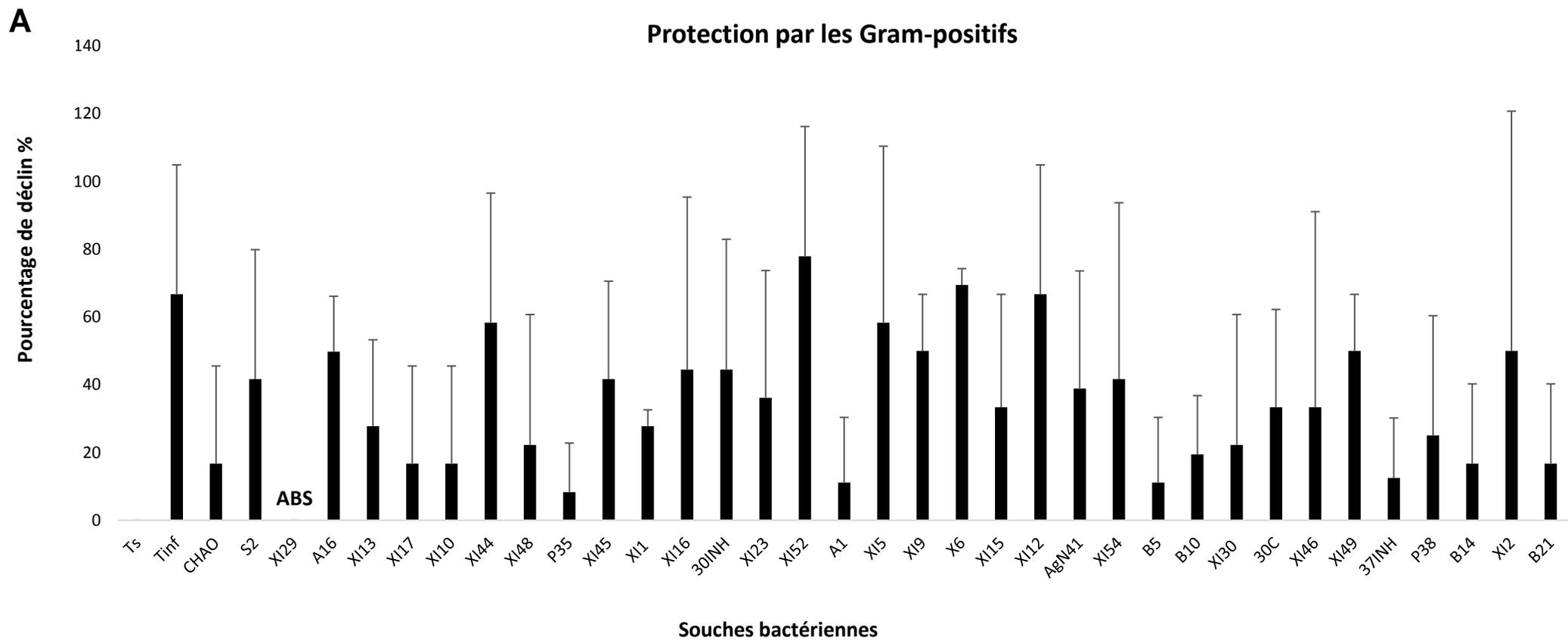
##### **a. Déclin**

La croissance des plantules du blé et le développement des symptômes de la maladie causée par *F. graminearum*, ont été suivis jusqu'à ce que le témoin infecté soit complètement flétri.

Les symptômes de la maladie se sont typiquement manifestés au bout de la période de suivi. Les plantules sont apparues flétries. La partie aérienne a montré des changements de coloration : les feuilles ont montré une chlorose tandis que les tiges sont devenues brunâtres. Les parties souterraines ont été complètement pourries avec une mauvaise odeur caractéristique de la pourriture racinaire. Les racines généralement peu développées, ont été très fragiles et difficiles à extraire ; et les semences infectées sorties du sol, ont perdu leur consistance et sont devenues molles et pouvant s'écraser facilement (symptômes caractéristiques de la fonte des semis, figure 27). Cependant, une protection totale significative des plantules vis-à-vis du pathogène a été obtenue avec les souches à Gram négatives *P. protegens* XI11 et *Pseudomonas* sp. (P37 et XI3) ; étant plus protectrices que la souche de référence CHA0, qui a montré 72% de plantules saines (Figures 28A et 28B).



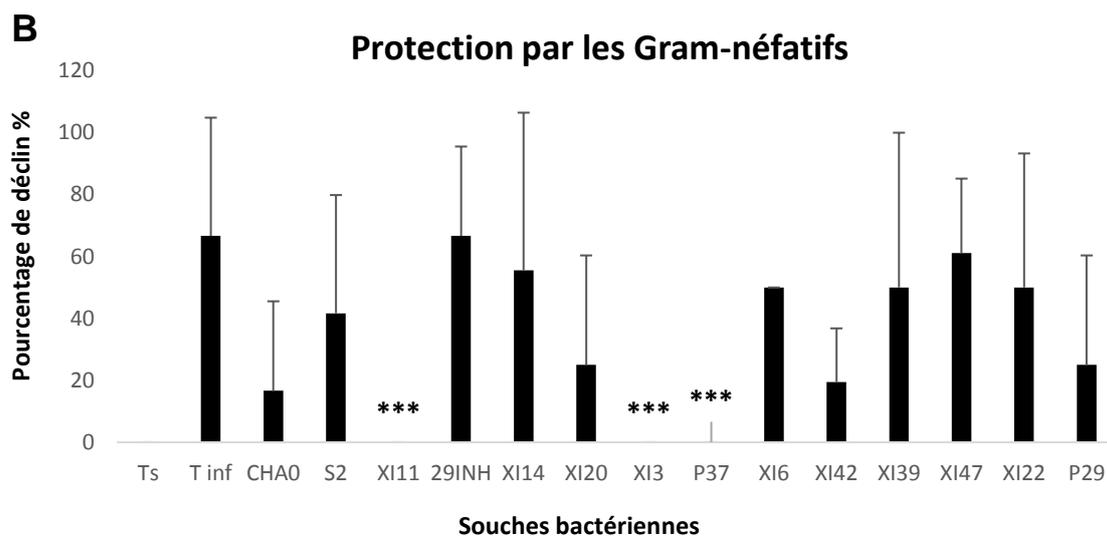
**Figure 27.** Symptômes causés par *F. graminearum* sur les plantules de blé.  
 (A) et (B) plantules flétries, (1) feuilles flétries, (2) fonte des semis, (3) racines pourries (purriture racinaire) ;(C) plantule non développée envahie par le mycélium fongique.



**Figure 28.** Taux de déclin enregistré après inoculation par *F. graminearum* chez les plantules de blé traitées avec les Gram-positifs (A).

ABS : absence totale de croissance

\*\*\* Protection significative ( $p < 0.05$ )



**Figure 28.** Taux de déclin enregistré après inoculation par *F. graminearum* chez les plantules de blé traitées avec les Gram-négatifs (B).

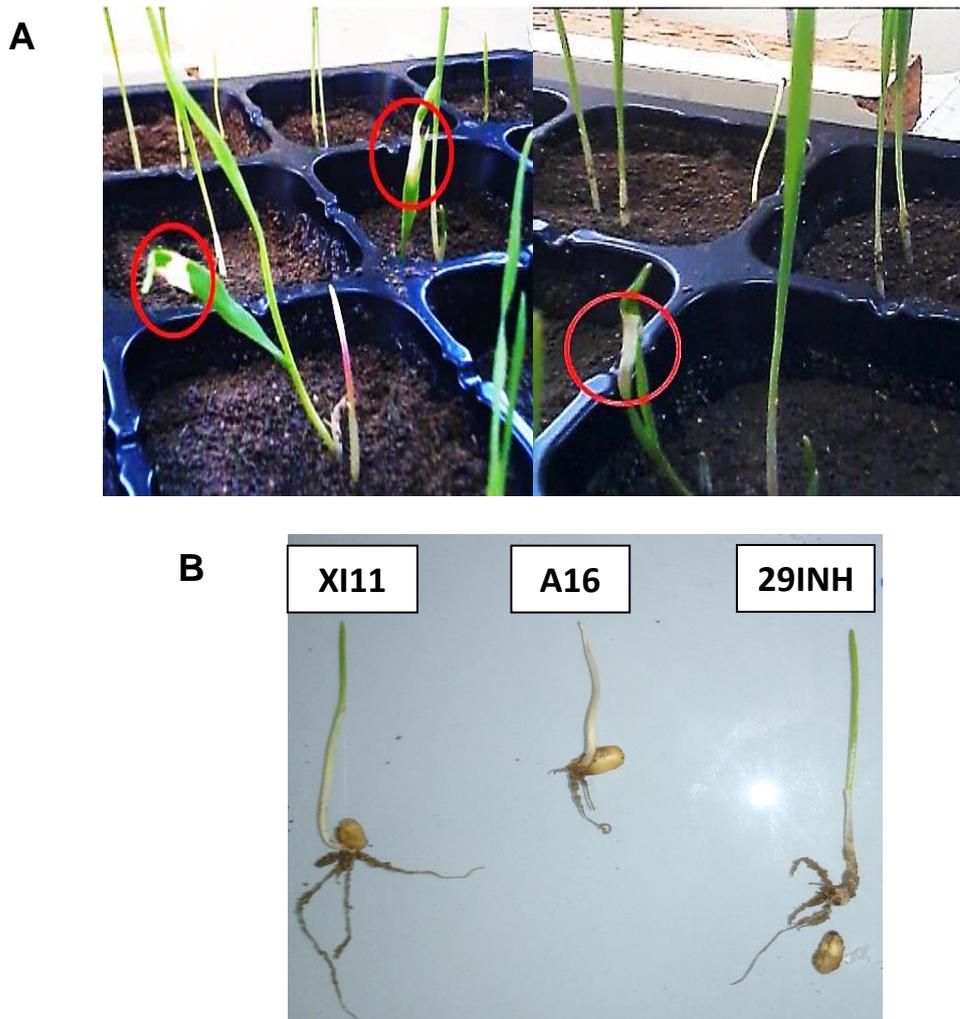
ABS : absence totale de croissance

\*\*\* Protection significative ( $p < 0.05$ )

### ***b. Infection***

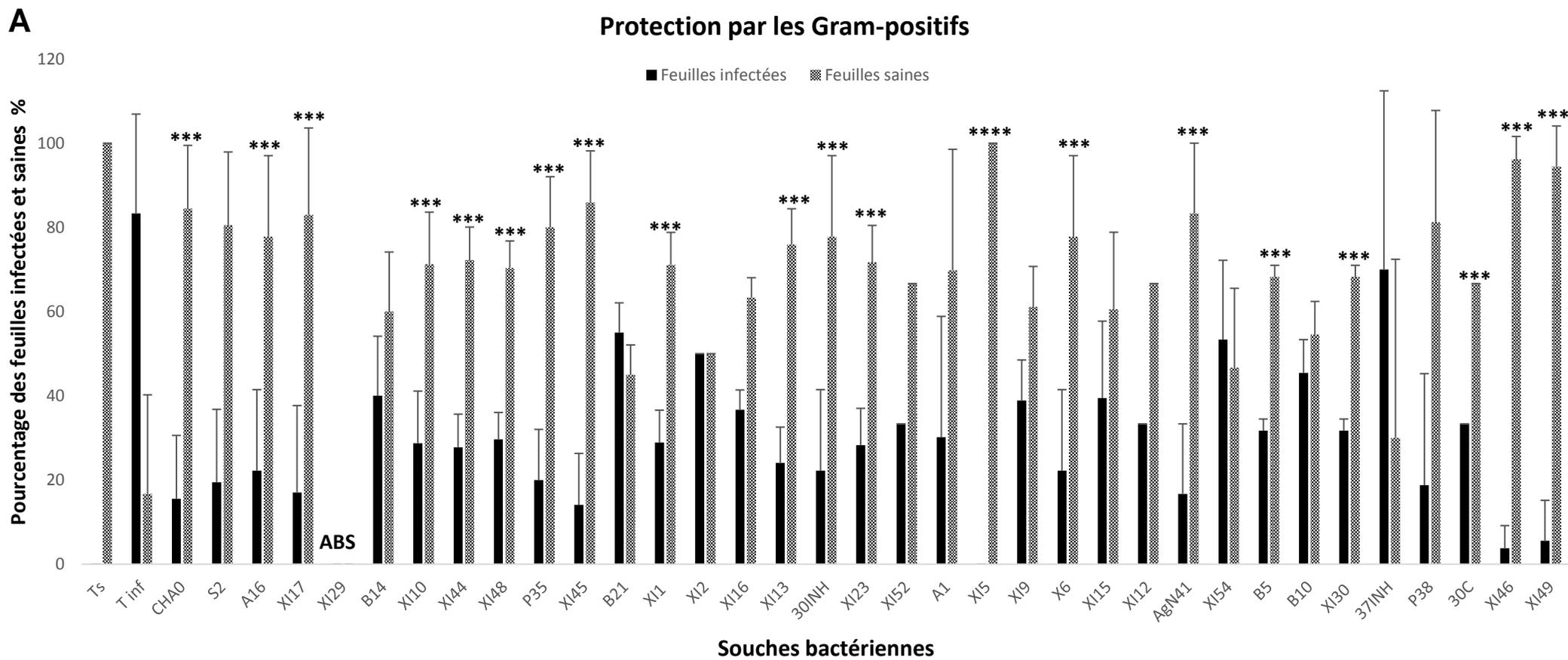
Le pourcentage des feuilles infectées et saines, a été calculé chez les plantules survivantes après élimination des plantules fanées. Les feuilles infectées ont présenté des chloroses caractéristiques de la brûlure des semis du blé ou « seedling blight », dans la plupart des cas, à l'extrémité de la feuille (Figure 29).

Certaines souches ont diminué l'incidence de la maladie à des taux significativement plus élevés que ceux enregistrés avec la souche de référence *P. protegens* sp. nov. CHA0. Parmi les plantules traitées avec XI5 et qui ont survécu, toutes les feuilles sont apparues saines. Les isolats Gram-positifs XI46, XI49, XI45, XI44, XI1, XI48, XI17, P35, A16, 30INH, X6, XI13, XI10, XI23, B5 et XI30 et le Gram-négatif XI42 ont significativement atténué les symptômes de l'infection chez les plantules de blé, avec les taux de diminution de l'incidence compris entre 95.45 et 60 % (Figures 30A et 30B).



**Figure 29.** (A) Symptômes de la brûlure des semis sur les feuilles infectées, (B) comparaison entre une plantule saine (traitée avec *P. protegens* XI11) et des plantules atteintes (traitées avec *B. amyloliquefaciens* A16 et *P. plecoglossicida* 29INH).

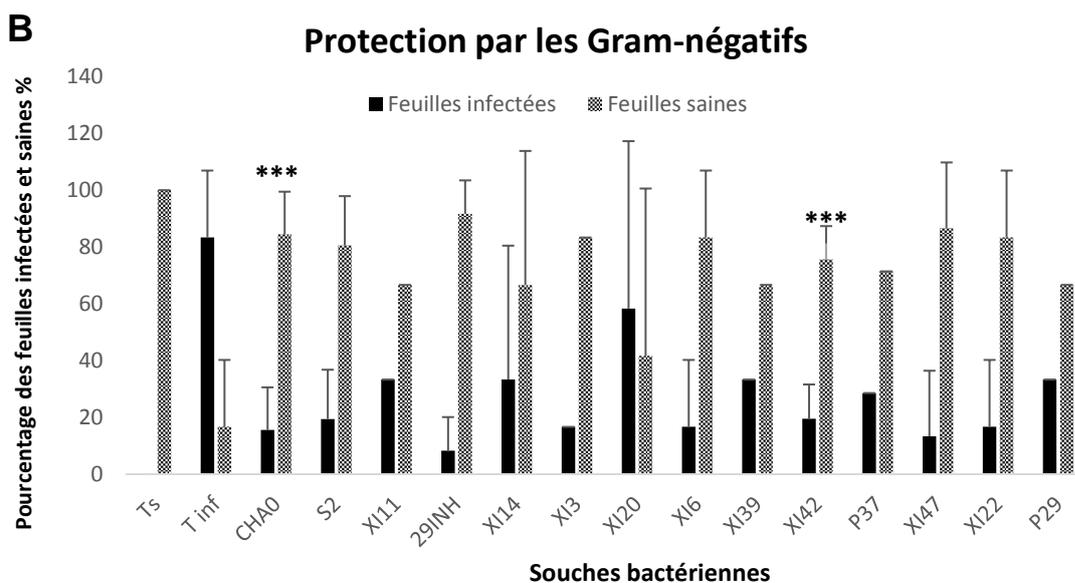
Le *F. graminearum* est cosmopolite. Bien qu'il est principalement retrouvé sur le blé, le maïs et l'orge, il peut également se produire sur d'autres hôtes annuels et pérennes (Wegulo *et al.*, 2008). Le champignon, en plus la brûlure des semis et des épis (seedlings and head blight) du blé, provoque différentes autres maladies des semences et des semis (Obanor *et al.*, 2013). L'incidence et la gravité de la maladie de la pourriture des racines ainsi que l'état final du semis (final seedlings stand), augmentent avec l'augmentation de la concentration de l'inoculum du *F. graminearum* (Wang *et al.*, 2006).



**Figure 30.** Pourcentage des feuilles infectées et non-infectées issues des plantes infectées après inoculation avec des rhizobactéries Gram-positives (A).

ABS : absence totale de croissance

\*\*\* Protection significative ( $p < 0.05$ )



**Figure 30.** Pourcentage des feuilles infectées et non-infectées issues des plantes infectées après inoculation avec des rhizobactéries Gram-négatives (B).

ABS : absence totale de croissance

\*\*\* Protection significative ( $p < 0.05$ )

Actuellement, les traitements des semences de blé avec des souches bactériennes se sont révélés efficaces pour lutter contre la brûlure des semis. Les bactéries antagonistes peuvent diminuer la toxicité de *F. graminearum*. Les surnageants de cultures bactériennes de *B. amyloliquefaciens* ont diminué la production de mycotoxines par *F. graminearum* sur les graines de blé (Shi *et al.*, 2014).

Dans un sol contaminé avec *F. graminearum*, le taux de germination des semences et l'émergence de semis très sensible de *T. aestivum* cv. Norm ont augmenté par 20 et 62% respectivement après enrobage des graines dans une suspension bactérienne de *B. mojavensis*. Cette dernière a causé des zones mycéliennes nécrotiques aux points de contact des bactéries avec la colonie fongique du pathogène, qui s'étendaient en prolongeant la durée du contact (Bacon et Hinton, 2007).

Par ailleurs, la souche PGPR *P. fluorescens* MAA10 est plus efficace que *B. subtilis* MAA3 dans le contrôle de la pourriture des racines chez *T. aestivum* cv. Tabuki causée par *F. graminearum* (Moussa *et al.*, 2013). Ces mêmes résultats ont été obtenus dans l'étude conduite sur la brûlure des semis causée par *F. graminearum* sur les épillets du blé ; les souches de *Pseudomonas* étaient plus actives que les *Bacillus* (Hu *et al.*, 2014).

En outre, la performance des souches de biocontrôle *in vitro* peut différer complètement des essais *in vivo* (Jetiyanon et Kloepper, 2002). Ceci concorde bien avec les résultats de la présente étude. Les souches à Gram-positif ont été moins efficaces contre le champignon *in vivo*, en comparaison avec leur activité antifongique *in vitro*. En revanche, les souches Gram-négatives ayant une activité inhibitrice restreinte *in vitro*, ont efficacement protégé les plantules du blé et ont diminué l'incidence de la fusariose causée par *F. graminearum*.

*P. fluorescens* MAA10 et *B. subtilis* MAA3 ont, d'une part, significativement augmenté les pourcentages quotidien et final de la germination des graines de blé en présence du pathogène ; et elles ont, d'autre part, diminué les pourcentages de l'infection (Moussa *et al.*, 2013). Ces mêmes auteurs, ont conclu que l'enrobage de la graine avec la suspension des bactéries antagonistes était le meilleur mode de traitement, puisque le pourcentage final et le temps moyen d'infection ont été nuls après traitement avec MAA10 ; suivi du traitement par trempage des graines et enfin l'arrosage du sol par la suspension.

Le trempage des épillets détachés de *T. aestivum* cv. Celtic dans les suspensions de cinq *Paenibacillus polymyxa*, a réduit l'incidence de la brûlure de l'épi (head blight) causée par *F. graminearum* avec  $\geq 70\%$  (He *et al.*, 2009). Vu que la méthode utilisée dans le présent travail est celle du trempage, des essais ultérieurs pourraient être réalisés par enrobage des graines afin de comparer les résultats et déterminer le meilleur type de traitement et l'isolat le plus performant.

Le potentiel antifongique de la souche *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* Pcho10 vis-à-vis de *F. graminearum* a été mis en évidence *in vitro*. La phénazine a été identifiée comme étant responsable de l'activité antifongique de la souche (Hu *et al.*, 2014). Ici, la souche 2 (*P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*) a réduit l'incidence de la pourriture racinaire causée par 38%. Cette souche a été précédemment démontré comme productrice de phénazines (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012 et 2013a).

Les cLPs des Gram-positifs jouent un rôle dans le biocontrôle de *F. graminearum*. L'iturine A produite par *B. amyloliquefaciens* JCK-12 a entraîné l'inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des spores du pathogène. La surfactine et la fengycine produites par la même souche n'avaient aucun effet sur les spores, par contre le mélange des deux cLPs avec l'iturine A a augmenté le pouvoir inhibiteur de cette dernière. L'examen microscopique du mycélium après application de l'extrait bactérien contenant les cLPs, a révélé un gonflement des hyphes, des cellules ballonnées, des altérations de la paroi et de la membrane plasmique des hyphes. Les cLPs ont augmenté la perméabilité de la membrane, rendant *F. graminearum* plus susceptibles aux autres agents antifongiques (Kim *et al.*, 2017).

Une autre étude a démontré l'implication de la bacillomycine D et la fengycine de *B. amyloliquefaciens* FZB42 dans la suppression du *F. graminearum* (Gu *et al.*, 2017). La bacillomycine D a également inhibé la germination des spores et a causé des déformations morphologiques des hyphes et des conidies similaires à ceux notés par Kim *et al.* (2017). Dans le présent travail, de faible taux de mortalité et d'infection ont été enregistrés avec des souches Gram-positives hébergeant les gènes de la bacillomycine D, de la surfactine et la fengycine ensembles ou hébergeant la bacillomycine D et la fengycine. Ceci pourrait être dû aux effets exercés sur l'agent pathogène par ces lipopeptides.

La formation de biofilm est un paramètre impliqué dans le biocontrôle exercé par *B. subtilis* contre l'infection des racines d'*Arabidopsis* par *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Bais *et al.*, 2004). Ici, des taux de déclin et d'infection considérablement faibles, ont été obtenus avec des souches ayant des capacités significatives de formation de biofilm ; à savoir : A1, B14, A16 et XI45. Ces souches, également abritent les gènes de la surfactine, fengycine et la bacillomycine ; indiquant la possibilité d'une synergie entre les deux mécanismes (la colonisation des racines par formation de biofilm et la production de lipopeptides) dans le biocontrôle de *F. graminearum* par ces souches. En outre, ces dernières ont précédemment montré des taux d'inhibition allant de 38 à 54% et de 42 à 63% vis-à-vis de *Fusarium* sp. 2 et *Fusarium* sp. 29, respectivement (Challal et Attar, 2016).

Les PGPR ont également montré leur efficacité contre *F. graminearum in situ*. L'inoculation des épillets de blé cultivar Baguette 9 avec les antagonistes *B. megaterium* BM1 et *B. subtilis* BSM2 et BSM0, a réduit l'incidence de la brûlure des épis. Aussi, les filtrats bactériens traités à la chaleur ont eu le même effet protecteur. Ceci suggère l'implication de métabolites secondaires thermostables dans l'induction de la résistance chez Baguette 9 par les souches antagonistes (Pan *et al.*, 2015). La souche *Streptomyces* sp. 3 avait un double effet sur le blé. En plus de l'induction de la résistance et la protection contre *F. graminearum* ; elle a même amélioré la croissance des plantes en présence du pathogène (Nourozian *et al.*, 2006).

L'activation de la SAR par l'intermédiaire de *P. syringae* pv. *tomato* avirulent a protégé *Arabidopsis* contre *F. graminearum*. L'inoculation des feuilles de la plante avec le pathogène a entraîné l'accumulation du SA endogène et l'expression du *pr1*, signifiant l'activation de la voie de signalisation dépendante du SA par *F. graminearum*. L'incidence de la maladie était réduite chez les mutants d'*Arabidopsis* exprimant constitutivement le *pr1*, mais elle a été sévère chez les mutants : *npr1-1* déficient en NPR1, *sid2* non producteur et *NahG* non accumulateur de l'acide salicylique (Makandar *et al.*, 2010).

L'application de l'AS exogène a également diminué la sévérité de la brûlure des épis chez *T. aestivum* cv. Roblin, et a induit l'expression des gènes de défense *pr1*, *pr4* et *npr1* dépendants de l'AS (Qi *et al.*, 2012). La sévérité de la maladie a été également réduite chez les plantes de blé traitées avec l'AS et chez le blé exprimant le At-NPR1 (NPR1 issu d'*A. thaliana*) mais elle était plus élevée chez le blé exprimant la salicylate hydroxylase (codée par *NahG* ; Makandar *et al.*, 2012). Ensemble, ces résultats confirment l'implication de la voie de l'acide salicylique dans le contrôle de *F. graminearum* chez *Arabidopsis* et le blé. Ici, Les souches qui ont été précédemment testées pour l'induction des gènes impliqués dans la voie du salicylate, et plus particulièrement la souche *B. pumilus* B10, a considérablement réduit le taux de déclin dû au *F. graminearum* par 70%.

## **4.8. Dégradation des fongicides**

### ***a. Survie***

Une variabilité significative de la croissance des souches testées a été observée selon le fongicide considéré. Toutes les souches testées ont été capables à croître dans le bouillon nutritif ajouté de vapcotop (Thiophanate), tandis que 32, 29 et 23 souches ont pu croître en présence du kazir (Dithio-carbamates), de la curatine V (Dithio-carbamates+Acétamides) et du propicone (Benzimidazole) respectivement.

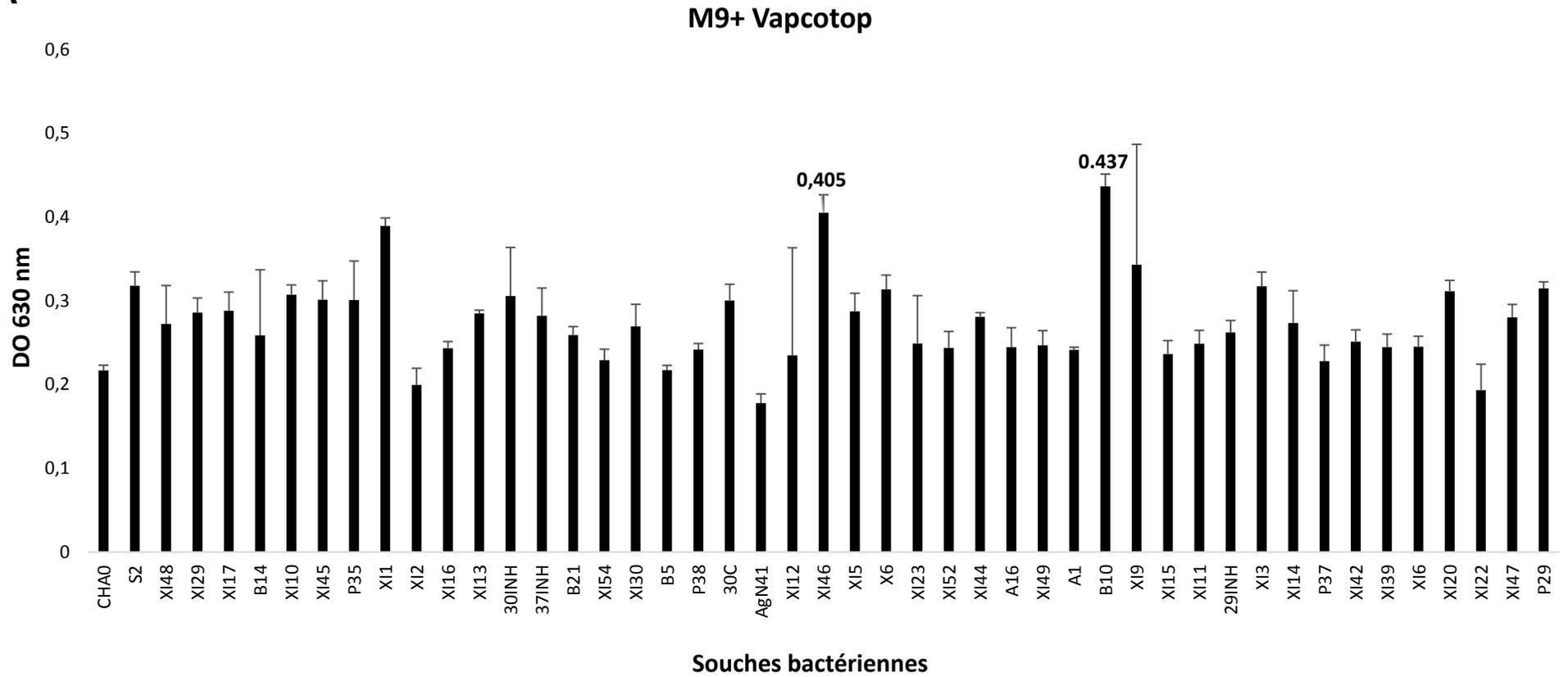
Les isolats Gram-positifs ont été plus sensibles que les Gram-négatifs. Ces derniers ont pu atteindre des taux de croissance considérables en présence des quatre fongicides, plus précisément la souche *Pseudomonas* sp. XI20. En plus de cette dernière, les isolats Gram-positifs *B. amyloliquefaciens* 30INH, *B. subtilis* XI9, *B. pumilus* (B10 et 37INH) et AgN41 ont également pu résister aux quatre fongicides (Annexe VI)

### ***b. Dégradation***

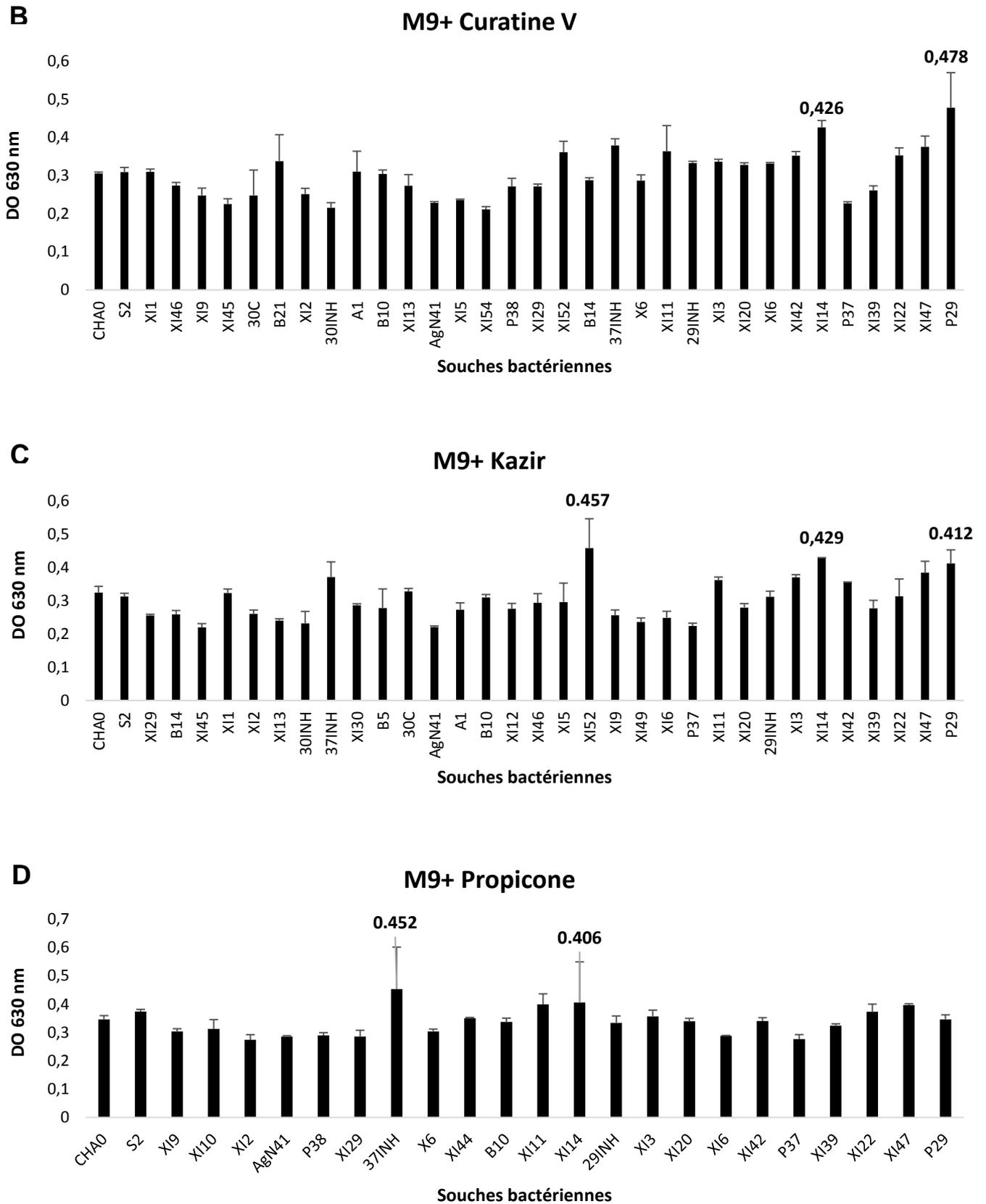
Contrairement aux résultats précédents, la croissance de la majorité des isolats a été inhibée dans le milieu minimal contenant les fongicides comme seules sources de carbone. Parmi les Gram-positives, les souches *B. amyloliquefaciens* XI46 et *B. pumilus* B10 ont pu dégrader le vapcotop (Thiophanate). *B. pumilus* 37INH est la seule pouvant dégrader le propicone et *B. subtilis* XI52 est la seule dégradant le kazir (Dithio-carbamates). Aucun des Gram-positifs n'a pu dégrader la curatine V (Dithio-carbamates+Acétamides). Par ailleurs, uniquement deux souches à Gram-négatif ont pu résister et ont poussé à des taux détectables. Il s'agit de : *S. maltophilia* P29 pouvant dégrader la curatine V et le kazir, et *P. protegens* XI14 qui a dégradé les trois fongicides : propicone (Benzimidazole), curatine V et kazir (Annexe VI; figures 31A-D).

La dégradation microbienne accélérée est le nom couramment donné au phénomène associé à une augmentation significative du taux de la dégradation d'un pesticide dans le sol après une application antérieure du même pesticide. Ce phénomène est apparemment causé par une adaptation d'une ou plusieurs espèces de microorganismes présents dans le sol pour métaboliser le pesticide. De plus, l'augmentation du taux d'application peut augmenter la population de dégradeurs de pesticides, ce qui entraînerait un taux de dégradation encore plus élevé (Arbeli et Fuentes, 2007).

A



**Figure 31.** Croissances bactériennes sur milieu minimum (M9) additionné des fongicides : (A) Vapcotop.



**Figure 31.** Croissances bactériennes sur milieu minimum (M9) additionné des fongicides :  
(B) Curatine V, (C) Kazir et (D) Propicone.

Le bénomyl (matière active du propicône) est connu pour être l'un des fongicides les plus influencé par la dégradation microbienne accélérée. L'application du composé même à de faibles doses est suffisante pour conditionner le sol à la dégradation accélérée (Yarden *et al.*, 1987).

Le carbendazime, une autre molécule active du propicône (Benzimidazole), est un fongicide à large spectre utilisé contre les pathogènes fongiques des céréales et des fruits (Pattanasupong *et al.*, 2004). Le processus de dégradation bactérienne de ce fongicide est très lent (Helweg, 1977). Ce même auteur a rapporté que seulement 5% du carbendazime ont été récupérés du sol non stérile comparant à 50% récupérés du sol stérile. Durant ce processus, le fongicide est converti en 2-aminobenzimidazole par les bactéries du sol (Helweg, 1977 ; Cycoń *et al.*, 2011). Des souches appartenant aux différents genres bactériens sont capable de dégrader le carbendazime telles que *B. subtilis* (Salunkhe *et al.*, 2014), *B. licheniformis* (Panda *et al.*, 2017), *Stenotrophomonas* sp. et *Ochrobactrum* sp. (Conceição dos Santos *et al.*, 2017).

D'autre part, *Enterobacter* sp. TDS-1 et *Bacillus* sp. TDS-2 ont efficacement dégradé le méthyl thiophanate (molécule active du vapcotop). L'incubation des deux souches dans un milieu minimal salin supplémenté du fongicide a engendré la diminution de la dose jusqu'à 77% par *Bacillus* sp. TDS-2 et jusqu'à 60% par *Enterobacter* sp. TDS-1 (Cycoń *et al.*, 2011). Ici, les souches à Gram-positif (*B. pumilus* B10 et 37INH) ont efficacement dégradé le vapcotop (Thiophanate) et le propicône (Benzimidazole) respectivement.

L'application du mancozèbe (matière active de la curatine V et du kazir) réduit la population des bactéries, des champignons et des actinomycètes. Le mancozèbe influence les processus de la fixation aérobie et de la minéralisation de l'azote, et donc altère le cycle d'azote et inhibe la population qui y est impliquée (Doneche *et al.*, 1983 ; Pozo *et al.*, 1994).

Par contre, la présence du manèbe (matière active du kazir) dans le sol améliore la microflore fongique, et les populations des bactéries diazotrophes et nitrifiantes (Pozo *et al.*, 1994). Dans le présent travail, deux souches à Gram-négatif : XI14 et P29 ont pu dégrader les deux fongicides kazir (Dithio-carbamates) et curatine V (Dithio-carbamates+Acétamides) ; cela peut être expliqué par le fait que les deux composés contiennent une matière active commune (mancozèbe).

Une dégradation complète du mancozèbe a été observée 90 jours après traitement du sol contaminé avec des souches du genre *Bacillus*. Les résidus du mancozèbe ont été éliminés du sol et les populations indigènes ont repris leur croissance (Doneche *et al.*, 1983). Ici, une seule souche à Gram-positif (*B. subtilis* XI52) était capable de le dégrader.

#### 4.9. Pathogènes humains en tant que PGPR

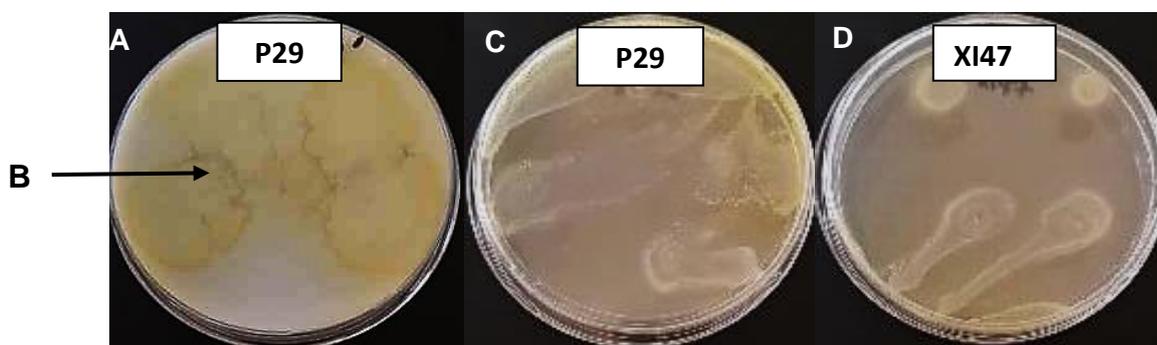
Trois isolats de la collection des trois bactéries ont été identifiés comme des espèces pathogènes de l'homme. Les environnements associés aux plantes peuvent servir de niche pour les bactéries pathogènes opportunistes de l'homme et de l'animal, telles que *Hafnia*, *Stenotrophomonas* (Ouzari *et al.*, 2008) et *Acinetobacter* (Sarode Prashant *et al.*, 2009).

##### 4.9.1. Activité hydrolytique

Aucune des souches n'a pu croître en présence de la chitine comme seule source de carbone ; signifiant l'absence d'enzymes hydrolysant la chitine. La souche P29 est la seule productrice de protéases sur milieu au lait, par contre les lipases hydrolysant le tween 80 ont été produites par P29 et XI47 (Tableau XI, figure 32).

**Tableau XI.** Activité enzymatiques des trois souches pathogènes.

<i>Souches</i>	<i>Enzymes</i>		
	<i>Protéases</i>	<i>Chitinases</i>	<i>Lipases</i>
<i>A. calcoaceticus</i> XI22	-	-	-
<i>H. alvei</i> XI47	-	-	+
<i>S. maltophilia</i> P29	+	-	+



**Figure 32.** Production d'enzymes lytiques par les souches pathogènes sur milieux spécifiques.

(A) Protéases par P29, (B) halo transparent autour de la colonie, (C) et (D) lipases par P29 et XI47.

#### 4.9.2. Activités antifongiques

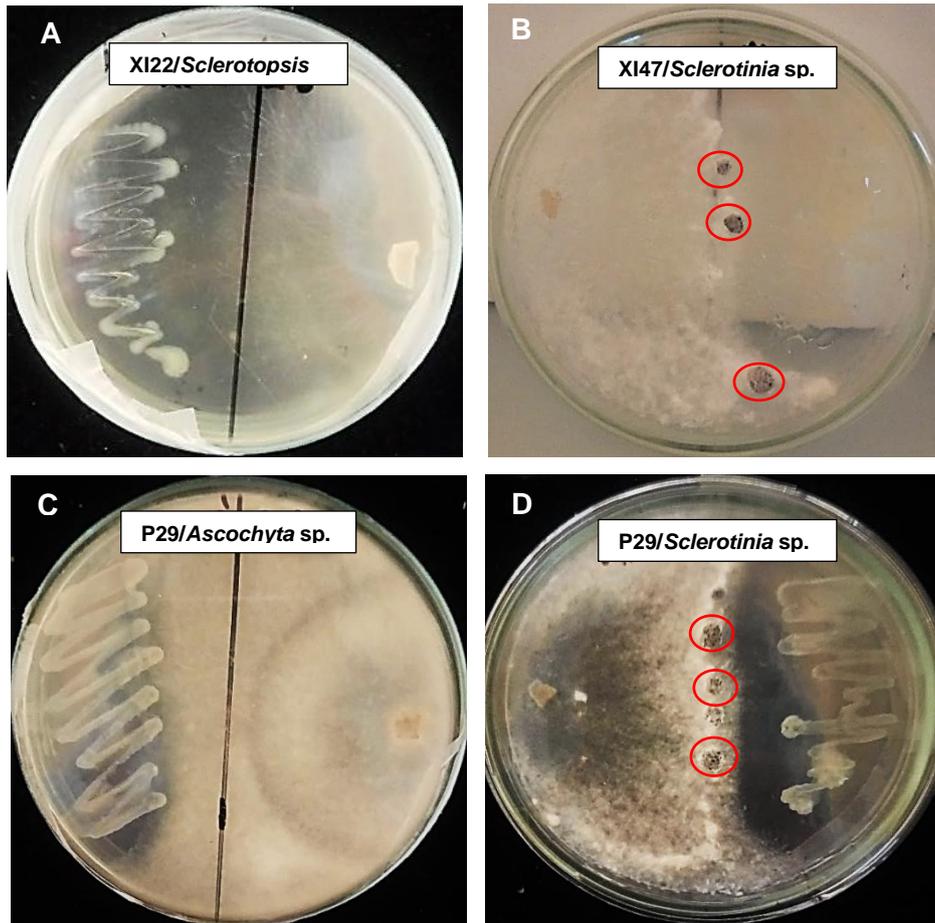
##### a. Par confrontation directe

La souche *H. alvei* XI47 est la plus active contre les champignons résistants aux fongicides. Elle a pu inhiber la croissance de 5 souches à des taux significatifs ; suivie de *S. maltophilia* P29 qui a inhibé quatre champignons et finalement l'*A. calcoaceticus* XI22 ayant inhibé deux souches fongiques.

Aucune des souches n'a un effet significatif sur le *Fusarium* sp. 2, contrairement au *Sclerotopsis* sp. qui a été inhibé par les trois isolats, où le taux d'inhibition le plus significatif est celui enregistré avec XI22 (51.10%). La XI47 est la seule ayant une activité inhibitrice significative contre *Stiebium* sp. et *Fusarium* sp. 29 (28.51 et 32 % respectivement) ; mais n'ayant pas d'effet significatif contre *Sporonema* sp. L'inhibition la plus significative contre *Sclerotinia* sp. et *Ascochyta* sp. ont été obtenue avec XI47 (40.22 et 30% respectivement) et par P29 (34 et 33% respectivement ; Figures 33 et 34). Aussi, l'apparition des sclérotés a été observée au niveau des zones de contact des souches P29 et XI47 (ou leurs métabolites) avec le mycélium de *Sclerotinia* sp. (Figure 33).

Une souche d'*Acinetobacter* sp. a montré une activité antifongique vis-à-vis de deux espèces de *Sclerotinia*, mais elle était inactive vis-à-vis de *F. solani* (Oedjijono *et al.*, 1993). D'autre part, il a été démontré que le pouvoir inhibiteur d'*A. calcoaceticus* sur *F. oxysporum* dans un milieu limité en fer, est due à la production de sidérophores (Sarode Prashant *et al.*, 2009 ; Rokhbakhsh-Zamin *et al.*, 2011). Ceci correspond aux résultats obtenus sur milieu PDA, où les souches de *Fusarium* étaient résistantes alors que *Sclerotinia* était partiellement inhibé par la souche XI22.

Kamal *et al.* (2015) ont démontré que l'inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des sclérotés de *Sclerotinia sclerotiorum* par *B. cereus* (SC-1 et P-1) et *B. subtilis* W-67 est due à la production des substances diffusibles ainsi qu'aux composés volatils.

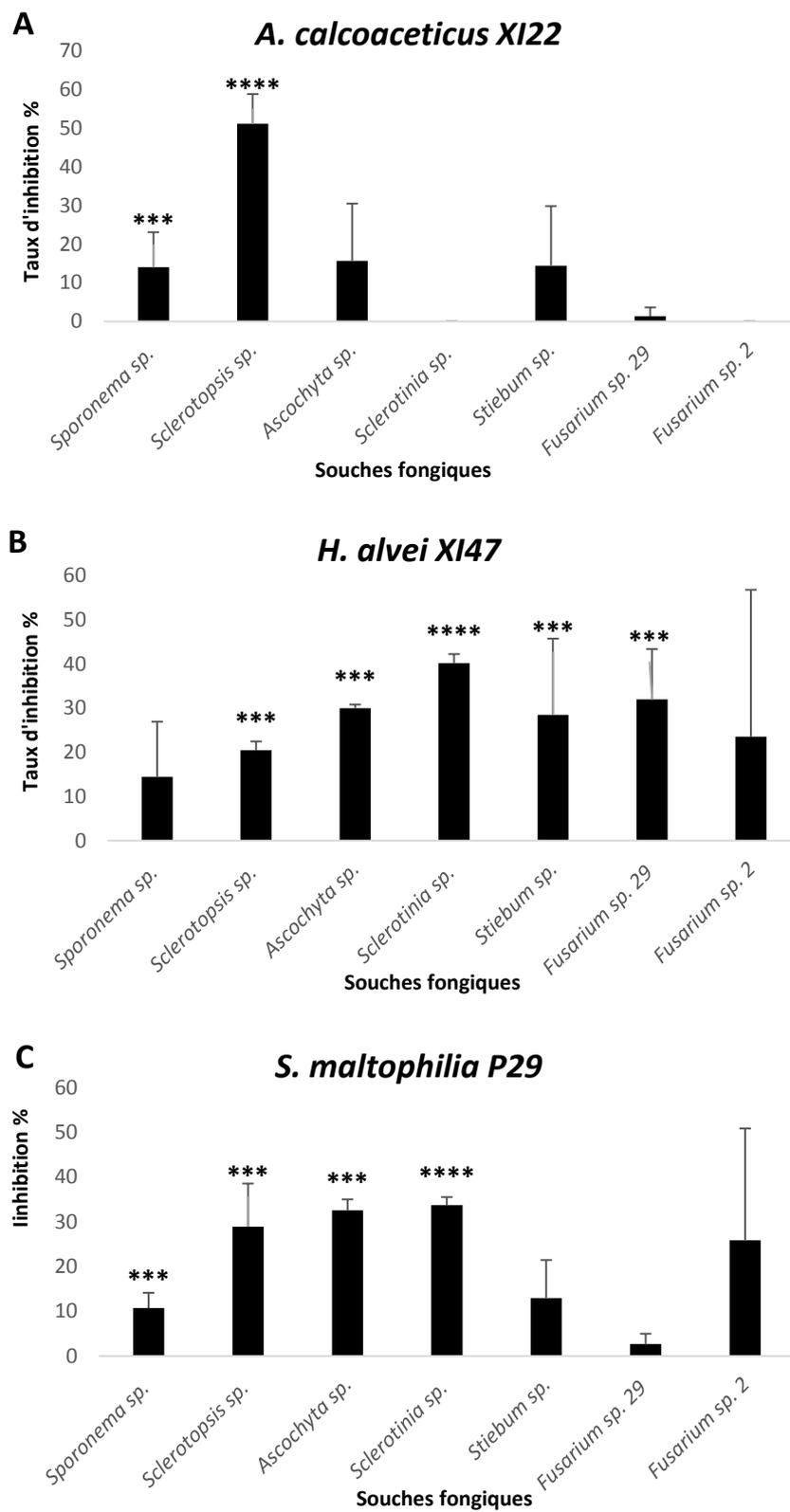


**Figure 33.** Activité antifongique par confrontation directe des souches pathogènes contre des champignons résistants aux fongicides.

(A) *A. calcoaceticus* XI22 contre *Sclerotopsis* sp., (B) *H. alvei* XI47 contre *Sclerotinia* sp. et (C, D) *S. maltophilia* P29 contre *Ascochyta* sp. et *Sclerotinia* sp., respectivement. Cercles rouge : sclérotés.

De nombreuses rhizobactéries synthétisent des enzymes hydrolytiques extracellulaires impliquées dans l'hydrolyse des composants de la paroi fongique tels que les chitinases hydrolysant la chitine, les protéinases hydrolysant les protéines et les cellulases qui dégradent la cellulose. Ces enzymes ont donc un potentiel pour inhiber les phytopathogènes (Pal et McSpadden Gardener, 2006).

Le pouvoir inhibiteur des souches d'*Acinetobacter* sur *F. oxysporum* est dû à la production de la lipase et de l'amylase dégradant la paroi fongique, mais non pas aux protéases (Singh et Varma, 2015). L'absence d'inhibition par l'isolat XI22 contre les souches de *Fusarium* sp. 2 et 29 pourrait être expliquée par l'absence d'enzymes lytiques.



**Figure 34.** Inhibition de la croissance des souches fongiques résistantes aux fongicides par les isolats pathogènes.

(A) *A. calcoaceticus* XI22, (B) *H. alvei* XI47 et (C) *S. maltophilia* P29.

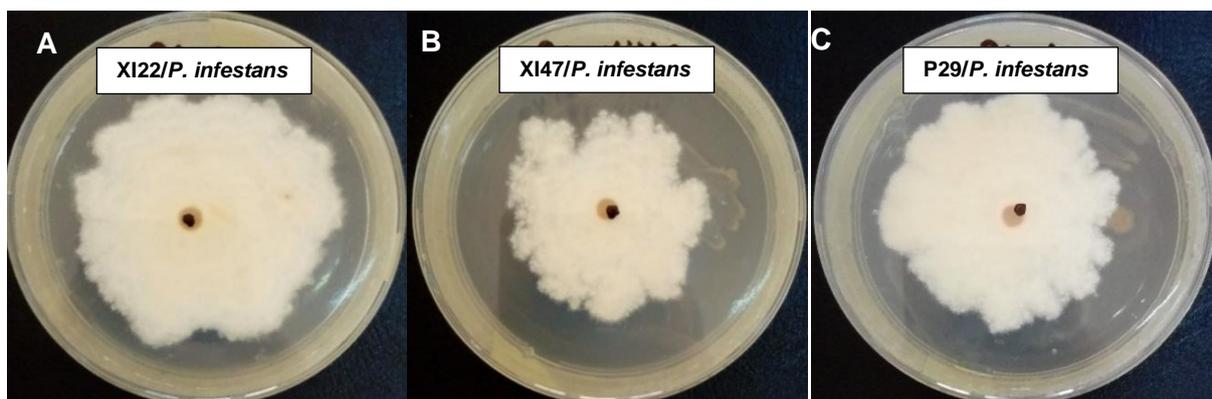
\*\*\* Inhibition significative ( $p < 0.05$ )

Les souches XI47 et P29 productrices de lipases sont actives contre *Fusarium* sp. 2 et 29, et ont précédemment montré des taux d'inhibition respectifs de 71% et 50% contre *F. solani* var. *coeruleum* et de 71% et 61% contre *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (Lahrache et Boulekfouf, 2014). Ces deux isolats ont également montré une inhibition complète de la germination des spores de ces derniers pathogènes (Benslim *et al.*, 2016).

Cependant, l'activité antifongique de *S. maltophilia* W81 vis-à-vis de *P. ultimum* semble être strictement liée à la production de protéases. L'incubation du oomycète avec les filtrats bactériens de la souche sauvage ou de son mutant non producteur de chitinase, a entraîné la lyse des hyphes et l'arrêt de la croissance fongique sur boîte (Dunne *et al.*, 1997). Il a été précédemment démontré que la souche *S. maltophilia* P29 productrice de protéases a inhibé la croissance mycélienne de *P. infestans* par 39% (Lahrache et Boulekfouf, 2014).

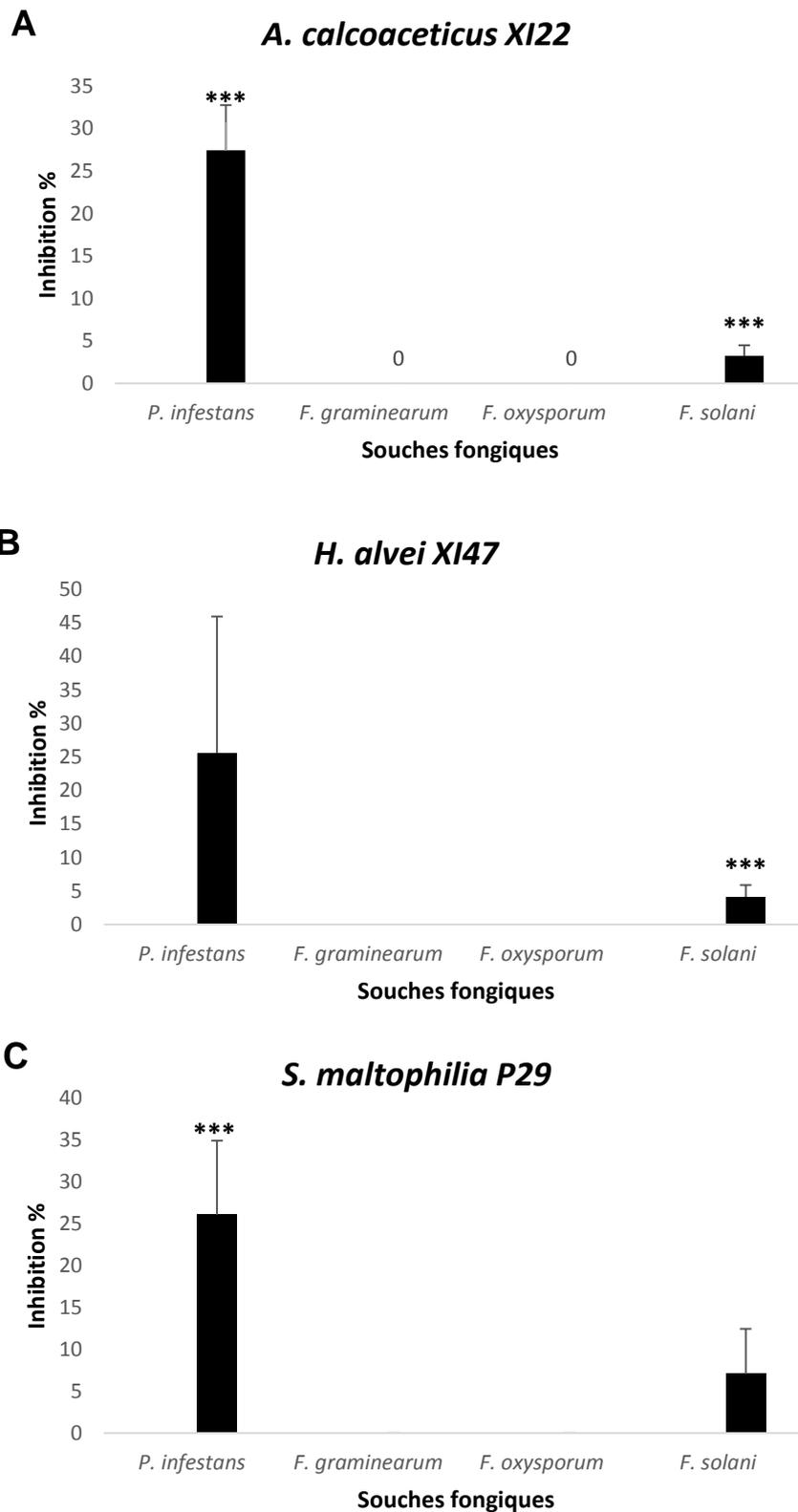
*b. Par production de substances volatiles*

Les trois souches pathogènes n'ont pas inhibé la croissance de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* et de *F. graminearum*, par contre, elles ont inhibé la croissance de *P. infestans* à des taux considérables. La souche XI22 a inhibé la croissance de l'oomycète par 27.44%, suivie de P29 par 26.07% et XI47 par 25.58% ; ceux obtenus avec XI22 et P29 étant statistiquement les plus significatifs. Cependant, l'effet des souches vis-à-vis de *F. solani* var. *coeruleum* était très faible (entre 3 et 7% ; Figures 35 et 36)



**Figure 35.** Activité antifongique par confrontation indirecte des souches pathogènes contre *P. infestans*.

(A) *A. calcoaceticus* XI22, (B) *H. alvei* XI47 et (C) *S. maltophilia* P29



**Figure 36.** Inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par production de substances volatiles.

(A) *A. calcoaceticus* XI22, (B) *H. alvei* XI47 et (C) *S. maltophilia* P29

\*\*\* inhibition significative ( $p < 0.05$ )

Des études ont démontré que les espèces *F. solani* et *F. culmorum* étaient résistantes aux composés volatils émis par les espèces de *Stenotrophomonas* (Vespermann *et al.*, 2007 ; Kai *et al.*, 2008). Aussi, *F. oxysporum* était moins sensible aux COV émis par des souches de *Pseudomonas* par rapport au *P. infestans* qui était complètement inhibé (Hunziker *et al.*, 2015). Ces résultats correspondent à ceux obtenus dans la présente étude, puisque la souche P29 n'a pas inhibé ou a faiblement inhibé la croissance des *Fusarium* testés.

L'activité antagoniste de *S. maltophilia* CR71 contre *B. cinerea* n'est pas due à des composés diffusibles dans le milieu, mais plutôt à l'émission de composés antifongiques volatils tels que l'acétoïne, l'isobutyl isothiocyanate et le diméthylsulfure (Rojas-Solís *et al.*, 2018).

Très peu d'études ont été menées sur l'inhibition des champignons phytopathogènes par des pathogènes humains *via* la production de substances organiques volatiles. Cependant, la présente étude est la première à évaluer la capacité antifongique des COV produits par *A. calcoaceticus* et *H. alvei* contre *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. solani* var. *coeruleum*, *F. graminearum* et *P. infestans*. Il est à noter que l'activité antifongique des trois souches XI22, XI47 et P29 est plus importante par production de substances diffusibles dans le milieu de culture en confrontation directe, que par production de substances volatiles en confrontation indirecte.

#### **4.9.3. Stimulation de la croissance**

Les souches XI22, XI47 et P29 et leurs combinaisons ont été testées pour leur pouvoir à stimuler la croissance du blé dur. Les résultats ont révélé des effets contrastés. Certains traitements avec les souches seules ou combinées ont stimulé la croissance par rapport au contrôle ; tandis que d'autres l'avaient inhibé. Une inhibition très considérable a été observée durant la phase de levée, par contre elle est moins sévère durant la phase de tallage. L'élongation des racines et le poids frais semblent être plus influencés durant cette phase (Tableau XII, figures 37-39).

Les souches XI22 et P29 appliquées seules ont inhibé l'élongation des feuilles et des racines durant les deux phases et ont réduit le poids frais des plantules. Cependant, la souche XI47 seule avait un effet inhibiteur sur les racines mais promoteur sur les feuilles, durant les deux phases. Le poids frais a également augmenté suite au traitement par cet isolat.

**Tableau XII.** Effets de *A. calcoaceticus* (XI22), *H. alvei* (XI47) et *S. maltophilia* (P29) seules ou en combinaison sur la croissance du blé.

Traitement	Levée		Tallage		Poids (gr)
	Longueur des racines (cm)	Longueur des feuilles (cm)	Longueur des racines (cm)	Longueur des feuilles (cm)	
T	5,4	13	8,17	25,3	0,43
XI22	3,67	10,4	7	24,33	0,39
XI22-S2	7,8	11,57	8,17	24,17	0,24
XI22-XI44	4,5	12,17	6,77	26	0,41
XI22-A16	5,67	12,83	7,4	23,77	0,4
XI22-B10 <sup>I</sup>	3,8	5	5,23	18,83	0,23
XI22-A1	7,23	8,17	5,77	24,33	0,3
XI22-XI49	10,17	10,57	6,6	26,57	0,29
XI22-XI39	8,33	9,33	7,57	26,8	0,31
XI22-XI47	4,83	12,1	6,5	23,33	0,39
XI22-P29 <sup>I</sup>	2,67	1,83	3,23	15,5	0,23
XI47	4,6	16,17	6,83	27,4	0,45
XI47-S2	7,57	11,93	5,97	27,6	0,29
XI47-XI44 <sup>S</sup>	5,17	15,6 <sup>S</sup>	6,5	25,5	0,39
XI47-A16 <sup>S</sup>	6,67 <sup>S</sup>	16,17 <sup>S</sup>	7,57 <sup>I</sup>	30,03 <sup>S</sup>	0,51 <sup>S</sup>
XI47-B10	8,17	9,17	5,83	26,7	0,27
XI47-A1 <sup>S</sup>	8	11,5	6,7	30,67 <sup>S</sup>	0,35
XI47-XI49 <sup>I</sup>	4,83	4,17	5,37	22,93	0,27
XI47-XI39	7,77	9	6,37	27,33	0,31
XI47-XI22	4,83	12,1	6,5	23,33	0,39
XI47-P29	5,17	10,27	5,77	19,17	0,27
P29	3,33	8,5	5,6	22,83	0,32
P29-S2	7,83	8,5	5,93	25,33	0,28
P29-44	4,57	13,93	7,57	27,17	0,46
P29-A16 <sup>S</sup>	3,63	10,33	9,6 <sup>S</sup>	22,6	0,35
P29-B10	6,37	6,37	8,4	26	0,35
P29-A1	6,5	8,17	6,67	23,43	0,26
P29-XI49 <sup>S</sup>	9,5 <sup>S</sup>	9,3	6,77	29,1	0,35
P29-XI39	6,4	8,67	6,17	27	0,29
P29-XI22	2,67	1,83	3,23	15,5	0,23
P29-XI47	5,17	10,27	5,77	19,17	0,27

I : effet inhibiteur de la croissance, S : effet stimulateur.

Bien que plusieurs études ont rapporté le potentiel biofertilisant et stimulateur de la croissance des plantes par des souches d'*Acinetobacter* (Sarode Prashant *et al.*, 2009 ; Bhawsar et Patil, 2015), *Hafnia* (Fayetörbay *et al.*, 2010 ; Gunes *et al.*, 2015) et *Stenotrophomonas* (Majeed *et al.*, 2015 ; Rojas-Solís *et al.*, 2018). Ces bactéries peuvent avoir un effet inhibiteur sur la croissance. L'incubation des plantules d'*Arabidopsis* avec les deux souches rhizosphériques *S. rhizophila*, et *S. maltophilia* a abouti à une inhibition drastique de leur croissance (par 80%). La chlorose puis la mort des plantes sont dues à l'émission de substances volatiles par les deux souches bactériennes (Vespermann *et al.*, 2007 ; Kai *et al.*, 2008 ; Wenke *et al.*, 2012).

En plus de l'inhibition de la croissance, les COV produits par *S. maltophilia* ont induit la production de l' $H_2O_2$  chez *Arabidopsis* en co-culture. Le COV 2-phenyléthanol produit par *S. maltophilia* semble être lié aux effets notés chez *Arabidopsis* (Wenke *et al.*, 2012 ; Wenke *et al.*, 2018).

L'effet des combinaisons (l'utilisation concomitante de plusieurs souches bactériennes), diffère selon la compatibilité des bactéries utilisées. Les combinaisons compatibles (souches combinées n'ayant pas un effet inhibiteur l'une sur l'autre), influencent positivement la croissance de la plante ; alors que celles non compatibles l'influencent négativement. Dans le présent travail, et pendant la levée, les inhibitions les plus significatives sont celles enregistrées avec les combinaisons XI22-P29, XI22-B10 et XI47-XI49; les autres étant moins inhibitrices. Cependant, certaines combinaisons ont amélioré la croissance des semis mais à des taux statistiquement non significatifs.

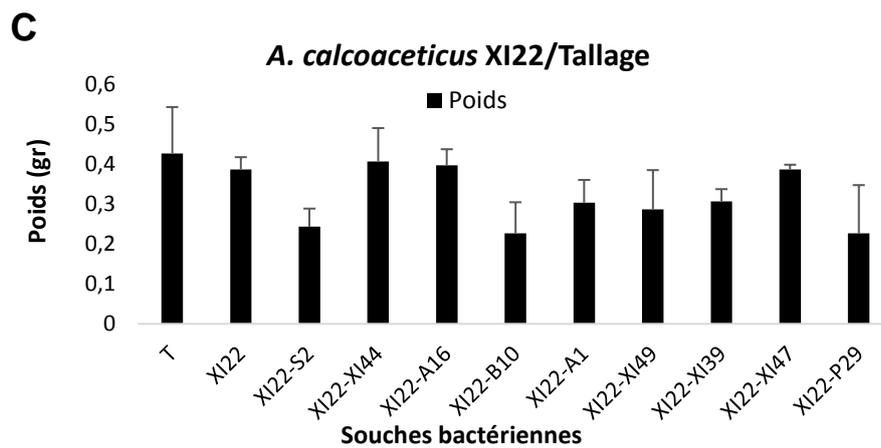
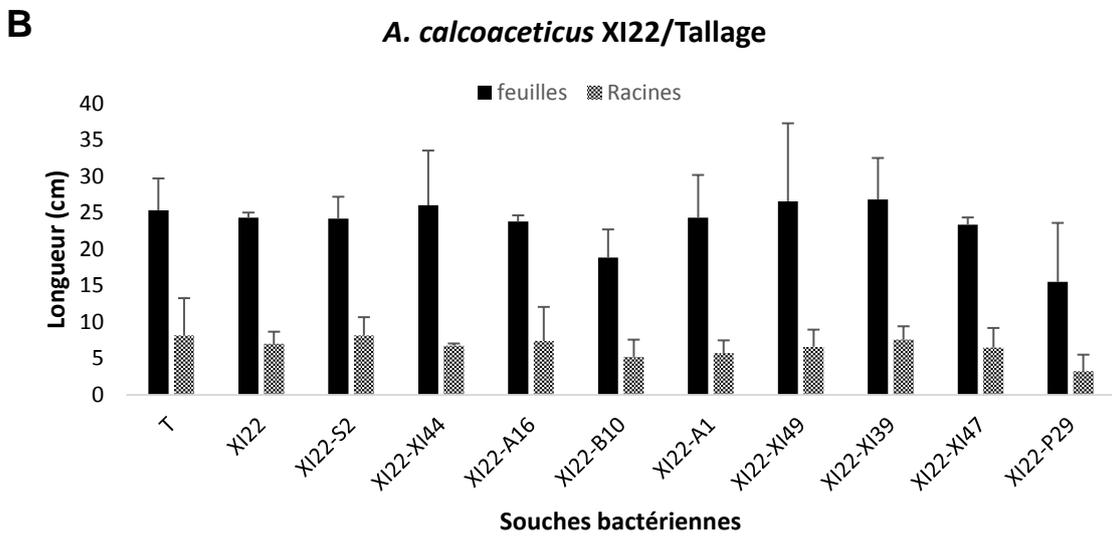
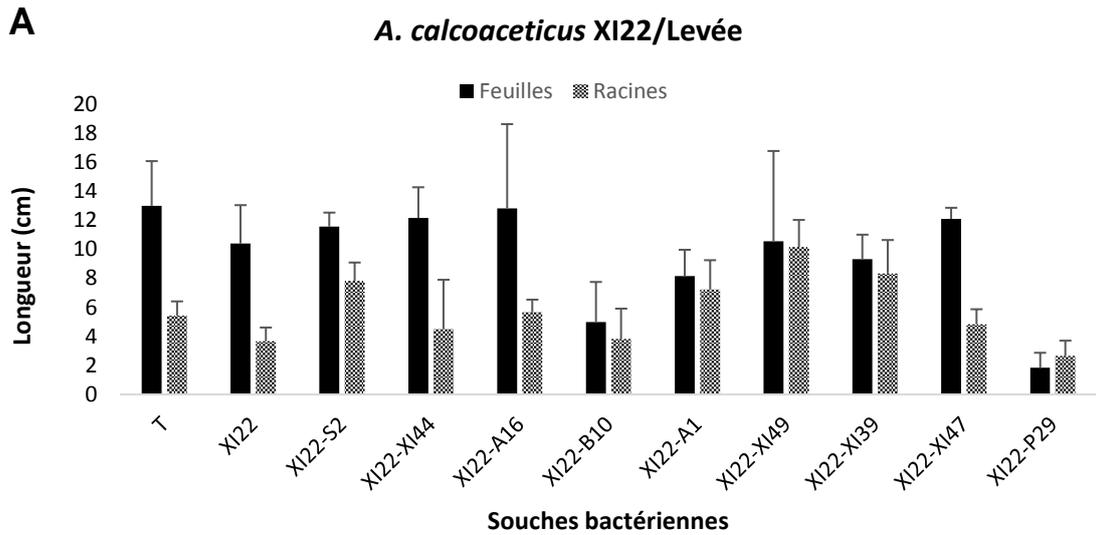
Plusieurs études ont rapporté la double efficacité des mélanges bactériens (combinaisons de deux ou trois souches bactériennes) dans la protection des plantes contre différents agents pathogènes et dans la stimulation de leur croissance (Raupach et Kloepper, 1998; Siddiqui et Shaukat, 2002; Jetiyanon *et al.*, 2003; Szczech et Dyśko, 2008; Liu *et al.*, 2018). Le traitement des graines de la vesce commune (*Vicia sativa*) avec le mélange des souches *H. alvei* TV33A et *B. megaterium* TV11C solubilisant le phosphate ; a causé une augmentation du rendement en herbes fraîches, du poids des racines et de la hauteur des plantes (Fayetörbay *et al.*, 2010). Aussi, la co-inoculation avec les souches de *Pseudomonas stutzeri* E25 et *S. maltophilia* CR71 avait amélioré la croissance de la tomate en augmentant la longueur des racines, le poids frais total et la concentration en chlorophylle chez les plants (Rojas-Solís *et al.*, 2018).

Bien qu'elle ait légèrement réduit la croissance des racines durant le tallage, la combinaison XI47-A16, semble la plus compatible. Les autres n'étaient actives que sur un des paramètres, et durant l'une des deux phases. XI47-XI44 et P29-XI49 sont les plus stimulatrices des racines et des feuilles respectivement durant la levée ; tandis que XI47-A1 et P29-A16 sont les plus stimulatrices des racines et des feuilles respectivement durant le tallage.

Les combinaisons de souches à Gram-négatif (*CHA0*, *P. aeruginosa* et *Bradyrhizobium japonicum*), ont stimulé la croissance de la tomate et ont diminué l'incidence de pathogènes spécifiques (Raupach et Kloepper, 1998). D'autres combinaisons entre des Gram-positifs (*B. pumilus* et *B. amyloliquefaciens*) ont également montré une grande efficacité de promotion de la croissance et le rendement de la tomate et du concombre ; et le biocontrôle d'un autre rang de pathogènes (Jetiyanon *et al.*, 2003). Latha *et al.* (2009), ont démontré la compatibilité et l'effet synergétique des souches *P. fluorescens* et *B. subtilis* en stimulant la croissance et en réduisant l'alternariose de la tomate. Les combinaisons bactériennes sont plus efficaces en cas de coinfection avec plusieurs agents pathogènes (Raupach et Kloepper, 1998) ; et peuvent agir simultanément en stimulant et protégeant les plantes en présence du pathogène (Kang *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2018).

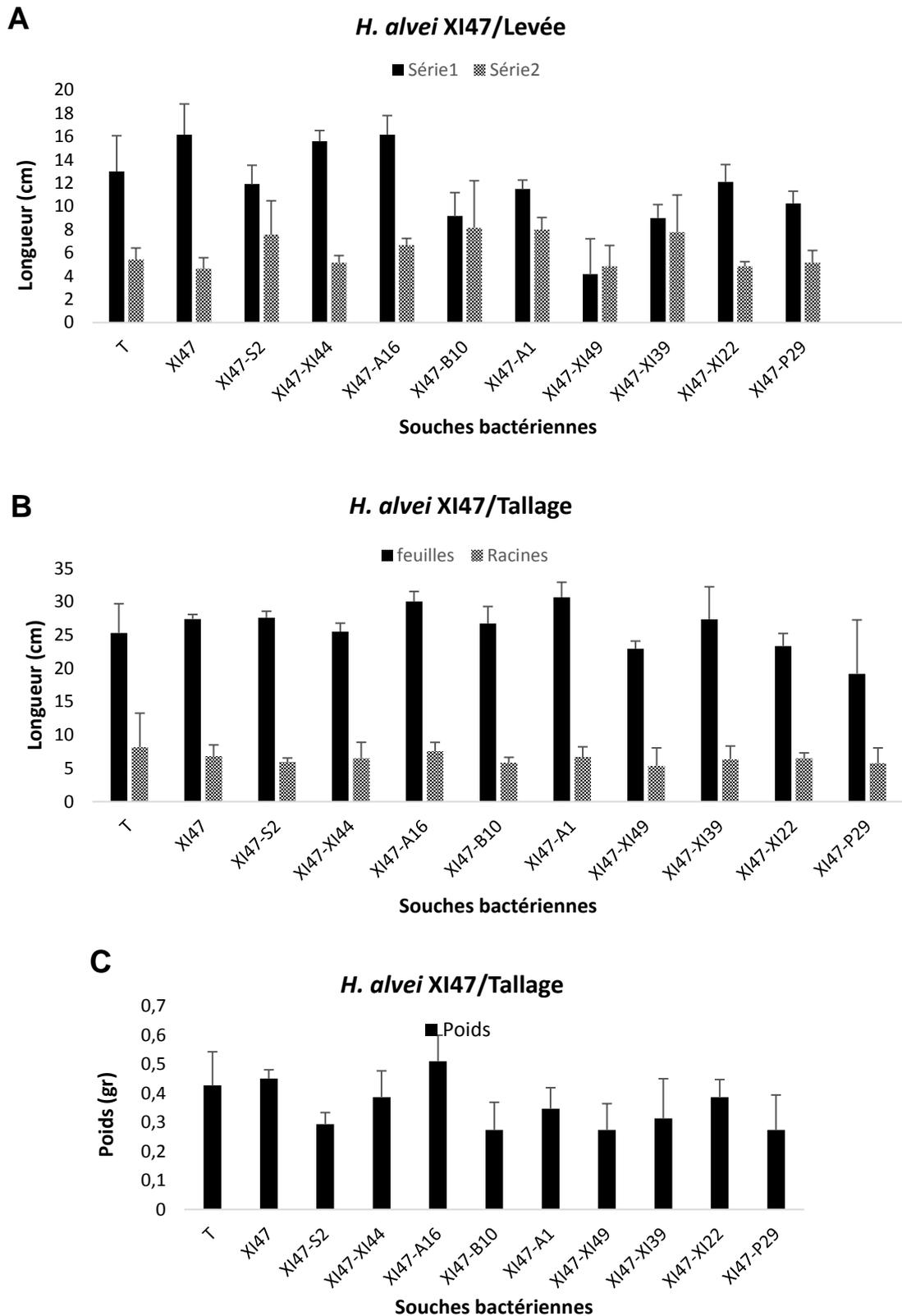
Par ailleurs, l'utilisation de mélanges bactériens pour la promotion de la croissance, et le nombre de combinaisons compatibles et efficaces sont très limités. Ceci est dû à plusieurs facteurs : La majorité des mélanges ne présentent aucun avantage ; ou encore, un mélange qui améliore l'activité dans un ensemble de conditions ou sur un hôte peut être antagoniste dans d'autres conditions ou sur un hôte différent (Raupach et Kloepper, 1998). Szczech et Dyško (2008), ont rapporté des mélanges bactériens qui ont eu un pouvoir de biocontrôle très important en 2006 vis-à-vis de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mais qui l'ont perdu en 2007. Les mêmes combinaisons n'avaient aucun effet sur l'amélioration du rendement de la tomate en 2006, par contre cet effet était significativement plus élevé en 2007; suggérant l'instabilité des synergies appliquées. Aussi, les mélanges de PGPR n'agissent pas toujours en synergie. Deux souches PGPR compatibles *B. pumilus* WP8 et *Erwinia persicinus* RA2, mais qui ne fonctionnent pas en synergie dans la promotion de la tomate et le biocontrôle contre *Ralstonia solanacearum* Rs 1115. La souche *E. persicinus* RA2 a inhibé la formation de biofilm par *B. pumilus* WP8, influençant sur la performance de cette dernière au sein du mélange par rapport à son application seule (Kang *et al.*, 2014).

A travers les résultats des travaux présentés ci-dessus, les inhibitions de la croissance enregistrées pourraient être dues à (i) l'incompatibilité des souches au sein des combinaisons qui ont donc exercé un antagonisme influençant directement sur le développement du blé ; (ii) la libération, dans le milieu, de substances inhibitrices de la croissance du blé.



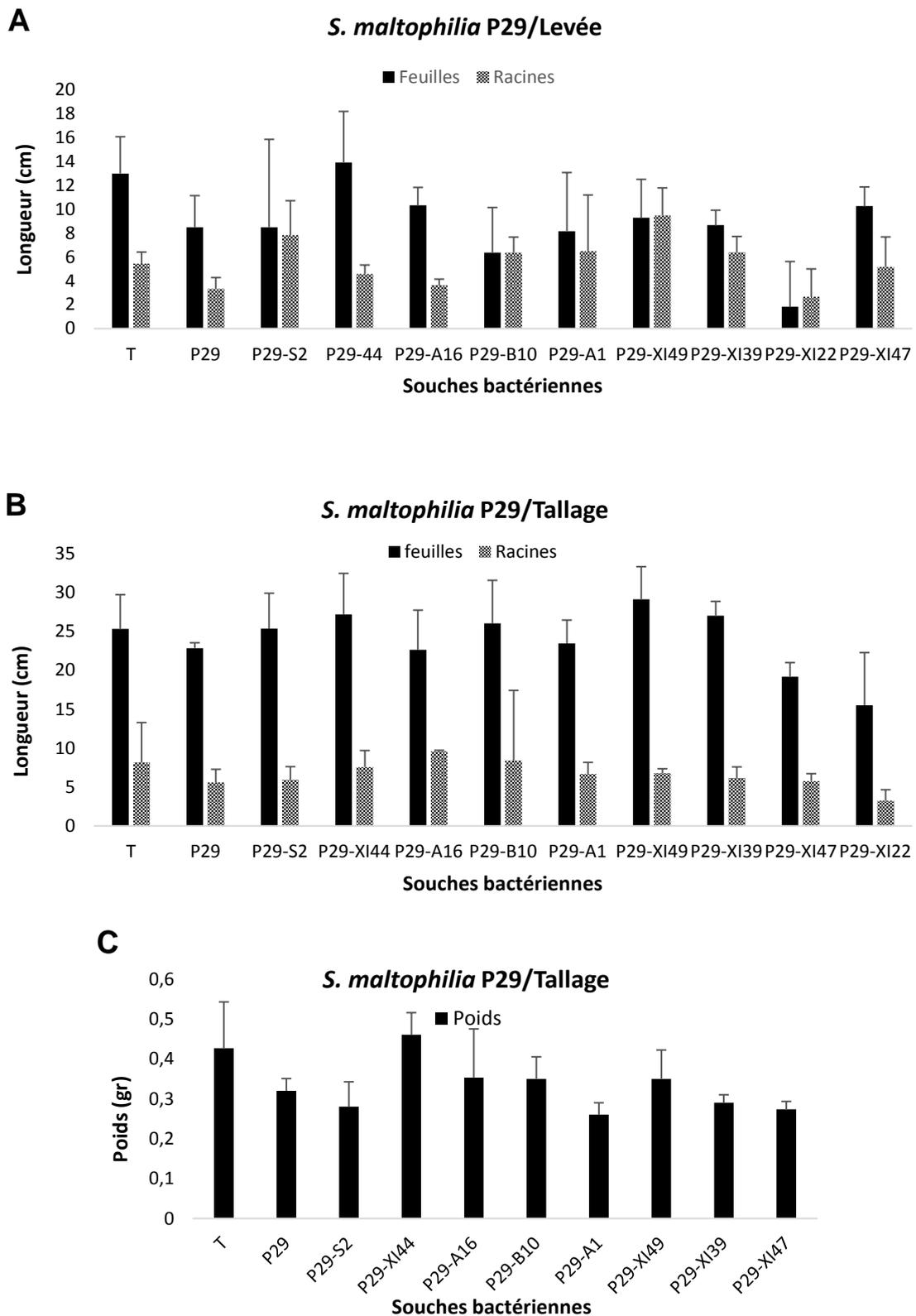
**Figure 37.** Effet de *A. calcoaceticus* XI22 et ses combinaisons sur la croissance du blé durant les phases de la levée (A) et du tallage (B et C).

\*\*\* Stimulation significative ( $p < 0.05$ )



**Figure 38.** Effet de *H. alvei* XI47 et ses combinaisons sur la croissance du blé durant les phases de la levée (A) et du tallage (B et C).

\*\*\* Stimulation significative ( $p < 0.05$ )



**Figure 39.** Effet de *S. maltophilia* P29 et ses combinaisons sur la croissance du blé durant les phases de la levée (A) et du tallage (B et C).

\*\*\* Stimulation significative ( $p < 0.05$ )

## *Conclusion et perspectives*

## Conclusion et Perspectives

Le contrôle biologique des maladies fongiques des plantes, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques. Les PGPRs occupent progressivement une place importante en agriculture moderne. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'efficacité des souches bactériennes rhizosphériques montrant des effets antifongiques contrastés vis-à-vis des champignons phytopathogènes durant la présélection.

L'étude a débuté par une approche utilisant des techniques de biologie moléculaire. La caractérisation moléculaire des isolats par séquençage du gène de l'ADNr 16S a révélé l'appartenance des souches majoritairement aux *Bacillus* et aux *Pseudomonas* ; et celles pouvant présenter un risque potentiel pour l'homme ont été traitées à part. Parmi les souches à Gram-positifs, 24 isolats ont été sélectionnés pour la présence de gènes de biosynthèses de quatre lipopeptides cycliques. Certains isolats abritaient tous les gènes de biosynthèse recherchés, d'autres abritaient trois, deux ou un seul gène ; tandis que quatre isolats ne possédaient aucun des gènes ciblés. Bien que certaines souches hébergeant un gène ou plus des cLPs et ayant précédemment démontré un potentiel antifongique, d'autres souches ne possédant aucun des gènes ont eu eux aussi une activité antifongique considérable. Ceci suggère que les cLPs ne sont pas les seules molécules antifongiques produites par ces isolats, laissant penser à la mise en évidence de la production d'autres composés.

Pour évaluer l'effet inducteur de l'expression de six gènes de défense appartenant à la voie de l'acide salicylique chez *Arabidopsis* par quatre isolats sélectionnés ; une méthodologie se basant sur la qRT-PCR a été conduite. Les souches testées ont montré des taux de régulation contrastés. Certaines avaient un effet inducteur de l'expression, d'autres n'avaient aucun effet ou ont plutôt réprimé l'expression des gènes. Le pouvoir inducteur de l'expression des gènes ciblés démontre un potentiel de régulation des défenses systémiques dépendantes de l'acide salicylique chez *Arabidopsis*. Toutefois, une corrélation positive s'est établie entre le nombre de gènes de cLPs trouvés chez la souche et son pouvoir à réguler les gènes de défense de la plante.

L'étude de la sensibilité des souches fongiques aux composés organiques volatils émis par les Gram-positif a révélé une diversité de la sensibilité des champignons à ces composés. *P. infestans* était le plus sensible aux substances volatiles tandis que les *Fusarium* testés étaient plus résistants. Ainsi, l'efficacité des composés antifongique peut dépendre de la morphologie du champignon visé. Par ailleurs, l'étude présentée ici a permis d'évaluer la capacité des isolats à persister dans le sol, en évaluant leur capacité de formation de biofilm et de dégradation des fongicides. La plupart des souches, en particulier les Gram-positives, ont formé le biofilm sur surface artificielle ; par contre très peu ont eu la capacité à dégrader les fongicides.

Les expériences réalisées sur le blé dur, ont révélé des capacités de phyto stimulation et de phyto protection très importantes par les isolats sélectionnés. L'effet stimulateur était plus important durant la phase de la levée que durant la phase de tallage, ceci suggère que les rhizobactéries influencent le développement de la plantes dès le stade précoce de la germination. Cependant, des taux de déclin et d'infection nuls et d'autres très faibles ont été obtenus avec les souches testées. Contrairement à ce qu'il a été obtenu durant la présélection, l'activité des Gram-positifs était restreinte *in vivo*, par contre celle des Gram-négatifs était plus importante. En outre, les résultats de l'essai de protection *in vivo* vis-à-vis de *F. graminearum*, révèle un antagonisme plus considérable que celui enregistré dans le test d'émission de substances volatiles. Ainsi, l'antagonisme pourrait être dû aux substances diffusibles dans le milieu.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à l'étude du potentiel PGP des pathogènes humains à Gram-négatif. L'activité antagoniste a été évaluée par la mise en évidence de la production d'enzymes lytiques sur milieux spécifiques, et de l'inhibition de la croissance des champignons telluriques phytopathogènes *via* la production de substances antifongiques volatiles ou diffusibles dans le milieu. Le pouvoir inhibiteur est plus important dans l'essai de confrontation directe que dans la confrontation indirecte. Contrairement à ce qu'il a été attendu, les pathogènes humains seuls ou combinés aux autres avaient un effet promoteur très restreint sur la croissance du blé ; mais ont eu un effet inhibiteur drastique. Les inhibitions enregistrées pourraient être dues à l'incompatibilité des souches au sein des combinaisons ou à la libération de substances inhibitrices dans le sol.

La présente étude tend à trouver une place pour les isolats testés dans les applications biotechnologiques visant l'amélioration des rendements et la préservation de l'environnement pour un développement durable. Toutefois, ce travail n'est qu'une initiation prometteuse visant le développement d'une procédure de formulation d'engrais et de pesticides biologiques.

Afin d'achever l'objectif fondamental de ce travail, des études ultérieures seront menées, à savoir :

1. La recherche d'autres métabolites secondaires impliqués dans l'antagonisme et codés par le génome bactérien,
2. La détermination de la nature des essences antifongiques actives des substances volatiles par moyen des techniques biochimiques,
3. La régulation des mécanismes de défense systémique impliqués dans la résistance d'*Arabidopsis* aux champignons phytopathogènes, en présence des isolats en tant que stimuli de l'ISR,
4. L'optimisation des modes de traitement des graines,
5. L'évaluation des effets stimulateur et protecteur sur d'autres plantes contre d'autres pathogènes.
6. L'évaluation de la capacité de formation de biofilms et colonisation des racines *in vivo*, et détermination de l'effet des exsudats racinaires,
7. L'étude de la toxicologie et l'écotoxicologie des isolats pour évaluer les risques potentiels liés à leur application *in situ* sur la santé humaine et sur l'environnement.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

Abdulkareem M, Aboud HM, Saood HM, Shibly MK (2014) Antagonistic activity of some plant growth rhizobacteria to *Fusarium graminearum*. Int J Phytopathol 3(01):49-54.

Adams MJ, Lapwood DH (1983) Transmission of *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *F. sulphureum* from seed potatoes to progeny tubers in the field. Ann Appl Biol 103:411-417

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res 163(2):173-181.

Ahmad S, Van Hulten M, Martin J, Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Ton J (2011) Genetic dissection of basal defense responsiveness in accessions of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ 34(7):1191-1206.

Ahmad A, Shafique S, Shafique S (2014) Intracellular interactions involved in induced systemic resistance in tomato. Sci Hort 176:127-133.

Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisc Toxicol 2(1):1-12.

Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S (2009) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. Lett Appl Microbiol 48(5):542-527.

Alström S, Burns RG (1989) Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biol Fertil Soils 7:232-238.

Alvarez ME (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. Plant Mol Biol 44:429-442.

Andolfi A, Cimmino A, Cantore PL, Iacobellis NS, Evidente A (2008) Bioactive and structural metabolites of *Pseudomonas* and *Burkholderia* species causal agents of cultivated mushrooms diseases. Perspect Medicin Chem 2:81-112.

Antoniw JF, White RF (1980) The Effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco. J Phytopathol 98(4):331-341.

Anzuay MS, Frola O, Angelini JG, Ludueña LM, Ibañez F, Fabra A, Taurian T (2015) Effect of pesticides application on peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated phosphate solubilizing soil bacteria. Appl Soil Ecol 95:31-37.

Araújo ASF, Monteiro RTR, Abarkeli RB (2003) Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. Chemosphere 52:799-804.

Arbeli Z, Fuentes CL (2007) Accelerated biodegradation of pesticides: an overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. Crop Prot 26:1733-1746.

Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb Cell Fact* 8:63.

Arima K, Kakinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* 31(3):488-494.

Armijo G, Salinas P, Monteoliva MI, García C, Seguel A, Villarroel-Candia E, Song W, van der Krol AR, Álvarez ME, Holuigue L (2013) A salicylic acid-induced lectin-like protein plays a positive role in the effector-triggered immunity response of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* Avr-Rpm1. *Mol Plant Microbe Interact* 26(12):1395-1406.

Aström B, Gerhardson B (1989) Wheat cultivar reactions to deleterious rhizosphere bacteria under gnotobiotic conditions. *Plant Soil* 117:157-165.

Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, Höfte M (2002) Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant Microbe Interact* 15(11):1147-1156.

## B

Bacon CW, Hinton DM (2007) Potential for control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* and related species using the bacterial endophyte *Bacillus mojavensis*. *Biocontrol Sci Technol* 17(1/2):81-94.

Bailly A, Weisskopf L (2012) The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. *Plant Signal Behav* 7(1):79-85.

Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134(1):307-319.

Ballio A, Barra D, Bossa F, DeVay JE, Grgurina I, Iacobellis NS, Marino G, Pucci P, Simmaco M, Surico G (1988) Multiple forms of syringomycin. *Physiol Mol Plant Pathol* 33(3):493-496.

Ballio A, Bossa F, Collins A, Gallo M, Iacobellis NS, Paci M, Pucci P, Scaloni A, Segre A, Simmaco M (1990) Structure of syringotoxin, a bioactive metabolite of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett* 269(2):377-380.

Baumgart F, Kluge B, Ullrich C, Vater J, Ziessow D (1991) Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 177(3):998-1005.

Bekai NH, Aggoun M (2016) Antagonisme des bactéries rhizosphériques vis-à-vis des champignons phytopathogènes résistants aux fongicides. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p26.

Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(2):266-292.

Benslim A, Mezaache-Aichour S, Haichour N, Chebel S, Zerroug MM (2016) Evaluation of inhibition of fungal spore germination by rhizospheric bacterial extracts. *Ann Res Rev Biol* 11(5):1-7.

Besson F, Peypoux F, Michel G, Delcambe L (1977) Structure de la bacillomycine L, antibiotique de *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 77:61-67.

Bhawsar SD, Patil SD (2015) Efficacy testing of *in vitro* diazotrophic activity of *Acinetobacter* on the field growth of soybean. *Indian J Agric Res* 49(5):383-391.

Blanco F, Garretó V, Frey N, Dominguez C, Pérez-Acle T, Van der Straeten D, Jordana X, Holuigue L (2005) Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 59:927-944.

Blanco F, Salinas P, Cecchini NM, Jordana X, Van Hummelen P, Alvarez ME, Loreto H (2009) Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 70:79-102.

Blom D, Fabbri C, Eberl L, Weisskopf L (2011) Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Appl Environ Microbiol* 77(3):1000-1008.

Bonmatin JM, Laprévotte O, Peypoux F (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen* 6(6):541-556.

Bonnichsen L, Bygvraa Svenningsen N, Rybtke M, de Bruijn I, Raaijmakers JM, Tolker-Nielsen T, Nybroe O (2015) Lipopeptide biosurfactant viscosin enhances dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 biofilms. *Microbiology* 161(12):2289-2297.

Bouaoud Y, Troulet C, Foughalia A, Berge O, Aissat K, Bardin M (2018) A multi-criteria approach for the selection of efficient biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on tomato in Algeria. *BioControl* 63:299-311.

Boukhalifa A, Madaci I (2013) Production de métabolites secondaires. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p42.

Bulluck III LR, Brosius M, Evanylo GK, Ristaino JB (2002) Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Appl Soil Ecol* 19(2):147-160.

Buysens S, Heungens K, Poppe J, Höfte M (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol* 62(3):865-871.

## C

Caloni F, Cortinovis C, Rivolta M, Davanzo F (2016) Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Sci Total Environ* 539:331-336.

- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6(11):1583-1592.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88(1):57-63.
- Cardinale M, Ratering S, Suarez C, Zapata Montoya AM, Geissler-Plaum R, Schnell S (2015) Paradox of plant growth promotion potential of rhizobacteria and their actual promotion effect on growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. *Microbiol Res* 181:22-32.
- Carlos MJ, Stefani PY, Janette AM, Melani MS, Gabriela PO (2016) Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiol Res* 188-189:53-61.
- Carriger JF, Rand GM, Gardinali PR, Perry WB, Tompkins MS, Fernandez AM (2006) Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida canals: an ecological risk prioritization for aquatic arthropods. *Soil Sediment Contam* 15:21-45.
- Carvalho FP (2006) Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ Sci Pol* 9:685-692.
- Cawoy H, Mariutto M, Henry G, Fisher C, Vasilyeva N, Thonart P, Dommes J, Ongena M (2014) Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact* 27(2):87-100.
- Challal A, Attar RI (2016) Antagonisme des bactéries à Gram positif vis-à-vis des champignons résistants aux fongicides du genre *Fusarium*. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p35.
- Chaurasia B, Pandey A, Palni LMS, Trivedi P, Kumar B, Colvin N (2005) Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiol Res* 160(1):75-81.
- Chen F, Wang M, Zheng Y, Luo J, Yang X, Wang X (2010) Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World J Microbiol Biotechnol* 26:675-684.
- Chen Y, Cao S, Chai Y, Clardy J, Kolter R, Guo JH, Losick R (2012) A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Mol Microbiol* 85(3):418-430.
- Conceição dos Santos J, Batista IH, Santos Barroso H, Silva Lima JM, Costa Neto PdQ, Ghelfi A, Pereira JO (2017) Biodegradation of the fungicide carbendazim by bacteria from *Coriandrum sativum* L. rhizosphere. *Acta Scientiarum: Biol Sci* 39(1):71-77.
- Couillerot O, Combes-Meynet E, Pothier JF, Bellvert F, Challita E, Poirier MA, Rohr R, Comte G, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) The role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phyto-stimulators. *Microbiology* 157:1694-1705.

Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WR, Anderson DG, Baetcke KR, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM (1998) Environmental Endocrine Disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect* 106(Suppl 1):11-56.

Cycoń M, Wójcik M, Piotrowska-Seget Z (2011) Biodegradation kinetics of the benzimidazole fungicide thiophanate-methyl by bacteria isolated from loamy sand soil. *Biodegradation* 22(3):573-583.

## D

D'aes J, Kieu NP, Léclère V, Tokarski C, Olorunleke FE, De Maeyer K, Jacques P, Höfte M, Ongena M (2014) To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environ Microbiol* 16(7):2282-2300.

Das P, Mukherjee S, Sen R (2008) Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. *Biotechnol Genet Eng Rev* 25:165-186.

de Bruijn I, de Kock MJD, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM (2008) Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 190(8):2777-2789.

de Bruijn I, de Kock MJD, Yang M, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 63(2):417-428.

de Bruijn I, Raaijmakers JM (2009) Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP protease. *J Bacteriol* 191(6):1910-1923.

DeFilippi S, Groulx E, Megalla M, Mohamed R, Avis TJ (2018) Fungal competitors affect production of antimicrobial lipopeptides in *Bacillus subtilis* strain B9-5. *J Chem Ecol* 44(4):374-383.

Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266(5188):1247-1250.

De Meyer G, Audenaert K, Höfte M (1999) *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on *in planta* salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur J Plant Pathol* 105: 513-517.

De Meyer G, Höfte M (1997) Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87(6):588-593.

Desaki Y, Miya A, Venkatesh B, Tsuyumu S, Yamane H, Kaku H, Minami E, Shibuya N (2006) Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol* 47(11):1530-1540.

de Souza JT, de Boer M, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM (2003) Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 69(12):7161-7172.

Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(10):4095-4098.

Doneche B, Seguin G, Ribereau-Gayon P (1983) Mancozeb effect on soil microorganisms and its degradation in soils. *Soil Sci* 135(6):361-366.

Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C, Stein T, Leenders F, Vater J (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(23):13294-13299.

Dunlap CA, Schisler DA, Price NP, Vaughn SF (2011) Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. *J Microbiol* 49(4):603-609.

Dunne C, Crowley JR, Moënne-Loccoz Y, Dowling DN, de Bruijn FJ, O’Gara F (1997) Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143:3921-3931.

Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42:185-209.

Dutta S, Mishra AK, Dileep Kumar BS (2008) Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biol Biochem* 40(2):452-461.

## E

Elhariry HM (2011) Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiol* 28:1266-1274.

Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6):2480-2484.

## F

Fan W, Dong X (2002) *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14(6):1377-1389.

Fayetörbay D, Karagoz K, Dadasoglu F, Comakli B, Cakmakci R, Kotan R (2010) Common vetch (*Vicia sativa*) growth and yield in relation to single and mixed cultures of plant growth promoting bacteria, mineral and organic fertilizers. *Proceedings of the Turkey IV organic farming symposium, Turkey*, p696-701.

Fernandez D, lourd M, Quinten M, Tantaoui A, Geiger JP (1995) Le Bayoud du palmier dattier : une maladie qui menace la phoeniciculture. *Phytoma* 469:36-40.

Finking R, Marahiel MA (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* 58:453-488.

FRAC (2013) List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents, p5.

## G

Gerard J, Lloyd R, Barsby T, Haden P, Kelly MT, Andersen RJ (1997) Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *J Nat Prod* 60:223-229.

Gerhardson B (2002) Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol* 20(8):338-343.

Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143(2):973-982.

Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, Pasternak JJ (1994) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can J Microbiol* 40:911-915.

Göhre V, Robatzek S (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 46:189-215.

Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, Nowak-Thompson B, Loper JE, Gerwick WH (2007) The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem Biol* 14(1):53-63.

Grover M, Nain L, Singh SB, Saxena AK (2010) Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. *Curr Microbiol* 60:99-106.

Gu Q, Yang Y, Yuan Q, Shi G, Wu L, Lou Z, Huo R, Wu H, Borriss R, Gao X (2017) Bacillomycin D Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Appl Environ Microbiol* 83(19).

Gunes A, Karagoz K, Turan M, Kotan R, Yildirim E, Ramazan Cakmakci R, Sahin F (2015) Fertilizer efficiency of some plant growth promoting rhizobacteria for plant growth. *Res J Soil Biol* 7(2):28-45.

Guo Q, Dong W, Li S, Lu X, Wang P, Zhang X, Wang Y, Ma P (2014) Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiol Res* 169(7-8):533-540.

## H

Han SH, Lee SJ, Moon JH, Park KH, Yang KY, Cho BH, Kim KY, Kim YW, Lee MC, Anderson AJ, Kim YC (2006) GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 19(8):924-930.

- Haney RL, Senseman SA, Hons FM, Zuberer DA (2000) Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci* 48(1):89-93.
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Visser RGF, van der Vossen EAG (2008) Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res* 51:47-57.
- He J, Boland GJ, Zhou T (2009) Concurrent selection for microbial suppression of *Fusarium graminearum*, *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat. *J Appl Microbiol* 106(6):1805-1817.
- Heck S, Grau T, Buchala A, Métraux JP, Nawrath C (2003) Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *Plant J* 36(3):342-352.
- Helweg A (1977) Degradation and adsorption of carbendazim and 2-aminobenzimidazole in soil. *Pestic Sci* 8:71-78.
- Herlemann DPR, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* 5(10):1571-1579.
- Herrera-Vásquez A, Carvallo L, Blanco F, Tobar M, Villarroel-Candia E, Vicente-Carbajosa J, Salinas P, Holuigue L (2015a) Transcriptional control of glutaredoxin *GRXC9* expression by a salicylic acid-dependent and NPR1-independent pathway in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol Report* 33:624-637.
- Herrera-Vásquez A, Salinas P, Holuigue L (2015b) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front Plant Sci* 6:171.
- Hiramoto M, Okada K, Nagai S (1970) The revised structure of viscosin, a peptide antibiotic. *Tetrahedron Lett* 13:1087-1090.
- Ho YN, Chiang HM, Chao CP, Su CC, Hsu HF, Guo CT, Hsieh JL, Huang CC (2015) *In planta* biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant Soil* 387:295-306.
- Hu W, Gao Q, Hamada MS, Dawood DH, Zheng J, Chen Y, Ma Z (2014) Potential of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pcho10 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 104(12):1289-1297.
- Hua GKH, Höfte M (2015) The involvement of phenazines and cyclic lipopeptide sessilin in biocontrol of *Rhizoctonia* root rot on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Pseudomonas* sp. CMR12a is influenced by substrate composition. *Plant Soil* 388:243-253.
- Hunziker L, Bönisch D, Groenhagen U, Bailly A, Schulz S, Weisskopf L (2015) *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Appl Environ Microbiol* 81(3):821-830.
- Hurley PM, Hill RN, Whiting RJ (1998) Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect* 106(8):437-445.

Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML (2008) Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet* 4(11):e1000255.

## I

Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux JP (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact* 16(10):851-858.

## J

Jamalizadeh M, Etebarian HR, Alizadeh A, Aminian H (2008) Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1). *Phytoparasitica* 36(1):23-29.

Jetiyanon K, Fowler WD, Kloepper JW (2003) Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. *Plant Dis* 87(11):1390-1394.

Jetiyanon K, Kloepper JW (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol Control* 24:285-291.

Jetiyanon K, Wittaya-Areekul S, Plianbangchang P (2008) Film coating of seeds with *Bacillus cereus* RS87 spores for early plant growth enhancement. *Can J Microbiol* 54(10):861-867.

Johnson C, Boden E, Arias J (2003) Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(8):1846-1858.

## K

Kai M, Crespo E, Cristescu SM, Harren FJM, Francke W, Piechulla B (2010) *Serratia odorifera*: analysis of volatile emission and biological impact of volatile compounds on *Arabidopsis thaliana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88(4):965-976.

Kai M, Vespermann A, Piechulla B (2008) The growth of fungi and *Arabidopsis thaliana* is influenced by bacterial volatiles. *Plant Signal Behav* 3(7):482-484.

Kakinuma A, Ouchida A, Shima T, Sugino H, Isono M, Tamura G, Arima K (1969a) Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. *Agric Biol Chem* 33(11):1669-1671.

Kakinuma A, Sugino H, Isono M, Tamura G, Arima K (1969b) Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agric Biol Chem* 33(6):973-976.

Kamal MM, Lindbeck KD, Savocchia S, Ash GJ (2015) Biological control of *Sclerotinia* stem rot of canola using antagonistic bacteria. *Plant Pathol* 64(6):1375-1384.

Kamilova F, Validov S, Azarova T, Mulders I, Lugtenberg B (2005) Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ Microbiol* 7(11):1809-1817.

Kang Y, Shen M, Yang X, Cheng D, Zhao Q (2014) A plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) mixture does not display synergistic effects, likely by biofilm but not growth inhibition. *Microbiology* 83(5):666-673.

Kaur PK, Joshi N, Singh IP, Saini HS (2017) Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. *J Appl Microbiol* 122(1):139-152.

Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Défago G (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant Microbe Interact* 5(1):4-13.

Khababa H, Nouasria A (2016) Effet antagoniste des bactéries à Gram positif vis-à-vis de champignons résistants aux fongicides. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p26.

Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96(3):473-480.

Khan AL, Halo BA, Elyassi A, Ali S, Al-Hosni K, Hussain J, Al-Harrasi A, Lee IJ (2016) Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electron J Biotechnol* 21:58-64.

Kim K, Lee Y, Ha A, Kim JI, Park AR, Yu NH, Son H, Choi GJ, Park HW, Lee CW, Lee T, Lee YW, Kim JC (2017) Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to chemical fungicides using cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain JCK-12. *Front Plant Sci* 8:2010.

Kim JS, Lee J, Lee CH, Woo SY, Kang H, Seo SG, Kim SH (2015) Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. *Plant Pathol J* 31(2):195-201.

Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11):1259-1266.

Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* 186(4):1084-1096.

Kramell R, Atzorn R, Schneider G, Miersch O, Brückner C, Schmidt J, Sembdner G, Parthier B (1995) occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *J Plant Growth Regul* 14:29-36.

Kruijt M, Tran H, Raaijmakers JM (2009) Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J Appl Microbiol* 107(2):546-456.

Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GEM, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV (2004) Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* 51(1):97-113.

Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5(4):325-331.

## L

Lahrache M, Boulekfouf N (2014) Etude comparative de deux méthodes de mise en évidence de l'antagonisme de souches bactériennes *in vitro*. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p26.

Lam E (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4):305-315.

Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411(6839):848-853.

Landa BB, Mavrodi OV, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS, Weller DM (2002) Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Appl Environ Microbiol* 68(7):3226-3237.

Latha P, Anand T, Ragupathi N, Prakasam V, Samiyappan R (2009) Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biol Control* 50(2):85-93.

Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl Environ Microbiol* 71(8):4577-4584.

Leclère V, Marti R, Béchet M, Fickers P, Jacques P (2006) The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch Microbiol* 186:475-483.

Leeman M, Van Pelt JA, Den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B (1995) Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85(9):1021-1027.

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 18;79(4):583-593.

Lim SM, Yoon MY, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Shin TS, Park HW, Yu NH, Kim YH, Kim JC (2017) Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathol J* 33(5):488-498.

Liu J, Hagberg I, Novitsky L, Hadj-Moussa H, Avis TJ (2014) Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biol* 18:855-861.

Liu K, McInroy JA, Hu CH, Kloepper JW (2018) Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Dis* 102:67-72.

Liu H, Wang Y, Xu J, Su T, Liu G, Ren D (2008) Ethylene signaling is required for the acceleration of cell death induced by the activation of AtMEK5 in *Arabidopsis*. *Cell Res* 18(3):422-432.

Luo C, Liu X, Zhou H, Wang X, Chen Z (2015) Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Appl Environ Microbiol* 81(1):422-431.

## M

Ma Z, Geudens N, Kieu NP, Sinnaeve D, Ongena M, Martins JC, Höfte M (2016) Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front Microbiol* 7:382.

Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, Ptak M (1992) Surfactin/iturinA interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74:1047-1051.

Magnucka EG, Pietr SJ (2015) Various effects of fluorescent bacteria of the genus *Pseudomonas* containing ACC deaminase on wheat seedling growth. *Microbiol Res* 181:112-119.

Maier F, Zwicker S, Hückelhoven A, Meissner M, Funk J, Pfitzner AJ, Pfitzner UM (2011) NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Mol Plant Pathol* 12(1):73-91.

Majeed A, Abbasi MK, Hameed S, Imran A, Rahim N (2015) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Front Microbiol* 6:198.

Makandar R, Nalam VJ, Chaturvedi R, Jeannotte R, Sparks AA, Shah J (2010) Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis* interaction with *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 23(7):861-870.

Makandar R1, Nalam VJ, Lee H, Trick HN, Dong Y, Shah J (2012) Salicylic acid regulates basal resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 25(3):431-439.

Mandal K, Singh B, Jariyal M, Gupta VK (2013) Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 93:87-92.

Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* 97:2651-2673.

- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D, Défago G (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88(7):678-984.
- Mazzola M, de Bruijn I, Cohen MF, Raaijmakers JM (2009) Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 75(21):6804-6811.
- Mezaache-Aichour S, Akkal A, Meskine R, Haichour N, Zerroug MM (2018) Resistance of telluric fungi to chemical fungicides. *IJIAAR* 2(2):70-78.
- Mezaache-Aichour S, Guechi A, Nicklin J, Drider D, Prevost H, Strange RN (2012) Isolation, identification and antimicrobial activity of *Pseudomonads* isolated from the rhizosphere of potatoes growing in Algeria. *J Plant Pathol* 94(1):89-98.
- Mezaache-Aichour S, Guechi A, Zerroug MM, Nicklin J, Strange RN (2013a) Antimicrobial activity of *Pseudomonas* secondary metabolites. *Phcog Commn* 3(3):39-44.
- Mezaache-Aichour S, Haichour N, Guechi A, Zerroug MM (2014) Telluric pseudomonads metabolites involved in the antagonism to phytopathogenic fungi. *Global J Biol Agric Health Sci* 3(1):71-77.
- Mezaache-Aichour S, Haichour N, Sayeh N, Guechi A, Zerroug MM (2013b) Isolation and selection of indigenous bacterial strains with suppression properties from the rhizospheres of potato and wheat. *Annu Rev Res Biol* 3(4):405-415.
- Meziane H, van der Sluis I, van Loon LC, Höfte M, Bakker PAHM (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol Plant Pathol* 6(2):177-185.
- Mnif I, Ghribi D (2015) Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept. *World J Microbiol Biotechnol* 31(7):1001-1020.
- Mohamed KH, Daniel T, Aurélien D, El-Maarouf-Bouteau H, Rafik E, Arbelet-Bonnin D, Biligui B, Florence V, Mustapha EM, François B, Florence, Ennaji Moulay Mustapha, Bouteau François (2015) Deciphering the dual effect of lipopolysaccharides from plant pathogenic *Pectobacterium*. *Plant Signal Behav* 10(3):e1000160.
- Moussa TAA, Almaghrabi OA, Abdel-Moneim TS (2013) Biological control of the wheat root rot caused by *Fusarium graminearum* using some PGPR strains in Saudi Arabia. *Ann Appl Biol* 163:72-81.
- Moyne AL, Cleveland TE, Tuzun S (2004) Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett* 234:43-49.
- Mukherjee AK, Das K (2005) Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiol Ecol* 54:479-489.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497.

Mur LA, Bi YM, Darby RM, Firek S, Draper J (1997) Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV-infected tobacco. *Plant J* 12(5):1113-1126.

Mur LA, Brown IR, Darby RM, Bestwick CS, Bi YM, Mansfield JW, Draper J (2000) A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst. *Plant J* 23(5):609-621.

Mylne SJ, Wang CK, van der Weerden NL, Craik DJ (2010) Cyclotides are a component of the innate defense of *Oldenlandia affinis*. *Biopolymers* 94(5): 635-646

## N

Ndamukong I, Al Abdallat A, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C (2007) SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J* 50:128-139.

Nielsen TH, Christophersen C, Anthoni U, Sørensen J (1999) Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J Appl Microbiol* 87(1):80-90.

Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* 39(5):500-507.

Nourozian J, Etebarian HR, and Khodakaramian G (2006) Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin J Sci Technol* 28(Suppl1):29-38.

Nürnberg T (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell Mol Life Sci* 55:167-182.

Nutkins JC, Mortishire-Smith RJ, Packman LC, Brodey CL, Rainey PB, Keith K, Williams DH (1991) Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J Am Chem Soc* 113(7):2621-2627.

## O

Obanor F, Neate S, Simpfendorfer S, R. Sabburg R, P. Wilson F, Chakraborty S (2013) *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* caused the 2010 head blight epidemics in Australia. *Plant Pathol* 62:79-91.

Oedjijono, Line MA, Dragar C (1993) Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biol Biochem* 25(2):247-250.

Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16(3):115-125.

Ongena M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:29-38.

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol* 9(4):1084-1090.

Ouzari H, Khsairi A, Raddadi N, Jaoua L, Hassen A, Zarrouk M, Daffonchio D, Boudabous A (2008) Diversity of auxin-producing bacteria associated to *Pseudomonas savastanoi* - induced olive knots. *J Basic Microbiol* 48(5):370-377.

## P

Pal KK, McSpadden Gardener B (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *Biol Control*. doi: [10.1094/PHI-A-2006-1117-02](https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02).

Pan D, Mionetto A, Tiscornia S, Bettucci L (2015) Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. *Mycotoxin Res* 31(3):137-143.

Panda J, Kanjilal T, Das S (2017) Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. *Biotechnol Res Innov*. doi:[10.1016/j.biori.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.004).

Pathak KV, Keharia H, Gupta K, Thakur SS, Balaram P (2012) Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *J Am Soc Mass Spectrom* 23(10):1716-1728.

Pattanasupong A, Nagase H, Sugimoto E, Hori Y, Hirata K, Tani K, Nasu M, Miyamoto K (2004) Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. *J Biosci Bioeng* 98(1):28-33.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72(2):157-165.

Peng M, Kuc J (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696-699.

Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHG, De Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8(12):2309-2323.

Penninckx IAMA, Thomma BPHG, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10(12):2103-2113.

Peypoux F, Besson F, Michel G (1980) Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. *J Antibiot* 33(10):1146-1149.

Peypoux F, Besson F, Michel G, Delcambe L (1981) Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *Eur J Biochem* 118:323-327.

Peypoux F, Bonmatin JM, Labbe H, Grangemard I, Das BC, Ptak M, Wallach J, Michel G (1994) [Ala4]Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *Eur J Biochem* 224:89-96.

Peypoux F, Guinand M, Michel G, Delcambe L, Das BC, Lederer E (1978) Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 17(19):3992-3996.

Peypoux F, Michel G, Delcambe L (1976) Structure de la mycosubtiline, antibiotique isolé de *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 63:391-398.

Pieterse CMJ, Ton J, van Loon LC (2001) Cross-talk between plant defense signaling pathways: boost or burden?. *Agbiotechnet* 3:1-8.

Pieterse CMJ, van Loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance-signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 7(4):456-464.

Pieterse CMJ, van Pelt JA, Ton J, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, van Loon LC (2000) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol Mol Plant Pathol* 57:123-134.

Pieterse CMJ, van Wees SC, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8(8):1225-1237.

Pieterse CMJ, van Wees SC, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10(9):1571-1580.

Pimentel D, Hepperly P, Hanson J, Douds D, Seidel R (2005) Environmental, energetic, and economic comparisons of organic and conventional farming systems. *BioScience* 55(7):573-582.

Pozo C, Rodelas B, Salmeron V, Martinez-Toledo MV, Vela GR, Gonzalez-Lopez J (1994) Effects of fungicides maneb and mancozeb on soil microbial populations. *Toxicol Environ Chem* 43(3-4):123-132.

Press CM, Wilson M, Tuzun S, Kloepper JW (1997) Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 10(6):761-768.

## Q

Qi PF, Johnston A, Balcerzak M, Rocheleau H, Harris LJ, Long XY, Wei YM, Zheng YL, Ouellet T (2012) Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of *Fusarium* head blight in wheat. *Fungal Biol* 116(3):413-426.

## R

- Raaijmakers JM, de Bruijn I, de Kock MJD (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol Plant Microbe Interact* 19(7):699-710.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34:1037-1062.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëgne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321:341-361.
- Raaijmakers JM, Weller DM (2001) Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* Strain Q8r1-96. *Appl Environ Microbiol* 67(6):2545-2554.
- Rainey PB, Brodey CL, Johnstone K (1991) Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:57-70.
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot* 20(1):1-11.
- Ramarathnam R, Bo S, Chen Y, Fernando WG, Xuewen G, de Kievit T (2007) Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can J Microbiol* 53(7):901-911.
- Ramarathnam R, Fernando WGD, de Kievit T (2011) The role of antibiosis and induced systemic resistance, mediated by strains of *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus cereus* and *B. amyloliquefaciens*, in controlling blackleg disease of canola. *BioControl* 56:225-235.
- Ramírez-Suero (2009) Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, p281.
- Ran LX, van Loon LC, Bakker PAHM (2005) No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology* 95(11):1349-1355.
- Rasouli Sadaghiani MH, Barin M, Jalili F (2008) The effect of PGPR inoculation on the growth of wheat. *International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology* p891-898.
- Raupach GS, Kloepper JW (1998) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88(11):1158-1164.

- Reitz M, Oger P, Meyer A, Niehaus K, Farrand SK, Hallmann J, Sikora RA (2002) Importance of the O-antigen, core-region and lipid A of rhizobial lipopolysaccharides for the induction of systemic resistance in potato to *Globodera pallida*. *Nematology* 4(1):73-79.
- Ren D, Yang H, Zhang S (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277(1):559-565.
- Ren JH, Li H, Wang YF, Ye JR, Yan AQ, Wu XQ (2013) Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. *Biol Control* 67:421-430
- Rojas-Solís D, Zetter-Salmón E, Contreras-Pérez M, Rocha-Granados MdC, Macías-Rodríguez L, Santoyo G (2018) *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatal Agric Biotechnol* 13:46-52.
- Rokhbakhsh-Zamin F, Sachdev D, Kazemi-Pour N, Engineer A, Pardesi KR, Zinjarde S, Dhakephalkar PK, Chopade BA (2011) Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *J Microbiol Biotechnol* 21(6):556-566.
- Rokni-Zadeh H, Li W, Sanchez-Rodriguez A, Sinnaeve D, Rozenski J, Martins JC, De Mot R (2012) Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Appl Environ Microbiol* 78(14):4826-4834.
- Romano A, Vitullo D, Senatore M, Lima G, Lanzotti V (2013) Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. *J Nat Prod* 76(11):2019-2025.
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez-García A (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact* 20(4):430-440.
- Rosas-Díaz T, Cana-Quijada P, Amorim-Silva V, Botella MA, Lozano-Durán R, Bejarano ER (2017) *Arabidopsis* NahG plants as a suitable and efficient system for transient expression using *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant* 10(2):353-356.
- Roongsawang N, Hase Ki, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S (2003) Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem Biol* 10(9):869-880.
- Rudrappa T, Splaine RE, Biedrzycki ML, Bais HP (2008) Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS One* 3(4):e2073.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134(3):1017-1026.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(8):4927-4932.

## S

Sachdev DP, Chaudhari HG, Kasture VM, Dhavale DD, Chopade BA (2009) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian J Exp Biol* 47(12):993-1000.

Saikia R, Singh T, Kumar R, Srivastava J, Srivastava AK, Singh K, Arora DK (2003) Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiol Res* 158:203-213.

Sajitha KL, Dev SA (2016) Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood. *Biol Control* 96:78-85.

Salunkhe VP, Sawant IS, Banerjee K, Wadkar PN, Sawant SD, Hingmire SA (2014) Kinetics of degradation of carbendazim by *B. subtilis* strains: possibility of *in situ* detoxification. *Environ Monit Assess* 186(12):8599-8610.

Sarode Prashant D, Rane Makarand R, Chaudhari Bhushan L, Chincholkar Sudhir B (2009) Siderophoregenic *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. *Malays J Microbiol* 5(1):6-12.

Scaloni A, Dalla Serra M, Amodeo P, Mannina L, Vitale RM, Segre AL, Cruciani O, Lodovichetti F, Greco ML, Fiore A, Gallo M, D'Ambrosio C, Coraiola M, Menestrina G, Graniti A, Fogliano V (2004) Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: cormycin A. *Biochem J* 384:25-36.

Segre A, Bachmann RC, Ballio A, Bossa F, Grgurina I, Iacobellis NS, Marino G, Pucci P, Simmaco M, Takemoto JY (1989) The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett* 255(1):27-31.

Seo S, Matthews KR (2012) Influence of the plant defense response to *Escherichia coli* O157:H7 cell surface structures on survival of that enteric pathogen on plant surfaces. *Appl Environ Microbiol* 78(16):5882-5889.

Seo S, Okamoto M, Seto H, Ishizuka K, Sano H, Ohashi Y (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270(5244):1988-1992.

Serino L, Reimmann C, Baur H, Beyeler M, Visca P, Haas D (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 249:217-228.

Shi C, Yan P, Li J, Wu H, Li Q, Guan S (2014) Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *Int J Environ Res Public Health* 11(1):1094-1105.

Siddiqui IA, Shaikat SS (2002) Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. *Biol Fertil Soils* 36(4):260-268.

Singh N, Varma A (2015) Antagonistic activity of siderophore producing rhizobacteria isolated from the semi-arid regions of southern India. *Int J Curr Microbiol App Sci* 4(9):501-510.

Sørensen D, Nielsen TH, Christophersen C, Sørensen J, Gajhede M (2001) Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Acta Crystallogr C* 57(Pt 9):1123-1124.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56(4):845-857.

Sutherland MW (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:79-93.

Swarnalakshmi K, Prasanna R, Kumar A, Pattnaik S, Chakravarty K, Shivay YS, Singh R, Saxena AK (2013) Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. *Eur J Soil Biol* 55:107-116.

Szczech M, Dyśko J (2008) The possibility to use selected mixtures of PGPR bacteria in tomato cultivation. *Veg Crop Res Bull* 68:47-56.

## T

Thrane C, Nielsen TH, Neiendam Nielsen M, Sørensen J, Olsson S (2000) Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 33(2):139-146.

Ton J, Davison S, Van Wees SC, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2001) The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol* 125(2):652-661.

Ton J, De Vos M, Robben C, Buchala A, Métraux JP, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2002) Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant J* 29(1):11-21.

Tonelli ML, Fabra A (2014) The biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 primes the defense response against *Cercospora sojina*. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2503-2509.

Tran H, Ficke A, Asimwe T, Höfte M, Raaijmakers JM (2007) Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol* 175(4):731-742.

Turan M, Gulluce M, Cakmakci R, Oztas T, Sahin F (2010) The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters. 19th World congress of soil science, soil solutions for a changing world, Australia, p140-145.

Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14 Suppl:S153-164.

## U

Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4(6):645-656.

Upadhyay A, Srivastava S (2010) Evaluation of multiple plant growth promoting traits of an isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Indian J Exp Biol* 48(6):601-609.

Upadhyay A, Srivastava S (2011) Phenazine-1-carboxylic acid is a more important contributor to biocontrol *Fusarium oxysporum* than pyrrolnitrin in *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Microbiol Res* 166(4):323-335.

## V

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4:356.

Vanittanakom N, Loeffler W (1986) fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiot* 39(7):888-901.

van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol* 103:753-765

van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453-483.

van Loon LC, van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97.

van Wees SCM, de Swart EAM, van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CMJ (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(15):8711-8716.

Vassilev V, Lavermicocca P, Di Giorgio D, Iacobellis NS (1996) Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. *Plant Pathol* 45(2):316-322.

Velho RV, Medina LF, Segalin J, Brandelli A (2011) Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiol* 56(4):297-303.

Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS, Thomashow L (2006) Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Can J Microbiol* 52(1):56-65.

Vespermann A, Kai M, Piechulla B (2007) Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl Environ Microbiol* 73(17):5639-5641.

Volpon L, Besson F, Lancelin JM (2000) NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>. FEBS Letters 485:76-80.

von Saint Paul V, Zhang W, Kanawati B, Geist B, Faus-Keßler T, Schmitt-Kopplin P, Schäffner AR (2011) The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. Plant Cell 23:4124-4145.

Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A (2016) Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol Res 184:13-24.

## W

Wang H, Hwang SF, Eudes F, Chang KF, Howard RJ, Turnbull GD (2006) Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. Plant Pathol 55:224-230.

Wegulo SN, Jackson TA, Baenziger TS, Carlson MP, Nopsa JH (2008) *Fusarium* head blight of wheat. University of Nebraska-Lincoln extension, p1-8.

Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell 17:1279-1291.

Wenke K, Kopka J, Schwachtje J, van Dongen JT, Piechulla B (2018) Volatiles of rhizobacteria *Serratia* and *Stenotrophomonas* alter growth and metabolite composition of *Arabidopsis thaliana*. Plant Biol. doi: 10.1111/plb.12878.

Wenke K, Wanke D, Kilian J, Berendzen K, Harter K, Piechulla B (2012) Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY18 function. Plant J 70(3):445-459.

White RF (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99:410-412.

Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. Cell Rep 1(6):639-647.

## X

Xu Z, Shao J, Li B, Yan X, Shen Q, Zhang R (2013) Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. Appl Environ Microbiol 79(3):808-815.

## Y

Yan J, Wang J, Zhang H (2002) An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. Plant J 29(2):193-202.

Yang M, Mavrodi DV, Mavrodi OV, Thomashow LS, Weller DM (2017) Construction of a recombinant strain of *Pseudomonas fluorescens* producing both phenazine-1-carboxylic acid and cyclic lipopeptide for the biocontrol of take-all disease of wheat. *Eur J Plant Pathol* 149(3):683-694.

Yang Y, Zhang Y, Ding P, Johnson K, Li X, and Zhang Y (2012) The ankyrin-repeat transmembrane protein BDA1 functions downstream of the receptor-like protein SNC2 to regulate plant immunity. *Plant Physiol* 159:1857-1865.

Yarden O, Aharonson N, Katan J (1987) Accelerated microbial degradation of methyl benzimidazol-2-ylcarbamate in soil and its control. *Soil Biol Biochem* 19(6):735-739.

Yoshikawa M, Yamaoka N, Takeuchi Y (1993) Elicitors: their Significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiol* 34(8):1163-1173.

Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnolli BL (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol Biochem* 34(7):955-963.

Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q (2012) Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol* 78(16):5942-5944.

## Z

Zhang H, Scheirer DC, Fowle WH, Goodman HM (1992) Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4(12):1575-1588.

Zhang J, Liu J, Meng L, Ma Z, Tang X, Cao Y, Sun L (2012) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate. *J Microbiol* 50(2):191-198.

Zhang S, Moyne AL, Reddy MS, Kloepper JW (2002) The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biol Control* 25(3):288-296.

Zhang ZG, Yuan-Chao Wang YC, li J, Ji R, Shen G, Wang SC, Zhou X, Zheng XB (2004) The role of SA in the hypersensitive response and systemic acquired resistance induced by elicitor PB90 from *Phytophthora boehmeriae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 65(1):31-38.

Zhu G, Wu H, Guo J, Kimaro FME (2004) Microbial degradation of fipronil in clay loam soil. *Water Air Soil Pollut* 153:35-44.

Zwicker S, Mast S, Stos V, Pfitzner AJ, Pfitzner UM (2007) Tobacco NIMIN2 proteins control PR gene induction through transient repression early in systemic acquired resistance. *Mol Plant Pathol* 8(4):385-400.

# *Annexes*

## **Annexe I: Milieux de culture**

### **1. Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre	200g/l
Glucose	20g/l
Agar-agar	20g/l
Eau distillée	1000ml

Le milieu est préalablement stérilisé à 121°C/20min/1.2Bar

### **2. Milieu minimal M9**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.9g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15g/l
NH <sub>4</sub> Cl	5g/l
NaCl	2.5g/l
Eau distillée	1000ml

Le milieu est préalablement stérilisé à 121°C/20min/1.2Bar

### **3. Gélose au lait (mise en évidence des protéases)**

Lait stérile	250ml/l
Gélose nutritive déshydratée	28g/l
Eau distillée	1000ml

La gélose nutritive est préalablement stérilisée à 121°C/20min/1.2Bar, puis stérilement ajoutée de lait stérile.

### **4. Gélose à la poudre de chitine (mise en évidence des chitinase)**

Poudre de chitine	10g/l
Milieu M9	1000ml

Le milieu est préalablement stérilisé à 121°C/20min/1.2Bar

## **Annexe I: Milieux de culture (Suite)**

### **5. Gélose au Tween 80 (mise en évidence des lipases)**

Tween 80 (monoléate de sorbitol)	16ml/l
Gélose nutritive déshydratée	28g/l
Eau distillée	1000ml

Le milieu est préalablement stérilisé à 121°C/20min/1.2Bar

### **6. Milieu 1/2 CAA (1/2 casamido acids)**

Casamido acids	5g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.25g/l
Eau double distillée	1000ml

Le milieu a été préparé et conditionné dans des récipients préalablement rincés à l'acide chloridrique concentré ; puis stérilisé à 121°C/20min/1.2Bar

## **Annexe II : Purification des produits de la PCR d'amplification de l'ADN génomique par « QIAquick PCR Purification Kit »**

1. Ajouter 5 volumes de tampon PB (Fourni dans le kit) à 1 volume de produits de PCR et mélanger.  
Par exemple, ajouter 500µl de tampon PB à 100µl de produits de PCR.
2. Placer une colonne de purification QIAquick dans un tube collecteur de 2 ml (fournis dans le kit).
3. Pour lier l'ADN, appliquer le volume (produits PCR+ tampon PB) sur la colonne QIAquick et centrifuger à 13,000rpm pendant 30 à 60s.
4. Jeter le fluide et placer la colonne QIAquick dans le même tube.
5. Pour laver, ajouter 0.75ml de tampon de purification PB à la colonne QIAquick (fourni dans le kit), et centrifuger à 13,000rpm pendant 30 à 60s.
6. Jeter le fluide et replacer la colonne QIAquick dans le même tube, puis centrifuger à 13,000rpm pendant 1min supplémentaire.  
**Important :** Les résidus d'éthanol du tampon PE ne seront pas complètement éliminés, sauf si le liquide est éliminé avant cette centrifugation supplémentaire.
7. Placer la colonne QIAquick dans un tube propre de 1.5ml.
8. Pour éluer l'ADN, ajouter 50µl de tampon d'élution EB (10mM Tris Cl, pH 8.5 ; fourni dans le kit) ou d'eau (pH 7.0 à 8.5) ; au centre de la membrane de la colonne. Centrifuger la colonne à 13,000rpm pendant 1min. Afin d'augmenter la concentration de l'ADN, ajouter 30µl de tampon d'élution au centre de la membrane de la colonne QIAquick. Laisser la colonne reposer pendant 1min puis centrifuger.  
**Important:** S'assurer que le tampon d'élution est distribué directement sur la membrane de la colonne pour une élution complète de l'ADN lié. L'efficacité de l'élution dépend du pH. Une élution maximale est atteinte entre pH 7.0 et 8.5. Lorsque l'eau est utilisée pour éluer l'ADN ; assurer que la valeur du pH est comprise dans cette intervalle
9. Stocker l'ADN à -20°C.
10. Si l'ADN purifié doit être analysé sur gel, ajouter 1 volume de colorant de chargement à 5 volumes d'ADN purifié. Mélanger la solution en pipetant de haut en bas avant chargement dans les puits du gel.

**Annexe III :** Concentrations et caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes de biosynthèses des cLPs et des gènes de défense d'*Arabidopsis*

#	Oligo Name	Oligo #	Len	Pur	Scale	MW	Tm°	µg/OD	OD	µg	nmol	Epsilon 1/(nmMcm)	Dimer	2ndry	GC %	µl for 100µM	Sequence(5'-3')
17594	A12g14610_qRTPCR.F	8022209197-000010	22	DST	0.025	6808	60.0	30.5	10.1	308.9	45.3	222.6	No	Moderate	50	454 µl	GGTTAGCGAGAAAGGCTA
17595	A12g14610_qRTPCR.R	8022209197-000020	22	DST	0.025	6621	62.8	33.5	8.6	288.7	43.6	197.2	No	Moderate	50	437 µl	CATCCGAGTCTCACTGAC
17596	A11g02450_qRTPCR.F	8022209197-000030	22	DST	0.025	6808	63.7	30.5	9.3	283.8	41.6	223.1	No	None	50	417 µl	CGTCGTGAGGAGGAAAT
17597	A11g02450_qRTPCR.R	8022209197-000040	22	DST	0.025	6737	62.6	30.4	10.4	316.7	47.0	221.2	No	None	50	471 µl	CCGTACGACACTGAGAG
17598	A15g54610_qRTPCR.F	8022209197-000050	21	DST	0.025	6477	63.7	32.1	8.9	286.2	44.1	201.4	No	None	52.3	442 µl	CGTCATCTGCTGGGAAGT
17599	A11g54610_qRTPCR.R	8022209197-000060	21	DST	0.025	6359	61.7	31.5	10.4	327.8	51.5	201.7	No	None	47.6	516 µl	GCAACGGACTTAACCCAT
7600	A11g28480_qRTPCR.F	8022209197-000070	23	DST	0.025	7282	64.9	29.2	10.3	300.8	41.3	249.3	No	None	47.8	414 µl	GATTGATGAGGAGGGAGATG
7601	A11g28480_qRTPCR.R	8022209197-000080	21	DST	0.025	6359	61.7	31.4	9.1	286.4	45.0	202	No	Weak	47.6	451 µl	CTACATAAACCCGGGTA
7602	A15g03350_qRTPCR.F	8022209197-000090	22	DST	0.025	6820	61.2	31.8	9.3	295.9	43.3	214.3	No	Weak	40.9	434 µl	GTTGCTGAGAAAGCTGGTATT
7603	A15g03350_qRTPCR.R	8022209197-000100	22	DST	0.025	6572	60.6	34.5	7.8	269.6	41.0	190.1	No	Very Weak	50	411 µl	GCCTTGTAACCTCTCCATTAC
7604	A13g11340_qRTPCR.F	8022209197-000110	21	DST	0.025	6292	61.2	33.6	9.3	313.0	49.7	186.9	No	None	47.6	498 µl	ACCGTTAACCTCTCAGCTTC
7605	A13g11340_qRTPCR.R	8022209197-000120	22	DST	0.025	6723	59.7	33.8	9.6	324.8	48.3	198.7	No	Weak	50	484 µl	GTGAGTCTGCCTTAGTCTTTG
606	srAA F	8022209197-000130	25	DST	0.025	7766	71.5	29.2	11.1	324.6	41.8	265.5	No	Weak	44	419 µl	ACGAATGCCGAAGAAAGGAGATGC
507	srAA R	8022209197-000140	22	DST	0.025	6702	71.9	33.6	9.5	319.7	47.7	199.1	No	Moderate	59.0	478 µl	CGGTATCCCGGCGCTTTGACCT
308	bmyB F	8022209197-000150	24	DST	0.025	7392	65.6	31.3	10.9	341.4	46.1	236	No	Weak	41.6	462 µl	GTGAATGAGCTTCAAAATGCC
309	bmyB R	8022209197-000160	27	DST	0.025	8315	62.9	29.9	10.9	326.7	39.2	277.4	No	Weak	33.3	393 µl	GGCAAGAATCTCTGATTATCAAG
10	ferD F	8022209197-000170	24	DST	0.025	7381	72.2	33.5	9.1	305.1	41.3	220.1	No	Weak	45.8	414 µl	TCCATCTGCAATGTTTTGGTG
11	ferD R	8022209197-000180	23	DST	0.025	6911	73.1	35.0	10.2	357.6	51.7	197.1	No	Weak	60.8	518 µl	GCCTCTTCAAGCCGCTTCAGC
2	myc F	8022209197-000190	26	DST	0.025	8082	83.1	32.5	10.5	341.8	42.4	247.6	No	Weak	69.2	425 µl	ACAGGCTCTGGCGAAGCGGTGCGACG
3	myc R	8022209197-000200	23	DST	0.025	6993	68.5	31.2	10.2	318.2	45.5	224.1	No	Weak	47.8	456 µl	AAAGTTCATCGGATATCCAC

## Annexe IV : Extraction de l'ARN total par phénol chaud « Mini hot phenol »

- Décongeler le phénol et régler le bain-marie à 60°C sous hotte.
- Préparez des tubes de phénol chaud en mettant, dans un tube de 1,5 ml, et  
250µL de phénol  
500µL de tampon d'homogénéisation (composition ci-dessous)  
5µL de β-mercaptoéthanol
- Chauffer dans le bain-marie à 60°C.

1. Ajouter le mélange de phénol chaud à la poudre de tissus d'*Arabidopsis* (décrite la section *Extraction des ARNs totaux*) ; bien agiter les tubes pendant 15 min.
2. Ajouter 250µl de chloroforme et agiter pendant 15 min supplémentaires.
3. Centrifuger à vitesse maximale pendant 10 min et à température ambiante.
4. Transférer 550µl de la phase aqueuse dans un nouveau tube et ajouter 550µl du phénol: chloroforme ; agiter pendant 10 min et centrifuger pendant 10 min.

A partir de cette étape, faire très attention afin d'éviter la contamination par la RNase.

5. Transférer 500µl de la phase aqueuse dans des tubes propres. Ajouter 50µl d'acétate de sodium 3M et 400µl d'isopropanol.
6. Incuber à -80°C pendant 15 min, puis centrifuger à vitesse maximale pendant 30 min à 4°C.
7. Eliminer tout le surnageant, laisser sécher pendant 10 min ; puis resuspendre dans 500µl d'eau stérile.
8. Ajouter 500µl de LiCl à 4M (concentration finale de 2M), et incuber à 4°C pendant la nuit.
9. Centrifuger à vitesse maximale pendant 30 min à 4°C

Le surnageant contient l'ADN génomique et peut être conservé si nécessaire, le culot d'ARN peut être invisible si très propre mais est généralement blanc.

10. Rincer le culot avec 1ml d'éthanol à 80%, centrifuger pendant 5 minutes et éliminer soigneusement la phase éthanolique.

Si le culot était invisible, il devrait apparaître blanc après addition de l'éthanol. Centrifuger les tubes une seconde fois rapidement et éliminer l'éthanol qui reste.

**Annexe IV** : Extraction de l'ARN total par phénol chaud « Mini hot phenol »  
(Suite)

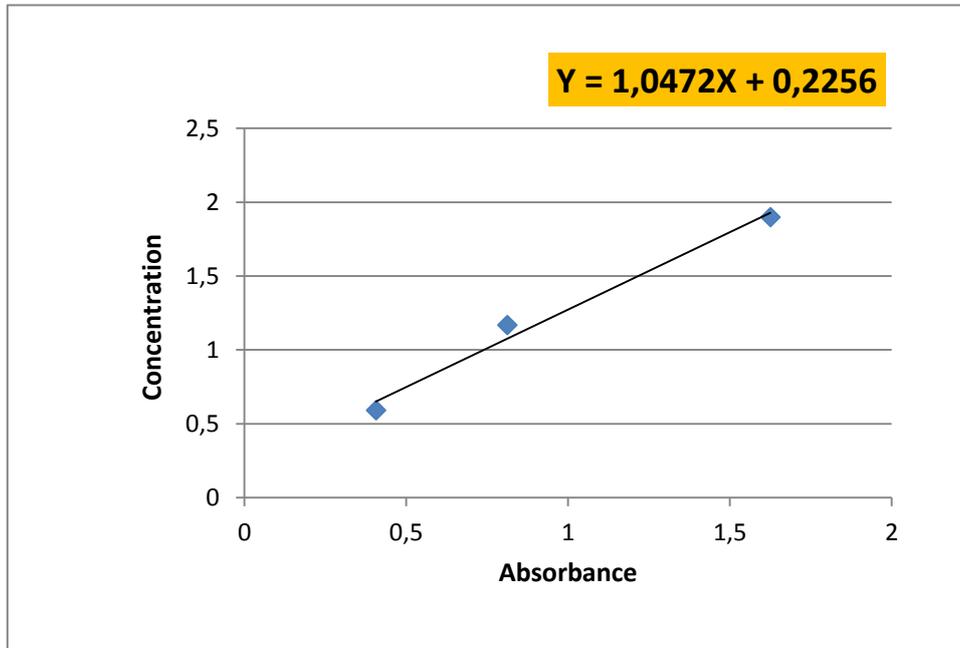
11. Secher le culot avec un dessiccateur à vide, puis resuspendre dans 60µl d'eau stérile.

12. Quantifier l'ARN extrait par un spectromètre.

*Tampon d'homogénéisation*

<b><i>Produits</i></b>	<b><i>Concentration</i></b>	<b><i>Concentration finale</i></b>	<b><i>Pour 100 ml</i></b>	<b><i>Pour 400 ml</i></b>
Tris (pH entre 8 et 9)	1M	100mM	10ml	40ml
EDTA (pH=8)	0.5M	5mM	1ml	4ml
NaCl	5M	100mM	2ml	8ml
SDS	10%	0.5%	5ml	20ml

**Annexe V : Courbe d'étalonnage du 3-5-dinitro salicylate**



X : Absorbance enregistrée du milieu après centrifugation,

Y : Concentration de salicylate produit.

**Annexe VI : Croissance des isolats et capacités de dégradation des fongicides.**

<i>Bactérie à Gram</i>	<i>Souches</i>	<i>Fongicide + milieu de culture</i>							
		<i>Propicone+</i>		<i>Curitine V+</i>		<i>Vapcotop +</i>		<i>Kazir+</i>	
		<i>BN</i>	<i>M9</i>	<i>BN</i>	<i>M9</i>	<i>BN</i>	<i>M9</i>	<i>BN</i>	<i>M9</i>
<i>Positif</i>	30INH	+		+		+		+	
	XI45			+		+		+	
	XI52					+		++	+
	XI54			++		+		+	
	XI29	+		+		+		+	
	XI13					+		+	
	XI30					+		+	
	XI9	++		+		+		+++	
	XI44	+				+			
	B21			+		+			
	B5					+		+	
	XI15					+			
	XI17					+			
	A16					+			
	P35					+			
	XI48					+			
	XI12					+		+	
	XI46			+		+++	+	++	
	XI2	+				+++		+	
	30C			+		++		+	
	B10	+		+		++	+	+	
	37INH	+	+	+		++		++	
	P38	+		+		+			
	X6					++			
	B14	+				++		+	
	A1			+		+		++	
	XI10	+		+		+			
	XI16					+			
	XI23			+		+			
	XI49					+		+	
AgN41	+		+		+		+		
XI1			+		+		+		
XI5			+		+		+		
<i>Négatif</i>	XI14	++	+	++	+	+		+	+
	XI11	+++		+++		++		++	
	XI6	++		++		+++		+	
	P37	++		++		++		++	
	XI42	+		+		+		+	
	XI3	+		+		+		+	
	XI20	+++		+++		+++		+++	
	XI39	++		+		+++		+	
	29INH	+++		++		++		++	
	XI22	+		+		+		+	
	XI47	++		+		+++		++	
	P29	+		+	+	+		++	+

BN : bouillon nutritif, M9 : milieu minimal M9

# *Publications*

## **Publications**

**Benslim A**, Mezaache-Aichour S, Haichour N, Aissat K, Zerroug MM (2018) Biofilm formation and regulation of salicylic acid-inducible genes expression in *Arabidopsis* by Algerian indigenous bacteria from wheat and potatoes rhizospheres in semi-arid Sétif region. Arch Microbiol 200:1395-1405.

**Benslim A**, Mezaache-Aichour S, Haichour N, Chebel S, Zerroug MM (2016) Evaluation of inhibition of fungal spore germination by rhizospheric bacterial extracts. Ann Res Rev Biol 11(5):1-7.

*Biofilm formation and regulation of salicylic acid-inducible genes expression in Arabidopsis by Algerian indigenous bacteria from wheat and potatoes rhizospheres in semi-arid Sétif region*

**Asma Benslim, Samia Mezaache-Aichour, Nora Haichour, Kamel Aissat & Mohamed Mihoub Zerroug**

**Archives of Microbiology**

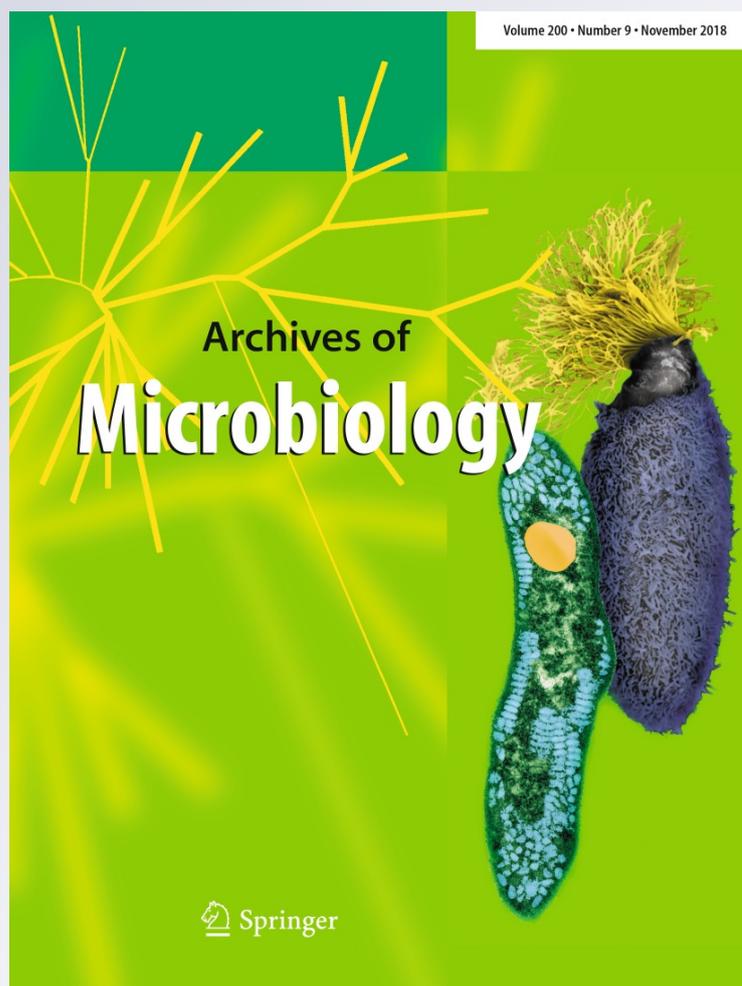
ISSN 0302-8933

Volume 200

Number 9

Arch Microbiol (2018) 200:1395-1405

DOI 10.1007/s00203-018-1556-5



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Biofilm formation and regulation of salicylic acid-inducible genes expression in *Arabidopsis* by Algerian indigenous bacteria from wheat and potatoes rhizospheres in semi-arid Sétif region

Asma Benslim<sup>1</sup> · Samia Mezaache-Aichour<sup>2</sup> · Nora Haichour<sup>2</sup> · Kamel Aissat<sup>3</sup> · Mohamed Mihoub Zerroug<sup>2</sup>

Received: 28 March 2018 / Revised: 16 July 2018 / Accepted: 18 July 2018 / Published online: 21 July 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

45 bacterial isolates from potatoes and wheat rhizospheres near Sétif (Algeria) pre-selected for their antagonistic activity against three fungal plant pathogens, two necrotrophic *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Phytophthora infestans*, and a systemic *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*. Molecular typing of the isolates showed abundance of *Bacillus* compared to *Pseudomonas*. Some of the tested strains have shown very high biofilm formation. Among the 24 Gram-positive bacilli screened for four cyclic lipopeptides genes, some isolates harbor two or more genes, while others have a single gene or have none. Four selected isolates were able to regulate the expression of six defense-related genes in *Arabidopsis* and produce salicylic acid. Upon the features assessed in this study, strain *B. amyloliquefaciens* A16 was selected for a subsequent use as seed treatment and biocontrol agent in semi-arid region fields. This strain showed important biofilm formation, regulation of *Arabidopsis* defenses, and harbored three cLPs genes.

**Keywords** Biocontrol · Rhizobacteria · Antagonism · Biofilm · Cyclic lipopeptides · Induced systemic resistance

## Introduction

Over the past few decades, the use of agrochemicals for crop protection has increased with the increase of agricultural production. However, the negative impact on environmental and human health and the growing cost associated with the use of chemical pesticides have boosted the development

of other methods and substitutes for chemical control that protect both the environment and consumers. Many microorganisms, mainly fungi such as *Trichoderma harzianum* or bacteria like *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Klopper et al. 2004), with biological traits such as antibiosis via production of antimicrobial compounds (Grover et al. 2010; Couillerot et al. 2011; Hua and Höfte 2015), production of hydrolytic enzymes; competition for nutrients (Mezaache-Aichour et al. 2014); plant root colonization (Raaijmakers and Weller 2001; Landa et al. 2002; Kamilova et al. 2005); and induction of plant defenses (Kamilova et al. 2005; Cawoy et al. 2014) are used for biocontrol applications as effective alternatives to control plant pathogens (Grover et al. 2010).

Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* species are known to play a key role in stimulation of plant growth and health through different mechanisms of antagonism. A part of the antagonistic activity is due to non-ribosomally produced secondary metabolites known as cyclic lipopeptides or cLPs (Rokni-Zadeh et al. 2012; Hua and Höfte 2015; Yang et al. 2017). *Bacillus* lipopeptides belong to surfactin, iturin, and fengycin families (Ongena and Jacques 2008; Grover et al. 2010). Members of the iturin family (iturin A, mycosubtilin, and bacillomycin D) have a strong inhibitory effect

Communicated by Erko Stackebrandt.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1556-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Asma Benslim  
asmben2017@gmail.com

- <sup>1</sup> Laboratory of Ecological Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Béjaïa, 06000 Béjaïa, Algeria
- <sup>2</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Ferhat Abbas Sétif 1, 19000 Sétif, Algeria
- <sup>3</sup> Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Batna 2, 05000 Batna, Algeria

against fungal pathogens (Yu et al. 2002; Moyne et al. 2004; Leclère et al. 2005; Xu et al. 2013). Surfactin is involved in biofilm formation, antifungal, and bactericidal activities of the producing bacterium (Bais et al. 2004), while fengycin family members have a strong fungitoxic activity (Koumoutsi et al. 2004; Dunlap et al. 2011). Moreover, surfactin and fengycin can trigger systemic defense pathways of plants (Ongena et al. 2007; Cawoy et al. 2014).

Induced resistance is based on regulations in expression of defense-related genes. A defensive state occurs when genes are either induced or repressed leading to changes in plant metabolites (Ahmad et al. 2014) and systemic defenses; consequently, the plant survives pathogen infection. One of the most active defense pathways is the salicylic acid (SA) pathway (Armijo et al. 2013; Ahmad et al. 2014) that involves different early and late SA-responsive defense and housekeeping genes (Blanco et al. 2009; Ahmad et al. 2011; Armijo et al. 2013, Herrera-Vásquez et al. 2014). In the past years, more intention is assigned to the use of rhizospheric bacteria as inducers of natural defense pathways in plants (Dutta et al. 2008; Ramarathnam et al. 2011; Tonelli and Fabra 2014; Kim et al. 2015).

The aim of the present study, is to identify the basis of the antifungal activity of 45 bacterial strains isolated from rhizospheres of potatoes and wheat, growing in fields near Sétif, Algeria (Mezaache-Aichour et al. 2013) by (a) assessing their ability to form biofilms, (b) screening for the presence of genes encoding antifungal lipopeptides, and (c) evaluating their ability to produce SA and elicit the expression of SA-regulated defense genes in *Arabidopsis thaliana* plants.

## Materials and methods

### Biological material

The 45 strains used in this study were previously isolated and selected based on their antifungal activity against soil-borne pathogenic fungi (Mezaache-Aichour et al. 2013); biofilm forming strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, coagulase-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Laboratory of Microbiology and Parasitology CHU, Sétif, Algeria) and PGPR referenced strain *Pseudomonas protegens* sp. nov (CHA0; a gift from Prof. Haas, Lausanne, Switzerland).

### Biofilm formation assay

Adhesion of the bacterial isolates to plastic surfaces was examined using the CV microtitre-plates method described in Elhariry (2011) with some modifications. The wells of flat bottom sterile 96-well plates were filled with 230 µl of tryptone soy broth (TSB, Merck, Germany) and inoculated

with 20 µl of each bacterial culture ( $10^8$  CFU/ml; 8 wells per strain) grown for 18 h in nutrient broth (NB). Plates were incubated under static conditions at room temperature for 48 h. Negative control wells contained TSB only and biofilm forming coagulase-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and the PGPR referenced strain CHA0 were used as positive control. After 48 h, the contents of the plates were poured off and the wells were washed three times with 300 µl of NB. Attached bacteria were fixed with 250 µl of 99.8% methanol (Sigma-Aldrich, Germany) for 15 min, plates were emptied and air dried, adherent cells were stained with 250 µl of 0.5% crystal violet for 5 min. The excess of stain was rinsed off by placing the plates under running tap water. The dye bound to the adherent cells was extracted with 250 µl of 99.9% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, Germany) and the OD was measured at 630 nm using ELx800 Absorbance Reader (BioTek Instruments, USA).

### Genotyping of selected antifungal strains

Chromosomal DNA was extracted from bacterial cultures grown overnight at 30 °C on NB and used for both strain identification down to species level and for cLPs genes amplification. Bacterial strains were identified by sequencing the 16S rRNA (Table 1). Amplification was carried out using the universal primers S-D-Bact-0341-b-S-17:5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' and S-D-Bact-0515-a-A-19:5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'. The 16S rRNA sequences were compared to sequences in the GenBank database using the Basic Alignment Search Tool (BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### Screening for cLPs genes

24 Gram-positive bacilli showing the highest antifungal activity in preselection were screened for the presence of cLPs encoding genes. Primer sequences used to amplify targeted genes are listed in Table 1.

### Expression of SA-inducible defense genes in *Arabidopsis*

#### Plant growth

*Arabidopsis thaliana* var. Columbia (*Arabidopsis* Col-0) were surface sterilized with 70% ethanol for 10 min, diluted sodium hypochlorite for 10 min, rinsed twice with sterile tap water and resuspended in sterile distilled H<sub>2</sub>O, incubated at 4 °C for 24 h on ½ Murashige and Skoog agar to promote seed germination. Seedlings were then grown for 10 days in a growth chamber at 25 °C, 16 h of light and 8 h of night,

**Table 1** Primers used for amplification of 16S rRNA, cLPs genes and the *Arabidopsis* defense genes

Gene	Primer	Sequence	Source
16S rRNA	S-D-Bact-0341-b-S-17	F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Herlemann et al. (2011)
	S-D-Bact-0515-a-A-19	R 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'	Huse et al. (2008)
Surfactin A	srfAA	F 5'-ACGAATGCGAAAGAAAAGCAGATGC-3'	*
		R 5'-CGGTATCCGCGGACTTTGACCT-3'	
bacillomycin	bmyB	F 5'-GTGAATGAGCTGTTCAAAATGTCC-3'	*
		R 5'-GGCAAAGAAATCTCTGATTATATCAAG-3'	
Fengycin D	fenD	F 5'-TCCATCTGGCAATTGTTTTGGTGG-3'	*
		R 5'-GCTCTCCTTCAAGCCGCTTCAGC-3'	
Mycosubtilin	myc	F 5'-ACAGGCTCTGGCGAAGGCGTGGCAGC-3'	*
		R 5'-AAACGTTCCATCGGGATATCCAC-3'	
<i>prl</i>	At2g14610	F 5'-GGTTAGCGAGAAGGCTAACTAC-3'	**
<i>nimin1</i>	At1g02450	R 5'-CATCCGAGTCTCACTGACTTTC-3'	**
		F 5'-CGTCGTGAGGAGGAAATCTAAC-3'	
<i>ank</i>	At1g54610	R5'-CCGTACGACACTGAGAGAAATC-3'	**
		F 5'-CGTCATCTGCTGGGAAGTTAG-3'	
<i>grxc9</i>	At1g28480	R 5'-GCAACGGACTTAACCCATACT-3'	**
		F 5'-GATTGATGAGGAGAGGGAAGATG-3'	
<i>llp1</i>	At5g03350	R 5'-CTACATAAACC GCCGTA ACT-3'	**
		F 5'-GTTGCTGAGAAAGCTGGTTATT-3'	
<i>ugt76b1</i>	At3g11340	R 5'-GCCTTGACCTCTCTCCATTAC-3'	**
		F 5'-ACCGTTAACCTCTCAGCTTTC-3'	
		R 5'-GTGAGTCTGCCTTAGTCTCTTG-3'	

\*Designed by Dr Christoph ENGL from NCBI adapted sequences

\*\*Designed by Dr Fuquan LIU from NCBI adapted sequences

37% relative humidity and 4000 Lux light intensity at the plant-top level.

Plates with 10-day-old seedlings were treated for 24 h under aforementioned growth condition with (i) 5 ml of ½ MS medium (negative control, CK), (ii) 2 ml of 250 µM salicylic acid (positive control, SA), and (iii) 5 ml of bacterial suspensions (*B. amyloliquefaciens* A16, *B. oryzaecorticis* XI44, *B. pumilus* B10 and *P. plecoglossicida* XI39, respectively, in ½ MS medium at a final concentration of 10<sup>8</sup> CFU/ml).

### Real-Time qRT-PCR

Total *Arabidopsis* RNA was extracted following the Mini Hot Phenol *Arabidopsis* RNA extraction procedure (Mylne et al. 2010) and treated with TURBO DNase (Ambion, Life Technologies) to remove contaminant genomic DNA. Reverse transcription of each treatment was performed in triplicates using: RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA), Quantitect primer mix and dNTPs (Quia-gen, Germany). The qRT-PCR assays were performed in the Light Cycler 480 Instrument II Real-Time qPCR System (Roche Life Science, Germany) using the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Life Science, Germany)

following the standard protocols: initiation for 5 min at 95 °C, with 40 cycles of amplification and quantification for 10 s at 95 °C, 20 s at 60 °C and 45 s at 72 °C. The *prl* mRNA, *nimin1* mRNA, *ank* mRNA, *grxc9* mRNA, *llp1* mRNA, and *ugt76b1* mRNA sequences were amplified using the target-specific primer pairs in Table 1. The ubiquitin gene was used as housekeeping gene.

### Salicylic acid production

Salicylic acid production was evaluated in vitro on casamino acids (CAA) medium as previously described by Serino et al. (1995) with some modifications. Fifty microliters from each overnight bacterial culture grown on nutrient broth (10<sup>8</sup> CFU/ml) were used to inoculate 1.4 ml of CAA medium. Bacterial cultures were grown in triplicates and one tube containing CAA medium only was used as negative control. Tubes were incubated at room temperature with constant shaking (150 rpm) for 40 h, then they were centrifuged at 4000 rpm for 10 min and supernatants were recovered for optical density (OD) measurements at 540 nm wavelength. Produced SA concentrations were estimated using a linear equation derived from the calibration curve using 3-5-dinitro salicylate.

## Statistical analysis

Statistical analysis was carried using the software Microsoft Excel 2013. The one-way ANOVA test was used to compare in vitro biofilm formation and *Arabidopsis* genes regulation assay's results, with confidence levels of 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## Results and discussion

This study highlights some features involved in the mechanisms by which soil microorganisms promote plant's growth and health in semi-arid regions. A number of rhizobacterial strains pre-selected on the basis of their antagonistic activity against soil borne phytophthogenic fungi were identified, then assessed for cLPs genes screening, biofilm formation and SA production as mechanisms involved in the antagonism of some of the isolates. Regulation of the expression of SA-responsive genes in *Arabidopsis* by four selected strains was also highlighted in this work.

### Identification of tested strains

The 45 strains pre-selected for their inhibitory potential on fungal mycelia (Mezaache-Aichour et al. 2013) were subjected to molecular typing. DNA sequences of 16S rRNA genes allowed the phylogenetic affiliation of 41 strains. Sequences have been deposited in Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under accession numbers in the supplement table. BLAST analysis allowed the identification of several species mainly of the *Bacillus* and *Pseudomonas* groups. *Bacillus* genus is more abundant than *Pseudomonas*; these results were also obtained by Bouaoud et al. (2018). Among the 45 strains, 33 were Gram-positive and 12 were Gram-negative. 26 Gram-positive strains were identified as *Bacillus*, 2 as *Virgibacillus* and 1 as *Paenibacillus*. *B. amyloliquefasciens* was the most frequent Gram-positive species (30.30%) followed by *B. subtilis* (24.24%). *Pseudomonas* sp. species were the most abundant among the Gram-negative isolates (33.33%). Three potential human pathogenic species were identified: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Hafnia alvei* and *Stenotrophomonas maltophilia* (8.33% each). Whereas, four isolates, B14, XI16, XI17 and AgN41, were not identified in any database (Supplement table).

### Biofilm formation

Strains clearly differed in their biofilm formation capability. Positive control *Pseudomonas* ATCC had higher ability to form biofilm than referenced CHA0 strain and *Staphylococcus* ATCC. Gram-positive strains were more efficient in biofilm formation than Gram-negatives. The most significant

biofilm formation was recorded with the Gram-positive isolate B14 followed by *Bacillus* sp. A1 and *B. subtilis* XI9, while a less significant ability was observed in the Gram-positive isolate XI16, *B. amyloliquefasciens* A16, *B. subtilis* XI45 and *B. amyloliquefasciens* XI23, respectively (Fig. 1).

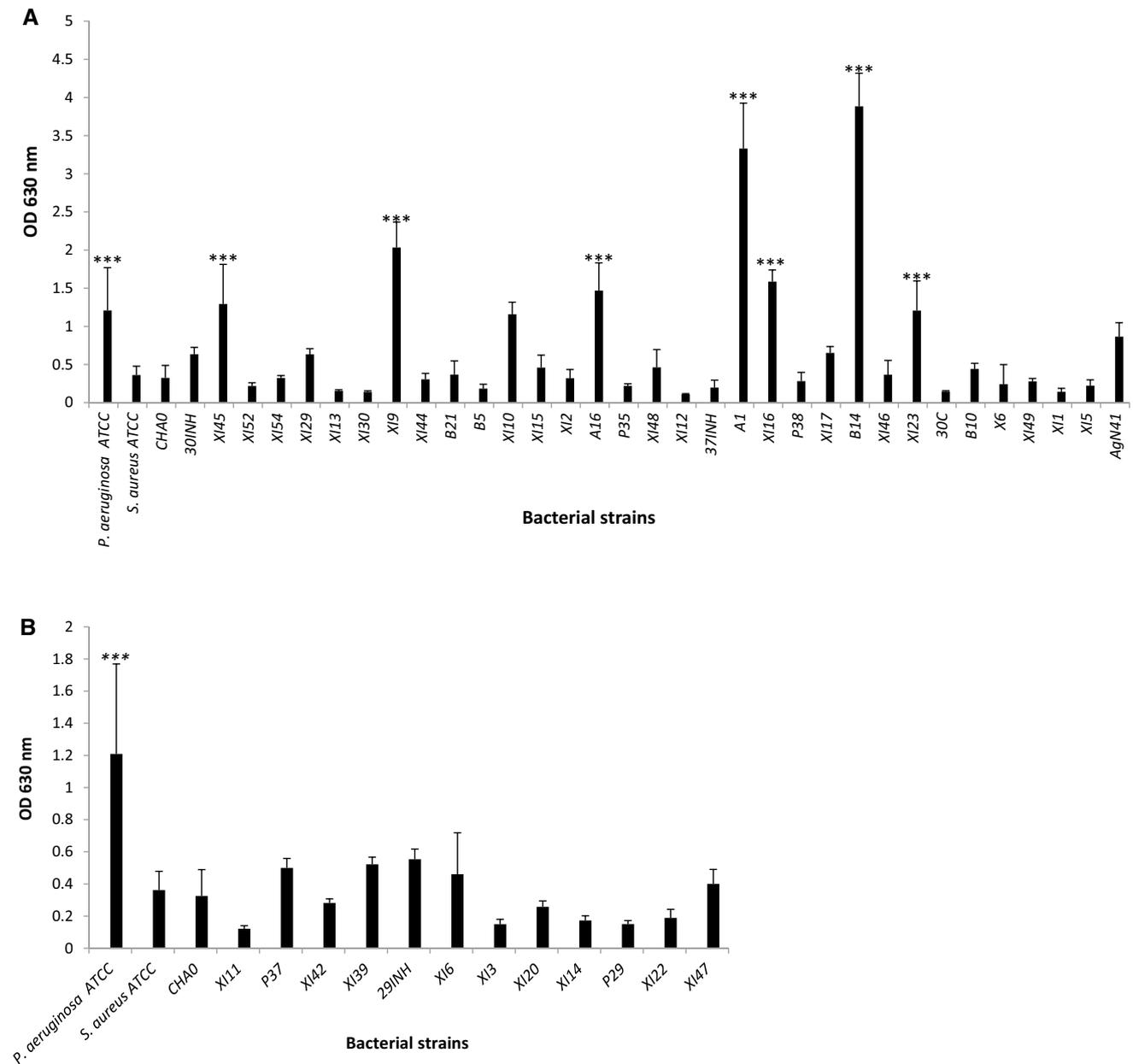
Biofilm formation is implied as a biocontrol mechanism in *Arabidopsis* against *P. syringae* (Bais et al. 2004). In this study, B14, A1 and XI9 are the isolates with the highest biofilm formation ability. In a previous study, B14 had inhibition percentage of 56% on fungi *Stiebum* sp. and *Dothichiza* sp., while A1 inhibited the mycelial growth of *Dothichiza* sp. by 60% (Khababa and Nouasria 2016). Other important biofilm forming agents *B. amyloliquefasciens* A16 and *B. subtilis* XI45 have an important antifungal activity. A16 inhibited the growth of *Fusarium* sp. 2 by 63% (Challal and Attar 2016) and of *Dothichiza* sp. by 70% (Khababa and Nouasria 2016), while XI45 inhibited the growth of *Fusarium* sp. 5 by 62% (Challal and Attar 2016).

### Screening for cLPs genes

The 24 most active antifungal Gram-positive isolates were screened for the presence of cLPs genes. The most widespread gene is *fenD* found in 17 strains (70.33%) followed by *srfAA* and *bmyB* genes detected, respectively, in 66.66% and 58.33% of the tested strains, while mycosubtilin-encoding gene (*myc*) was found in only 6 strains (25%, Fig. 2A). The *srfAA* and the *fenD* genes are more frequent among the *B. subtilis* strains, while the *bmyB* and the *fenD* gene are the most abundant among the *B. amyloliquefasciens* strains. Strains B14, *B. subtilis* XI30 and *Virgibacillus proomii* XI49 harbor all four targeted genes (Fig. 2B), while *B. subtilis* XI29, *B. pumilus* (30C, B10 and P38) did not harbor any cLPs gene.

Lipopeptides families are known to act in a synergistic manner as suggested by several studies on surfactin and iturin (Maget-Dana et al. 1992), surfactin and fengycin (Ongena et al. 2007) and iturin and fengycin (Koumoutsi et al. 2004; Romero et al. 2007). *B. subtilis* strain was found to produce three lipopeptides: iturin A, surfactin and fengycin (Grover et al. 2010; Dunlap et al. 2011; Liu et al. 2014), while *B. amyloliquefasciens* FZB42 produced bacillomycin, fengycin and surfactin (Koumoutsi et al. 2004). Hence, the co-existence of two or more cLPs genes has been reported in many strains in this study. Strains XI49, A1, XI30, and B14 harbor all four cLPs genes, while *B. amyloliquefasciens* (A16, XI13, B21, and 30INH) and *B. subtilis* strains (XI45 and XI52) have three cLPs genes: *srfAA*, *bmyB*, and *fenD*.

Mycosubtilin, bacillomycin, surfactin, and fengycin are proved to be responsible of the antagonistic activity of the producing strains (Leclère et al. 2005; Xu et al. 2013; Liu et al. 2014). The combination of fengycin and surfactin from *B. subtilis* led to a significant inhibition of

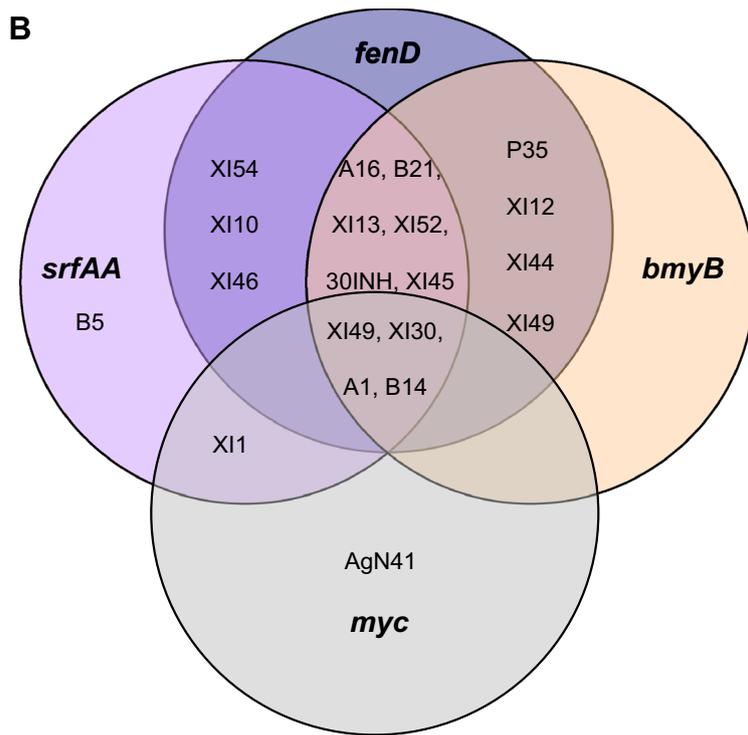
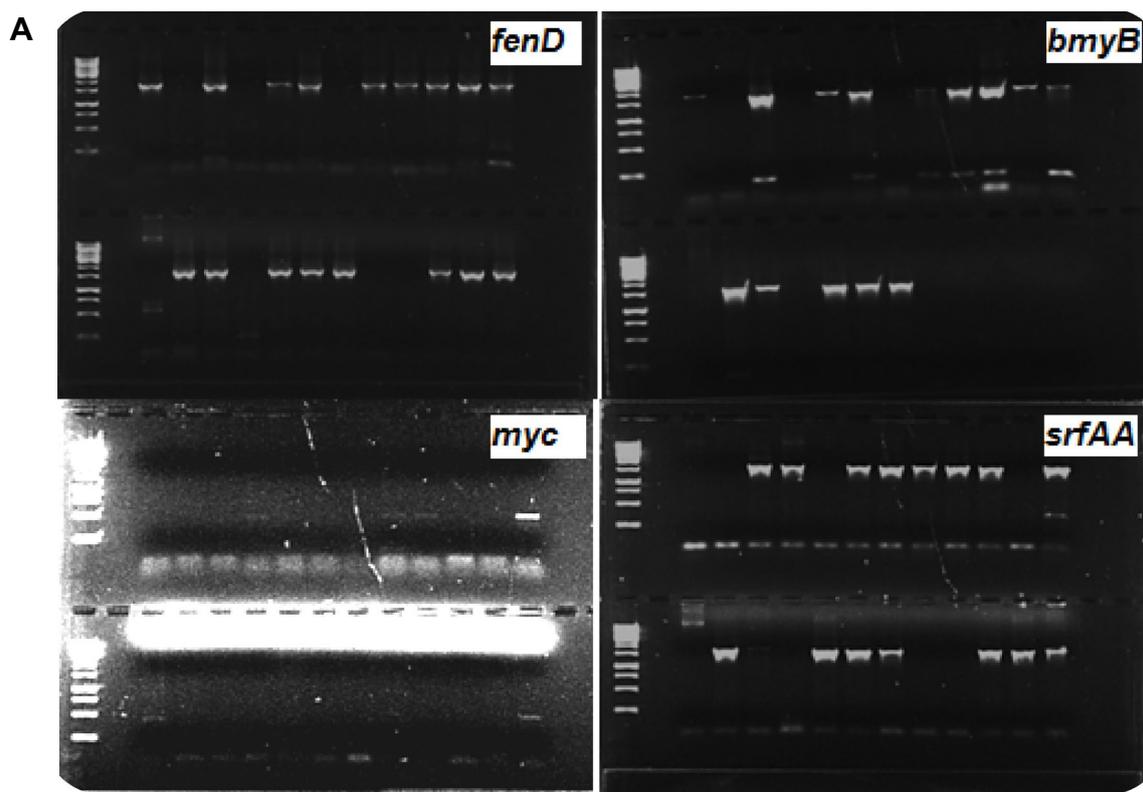


**Fig. 1** Biofilm formation capacity of the bacterial strains on TSB in 48 h culture evaluated by CV microtiter-plate assay. **A** Gram-positive strains, **B** Gram-negatives. X-axis: bacterial strains, Y-axis: optical density of dissolved CV stain. Mock consisted of TSB only, positive control consisted of three reference strains: biofilm forming:

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, coagulase-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and referenced strain CHA0. Error bars are the standard deviation from eight replications per strain. \*\*\*Significant difference ( $p < 0.05$ )

spore germination indicating a potential synergy (Liu et al. 2014). In previous studies, strains *Virgibacillus proomii* XI49 and *B. amyloliquefaciens* B21 have shown a total inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* spore germination (Benslim et al. 2016) and inhibition rate of 60 and 67%, respectively, against two *Fusarium* sp. isolates (Chalal and Attar 2016). These two strains harbor both surfactin and fengycin encoding genes. *B. amyloliquefaciens* P35

(*fenD*<sup>+</sup>, *bmyB*<sup>+</sup>) previously showed significant mycelial growth and spore germination inhibitions (47 and 100%, respectively) against *F. solani* var. *Coeruleum* (Lahrache and Boulekfouf 2014; Benslim et al. 2016), while strains *B. amyloliquefaciens* XI12 (*bmyB*<sup>+</sup>, *fenD*<sup>+</sup>) and *V. halodenitrificans* XI1 (*srfAA*<sup>+</sup>, *myc*<sup>+</sup>) have inhibited 59 and 61%, respectively, of *F. solani* var. *coeruleum* mycelial



**Fig. 2** **A** PCR profile for CLPs encoding genes in 24 Bacilli using specific primers for antibiotic biosynthesis genes in antagonistic bacteria. Detection of: the *fenD* gene of the fengycin synthetase biosynthesis cluster, the *bmyB* gene of bacillomycin B synthetase

biosynthesis operon: the *myc* gene of the mycosubtilin synthetase biosynthesis cluster the *srfAA* gene of the surfactin synthetase biosynthesis operon. **B** Venn diagram showing the prevalence of cLPs genes in Gram-positive bacilli

growth (Lahrache and Boulekfouf 2014); suggesting possible new antifungal combinations of cLPs.

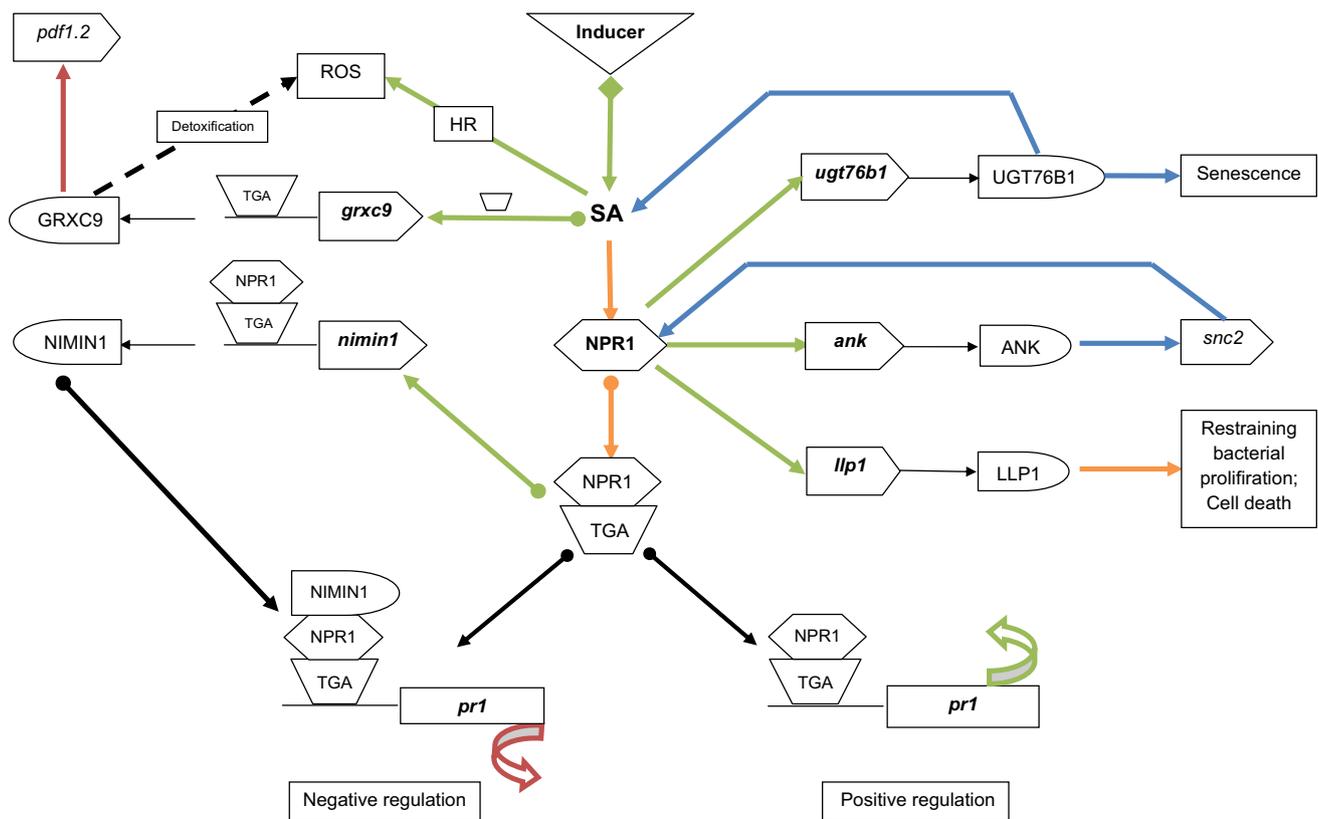
Although strains *B. pumilus* (B10, 30C) and *B. subtilis* XI29 do not harbor any of the screened cLPs genes, still they kept a very considerable antifungal activity. B10 showed inhibition rates of 46% and 50% against fungal strains *Didymabotrium* sp. 18 and *Dothichiza* sp. 20, respectively (Bekai and Aggoun 2016), while 30C inhibited the mycelial growth of *Fusarium* sp. 2 and a non-identified pathogenic fungal strain 14 by 60 and 81%, respectively (Challal and Attar 2016). Strain *B. subtilis* XI29 showed important inhibition rates of mycelial growth (49%; Lahrache and Boulekfouf 2014) and spore germination (81%; Benslim et al. 2016) when tested against *F. solani* var. *coeruleum*. These results are suggestive that a different mechanism than cLPs might be involved in the antifungal ability of these strains. Production of proteases was proved in the case of *B. pumilus* B10, 30C and P38 (data not shown). Ren et al. (2013), also found that

proteases and cellulases were involved in the antagonistic activity *B. pumilus* JK-SX00.

Surfactin and Bacillomycin are involved in root colonization and biofilm formation ability (Bais et al. 2004; Xu et al. 2013), while mycosubtilin is involved in swarming process and spreading on solid medium (Leclère et al. 2006). It is crucial to point that the most important biofilm forming and antagonistic isolates above-mentioned harbor the *srfAA*, *bmyB* and *myc* genes. This correlation may explains why *B. pumilus* (B10, 30C, and P38) and *B. subtilis* XI29 missing these three genes have a very low biofilm formation activity.

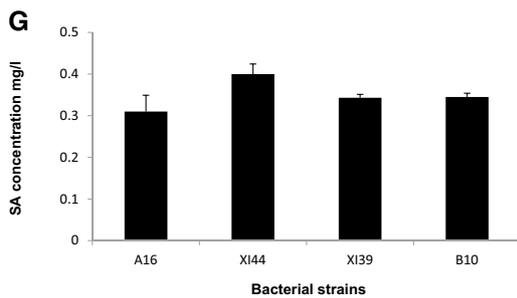
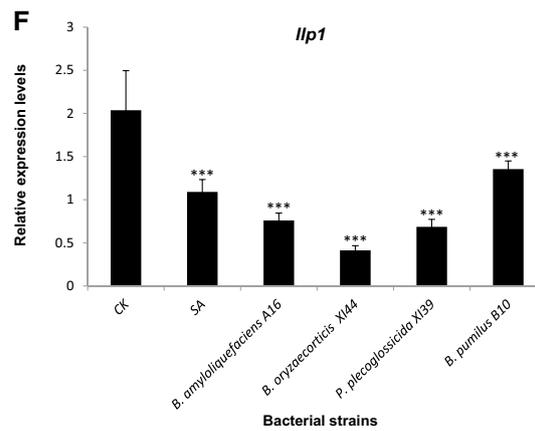
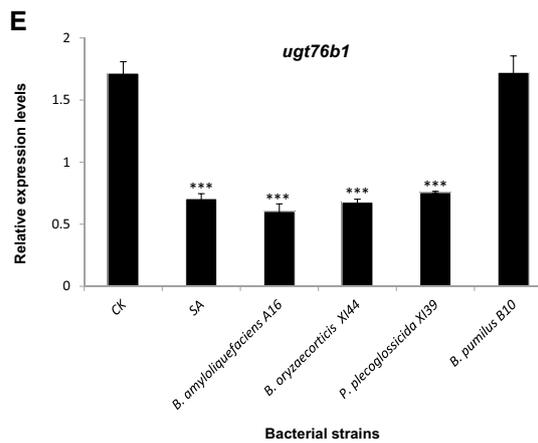
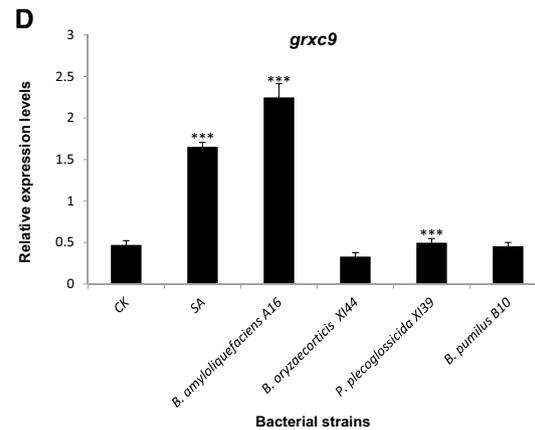
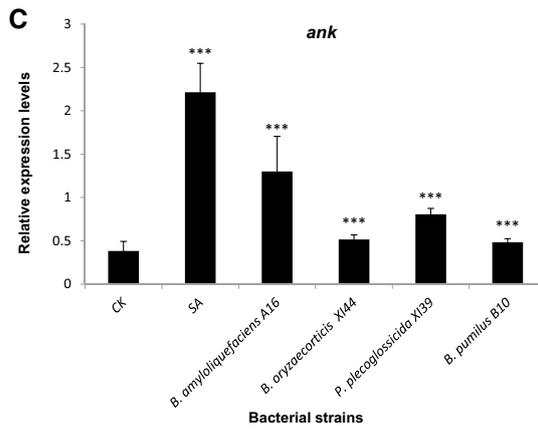
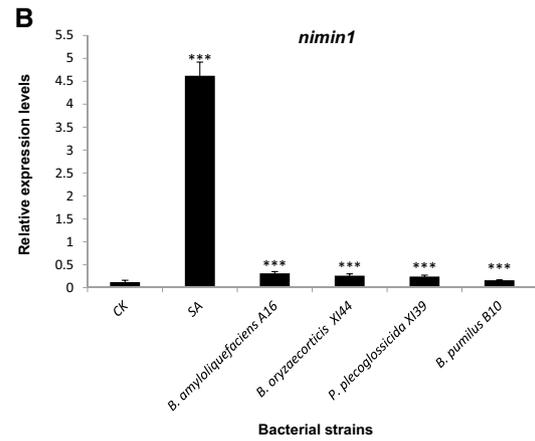
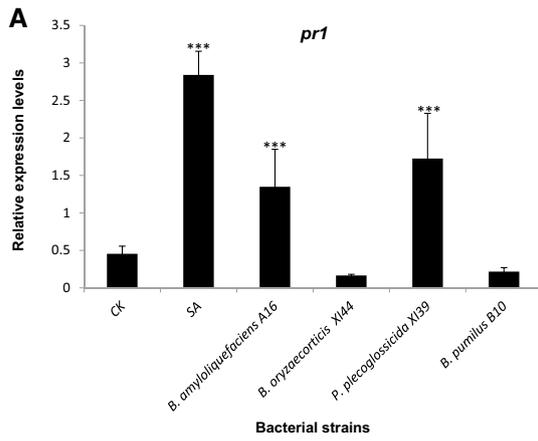
### Expression of SA-inducible defense genes in *Arabidopsis* and SA production

The pathogenesis-related protein PR1, GRXC9, NIMIN1, ANK, UGT76B1, and LLP1 are markers of the SA-dependent pathway in *Arabidopsis* (Fig. 3). Genes *nimin1*, *pr1*, *grxc9*, and *ank* were significantly up-regulated in response to



**Fig. 3** Regulatory itinerary of salicylic acid-induced genes in *Arabidopsis* adapted from Weigel et al. (2005); Ndamukong et al. (2007); Blanco et al. (2009); von Saint Paul et al. (2011); Yang et al. (2012); Armijo et al. (2013) and Herrera-Vásquez et al. (2014). All six genes used in this study belong to the SA defense pathway. *pr1* and *nimin1* expression is NPR1-dependent (for Non-expressor of PR1) and transcriptional factor TGA-dependent. Binding of the NIMIN1 to the NPR1/TGA complex bound on the *pr1* promoter turns off the gene

expression. The *ugt76b1*, *ank* and *llp1* genes are also NPR1-dependent, while *grxc9* is TGA-interacting/NPR1-independent. GRXC9 is implied in SA/JA crosstalk (repression of the *pdf1.2* from the jasmonic acid pathway). Colors and shapes indicate different regulatory mechanisms: green for gene up-regulation; red for gene repression; blue for positive/negative regulation; orange for molecule activation; round headed arrows for binding; square headed arrow for accumulation. *HR* hypersensitive response, *ROS* reactive oxygen species



**Fig. 4** Response of SA-dependent defense genes to four bacterial inocula. **A** *pr1*, **B** *nimin1*, **C** *ank*, **D** *grxc9*, **E** *ugt76b1* and **F** *llp1*. X-axis: treatments; *B. amyloliquefaciens* A16, *B. oryzaecorticis* XI44, *B. pumilus* B10 and *P. plecoglossicida* XI39. Positive control consisted of SA and negative control consisted of ½ MS medium only (CK); Y-axis: relative expression levels of mRNA of six *Arabidopsis* defense genes. Genes *ank*, *pr1*, *grxc9* and *nimin1* were induced by exogenous SA and some tested strains, while the *ugt76b1* and *llp1* were repressed by SA and the most tested isolates. **G** Concentrations of salicylic acid produced by the four bacterial strains. X-axis: treatments, Y-axis: concentration of produced SA. \*\*\*Significant difference ( $p < 0.05$ )

exogenous SA. Significant up-regulation levels of the *grxc9*, *ank*, *nimin1*, and *pr1* genes were recorded by *P. plecoglossicida* XI39 and *B. amyloliquefaciens* A16, this latter showed an induction level of *grxc9* even higher than that obtained with exogenous SA. *B. oryzaecorticis* XI44 and *B. pumilus* B10 significantly triggered the expression of only *ank* and *nimin1* genes. The *nimin1* reached the highest induction levels among targeted genes after treatment with exogenous SA, while its application on the seedlings significantly repressed the expression of *ugt76b1* and *llp1* genes. The four bacterial strains have also down-regulated *llp1* to significantly low levels with the most important repression recorded by *B. oryzaecorticis* XI44. As for the *ugt76b1* gene, its regulation levels were not affected after treatment with *B. pumilus* B10. However, its expression was repressed by strains XI39, XI44 and A16, respectively, where the most significant repression was obtained with *B. amyloliquefaciens* A16 (Fig. 4A–F).

The concentration of produced SA was estimated by exopolating OD measurements using the linear equation of the calibration curve. SA was produced by all tested strains (data not shown) but we were mainly interested in four isolates. *B. amyloliquefaciens* A16, *B. oryzaecorticis* XI44, *B. pumilus* B10 and *P. plecoglossicida* XI39 showed very close SA concentrations ranging between 0.31 and 0.4 mg/ml (Fig. 4G).

Treatment with exogenous SA stimulated the systemic resistance against *Fusarium* wilt and significantly reduced the disease severity in chickpea (Saikia et al. 2003). This result consists nicely with the results obtained in this work, since *Arabidopsis* regulatory genes *nimin1*, *pr1*, *ank*, and *grxc9* were highly induced by exogenous SA. As for the four tested strains, the highest induction levels were recorded by strain *B. amyloliquefaciens* A16 followed by *P. plecoglossicida* XI39, *B. oryzaecorticis* XI44 and *B. pumilus* B10. Cawoy et al. (2014) reported that surfactin producing *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* strains as well as purified surfactin triggered tobacco plant defenses when challenged with *Botrytis cinerea* spore suspension; and Ongena et al. (2007) found that the *B. subtilis* 168 derivative Bs2504 producing only fengycin kept some ability in inducing resistance in bean plants. These findings explain those obtained in the current work, *B. amyloliquefaciens* A16 significantly

up-regulated the *pr1*, *ank*, and *grxc9* genes, though it produced the less SA (0.31 mg/m) is due to the presence of both surfactin and fengycin encoding genes; therefore, *B. oryzaecorticis* XI44 (*srfAA*<sup>-</sup>, *fenD*<sup>+</sup>) and *B. pumilus* B10 (*srfAA*<sup>-</sup>, *fenD*<sup>-</sup>) have the lowest induction levels or no induction at all even they produced higher SA concentrations. This hypothesis might be compensated by the fact that *Arabidopsis* seedlings and bacterial inocula were co-cultured on MS medium (non-deficient in iron); thus, bacterial SA can be excluded as gene inducer. *P. plecoglossicida* XI39 produced important SA concentration but was less effective than A16 in inducing *Arabidopsis* genes. *Pseudomonas* strains involve different mechanisms in triggering plant defenses (Buysens et al. 1996; Iavicoli et al. 2003; Ramarathnam et al. 2011).

LLP1 is involved in reducing bacterial proliferation and increasing cell death in infected tissues (Armijo et al. 2013), while UGT76B1 is a stress-induced glucosyltransferase, highly responsive to abiotic stress as well as to biotrophic and necrotrophic pathogens, modulates plant defense and senescence (von Saint Paul et al. 2011). Another point that should be highlighted is the response of *Arabidopsis* plants towards our inocula, since *llp1* and *ugt76b1* were both repressed by exogenous SA, while *llp1* was repressed by four isolates, and *ugt76b1* was repressed by three isolates. This might be explained by communication between *Arabidopsis* plants and non-phytopathogenic root colonizing rhizobacteria via crosstalk molecules, i.e., SA and cLPs in our study.

## Conclusion

This study highlighted some features involved in the antagonism of PGPR isolates from semi-arid soil pre-selected for their antifungal activity towards highly pathogenic fungi. Some Gram-positive isolates with important biofilm formation harbored three to four cLPs genes. Future investigations will assess defense mechanisms implied in the resistance of *Arabidopsis* towards phytopathogenic fungi in presence of PGPR as ISR stimuli. Other works will focus on other genome-encoded secondary metabolites implied in the antagonism of these strains representing a promising alternative seed treatment and environmentally friendly biofungicide in semi-arid fields.

**Acknowledgements** We are grateful to Dr. Christoph Engl for hosting Miss Asma Benslim within his laboratory, for the help in the experiments, and his extremely useful discussions throughout this research. Thanks are also due to Dr Fuquan Liu for his valuable help in the *Arabidopsis* experiments.

**Funding** This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria, for the financial assistance of the internship of Miss Benslim Asma and the PNR project no: 1/u19/332 entitled “Contribution dans la lutte contre les maladies cryptogamiques: Recherche de sols à caractères suppressifs”.

## References

- Ahmad S, Van Hulten M, Martin J, Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Ton J (2011) Genetic dissection of basal defense responsiveness in accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 34(7):1191–1206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02317.x>
- Ahmad A, Shafique S, Shafique S (2014) Intracellular interactions involved in induced systemic resistance in tomato. *Sci Hortic* 176:127–133. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.004>
- Armijo G, Salinas P, Monteoliva MI, García C, Seguel A, Villarreal-Candia E, Song W, van der Krol AR, Álvarez ME, Holuigue L (2013) A salicylic acid-induced lectin-like protein plays a positive role in the effector-triggered immunity response of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* Avr-Rpm1. *Mol Plant Microbe Interact* 26(12):1395–1406. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0044-R>
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134(1):307–319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bekai NH, Aggoun M (2016) Antagonisme des bactéries rhizosphériques vis-à-vis des champignons phytopathogènes résistants aux fongicides. Masters final project: Microbiology. University Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif (French)
- Benslim A, Mezaache-Aichour S, Haichour N, Chebel S, Zerroug MM (2016) Evaluation of inhibition of fungal spore germination by rhizospheric bacterial extracts. *Ann Res Rev Biol* 11(5):1–7. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/31228>
- Blanco F, Salinas P, Cecchini NM, Jordana X, Van Hummel P, Alvarez ME, Loreto H (2009) Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 70:79–102. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9458-1>
- Bouaoud Y, Troulet C, Foughalia A, Berge O, Aissat K, Bardin M (2018) A multi-criteria approach for the selection of efficient biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on tomato in Algeria. *Biocontrol* 63:299–311. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9851-7>
- Buysens S, Heungens K, Poppe J, Höfte M (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdinin in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol* 62(3):865–871
- Cawoy H, Mariutto M, Henry G, Fisher C, Vasilyeva N, Thonart P, Dommes J, Ongena M (2014) Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact* 27(2):87–100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
- Challal A, Attar RI (2016) Antagonisme des bactéries à Gram positif vis-à-vis des champignons résistants aux fongicides du genre *Fusarium*. Masters final project: Microbiology. University Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif (French)
- Couillerot O, Combes-Meynet E, Pothier JF, Bellvert F, Challita E, Poirier MA, Rohr R, Comte G, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) The role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phyto-stimulators. *Microbiology* 157:1694–1705. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043943-0>
- Dunlap CA, Schisler DA, Price NP, Vaughn SF (2011) Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. *J Microbiol* 49(4):603–609. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1044-y>
- Dutta S, Mishra AK, Dileep Kumar BS (2008) Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biol Biochem* 40(2):452–461. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.09.009>
- Elhariry HM (2011) Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiol* 28:1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.05.004>
- Grover M, Nain L, Singh SB, Saxena AK (2010) Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. *Curr Microbiol* 60:99–106. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9508-6>
- Herlemann DPR, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* 5(10):1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Herrera-Vásquez A, Carvallo L, Blanco F, Tobar M, Villarreal-Candia E, Vicente-Carbajosa J, Salinas P, Holuigue L (2015) Transcriptional control of glutaredoxin *GRXC9* expression by a salicylic acid-dependent and NPR1-independent pathway in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol Rep* 33:624–637. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0782-5>
- Hua GKH, Höfte M (2015) The involvement of phenazines and cyclic lipopeptide sessilin in biocontrol of *Rhizoctonia* root rot on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Pseudomonas* sp. CMR12a is influenced by substrate composition. *Plant Soil* 388:243–253. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2327-y>
- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML (2008) Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet* 4(11):e1000255. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux JP (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact* 16(10):851–858. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.10.851>
- Kamilova F, Validov S, Azarova T, Mulders I, Lugtenberg B (2005) Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ Microbiol* 7(11):1809–1817. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x>
- Khababa H, Nouasria A (2016) Effet antagoniste des bactéries à Gram positif vis-à-vis de champignons résistants aux fongicides. Masters final project: Microbiology. University Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif (French)
- Kim JS, Lee J, Lee CH, Woo SY, Kang H, Seo SG, Kim SH (2015) Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. *Plant Pathol J* 31(2):195–201. <https://doi.org/10.5423/PJ.NT.11.2014.0122>
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11):1259–1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>
- Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* 186(4):1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- Lahrache M, Boulekfouf N (2014) Etude comparative de deux méthodes de mise en évidence de l'antagonisme de souches bactériennes *in vitro*. Masters final project: Microbiology. University Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif (French)
- Landa BB, Mavrodi OV, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS, Weller DM (2002) Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Appl*

- Environ Microbiol 68(7):3226–3237. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3226-3237.2002>
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl Environ Microbiol 71(8):4577–4584. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005>
- Leclère V, Marti R, Béchet M, Fickers P, Jacques P (2006) The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. Arch Microbiol 186:475–483. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0163-z>
- Liu J, Hagberg I, Novitsky L, Hadj-Moussa H, Avis TJ (2014) Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. Fungal Biol 18:855–861. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.07.004>
- Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, Ptak M (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. Biochimie 74:1047–1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V)
- Mezaache-Aichour S, Haichour N, Sayeh N, Guechi A, Zerroug MM (2013) Isolation and selection of indigenous bacterial strains with suppression properties from the rhizospheres of potato and wheat. Annu Rev Res Biol 3(4):405–415
- Mezaache-Aichour S, Haichour N, Guechi A, Zerroug MM (2014) Telluric pseudomonads metabolites involved in the antagonism to phytopathogenic fungi. Global J Biol Agric Health Sci 3(1):71–77. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4882.7288>
- Moyné AL, Cleveland TE, Tuzun S (2004) Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide-bacillomycin D. FEMS Microbiol Lett 234:43–49. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.011>
- Mylne SJ, Wang CK, van der Weerden NL, Craik DJ (2010) Cyclotides are a component of the innate defense of *Oldenlandia affinis*. Biopolymers 94(5):635–646. <https://doi.org/10.1002/bip.21419>
- Ndamukong I, Al Abdallat A, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C (2007) SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. Plant J 50:128–139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03039.x>
- Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol 16(3):115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ Microbiol 9(4):1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Raaijmakers JM, Weller DM (2001) Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* Strain Q8r1-96. Appl Environ Microbiol 67(6):2545–2554. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2545-2554.2001>
- Ramarathnam R, Fernando WGD, de Kievit T (2011) The role of anti-biosis and induced systemic resistance, mediated by strains of *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus cereus* and *B. amyloliquefaciens*, in controlling blackleg disease of canola. BioControl 56:225–235. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9324-8>
- Ren JH, Li H, Wang YF, Ye JR, Yan AQ, Wu XQ (2013) Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. Biol Control 67:421–430. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.012>
- Rokni-Zadeh H, Li W, Sanchez-Rodriguez A, Sinnaeve D, Rozenski J, Martins JC, De Mot R (2012) Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. Appl Environ Microbiol 78(14):4826–4834. <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-12>
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez-García A (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol Plant Microbe Interact 20(4):430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Saikia R, Singh T, Kumar R, Srivastava J, Srivastava AK, Singh K, Arora DK (2003) Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. Microbiol Res 158:203–213. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00202>
- Serino L, Reimann C, Baur H, Beyeler M, Visca P, Haas D (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Gen Genet 249:217–228. <https://doi.org/10.1007/BF00290369>
- Tonelli ML, Fabra A (2014) The biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 primes the defense response against *Cercospora sojina*. World J Microbiol Biotechnol 30:2503–2509. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1675-3>
- von Saint Paul V, Zhang W, Kanawati B, Geist B, Faus-Keßler T, Schmitt-Kopplin P, Schäffner AR (2011) The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. Plant Cell 23:4124–4145. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088443>
- Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell 17:1279–1291. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027441>
- Xu Z, Shao J, Li B, Yan X, Shen Q, Zhang R (2013) Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. Appl Environ Microbiol 79(3):808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>
- Yang Y, Zhang Y, Ding P, Johnson K, Li X, Zhang Y (2012) The ankyrin-repeat transmembrane protein BDA1 functions downstream of the receptor-like protein SNC2 to regulate plant immunity. Plant Physiol 159:1857–1865. <https://doi.org/10.1104/pp.112.197152>
- Yang M, Mavrodi DV, Mavrodi OV, Thomashow LS, Weller DM (2017) Construction of a recombinant strain of *Pseudomonas fluorescens* producing both phenazine-1-carboxylic acid and cyclic lipopeptide for the biocontrol of take-all disease of wheat. Eur J Plant Pathol 149(3):683–694. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1217-6>
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnoli BL (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biol Biochem 34(7):955–963. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5)



## Evaluation of Inhibition of Fungal Spore Germination by Rhizospheric Bacterial Extracts

Asma Benslim<sup>1</sup>, Samia Mezaache-Aichour<sup>2\*</sup>, Nora Haichour<sup>2</sup>, Sami Chebel<sup>2</sup>  
and Mohamed Mihoub Zerroug<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microbial Ecology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Abderrahmane Mira, Béjaia, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Sétif 1, Sétif, Algeria.

### Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors SMA and MMZ designed the study, wrote the protocol and interpreted the data. Authors SC, SMA, AB, MMZ and NH anchored the field study, gathered the initial data and performed preliminary data analysis. Authors SMA, NH and MMZ managed the literature searches and produced the initial draft. Authors SC and AB wrote the manuscript. While authors SMA and MMZ read and approved the publication. All authors read and approved the final manuscript.

### Article Information

DOI: 10.9734/ARRB/2016/31228

#### Editor(s):

- (1) Umesh Gangishetti, Department of Biology, Emory University, Atlanta, USA.  
(2) George Perry, Dean and Professor of Biology, University of Texas at San Antonio, USA.

#### Reviewers:

- (1) Everardo Curiel Quesada, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, Mexico.  
(2) Sanjay Mishra, IFTM University, India.  
(3) Md Fakruddin, Institute of Food Science and Technology (IFST), Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR), Dhaka, Bangladesh.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/17647>

Original Research Article

Received 28<sup>th</sup> December 2016  
Accepted 24<sup>th</sup> January 2017  
Published 28<sup>th</sup> January 2017

### ABSTRACT

**Aims:** This work aims to evaluate the anti-germinative activity of bacterial extracts. These bacteria were already characterized for their antagonistic capacity *in vitro* against telluric phyto-pathogens fungi: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Fsc) and *Phytophthora infestans* (Pi), causing Bayoud, dry rot and mildew diseases respectively.

**Methodology:** The OD of bacterial cultures is measured in order to determine the microbial charge producing the anti-germination substances, then centrifuged, filtered. A volume of spore suspension of determined concentration is added to a determined volume of the bacterial filtrates. After incubation, for 24 hours at room temperature the inhibition of spore germination is observed under a microscope using a Malassez cell.

\*Corresponding author: E-mail: [mezaic2002@gmail.com](mailto:mezaic2002@gmail.com), [mezaache@univ-setif.dz](mailto:mezaache@univ-setif.dz);

**Results:** The results showed that these bacterial filtrates are able of inhibiting fungal spore germination, among these filtrates XI35 ' one, gave a total inhibition (100%) on both of the tested fungi Foa and Fsc, while on Pi it only gave 16.66% of inhibition.

**Conclusion:** The bacterial filtrates were more active against mitosporic fungi, than oomycetes.

*Keywords: Antagonistic bacteria; inhibition of germination; secondary metabolites; telluric phyto-pathogenic fungi.*

## 1. INTRODUCTION

Plant diseases caused by soil-borne agents are economically important and, for the most part, difficult to control and / or treat. *Fusarium* diseases, as rots and mildew are causing considerable economic losses at the global level, affecting annual plants such as potatoes and perennials such as date palms. In these cases chemical treatment is ineffective or unnecessary.

During the twentieth century, considerable research has demonstrated the ability of microorganisms from various phylogenetic origins to inhibit different phyto-pathogenic agents [1]. These microorganisms act either by antibiosis, competition [2] or by interacting with the plant [3], leading to more complex defense mechanisms leading to biocontrol [4].

At the level of the rhizosphere and the control of soil-borne pathogens, the control is mainly via bacteria belonging to the genus *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* and *Pseudomonas* and fungi of the genera *Ampelomyces*, *Candida* [5] and *Trichoderma* [5,6]. The majority of studies show that 1 to 10% of soil isolates may have some antagonist potency *in vitro*, but of these, very few have the ability to suppress phytopathogenic agents in various soils and growing conditions and yet more Small number is capable of inhibiting a broad spectrum of pathogenic species [5].

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

#### 2.1.1 Phytopathogenic fungi

Fungal strains were as follows: *Phytophthora infestans* (Pr Larous, LMA, Département de

microbiologie, Université Sétif-1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (INRAA, Alger). *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Institut Pasteur de Paris, France).

#### 2.1.2 Referenced bacterial strains

*Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 (Pr Haas, Lausanne, Suisse) and *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *auréofaciens* (Dr. Mezaache-aichour, LMA Département de Microbiologie, Université Sétif-1).

#### 2.1.3 Tested strains

Bacterial strains used in the inhibition tests were previously isolated by Belatrous [7] et Sayah [8] and Mansouri et Remadna [9]. These strains belonging to *Pseudomonads* and *Bacillus* were already characterized for their antagonistic activity *in vitro* against the cited phytopathogenic fungi [10], and are noted: Xi29, Xi48, Xi49, Xi47, B5, B21, Xi35', Xi29', Xi37', Xi30, Xi12, Xi1.

## 2.2 Methods

### 2.2.1 Preparation of bacterial filtrates

The bacterial references strains as well as the tested strains were grown in 25 ml of NBY for 72 h, with constant stirring on a rotary shaker (7 G; throw 19 mm) at room temperature (20-22°C) to late exponential phase. The OD (optical density; Table 1) is measured at 625 nm in order to determine the microbial concentration producing the anti-germination substances.

The bacterial cultures are then centrifuged for 20 min at 3512 G, filtered through 0.45 µm diameter membranes (THOMAPOR®Membranfilter), and the filtrates are recovered in sterile bottles and stored at 4°C till use.

**Table 1. Optical density of the tested strains at 625 nm after 72 h of incubation**

Bacterial strains	CHA0	30-84	2	Xi 29	Xi 49	Xi 29'	B 5	Xi 12	Xi 37'	B 21	Xi 47	Xi 48	X i1	Xi 35'	Xi 30
OD at 625 nm	2.23	2.17	1.3	1.97	2.1	1.91	0.52	1.96	1.3	0.59	0.56	1.92	1.2	1.8	0.87

CHA0, 30-84 and 2: *Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 and strain 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *auréofaciens*; Xi29, Xi49, Xi29', B5, Xi12, Xi37', B21, Xi47, Xi48, Xi35' and Xi30: tested strains

### 2.2.2 Inhibition of spore germination

A volume of 1 ml of spore suspension of determined concentration ( $10^7$  spores / ml) is placed in a series of microtubes, and a volume of 20  $\mu$ l of the bacterial filtrates to be studied is added. The tubes are prepared in triplicates and incubated for 24 hours at room temperature. After incubation, the inhibition of spore germination is observed under a microscope using a Malassez cell. The number of spores germinated or not is reported.

The percentage of non-germinated spores is calculated according to the formula:

$$\%SNG = \frac{SNG}{SG+SNG} \times 100$$

%SNG: percentage of non germinated spores.

SG: number of germinated spores.

SNG: number of non germinated spores.

### 2.2.3 Statistical analysis

Data were analyzed by the one way analysis of variance (ANOVA) and the test with  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Results

#### 3.1.1 Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

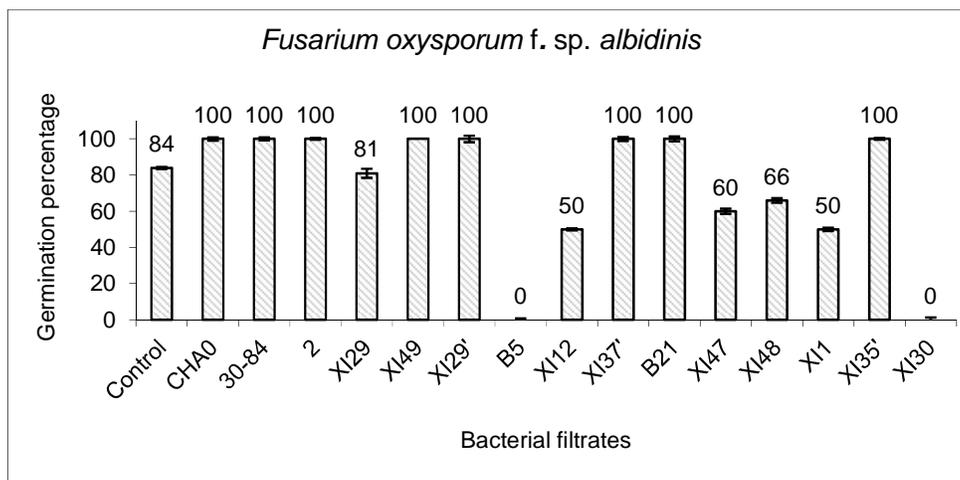
The percentage of germinated spores for *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA) was zero (0%) with the extracts of isolates XI30 and B5 and maximal (100%) for the extracts of the isolates tested Xi49, Xi29', Xi35', Xi37' and B21; as well as those of the reference strains 30-84, CHA0 and 2 (Fig. 1).

#### 3.1.2 Inhibition of *Phytophthora infestans*

The percentage of germinated spores for *Phytophthora infestans* (PI) varied between 15.47% for the extract of isolate XI30 and 100% for the control. While for the referenced strains; the inhibition varied from 40% for CHA0 and 66.66% for strains 2 and 30-84 (Fig. 2).

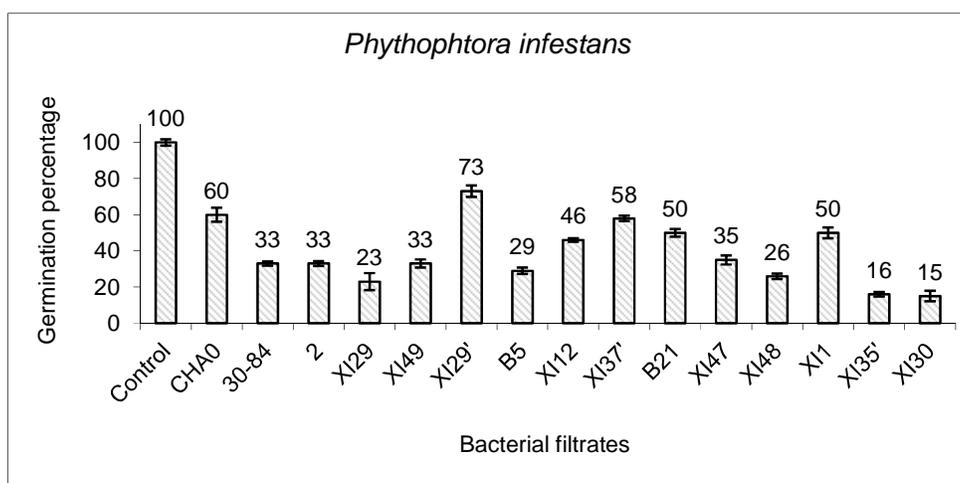
#### 3.1.3 Inhibition of *Fusarium solani* var. *coeruleum*

After 24 h of incubation, a significant germination of the spores of *Fusarium solani* var. *coeruleum* (FSC) was observed by the bacterial extracts.

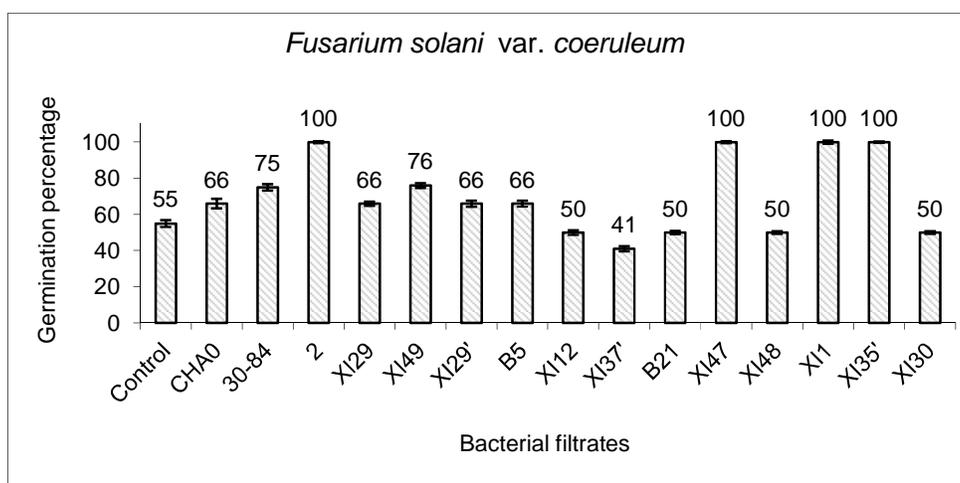


**Fig. 1. Graphical representation of the percentages of the germinated spores of the *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa) treated by different bacterial filtrates**

CHA0, 30-84 and 2: *Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 and strain 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* filtrates. Filtrates of the tested strains: Xi29, Xi49, Xi29', B5, Xi12, Xi37', B21, Xi47, Xi48, Xi35', Xi30. The first column corresponds to the untreated control



**Fig. 2. Graphical representation of the percentages of the germinated spores of the *Phytophthora infestans* (Pi) processed by different bacterial filtrates**  
 C, 3 and 2: *Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 and strain 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* filtrates. Filtrates of the tested strains..., B .....: Xi29, Xi49, Xi29', B5, Xi12, Xi37', B21, Xi47, Xi48, Xi35', Xi30. The first column corresponds to the untreated control



**Fig. 3. Graphical representation of the percentages of the germinated spores of the *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Fsc)Pi treated by different bacterial filtrates**  
 C, 3 and 2: *Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 and strain 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* filtrates. Filtrates of the tested strains..., B .....: Xi29, Xi49, Xi29', B5, Xi12, Xi37', B21, Xi47, Xi48, Xi35', Xi30. The first column corresponds to the untreated control

Indeed, this germination varied between 41.9% for the extract of the isolate Xi37', and 100% for the extracts of the isolates Xi11, Xi35' and Xi47. Whereas for the referenced strains CHA0, 30-84 and Strain 2, a percentage of 66.66, 75 and 100% respectively was observed (Fig. 3 above).

Depending on fungi and bacterial isolates, significant differences were recorded.

### 3.2 Discussion

Several antagonists certainly exist in nature and exert a more or less effective biological control on the pathogens of plants, the result is an increase in the inhibitory activities of the antagonists against the pathogens, the potential of a possible control of the diseases with this method is currently limited because, unlike laboratories and *in vitro*; the results in the field

are not usually of a particular success. The major problems are due to the fact that introduced microorganisms generally fail in their competition with the existing micro flora [11]. Such microorganisms are called plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), which use several mechanisms for biological control. However, antibiotic synthesis seems to be the main mechanism used against crop pathogens by different genera such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium* and *Serratia* [12].

Among the isolates tested which showed activity on fungi, the filtrates of the isolates XI29 and XI49 (Gram +ve bacilli), B5 (*Bacillus megatherium*) and XI29' (*Pseudomonas* sp.), inhibited the spore's germination of the studied fungi. XI 29, XI49 and B5 were the most active on Fsc and Pi with respective percentages ranging from 24.04 to 33.33% and 66.66 to 77%. However, the inhibition of the Foa was maximum for the filtrate of isolate B5 and zero for others as XI37', XI1....

While the filtrates of isolates XI1 (*Bacillus licheniformis*), XI35 'and XI47 (*Bacillus subtilis*) were completely inactive on Fsc (100% of germination). The filtrates of isolates XI12, XI37' and B21 (Gram + ve bacilli) showed an effect varying from 59.9 to 50%. Indeed, Chan et al. [13] showed that the filtrate of *Bacillus subtilis* D1 / 2 was found to be effective in preventing the spread of *Fusarium graminearum*. This antifungal activity was attributed to the extracellular lipopeptides identified as fengycins [13].

XI37' (*Bacillus cereus*) showed an average activity of 58.33% on Pi, an oomycete. Silo-Suh et al. [14] demonstrated that the filtrate of the *Bacillus cereus* culture contained two antibiotics that suppress alfalfa disease caused by another oomycete *Phytophthora medicaginis*. The purified zwittermicin A reduces reversibly the elongation of the germinal tubes derived from cysts of *P. medicaginis*, and antibiotic B is responsible for the deformations of the germinal tubes.

On the other hand, the partial inhibition of germination of the control Foa and Fsc in our study could be the result of self-inhibition of the germination frequently observed when the concentrations of spores are high thus imposing a state of dormancy, whereas the frequency of germination increases as the concentration decreases. This phenomenon was observed for

the first time by Edgerton (1910); who noted that when more than 12 to 15 conidia of *Colletotrichum lindemuthianum* are included in 1 cubic millimeter, the percentage of germination of spores is reduced. In some cases this inhibition is due to the effects of specific chemical inhibitors, but in other cases it may simply be due to an inadequate concentration of oxygen or nutrients [15].

Inhibition of germination of Foa spores was complete with the filtrates of isolates B5 and XI30. The bacteria associated with fungi have a considerable influence on their pathogenesis; their associations with *Fusarium oxysporum* appear to be important in their ability to adopt an invasive state / or pathogenic growth. Indeed, it has been demonstrated that volatile compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 prevent the growth and germination of spores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [16]. On the other hand, a negative effect on fungal pathogenesis was observed with the inhibition of germination of phytopathogenic spores *Botrytis cinerea* by an antagonistic bacterial community on Chrysanthemum leaves [17].

*Pseudomonas* has multiple biocontrol mechanisms, the production of antibiotics seems to be the main mechanism of action against harvesting microorganisms, by the secretion of Pyrrolnitrin, Aerugine, Phenazines and Phloroglucinols such as 2,4-DAPG (diacetyl-Phloroglucinol). Among these metabolites 2,4-DAPG is active against *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*; in addition to other antifungal metabolites such as proteases, lipases and chitinases [12]. Some of the isolates tested (XI35', XI48 and XI49) produce metabolites with the same biochemical characteristics of DAPG [18].

The filtrates of the reference strains tested gave an inhibition of spore germination but with different percentages depending on the fungus studied. While they showed important inhibition of PI. Inhibition of Fsc and Foa by the filtrates of these reference strains is of lesser effect except for strain 2 which gave important inhibition of PI. In addition to this strain 2, the isolates studied produce siderophores [19]. A direct relationship was established *in vitro* between the synthesis of siderophores in *Pseudomonas fluorescens* and their ability to inhibit the germination of *F. oxysporum* chlamydospores [20]. Indeed, Mezaache-Aichour et al. [21], demonstrated that this bacterium (strain 2) inhibits in dual culture

the mycelial growth of Foa, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* and the oomycete *Pythium ultimum*.

On the other hand, the filtrate of the isolate XI29' showed an inhibition of the spore germination of the Fsc of 33.33%. In contrast, the filtrate of isolates XI48 and XI30 (Gram-ve bacilli) showed a greater effect with 50% inhibition. Concerning the Foa, the filtrate of the isolate XI30 showed an inhibition of 100%, while that of XI29 showed no action on the germination of the spores of this fungus. Lim et al. [22] demonstrated that *Pseudomonas stutzeri* Ypl-1 filtrate containing lytic enzymes such as chitinase and laminarinase inhibited mycelial growth rather than spore germination, but also caused lysis of mycelia and germinal tubes in *F. solani*.

However for Pi, the respective inhibitions were 73.33 and 15.47% with XI30 and XI29'. These isolates produce similar molecules to phloroglucinol and its derivatives [18]. This polycetide, produced by biocontrol bacteria such as *P. fluorescens*, prevents zoosporogenesis and alters the motility of the zoospores of *Plasmopara viticola* and *Aphanomyces cochlioides*. Generally, zoospores are first immobilized after a short exposure to DAPG, then they undergo lysis [23]. The low sensitivity of Pi spores to the extract of isolate XI29' may be due to the low concentration of active molecules. Tofazzel and Tiedemann, [23] demonstrated that when treated with a small fraction of DAPG, instead of being lysed, zoospores of *A. cochlioides* germinate and form around the cystospores multiple germinal tubes with several branches.

Finally, in this study, the most effective isolates on the inhibition of germination of fungal spores are: isolates B5, XI29, XI30, XI35', XI37' and XI49 in addition to the reference strains tested.

#### 4. CONCLUSION

The protection of crops against phytopathogens is a major issue in agriculture. Chemical control is widely used, but it is not always effective and can lead to contamination of food and the environment. The ability of these bacteria to produce antagonist substances that inhibit the germination of spores of phytopathogenic fungi as different as the isolated Foa and Fsc suggests the possibility of using these microorganisms in the control of fungal diseases of the date palm and Potato. This is by delaying infections, or

contributing to weakening the pathogen and predisposing it to other chemical or biological substances.

#### COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

#### REFERENCES

1. Cook RJ. Advances in plant health management in the 20th century. Ann. Rev. Phytopathol. 2000;38:95-116.
2. Chet I. Trichoderma - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control, I. Chet (ed.), John Wiley & Sons: New York. 1987;137-160.
3. Benizri E, Baudoin E, Di Battista-Leboeuf C, Guckert A. Des bactéries pour la santé des plantes. Biofutur. 2001;210:52-56. (French)
4. Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto DK, Mazzola M, Bangerla G, Kim DS. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995;92:4197-4201.
5. McSpadden Gardener BB, Fravel DR. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Plant Health Progress. 2002;10:1-18. Online DOI: 10.1094/PHP-2002-0510-01-RV
6. Dendouga W, Bouregghda H, Belhamra M. Biocontrol of wheat *Fusarium* crown and root rot by *Trichoderma* spp. and evaluation of their cell wall degrading enzymes activities. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. 2016;51(1):1-12.
7. Belatrous Z. Contribution à l'étude des sols suppressif de la region de Ain oulmane. UFA Sétif Mémoire de Master. 2011;23-34. (French)
8. Sayah N. Contribution à l'étude des sols suppressif de la région de Ain azel. UFA Sétif Mémoire de Master. 2011;28-36. (French)
9. Remadna H, Mansouri S. Identification de bacterias isolees de la rhizosphere. UFA Sétif Mémoire de Master. 2013;25-35. (French)
10. Mezaache-Aichour S, Haichour N, Sayeh N, Guechi A, Zerroug MM. Isolation and selection of indigenous bacterial strains

- with suppression properties from the rhizospheres of potato and wheat. ARRB. 2013;3(4):405-415.
11. Nasraoui B. Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre de publication Universitaires, Tunisie. 2006;330. (French)
  12. Narayanasamy P. Detection and identification of bacterial biological control agents. In: Biological Management of Diseases of Crops, Progress in Biological Control. 2013;4:201-293.
  13. Chan YK, Savard ME, Reid LM, Cyr T, McCormick WA, Seguin C. Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. Bio Control. 2009;54:567–574.
  14. Silo-Suh AA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J, Handelsman J. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Appl Environ Microbiol. 1994;60(6):2023-2030.
  15. Moore LE. Fundamentals of the fungi. 4th Ed. Prentice Hall International London. 1996;12:361.
  16. Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Appl Environ Microbiol. 2012;78(16):5942-5944.
  17. Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau MA, Tarkka BM, Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: Hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiol Mol Bio Rev. 2011;75(4):583-609.
  18. Mezaache-aichour S, Haichour N, Taleb Z, Benlarbi N, Guechi A, Zerroug MM. Activités d'isolats indigènes antagonistes par des substances similaires au phloroglucinol. AFPP – Cinquième Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Plantes. Lille, 10, 11 et 12 Mars. 2015;301-308. (French)
  19. Haichour N, Mezaache-aichour S, Boukhalfa A, Madaci I, Guechi A, Zerroug MM. Métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes et leur protection. AFPP – Cinquième Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Plantes. Lille, 10, 11 et 12 Mars. 2015;309-316. (French)
  20. Pal KK, McSpadden Gardener B. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor; 2006. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02
  21. Mezaache-Aichour S, Guechi A, Nicklin J, Drider D, Prevost H, Strange RN. Isolation, identification and antimicrobial activity of pseudomonads isolated from the rhizosphere of potatoes growing in Algeria. Plant Pathol. 2012;94(1):89-98.
  22. Lim HS, KIM YS, Kim SD. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. Appl Environ Microbiol. 1991;57(2):510-516.
  23. Tofazzal IM, Tiedemann AV. 2, 4-Diacetylphloroglucinol suppresses zoosporogenesis and impairs motility of *Peronosporomycete* zoospores. World J Microb Biotech. 2011;27:2071-2079.

© 2016 Benslim et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:  
<http://sciencedomain.org/review-history/17647>

**Résumé :** Les 45 isolats utilisés dans ce travail proviennent des rhizosphères du blé et de la pomme de terre près de la région de Sétif. Ils ont été présélectionnés à la base de leur pouvoir inhibiteur de la croissance de champignons phytopathogènes telluriques. Le séquençage du gène de l'ADNr 16S, a montré que les souches appartenaient majoritairement aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. Sur les quatre souches évaluées pour leur capacité à induire l'expression des gènes de défense chez *Arabidopsis*, *Bacillus amyloliquefaciens* A16 et *Pseudomonas plecoglossicida* XI39 ont montré une induction de l'expression des gènes à des taux aussi important que ceux obtenus avec l'acide salicylique. La production de ce dernier a été mise en évidence pour ces quatre souches, elles ont produit des concentrations comprises entre 0.31 et 0.4 mg/ml. 24 isolats à Gram-positif ayant le meilleur potentiel antifongique *in vitro* ont été sélectionnés pour le criblage de quatre gènes de biosynthèses des lipopeptides cycliques et pour la production de composés organiques volatils antifongiques. Le profil électrophorétique des produits de PCR a montré l'abondance du gène de biosynthèse de la fengycine (70.33%) ; suivi par ceux de la surfactine (66.66%), la bacillomycine (58.33%) et la mycosubtiline (25%). Les composés volatils émis par ces isolats ont montré une inhibition considérable de la croissance de *Phytophthora infestans*, étant moins actifs contre *Fusarium oxysporum* var. *coeruleum*, tandis que *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* et *F. graminearum* ont été résistants. Les Gram-positifs ont formé des biofilms plus denses que ceux formés par les Gram-négatifs. Aussi, l'effet biorémediateur des isolats a été évalué en testant leur capacité à dégrader les fongicides, où la souche *Pseudomonas protegens* XI14 a dégradé les trois fongicides : propicone, curatine V et kazir. Certains isolats ont significativement stimulé la croissance du blé durant la phase de la levée, à savoir : *P. protegens* XI14, *P. plecoglossicida* 29INH et *B. amyloliquefaciens* 30INH. Les Gram-négatifs ont été plus efficaces en protégeant le blé contre *F. graminearum*. Aucun déclin n'a été enregistré chez les plantules traitées avec *P. protegens* XI11 et *Pseudomonas* sp. (XI3 et P37). Quant aux souches pathogènes identifiées : *Acinetobacter calcoaceticus* XI22, *Hafnia alvei* XI47 et *Stenotrophomonas maltophilia* P29 ; ces isolats ont eu un potentiel antagoniste très considérable en confrontation directe contre des champignons pathogènes résistants aux fongicides mais très restreint en confrontation indirecte par production de substances volatiles. P29 a produit des lipases et des protéases alors que XI47 n'a produit que des lipases.

**Mots clés :** Biocontrôle, lipopeptides cycliques, résistance systémique, phytostimulation, bioremédiation.

**Abstract:** The 45 isolates used in this work were isolated from the rhizospheres of wheat and potatoes near the region of Sétif. They were preselected at the base of their inhibitory effect on the growth of telluric phytopathogenic fungi. Sequencing of the 16S rDNA gene showed that the strains predominantly belong to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*. Among the four strains evaluated for their ability to induce the expression of defense genes in *Arabidopsis*, *Bacillus amyloliquefaciens* A16 and *Pseudomonas plecoglossicida* XI39 have shown an induction of gene expression at levels as important as those obtained with salicylic acid. The production of the latter by these four strains was assessed; they produced concentrations ranging between 0.31 and 0.4 mg/ml. 24 Gram-positive isolates showing the best *in vitro* antifungal potential were selected for screening for the presence of four cyclic lipopeptides biosynthesis genes and for the production of volatile organic antifungal compounds. The electrophoretic PCR products profile showed the abundance of the fengycin biosynthesis gene (70.33%); followed by those of surfactin (66.66%), bacillomycin (58.33%) and mycosubtilin (25%). Volatile compounds emitted by these isolates showed a considerable inhibition of *Phytophthora infestans* growth, being less efficient against *Fusarium oxysporum* var. *coeruleum*, while *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* and *F. graminearum* were resistant. Gram-positive isolates formed thicker biofilms than those formed by Gram-negative ones. In addition, the bioremedial effect of the isolates was evaluated by testing their ability to degrade fungicides, strain *Pseudomonas protegens* XI14 was found to degrade the three fungicides: propicone, curatine V and kazir. Some isolates significantly stimulated wheat growth during the emergence phase, namely: *P. protegens* XI14, *P. plecoglossicida* 29INH and *B. amyloliquefaciens* 30INH. Gram-negatives strains were more efficient in protecting wheat against *F. graminearum*. No decline rate has been recorded in seedlings treated with *P. protegens* XI11 and *Pseudomonas* sp. (XI3 and P37). As for the identified pathogenic strains: *Acinetobacter calcoaceticus* XI22, *Hafnia alvei* XI47 and *Stenotrophomonas maltophilia* P29; they had a very considerable antagonistic potential in direct confrontation against fungicide-resistant pathogenic fungi but very limited in indirect confrontation *via* production of volatile substances. P29 produced lipases and proteases while XI47 produced only lipases.

**Key words:** Biocontrol, cyclic lipopeptides, systemic resistance, phytostimulation, bioremediation.

**ملخص:** تم في هذه الدراسة استعمال 45 سلالة بكتيرية معزولة من رايزوسفير القمح والبطاطا. تم انتقاء هذه العزلات مسبقا بناء على قدرتها التثبيطية لنمو فطريات ممرضة للنبات. بين تحديد التسلسل النيكليوتيدي ل ADN 16S انتماء هذه العزلات الى جنسي *Bacillus* و *Pseudomonas* من بين العزلات الاربع التي تم اختبار قدرتها على تخفيف التعبير الجيني لمورثات المقاومة عند نبتة *Arabidopsis* وجد أن العزلتين *Bacillus amyloliquefaciens* A16 و *Pseudomonas plecoglossicida* XI39 قادرتان على تخفيف هذه المورثات الى مستويات هامة مقارنة مع ما تم الحصول عليه باستعمال حمض salicylique. تم اثبات انتاج هذا الحمض من قبل العزلات الاربع بتركيز تراوحت بين 0.34 و 0.40 مغ/مل. تم انتقاء 24 عزلة بناء على قدرتها التضادية مخبريا للبحث عن مورثات تصنيع البروتينات الليبيدية الحلقية ودراسة قدرتها على اثباط الفطريات الممرضة بواسطة افرازها لمركبات عضوية طيارة. بين مظهر الهجرة الكهروبنائية لنواتج التضاعف المتسلسل تواجدا وفيرا لمورثة تصنيع fengycine (70.33%) متنوعة ب surfactine (66.00 %) و bacillomycine (58.33%) ثم mycosubtiline (25%). تثبطت المركبات الطيارة المفروزة بنسب هامة نمو فطر *Phytophthora infestans* و بنسبة اقل نمو فطر *Fusarium solani* var. *coeruleum* في حين انها كانت عديمة التأثير على فطري *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* و *Fusarium graminearum*. شكلت البكتيريا موجبة الغرام بيوفيلم بيكتيري أسمك من الذي شكلته العزلات سالبة الغرام. كذلك تم اختبار القدرة التطهيرية لهذه البكتريا وتبين انها قادرة على هدم مبيدات الفطريات الكيميائية، حيث فككت العزلة *Pseudomonas protegens* XI14 المبيدات الثلاثة propicone, curatine V و kazir. حفزت العزلات البكتيرية *Pseudomonas protegens* XI14 و *Pseudomonas* sp. (XI3 و P37) نمو القمح خلال فترة الانبات. بينما كانت البكتريا سالبة الغرام أكثر نشاطية في حماية القمح ضد *F. graminearum*. حيث نمت جميع الشتلات المعالجة بالعزلات *P. plecoglossicida* 29INH و *B. amyloliquefaciens* 30INH و *P. protegens* XI11 و *Pseudomonas* sp. (XI3 و P37) ، و لم يسجل موت أية شتلة. أظهرت السلالات الممرضة المعزولة *Acinetobacter calcoaceticus* XI22 و *Stenotrophomonas maltophilia* P22 و *Hafnia alvei* XI47 قدرة تضادية كبيرة تجاه الفطريات المقاومة للمبيدات في اختبار المواجهة المباشرة، وقدرة محدودة في الاختبار غير المباشرة بانتاج مواد طيارة أيضا أفزرت العزلة P29 إنزيمات حالة للبيدات والبروتينات، بينما أفزرت العزلة XI47 إنزيمات حالة للبروتينات فقط.

**كلمات مفتاحية:** المكافحة الحيوية، بروتينات ليبيدية حلقية، مقاومة جهازية، تخفيف نباتي، تطهير بيولوجي.