

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : *Biologie Moléculaire des Microorganismes*

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

*Effets PGPR des bactéries endophytes isolées à partir des nodules du  
pois*

---

Présenté par : BOUHACHICHA GHOUFRANE  
FRIFET AMANI LINA  
BOUAROUDJ KHOULOU

Le 22/06/2023

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme. ARABET D. (Maître de Conférences- UFM Constantine 1).  
Rapporteuse : Mme. GACI M. (Maître de Conférences- UFM Constantine 1).  
Examinatrice : Mme. LIFA M. (Maître Assistante – UFM Constantine 1).

Année universitaire  
2022 - 2023



# *Remerciements*

Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans des bonnes conditions.

Nous tenons à remercier très profondément *Mme. GACI MERIEM* de nous avoir encadrées, orienté, aidé, conseillé et encouragé et de nous avoir permis de travailler dans un cadre très agréable, nous vous somme infiniment reconnaissantes.

Nos vifs remerciements sont adressés aux membres de jury *Mme. ARABET DALLEL* et *Mme. LIFA MAROUA* pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger notre travail.

Nous n'oublions pas de remercier toute personne ayant participé et aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## *Dédicaces*

À mes très chers parents, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie, que j'aime plus que tout au monde, pour leur amour, leur suivis durant toutes mes années d'études, et aussi pour leurs sacrifices, leur patience sans limite ,leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que Dieu les protège et leur donne le bonheur et la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

À mes chers frères *MOUHANED, ABD EL MAWLA* : aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

À mes belles-sœurs *DOUNIA, ARIDJE* merci pour vos encouragements permanents.

À tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

À tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragée et m'ont Souhaité du bien de près ou de loin.

*GHOUFRANE*

## *Dédicaces*

*En signe de respect et d'appréciation, je tiens à dédier ce modeste travail :*

*À mes très chers parents Frifet Smaïn et Rezka Fatima Zohra, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifices. Quoique je puisse dire ou écrire, ne pourra exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance envers vous. En témoignage de tant d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières, pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous vos efforts fournis à mon égard.*

*À mes très chers frères Aymen et Mehdi et Louay merci à tous les moments d'enfance passés avec vous mes frères, en gage de ma profonde estime pour l'aide que vous m'avait apportée. Vous m'avez toujours soutenue, réconfortée et encouragée. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.*

*A mes très chères tantes Aucun mot ou langage ne pourrait exprimer ma gratitude, amour et respect envers vous, malgré toutes les difficultés et les obstacles vous m'avez toujours aidée avec un sourire plein d'amour et de joie, C'était un trajet long rendu plus facile grâce à votre soutiens, compréhension et efforts.*

*Merci infiniment ma source de joie et de courage vous et toute ma grande famille.*

*Et enfin à tous mes amis, tous ceux que j'aime et tous ceux qui m'aiment.*

*Amani Lina*

## *Dédicaces*

Je remercie Allah le généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la science.

A toute ma famille qui était toujours avec moi tout au long du parcours universitaire.

A Ma mère : je te dédie ce travail, ma chère maman ma source de joie dans ma vie, tu m'avais soutenue et encouragée durant ces années d'études.

A Mon père : était toujours avec moi, l'exemple du courage et de patience, merci d'illuminer ma vie avec ta présence.

Ma chère sœur *Sandra* et mon adorable frère *Abed El Rahman* pour leur encouragement et leur appui.

Je dédie ce travail également à tous ceux qui m'ont encouragée et aidée à réaliser ce travail de près ou de loin et qui ont participé à ma réussite.

*KHOULOUD*

## Résumé

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, communément désignés sous le terme « PGPR » habitent naturellement la rhizosphère, une zone du sol entourant les racines, caractérisée par sa richesse en micro-organismes et en éléments nutritifs. Ces PGPR ont attiré une attention particulière en raison de leur capacité à améliorer la productivité et la rentabilité des cultures agricoles, dans un temps où la sécurité alimentaire et les moyens de subsistance représentent une priorité majeure. Ces rhizobactéries établissent des interactions associatives bénéfiques avec les légumineuses, intervenant directement et indirectement dans la favorisation de leurs croissances selon divers mécanismes. Ce travail a pour but de caractériser et évaluer les différents métabolites et enzymes à effet PGPR, produit par nos 14 souches endophytes non rhizobiennes isolées à partir de la légumineuse *Pisum sativum* L. L'étude expérimentale a été effectuée par des tests de la production de l'acide indole acétique (AIA), le cyanure d'hydrogène (HCN) et l'ammoniac (NH<sub>3</sub>), tout en mettant l'accent sur la détection des activités enzymatiques telles que : la présence de l'amylase, la pectinase et la catalase. Les résultats obtenus montrent la capacité de toutes nos souches à produire l'AIA à des concentrations variables. La plus grande concentration (25,8 µg/ml) a été observée chez la souche 13 au bout du 7<sup>ème</sup> jour d'incubation, alors que la plus faible quantité a été observée chez la souche 69 après 2 jours d'incubation. La capacité à produire l'ammoniac chez la totalité des souches a été constaté excepté la souche 13. La recherche de la catalase indique que toutes les souches sont catalase positif sauf les souches 8 et 13 qui sont catalase négatif. Le pouvoir de produire les enzymes amylase et pectinase a été détecté chez l'intégralité des souches, avec la production de l'HCN chez 11 souches parmi les 14 testées. Toutes ces données nous poussent à déduire que toutes les souches isolées détiennent des activités à effets favorisant la croissance végétale « PGP ».

**Mots clés :** *Pisum Sativum* L ; Rhizosphère ; Bactéries endophytes ; PGPR.

## **Abstract**

Plant growth- promoting rhizobacteria, commonly referred to as “PGPR” naturally inhabit the rhizosphere, a zone of soil surrounding the roots, characterized by its richness in microorganisms and nutrients. These PGPRs have attracted particular attention because of their ability to improve the productivity and profitability of crops, at a time when food security and livelihoods are a major top priority. These rhizobacteria establish beneficial associative with legumes, playing a direct and indirect role in promoting their growth through various mechanisms. The aim of this work is to characterize and evaluate the various metabolites and enzymes with a PGPR effect, produced by our 14 non-rhizobial strains isolated from the legume *Pisum Sativum L.* The experimental study was carried out by testing the production of indol acetic acid (IAA), hydrogen cyanide (HCN) and ammonia (NH<sub>3</sub>), with emphasis on the detection of enzymatic activities such as amylase, pectinase and catalase. The results obtained show the ability of all our strains to produce IAA at varying concentrations. The highest concentration (25,81 µg/ml) was observed in strain 13 at the end of the 7th day of incubation, while the lowest amount was observed in strain 69 after 2 days of incubation. The ability of all strains to produce ammonia except strain 13. Testing for catalase indicates that all strains were catalase positive except strains 8 and 13, which were catalase negative. The ability to produce the enzymes amylase and pectinase was detected in all strains, with HCN production in 11 strains out of the 14 tested. All these data leads us to deduce that all strains isolated have plant growth promoting activities “PGP”.

**KEY WORDS:** *Pisum sativum L* ; Rhizosphere ; Endophytic bacteria ; PGPR.



## ملخص

تعيش البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات والتي يشار إليها عادةً باسم "PGPR" بشكل طبيعي في منطقة الجذور، وهي منطقة من التربة تحيط بالجذور، وتتميز بثرائها بالكائنات الحية الدقيقة والمغذيات. وقد اجتذبت تقارير PGPR هذه اهتمامًا خاصًا نظرًا لقدرتها على تحسين إنتاجية وربحية المحاصيل الزراعية، في وقت يمثل فيه الأمن الغذائي وسبل العيش أولوية رئيسية. تنشئ هذه البكتيريا الجذرية تفاعلات ارتباطية مفيدة مع البقوليات، وتتدخل بشكل مباشر وغير مباشر في تعزيز نموها وفقًا لآليات مختلفة. يهدف هذا العمل إلى توصيف وتقييم المستقلبات والإنزيمات المختلفة بتأثير PGPR، التي تنتجها سلالاتنا الداخلية غير الجذرية 14 المعزولة من البقوليات *Pisum sativum* L. وأجريت الدراسة التجريبية عن طريق اختبار إنتاج حمض الأسيتيك الإندولي (AIA)، سيانيد الهيدروجين (HCN) والأمونيا (NH<sub>3</sub>)، مع التأكيد على الكشف عن الأنشطة الأنزيمية مثل: وجود الأميلاز والبكتيناز والكتلاز. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها قدرة جميع سلالاتنا على إنتاج AIA بتركيزات مختلفة. لوحظ أعلى تركيز (25,8 ميكروجرام / مل) في السلالة 13 بعد اليوم السابع من الحضانة، بينما لوحظ أقل تركيز في السلالة 69 بعد يومين من الحضانة. وقد لوحظت القدرة على إنتاج الأمونيا في جميع السلالات باستثناء السلالة 13. تشير أبحاث الكاتلاز إلى أن جميع السلالات موجبة للكتلاز باستثناء السلالتين 8 و13 اللتين تكونان سالبة الكاتلاز. تم الكشف عن القدرة على إنتاج إنزيمات الأميلاز والبكتيناز في جميع السلالات، مع إنتاج HCN في 11 من 14 سلالة تم اختبارها. كل هذه البيانات تقودنا إلى استنتاج أن جميع السلالات المعزولة لها أنشطة ذات تأثيرات تعزز نمو النبات "PGP".

الكلمات الرئيسية: *Pisum Sativum* L ؛ جذر ؛ بكتيريا Entophytic ؛ PGPR .

## Liste des abréviations

<b>ACC</b>	AminoCycloPropane-1-Carboxylate
<b>AIA</b>	Acide Indole Acétique
<b>COV</b>	Composés Organiques Volatiles
<b>EPS</b>	ExoPolySaccharides
<b>LPWG</b>	<i>The Legume Phylogeny Working Group</i>
<b>NPR</b>	<i>Nodule Promoting Rhizobacteria</i>
<b>PHPR</b>	<i>Plant Health Promoting Rhizobacteria</i>
<b>PGPR</b>	<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>
<b>PSB</b>	<i>Phosphate Solubilizing Bacteria</i>
<b>YMB</b>	<i>Yeast Mannitol Broth</i>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01.</b>	Résultats des différents tests enzymatiques réalisés.....	35
--------------------	---	----

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Classification des sous-Familles de légumineuses.....	4
<b>Figure 2.</b> Production qualitative d'Acide indole acétique.....	18
<b>Figure 3.</b> Production d'ammonium.....	19
<b>Figure 4.</b> Production de la catalase.....	20
<b>Figure 5.</b> Production d'amylase.....	20
<b>Figure 6.</b> Production de la pectinase.....	21
<b>Figure 7.</b> Production d'HCN.....	22

## Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Table des matières

**Introduction**..... 1

### Chapitre 01 : Etude bibliographique

1. Les légumineuses.....	3
1.1. Généralités sur les légumineuses.....	3
1.2. Classification des légumineuses.....	4
1.3. Importance et rôle des légumineuses.....	5
2. Généralités sur les bactéries endophytes.....	6
2.1. Définition.....	6
2.2. Quelques exemples des bactéries endophytes.....	6
2.3. Importances des bactéries endophytes.....	6
3. Généralités sur les PGPR.....	7
3.1. Définition de la rhizosphère.....	7
3.2. Définition de PGPR.....	7
3.3. Les types de PGPR.....	8
3.4. Les mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR.....	8
3.4.1. Les mécanismes directs.....	9
3.4.1.1. Fixation d'azote.....	9
3.4.1.2. Solubilisation du phosphate.....	9
3.4.1.3. Solubilisation du potassium.....	10

3.4.1.4.	Production des sidérophores.....	10
3.4.1.5.	Production des phytohormones.....	11
	A. Acide Indole Acétique AIA.....	11
	B. Aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC).....	11
	C. Cytokines.....	12
3.4.2.	Les mécanismes indirects.....	12
	3.4.2.1. Antibiose et parasitisme.....	12
	3.4.2.2. Les composés volatiles.....	13
	3.4.2.3. Les enzymes protectrices.....	13
3.5.	Rôle des PGPR.....	13

## **Chapitre 02 : Matériel et méthodes**

1.	Production d'acide Indole Acétique AIA.....	15
2.	Production d'ammonium.....	15
3.	Recherche de la catalase.....;	16
4.	Recherche de l'amylase.....	16
5.	Recherche de la pectinase.....	16
6.	Production d'HCN.....	17

## **Chapitre 03 : Résultats et discussion**

1.	Production d'acide Indole Acétique AIA.....	18
2.	Production d'ammoniac NH <sub>3</sub> .....	19
3.	Recherche de la catalase.....	19
4.	Recherche de l'amylase.....	20
5.	Recherche de la pectinase.....	21
6.	Production d'HCN.....	21
	Conclusion.....	23
	Références bibliographiques.....	25
	ANNEXES.....	35

# **Introduction**

Les légumineuses également appelé légumineuses à grains sont fortement cultivées principalement pour leurs graines comestibles riches en protéines, vitamines et glucides (Suneja *et al.*, 2017). Elles constituent une source d'alimentation extrêmement importante aussi bien pour l'homme (soja, pois, haricot...) que pour l'animal (trèfle, luzerne...). Présentant un énorme avantage celui de pouvoir s'associer à des microorganismes du sol, plus précisément dans une zone bien spécifique qui est la rhizosphère entourant la racine qui est influencée directement ou indirectement par les exsudats de cette dernière. Cette rhizosphère représente ainsi l'habitat principal de ces microorganismes qui vivent en interaction avec les plantes (Giraud, 2007). Ils existent parmi ces microorganismes ceux qui sont néfastes et ceux qui sont bénéfiques tels que les Rhizobacteries stimulatrices de la croissance végétale communément désignés sous le terme « PGPR » de l'anglais « *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ». Ces dernières ont la capacité de promouvoir la croissance des plantes en leur conférant la faculté de résisté face aux agents phytopathogènes, et au différents stress environnementaux (Compant *et al.*, 2010). Leur effets bénéfique est assuré par des mécanismes directs à travers la fixation d'azote atmosphérique, la minéralisation des composés organiques, la dissolution des nutriments minéraux ainsi que la production des hormones végétales qui favorisent l'absorption des nutriments par les plantes, et par des mécanismes indirects par rapport à leur pouvoir compétitif à l'égard des autres communautés microbiennes par la production des antibiotiques, la production des sidérophores, de Cyanures d'hydrogène « HCN » et des enzymes lytiques (Rehman *et al.*, 2020).

Les PGPR représentent une solution intéressante pour une approche durable et respectueuse de l'environnement dans l'agriculture, afin d'augmenter naturellement la fertilité des sols face à l'utilisation des composants synthétiques agrochimiques (les engrais chimiques, pesticides) qui conduisent à la dégradation progressive de la santé biologique et physiologique des terres arables, jouant ainsi le rôle d'excellents biofertilisants qui augmentent la productivité des cultures agricoles (Gianelli, 2023).

Le but de notre travail est d'apporter une réponse à notre problématique de recherche qui est de savoir si nos souches endophytes possèdent un pouvoir PGPR envers les légumineuses ? Et quel est leurs effets ?

Le présent travail s'articule sur trois chapitres :



- Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur les travaux portant sur des généralités relatives aux légumineuses, les bactéries endophytes et les PGPR avec un aperçu de leurs effets directs et indirects qui se produisent à l'intérieur et à l'extérieur de la plante.
- Le second chapitre concerne la méthodologie et le matériel utilisé pour l'élaboration des différents tests réalisés dans ce travail.
- Les résultats obtenus sont exposés et discutés dans le troisième chapitre.
- Enfin une conclusion brossera les grandes lignes de notre étude.

# **Etude bibliographique**

## 1. Les légumineuses

### 1.1 Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses sont des plantes remarquables du règne végétal, appartenant à la famille des *Fabaceae* (Zhu *et al.*, 2005) tels que : le haricot, les arachides, le pois, les lentilles, le soja, le trèfle, etc. Les légumineuses comprennent des plantes herbacées qui colonisent les régions tropicales ainsi que les régions tempérées ou arctique du globe terrestre (Remond & Walrand, 2017).

On distingue deux types principaux de légumineuses :

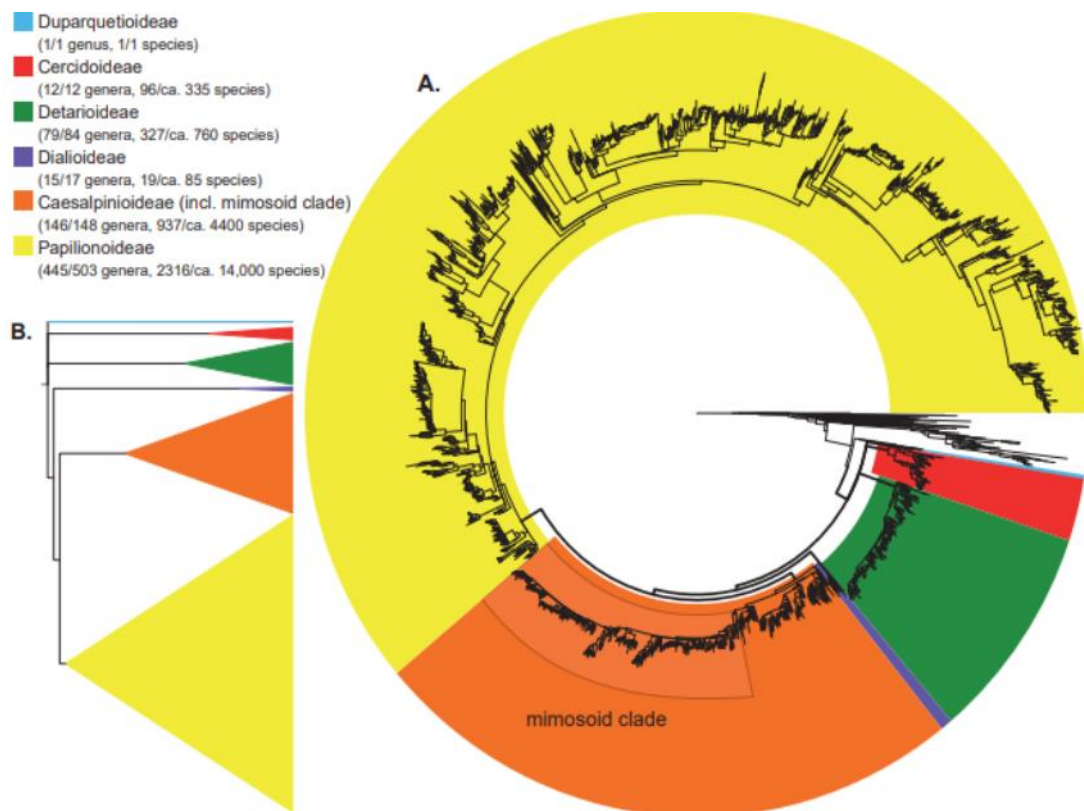
- **Les légumineuses fourragères**, sont des légumineuses destinées à l'alimentation animal : luzerne, trèfle blanc, trèfle violet... ces plantes peuvent être cultivées seules au sein des prairies artificielles (luzerne ou trèfle) ou en association avec d'autres espèces au sein de prairies permanentes ou temporaires (Cholez & Magrini, 2014).
- **Les légumineuses à graines** sont des espèces domestique dans le croissant fertile, elles sont utilisées dans les rations alimentaires, qu'il s'agisse des fèves, de la lentille ou du pois. Ces aliments sont caractérisés à la fois par une forte densité énergétique et nutritionnelle (Duc *et al.*, 2010).

Les racines des légumineuses sont associées à des bactéries du sol dites « *rhizobium* » qui forment une relation symbiotique réciproque. Les rhizobiums sont capables de fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) additionné avec trois paires d'atomes d'hydrogène par la nitrogénase, le produit de la réaction c'est l'ammoniac ( $NH_3$ ) utilisable par la plante. L'azote joue un rôle très important en augmentant la productivité de culture et en favorisant la croissance de la plante. Les produits des plantes légumineuses ont l'avantage d'être stockés pendant de longues périodes en raison de leur capacité à conserver leurs valeurs nutritionnelles. Elles sont riches en acides aminés, fibres et en amidon avec un faible score lipidique, ce qui leur doit le pouvoir de remplacer les protéines animales.

## 1.2 Classification des légumineuses

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des Fabacées (*Fabaceae*), qui est la troisième plus grande famille des plantes à fleurs après les *Astéracées* et les *Orchidacées*. Elle contient plus de 770 genres et 20 000 espèces, elle est considérée comme la deuxième famille des plantes cultivées après les Poacées (qui font partie de la famille des graminées) sur le plan économique (Domergue, 2017).

Les légumineuses ont été classées auparavant en trois sous-familles : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinioideae* et les *Papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003). Mais en 2017 « *The Legume Phylogeny Working Group* » (*LPWG*) ont trouvé que quelques légumineuses ne présentent pas de monophylies alors ils ont proposé la reclassification en six sous-familles : *Caesalpinioideae* (incluant le clade des *Mimosoideae*), *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Duparquetioideae*, et *Papilionoideae* (Azani *et al.*, 2017).



En se basant sur un arbre phylogénétique créé à partir de 3842 séquences du gène *matK* Au total 3696 espèces de légumineuses sont représentées en couleurs et 100 espèces non –légumineuses de références en non – coloré (Azani *et al.*, 2017).

### 1.3 Importance et rôle des légumineuses

Les légumineuses sont des cultures vivrières qui représentent une source très riche en protéines et en micronutriments très bénéfique pour la santé. Ce sont des moyens de subsistance indispensables dans l'alimentation humaine en particulier celle des pays en développement. L'année 2016 a été désignée par l'assemblée générale des Nations unies comme étant l'année internationale des légumineuses dans le but de sensibiliser les gens sur leur importance nutritionnelle, ainsi que sur le plan agro-écologique pour maintenir une agriculture durable et une biodiversité face au changement climatique. Les légumineuses ont été domestiquées à côtés des graminées dans différentes régions du monde depuis les débuts de l'agriculture et ont joué un rôle crucial dans son développement précoce. Les légumineuses sont également d'une importance unique comme fourrage et engrais vert dans les régions tempérées et tropicales, et sont utilisées pour leur bois, leurs tanins, leurs huiles et leurs résines, dans la fabrication de vernis, peintures, teintures et médicaments, et dans le commerce horticole (Azani *et al.*, 2017).

Les atouts agronomiques des légumineuses proviennent principalement de leur capacité à s'associer avec les bactéries du sol (Rhizobiacées) pour former des organes symbiotiques racinaires appelés « nodules ou nodosités » au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, et grâce à ces dernières les légumineuses peuvent produire d'une façon abondante des protéines végétales même en l'absence de fertilisants azotés. Et c'est bien pour cela qu'elles sont appelées plantes améliorantes (Boumaza, 2006).

L'intérêt alimentaire découle du fait que les légumineuses représentent une source très importante de protéines et de lipides, indispensables dans l'alimentation humaine et animale :

- Protéagineux tels que le pois (*Pisum*), la féverole (*Vicia faba*), le haricot (*Phaseolus*), le pois chiche (*Cicer*) et les lentilles (*Ervum*).
- Oléo protéagineux comme le soja (*Glycine max*) et l'arachide (*Arachis*).
- Fourrages tels que les luzernes (*Medicago*), le sainfoin (*Onobrychis*) et le trèfle (*Trifolium*) (Boumaza, 2006).

L'intérêt industriel se détermine par le fait que beaucoup d'espèces de cette famille fournissent des produits industriels tels que le soja qui est utilisé à grande échelle dans l'élevage industriel, les *Derris* et les *Lonchocarpus* qui donnent les roténoïdes insecticides. D'autres espèces produisent des substances colorantes, et d'autres sont utilisées en parfumerie comme

*Pterocarpus santalinus*. Certaines espèces sont ornementales tels que le robinier, le faux acacia, le cytise, la glycine, etc (Mekkiou, 2005).

L'intérêt pharmaceutique des fabacées est tout aussi important vu le grand nombre d'espèces qui figurent dans les pharmacopées et qui donnent de précieux produits utilisables en thérapeutique (Mekkiou, 2005).

## **2. Généralités sur les bactéries endophytes**

### **2.1 Définition**

De Barry était le premier chercheur qui a introduit le mot endophytes en 1866, («*endo*» signifie à l'intérieur ; «*phyte*» est dérivé du mot grec *phyto*, qui signifie plante). Les bactéries endophytes sont des bactéries qui ont la capacité de favoriser la croissance des plantes. Elles résident dans les tissus végétaux (Bai *et al.*, 2002). Ces bactéries proviennent de l'environnement de la rhizosphère et des rhizodépôts (Abedinzadeh *et al.*, 2018).

### **2.2 Quelques exemples des bactéries endophytes**

Les bactéries endophytes vivent généralement dans les racines, mais on peut en retrouver dans les tiges ou les feuilles des plantes, elles comprennent plus de 54 genres et espèces à Gram négatif et à Gram positif (Pullen *et al.*, 2002). Elles ont été trouvées dans les espèces végétales tels que : le riz, le blé et le maïs... (Hallmann *et al.*, 1997 ; Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006 ; Miliute *et al.*, 2015). Parmi les bactéries endophytes qui colonisent les plantes on a : *Microccus luteus*, *Bacillus paenibacillus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Burkholdaria* sp. et *Variovorax* sp.

### **2.3 Importances des bactéries endophytes**

Les bactéries endophytes des plantes jouent un rôle impératif dans leur croissance et leur développement, d'une façon direct ou indirect. Directement, elles peuvent favoriser la croissance des plantes en produisant diverses phytohormones comme les auxines, des enzymes, en facilitant l'absorption des nutriments en solubilisant le phosphate, en fixant l'azote atmosphérique et en produisant des sidérophores. Indirectement, les endophytes peuvent diminuer ou prévenir certains effets létaux de l'organisme phytopathogène en produisant du l'HCN (hydrogène, carbone, azote) (Maheshwari *et al.*, 2020).

L'interaction entre les plantes et les microorganismes située dans la rhizosphère est un déterminant majeur de la santé des plantes, de la productivité et de la fertilité des sols. Les

inoculants bactériens contribuent à améliorer l'efficacité agronomique en réduisant les coûts de production et la pollution de l'environnement, car ils réduisent ou peuvent carrément éliminée l'utilisation d'engrais chimiques, elles formulent des biofertilisants et peuvent résoudre ainsi les problèmes de perte de fertilité des sols, de fluctuation des conditions climatiques et des attaques d'agents pathogènes et des ravageurs (Iyer et Rajkumar, 2017).

### **3 – Généralités sur les PGPR**

#### **3-1 Définition de la rhizosphère**

En 1904 le terme rhizosphère a été introduit par Lorenz Hilten (Bactériologiste du sol et professeur d'agronomie au collège technique de Munich). Le terme « rhizosphère » tire son origine du grec « rhizo » ou « rhiza » signifiant « racine » et « sphère », le champ d'action ou d'influence. La rhizosphère est l'un des écosystèmes les plus complexes qui est définie comme volume du sol entourant les racines des plantes vivantes et considérée comme une niche écologique entre les différents microorganismes et diverses racines à proximité. Son volume est variable selon le développement racinaire (Bazot, 2005).

Dans la rhizosphère il faut distinguer : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (Surface racinaire) et l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005).

#### **3-2 Définition des PGPR**

Le terme PGPR a été inventé par Kloepper et ses collaborateurs en 1980 bien qu'il soit mentionné pour la première fois en 1978 par le même auteur dans les actes du quatrième congrès international sur les phytopathogènes bactériens, organisé en France (Solano *et al.*, 2008). Également connue sous les noms de « *Nodule Promoting Rhizobacteria* » (NPR) rhizobactéries favorisant les nodules et « *Plant Health Promoting Rhizobacteria* » (PHPR) rhizobactéries favorisant la santé des plantes (Singh, 2018).

Les PGPR sont un groupe unique de bactéries qui colonisent la rhizosphère et les racines des plantes. Ils sont impliqués dans une multitude d'interactions avec la plante hôte en lui offrant des avantages sur le plan nutritionnel et pathologique (Sinha *et al.*, 2021) en stimulant directement ou indirectement sa croissance par leur divers mécanismes que ça soit en immobilisant les nutriments ou en agissant comme régulateur de défense contre un large éventail d'agents pathogènes (Kumari *et al.*, 2019).

### 3-3 Les types de PGPR

En se basant sur le type d'interaction, ces PGPR peuvent être partagées en 2 types appelés symbiotiques et libres en rapport avec leur mode de vie. Les symbiotiques tiennent leur nomination du fait qu'elles vivent à l'intérieur des différentes parties de la plante ce qui leur procurent une interaction directe avec elle en ce qui concerne les échanges de métabolites, contrairement à l'autre type qui vivent à l'extérieur indépendamment de la plante. Certaines de ces bactéries symbiotiques prennent fréquemment des espaces intracellulaires de la plante comme habitat, tandis que d'autres entrent dans une forme d'interaction mutualiste afin de pouvoir s'introduire à l'intérieur de la cellule végétale par la formation de structure spécialisée. À titre d'exemple « rhizobia » est un des meilleurs exemples de l'association mutualiste entre les bactéries et les plantes. Ces PGPR comprennent différentes genres comme : *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Azobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, et *Pseudomonas* (Singh, 2018).

### 3-4 Les mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR

Ces microorganismes qui sont les PGPR exercent des effets bénéfiques en agissant par deux mécanismes majeurs : un mécanisme direct qui se produit à l'intérieur de la plante et un mécanisme indirect se produisant à l'extérieur de la plante (Rosenberg *et al.*, 2008). Bien que la différence entre les deux n'est pas toujours évidente. Le mécanisme direct se fait le plus souvent par la fixation de l'azote atmosphérique, production des sidérophores et les phytohormones tandis que le mécanisme indirect se fait par induction de la résistance systémique chez les plante en utilisant des probiotiques (Shaikh *et al.*, 2018 ; Shelake *et al.*, 2019 ; Rehman *et al.*, 2020). L'application de ces microorganismes et leurs interactions avec les plantes forment le biofilm qui est considérée comme leur principale stratégie de défense contre les conditions environnementales imprévisibles et variables. Leur utilisation comme bio-inoculants (biofertilisants) agit principalement par : la production ou bien l'amélioration de la production de certains régulateurs de croissance chez les plantes comme l'acide indole acétique, éthylène, acide gibbérellique (Vejan *et al.*, 2016) et la solubilisation des phosphates pour assurer finalement la promotion de la croissance des plantes (Mus *et al.*, 2016 ; Asaf *et al.*, 2017).



### 3.4.1 Les mécanismes directs

Les mécanismes directs sont des mécanismes de contrôles de stress des plantes, biofertilisants, amélioration de la nutrition des plantes en fournissant des phytonutriments tels que l'azote fixé ou des minéraux solubilisés du sol (le phosphore et le potassium), produisant des sidérophores et stimulant la croissance et le développement des plantes en régulant les niveaux d'hormones végétales dans l'environnement entourant la plante comme : les auxines, les cytokinines, l'éthylène et ACC désaminas (Choudhary *et al.*, 2011 ; García -Fraile *et al.*, 2015 ; Singh *et al.*, 2017 ; Bashandy *et al.*, 2019).

#### 3.4.1.1 Fixation d'azote

L'Azote est un composant essentiel du système vivant qui est nécessaire pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Les rhizobactéries du sol ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et le rendre ainsi disponible et assimilable pour les plantes sous forme d'ammoniac dans le processus de fixation de l'azote. Les PGPR sont capables de fixer l'azote de manière symbiotique (*Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., etc.) et d'une façon non symbiotique (diazotrophes libres, *Azospirillum*). Chez les plantes légumineuses, la fixation de l'azote est assistée par les rhizobiums qui subissent une transformation significative de bactéroïde libre en bactéroïde fixateur d'azote résidant dans les nodules racinaires. L'inoculation commerciale de ces rhizobactéries a prouvé son efficacité dans l'amélioration de la nodulation et dans l'augmentation du rendement des cultures (Bhat *et al.*, 2023).

#### 3.4.1.2 Solubilisation du phosphate

En plus de la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates est également importante. Le phosphate joue un rôle important dans presque tous les processus métaboliques majeurs : la respiration, la biosynthèse macromoléculaire, le transfert d'énergie, la transduction du signal et la photosynthèse (Anand *et al.*, 2016). Il se trouve sous forme insoluble, immobilisées ou précipitées. Les bactéries solubilisant le phosphate « *Phosphate Solubilizing Bacteria* » (PSB) sont trouvées fréquemment dans la rhizosphère qui transforment le phosphate insoluble en phosphate soluble (Vessey, 2003). Le mécanisme principal de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. Les acides gluconiques et le 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. Les acides glycolique, succinique, malonique et oxalique ont également été identifiés. Notons que ces microorganismes produisent les acides organiques et relâchent des protons qui à travers leurs groupements carboxyliques

chélates les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles absorbées sous deux formes  $H_2PO_4$  et  $HPO_4$ . La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases (Govind *et al.*, 2015). Les PGPR solubilisant le phosphate sont inclus dans les genres *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Microbacterium* qui améliorent la croissance et le rendement des plantes ce qui augmente la fertilité du sol. Tout en sachant que les études concernant leur utilisation comme engrais biologiques sont limitées (Oteino *et al.*, 2015).

### 3.4.1.3 Solubilisation du potassium

Le potassium est le troisième élément important à la croissance des plantes. Y compris 90 % du potassium existe sous forme de roche insoluble et de minéraux silicatés, et se trouve soluble à des concentrations très faibles dans le sol (Parmar et Sindhu, 2013). Une carence en potassium provoque des racines mal développées chez les plantes, une faible production de graines, un taux de croissance lent et un rendement faible des cultures agricoles (Kumar et Dubey, 2012). Parmi les PGPR solubilisant le potassium on cite les *Bacillus edaphicus*, *Ferrooxidans* sp., *Bacillus mucilaginosus*, *Pseudomonas* sp. et *Paenibacillus* sp. qui libèrent le potassium sous une forme accessible à partir de minéraux contenant du potassium dans les sols, ce qui aide à améliorer les conditions de l'agriculture par la réduction de l'utilisation de produits agrochimiques afin de soutenir une production végétale respectueuse de l'environnement (Setiawati et Mutmainnah, 2016 ; Liu *et al.*, 2017).

### 3.4.1.4 Production des sidérophores

Les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire secrétés par les PGPR, les sidérophores sont produits par de nombreuses espèces bactériennes pour absorber la forme  $Fe^{3+}$  de l'ion ferrique qui est hautement insoluble par les plantes (Vejan *et al.*, 2016), étant donné que la forme ( $Fe^{+3}$ ) est la prédominante dans la nature est peu soluble (Neilands *et al.*, 1987). De ce fait les sidérophores se lient avec le  $Fe^{+3}$  avec une très forte affinité (Castignetti et Smarrelli, 1986) et le transportent vers la cellule microbienne en formant un complexe fer-sidérophore à l'aide d'un récepteur spécifique situé sur la membrane cellulaire externe de la bactérie (O'Sullivan et O'Gara, 1991) utilisé durant la croissance microbienne (Neilands et Leong, 1986 ; Briat, 1992). Parmi les bactéries synthétisant les sidérophore : *Pseudomonas*, *Azotobacter* et *Bacillus* (Ahmad *et al.*, 2008). De plus étant donné que les sidérophores soient principalement spécifiques du fer, ils peuvent aussi complexer d'autres métaux lourds pour atténuer leur toxicité (Khan *et al.*, 2009).

### 3.4.1.5 Production des phytohormones

Les phytohormones sont des messagers chimiques synthétisées de manière exogène appelées régulateurs de croissance des plantes qui sont produits à partir des PGPR qui ont la capacité de les produire et de modifier leur concentration. L'acide indole acétique (auxine), ACC désaminase (l'éthylène) et les cytokinines représentent des exemples parmi les phytohormones qui sont synthétisées directement et indirectement par les PGPR stimulant ainsi la croissance des plantes (Lugtenberg *et al.*, 2002 ; Somers *et al.*, 2004 ; Porcel *et al.*, 2014).

#### A. Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est l'une des phytohormones les plus importantes produites par les plantes et les PGPR. Elle joue un rôle crucial dans les réponses des cellules végétales, spécialement dans la division cellulaire, l'expression des gènes, l'organogenèse, la formation de pigments, le développement des racines, la germination des graines, la résistance des plantes au stress et la photosynthèse. L'AIA peut jouer deux rôles parallèlement en tant que stimulateur et inhibiteur. Son taux nécessaire à la favorisation de la croissance des plantes est fortement dépendant aux types de chacune des plantes et bactéries (Rehman *et al.*, 2020).

Environ 80 % des bactéries qui colonisent la rhizosphère synthétisent l'AIA à l'exception de quelques bactéries qui ont une très faible production à son égard (Loper et Schroth, 1986). Ce qui oblige une inoculation racinaire avec des espèces productrices d'AIA comme les *Bacillus* et *Paenibacillus* couvrant le manque et assurant ainsi l'amélioration de la croissance végétales (Kloepper *et al.*, 2004, Idris *et al.*, 2007).

Sa biosynthèse est soumise à de nombreuses conditions environnementales. En particulier, il exige des conditions de pH élevé et éprouve une forte corrélation avec le tryptophane dans sa production qui augmente proportionnellement avec sa quantité disponible dans le milieu (Spaepen *et al.*, 2009).

#### B. Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)

L'ACC est le précurseur direct de l'éthylène qui est une autre hormone végétale clé avec une large gamme d'activités biologiques agissant comme molécule secondaire du signal dans l'induction des défenses de la plante (Ecker, 1995). Il favoriserait l'allongement des racines, régule de nombreux processus tels que : la maturation des fruits, l'abscission des feuilles et l'activation de la synthèse d'autres hormones végétales (Reid, 1981). Les plantes synthétisent

l'ACC en réponse à l'exposition à divers types de stress environnementaux, tels que : le froid, la sécheresse, les inondations, les infections par des agents pathogènes et la présence des métaux lourds (Glick, 2012).

### C. Cytokines

Les cytokines sont des aminopurines N6-substituées qui régulent l'expression du gène codant pour l'expansine. Une protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes, facilite l'expansion de la cellule végétale et joue un rôle dans les processus physiologiques tels que : l'activation de la germination des graines, l'accumulation de la chlorophylle et le retard de la sénescence (Salisbury et Ross, 1992). Les PGPR producteurs de cette hormone sont les *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. (Nieto et Frankenberger, 1989). Certaines souches des bactéries phytopathogènes peuvent synthétiser ces cytokines mais en tant qu'agent pathogène jouent le rôle d'inhibiteur, contrairement aux rhizobactéries qui les produisent essentiellement favorisant la croissance des plantes (Glick *et al.*, 2007).

#### 3.4.2 Les mécanismes indirects

Les mécanismes indirects des PGPR agissent sur la santé des plantes par l'induction d'une résistance systémique contre un large spectre de pathogènes racinaires et foliaires par l'antibiose parasitisme, la production de substances antagonistes (tels que les antibiotiques et les composés volatils) et par les enzymes protectrices (Etesami *et al.*, 2017) qui sont des processus défensifs menant à la suppression des phytopathogènes (Jadhav *et al.*, 2020).

##### 3.4.2.1 Antibiose et parasitisme

L'antibiose est l'un des mécanismes les plus importants utilisés par les PGPR afin de limiter les invasions pathogènes à l'intérieur des tissus de la plante hôte via la production des métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Plusieurs facteurs influencent cette production faite par les bactéries de biocontrôle de type abiotique (en ce qui concerne l'O<sub>2</sub>, la température et la disponibilité des sources élémentaires comme le carbone, l'azote et les micro-éléments), biotique (la densité de cellules de la souche productrice, le pathogène et la plante hôte) et physiologique tels que le quorum-sensing. Certaines souches de lutte biologique comme les souches de *Bacillus subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques forts tels que : la zwittermycine-A et la kanosamine, des lipopeptides qui proviennent des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine ainsi que des enzymes hydrolytiques ( $\beta$ -

1, 3-Glucanase) qui ont la capacité de dégrader efficacement les parois des cellules fongiques (Cherif, 2014).

#### **3.4.2.2 Les composés volatiles**

Les composés organiques volatils (COV) comprennent des caractéristiques bien spécifiques qui leur sont propres. De ce fait pour être un COV il doit s'agir d'un composé organique premièrement de faible poids moléculaire, de pression de vapeur assez élevée pour s'évaporer et entrer en phase gazeuse dans des conditions de température et pression atmosphériques normales (Dicke et Loreto, 2010 ; Hung *et al.*, 2015). Les COVs se caractérisent aussi par un faible indice de solubilité dans l'eau et une odeur bien distincte (Herrmann, 2010). Ils peuvent être d'origine humaine ou biologique (Baghi, 2013). L'ammoniac qui représente un des inhibiteurs de certains microorganismes pathogènes est produit comme intermédiaire dans le catabolisme des acides aminés dans les exsudats racinaires des plantes. L'HCN un autre métabolite secondaire qui est produit par les rhizobactéries à partir des précurseurs comme la glycine, le glutamate ou la méthionine via une voie de décarboxylation oxydative (Castric, 1977) assure l'échappement de toute menace de prédation ou de concurrence envers son hôte. Les 2,3-butanediol et l'acétoïne font partie aussi des composés volatils libérés par les PGPR qui induisent une résistance face aux maladies menaçants les plantes, améliorant ainsi leur croissances et développements (Ryu *et al.*, 2004).

#### **3.4.2.3 Les enzymes protectrices**

Les PGPR produisent des enzymes de protection comme des métabolites qui contrôlent les agents phytopathogènes, leur mode d'action pourrait être qualifié de bio-pesticide et produisent des enzymes telles que : la  $\beta$ -1,3-glucanase, l'ACC-désaminase et la chitinase utilisés comme des systèmes de défense des plantes contre les champignons phytopathogènes, vu que la paroi cellulaire fongique est constitué de  $\beta$ -1,4-N-acétyl-glucoséamine et de chitine. Elles sont produites par les *Sinorhizobium fredii* et *Pseudomonas fluorescens* qui inhiberaient la croissance fongique (Kumar *et al.*, 2010).

### **3.5 Rôle des PGPR**

Les PGPR sont des outils potentiels d'une approche écologiquement durable dans le but est d'augmenter la fertilité des sols ainsi que l'amélioration de la santé des plante hôtes. (Prasad *et al.*, 2016). Ils aident les plantes à l'acquisition des nutriments et de l'eau par l'amélioration de leur absorption et par la régulation de la teneur relative en eau du sol ainsi au renforcement

de l'activité métabolique et de la défense antioxydante ce qui leur permet une bonne croissance. La production des exopolysaccharides (EPS) médiée par les PGPR tels que : la cellulose et l'alginate a prouvé son efficacité pour atténuer les effets du stress augmentant ainsi la tolérance des plantes face aux différents stress environnementaux (Bhat *et al.*, 2023). Les PGPR sont connues aussi pour apporter aux plantes une tolérance à la salinité, par la réduction des dommages oxydatifs et par la régulation des attributs photosynthétiques tels que : le taux brute de la photosynthèse et la teneur en chlorophylle et caroténoïdes (Hoque *et al.*, 2023). Avec un potentiel de détoxification des métaux lourds, certaines rhizobactéries spécialisées dans le biocontrôle produisent des enzymes : Chitinase, Cellulase,  $\beta$ 1-3 Glucanase, protéase et la lipase qui ont la capacité de lyser la paroi cellulaire des champignons pathogènes (Gupta *et al.*, 2017). En plus de leur application intéressante sur le plan agricole en tant que biofertilisants puissants, ils sont utilisés aussi comme des biopesticides assurant la lutte biologique et le biocontrôle des phytopathogènes par la production des antibiotiques, les sidérophores, HCN et les métabolites fongiques. Ils interviennent également dans des applications de phytoremédiation visant la dégradation des polluants organiques du sol (Kridi, 2011).

Prochainement l'emploi de ces bio-inoculants aidera à surmonter les contraintes liées aux problèmes de changement persistant des conditions climatiques, ce qui offrira une alternative prometteuse pour atteindre la durabilité dans l'agriculture d'une manière bien plus respectueuse de l'environnement (Bhat *et al.*, 2023).

# **Matériel et Méthodes**

Dans le cadre de la préparation de notre mémoire de Master en Biologie Moléculaire des Micro-organismes au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Des Frères Mentouri Constantine 1. La faculté nous a offert un stage académique de deux mois au niveau du laboratoire (N°09) de Microbiologie sous l'encadrement de Dr. GACI M. L'étude a été faite sur 14 souches des bactéries endophytes non rhizobiennes isolées à partir des nodules de la plante *Pisum sativum*, qui font partie de la collection de notre encadrante. L'objectif est d'étudier les métabolites produits par les bactéries endophytes en se focalisant essentiellement sur leurs effets PGPR affectant les légumineuses en appliquant différentes méthodes de Microbiologie.

### **1. Production d'acide indole acétique**

La production de l'acide indole acétique (AIA) a été déterminée selon la méthode de Bano et Musarrat (2003). Des tubes contenant 5 ml du milieu YMB (Vincent, 1970) (Annexe 1) ont été inoculés avec une seule colonie de chaque souche bactérienne. Les tubes ont été vortexés et incubés pendant 72 H à 28 °C. Cinq-Cents Microlitre de l'inoculum ont été cultivés dans des flacons contenant 50 ml du milieu YMB avec et sans tryptophane (0,1 %), l'incubation est faite à l'obscurité à 28 °C pendant 2 jusqu'à 7 jours sous agitation à 120 rpm.

Après 2, 3, 4 et 7 jours d'incubation, 1,5 ml de chaque culture bactérienne ont été prélevés dans des tubes Eppendorf et centrifugés à 11000 g pendant 15 min. 1 ml du surnageant a été transféré dans un tube à essai contenant 2 ml de réactif de Salkowski (1ml de 0,5 M FeCl<sub>3</sub> dans 50 ml de 35% HClO<sub>4</sub>) (Annexe 1) et 50 µl d'acide ortho-phosphorique. Le blanc a été réalisé en substituant le surnageant par 1,5 ml de milieu de culture non inoculé. Chaque tube est vortexé avant d'être incubé pendant 30 min à 28 °C à l'obscurité. À l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UV-1280) l'absorbance de la couleur rose développée a été lue à 530 nm. Ensuite la concentration d'AIA dans la culture a été calculée en se basant sur la courbe d'étalonnage de Shoukry *et al.* (2018).

### **2. Production d'ammonium**

La production de NH<sub>3</sub> a été testée sur l'eau peptonée (Annexe 1) en se basant sur la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Elle consiste à inoculer les souches bactériennes dans des tubes contenant 5 ml d'eau peptonée, ils sont ensuite incubés à 28 °C pendant 48 H.



0,5 ml du réactif de Nessler a été additionné. L'apparition d'une couleur jaune à marron indique la production de  $\text{NH}_3$ .

### 3. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme existante presque chez tous les organismes vivants aérobies stricts et anaérobies facultatifs renfermant le fer. Elle catalyse la décomposition du peroxyde d'oxygène  $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau et en oxygène (Delarrase, 2007).

Une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a été déposée sur une lame, puis une colonie bactérienne a été prélevée à partir d'un milieu solide et émulsionnée sur la goutte d'eau oxygénée. La formation de bulles suite au dégagement gazeux, provient de la dégradation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  indiquant une activité catalase positive.

### 4. Recherche de l'amylase

L'amylase est une enzyme qui appartient à la 13<sup>ème</sup> famille des glycosides hydrolase. Elle existe en deux formes  $\alpha$  amylase et  $\beta$  amylase. Celle synthétisé par les micro-organismes est l' $\alpha$  amylase qui dégrade l'amidon en plusieurs produits comme la dextrine et donne progressivement des molécules plus petites de glucose. Elle permet donc la dégradation de la matière organique disponible dans le sol, et ainsi fournit aux plantes les éléments minéraux indispensables à leur croissance (Pandy *et al.*, 2000 ; Raj *et al.*, 2009).

L'activité d'amylase a été testée sur un milieu de culture contenant 1 % d'amidon (Annexe 1) selon la méthode décrite par López *et al.* (2018). Les souches bactériennes ont étéensemencées par stries sur ce milieu et incubées à 28 °C pendant 72 H. Les boîtes ont été ensuite inondées par une solution d'iode. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive.

### 5. Recherche de la pectinase

La pectinase est une enzyme hydrolytique caractérisée par son pouvoir de dégradation de pectine qui représente le polysaccharide majeur présent dans la lamelle médiane entre les parois cellulaires végétales. Elle confert un avantage dans la pénétration intracellulaire et la propagation des endophytes chez la plante hôte (Hallman *et al.*, 1997 ; Martinez-Trujilo *et al.*, 2011).

La pectinase a été recherchée sur le milieu de Soares *et al.* (1999) qui est un milieu gélosé contenant 1 % de pectine (Annexe 1). Les boîtes ont étéensemencées puis incubées à

28 °C pendant 5 jours. Après incubations, elles ont été inondées avec une solution d'iode. La production de pectinase se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

## 6. Production d'HCN

L'HCN est une substance volatile qui fait partie des métabolites secondaires produits par certains rhizobactéries. Il contrôle le développement des espèces pathogènes et améliore leur capacité à résister face aux différents colonisateurs exogènes agissant ainsi comme un agent de lutte biologique (Sullivan *et al.*, 2001).

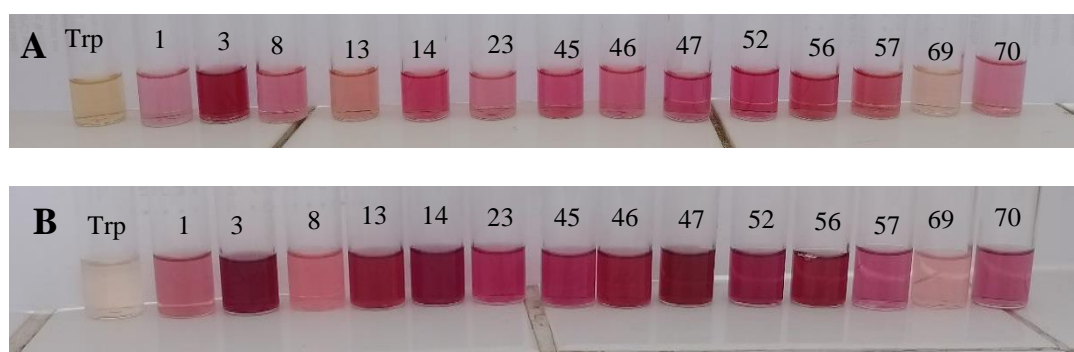
La capacité des souches bactériennes à produire de l'acide cyanhydrique (HCN) a été testée selon la méthode de Bakker et Schipperes (1987) sur le milieu LMG201 additionnée de glycine (4,4 g/l) (Annexes 1). Après ensemencement des boîtes de Pétri, le papier Whatman N1 de 9 cm de diamètre a été imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium anhydre), il a été ensuite placé à l'intérieur du couvercle de la boîte de Pétri. Cette dernière a été fermée par le parafilm et incubée à 28 °C pendant 4 jours. La production de HCN volatile se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron.

# **Résultats et discussions**

## 1. Production d'AIA

Selon les résultats obtenus de la capacité de production de l'AIA, on observe chez les souches l'apparition d'une couleur rose après l'addition du réactif de Salkowski montrant ainsi une réaction positive qui indique la production de l'AIA, l'intensité de cette couleur varie proportionnellement à la quantité de l'acide produite (Figure 2).

Les souches avec une production d'AIA importantes sont : 3, 52, 56, 14, 57, 47, 45, 46 et 8 suivie de 23, 1, 70, 13. En dernière position la souche 69 qui a montré une couleur rose très clair dans le tube représentant bien la plus faible quantité produite.



**Figure 2.** Production qualitative d'Acide indole acétique  
A : J 2 ; B : J 7

Les concentrations de l'AIA produites par nos souches sont calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage ( $Y = 0,0496x - 0,1393$ ) de Shoukry *et al.* (2018).

La concentration d'AIA après 2 jours d'incubation chez les souches se situe entre 3,51 et 15,06  $\mu\text{g/ml}$ .

La plus grande quantité d'AIA (25,81  $\mu\text{g/ml}$ ) est observée chez la souche 13 au bout du 7<sup>ème</sup> jour d'incubation. Tandis que la plus faible (3,51  $\mu\text{g/ml}$ ) est obtenue chez la souche 69 observé au deuxième jour d'incubation. On constate que la plus grande quantité d'AIA produite par certaines souches est observée au J 7 alors que d'autres souches ont marqué des taux les plus élevés produits après 2 et 3 jours d'incubations.

Les résultats de Shah *et al.* (2020) ont confirmé que les souches bactériennes produisent des taux maximales d'AIA après des périodes d'incubation très courtes. Shirokikh *et al.* (2007) ont montré que la production d'AIA par quelques actinomycètes commence après le premier jour d'incubation et atteint un maximum après 3 jours puis baisse lentement, cette

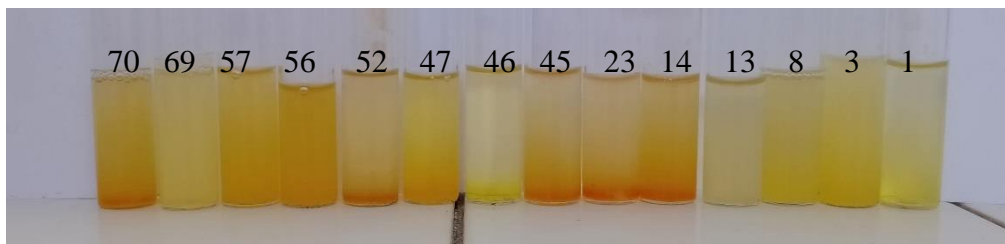
décroissance pourrait être expliquée par la libération des enzymes qui ont la capacité de dégrader l'AIA comme l'AIA oxydase et peroxydase.

L'AIA est une phytohormone produite par les PGPR libérée dans la rhizosphère à partir des exsudats racinaires contenant le tryptophane son précurseur principal (Spaepan *et al.*, 2007). Elle s'ajoute avec l'AIA endogène de la plante afin de stimuler la prolifération cellulaire des plantes et l'allongement de la surface racinaire facilitant ainsi l'absorption des nutriments du sol par les végétaux (Khan *et al.*, 2009).

## 2. Production d'ammonium NH<sub>3</sub>

Après avoir ajouté 0,5 ml du réactif de Nessler aux cultures bactériennes, à l'exception de la souche n °13, toutes les souches ont formé un précipité jaune à jaune-brun indiquant la production d'ammonium (Figure 3).

Les travaux de Capuccino et Sherman réalisés en 1992 ont montrés aussi la production d'ammonium par leurs souches endophytes ce qui confirme nos résultats.

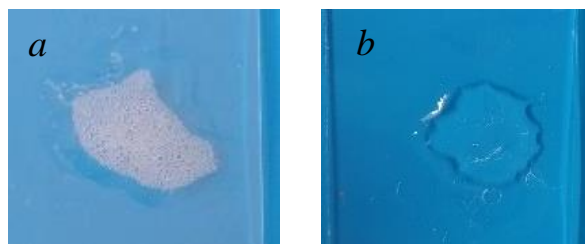


**Figure 3.** Production d'ammonium

La production de l'ammoniac est l'une des plus importantes caractéristiques des bactéries endophytes qui remplit efficacement les besoins d'azote de la plante (Yadav *et al.*, 2010). Elle intervient d'une façon indirecte dans la stimulation de la croissance des plantes (Joseph *et al.*, 2007) et assure un rôle d'inhibiteur des phytopathogènes et d'intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par les bactéries du sol (Joseph *et al.*, 2007 ; Ahmed *et al.*, 2008).

## 3. Recherche de la catalase

On observe chez presque toutes les souches testées une formation des bulles d'air due au dégagement d'oxygène provenant de la dégradation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ce qui indique la présence de la catalase (souches à catalase +). À l'exception des souches 8 et 13 il y avait absence de dégagement d'oxygène qui sont donc catalase (-) (Figure 4).



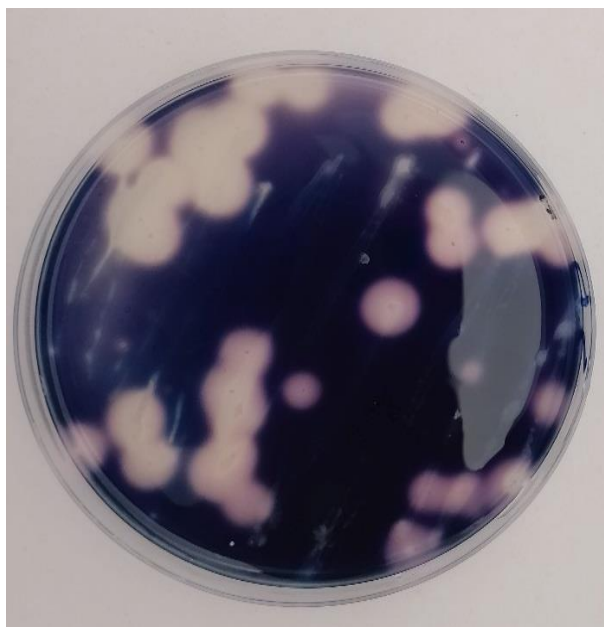
**Figure 4.** Production de la catalase

*a* : Catalase (+)    *b* : Catalase (-)

La présence de catalase chez les endophytes aide à protéger leurs cellules face aux dommages oxydatifs causés par les espèces réactives à l'oxygène (ROS), les rendant ainsi résistantes à divers stress environnementaux, mécaniques et chimiques (Kumar *et al.*, 2012).

#### 4. Recherche de l'amylase

Nous avons noté la présence de la production de  $\alpha$  amylase pour toutes les souches bactériennes, ce qui a été démontré par des zones de dégagements (halo) clair autour des colonies après addition de la solution d'iode (Figure 5). Nos résultats rejoignent ceux rapportés par Ningthoujam *et al.* (2009), qui ont détecté une production de l'  $\alpha$  amylase chez 100 % de leurs isolats bactériens.



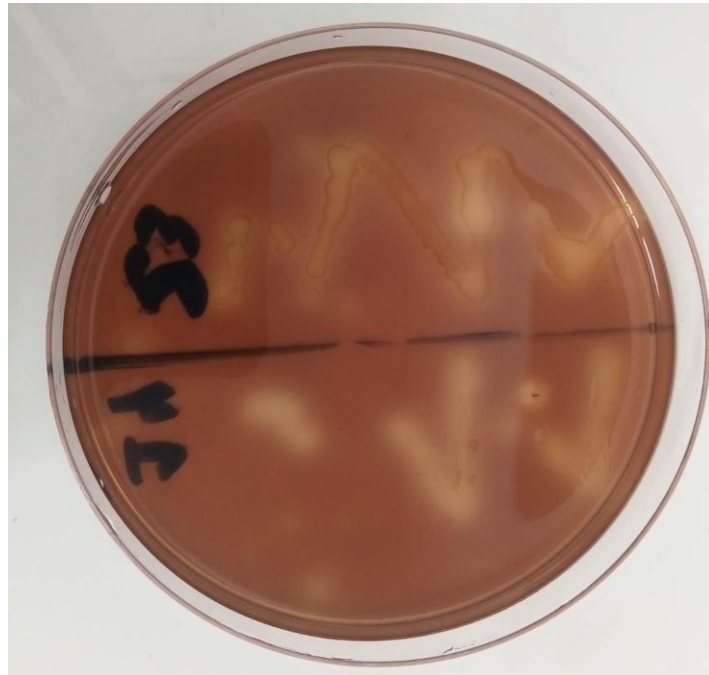
**Figure 5.** Production d'amylase

L'amylase est une enzyme hydrolytique, nécessaire à l'induction de la résistance systémique et l'inactivation des agents pathogènes impliqués dans l'activité antagoniste des plantes (Liu *et al.*, 1995 ; Sadfi *et al.*, 2001 ; Ruchi *et al.*, 2012).

## 5. Recherche de la pectinase

Sur un milieu gélosé additionné de pectine, toutes les souches après l'ajout de la solution d'iode ont montré une capacité à produire la pectinase, traduites par une formation d'un halo clair autour des colonies (Figure 6).

Les résultats obtenus sont en parfait accord avec ceux trouvés par Cotty *et al.* (1990), qui ont observé la production de la pectinase chez la totalité de leurs souches isolées.



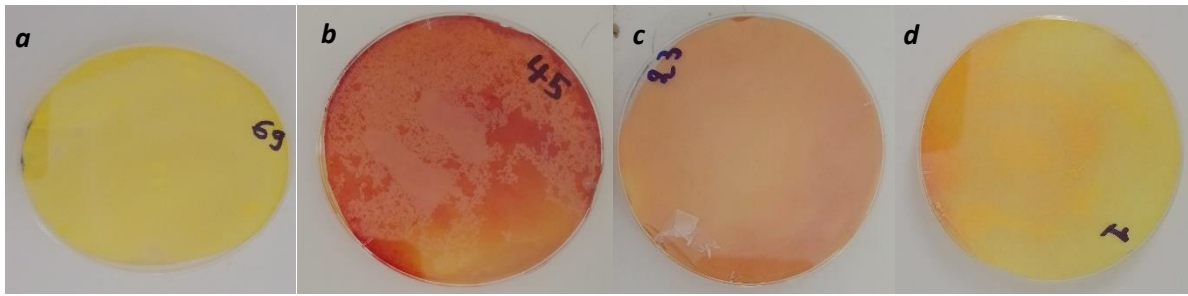
**Figure 6.** Production de la pectinase

La pectinase est une enzyme connue pour la dégradation des substances pectique des parois cellulaires végétales par un processus de dépolymérisation. Elle inhibe les infections causées par les agents phytopathogènes, tout en assurant une stimulation de la croissance des plantes (Reetha *et al.*, 2014).

## 6. Production d'HCN

La production d'HCN a été révélée par le virage du papier whatman imprégné d'acide picrique du jaune vers une couleur orange à marron (Figure 7). La production du HCN était exprimée chez 11 souches testées sur 14.

Nos résultats sont en concordance avec ceux décrits par Mahishwari *et al.* en 2019 qui ont trouvé que 40 % de leur isolats été positive pour la production de l'HCN isolés à partir des plantes légumineuses (pois et pois chiche).



**Figure 7.** Production d'HCN

**a** : pas de production ; **b** : forte production ; **c** : production moyenne ; **d** : production faible

Le cyanure d'hydrogène est un composé volatil qui fait partie des métabolites secondaires de la famille des cyanides. Il est directement produit à partir de la glycine (Bakker et schippers, 1987), un acide aminé étant le meilleur précurseur de la production de l'HCN par les microorganismes (Askeland et Morrison, 1983). Celui produit par les PGPR assure le rôle d'un bon antagoniste contre les maladies des racines chez les plantes (Defago et Haas, 1990) conduisant ainsi à la suppression des agents phytopathogènes telluriques (Alstrom, 2001 ; Wheatley, 2002), en plus de son implication dans l'induction et la stimulation de la résistance systémique de la plante (Kumar *et al.*, 2012).



# **Conclusion et perspectives**

Notre travail a porté sur l'étude des effets PGPR des bactéries endophytes non rhizobiennes isolées à partir des nodosités de la légumineuse *Pisum sativum* L. Cette recherche nous a permis de faire la caractérisation et l'évaluation des différents métabolites et enzymes à effets promoteur produits par ces souches, grâce à une multitude de tests.

La production d'AIA par nos 14 souches cultivées sur le milieu YMB additionné de tryptophane a été confirmé chez toutes les bactéries mais à des concentrations variables selon deux modes différents, certaines produisent la plus grande quantité de l'AIA au bout de 7 jours, tandis que d'autres marquent des taux les plus élevés après 2 à 3 jours d'incubation.

À l'exception d'une seule souche, la production d'ammonium  $\text{NH}_3$  était observée chez tous les isolats, indiquant une caractéristique des bactéries endophytes qui remplit efficacement les besoin d'azote de la plante.

La capacité d'éliminer le peroxyde d'oxygène a été signalée chez la majeure partie des isolats indiquant ainsi la possession d'une catalase. La détection de l'activité de l'amylase et de la pectinase a été faite chez la totalité des souches, leurs conférant ainsi la capacité de s'introduire à l'intérieur des parois cellulaires de la plante avec un pouvoir antagoniste lytique vis-à-vis des phytopathogènes. Le test de la production de l'HCN a été exprimé chez 11 souches parmi les 14.

Au terme de ce travail qui ouvre plusieurs perspectives de recherches, il serait intéressant de plus approfondir les investigations sur les souches les plus performantes afin de :

- Déterminer leurs mécanismes d'actions directes (production des phytohormones, assimilation et solubilisation des sels minéraux, induction de la résistance systémique...) ou indirects (compétition, production des sidérophores, antibiose et la production des composés volatiles...) impliqué dans leur potentiel stimulateur de la croissance végétale ou antagoniste à l'égard des différents phytopathogènes et bio-agresseurs des cultures agricoles.
- Identifier les métabolites actifs et puissants afin de s'en servir pour l'élaboration des biopesticides.
- connaître leur potentiel à promouvoir la tolérance des plantes cultivées face aux différents stress abiotiques.
- Modéliser et comprendre les interactions faites entre les souches performantes et les communautés microbiennes rhizosphériques.

- Caractériser le déterminisme génétique des différents métabolites d'actions en utilisant des outils de biologie moléculaire et de bioinformatique afin de pouvoir assurer leur stabilité et productibilité.

# **Références bibliographiques**

- Abedinzadeh, M., Etesami, H. & Alikhani, H. A. 2018.** Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. *Biotechnology reports*, 20, 1-12.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research*, 163(2): 173-81.
- Alström, S. 2001.** Characteristics of Bacteria from Oil seed Rape in Relation to their Biocontrol Activity against *Verticillium dahlia*. *Journal of Phytopathology*. 149:57-64.
- Anand. K., Kumari, B. & Mallick, M. A. 2016.** Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as bio-fertilizers. *Intenational journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 8 (2): 37-40.
- Asaf, S., Khan, M. A., Khan, A. L., Waqas, M., Shahzad, R & Kim A.Y., Kang S.M & Lee I.J., 2017.** Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas sp* And *Serratia marcescens*. *Journal of Plant Interactions*. 12(1): 31–38.
- Askeland, R. A. & Morrison, S. M. 1983.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*. 45, 1802-1807, 1983.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., Boatwright, J. S., Borges, L. M., Brown, G. K. & Bruneau, A. 2017.** A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* 66, 44-77.
- Baghi, R. 2013.** *Emissions biogéniques de composés organiques volatils en région méditerranéenne-développement instrumental, mesures et modélisation*. Thèse de Doctorat : Physique et chimie de l'atmosphère. Université de Toulouse III- Paul Sabatier. 148 p.
- Bai, Y., D'aoust, F., Smith, D. L. & Driscoll, B. T. 2002.** Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 230-238.
- Bakker, A. W. and Schipper, B. 1987.** Microbial cyanide production in the Rhizosphere in relation to potato yield Reduction and *Pseudomonas* spp. Mediated plant growth stimulation. *Soil Biology & Biochemistry Journal*. 19: 451 457.

- Bashandy, S. R., Abd-Alla, M. H & Bagy, M. M. K. 2019.** *Biological nitrogen fixation and biofertilizers as ideal potential solutions for sustainable agriculture.* Integrating Green Chemistry and Sustainable Engineering. 1 : 343–396.
- Bano, N., Musarrat, J. 2003.** Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Current microbiology*, 46(5): 324-8.
- Bazot S., 2005.** *Contribution à l'étude de l'allocation des photoassimilats récents dans la plante et la rhizosphère chez une graminée pérenne (Lolium perenne L.).* Thèse de doctorat : sciences. Institut National Polytechnique de Lorraine. 201 p.
- Boumaza, O. 2006.** *Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de Genistatricuspida (Fabaceae), et Haloxylonscoparium (Chenopodiaceae).* Thèse de doctorat : *Phytochimie.* Université Mentouri constantine. 182p.
- Briat, J. F. 1992.** *Iron assimilation and storage in prokaryotes.* *J Gen Microbiol.* 138 (12): 2475-2483.
- Cappuccino, J. G., Scherman, N. 1992.** Biochemical activities of microorganism. *Microbiology, A Laboratory Manual.* The Benjamin/ Cummings Publishing Co. California, USA.P:125-179.
- Castignetti, D. et Smarrelli, J. Jr. 1986.** Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS Letters.* 209 (2) :147-151.
- Castric, P. A. 1977.** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *Journal of Bacteriology.* 130(2) : 826-831.
- Cherif, H. 2014.** *Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec bacillus sp.et pantoea agglomerans isolées de sols.* Thèse de Doctorat : *Microbiologie.* Université Ferhat Abbas Sétif. 162 p.
- Cholez, C. & Magrini, M. B. 2014.** Cultiver des légumineuses à graines en pure ou en association avec des céréales : points de vue d'acteurs du système sociotechnique agricole. *Innovations Agronomiques*, 40, 43-59.
- Choudhary, D. K., Sharma, K. P & Gaur, R. K. 2011.** Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnology Letters.* 33(10): 1905–1910.

- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. 2010.** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, Colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*.19: 451-457.
- Cotty, P. J., Cleveland, T. E., Brown, R. L., and Mellon, J. E. 1990.** Variation in polygalacturonase production among *Aspergillus flavus* isolates. *Applied & Environmental Microbiology*. 56:3885-3887.
- De Barry A. 1866.** Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und *Myxomyceten*. *Handbuch der physiologischen Botanik*, 2. Bd., 1. Abt. DOI: <http://doi.org/10.5962/bhl.title.120970>.
- Defago, G., Haas, D. 1990.** Pseudomonads as antagonists of soil borne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. *Soil Biochemistry*. 6:249–291.
- Delarasse, C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. 954. Paris: Tec & Doc et Mechanisms of Cross-Talk between Plant and Bacteria. *J Plants*.12(11):2197.
- Dicke, M. et Loreto, F. 2010.** Induced plant volatiles :from genes to climate change. *Trends Plant Sci*. 15(3): 7-115.
- Domergue, O. 2017.** *Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agroécosystème Sud de France*. Thèse de Doctorat : *Bactériologie*. L'Université de recherche Paris Sciences et Lettres. 232 p.
- Doyle J. J., Luckow M. A. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131: 900–910.
- Duc, G., Mignolet, C., Carrouée, B. & Huyghe, C. 2010.** Importance économique passée et présente des légumineuses : Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Innovations agronomiques*, 11, 1-24.
- Ecker, J. R. 1995.** The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*. 268(5211):667-675.
- Etesami, H., Emami, S. & Alikhani, H. A. 2017.** Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant growth, and prospects a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 17(4): 897–911.

**García-Fraile, P., Menéndez, E. & Rivas, R. 2015.** Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*. 2(3): 183–205.

**Gianelli, G., Potestio, S., Visioli, G. 2003.** The Contribution of PGPR in Salt Stress Tolerance in Crops : Unravelling the Molecular Mechanisms of Cross-Talk between Plant and Bacteria. *J Plants*. 12(11): 2197.

**Giraud, E. 2007.** Symbiose rhizobium/ légumineuse : un nouveau sesame. 23.6-7.Paris: Med Sci.pp.663-666.

**Glick, B. R. Todorovic, B. Czarny, J. Cheng, Z. Duan, J. & Mcconkey, B. J. 2007.** Promotion of plant Growth by Bacterial ACC Desaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 26 (5-6): 227-242.

**Glick, B .R. 2012.** Bactéries favorisant la croissance des plantes : mécanismes et applications. *Scientifica*.1–15.

**Gray, E. J et Smith, D. L. 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Biol Biochem*. 37: 395- 412.

**Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K & Singh, V. 2015.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 07(02): 96-102.

**Gupta, S., Kaushal, R. & Sood, G. 2017.** Impact of plant growth promoting rhizobacteria on vegetable crop production. *International journal of vegetable science*. 24(3) : 289-300.

**Hallmann. J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F. & Kloepper J.W., 1997.** Bacterial endophytes in Agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*., 9: 895-914.

**Herrmann, A. 2011.** The chemistry and biology of volatiles (1 ed). John Wiley & Sons Ltd, 430 p.

**Hoque, M.N., Hannan, A., Imran, S., Paul, N. C., Mondal, M. F., Sathin , M. M. R, Bristi, J. M., Dola, F. S, Abu Hanif, M., Ye, W., Brestic, M.& Rahman, M. S. 2023.** Plant growth promoting rhizobacteria mediated adaptive responses of plants under salinity stress. *Journal of plant growth regulation*. 42(3) : 1307-132.

**Hung, R., Lee, S. & Bennett, J. W. 2015.** Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Microbiology & Biotechnology*. 99: 3395-3405.



- Idris, H. A., Labuschagne, N. & Korsten, L. 2007.** Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological control*. 40 : 97-106.
- Iyer, B. & Rajkumar, S. 2017.** Host specificity and plant growth promotion by bacterial endophytes. *Current Research in Microbiology Biotechnology*, 5, 1018-1030.
- Jadhav, H. P., Sonawane, M. S., Khairnar, M. H. & Sayyed, R. Z., 2020.** Production of alkaline protease by rhizospheric *Bacillus cereus* HP\_RZ17 and *Paenibacillus xylanilyticus* HP\_RZ19. *Environmental Sustainability*. 3(1): 5–13.
- Joseph, B., Ranjan Patra, R et Lawrence, R. 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Intional Journal of Plant Production*. 2, 141– 152.
- Khalid, A., Arshad, M et Zahir, Z.A. 2004.** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiology*. 96: 473-480(8).
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P.A& Oves, M. 2009.** Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chemy.Lett.* 7:1-19.
- Kirdi, B. 2011.** Rôle des PGPR «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites. Mémoire de Magister : Sciences Agronomiques. *Ecole Nationale supérieure agronomique El Harrach Alger*. 73 p.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M & Zhang, S. 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94 : 1259-1266.
- Kumar, H., Bajpai, V. K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Choul, S. 2010.** Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus Cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. *Crop Protect.* 29(6): 591–598.
- Kumar, P. et Dubey, R. 2012.** Plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens and yield enhancement of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Current Perspectives in Applied Microbiology*. 1: 6-38.
- Kumari, B. Mallick, M. A., Solanki, M. K., Solanki, A. C, Hora, A. & Guo, W. 2019.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Modern Prospects for Sustainable Agriculture Plant Health Under Biotic Stress. *Microbial Interactions*. 2 : 109-127.

**Leminor, L. and Véron, M. 1982.** Bactériologie Médicale, Ed. *Flammarion medecinescience*, p. 360- 375.

**Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S. 1995.** Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root-colonization. *Phytopathology*. 95: 1064-1068.

**Liu H, Carvalhais L.C, Crawford M, Singh E, Dennis P.G, Pieterse C.M.J & Schenk P.M., 2017.** *Inner plant values: diversity, colonization, and benefits from endophytic bacteria. Frontiers in Microbiology*. 8: 2552.

**Lloret L., Martinez-Romero, E.2005.** Evolution and phylogeny of rhizobia. *Rev. Latinoam. Microbiol.* ; 47:43–60.

**Loper, J. & Schroth, M. 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*. 76: 386-389.

**LÓPEZ, J. L., ALVAREZ, F., PRÍNCIPE, A., SALAS, M. E., LOZANO, M. J., DRAGHI, W. O., JOFRÉ, E. & LAGARES, A. 2018.** Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *Jornal of Biotechnology*, 267:55-62. 10.1016/j.jbiotec.2017.12.020.

**Lugtenberg B.J, Chin A-Woeng T.F & Bloemberg G.V., 2002.** *Microbe-plant interactions: Principles and mechanisms. Antonie Van Leeuwenhoek*. 81: 373–383.

**Maheshwari, R., Bhutani, N., Bhardwaj, A & Suneja, P. 2019.** Functional diversity of cultivable endophytes from *Cicer arietinum* and *Pisum Sativum*: Bioprospecting their *plant growth potential. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 20 (101229) : 4-5.

**Maheshwari, R., Bhutani, N. & Suneja, P. 2020.** Isolation and characterization of ACC deaminase producing endophytic *Bacillus mojavensis* PRN2 from *Pisumsativum*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 18, 11-20.

**Martínez-Trujillo, A., Arreguín-Rangel, L., García-Rivero, M., & Aguilar-Osorio, G.2011.** Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-3 *Letters in applied microbiology*. 53 (2), 202-20970.

**Mekkiou, R. 2005.** *Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires d'espèces du genre Genista (Fabaceae) :G. saharae, G. ferox.* Thèse de doctorat : *Chimie Organique - Option Phytochimie*. Université Mentouri constantine. 217p.

**Miliute I., Buzaitė O., Baniulis D., Stanys V. 2015.** Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: A review. Zemdirbyste, Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture & Forestry. Kauno 30, Babtai, distr., Lithuania. 102 (4), pp.465-478.

**Mus, F., Crook M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M. H., Oldroyd, G. E., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ané, J. M & Peters, J. W. 2016.** Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(13): 3698–3710.

**Neilands, J. B. et Leong, S. A. 1986.** *Siderophores in relation to plant growth and disease. Plant Physiology*. 37: 187-208.

**Neilands, J. B., Konopka, K., Schwin, B., Coy M . 1987.** *Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. Journal of Iron transport in microbes, plants & animals*. 3-34.

**Nieto K.F et Frankenberger W.T., 1989.** *Biosynthesis of Cytokinins in Soil. Soil Microbiology & Biochemistry*. 53 (3): 735-740.

**Ningthoujam, D. S., Kshetri, P., Sanasam, S & Nimaichand, S. 2009.** Screening Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. *World Applied Sciences Journal*. 7: 907-916.

**O'Sullivan M, Stephens P.M, & O'Gara F., 1991.** *Extracellular protease production by fluorescent Pseudomonas spp. and the colonization of sugarbeet roots and soil. Soil of Biology and Biochemistry*. 23(7): 623-627.

**Oteino N., Lally R.D., Kiwanuka S., Lloyd A, Ryan D, Germaine K.J & Dowling D.N., 2015.** *Plant Growth Promotion Induced by Phosphate Solubilizing Endophytic Pseudomonas Isolates. Frontiers in Microbiology*. 6: 1-9.

**Pandey, A., Soccol, C. R, Nigam, P., Soccol, V.T, Vandenberghe, L. P. S & Mohan, R 2000.** Potentiel biotechnologique des résidus agro-industriels. II : bagasse de manioc. *Bioresource Technology*. 74 (1): 81-87.

**Parmar, P., Sindhu, S. S. 2013.** Potassium solubilization by rhizosphere bacteria : Influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research*. 3(1): 25-31.

**Patten, C. L., and Glick, B. R. 2002.** Role of pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microb.* 68:3795–3801.

**Porcel, R., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., Aroca, R. 2014.** Involvement of plant endogenous ABA in Bacillus megaterium PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biol.* 14 (36).

**Prasad, R., Kumar, M. et Varma, A. 2016.** Role of PGPR in soil fertility and plant health. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. *Soil Biology.* 42 : 247–260.

**Pullen C., Schmitz P. & Meurer K.2002.** New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. *Journal of Medicinal Plant & Natural Product Research*, 162-167pp.

**Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R. 2004.** the natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* ; 21:541–554.

**Reetha, S., Selvakumar, G., Bhuvanewari, G, Thamizhiniyan, P., Ravimycin, T. 2014.** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences* 8 (2).

**Rehman F.U, Kalsoom M, Adnan M, Toor M. & Zulfiqar A., 2020.** *Plant growth promoting rhizobacteria and their mechanisms involved in agricultural crop production: a review.* *SunText Review of Biotechnology.* 1(2): 1–6.

**Reid, M. S. 1981.** The role of ethylene in flower senescence. *Acta Hortic.* 261:157–169.

**Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W. & Paré, P. 2004.** Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology.* 134(3) : 1017-1026.

**Remond. D & Walrand. S. 2017.** Les graines de légumineuses : caractéristiques nutritionnelles et effets sur la santé. *Innovations Agronomiques.* Clermont-Ferrand: stephane.walrand@inra.fr pp134.

**Rosenblueth M. & Martinez-Romero E. 2006.** Bacterial endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant –Microbe Interact.* 19, pp.827-837.

**Ruchi., Kapoor, R., Kumar, A., Kumar, A., Patil, S., Thapa, S. and Kaur, M 2012.** Evaluation of plant growth promoting attributes and lytic enzyme production by fluorescent

*Pseudomonas* diversity associated with Apple and Pear. International Journal of Scientific and Research Publications, 2(2):1-8.

**Sadfi, N., Cherif, M., Fliss, I., Boudabbous, A. and Antoun, H. 2001.** Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*. 83, 101-118.

**Salisbury F.B et Ross C., 1992.** *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company Belmont California.

**Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, R& Van Peer, R. 1990.** Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interaction. *Plant Soil*.129:75-83.

**Setiawati, T. C. et Mutmainnah, L. 2016.** Solubilization of Potassium Containing Mineral by Microorganisms From Sugarcane Rhizosphere. *Agriculture and agricultural science*. 9 : 108-117.

**Shah, R., Chaudhari, K., Patel, P., Natarajan, A., Ramar, K. 2020.** Isolation, characterization, and optimization of indole acetic acid–producing *Providencia* species (7MM11) and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 28: 101732.

**Shaikh, S. S., Wani, S. J., Sayyed, R. Z., Thakur, R., Gulati, A. 2018.** Production, purification and kinetics of chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from rhizospheric soil. *Indian journal of experimental biology*. 56(4): 274-278.

**Shirokikh, I. G., Zenova, G. M., Merzaeva, O.V., Lapygina, E.V., Batalova, G.A., Lysak, L.V. 2007.** Actinomycetes in the prokaryotic complex of the rhizosphere of oats in a soddy-podzolic soil. *Eurasian Soil Sci* 40:158–162.

**Shoukry, A. A., El-Sebaay, H. H., El-Ghomary, A. E. 2018.** Assessment of Indole Acetic Acid Production from *Rhizobium leguminosarum*. Department of Agricultural Botany. (Microbiology) Faculty of Agriculture, Al-Azhar University, Cairo, Egypt. 60-69.

**Sinha, D., Suchetana, M. & Dakshayani, M. 2021.** Multifaceted Potential of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Handbook of Reseach on Microbial Remediation and Microbial Biotechnology for Sustainable Soil*. 1-7998-7062-3.

**Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P. & Prasad, S. M. 2017.** Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in

biology, agriculture, and medicine: current status and future prospects. *Frontiers in Microbiology*. 8(515): 37p.

**Singh, I. 2018.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions. *European Journal of Biological Research*. 8: 191-213.

**Soares, M. M. C. N., Silva, da, R., Gomes, E., 1999.** Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Rev. Microbiology*. 30, 299–303.

**Solano, B. R., Maicas, J. P. et Manero, F. J. G. 2008.** Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*, 41-52.

**Somers E, Vanderleyden J & Srinivasan M., 2004.** *Rhizosphere bacterial signalling : A love parade beneath our feet. Crit Rev Microbiol*. 30(4) : 205–240.

**Spaepen, S., Vanderleyden, J & Remans, R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant Signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. 425-448.

**Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. 2009.** Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in botanical research*. 51 : 283-320.

**Sullivan, M. J., Thorn, B., Haythornthwaite, J. A., Keefe, F., Martin, M., Bradley, L. A. & Lefebvre, J. C. 2001.** Theoretical perspectives on the relation between catastrophizing and pain. *The Clinical Journal of Pain*. 17(1):52-64.

**Suneja, P., Duhan, J. S., Bhoutan, N. & Dudeja, S. S. 2017.** Recent Biotechnological Approaches to study Taxonomy of Legume Nodule Forming Rhizobia. *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*. 101-124. 10.1007/978-981-10-4732-9\_6.

**Taktek, S . 2015.** *Dissolution biologique des phosphates : Interaction bactéries – mycorhizes*. Thèse de Doctorat : *microbiologie agroalimentaire*. Université LAVAL Québec Canada. 128p.

**Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. & Nasrulhaq, B. A. 2016.** Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability. *Molecules*. 21(5): 573p.

**Vessey, J. K. 2003.** *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil*. 255: 571–586.

**Vincent, J.M. 1970.** A Manual for Practical Study of Root Nodule Bacteria. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164. 440p.

**Wheatley, R. E. 2002.** The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 357–364.

**Yadav, J., Verma, J. P & Tiwari, K. N. 2010.** Effect of Plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and plant growth chickpea (*Cicer arietinum* L) under in vitro conditions. *In Biological Forum*. 2: 15-18.

**Zhu, H., Choi, H. K., Cook, D. R. & Shoemaker, R. C. 2005.** Bridging model and crop legumes through comparative genomics. Department of plant & Soil Sciences. *Plant physiology*, California. (137), 1189-1196.

# Annexes



# **Annexe 01**

## **Milieux de culture et réactifs**

**Yeast Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)**

- Mannitol.....	10 g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5 g
- Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
- NaCl .....	0,1 g
- Extrait de levure.....	0,5 g
- Eau distillée .....	1 L
- PH .....	6,8

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min

**Milieu d'activité d'amylase (López *et al.*, 2018)**

- amidon.....	10 g
- Extrait de levure .....	2 g
- peptone.....	5 g
- Mg SO <sub>4</sub> .....	0,5 g
- CaCl <sub>2</sub> .....	0,15 g
- NaCl.....	0,5 g
- Agar.....	15 g
- Eau distillée.....	1L
- PH .....	7

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min

**Milieu de Soares *et al.*, (1999)**

- pectine.....	10g
- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1,4 g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2 g
- Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
- d'agar.....	18 g
- Eau distillée.....	1 L
- PH .....	6,8

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min

**Milieu LMG 201 (Atlas, 2005)**

- Mannitol.....	10 g
- extrait de levure.....	1 g
- glutamate de sodium.....	0,5 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,5 g
- $\text{Mg SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,1 g
- $\text{CaCl}_2 2\text{H}_2\text{O}$ .....	40 mg
- $\text{Fe Cl}_3$ .....	4 mg
- pH.....	6.8

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min

**Eau peptonée**

- Eau peptonée déshydraté.....	15 g
- Eau distillée.....	1 L

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min

**Réactif de Salkowski (Shraddha *et al.*, 2019)**

Premièrement, une préparation de 100 ml de chlorure ferrique 0,5 M a été faite en dissolvant 8,125 g de  $\text{FeCl}_3$  dans 100 ml d'eau distillée.

- Ensuite pour diluer l'acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$ ), 24,5 ml d'eau distillée ont été mesurés dans une éprouvette graduée en y ajoutant 24,5 ml d'acide concentré  $\text{HClO}_4$  à 70 %.
- 1 ml de solution de chlorure ferrique 0,5 M a été ajouté à 49 ml d'acide perchlorique 35% pour obtenir le réactif.
- Finalement, le réactif a été bien mélangé et conservé dans une bouteille brun foncé à température ambiante.

# **Annexe 02**

## **Résultats des tests**

**Tableau : Résultats des différents tests enzymatiques réalisés**

Souche	Production d' $\text{NH}_3$	Amylase	Production HCN	Pectinase	Catalase
01	+	+++	++	+	+
03	+	+++	+	+	+
08	+	+	-	+	-
13	-	++	-	++	-
14	++	++	+++	+	+
23	++	+	+++	+	+
45	++	+++	+++	+	+
46	+	++	+	+	+
47	++	++	+++	+	+
52	++	+++	+	+	+
56	++	+++	+	+	+
57	++	+++	++	+	+
69	+	+++	-	+	+
70	++	+++	++	+	+

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes**

***Effets PGPR des bactéries endophytes isolées à partir des nodules du pois***

Résumé :

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes communément désignés sous le terme «PGPR » habitent naturellement la rhizosphère, une zone du sol entourant les racines, caractérisée par sa richesse en micro-organismes et en éléments nutritifs. Ces PGPR ont attiré une attention particulière en raison de leur capacité à améliorer la productivité et la rentabilité des cultures agricoles, dans un temps où la sécurité alimentaire et les moyens de subsistance représentent une priorité majeure. Ces rhizobactéries établissent des interactions associatives bénéfiques avec les légumineuses, intervenant directement et indirectement dans la favorisation de leurs croissances selon divers mécanismes. Ce travail a pour but de caractériser et évaluer les différents métabolites et enzymes à effet PGPR, produit par nos 14 souches endophytes non rhizobiennes isolées à partir de la légumineuse *Pisum sativum* L. L'étude expérimentale a été effectuée par des tests de la production de l'acide indole acétique (AIA), le cyanure d'hydrogène (HCN) et l'ammoniac (NH<sub>3</sub>), tout en mettant l'accent sur la détection des activités enzymatiques telles que : la présence de l'amylase, la pectinase et la catalase. Les résultats obtenus montrent la capacité de toutes nos souches à produire l'AIA à des concentrations variables. La plus grande concentration (25,8µg/ml) a été observée chez la souche 13 au bout du 7ème jour d'incubation, alors que la plus faible quantité a été observée chez la souche 69 après 2 jours d'incubation. La capacité à produire l'ammoniac chez la totalité des souches a été constaté excepté la souche 13. La recherche de la catalase indique que toutes les souches sont catalase positif sauf les souches 8 et 13 qui sont catalase négatif. Le pouvoir de produire les enzymes amylase et pectinase a été détecté chez l'intégralité des souches, avec la production de l'HCN chez 11 souches parmi les 14 testées. Toutes ces données nous poussent à déduire que toutes les souches isolées détiennent des activités à effets favorisant la croissance végétale « PGP ».

**Mot clés :** *Pisum Sativum* L ; Rhizosphère ; Bactéries endophytes ; PGPR.

**Membre du jury :**

**Présidente du jury :** Mme. ARABET D. (Maître de Conférences- UFM Constantine 1).

**Rapporteuse :** Mme. GACI M. (Maître de Conférences- UFM Constantine 1).

**Examinatrice :** Mme. LIFA M. (Maître Assistante – UFM Constantine 1).

**Présentée par :**

**Bouhachicha Ghoufrane**

**Frifet Amani Lina**

**Bouaroudj Khouloud**

**Année universitaire : 2022 -2023**