

# Les bactéries

Les bactéries sont les organismes les plus anciens que l'on connaisse et les plus nombreux dans le sol. Leurs tailles sont si petites qu'il est difficile d'imaginer qu'un simple grain de poussière peut en contenir des centaines de milliers. Elles sont apparues il y a 3 milliards d'années et représentent la plus ancienne forme de vie sur Terre.

Elles sont des procaryotes, c'est-à-dire de forme si simple qu'elles sont constituées souvent d'une simple cellule sans organelle ni même de noyau, un simple ADN contenu dans un seul chromosome au milieu du cytoplasme. Leurs parois rigides possèdent des formes très diverses qui permettent de les classer.

Entre cette paroi extérieure et la membrane cytoplasmique intérieure (l'espace périplasmique) se trouve de la place pour loger des protéines qui leur permettent d'appréhender leur environnement et surtout de se nourrir.

Pour l'essentiel, les bactéries se reproduisent par division cellulaire. Une cellule se divise en deux et donne deux cellules qui à leur tour se divisent en deux et ainsi de suite. La vitesse de division est extrêmement rapide, de l'ordre de plusieurs milliards par jour mais fort heureusement, leur durée de vie dans les sols est contrariée par de nombreux prédateurs (d'autres bactéries, champignons, surtout des protozoaires) et par les conditions édaphiques (humidité, sécheresse, température, modification du pH, etc...). Leur nombre et leur petite taille les placent à la base du réseau alimentaire des sols.

## **Travail de décomposition des M.O.**

En dépit de leur petite taille, les bactéries font partie, juste après les champignons, des décomposeurs les plus actifs et les plus importants des matières organiques sur Terre. Elles sont les premières à attaquer les matières animales et végétales afin d'en absorber notamment l'azote et le carbone. Ces nutriments sont alors stockés à l'intérieur de la bactérie et ne seront libérés (minéralisés) qu'à sa mort puis sa décomposition ou sa digestion et son exsudation par un prédateur.

Leur petite taille ne leur permet que des déplacements à leur échelle, c'est-à-dire quelques millimètres au cours de leur vie. Elles sont donc obligées de se nourrir des matières à leurs portées et plus petites qu'elles. C'est sans doute la raison qui les pousse à s'attaquer aux matières végétales ayant subies l'action fragmentaire d'animaux comme les microarthropodes (acariens et collemboles). Les bactéries attaqueront les produits de décomposition des végétaux carbonés après qu'ils aient été transformés par d'autres organismes en chaînes carbonées de plus petite taille.

En fragmentant et en ingérant les débris de matière organique, les micro-animaux du sol l'enrichissent en enzymes dans leurs tubes digestifs et sur leurs déjections peuvent alors se développer les bactéries qui trouvent aux seins de ces excréments des conditions de pH, d'humidité et de taille de matériaux favorables.

Mais se sont les matières organiques encore jeunes et fraîches (les matières vertes) qui contiennent beaucoup de sucres, plus facile à digérer que le carbone issu de végétaux plus âgés, que les bactéries attaquent en priorité.

Les matières organiques sont formées de molécules complexes de grande taille dont la plupart sont constituées de chaînes de molécules plus petites réunies en motifs répétitifs et comprenant du carbone. Les bactéries ont cette capacité de rompre ces chaînes de plus petite taille faite de sucres simples et d'acide gras et aminés. Pour briser ces liens qui maintiennent ensemble les chaînes organiques, les bactéries sécrètent des enzymes hors de leur paroi, et l'ensemble des réactions chimiques se déroulent ainsi dans le sol avant ingestion des particules dégradées. Ce plasma 'digestif' gluant entourant les bactéries est caractéristique de leur activité et joue un rôle non négligeable dans les sols, nous l'expliquons plus loin. En relais de cette prédigestion extérieure, d'autres enzymes, à l'intérieur de la bactérie, transforment ces fragments de molécules pour les besoins nutritionnels et énergétiques.

Les chercheurs ont énormément étudié les activités décomposantes des bactéries et ils les ont classés selon le milieu dans lequel elles vivent. En agriculture, deux grands types de bactéries nous intéressent. Le premier, les **bactéries anaérobies** sont capables de vivre en l'absence d'oxygène mais leurs activités aboutissent à des sous-produits liés au sulfure d'hydrogène, à l'acide butyrique, à l'ammoniac, à l'acide acétique qui ne présentent pas d'intérêt agronomique sauf qu'il faut savoir que les conditions anaérobies favorisent le développement des bactéries pathogènes induisant de nombreuses maladies et détruisent tout ou partie du groupe des bactéries aérobies, qui sont elles, bénéfiques. L'absence d'oxygène est préjudiciable au développement du groupe le plus intéressant des bactéries phytophages indispensable à la dégradation de la litière des sols, en minéraux et en humus.

Les **bactéries dites aérobies** sont celles qui permettent les décompositions indispensables à la vie. Celles présentes dans les sols jouent un rôle crucial dans le recyclage des trois éléments de base nécessaire à la vie terrestre: le carbone, le soufre et l'azote. Le carbone atmosphérique que la photosynthèse a bloqué dans la biomasse végétale en divers composés organiques est recombéné à l'oxygène lors de la décomposition dans le sol pour reformer du CO<sub>2</sub> qui s'échappe à nouveau dans l'atmosphère.

Leur spectre d'activité très large et sur une vaste gamme de pH, leur capacité, pour certaines d'entre elles, telles celles appartenant au genre *Bacillus*, de se protéger en produisant des spores très résistantes à la chaleur, aux radiations et aux désinfections chimiques, leur rapport surface/volume très élevé, leur permettant des transferts rapides de substrats solubles à l'intérieur de la cellule, assurent souvent aux bactéries une prédominance sur des micro-organismes de plus grandes dimensions comme les champignons.

Plus de cinquante familles de bactéries aérobies, décrites par les chercheurs, interviennent dans ces phases de décomposition-recyclage des minéraux.

### **Décomposition de la cellulose et de la lignine**

Parmi les bactéries, un sous-groupe a une grande importance : les actinomycètes. Ce sont des bactéries formant des filaments multicellulaires très semblables à des hyphes fongiques qui se fixent aux particules des sols. Les actinomycètes, contrairement aux autres bactéries, peuvent dégrader la cellulose et la lignine comme certains champignons tout en tolérant des températures et un pH plus élevés que les champignons. Ainsi, les actinomycètes sont des agents essentiels de la lignocellulolyse, bien que leur capacité à dégrader la cellulose et la

lignine ne soit pas aussi étendue que celle des champignons (Tuomela *et al.*, 2000). Les genres *Streptomyces* et *Nocardia* dominent ce sous-groupe à plus de 90 % selon Mustin (1987). Ils produisent des enzymes qui renferment des composés volatiles qui donnent au sol ces odeurs terreuses et fraîches.

**La cellulose** est un hydrate de carbone complexe composé de longues chaînes de glucose. C'est la molécule qui donne sa structure à la plante. La cellulose est le composé organique le plus abondant dans la biosphère, comportant presque la moitié de la biomasse synthétisée par la fixation photosynthétique de CO<sub>2</sub> et de ce fait elle représente une grande partie de la matière organique soumise à décomposition.

Les hémicelluloses sont des constituants végétaux qui accompagnent la cellulose dans la constitution du bois. Mais contrairement à la cellulose, les molécules d'hémicelluloses sont moins ramifiées et présentent un degré de polymérisation plus faible, plus facile à casser par les bactéries.

Des bactéries spécifiques : les *Cellulomonas*, sont porteuses d'enzymes (les cellulases) capables de dissocier les longues chaînes de glucose par opposition aux autres bactéries qui pratiquent des libérations aléatoires d'enzymes moins efficaces.

**La lignine** est une macromolécule complexe composée d'unités de type phénylpropanoïde. Ce polymère aromatique participe à la rigidité de la paroi cellulaire et rend les plantes plus résistantes à l'attaque des organismes pathogènes. Après les polysaccharides, la lignine est le plus abondant biopolymère dans la nature.

**La ligninocellulose** est un complexe formé de polymères de lignine, de cellulose et d'hémicelluloses. Les fibres de cellulose peuvent être étroitement liées aux hémicelluloses et à la lignine par des liaisons hydrogène principalement.

Ces composés complexes sont difficiles à attaquer du fait même de leur rôle durcifiant et protecteur des tissus végétaux. Les chaînes d'alcools interconnectés de la lignine résistent aux attaques des enzymes produits par la plupart de bactéries. Ce sont finalement les champignons qui se chargeront de ce travail.

### **Rôle des bactéries dans le cycle des éléments.**

Dans la Nature, rien ne perd, tout se recycle. Les plantes transforment en matières végétales les particules des gaz atmosphériques (par l'énergie du soleil et la photosynthèse) dans leurs parties aériennes (feuilles-tiges) et certains minéraux puisés dans le sol par leurs racines.

Des molécules isolées sont donc associées entre elles pour former des structures végétales et donner naissance aux diverses plantes. En fin de vie, ou par la volonté des hommes, ces plantes meurent ou sont détruites. Leur force énergétique s'éteint et n'est plus redistribuée aux organismes du sol par redistribution carbonée au niveau racinaire. N'étant pas capable de synthétiser leur alimentation par photosynthèse, les microorganismes attaquent donc la matière organique à leur disposition pour en tirer principalement le carbone, l'azote et le soufre dont ils ont besoin et qu'ils recevaient en partie des exsudats racinaires (phénols, acides organiques, alcools, protéines).

L'ensemble du réseau trophique du sol défait les liens moléculaires que la photosynthèse a construits et libère, après les avoir ingérés pour s'en nourrir, les éléments basiques de la vie

qui seront donc à nouveau disponible pour une transformation photosynthétique par les plantes.

Ainsi s'expliquent tous les cycles des éléments dont les principaux sont celui du carbone, de l'azote et du soufre.

Le cycle de l'azote est réalisé principalement par des bactéries libres ou en association avec les plantes. C'est l'un des systèmes d'entretien de la vie terrestre les plus importants.

L'azote est l'élément fondamental de la production végétale. Sa disponibilité détermine la croissance et les rendements. Il est disponible essentiellement dans l'air (79% du volume de l'atmosphère) où des bactéries spécifiques le captent pour qu'il pénètre dans les plantes par les divers systèmes d'association (les symbioses) mis au point durant l'Evolution. Cette fixation atmosphérique est décrite au chapitre suivant.

La seconde source d'azote vient de l'activité de décomposition exercée par de multiples bactéries, des champignons et les actinomycètes qui officient dans les sols, sur les tissus végétaux morts tombés en surface ou enfouis comme amendements. Ces microorganismes transforment les grosses molécules des protéines en polypeptides, acides aminés puis en amines dont l'urée  $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$  puis en ammoniac  $[\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2]$  qu'ils absorbent et engrangent dans leur cytoplasme.

Ce sont les protozoaires et des nématodes qui libèrent ces ions  $\text{NH}_4^+$  en les dispersant dans le sol par leurs déjections, après avoir mangés et digérés les bactéries et les champignons qui constituent leurs nourritures. A ce stade, l'azote est pour partie assimilé par les plantes ou mis en stock sur le complexe argilo-humique, ou lessivé si le pouvoir absorbant du sol est trop faible. Passé ce stade, seules les bactéries nitreuses (les Nitromonas) sont capables de poursuivre le processus de la transformation des ions  $\text{NH}_4^+$  par oxydation, en nitrite  $\text{NO}_2$  et si les conditions de pH sont favorables, par une nouvelle oxydation, en nitrate  $\text{NO}_3^-$  par les bactéries nitriques (les Nitrobacter).

Le travail de ces bactéries nitrificatrices est possible parce que, contrairement aux premiers intervenants microbiens, elles ne tirent pas leur énergie de l'azote qu'elles ingèrent, mais des oxydations qu'elles réalisent et du carbone qu'elles puisent dans le  $\text{CO}_2$  du sol. Elles laissent donc disponible dans le sol l'azote qu'elles synthétisent. La Nature a bien fait les choses.

$\text{NO}_3^-$ , le nitrate, est la forme d'azote la plus assimilable par les plantes qui l'absorberont selon leurs besoins ou qui sera stocké par le complexe argilo-humique pour une utilisation ultérieure, ou lessivé en cas de déséquilibre ioniques.

Si les conditions de pH sont défavorables, trop basse (acide), les bactéries ne peuvent pas vivre et seuls les champignons décomposent les matières azotées en s'arrêtant au stade ammoniac.

La réaction de l'azote avec l'eau dont il capte l'oxygène ou l'hydrogène le rend soluble et lessivable par l'eau de pluie et d'arrosage vers les nappes phréatiques et les océans quand il est sous la forme nitrate  $\text{NO}_3^-$ .

A ce stade également, présentes dans tous les sols mais spécifiquement dans les sols pauvres en oxygène, d'autres bactéries dite dénitrificatrices sont capables d'utiliser les nitrates comme oxydants et de les réduire en azote gazeux ( $\text{N}_2$ ) qui retourne dans l'atmosphère, perpétuant ainsi le cycle.

La conséquence pratique immédiate est d'avoir des sols suffisamment aérés pour favoriser une importante activité bactérienne. Le microfilm bactérien, visqueux, est capable de lier les particules du sol les une aux autres et il est l'endroit au sein duquel se situe toutes les activités enzymatiques. Il a généralement un pH supérieur à 7. Si l'on entretient dans les sols une activité bactérienne par toutes les techniques qui seront développées en seconde partie de ce manuel, le biofilm produit par les bactéries aérobies maintiendra le pH de leur voisinage au dessus de 7 et la nitrification pourra se faire.

### **Les biofilms et les antibiotiques :**

Le mucus bactérien a bien d'autres particularités intéressantes en agriculture. Ce biofilm, comme nous venons de le voir, est la matrice constituée de sucres, de protéines et d'ADN issue de l'activité des bactéries. Il est alcalin mais n'influence pas le pH du sol. Il n'agit que sur celui de la rhizosphère, améliorant ainsi la vie microbienne autour des racines et les résultats des échanges sol/plantes.

Agglomérés à ce mucus gélatineux, des restes d'animaux, des fibres de plantes, des cristaux de roches forment des cavités et des canaux qui se remplissent d'eau et permettent le transport des nutriments et des déchets. Il a été constaté que ce biofilm protège les bactéries de la déshydratation lorsque le sol s'assèche et des antibiotiques ou microbiocides présents dans le sol. Les bactéries isolées sont mille fois moins résistantes à ces antibiotiques et microbiocides produits naturellement par l'activité microbienne.

Cette propriété des microorganismes à produire des toxines pour éliminer la concurrence est d'une importance essentielle en agriculture biologique.

L'étude des synergies ou antagonismes entre les interactions des agents microbiens présents dans les sols ne sont pas encore bien étudiés. Les penicillium, Proteus, Pastorella, Acinetobacter, Actinomyces, Bacteroides, Brucella, Campylobacter, Clostridium, Moraxella, Neisseria, Nocardia, et toutes les bactéries issues des familles répertoriées dans les sols (Alcaligenaceae, Alteromonadaceae, Bacillaceae, Burkholderiaceae, Bradyrhizobiaceae, Caryophanaceae, Caulobacteraceae, Cellulomonadaceae, Clostridiaceae, Comamonadaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Flexibacteraceae, Hyphomicrobiaceae, Intrasporangiaceae, Methylobacteriaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae, Neisseriaceae, Nitrosomonadaceae, Nocardiaceae, Nocardiosporeaceae, Paenibacillaceae, Phyllobacteriaceae, Propionibacteriaceae, Pseudomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Rhodobacteraceae, Sphingobacteriaceae, Staphylococcaceae, et Xanthomonadaceae. etc..) connues pour leurs productions d'antibiotiques en général puissants et à larges spectres, doivent forcément induire les équilibres sanitaires constatés sur le terrain. Les résultats extraordinaires de bonne santé obtenus sur des cultures par l'entretien de la vie organique, confirment ces synergies et antagonismes ou les bactéries aérobies, d'actions positives pour la vie des sols, dominant le développement des activités des bactéries anaérobies d'actions néfastes.

Plusieurs espèces et genres de bactéries ont été utilisés pour améliorer la croissance des végétaux, les résultats les plus intéressants étant obtenus avec *Agrobacterium radiobacter*, pour lutter contre la galle du collet dans plusieurs familles de plantes, *Bacillus subtilis*, qui élimine le piétin des céréales, et différents inoculums à base de *Bacillus* utilisés dans toute la Chine sur les cultures maraîchères.

Un certain nombre de Bactéries sécrètent des métabolites toxiques pour les Nématodes.

Une seule Bactérie parasite de Nématodes, *Pasteuria penetrans*, est étudiée de façon approfondie par les nématologistes. Son efficacité parasitaire remarquable permet de réduire les populations de Nématodes de plus de 80% et ses endospores d'une résistance exceptionnelle permet leur stockage pendant très longtemps sans aucun problème particulier.

On désigne par métabolites toxiques ou toxine une substance non-enzymatique, de faible poids moléculaire, produite par un micro-organisme et nocive à faible concentration. L'originalité des toxines "nématocides" réside dans leur activité, qui se manifeste par contact et non par ingestion, ce qui les distingue par exemple des mycotoxines insecticides, telles que les destruxines. Mais ce terme de nématocide est souvent employé au sens large pour désigner des substances nématifuges (répulsives), nématostatiques (perturbant la reconnaissance de sa plante-hôte par le Nématode, ou bloquant le développement de l'oeuf ou de la larve, ou paralysant l'animal temporairement) et nématocides *sensu stricto* (ovicides, larvicides ou létales pour tous les stades).

Plusieurs bactéries du genre *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement attrayantes pour protéger les plantes contre les pathogènes. Pour la plupart, ces bactéries ont une capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population remarquable (Haas et Keel 2003), sans doute grâce aux échanges de métabolites avec la plante au niveau de la rhizosphère. Ces nombreuses rhizobactéries sont donc capables d'agir directement sur l'agent pathogène (par compétition vis-à-vis des éléments nutritifs ou de l'espace, par antibiose ou par parasitisme), ou indirectement via l'induction d'une résistance systémique (ISR) chez la plante hôte, ce qui engendre une protection contre un grand nombre d'agents pathogènes fongiques et bactériens (Van Loon et al., 1998). Cependant la nature des mécanismes impliqués dans le déclenchement de cette ISR reste un sujet à controverse. Cette résistance a souvent été comparée à la résistance systémique acquise (SAR) traditionnellement induite par des pathogènes et qui consiste en l'activation d'un certain nombre de réactions de défense qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance de la plante entière contre un large spectre d'agents pathogènes.

La capacité des bactéries à stimuler les défenses naturelles est déterminée principalement *via* deux types de protéines de défenses (chitinases et  $\beta$ -1,3-glucanases) produites dans toutes les plantes si l'on s'en réfère à la littérature scientifique.

Des centaines d'études s'attachent à comprendre l'activité phytoprotectrice des divers microorganismes du sol pour en reproduire les mécanismes en sélectionnant et cultivant bactéries, nématodes, champignons ou virus pour des usages phytosanitaires dit naturels.

Une colonie de bactéries aérobies produira naturellement des antibiotiques pour tenir sous contrôle les colonies de bactéries. L'expérience concrète sur des milliers d'hectares montre qu'un sol bien entretenu en matière organique diminue considérablement les risques infectieux pour les cultures grâce à toute la série d'influences biochimiques de l'activité microbienne sur sa structure, sa chimie et sa biologie.

### **Le cas particulier des rhizobactéries du genre *Pseudomonas***

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires. Quelques espèces comme *P. syringae*

sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain, particulièrement *P. aeruginosa*.

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui sont particulièrement intéressantes en agriculture biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable. Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exudats racinaires (Chin-A-Woeng et al. 2002).

Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces éléments chimiques sécrétés par les micro-organismes et capable de chélater l'ion Fe permettent au *P. fluorescens* de dominer très facilement et farouchement pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. Certaines souches développent aussi une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante. Mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène.

Le premier rapport sur l'utilisation d'un *Pseudomonas* produisant un antibiotique pour le contrôle d'un agent pathogène racinaire, en l'occurrence *Rhizoctonia solani*, est venu de Howell et Stipatovic en 1979. Ces auteurs identifièrent la pyrrolnitrine produite par une souche de *Pseudomonas fluorescens* comme facteur permettant d'inhiber le pathogène. Par contre, on doit à Thomashow et Weller, neuf ans plus tard, la première démonstration expérimentale, utilisant une approche génétique pour démontrer l'implication d'un antibiotique produit par une souche de *Pseudomonas* dans la suppression d'un agent phytopathogène.

L'idée que des rhizobactéries peuvent être utilisées pour lutter contre les agents pathogènes telluriques découle en partie de certaines études faites sur les sols suppressifs (Keel et al. 1996, Mazzola et al. 2002, Raaijmakers et al. 1997, 1998). Un sol suppressif se caractérise par une très faible incidence d'infection, ou l'absence totale de maladie, malgré la présence d'un organisme capable d'infecter la plante et d'un hôte susceptible (Weller et al. 2002). Bien que certains facteurs physiques comme le pH, la proportion de matière organique et d'argile puissent influencer la capacité de suppression, cette dernière est généralement directement liée à la communauté microbienne.

Les sols suppressifs ont été caractérisés pour plusieurs pathosystèmes différents. On rencontre des sols dans lesquels des agents pathogènes comme les nématodes *Heterodera spp.*, la bactérie *Streptomyces scabies*, les champignons *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* et *Gaeumannomyces graminis* ainsi que l'oomycète *Phytophthora cinnamomi* sont incapables de croître convenablement et d'infecter leurs hôtes (Weller et al. 2002).

C'est plus particulièrement l'étude des sols favorisant le déclin du piétin échaudage du blé causé par *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* qui aiguillonna les chercheurs sur la piste des *Pseudomonas fluorescens* producteurs d'antibiotiques. On remarqua alors que les racines des

plants de blé poussant dans ces sols abritaient une grande densité ( $2 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  de racine) de *Pseudomonas fluorescens* capable de produire l'antibiotique 2,4-diacétylphloroglucinol. À l'opposé, la proportion de la population de *Pseudomonas* capable de produire cet antibiotique était nulle ou très faible dans les rhizosphères de blé provenant des sites propices à la maladie.

Rapidement après cette découverte sur les sols suppressifs dans le nord-ouest des États Unis, des souches de *Pseudomonas* productrices d'antibiotiques ont été isolées sous plusieurs horizons géographiques différents et associées aux rhizosphères d'une grande variété de plantes agricoles. Par exemple, en plus du blé, des rhizosphères de betteraves à sucre en Irlande, de concombre et de tomates en Suisse, de coton au Texas et de tabac au Ghana ont livré des souches productrices de DAPG .

Les antibiotiques produits par les rhizobactéries du genre *Pseudomonas* sont de plusieurs types : le DAPG, le cyanure d'hydrogène (HCN), la pyolutheorine (PLT) et, dans certains cas, la pyrrolnitrine (PYR)

- Les phloroglucinols (à l'origine du 2.4 Diacétylphloroglucinol (DAPG) sont les plus souvent rencontrés dans la production des *P. fluorescens* dans les sols du monde. Se sont des métabolites secondaires phénoliques produits également par des plantes, algues et bactéries, ce qui montre bien (si cette démonstration est encore nécessaire) les possibilités de défense que l'ensemble du complexe rhizosphérique a mis en place au cours de son évolution.

Plus d'une soixantaine de dérivés ont été décrits pour leurs activités antimicrobiennes, antivirales, antihelminthiques, phytotoxiques, cytotoxiques et antioxydantes (Bender and Rangaswamy 1999, Dwivedi and Johri 2003). De ce nombre, c'est l'activité antimicrobienne qui a attiré le plus l'attention des chercheurs. En effet, plusieurs études ont démontré que les souches de *Pseudomonas* spp. productrices de DAPG peuvent supprimer une large gamme d'agents phytopathogènes, incluant bactéries, champignons et nématodes.

Le groupe de gènes responsable de la formation du DAPG a été identifié et caractérisé chez la souche Q2-87 (Bangera et al. 1996, 1999). On sait avec certitude que le monoacétylphloroglucinol (MAPG) est le précurseur immédiat du DAPG. Le précurseur du MAPG n'a pas été clairement identifié mais semble appartenir au groupe des polycétides. Les polycétides sont une famille de molécules naturelles produites par condensation successive de petits acides carboxyliques. Trois types de polycétides synthases (PKS) sont connus. On retrouve chez les microorganismes des PKS de types I et II principalement. Parallèlement, on retrouve chez les plantes des PKS de type III. Ces enzymes végétales sont composées d'une protéine homodimérique capable d'assurer les étapes de condensation et de cyclisation menant à la synthèse de nombreux composés phénoliques impliqués dans les réactions de défense.

Chez *P. fluorescens* Q2-87, six gènes désignés *phIA*, *phIB*, *phIC*, *phID*, *phIE* et *phIF*, faisant partie de la voie métabolique, ont été identifiés sur un fragment génomique de 7.2 kb. L'enzyme PhID est essentielle pour la synthèse du MAPG.

Les populations de *Pseudomonas* productrices de ces divers antibiotiques ont des préférences de genre. Certaines bactéries colonisent davantage les monocotylédones tandis que d'autres se développent plus une présence des dicotylédones mais quoiqu'il en soit, la rhizosphère est colonisée par un nombre grandissant de producteurs de DAPG au cours de son développement (On en a compté 188 chez le maïs, 116 chez le blé). Il y aurait de plus une relation entre l'âge de la plante et le niveau de diversité. Ce dernier serait assez



constant au cours du développement mais chuterait à la fin du développement alors que les racines sont fortement colonisées (Picard and Bosco 2000).

- Les phénazines : elles représentent une vaste famille de molécules hétérocycliques azotées fortement pigmentées et capables d'une action antibiotique à large spectre. L'aptitude à les produire est limitée aux bactéries. On en note la production chez certains membres des genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Sorangium*, *Nocardia* et *Brevibacterium*. Plus de 50 phénazines sont présentement connues, toutes ayant le même noyau hétérocyclique, et certaines souches peuvent produire jusqu'à 10 dérivés différents en même temps (Delaney et al. 2001, Chin-A-Woeng et al. 2003, Mavrodi et al. 1998).

Les différentes espèces de *Pseudomonas* étudiées (*P. fluorescens* 2-79, *P. chlororapis* PCL1391, *P. aeruginosa* PA01 et *P. aureofaciens* 30-84 en autres) partagent des gènes de production de phénazine assez semblables mais elle se démarquent par l'éventail des phénazines qu'elle produisent.

Les premières études sur le rôle des antibiotiques produits par les rhizobactéries suggéraient une implication dans la survie des microorganismes dans le sol. On connaît aujourd'hui l'avantage de la production de phénazine pour la colonisation et la survie des bactéries dans la rhizosphère. L'implication des phénazines dans la compétition écologique se traduit également par une action directe sur le biocontrôle des pathogènes racinaires fongiques (Chin-A-Woeng et al. 2003, Cook et al. 1995).

Le spectre d'action étonnamment large des phénazines, ainsi que le mécanisme de cette action au niveau cellulaire ne sont pas à ce jour bien compris. On peut cependant croire, en se référant à la structure de ces molécules, que suite à leur diffusion à travers la membrane de la cellule cible, elles pourraient agir comme accepteur d'électron et court-circuiter la chaîne respiratoire. Cette interférence dans le transport normal des électrons aurait pour effet de produire une grande quantité de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et d'ions superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La quantité de ces deux molécules cytotoxique serait alors suffisante pour surcharger la superoxyde dismutase et mener directement à la mort de la cellule (Delaney et al. 2001).

Un autre phénomène est couramment observé, c'est la déformation des hyphes qui s'enroulent sur eux-mêmes au lieu de pénétrer dans les racines. Le phénomène de distorsion de la croissance des hyphes résulte en des changements abrupts de la direction de croissance des hyphes, une croissance en boucle et une augmentation de la fréquence de branchement des hyphes (mycéliums anastomisés, voir chapitre sur les champignons)

- La pyrrolnitrine (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)-pyrrole) est un antibiotique à large spectre isolé pour la première fois dans les années soixante à partir de *Pseudomonas pyrrocinia*. Par la suite, ce composé a été isolé chez plusieurs autres espèces de bactéries incluant *Myxococcus fluvus*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia* sp., ainsi que plusieurs *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Ce métabolite très actif a également connu un usage médical pour le traitement des mycoses cutanées tandis qu'un dérivé de la molécule a été développé comme fongicide agricole (fludioxonil) (Hammer et al. 1997, McSpadden Gardener et al. 2002). La production de ce composé par *P. fluorescens* et *B. cepacia* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *R. solani*, *V. dahliae*, *G. graminis* et *F. oxysporum* (Homma et al. 1989, Howell and Stipatovic 1979).

- La pyolutéorine est un autre antibiotique produit par différents *Pseudomonas*. Elle possède un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes et s'avère l'antibiotique bactérien le plus toxique envers *Pythium ultimum*.

- Le cyanure d'hydrogène (HCN) : La HCN synthase est une flavoprotéine membranaire qui catalyse la formation de cyanure d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> à partir de la glycine (La *glycine* est un acide aminé répandu dans les végétaux). Cette enzyme est codée par trois gènes structuraux ( *hcnA*, *hcnB*, *hcnC* ) séquencés chez *P. aeruginosa* PAO1 et chez *P. fluorescens* CHAO (Ramette et al. 2003).

La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielaviopsis basicola* , *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Ramette et al. 2003). Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant la cytochrome oxidase dans la chaîne respiratoire. Cependant, en plus d'une activité protectrice, le HCN peut également être nocif pour la plante.

Au niveau de l'adaptation à la rhizosphère, la production d'HCN peut être avantageuse pour acquérir des nutriments. Par exemple, le HCN cause une augmentation de l'exudation de nutriments par les tissus de la plante. Il peut aussi contribuer à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci.

- En plus des antibiotiques mentionnés ci-haut, qui sont de loin les plus étudiés, d'autres composés secondaires ainsi que certaines enzymes extracellulaires produits par les *Pseudomonas* peuvent avoir un effet sur le biocontrôle. Par exemple, la production de trois lipopeptides cycliques (viscosianmide, tensine et amphisine) a été démontrée chez une souche isolée de la rhizosphère de la betterave à sucre (Harder et al. 2003). Ces composés démontrent tous une activité antagoniste contre *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani*.

Notre conviction que la propagation d'agents bactériens comme régulateurs de la flore ou de la faune pathogène n'est pas le remède magique à développer systématiquement. En effet, l'action des microorganismes est très souvent lié à une plante hôte, à la reconnaissance d'un signal génétique qu'elles (les plantes et les bactéries) ont mis au point à force de se côtoyer.

**Cette constatation, liée à toutes les autres concernant les antibiotiques issus des microorganismes du sol, va dans le sens d'une préconisation de la présence simultanée de tous les microorganismes dans le sol. Cela veut dire qu'il faut favoriser leur développement (aléatoire car dépendante de la nature du sol) par une nourriture du sol variée, adaptée à toutes les espèces, afin de bénéficier de l'émergence (incontrôlable) des milliers d'espèces bénéfiques ou non, mais concurrentielles des espèces pathogènes.** Les matières organiques incorporées dans le sol peuvent tout de même influencer la nature des microorganismes que l'on désire favoriser mais cela fera l'objet d'un chapitre spécifique de la deuxième partie de ce protocole.

Tous les antibiotiques impliqués dans le biocontrôle sont produits sous la gouvernance du système de régulation post-transcriptionnel GacA/GacS. Ce système dont l'acronyme vient de *global activator of antibiosis and cyanide synthesis* , régule, chez les bactéries Gram-négative, la production d'antibiotiques ou de facteurs de virulence selon l'espèce. Selon le modèle actuel, un signal inconnu active GacS ( *sensor kinase* ) et cette activation mène à la phosphorylation de GacA. Une fois phosphorylée, GacA permet la transcription de petits ARN régulateurs. Ceux-ci pourront alors libérer le site de liaison au ribosome des ARNm des gènes de production d'antibiotiques, et permettre leur traduction (Haas and Keel 2003).

Chez *Pseudomonas*, le mécanisme de détection du quorum nécessaire à l'activité inhibitrice se base sur la communication entre les cellules par la diffusion de petites molécules de signal : les *N*-acyl-homosérines lactones (AHL). Le système de détection du quorum permet donc aux bactéries d'avoir atteint un certain seuil de population avant de déclencher la

synthèse d'antibiotiques. Ainsi, les antibiotiques sont produits au moment où ils seront efficaces, c'est à dire lorsqu'il y aura suffisamment de cellules pour en produire en quantité inhibitrice.