



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Et Ecologie Végétale

قسم : بيولوجيا إيكولوجيا النبات.

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et génomique végétale

Intitulé :

Caractérisation de quelques modes d'action des PGPR chez 30 souches bactériennes isolées de la rhizosphère et le rhizoplan du blé dur

Présenté et soutenu par : M^{elle} Amour Karima

Le : 25/06/2018

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. BENABDOUN F.M. (M.C.B – SNV UFM Constantine I).

Rapporteur : Dr. KECHID M. (M.C.B – INATAA UFM Constantine I).

Examineur : Mr. TEMAGOULT M. (M.A.A – SNV UFM Constantine I).

Année universitaire 2017 - 2018

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Je remercie infiniment madame BENABDOUN F.M maitre de conférences à l'Université Mentouri- Constantine I, d'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'elle me permet de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie également Mr TEMAGOULT M. maitre assistant à l'Université Mentouri-Constantine I, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance à madame KECHID M, pour m'avoir épaulé tout au long de ce travail, pour m'avoir fait profiter de ses connaissances et pour son soutien précieux lors de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier toute l'équipe des laboratoires de « Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales », en particulier, Mr. Nadir BELBEKRI pour son assistance et ses conseils, ainsi que Mme ZAHRAOUI Chafika qui a été très patiente et bienveillante avec nous.

J'adresse mes remerciements à tous nos enseignants. Nous avons grandement apprécié votre soutien, votre implication et votre expérience, tout au long de notre cursus universitaire.

Un grand merci à mes collègues de promotion ainsi qu'à toute personne qui a aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

.

Dédicaces

*A la mémoire de mon Père Saci
Aucune dédicace ne saurait exprimer
l'amour, L'estime, le dévouement et le
respect que j'ai toujours eu Pour vous.
Rien au monde ne vaut les efforts fournis
jour et Nuit pour mon éducation et mon bien
être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que
tu as Consentis pour mon éducation et ma
formation.*

A ma très chère mère Fatiha

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi,

A mon très cher frère Billel, son épouse Meriem

Mon cher frère qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur de santé et de réussite,

A ma très chère sœur Khaoula et Lydia

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite,

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon

Affection,

A ma chère cousine Ouassila

A mes chères ami (e)s et collègue(e)s

Bouthaina, Assma, Chaima, Adra, Khadidja, Rayane, Zouleikha

Hanane, Mina, Randa, Narimene, Sonia, Alla Eddine,

Mouhammed, Anis, Yasser, Abdou, Amina

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

RESUME

Les rhizobactéries jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre du sol, parmi ces bactéries, il y a celles qui ont montré leur capacité à favoriser la croissance des plantes, elles sont connues sous le terme de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), elles agissent positivement sur la croissance de la plante, en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à caractériser 30 souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère et le rhizoplan de blé dur (*Triticum durum*), à partir des deux régions de l'est algérien (El Khroub et Ain Abid de la wilaya de Constantine). D'abord, nous avons commencé par caractériser les propriétés morphologiques et phénotypiques des souches isolées. La caractérisation de leurs enzymes respiratoires a été également réalisée et finalement la mise en œuvre de quelques modes d'actions de ces bactéries comme leur capacité à produire des auxines, à solubiliser la phytate et à dégrader la nitrate. Les résultats obtenus nous ont servi de sélectionner et de classer les bactéries les plus performantes pour stimuler la croissance de la plante.

Mots clés : PGPR, rhizosphère, rhizoplan, blé dur.

ABSTRACT

Rhizobacteria play an important role in maintaining soil balance, among these bacteria, there are those that have shown their ability to promote plant growth, they are known as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), they act positively on the growth of the plant, increasing the uptake of soil nutrients, inducing and producing plant growth regulators and activating the mechanisms of resistance induced in plants. In our work, we focused on characterizing 30 strains isolated from rhizosphere and durum wheat rhizoplan (*Triticum durum*), from the two regions of eastern Algeria (El Khroub and Ain Abid from the wilaya of Constantine). First, we began by characterizing the morphological and phenotypic properties of isolated strains. The characterization of their respiratory enzymes was also carried out and finally the implementation of some modes of action of these bacteria as their ability to produce auxins, to solubilize phytate and to degrade nitrate. The results obtained were used to select and classify the most efficient bacteria to stimulate the growth of the plant.

Key words: PGPR, rhizosphere, rhizoplan, durum wheat.

ملخص

تلعب Rhizobacteria دوراً مهماً في الحفاظ على توازن التربة ، من بين هذه البكتيريا ، هناك تلك التي أظهرت قدرتها على تعزيز نمو النبات ، وهي تعرف باسم Rhizobacteria أو PGPR، وهي تعمل بشكل إيجابي على نمو النبات ، مما يزيد من امتصاص المغذيات في التربة ، وتحريض وإنتاج منظمات نمو النباتات وتفعيل آليات المقاومة الناجمة في النباتات. ركزنا في عملنا على توصيف 30 سلالة معزولة عن جذور الريزوسفير و rhizoplan من نبات القمح الصلب (Triticum durum)، من منطقتي شرق الجزائر (الخراب و عين عابد من ولاية قسنطينة). أولاً ، لقد بدأنا بتوصيف الخصائص المورفولوجية والمظهري للسلاسل المعزولة. وقد تم أيضاً توصيف أنزيماتهم التنفسية وأخيراً تنفيذ بعض طرق عمل هذه البكتيريا مثل قدرتها على إنتاج الأكسينات ، ولإذابة phytate وحل النتراة. تم استخدام النتائج التي تم الحصول عليها لتحديد وتصنيف البكتيريا الأكثر فعالية لتحفيز نمو النبات .

الكلمات المفتاحية : PGPR ، rhizosphere ، rhizoplan ، durum wheat.

Liste de figures

	PAGE
FIGURE 1 : LES BACTERIES DU SOL.....	4
FIGURE 2 : MODES D’ACTION DES PGPR.....	8
FIGURE 3: SITES D’ISOLEMENT DES SOUCHES DU RHIZOPLAN ET DE LA RHIZOSPHERE.....	18
PHOTO1 : BOITES DE PETRI DES DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES	19
PHOTO 2: TEST D’OXYDASE.....	21
PHOTO3 : CULTURES BACTERIENNE EN AGITATION.....	22
FIGURE 4 : COLORATION DE GRAM.....	24
PHOTO 5 : TEST QUALITATIF DE CROISSANCE DES BACTERIES SUR UN MILIEU CONTENANT LE PHYTATE COMME SEULE SOURCE DE PHOSPHORE.....	31
PHOTO 6 : RESULTATS DE LA CONCENTRATION DE L’AIA APRES AJOUT DE REACTIF DE SALKOWSKI.....	33
FIGURE 5 : CONCENTRATION D’AUXINE PRODUITE PAR LES BACTERIES DE LA REGION DE AIN ABID PAR UNE ABSORBANCE BACTERIENNE EGALE A 1.....	34
FIGURE 6 : CONCENTRATION D’AUXINE PRODUITE PAR LES BACTERIES DE LA REGION D’EL KHROUB PAR UNE ABSORBANCE BACTERIENNE EGALE A 1.....	35
PHOTO 7 : RESULTATS DE L ACTIVITE NITRATE REDUCTASE APRES L’AJOUT DES REACTIFS GRIESS 1 ET GRIESS 2.....	37
FIGURE 7 : CONCENTRATION DE NITRATE PRODUITE PAR LES BACTERIES DE LA REGION DE AIN ABID PAR UNE ABSORBANCE BACTERIENNE EGALE A 1.....	38
FIGURE 8 : CONCENTRATION DE NITRATE PRODUITE PAR LES BACTERIES DE LA REGION D’EL KHROUB PAR UNE ABSORBANCE BACTERIENNE EGALE A 1.....	39

Liste de tableaux

	PAGE
TABLEAU 1: DIFFERENTES SOUCHES UTILISEES.....	19
TABLEAU 2 : TEST MORPHOLOGIQUE DES BACTERIES ISOLEES DE LA REGION DE AIN ABID.....	25
TABLEAU 3 : TEST MORPHOLOGIQUE DES BACTERIES ISOLEES DE LA REGION D'EL KHROUB.....	26
TABLEAU 4 : TEST CATALASE DES BACTERIES DE LA REGION D'EL KHROUB.	28
TABLEAU 5 : TEST CATALASE DES BACTERIES DE LA REGION DE AIN ABID.	28
TABLEAU 6 : TEST D'OXYDASE DES BACTERIES DE LA REGION D'EL KHROUB.	29
TABLEAU 7: TEST DE CATALASE DES BACTERIES DE LA REGION DE AIN ABID	30
TABLEAU 8 : TEST QUALITATIF DES BACTERIES SOLUBILISANT LA PHYTATE DE LA REGION DE AIN ABID.....	31
TABLEAU 9: TEST QUALITATIF DES BACTERIES SOLUBILISANT LA PHYTATE DE LA REGION D'EL KHROUB.....	32

Table des matières

LISTE DE FIGURES	
LISTE DE TABLEAUX	
SOMMAIRE	
INTRODUCTION GENERALE.....	3
Chapitre 1 Synthèse bibliographique	
1. RHIZOSPHERE	4
2. RHIZOBACTERIES	4
3. BACTERIES PROMOTRICES DE LA CROISSANCE DES PLANTES (PGPR)	4
4. DIFFERENTS GENRE DE PGPR.....	5
4.1. <i>AZOSPIRILLUM</i>	5
4.2. <i>PSEUDOMONAS</i>	6
4.3. <i>BACILLUS</i>	6
4.4. <i>RHIZOBIUM</i>	6
4.5. <i>FRANKIA</i>	7
5. MODES D’ACTION DES PGP.....	7
5.1. MODE DIRECTE.....	8
5.1.1. <i>Fixation biologique de l’azote</i>	8
5.1.2. <i>Solubilisation du Phosphate</i>	9
5.1.3. <i>Production d’hormones de croissance</i>	10
5.1.3.1. <i>Acide indole acétique (AIA)</i>	11
5.1.3.2. <i>Cytokinines</i>	11
5.1.3.3. <i>Gibérillines</i>	12
5.1.4. <i>Régulation d’éthylène</i>	12
5.2. MODE INDIRECT	13
6. EFFETS DES PGPR SUR LA CROISSANCE VEGETALE	14
6.1. RENDEMENT ET COMPOSANTES DU RENDEMENT	14
6.2. GERMINATION ET EMERGENCE	15
6.3. ENRACINEMENT DES BOUTURES	16
6.4. ABSORPTION DES NUTRIMENTS.....	16

Chapitre 2 Matériels et Méthodes

MATERIELS ET METHODES	18
1. LOCALISATION DES SITES DE PRELEVEMENT	18
2. MATERIEL BIOLOGIQUE	18
3. METHODES	19
3.1. REPIQUAGE DES SOUCHES	19
3.2. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET PHENOTYPIQUE DES SOUCHES ISOLEES.....	20
4. ETUDE DES ENZYMES RESPIRATOIRES	20
4.1. RECHERCHE DE LA CATALASE	20
4.2. RECHERCHE DE L'OXYDASE: (INDOPHENOL OXYDASE).....	20
5. ANALYSE DE QUELQUES MODES D'ACTION DES PGPR.....	21
5.1. SOLUBILISATION DE LA PHYTATE	21
5.2. DOSAGE DE L'ACIDE INDOLE ACETIQUE (AIA).....	21
5.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE	22
6. EVALUATION STATISTIQUE	23

Chapitre 3 Résultats et Discussion

RESULTATS ET DISSCUSION	23
1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE	23
2. CARACTERISATION DES ENZYMES RESPIRATOIRES.....	27
2.1. RECHERCHE DE CATALASE	27
2.2. RECHERCHE D'OXYDASE	29
3. CARACTERISATION DES MODES D'ACTION DES PGPR.....	30
3.1. SOLUBILISATION DE PHYTATE	30
3.2. PRODUCTION DE L'ACIDE INDOLE ACETIQUE (AIA).....	33
3.3. ACTIVITE NITRATE REDUCTASE.....	36
CONCLUSION.....	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	53
ANNEXES	54

Introduction générale

Le blé, le riz et le maïs sont les céréales les plus abondants dans le monde entier. Le blé fournit plus de calories et de protéines dans le régime que n'importe quelle autre céréale (Susana *etal.*, 2008). En Algérie, le blé est l'une des récoltes les plus importantes, plusieurs hectares sont employés pour sa plantation. Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est la première céréale cultivée en Algérie elle occupe environ 2 millions d'hectares (Susana *etal.*, 2008).

La plupart des travaux de recherche effectués sur le blé dur ont eu durant de nombreuses années pour objectif principal l'augmentation de la productivité, une approche basée essentiellement sur les performances agronomiques. Ces dernières années, un intérêt plus croissant a été porté sur les études qui concernent l'amélioration génétique de la tolérance au stress hydrique dans les programmes d'amélioration du blé.

Cependant, la production nationale ne répond pas au besoin de la population étant donné le faible rendement ce qui classe l'Algérie comme l'un des plus importants pays importateurs des céréales. Ceci est dû essentiellement à la dégradation du sol qui représente une menace pour la survie à long terme de la production agricole. En plus, la culture du blé nécessite des apports importants en engrais azotés, ce qui favorise la contamination des nappes souterraines.

Actuellement, plusieurs recherches ont utilisé d'autres méthodes pour améliorer la production de blé et diminuer le risque de contamination de l'environnement, parmi lesquelles une approche basée sur l'utilisation de microorganismes principalement dans des programmes d'amélioration de la production de blé. Certains microorganismes appelés rhizobactéries ont l'aptitude à coloniser les racines ou interagir avec eux directement ou indirectement de façon intense.

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol-racine. En effet, le rhizoplan et la rhizosphère sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (Lugtenberg *et al.*, 2002 ; Rawat et Mushtaq, 2015). L'ensemble des effets bénéfiques des rhizobactéries s'est élargi dans les dernières années.

Parmi les microorganismes à effets bénéfiques, il existe notamment des bactéries dont l'effet global favorise la croissance de la plante, ces bactéries portent l'appellation de « Plant Growth Promoting Rhizobacteria »(PGPR) (Kloepper, 1980), d'autre part, certaines de ces bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculant pour améliorer le développement des racines via la production de certaines phytohormones, telles que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (El-Hadad *et al.*, 2010), De nombreux travaux ont montré que ces rhizobactéries interviennent aussi dans le bio contrôle de la plante par la diminution des effets délétères des phytopathogènes, en synthétisant des antibiotiques spécifiques (Fischer *et al.*,2009). D'autre part, il a été montré l'importance qu'elles peuvent jouer ces bactéries dans la tolérance face au stress hydrique, ainsi que leur capacité à augmenter la biomasse et la croissance racinaire (Arzanech *et al.*,2011).C'est ainsi que, de très nombreuses activités enzymatiques peuvent être décelées dans le sol comme la catalase, les oxydases et les cellulases. Les rhizobactéries sont parmi les microorganismes qui ont montré un véritable potentiel de ces activités enzymatiques (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003).

C'est dans cette optique que notre le travail consiste à étudier au niveau phénotypique et biochimique, 30souches bactériennes isolées de la rhizosphère et le rhizoplan du blé dur cultivés dans deux régions de Constantine, dont Ain Abid et El Khroub, pour sélectionner parmi celles-ci, les souches les plus performantes, en étudiant certains de leurs modes d'action en tant que PGPR et déterminer celles qui ont le potentiel d'agir en tant que bactéries bénéfiques. Afin de réaliser ce travail, nous avons commencé par une caractérisation morphologiques des différentes souches isolées, une détermination de leurs enzymes respiratoires et enfin étudier leur capacité à solubiliser le phosphate (Phytate), à réduire le nitrate et à produire l'auxine.

Chapitre 1

Synthèse

Bibliographique

1. Rhizosphère

La rhizosphère est la zone de sol qui entoure les racines et qui est sous l'influence des exsudats racinaires. La richesse de cette zone la rend favorable à la colonisation par des microorganismes dont leur activité, modifie sa composition et son activité chimique (Hiltner, 1904). Les microorganismes qui se trouvent dans cette zone, nous appelons les « Rhizobactéries ». (**Figure 1**)

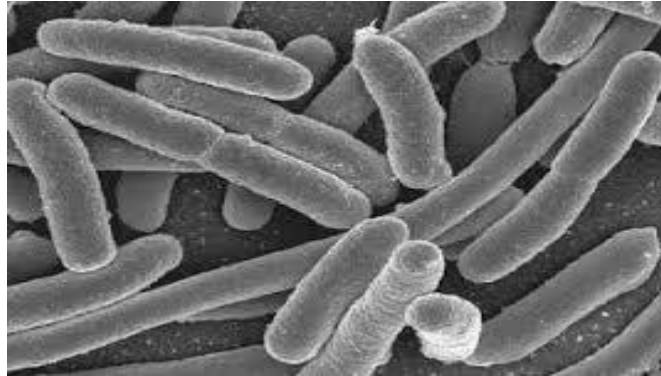


Figure 1 : Les bactéries du sol.

2. Rhizobactéries

Ce sont des bactéries capables de se multiplier et de rivaliser avec les autres microorganismes pour occuper cette zone riche en éléments nutritifs. L'association, le rôle et les effets que les rhizobactéries exercent sur la plante sont en fonction du succès de leur établissement dans la rhizosphère; elles peuvent avoir un effet positif, négatif ou neutre sur la croissance des plantes. Près de 5% des rhizobactéries favorisent la croissance des plantes et les protègent contre les agents pathogènes tels les bactéries, les moisissures (Suslow, 1982; Weller, 1988) et les nématodes (Kloepper *et al.*, 1992). L'inoculation des semences avec des rhizobactéries bénéfiques se traduit généralement par des accroissements de rendement d'environ 10 à 30% (Suslow, 1982). Ces rhizobactéries appartiennent à différents groupes taxonomiques de bactéries. Elles ont été regroupées sous le nom de Rhizobactéries qui Favorisent la Croissance des Plantes (RFCP) ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

3. Bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Le deuxième type de symbiose plantes/microorganismes est la symbiose associative qui est également une interaction à bénéfices réciproques entre les deux partenaires plante – bactérie. Elle est habituellement considérée comme une interaction facultative, à large

spectre d'hôte, et avec peu ou pas de différenciation des partenaires. L'exemple le mieux connu est celui des rhizobactéries qui contribuent positivement à la croissance des plantes, elles sont appelées : PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 2004).

Le terme PGPR a été introduit pour la première fois à la fin des années 1970, lorsqu'il a été démontré par Kloepper et Schroth (Kloepper, 1980a ; Kloepper, 1980b), que des souches de *Pseudomonas fluorescens* ont amélioré le rendement des cultures de pommes de terre jusqu'à 500% en produisant des sidérophores et des chélateurs de fer, privant les bactéries pathogènes indigènes de fer (Garcia *et al.*, 2003). Selon Beneduzi *et al.* (2012), seulement 1 à 2% des rhizobactéries la croissance des plantes dans la rhizosphère. Ces rhizobactéries colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs. A la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (Vacheron *et al.*, 2013). La sélection d'une souche PGPR efficace est liée à la caractérisation de ses propriétés favorisant la croissance végétale comme : la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores et de phytohormones, la capacité à fixer l'azote, et la lutte biologique contre les maladies des plantes (Cattelan *et al.*, 1999).

4. Différents genre de PGPR

4.1. *Azospirillum*

Azospirillum est une bactérie mobile, à Gram négatif, appartenant à l'ordre des Rhodospirillales, associée avec les racines des monocotylédones, notamment des cultures importantes comme le blé, le maïs et le riz. Plusieurs souches d'*Azospirillum* ont montré des effets bénéfiques sur la croissance des plantes et sur le rendement des cultures, en serre ou dans des essais au champ, sous divers sols et diverses conditions climatiques. Elles peuvent établir une symbiose associative avec les céréales (Bashan *et al.*, 2004). L'association entre *Azospirillum* et la plante produit des changements morphologiques et physiologiques dans les racines. La bactérie produit des hormones de croissance, l'acide indole-3 acétique (AIA), qui favorise l'augmentation de la surface des racines, entraînant une augmentation de l'absorption de l'eau et des minéraux. De plus cette association permet la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (jusqu'à 50 kg de N/ha/ans) ce qui favorise la croissance et le rendement des cultures (Bashan *et al.*, 2004). Les *Azospirillum* se fixent à la surface des racines, dans la zone d'élongation, ou au niveau des poils absorbants. Cette fixation implique une synthèse des polysaccharides de la capsule

par des lectines (glycoprotéines) de la plante et s'accomplit en deux étapes. Il y a d'abord attachement réversible à la surface de l'hôte par les flagelles, puis ancrage définitif par les exopolysaccharides. Les *Azospirillum* demeurent dans la couche mucilagineuse qui recouvre la surface des racines, ou s'enfoncent dans les assises corticales. Ils possèdent des enzymes pectonolytiques qui leur permettent de pénétrer dans les lamelles moyennes des cellules et de descendre, parfois jusqu'à l'endoderme. Des substances de croissance directement produites par les bactéries, modifient l'aspect du système racinaire (Bashan *et al.*, 2004).

4.2. *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des Proteobacteria, classe des Gamma proteobacteria, ordre des Pseudomonales. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont mobiles, elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes, elles sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes (Höfte et de Vos, 2006), ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes *et al.*, 2004).

4.3. *Bacillus*

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à Gram positif, appartenant à la famille des Bacillaceae, l'ordre des Bacillales, la classe des Bacilli. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. C'est le genre le plus abondant dans la rhizosphère, l'activité PGPR de certaines de ces souches a été connue depuis plusieurs années (Probanza *et al.*, 2002). Elles sont potentiellement utiles comme agents de lutte biologique (Nagórska *et al.*, 2007) et capables de solubiliser le phosphate, produire de l'AIA, séderophore et antifongique (Charest *et al.*, 2005).

4.4. *Rhizobium*

Les rhizobiums, ou rhizobia, sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des Rhizobiaceae (Sahgal et Johri, 2006). Ces bactéries sont capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses. Cette symbiose

se traduit par la formation sur les racines de la plante hôte des nodules (nodosités). Les nodosités sont le lieu d'une activité symbiotique : la plante fournit les substances carbonées aux bactéries, et les bactéries fournissent à la plante les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique (Downie, 2005). Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote. Akhtar et Siddiqui (2009) ont montré que l'inoculation par *Rhizobium* sp. Entraîne une augmentation dans la croissance, le rendement et le nombre de nodules formé au niveau des racines par rapport aux plantes sans inoculation. En plus de leur activité bénéfique de fixation d'azote avec les légumineuses, les Rhizobia peuvent améliorer la nutrition des plantes par la mobilisation du phosphate organique et inorganiques.

4.5. *Frankia*

L'actinomycète *Frankia* est une bactérie Gram-positive filamenteuse, et non un champignon comme le pensaient les microscopistes du XIXème siècle. Il s'agit plus précisément d'un actinomycète en raison de ses caractéristiques morphologiques et biochimique (Duhoux et Nicole, 2004). Contrairement aux bactéries fixatrices d'azote comme les Rhizobia, *Frankia* peut fixer l'azote atmosphérique à l'état libre (Pawlowski et Sprent, 2008). Elle a été détectée dans des sols dépourvus de plantes actinorhizienne (Wall, 2000).

5. Modes d'action des PGP

Les modes d'action des PGPR sont regroupés traditionnellement en directs et indirects. Bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes directs sont ceux agissant à l'intérieur des plantes et affectent directement leur nutrition, leur métabolisme et leur développement, tandis que les mécanismes indirects, en général, sont ceux qui se produisent en dehors des plantes et touchent surtout tout ce qui est en relation avec le bio contrôle. Les mécanismes directs comprennent les processus de bio fertilisation (nutrition de la plante) et de bio stimulation (production des phytohormones de croissance) (Figure 2). Les processus de bio contrôle (production des métabolites antifongiques, production de composés volatiles,...) ; constituent des mécanismes indirects (Figure 2), car elle assure un milieu sain pour la croissance de la plante, ce qui assure une bonne croissance de celle-ci.

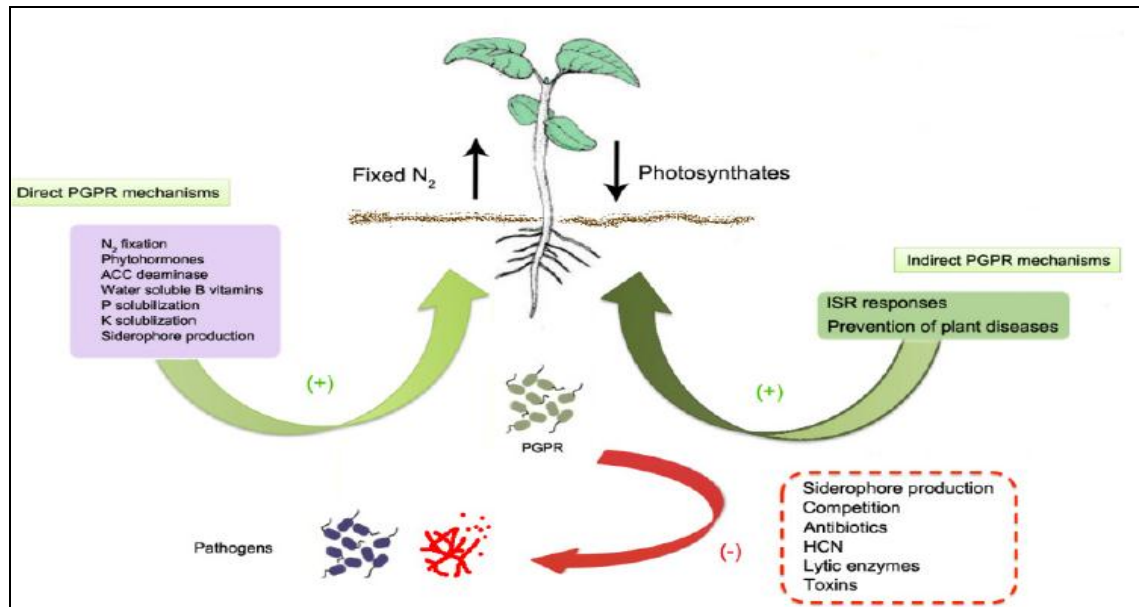


Figure 2 : Modes d'action des PGPR (Garcia Fraile *et al.*, 2015).

5.1. Mode directe

Les PGPR participent à augmenter la disponibilité des nutriments et des phytohormones dans la rhizosphère, ceci stimule directement le développement et la croissance de la plante, les mécanismes les plus importants sont cités ci-dessous.

5.1.1. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne. L'azote est un aliment essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes.

L'utilisation de bio-engrais tels que les bactéries fixatrices d'azote peut accroître la productivité et constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production. Ainsi, Figueiredo *et al.* (2008) ont rapporté que, au cours des deux dernières décennies, l'utilisation de PGPR pour le développement durable de l'environnement et de l'agriculture a considérablement augmenté dans plusieurs régions du monde. Les microorganismes prennent de l'importance dans l'agriculture en favorisant la circulation des éléments nutritifs (Sahin *et al.*, 2004; Orhan *et al.*, 2006).

Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (Graham, 1988). La fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique (Saxena et Tilak, 1998). Les bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère sont de plus en plus utilisées dans les cultures des non légumineuses comme la betterave sucrière, la canne à sucre, le riz, le maïs, et le blé (Dobereiner, 1997; Hecht-Buchholz, 1998; Sahin *et al.*, 2004). Parmi les bactéries fixatrices d'azote non-symbiotiques les plus importantes appartiennent à plusieurs espèces : *Azoarcus* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*. *Azospirillum* est le représentant des PGPR, ses capacités ont été évaluées dans des expériences à travers le monde (Burdman *et al.*, 2000; Dobbelaere *et al.*, 2003; Vessey, 2003; Lucy *et al.*, 2004; Ramirez et Mellado, 2005). De plus, des espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus* (Glick *et al.*, 1994a; Alam *et al.*, 2001; Cakmakci *et al.*, 2001; Kokalis-Burelle *et al.*, 2002), et d'autres bactéries endophytiques telles que *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia* et *Stenotrophomonas*, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs ces dernières années en raison de leur association avec des cultures importantes et leur potentiel à améliorer la croissance des plantes (Chélius et Triplett, 2000; Verma *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2003; Ramirez et Mellado, 2005).

5.1.2. Solubilisation du Phosphate

L'amélioration de la fertilité du sol est l'une des stratégies les plus communes pour augmenter la production agricole. En plus de la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates représente également un moyen important. Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologique disponible (Ezawa *et al.*, 2002). Même dans les sols riches, la plupart du phosphore n'est pas disponible pour les plantes, une grande quantité se trouve sous forme insoluble. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). Les microorganismes permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités (Kucey *et al.*, 1989; Pradhan et Sukla, 2005). La capacité de

quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent bio fertilisant dans l'agriculture (Sharma *et al.*, 2007).

Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. Les acides gluconiques et 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel, de phosphate conduisent à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique. La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases (Kumar et Narula 1999; Whitelaw, 2000; Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas* spp. (Subbarao, 1988 ; Kucey *et al.*, 1989). *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. sircalmous* sont les plus performantes dans la solubilisation des phosphates (Podile et Kishore, 2006).

5.1.3. Production d'hormones de croissance

Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaires, la différenciation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones. De nombreuses phytohormones sont produites par les PGPR. Bien que le rôle de la biosynthèse de ces phytohormones par ces micro-organismes ne soit pas entièrement expliquée, il est à noter que les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden 1995 ; Glick, 1995; Lucy *et al.*, 2004). Les régulateurs de croissance des végétaux sont les substances qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations et modifient ou contrôlent un ou plusieurs événements spécifiques du métabolisme d'une plante. Les hormones végétales sont des signaux chimiques affectant la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques.

5.1.3.1. Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008). Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en limitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. Les poids des tiges et des racines des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (Narula *et al.*, 2006). Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Une grande proportion (80%) de bactéries colonisant la rhizosphère le synthétise, les bactéries à Gram positif sont faiblement productrices (Loper et Schroth, 1986). Toutefois, l'amélioration de la croissance des plantes par la colonisation racinaire avec des espèces de *Bacillus* et *Paenibacillus* productrices d'AIA est bien connue (Kloepper *et al.*, 2004 ; Idris *et al.*, 2007).

5.1.3.2. Cytokinines

Les cytokinines sont des aminopurines N6-substituées qui jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la division cellulaire des plantes, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retard de la sénescence (Salisbury et Ross, 1992). En outre, les cytokinines régulent l'expression du gène codant pour l'expansine, protéine qui induit le relâchement des parois cellulaires des plantes et facilitant l'expansion de la cellule végétale et provoquant sa turgescence, ceci a un impact à la fois sur la taille et la forme des cellules (Downes *et al.*, 2001). Le gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse des cytokinines a été initialement caractérisée chez *Agrobacterium tumefaciens* (Nester *et al.*, 1984) et ensuite chez les bactéries méthylotrophes et méthanotrophes (Ivanova *et al.*, 2001). Depuis, de nombreuses PGPR y compris *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. sont productrices de cette hormone (Nieto et Frankenberger, 1989; Timmusk *et al.*, 1999). L'inoculation de graines avec des bactéries productrices de cytokinines conduit généralement à augmenter le contenu en cytokinines chez les plantes influençant ainsi simultanément la croissance et le développement des plantes (Arkhipova *et al.*, 2005).

Divers stress environnementaux peuvent aussi engendrer l'accumulation des taux élevés de cytokinines végétales (Arkhipova *et al.*, 2007).

5.1.3.3. Gibérellines

Sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries; ce sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques. Un nombre important (136) de gibbérellines différentes sont identifiées et caractérisées (MacMillan, 2002). Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (MacMillan, 2002). Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini *et al.*, 2004). La capacité des bactéries à synthétiser des substances de gibbérellines a été initialement décrite chez *A. brasilense* (Tien *et al.*, 1979) et *Rhizobium* (Williams et Sicardi de Mallorca, 1982), puis chez différents genres bactériens qui peuplent le système racinaire de la plante, y compris *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Burkholderia*, et *Xanthomonas* (Mitter *et al.*, 2002; Tsakelova *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2009). La promotion de la croissance des plantes par les PGPR productrices de gibbérellines est rapportée par plusieurs travaux et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux (Atzhorn *et al.*, 1988; GutierrezManero *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2009).

5.1.4. Régulation d'éthylène

Au cours des dernières années, un nouveau mécanisme de promotion de la croissance des plantes impliquant l'éthylène est proposé (Burdman *et al.*, 2000). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène (qui affecte négativement de nombreuses étapes physiologiques des plantes : Une augmentation de la production d'éthylène agissant comme hormone sensitive stimule la maturation des fruits et le vieillissement des fleurs. Ces symptômes sont associés à une perte de la chlorophylle des feuilles, une dégradation des protéines et des ARN et une perte de pigmentation des fleurs (Oldroyd *et al.*, 2001; VanLoon *et al.*, 2006) et favoriserait un allongement des racines.

Les PGPR produisant cette enzyme soulageraient ainsi la plante de plusieurs stress causés par des infections, l'absorption de métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse (Glick *et al.*, 1998).

Le rôle de l'ACC désaminase chez les PGPR est actuellement bien établi. Elle intervient dans la régulation de l'éthylène chez les plantes. Les PGPR s'attachent aux racines et métabolisent les exsudats racinaires tels que le tryptophane et le transforment en auxines particulièrement en AIA. Cet AIA rhizobactérien ainsi que l'AIA endogène de la plante peuvent induire l'activité de l'ACC-synthase qui produit de l'ACC (Penrose et Glick, 2001). Une partie de l'ACC de la plante est excrétée et dégradée par l'ACC-désaminase des rhizobactéries en ammoniacque et α -cétobutyrate, composés rapidement métabolisés par les bactéries (Holguin et Glick, 2001), par conséquent la diminution de l'ACC entraîne l'abaissement du taux d'éthylène dans la plante.

5.2. Mode indirect

Les micro-organismes, principalement les bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante via le biocontrôle : en dégradant les polluants organiques et en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (Antoun et Prévost, 2005). La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Agrobacterium* (Haas et Defago, 2005). De nombreuses recherches ont concerné *Bacillus* et *Pseudomonas* qui sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ces rhizobactéries ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques (Raaijmakers *et al.*, 2002). Les modes d'action des agents microbiens dans le biocontrôle ne sont pas toujours bien connus et peuvent varier pour un microorganisme donné en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles.

En général, les principaux modes de biocontrôle attribués à ces rhizobactéries sont :

- a. Antibiose : interaction biologique dont l'un des aspects est l'antagonisme contre les phytopathogènes et la compétition pour les nutriments (Parray *et al.*, 2015) ;
- b. Résistance systémique induite (ISR) via la stimulation des défenses de la plante par la synthèse d'éliciteurs appartenant à la classe des antibiotiques (le 2,4-diacetylphoroglucinol DAPG, principalement), et des phytohormones liées au stress

- (l'acide jasmonique, l'acide salicylique, la cadavérine, etc.), ainsi que la production d'enzymes liées au catabolisme d'éthylène (l'ACC désaminase) (Jourdan *et al.*, 2008 ; Parray *et al.*, 2015) ;
- c. Production de métabolites à activité antimicrobienne tels que l'ammoniac (NH₃), les antibiotiques phénaziniques (ex : la pyocyanine), les sidérophores, le cyanure d'hydrogène (HCN), les enzymes hydrolytiques (chitinases, glucanases, protéases, et lipases), etc. (Beneduzi *et al.*, 2012) ;
 - d. Bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds toxiques et les pesticides (les composés xénobiotiques), par l'immobilisation et la transformation des métaux les rendant inactifs pour tolérer leur absorption. Les cellules végétales sont étroitement associées aux cellules microbiennes qui se développent en biofilm sur la surface de la racine, générant des molécules de signaux et entraînant un phénomène nommé : « quorum sensing ». Cette capacité des microbes à sentir le milieu environnant joue un rôle impératif dans l'efficacité nutritive et peut contrebalancer les effets délétères des métaux lourds sur les plantes (Daniels *et al.*, 2004).

6. Effets des PGPR sur la croissance végétale

Depuis les dernières décennies, la réponse des cultures végétales à l'inoculation par des PGPR est étudiée dans de nombreuses expériences menées à travers le monde dans les champs et sous serres. Sur la base des données obtenues, il est évident que l'inoculation a entraîné des augmentations significatives des rendements de différentes cultures, sous différentes conditions. Elles peuvent affecter la croissance et le rendement d'une large gamme de cultures telles que les céréales ou les légumes. Les traitements avec les PGPR augmentent le pourcentage de germination, la vigueur des plantules, l'émergence, le développement des racines et des tiges, la biomasse totale des plantes, le poids des semences, la floraison précoce et les rendements de fruits et des graines (Van Loon *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

6.1. Rendement et composantes du rendement

L'augmentation et la qualité de la productivité agricole sont indispensables. Les applications des PGPR sont les pratiques les plus fiables offrant de meilleurs rendements des cultures agricoles. Les souches *Pseudomonas* BA-8 et *Bacillus* OSU-142 appliquées sur les feuilles et les fleurs des pommiers ont considérablement amélioré le rendement de

la superficie de la section transversale du tronc (de 13,3 à 118,5%), le poids des fruits (4.2 à 7.5%), la longueur des tiges (de 20,8 à 30,1 %), et le diamètre des tiges (9,0 à 19,8%) par rapport au témoin (Pirlak *et al.*, 2007). Ainsi, les combinaisons *Bacillus* M3 et/ou OSU-142 et/ou *Microbacterium* FS01 ont le potentiel d'accroître le rendement et la croissance des pommiers. En outre, *Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 et M3 ont également donné un effet bénéfique sur la longueur, le rendement des cultures et la qualité des fruits d'abricot, de cerise et de framboise (Esitken *et al.*, 2005 ; Orhan *et al.*, 2006). Le poids moyen des fruits de tomate par plante traitée avec *Rhodopseudomonas* sp KL9 (82,7 g) est supérieur par rapport au témoin non inoculé. La teneur en lycopène dans la tomate mûre a augmenté de 48,3% avec l'application de *Rhodopseudomonas* sp. KL9 (Lee *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que *Burkholderia gladii* BA-7, *Pseudomonas* BA-8, et *Bacillus* OSU-142 ont un grand potentiel pour accroître les paramètres de croissance des plantes de *Eruca sativa* (Dursun *et al.*, 2008). Les espèces efficaces de *Bacillus*, comme OSU-142, RC07 et M-13, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *P. putida* RC06 et RC04 et *Rhodobacter capsulatus* peuvent être utilisées dans l'agriculture biologique et durable. Plusieurs études ont clairement démontré le potentiel de ces bactéries dans la croissance et le rendement des plantes (De Freitas, 2000; Herman *et al.*, 2008).

6.2. Germination et émergence

Les PGPR sont en mesure d'exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes telles que l'augmentation du taux de germination des graines. De nombreux travaux ont prouvé que l'utilisation des PGPR telles que *Azospirillum* spp (Rodriguez *et al.*, 2001), *Hafnia alvei* P3 (Vargas *et al.*, 2001), *Pseudomonas* PMZ2 ou avec *B. japonicum* (Zaidi, 2003), *Azotobacter chroococcum* C2 (Basavaraju *et al.*, 2002) et *Azotobacter* sp. 17 et 20 (Reyes *et al.*, 2008) ont donné une meilleure germination des graines de tomates, de poivre, de laitue, du radis, du maïs et des plants de soja. Bien que les études mentionnées sur l'effet des souches bactériennes sur la germination des différentes espèces végétales aient été menées dans des conditions optimales, Kaymak *et al.* (2009) ont suggéré que *Agrobacterium rubi* A16, *Burkholderia gladii* BA7, *P. putida* BA8, *B. subtilis* BA142, *B. megaterium* M3 appliquées sous stress salin pourrait procurer un pourcentage de germination plus élevé. De plus, les PGPR peuvent être employées contre des agents pathogènes. Ainsi, différents souches telles que *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *Brevibacillus brevis* ont servi à traiter des semences afin de supprimer les maladies causées par des champignons phytopathogènes. Ces souches augmentant la germination et

la vigueur des plantules à des taux très élevés ont réduit l'incidence de la mycoflore des semences (Begum *et al.*, 2003). Selon Araujo (2008), l'inoculation des semences avec *B. subtilis* est une technologie prometteuse pour le traitement des semences.

6.3. Enracinement des boutures

Plusieurs facteurs physiologiques et environnementaux influencent la formation des racines, les traitements exogènes des boutures étant particulièrement importants (Couvillon, 1998). Les producteurs ont tenté de stimuler l'enracinement en appliquant diverses substances chimiques comme régulateurs de croissance. Cependant, l'utilisation de produits chimiques peut causer des problèmes environnementaux et augmenter les coûts de la production. Les problèmes écologiques ont suscité l'intérêt des pratiques agricoles durables respectant l'environnement (Salantur *et al.*, 2005). Par conséquent, l'utilisation de PGPR peut palier à ces problèmes liés à l'environnement (Kaymak *et al.*, 2008). Elles appartiennent à plusieurs genres (*Agrobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Alcaligenes*) et induisent la formation de racines et la croissance des boutures (Bassil *et al.*, 1991; Hatta *et al.*, 1996; Rinallo *et al.*, 1999). Dans d'autres travaux, l'utilisation des PGPR comme *A. rubi*, *B. subtilis*, *B. gladii*, *P. putida*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *P. polymyxa*, et *Comamonas acidovorans* ont montré leur efficacité à obtenir des pourcentages élevés d'enracinement des kiwis 40 (Ercisli *et al.*, 2003), de la vigne (Kose *et al.*, 2003), des roses (Ercisli *et al.*, 2004), de la pistache (Orhan *et al.*, 2006), du thé (Erturk *et al.*, 2008) et de la menthe (Kaymak *et al.*, 2008).

6.4. Absorption des nutriments

Les PGPR sont considérées comme une composante pour le maintien de la nutrition adéquate des plantes. Les PGPR pourraient favoriser l'absorption des nutriments, réduire ainsi la nécessité de l'apport d'engrais et prévenir l'accumulation de nitrates et de phosphates dans les sols agricoles (Yang *et al.*, 2009). Le phosphore et l'azote sont les nutriments majeur-clé limitant la croissance des plantes. (Kumar et Narula, 1999; Sundara *et al.*, 2002; Podile et Kishore, 2006). En outre, certaines PGPR améliorent l'absorption de ces éléments nutritifs en favorisant le développement des racines (Mantelin et Touraine, 2004) par la production de phytohormones (Kloepper *et al.*, 2007).

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Localisation des sites de prélèvement

Les souches bactériennes ont été isolées à partir de la rhizosphère et le rhizoplan du blé dur cultivé dans les régions d'El khroub et d'Ain abid (Figure3), de la wilaya de Constantine (Collection de Mme KECHID).

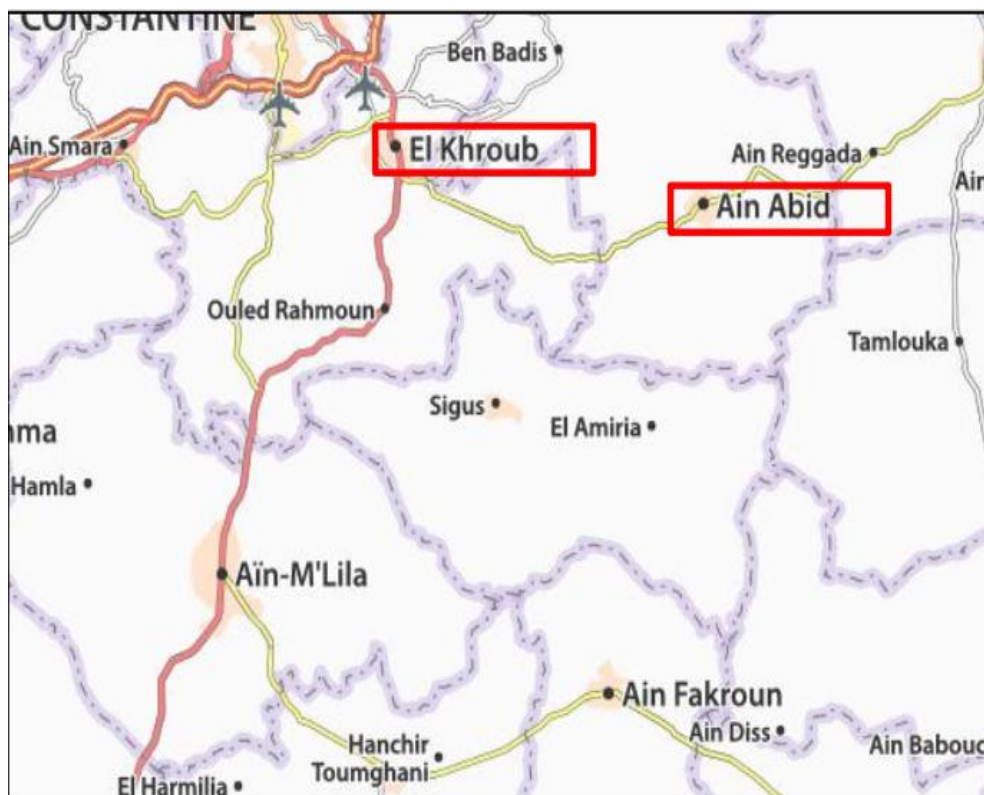


Figure 3: Sites d'isolement des souches du rhizoplan et de la rhizosphère.

2. Matériel biologique

30 souches bactériennes sont isolées à partir de la rhizosphère et le rhizoplan de blé dur (*Triticum durum*): 13 bactéries issues de la région d'El Khroub dont 8 de la rhizosphère et 5 souches du rhizoplan et 17 bactéries de la région d'Ain Abid dont 11 souches du rhizoplan et 6 de la rhizosphère, afin d'étudier les différentes activités des bactéries PGPR et de caractériser leur mode d'action (Tableau 1).

Tableau 1: Différentes souches utilisées.

	Ain Abid	El Khroub
Rhizosphère	AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS6, AS7, AS8, AS9, AS10, AS11	KS1, KS2, KS3, KS4, KS5
Rhizoplan	AR1, AR2, AR3, AR4, AR5	KR1, KR2, KR3, KR4, KR5, KR6, KR7, KR8

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) à Chaabat El rsass, Université Frères Mentouri Constantine 1.

3. Méthodes

3.1. Repiquage des souches

Nous avons ensemencé les 30 souches isolées de la rhizosphère et le rhizoplan des deux régions d'El khroub et d'Ain abid, à partir des tubes eppendorff conservés au glycérol à -80°C. L'ensemencement est réalisé sur des boîtes de Pétri, en surface et en strie sur le milieu gélose nutritive (Annexe 1.1). L'ensemencement est réalisé dans des conditions de travail en asepsie totale, qui consiste à étaler sur la surface de la boîte des stries qui sont faites à l'aide d'une anse de platine stérile, chaque souche est ensemencé sur une boîte de Pétri contenant le milieu Gélose nutritive (Photo 1). Ceci permet d'obtenir des colonies jeunes et séparées. Après l'ensemencement, les boîtes sont fermées et incubées dans une étuve à 28°C pendant 48h.



Photo1 : Boites de Pétri des différentes souches bactériennes utilisées.

3.2. Caractérisation morphologique et phénotypique des souches isolées

Afin de caractériser le Gram et la morphologie des bactéries utilisées, nous avons réalisé une coloration de Gram qui est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Dennis, 2007).

En effet, les colonies de chaque bactéries sont prélevées à partir des boîtes de Pétri, ensuite sont mises sur une lame stérile contenant de l'eau stérile et séchées sur le feu de bec benzen, les frottis sont ensuite mis au contact du violet de gentiane (2 min) puis soumises à l'action du Lugol (30sec), il se forme un complexe colorant qui colore en violet toute la couche en peptidoglycane de la membrane des bactéries. Ces bactéries colorées sont mis à l'action de décoloration en utilisant l'éthanol qui est rajouté goutte à goutte jusqu'à obtention des gouttes claires, seules celles à Gram négatif (présence membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après lavage avec de l'eau et coloration par la Fushine (2 min). Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violette même après l'ajout de Fuschine. L'observation microscopique des échantillons a été faite au microscope optique à faible grossissement (mis en point) et au grossissement 100 (objectif à immersion), qui nécessite l'ajout d'une goutte d'huile de vaseline sur la lame du frottis préparé.

4. Etude des enzymes respiratoires

4.1. Recherche de la catalase

Une suspension bactérienne est mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée. La production des bulles d'air révèle la présence d'une catalase, (Marchall 1982).

4.2. Recherche de l'oxydase: (Indophenol oxydase)

Un disque pour dosage de l'oxydase est imbibé d'eau stérile et mis sur une lame stérile en contact avec les bactéries prélevées d'une colonie à identifier (Photo 2). Les bactéries oxydases positives dégradent le substrat sur le disque et donnent une coloration violette foncée après quelques secondes (Marchall, 1982).



Photo 2: Test d'oxydase

5. Analyse de quelques modes d'action des PGPR

5.1. Solubilisation de la phytate

Nous avons préparé un milieu spécifique (NBRIP) (Annexe 1.2), contenant le phytate comme seule source de phosphore, puis chaque bactérie est ensemencé en strie sur une boîte de Pétri contenant ce milieu. Ce traitement nous permet de voir si la bactérie est capable de dégrader le phytate. Les boîtes sont ensuite, mises dans l'étuve à une température de 28°C jusqu'à deux semaines. Ce test nous permet de sélectionner les bactéries capables de dégrader le phytate via la phytase. Ces bactéries représentent un moyen important pour solubiliser le phytate présent dans le sol et le rendre accessible à la plante.

5.2. Dosage de l'acide Indole acétique (AIA)

Les bactéries sont mises en culture pendant 48h dans le milieu LB liquide contenant 0,5g/L du tryptophane (Annexe 1.4), la croissance est assurée à une température de 28 °C sous agitation (Photo 3). Après croissance, l'absorbance des différentes cultures a été mesurée à une longueur d'onde de 620nm, ensuite les cultures sont centrifugées à 30000 rpm pendant 5 minutes et le surnageant est récupéré.

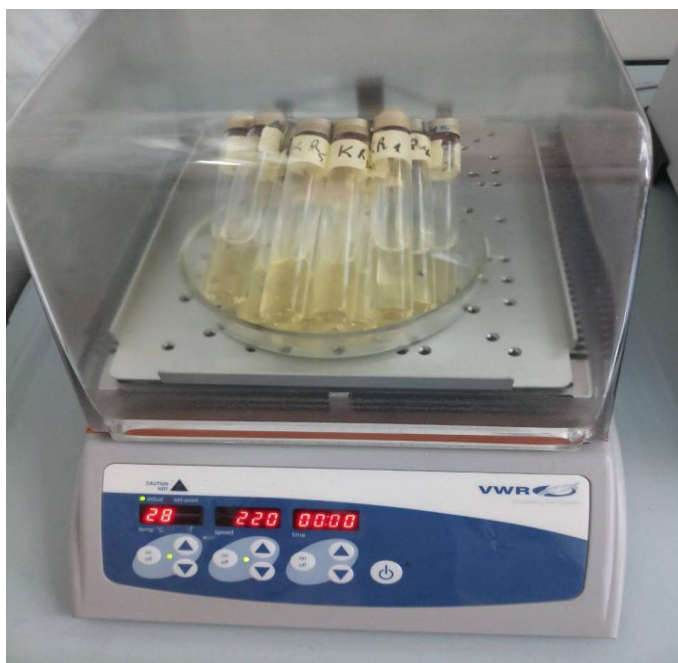


Photo3 : Cultures bactérienne en agitation.

Après récupération du surnageant, 1 ml de celui ci est mélangé avec 1 ml du réactif Salkowski qu'on a déjà préparé (Annexe 1.5), les préparations sont ensuite mises à température ambiante à l'obscurité pendant 20 minutes. L'absorbance de la couleur rose résultante qui indique la production de l'AIA a été lue à 530nm avec un spectrophotomètre. Les valeurs obtenues sont converties en taux d'auxine par le biais d'une courbe d'étalonnage, préalablement établie à partir d'une série de solution de concentration en AIA. Une solution mère d'auxine a été préparée (Annexe 1.6), ensuite une série de dilution est réalisée dans un intervalle de 0 à 20 μ g/ml. La courbe d'étalonnage a été réalisée par l'ajout de 1ml de chaque dilution de l'AIA et 1ml de solution de dosage pour chaque concentration. L'absorbance de ces solutions a été lue à 530nm après 20min d'incubation à l'obscurité.

5.3. Dosage de l'activité nitrate réductase

L'activité nitrate réductase a été détectée par ensemencement des souches en milieu liquide NFB (Nitrogen Free Broth), contenant une concentration de 1g/L de nitrate (Annexe 1.7), Ainsi, des tubes contenant 10 ml du milieu de culture liquide ont été ensemencés avec une colonie bactérienne fraîche de chaque souche. Puis l'ensemble des tubes ont été incubés pendant 2 jours à 28 °C sous agitation, après croissance, l'absorbance des différentes cultures a été mesurée à une longueur d'onde de 620nm. La révélation de la

présence de la nitrate réductase a été réalisée par addition des réactifs Griess 1 et Griess 2 déjà préparé (Annexe 1.8.1 et 1.8.2). L'apparition d'une coloration rose indique que les nitrates ont été réduits en nitrites, la coloration rose indique la présence de nitrite dans le milieu.

Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue. Après ajout du zinc, si le milieu ne change pas de coloration, nous disons que la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase ainsi que la nitrite réductase, par contre l'apparition d'une couleur rose confirme que la bactérie n'a pas la capacité de réduire le nitrate en nitrite donc ne possède pas la nitrate réductase (Beringer, 1974).

Le dosage de nitrite réductase est réalisé sur le surnageant des cultures bactériennes centrifugées à 30000 rpm pendant 5min, nous avons pris 100 µl de surnageant additionné à 1 ml de réactif de Griess 1 et 1 ml de réactif de Griess 2, le dosage de nitrite réduit est mesuré au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540nm, les concentrations finales de nitrite produite sont révélées par le biais d'une courbe d'étalonnage de nitrite qui varie de la concentration 0 à 200µM.

6. Evaluation statistique

Une analyse de la variance (ANOVA) des résultats obtenus sur le dosage d'auxine et la nitrate réductase a été réalisée, afin de valoriser les résultats obtenus, en utilisant le logiciel spécifique Excel Stat 2014. Les groupes homogènes sont donnés par le logiciel Excel Stat 2014 en utilisant le test de Fischer ($\alpha= 0.05$).

Chapitre 3

Résultats et

Discussion

Résultats et discussion

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes ou RFCP (en anglais : PGPR, acronyme de *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) sont des bactéries de la rhizosphère bénéfiques à la croissance et à la santé des plantes. (Haas, 2005).

D'une part, ces bactéries présentent des avantages classiques, documentés depuis de nombreuses années : fixatrices d'azote, elles sont également impliquées dans la synthèse d'hormones, dans la solubilisation de phosphate et aussi dans la chélation de fer.

Cependant, depuis la découverte de ces compétences et de cette implication positive sur la croissance des plantes, plusieurs questions se posent à ce jour quant aux rôles joués par les PGPR dans l'amélioration de la croissance du blé dur.

Sachant que de nombreuses études décrites précédemment ont placé l'importance des interactions entre les PGPR et les céréales au centre de l'intérêt croissant des chercheurs pour la production de bio fertilisants, les interactions entre les PGPR et le blé restent néanmoins les moins étudiées. D'où la nécessité d'étudier ces interactions pour développer ce secteurs de recherche. Au niveau appliqué, l'effet PGPR offre des possibilités intéressantes en bio-agronomie. Mais avant de passer à l'application, il est nécessaire de s'intéresser à l'étude des mécanismes bénéfiques de ces bactéries coopératives.

Notre travail expérimental est divisé en deux parties principales, la première partie consiste à faire une petite caractérisation morphologique et des enzymes respiratoires. Quand à la seconde partie, elle consiste à faire une analyse qualitative et quantitative de certains modes d'action des PGPR.

1. Caractérisation morphologique

L'observation microscopique permet de déterminer la morphologie des cellules d'une espèce bactérienne. Afin de connaître leur morphologie une coloration de Gram est réalisée pour déterminer la forme et le Gram des différentes bactéries. Cette coloration est réalisé systématiquement sur les différentes colonies purifiés pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-.

Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose (Figure 4).

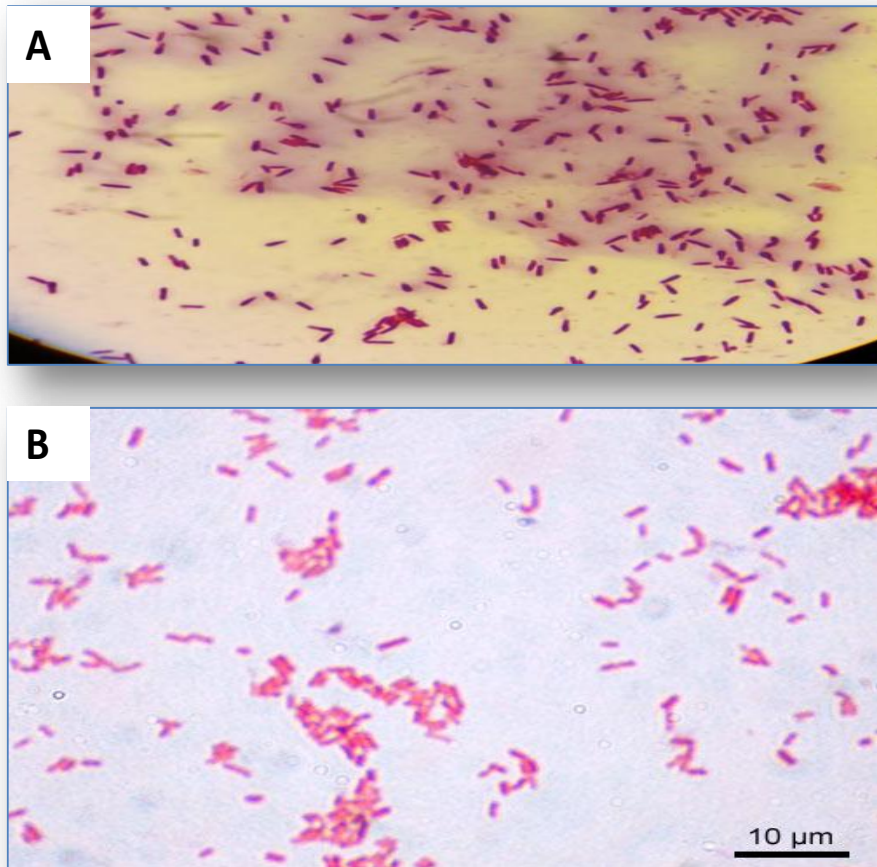


Figure 4 : Coloration de Gram. Gram positif (A), Gram négatif (B).

Les résultats de l'identification préliminaire obtenus après la réalisation de ces tests révèlent qu'il y a une diversité assez remarquable au niveau de leur morphologie. En effet, l'observation au microscope optique (Grossissement 100) montre une diversité dans les formes et tailles des 30 souches.

En effet, l'examen microscopique révèle des souches de plusieurs formes dont bacilles, Cocci, et de forme bâtonnet (Tableau 2 et 3), de même pour le Gram et le mode de disposition (Tableau 2 et 3).

Tableau 2 : Test morphologique des bactéries isolées de la région de Ain Abid.

AIN ABID			
Bactéries	Gram	Formes	Dispositions
AS1	Gram +	Cocci	Isolés
AS2	Gram +	Bâtonnet	Isolés
AS3	Gram +	Coccobacille	Isolés
AS4	Gram +	Bacille	En chaine
AS5	Gram +	Bacille	En chaine
AS6	Gram -	Cocci	Isolés
AS7	Gram +	Cocci	Isolés
AS8	Gram +	Bâtonnet	Isolés
AS9	Gram +	Bâtonnet	Isolés
AS10	Gram -	Coccobacille	En amas
AS11	Gram -	Cocci	En amas
AR1	Gram +	Bacille	Isolés
AR2	Gram +	Cocci	Isolés
AR3	Gram +	Bacille	Isolés
AR4	Gram +	Cocci	En chaine
AR5	Gram +	Bacille	En amas
AR6	Gram -	Cocci	En chaine

Les bactéries à Gram- isolées sont au nombre de 3/30 (Tableau 2) dans la région de AIN abid désignées comme suit :

- 5 souches de rhizosphère (AS10, AS11) (Tableau 2)
- 1 souche du rhizoplan (AR6) (Tableau 2)

Les bactéries à Gram+ isolées de la même région sont au nombre de 13/ 30 désignées comme suit :

- 8 souches de rhizosphère (AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS7, AS8, AS9) (Tableau 2)
- 5 souches de rhizoplan (AR1, AR2, AR3, AR4, AR5) (Tableau 2).

Tableau 3 : Test morphologique des bactéries isolées de la région d'El Khroub.

EL KHROUB			
Bactéries	Gram	Formes	Dispositions
KS1	Gram +	Coccobacille	Isolés
KS2	Gram +	Bacille	Isolés
KS3	Gram -	Bâtonnet	Isolés
KS4	Gram +	Cocci	En chaine
KS5	Gram -	Cocci	En amas
KR1	Gram +	Bâtonnet	Isolés
KR2	Gram +	Bâtonnet	En amas
KR3	Gram +	Bacille	Isolés
KR4	Gram +	Bâtonnet	Isolés
KR5	Gram +	Bacille	En chaine
KR6	Gram +	Bacille	En chaine
KR7	Gram +	Cocci	Isolés
KR8	Gram +	Bacille	En chaine

Les bactéries à Gram- isolées sont au nombre de 2/30 (Tableau3) dans la région d'EL Khroub désignées comme suit :

- 2 souches de rhizosphère (KS3, KS5) (Tableau 3)

Les bactéries à Gram+ isolées de la meme région sont au nombre de 11/ 30 désignées comme suit :

-3 souches de rhizosphère (KS1, KS2, KS4) (Tableau 3)

-8 souches de rhizoplan (AR1, AR2, AR3, AR4, AR5) (Tableau 3).

D'après les tableaux et, les souches isolées de rhizosphère et de rhizoplan des deux régions se répartissent en bacilles Gram positif et négatif et coque à Gram positive et négative et des bâtonnets. Plusieurs études révèlent que le genre *Bacillus* est le plus abondants dans la rhizosphère du blé (Milus et Rothrock 1993; Maplestone et Campbell, 1989), parmi nos souches, plusieurs sont celles qui sont Gram + et bâtonnet ou bacilles comme *Bacillus*, ce qui suggèrent que parmi elles, il y a des *Bacillus*. Ce genre bactérien, porte les caractéristiques suivantes : gros bacilles Gram positif, certain sont mobiles et autres sont immobiles. C'est le genre le plus abondant dans la rhizosphère, l'activité PGPR de certaines de ces souches a été connue depuis plusieurs années (Probanza *et al.*, 2002). Elles sont potentiellement utiles comme agents de lutte biologique (Nagórska *et al.*, 2007) et capables de solubiliser le phosphate, produire de l'AIA, séderophore et antifongique

(Charest *et al.*, 2005). Ces bactéries sont fréquemment retrouvées au voisinage des racines des plantes ou certaines espèces ont un rôle dans la fixation d'azote.

2. Caractérisation des enzymes respiratoires

Pour caractériser une bactérie, il est préférable de connaître son type respiratoire. On trouve la catalase chez tous les organismes aérobies. C'est un cytochrome appartenant à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes.

2.1. Recherche de catalase

Un test de la catalase jugé comme étant positif est observable si des bulles d'air apparaissent après contact des bactéries avec le peroxyde d'oxygénée. Dans le cas contraire, un test négatif ne permet pas de distinguer de réactions provoquant le dégagement d'oxygène. (Photo 4) cette photo présente une réponse nettement positive à ce test, puisque des bulles d'air sont observables dans la goutte de peroxyde ajoutée (Photo prise au cours de notre étude).



Photo 4 : test de catalase positive.

Sur les 30 souches étudiées, 17/30 ont montré une activité catalase positive (Tableau 4), et 13/30 sont des catalases négatifs.

Tableau 4 : Test catalase des bactéries de la région d’El Khroub.

EL KHROUB			
Souches de rhizosphères		Souches de rhizoplan	
Bactéries	Résultats	Bactéries	Résultats
KR1	+	KS1	-
KR2	-	KS2	+
KR3	+	KS3	-
KR4	+	KS4	+
KR5	+	KS5	-
KR6	+		
KR7	-		
KR8	+		

Le tableau 4 présente les résultats de test de catalase de la région d’El Khroub, la plupart des résultats obtenus sont positive, cela permet de confirmer si une bactérie possède l’enzyme de la catalase et donc ayant comme utilité de décomposer le peroxyde d’hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) ainsi qu’en oxygène (O₂). La bactérie qui présente cette caractéristique peut ainsi se protéger du peroxyde d’hydrogène qui est habituellement toxique pour les bactéries aérobies, c’est-à-dire celles qui ont besoin d’oxygène pour proliférer.

Tableau 5 : Test catalase des bactéries de la région de Ain abid.

AIN ABID			
Souches de rhizoplan		Souches de rhizosphères	
Bactéries	Résultats	Bactéries	Résultats
AS1	-	AR1	+
AS2	+	AR2	-
AS3	+	AR3	-
AS4	+	AR4	-
AS5	+	AR5	-
AS6	-	AR6	-
AS7	-		
AS8	+		
AS9	+		
AS10	+		
AS11	+		

D'après le deuxième tableau, toutes les souches de rhizosphère ont une activité catalase négative c'est-à-dire absence de l'enzyme de catalase sauf pour la souche AR1.

2.2. Recherche d'oxydase

Le terme d'oxydase désigne une enzyme recherchée en bactériologie systématique. On dit qu'une bactérie est oxydase + si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylène diamine en semi-quinone (rose violacé). La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique IV : cytochrome-oxydase. Certains bactériologistes préfèrent parler de cytochrome-oxydase plutôt que d'oxydase.

Ce test permet de mettre en évidence l'enzyme cytochrome oxydase des bactéries, un disque est placé sur une lame et une colonie y est déposée avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase+ et elle possède le cytochrome oxydase, les résultats de ce test sur les différentes souches que nous avons est montré dans le tableau 6 et 7.

Tableau 6 : Test d'oxydase des bactéries de la région d'El Khroub.

EL KHROUB			
Souches de rhizosphères		Souches de rhizoplan	
Bactéries	Résultats	Bactéries	Résultats
KR1	-	KS1	-
KR2	-	KS2	-
KR3	-	KS3	-
KR4	-	KS4	+
KR5	-	KS5	-
KR6	-		
KR7	-		
KR8	-		

Tableau 7: Test de catalase des bactéries de la région de Ain Abid.

AIN ABID			
Souches de rhizosphères		Souche de rhizoplan	
Bactéries	Résultats	Bactéries	Résultats
AR1	-	AS1	-
AR2	-	AS2	-
AR3	-	AS3	-
AR4	-	AS4	-
AR5	-	AS5	-
AR6	-	AS6	-
		AS7	-
		AS8	-
		AS9	-
		AS10	-
		AS11	-

On estime que 99% des souches sont (oxydase -), il y a que la souche KS4 qui a présenté un test positif, cela signifie que la majorité des souches sur lesquelles nous travaillons ne possèdent pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

3. Caractérisation des modes d'action des PGPR

Les réponses des bactéries isolées aux différents tests inhérents à la promotion de la croissance végétale permettent la mise en évidence des potentialités naturelles de chaque souche. S'agissant dans cette partie de déterminer quelques propriétés de la bactérie qui affectent positivement la croissance de la plante.

3.1. Solubilisation de phytate

Tout d'abord, un micro-organisme ne pourra pousser sur un milieu ne contenant que les phytates comme seule sources de phosphore, que s'il a une capacité à libérer une phytase extracellulaire ou par l'absorption du phytate a travers la membrane externe et sa déphosphorylation ultérieure dans le cytoplasme (Hill et Richardson, 2007).

La mise en évidence des bactéries capable de dégrader la phytate en forme soluble pour les plantes par le biais de la phytase comme enzyme, a été réalisée sur un milieu contenant le phytate comme seule source de phosphore, la croissance des bactéries sur ce milieu, indique leur capacité à solubiliser la phytate (Photo 5), ce test est un test quantitative.

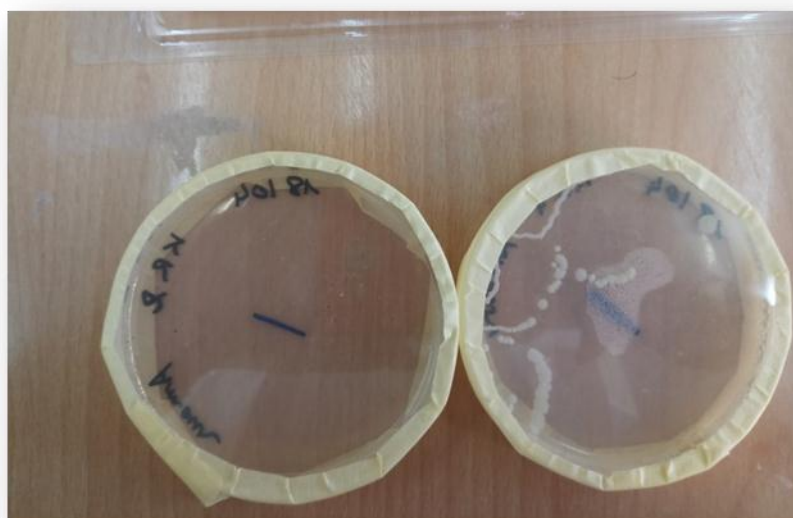


Photo 5 : Test qualitatif de croissance des bactéries sur un milieu contenant le phytate comme seule source de phosphore.

Pour cribler les bactéries de rhizosphère et du rhizoplan capables de dégrader le phytate nous avons ensemencé les 30 souches qui ont déjà poussées sur un milieu solide qui ne contient que le phytate comme source de phosphore. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux ci-dessous, (Tableau 8 et 9)

Tableau 8 : Test qualitatif des bactéries solubilisant la phytate de la région de Ain Abid.

AIN ABID			
Souches de rhizoplan		Souches de rhizosphères	
Bactéries	Résultats	Bactéries	Résultats
AS1	-	AR1	-
AS2	+	AR2	+
AS3	+	AR3	+
AS4	+	AR4	-
AS5	+	AR5	+
AS6	-	AR6	+
AS7	-		
AS8	-		
AS9	-		
AS10	+		
AS11	+		

Parmi les bactéries de la région d'Ain Abid il y a 10 sur 17 souches qui ont pu pousser sur un milieu contenant que le phytate comme source de phosphore (Tableau 8).

Tableau 9: Test qualitatif des bactéries solubilisant la phytate de la région d'El khroub.

EL KHROUB			
Souches de rhizosphères		Souches de rhizoplan	
Bactéries	Résultats	Bactéries	Résultats
KR1	-	KS1	+
KR2	-	KS2	+
KR3	+	KS3	-
KR4	+	KS4	-
KR5	-	KS5	-
KR6	-		
KR7	-		
KR8	-		

Parmi les bactéries de la région d'EL Khroub il y a 4 sur 13 souches qui ont pu pousser sur un milieu contenant que le phytate comme source de phosphore (Tableau 9).

Les résultats obtenus indiquent que la moitié des souches de la rhizosphère et de rhizoplan des deux régions ont pu pousser et ont donc pu dégrader le phytate, et sont donc capables de produire des enzymes appelées *phytases*. Ces enzymes vont permettre de libérer les ions phosphates à partir des *phytates*, et seront ainsi disponibles pour les racines des plantes.

Au vu de leurs propriétés, les bactéries qui solubilisent et minéralisent le phosphore ont un intérêt majeur dans le cadre d'une fertilisation agricole. En effet, une fois introduites dans le sol, elles peuvent tirer parti des réserves en phosphore présentes dans le milieu, en grande partie indisponibles, pour les rendre disponibles pour les plantes. Pour cela, elles solubilisent et minéralisent le phosphore inorganique et organique, et permettent ainsi de libérer des phosphates solubles aux racines.

Ces bactéries se trouvent de manière naturelle dans de nombreux types de sol, mais l'intérêt d'un bio fertilisant est de pouvoir utiliser ces bactéries en les introduisant sur une parcelle en plus grand nombre, pour un effet plus marqué. Leur action entraîne un renforcement des systèmes racinaires des végétaux, une optimisation de l'assimilation du phosphore, et donc une optimisation du développement et du rendement de la culture.

Elles ont par ailleurs bien d'autres propriétés, liées à leur nature de micro-organismes vivants, qui sont aussi bénéfiques pour les plantes : production de phytohormones, structuration du sol, amélioration de l'activité microbiologique du sol, etc.

3.2. Production de l'acide Indole Acétique (AIA)

Les 30 souches bactériennes ont été testées pour leur capacité à produire l'auxine qui est une phytohormone de croissance végétale indispensable au développement des plantes. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle de leur croissance. L'intensité de la couleur rose indique la concentration de l'AIA libéré par les souches bactériennes après addition de réactif de Salkowski aux surnageants (Photo 6). La densité optique a été mesurée à 530 nm et les concentrations de l'AIA ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Annexe 1)



Photo 6 : Résultats de la concentration de l'AIA après ajout de réactif de Salkowski.

Les résultats obtenus ont montré que les quantités d'auxine produites par les souches bactériennes sont proches et varient de 1.33 à 12.70 $\mu\text{g}/\text{Absorbance } 1$ de bactéries au sein de rhizoplan, et de 4.10 à 14.61 $\mu\text{g}/\text{Absorbance } 1$ de bactéries dans rhizosphère de la région d'Ain Abid (Figure 5). Ainsi les souches de la région d'El Khroub, les résultats ont été proches mais avec des quantités faibles varient de 3.40 à 12.16 $\mu\text{g}/\text{Absorbance } 1$ de bactéries au sein de rhizoplan, et de 3.34 à 12.16 $\mu\text{g}/\text{Absorbance } 1$ de bactéries dans la rhizosphère (Figure 5).

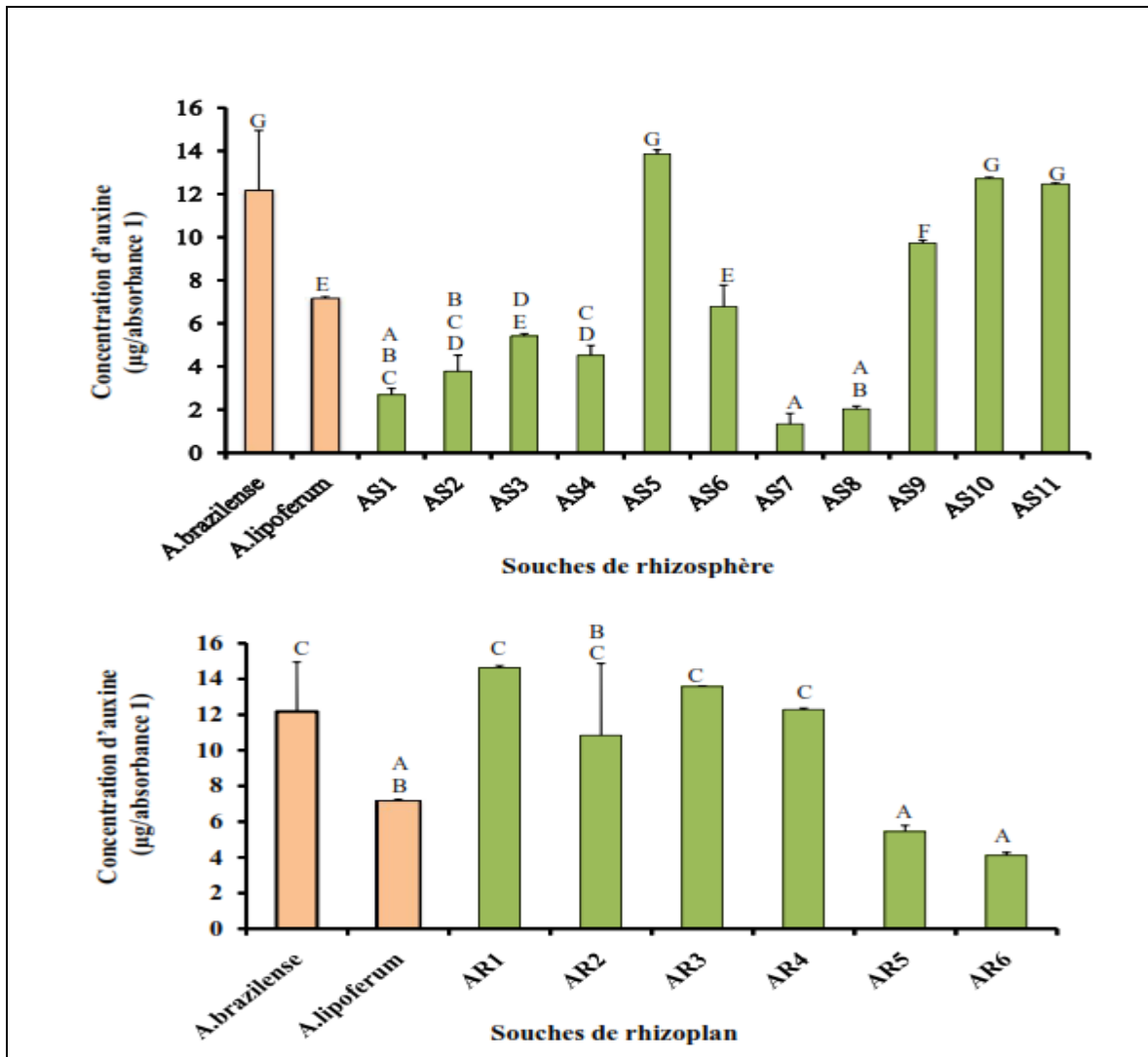


Figure 5 : Concentration d'auxine produite par les bactéries de la région de Ain abid par une absorbance bactérienne égale à 1.

A partir de graphe ci-dessus (Figure 5), il présente les taux d'auxine synthétisés par les différentes souches de la région de Ain Abid, il nous a permis de mettre en évidence la production de cette hormone chez tous les souches, la production d'auxine par ces derniers est variable d'un souches à un autre, en effet l'AIA synthétisé par certain souche de rhizosphère (AS5, AS10 et AS11) avec des concentrations (13.85µg, 12.70µg, et 12.47µg) est presque similaire à notre bactérie témoin *Azospirillum brazilense*, avec une concentration de (12.16µg), ce qui révèlent des bactéries qui produisent fortement l'auxine qui une hormone de stimulation de croissance pour les plantes. Alors que, le reste des souches libèrent des taux très faibles.

D'après Bashan *et al.*, 2004.L'association entre *Azospirillum* et la plante produit des changements morphologiques et physiologiques dans les racines. La bactérie produit des

hormones de croissance, l'acide indole-3 acétique (AIA), qui favorise l'augmentation de la surface des racines, entraînant une augmentation de l'absorption de l'eau et des minéraux. De plus cette association permet la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (jusqu'à 50 kg de N/ha/ans) ce qui favorise la croissance et le rendement des cultures.

On outre, les souches de la région d'El khroub, que ce soit les souches de rhizosphère ou du rhizoplan ont pu produire l'auxine mais avec des quantités insuffisantes par rapport aux souches de la région de Ain Abid et aux témoins. (Figure 6)

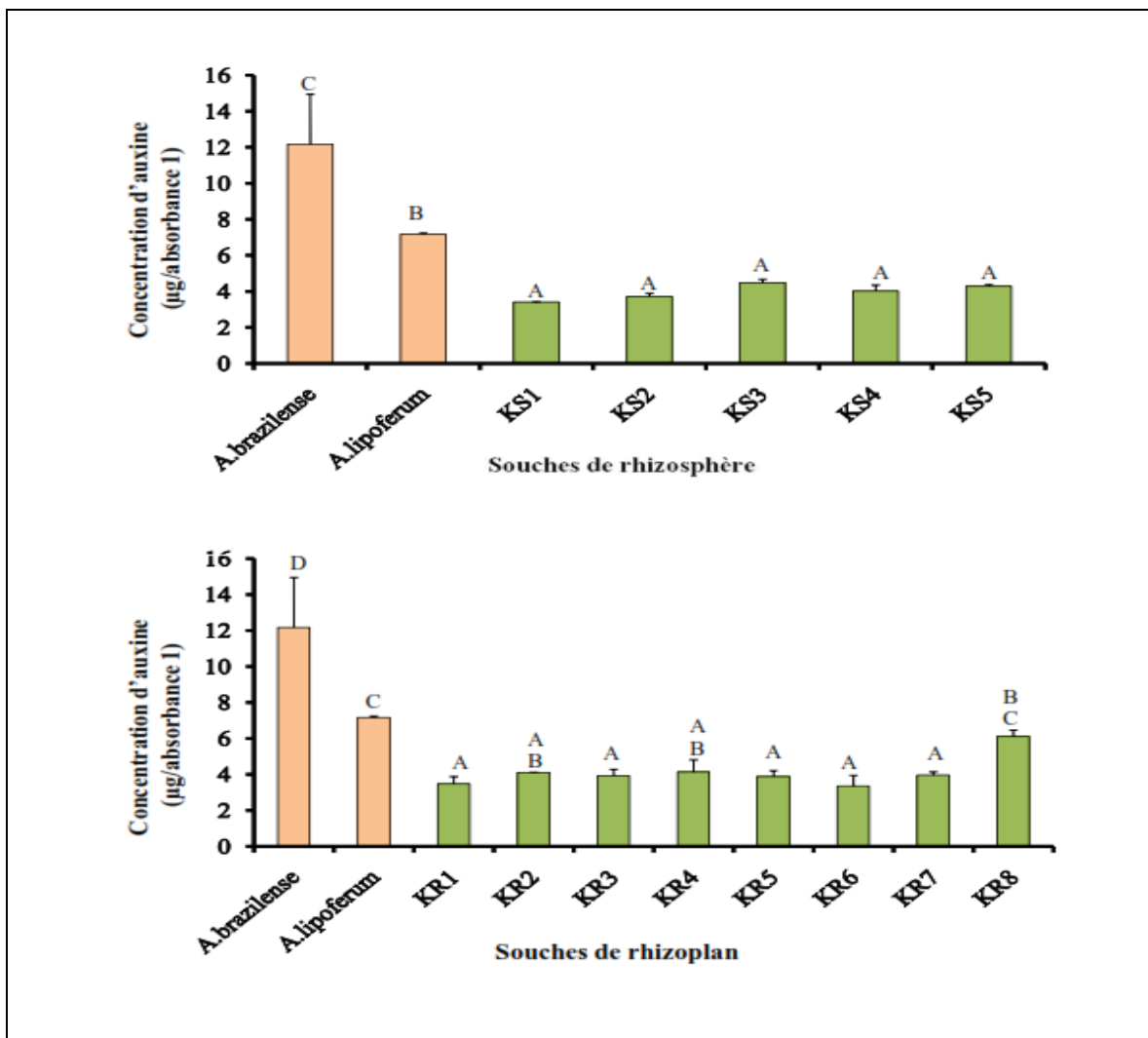


Figure 6 : Concentration d'auxine produite par les bactéries de la région d'El Khroub par une absorbance bactérienne égale à 1.

Les bactéries sécrétant une grande quantité d'auxine soit l'AIA, dans le sol causent une augmentation maximale de la croissance et le rendement des récoltes (Khalid *et al.*, 2004). La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Miraza *et al.*, 2001).

Plusieurs microorganismes ont aussi la capacité de produire des auxines, des gibbérellines et des substances de type kinétines *in vitro* (Brown 1974; Frankenberger et Arshad 1991). Selon ces auteurs, les régulateurs de croissance qui sont produits dans la rhizosphère peuvent être prélevés directement par les racines et stimuler la croissance de la plante. Les quantités produites varient avec le microorganisme impliqué et la présence des précurseurs métaboliques des régulateurs de croissance. La L-tryptophane est le précurseur des auxines chez les microorganismes, dont des *Azotobacter*, des *Azospirillum*, des *Rhizobium*, des *Pseudomonas* et des *Bacillus* spp. En présence d'adénine et d'alcool isopentyle, certains de ces microorganismes produisent des kinétines. Finalement, plusieurs bactéries du sol, dont des *Pseudomonas* spp vont produire de l'éthylène en présence de la -méthionine ou la L-éthionine.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chaiarn et Lumyong (2011), qui ont constaté qu'environ 80 % des bactéries de la rhizosphère peuvent sécréter de l'AIA, cela semble être dû à une forte quantité de matière organique dérivée des racines des plantes et des exsudats radiculaires nécessaire à la croissance bactérienne. Les travaux de Ogbo et Okonkwo (2012), ont montré que la bactérie *Enterobacter* sp produit environ 20µg/ml. Des niveaux élevés de production de l'AIA par des espèces de *pseudomonas* ont été enregistrés dans les travaux de Ahmed *et al.*, (2008a), Kumar *et al.*, (2012), et Kaur et Sharma (2013).

3.3. *Activité nitrate réductase*

La nitrate réductase est une enzyme (ou complexe enzymatique en réalité) qui permet de catalyser la réduction des nitrates. La nitrate réductase permet cette réduction jusqu'au stade diazote (gazeux), mais surtout la réduction des nitrates jusqu'au stade nitrite selon la réaction suivante : $\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$. Les nitrites seront ensuite réduits en ammoniac grâce à la nitrite réductase.

Les nitrites sont ensuite dosés par spectrophotométrie d'absorption moléculaire après diazotation de l'4-amino-2-naphthol sulfonamide (sulfanilamide) en conditions acides avec le

dichlorure de N-(naphtyl-1) diamino-1,2-éthane (N-1-naphtyléthylènediamine) (Slack, 1987 ; Rodier, 1996).

Si le milieu devient d'une couleur rose, cela indique la présence de nitrites. Donc la majorité de nos bactéries testées possèdent la nitrate réductase. Résultat NR+, c'est le résultat signalé pour 23 sur 32 souches (30 souches testées plus 2 souches témoins) et montre que 69.60 % des souches testées possèdent l'enzyme nitrate réductase (Photo 7).

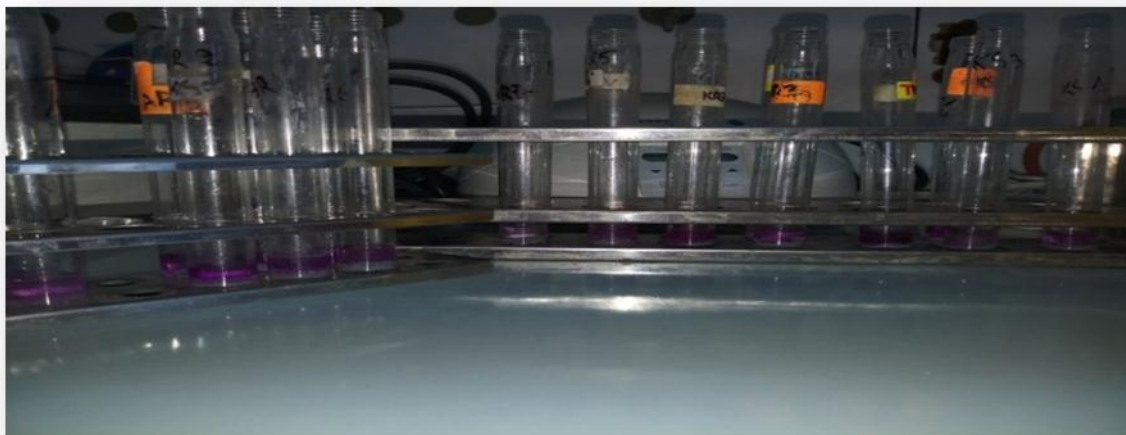


Photo 7 : Résultats de l'activité nitrate réductase après l'ajout des réactifs Griess 1 et Griess 2.

On ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase vis à vis des nitrates pour les tubes incolore NR négatif. Après l'ajout de Zinc si on obtient après quelque minute une :

- coloration rose : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. **Résultat NR-** .
- pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. **Résultat NR +**.

Les résultats de dosage de la nitrate réductase est présentée sur les graphes ci-dessous (Figure 7).

Les résultats obtenus ont montré que les quantités de nitrate produites par les souches bactériennes ont été faibles dans la région d'Ain Abid. Ainsi les souches de la région d'El Khroub, les résultats ont été proches mais avec des quantités plus faibles (Figure 7).

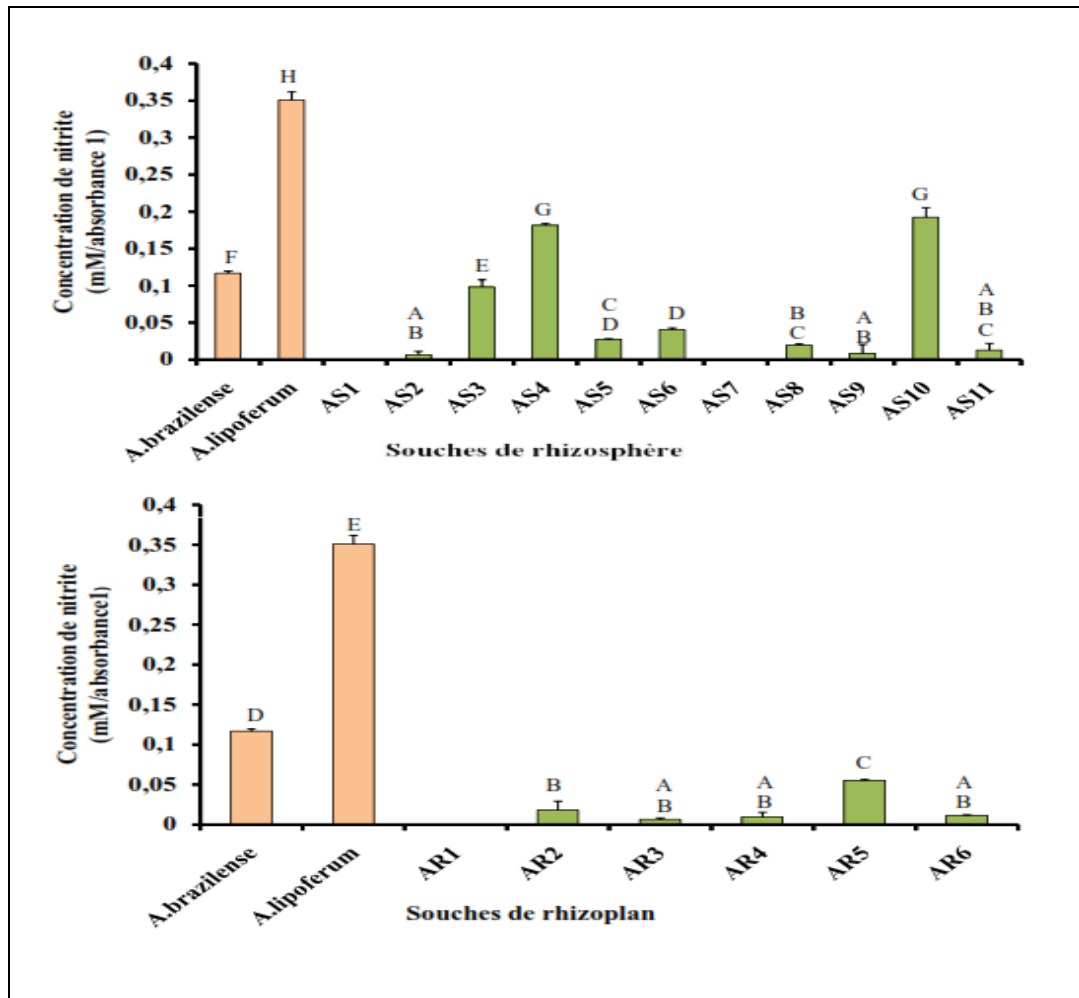


Figure 7 : Concentration de nitrate produite par les bactéries de la région de Ain Abid par une absorbance bactérienne égale à 1.

Il est à constater sur les 2 premiers histogrammes (Figure 7) que les taux de production de nitrate de toutes les souches est nettement inférieur à celles des souches témoins mais on a confirmé qu'il y a une activité nitrate réductase par rapport à la concentration. Mais y avait une petite activité nitrate réductase, et celles présentant une production assez importante sont : AS4 et AS10. Pour les bactéries rhizosphérique et d'une concentration assez faible (AR5) pour les bactéries de rhizoplan.

Beaucoup de bactéries réduisent les nitrates en nitrites. C'est le cas de beaucoup d'entérobactéries dont *E. coli*, des bactéries du genre *Pseudomonas* et de nombreux *Bacillus*. Mais la dénitrification complète conduisant à la libération d'azote gazeux n'est réalisée que par un petit nombre d'espèces comme, par exemple *Thiobacillus denitrificans*. Ceci est en accord avec des résultats obtenus par Tiso et Schechter (2013), qui ont montré que la dénitrification est la réduction des oxydes d'azote en sels d'ammonium, et

inversement, une nitrification, qui, par l'intermédiaire des bactéries du sol, oxyde l'ammoniac NH_3 en nitrites NO_2^- et nitrates NO_3^- .

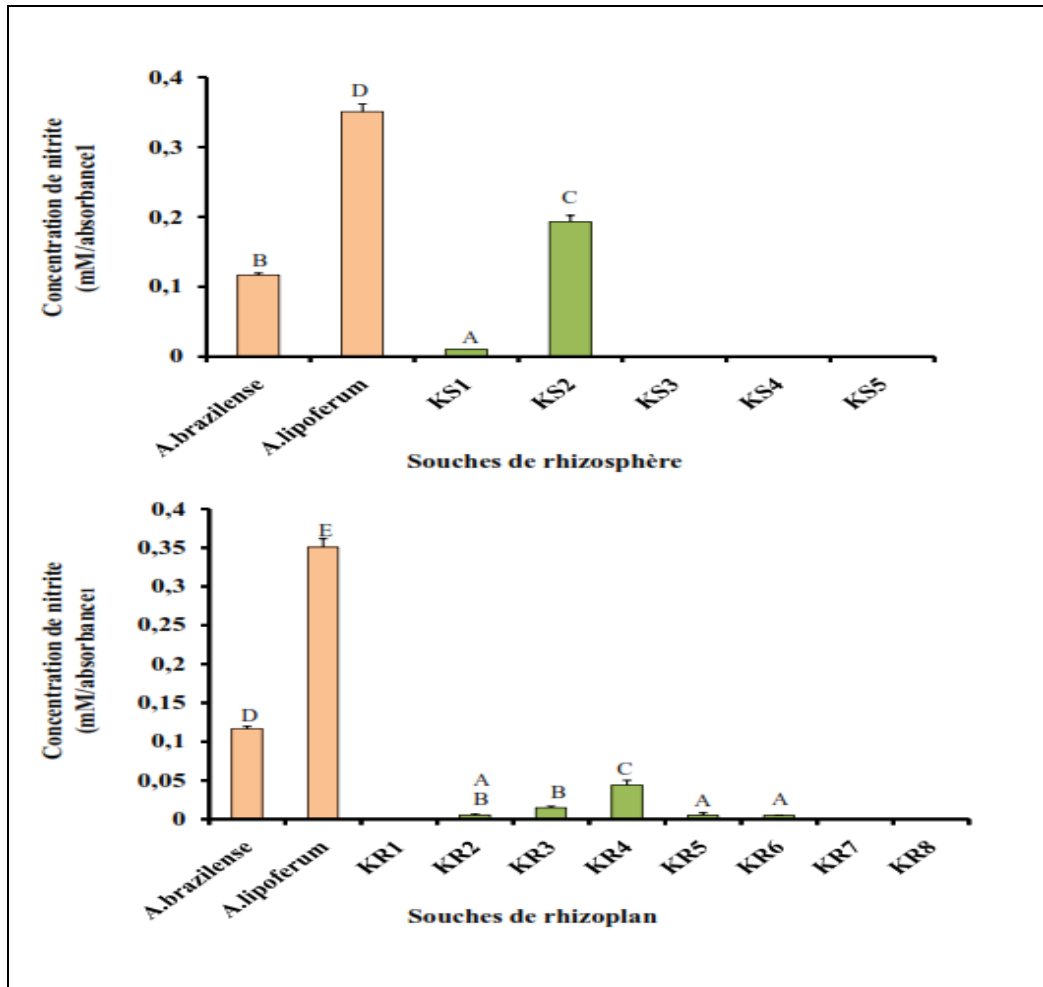


Figure 8 : Concentration de nitrate produite par les bactéries de la région d'El khroub par une absorbance bactérienne égale à 1.

On outre, pour les souches de la région d'El Khroub et d'après les histogrammes ci-dessus (Figure 8), on a estimé que seule la souche KS2 qui a une activité nitrate réductase assez élevée par rapport aux autres souches qui ont une faible activité ou presque n'ont pas d'activité (KS3, KS4, KS5, KR1, KR7, KR8), cela est référant à la croissance des bactéries qui n'ont pas pu pousser dès le début en présence de nitrate.

Conclusion

Conclusion

Par sa richesse naturelle, la rhizosphère est donc un nouveau continent à explorer et c'est à travers de ce modeste travail que nous avons pu découvrir ce merveilleux monde microbien.

La rhizosphère est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les micro-organismes associés, cet environnement particulier comprend une microflore microbienne qui inclut autant des micro-organismes bénéfiques que pathogènes. Certaines bactéries du sol ont la capacité de favoriser le développement des cultures agricoles en stimulant leur croissance à travers la production de métabolites impliqués directement dans leur fonctionnement ou en réduisant les dommages causés par les agents pathogènes. Les bactéries peuvent également influencer la symbiose entre les plantes et d'autres microorganismes co-environnants, stimulant indirectement leur croissance.

En effet, l'ensemble de ces bactéries bénéfiques regroupées sous le terme générique de rhizobactéries, joue un rôle important dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales par divers effets. Certaines agissent par effet direct, d'autres favorisent la croissance des plantes de façon indirecte (PGPR).

Dans cette étude, 30 souches bactériennes déjà isolées et purifiées à partir de la rhizosphère et le rhizoplan de deux régions de la wilaya de Constantine (Ain abid et El khroub), ont été testées. D'abord en caractérisant leurs propriétés morphologiques (Gram, formes des bactéries et leur mode de regroupement), ensuite, une caractérisation des deux types d'enzymes respiratoires a été réalisée (Catalase et Oxydase) et enfin ; nous avons déterminé parmi les 30 souches testées, celles qui ont la capacité de solubiliser la phytate, de produire l'auxine et de réduire la nitrate.

Ainsi la première partie de nos expérimentations, concernant l'identification phénotypique des souches bactériennes a permis de démontrer qu'il existait une diversité entre les bactéries présentes au sein de rhizosphères et de rhizoplan étudiées, la même chose a été observées pour la catalase et l'oxydase, ce qui confirme l'existence d'une diversité au sein de ces populations bactériennes.

La seconde partie de notre travail expérimental qui s'est orientée vers la mise en évidence de quelques modes d'actions des PGPR, a en effet révélé que certaines bactéries étudiées avaient montré leur aptitude à croître dans milieu où la seule source de phosphore est la

phytate, à produire des quantités très élevées d'auxine qui dépassent même celles d'*Azospirillum* et aussi à avoir la nitrate réductase.

Dans la région d'Ain Abid : AS10 est la souche commune la plus performante entre les 3 modes d'action (phytate, auxine et nitrate), et dans la région d'El Khroub : KS2 et KR4 sont les souches communes les plus performantes entre les 2 modes d'action (phytate et nitrate).

Ce travail vise à sélectionner les bactéries qui ont des caractéristiques des PGPR, pour les inoculer ensuite avec le blé dur, afin d'étudier leur capacité à stimuler la croissance du blé dur (*Triticum durum*) et d'améliorer les paramètres de sa croissance. Ces souches, peuvent donc être plus en profondeur étudiées et valorisées, afin d'être utilisées en agriculture et en biotechnologie.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

-Ahmed S.A, Ross S.A, Slade D, Radwan M.M, Khan I.A, ElSohly M.A (2008). Structure determination and absolute configuration of cannabichromanone derivatives from high potency *Cannabis sativa*. Tetrahedron Lett.;49:6050–6053.

-Alam M. S, Z. J.Cui , T. Yamagishi, et R., Ishii (2001). Grain yield and related physiological characteristics of rice plants *Oryza sativa* L. inoculated with free-living rhizobacteria, Plant Prod. Sci. 4:125–130.

-Antoun H, Prévost D (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria.In:

7

Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization, Springer, Dordrecht 1-38.

-Araujo. F.F (2008). Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha d'ostresedeseenvolvimento de milho, soja e algodão. Ciênc.Agrotec.32:456–462

-Arkhipova T.N, E.A. Prinsen, S.U. Veselov, E.V. Martinenko, A.I .Melentiev G.R. Kudoyarova (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. Plant Soil.292: 305–315.

-Arkhipova T.N, S.U Veselov, A.I Melentiev, E.V Martynenko G.R Kudoyarova (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants.Plant Soil.272: 201–209.

-Arzanesh .M. H, Alikhani H. A. , Khavazi K, Rahimian .H. A, Miransari. M (2011). Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. World J Microbiol Biotechnol . 27:197–205.

-Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen., M.R. Ismail., M.A. Hoque., M.Z. Islam ., S.M. Shahidullah et S. Meon (2009). Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth.Afri. J. Biotechnol., 8 : 1247-1252.

- Atzhorn, R., A. Crozier, C.T. Wheeler et G. Sandberg (1988).** Production of gibberellins and indole- 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* 175:532–538
- B. Mori (2009).** Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Boadilla del Monte, Madrid, Espana.
- Basavaraju, O., A.R.M. Rao et T.H. Shankarappa (2002).** Effect of *Azotobacter* inoculation and nitrogen levels on growth and yield of radish (*Raphanussativus* L.). In: Proceedings of Microbial Technology for Sustainable Development and Productivity, (Ed., Rajak D.C.), Jabalpur, Biotechnology of Microbes and Sustainable Utilization, pp. 155-160
- Bashan Y., Holguin G. and de-Bashan L. E (2004).** Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol.* 50:521-577.
- Bassil, NV., WM. Proebsting, LW. Moore et DA. Lightfoot (1991).** Propagation of hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *Hort. Sci.* 26:1058–1060.
- Begum, M., VR. Rai et S. Lokesh (2003).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seedborne fungal pathogens in okra. *Indian Phytopathol.* 56:156–158.
- Beneduzi, A. Ambrosini, A. & Passaglia, Luciane M.P. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*, 35(4Suppl): 1044-1051.
- Beringer, J. E. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84, 188–198.
- Bottini, R., F. Cassanet P. Picolli (2004).** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:497–503.
- Brown, M.E (1974).** Seed and root bacterization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12: 181-197.
- Burdman, S., E. Jurkevitch et Y. Okon (2000).** Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, In: *Microbial Interactions in*

Agriculture and Forestry. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.

-Burdman, S., E. Jurkevitch et Y. Okon (2000). Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, In: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.

-Cakmakci, R., F. Kantar et F. Sahin (2001). Effect of N₂-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164:527–531

-Cattelan, A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am.* J63(6): 1670-1680.

-Chaiharn, M., Lumyong, S (2011). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth *Curr. Microbiol.*, 62 (1) (2011), pp. 173-181.

-Charest. MH, Beauchamp. CJ, Antoun. H (2005). Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology.* 52: 219-227.

-Chelius MK, EW. Triplett (2000). Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:783–787.

-Costacurta, A., et J. Vanderleyden (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1–18.

-Couvillon, GA (1998). Rooting Responses to Different Treatments. *Acta Hort.* 227: 187-196.

-De Freitas, JR (2000). Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticum aestivum* L., var. Norstar) inoculated with rhizobacteria. *Pedobiologia* 44:97–104.

-Denis F., M-C Poly., C Martin., E Bingen., Rquentin (2007). Bactériologie médicale, techniques usuelles .MASSON, Cedex. P333-335.

- Dobbelaere, S, J. Vanderleyden et Y. Okon (2003).** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22:107–149
- Dobereiner, J (1997).** Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.* 29:771–774.
- Dong Y, AL. Iniguez et EW. Triplett (2003).** Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 257:49–59
- Downes, BP., CR. Steinbaker, DN. Crowell (2001).** Expression and processing of a hormonally regulated b-expansin from soybean. *Plant Physiol* 126:244–252
- Dursun, A., M. Ekinci et MF. Donmez (2008).** Effects of inoculation bacteria on chemical content, yield and growth in rocket (*Erucavesicaria subsp sativa*). *Asian J Chem.* 20:3197–3202
- Ercisli, S., A. Esitken, R. Cangiet F. Sahin (2003).** Adventitious root formation of kiwifruit in relation to sampling date, IBA and *Agrobacterium rubi* inoculation. *Plant Growth Regul.* 41:133–137.
- Ercisli, S., A. Esitken et F. Sahin (2004).** Exogenous IBA and inoculation with *Agrobacterium rubi* stimulate adventitious root formation on hardwood stem cuttings of two rose genotypes. *Hort. Sci.* 39:533–534
- Erturk, Y., S. Ercisli, R. Sekban, A. Haznedaret MF. Donmez (2008).** The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of tea (*Camellia sinensis* var. *Sinensis*) cuttings. *Roum. Biotechnol. Lett.* 13:3747–3756
- Esitken, A, S. Ercisli, H. Karlidaget F. Sahin (2005).** Potential use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in organic apricot production. In: Libek A., Kaufman E., Sasnauskas A. (eds) International conference on environmentally friendly fruit growing. Tartu, Estonia, pp 90–97.
- Ezawa, T., SE. Smith et FA. Smith (2002).** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, 244: 221–230.

- Figueiredo, VB., Burity HA., Martinez CR., Chanway CP. (2008).** Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacilluspolymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* 40:182–188
- Fischer Sonia .E, Edgardo. C. Jofre´ ,Paula V. Cordero , Francisco J. Gutie´rrez Manero ,Gladys Hill, J.E., Richardson, A.E. (2007).** Isolation and assessment of microorganisms that utilize phytate. Chap. 5. *In* Inositol phosphates: linking agriculture and the environment. *Edited by* B.L. Turner, A.E. Richardson, and E.J. Mullaney.
- Frankenberger, W.T., Jr. M. Arshad (1991).** Microbial production of plant growth regulating substances in soil. Pages 162-171 in C. Keel, B. Koller et G. D efago (r eds.), *Plant growth-promoting rhizobacteria— progress and prospects.* IOBC/WPRS Bull. XIV/8.
- Garc ia Lucas, J.A., Schloter, M., Durkaya, T., Hartmann, A. Gutirrez-Maero, F.J (2003).** Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *BiolFertil Soils* 37(6): 381-385.
- Glick , B.R., C.B. Jacobson, M.M.K. Schwarze et J.J. Pasternak (1994) .1-** Aminocyclopropane1- carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.*40:911–915.
- Glick, B.R (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41: 109-117.
- Glick., B.R., D.M. Penrose et L. Jiping (1998).** A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63–68.
- Graham, P. H (1988).** Principles and Application of Soil Microbiology, pp: 322–345.
- Gutierrez-Manero, FJ., B. Ramos, A. Probanza, J. Mehouchi, M. Talon (2001).** The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant* 111:206–211
- Gyaneshwar, P., GN. Kumar, LJ. Parekh, PS. Poole (2002).** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants.*Plant Soil.* 245(1):83-93.

-Haas, D. (10 février 2005). « *Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads.* », *Nature Reviews*,

-Haas, D., et G. Défago (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microb.* 1129.

-Hatta, M, CA. Beyl, S. Gartonet AM. Diner (1996). Induction of roots on jujube softwood cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Hort. Sci.* 71:881–886

-Hecht-Buchholz, C (1998). The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixing bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonleguminous plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 161:509–520.

-Herman, MAB., BA. Naultet CD. Smart (2008). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Prot.* 27:996–1002.

-Hiltner, L. (1904). Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. *Arb DLG* 98, 59–78.

-Holguin, G., et B.R. Glick (2001). Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.* 41:281–288.

-Idris, A.H., N. Labuschagne et L. Korsten (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control.* 40:97–106.

Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, **237**:47–54.

-Ivanova, E.G., N.V. Doronina et Y.A. Trotsenko (2001). Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiol.*, 70: 392–397.

-Joo, GJ., SM. Kang, M. Hamayun, Na. CI. Kim, DH. Shin et IJ. Lee (2009). *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *J. Microbiol.* 47:167–171

- Jourdan, E., Ongena, M, Thonart, P (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *BASE*12(4) : 437-449.
- Kaur Mandeep, Sharma H.K (2013).** Effect of enzymic treatment on carrot cell wall for increased juice yield on effect of physiochemical parameters. *African journal of plant science* 7(6): 234:243.
- Kaymak, HC., F. Yarali, I. Guvenc et MF. Donmez (2008).** The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. *Afr. J. Biotechnol.* 7:4479–4483
- Kaymak, HC., I. Guvenc, F. Yarali et MF. Donmez (2009).** The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turk J Agric Forest*, 33:173–179
- Khalid, A., M.Arshad. et Z.A. Zahir (2004).** Screening plant growth-promoting Rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, **96**: 473-480(8).
- Kloepper JW, A. Gutierrez-Estrada et A. McInroy (2007).** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.*53:159–167.
- Kloepper, J.W. (1992).** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Pages 255-274 in B. Metting (éd.), *Soil microbial technologies*. Marcel Dekker, New York.
- Kloepper, J.W., R. Rodríguez-Kàbana, J.A. McInroy et R.W. Young (1992).** Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant Soil* 139: 75-84.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. & Zhang, S.A. (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11):1259-1266.

- Kokalis-Burelle, N., EN.Vavrina, EN. Roskopf RA Shelby (2002).** Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil*, 238:257–266.
- Kose, C, M. Guleryuz, F. Sahnet I. Demirtas (2003).** Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting of grapevine rootstocks. *ActaAgrobot* .56:47–52.
- Kucey, R.M.N., H.H. Janzen et M.E. Legget (1989).** Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199–228.
- Kumar A, Devi S, Payal C , Negi S (2012).** Isolation ,screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities :in vitro study. *Recent Res Sci Technol.* 4(1): 1-5.
- Kumar, V. et N. Narula (1999).** Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacterchroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils*, 28(3):301-305
- Lee, KJ., S. Kamala-Kannan, HS. Sub, CK. Seonget GW. Lee (2008).** Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annum* L) using *Bacillus subtilis*.*World J. Microb.Biot.*24:1139–1145.
- Loper, J.E et M.N. Scroth (1986).** Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, 76: 386-389.
- Lucy M, E. Reed et BR. Glick (2004).** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 86:1–25.
- Lugtenberg. B, Chin-A-Woeng. T, Bloemberg. G (2002).** Microbe-plant interactions: principles mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:373–383
- MacMillan, J (2002).** Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria.*J. Plant Growth Regul.*20, 387-442.
- Mantelin, S. et B. Touraine (2004).** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55:27–34

- Miraza, M S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et KA. Malik (2001).**
- Mitter, N., AC. Srivastava, AS.Renu, AK. Sarbhoyet DK. Agarwal (2002).** Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* 153:187–193.
- Nagorska.K, Bikowski.M, Obuchowski.M (2007).** Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrôle agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54: 495-508.
- Narula, N., A. Deubel, W. Gans, RK.Behlet W. Merbach (2006).** Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ.*, 52: 119–129.
- Nester, EW., MP. Gordon, RM. Amasinoet MF. Yanofsky (1984).** Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:387–413.
- Nieto KF. et WT. Frankenberger (1989).** Biosynthesis of Cytokinins in Soil. *Sci. Soc. Am. J.* 53 (3): 735-740.
- Ogbo, Frank, and Julius Okonkwo (2012).** “Some Characteristics of a Plant Growth Promoting Enterobacter Sp. Isolated from the Roots of Maize”(September): 368–74.
- Oldroyd, GE., EM. Engstrom, SR. Long (2001).** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell.*13:1835–1849.
- Orhan, E, A. Esitken, S. Ercisli, M. Turan et F. Sahin (2006).** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hortic* 111:38–43.
- Parray J., A., Jan S., Kamili A.,N., Qadri R., A. (2015).** Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul*121 : 325-334.
- Paul, D., et S. Nair (2008).** Stress adaptations in a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *J. Basic. Microbiol.* 48(5):378–384.

- Paula García-Fraile, Esther Menéndez, Raúl Rivas (2015).** Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering* 2(3): 183-205.
- Penrose, D.M. et Glick BR (2001).** Levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in exudates and extracts of canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. *Can. J. Microbiol.*47:368–372.
- Podile, AR. et GK. Kishore (2006).** Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-associated bacteria: rhizosphere bacteria*. Springer, Netherlands, pp 195–230
- Pradhan, N. et LB. Sukla (2005).** Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol.* 5(10): 850-854.
- Probanza.A et Lucas Garcia.JA, (2002).** Pinus pineal seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus*. *Applied Soil Ecology*, 20: 75-84.
- Raaijmakers, J.M., M.Vlamiet J.T. de Souza (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 537-547
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raghuchander, V. Prakasamet R. Samiyappan (2001).** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20:1–11.
- Ramirez, LEF., JC. Mellado (2005).** Bacterial biofertilizers. In: Siddiqui ZA (ed) *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 143–172.
- Rawat.S, Mushtaq. A (2015).** Plant growth promoting rhizobacteria , a formula for sustainable agriculture: A review. *Asian Journal of Plant Science and Research* 5 (4), 43-46
- Reyes, I., L. Alvarez, H. El-Ayoubiet A. Valery (2008).** Selection and evaluation of growth promoting rhizobacteria on pepper and maize.*Bioagro.*20:37–48.
- Rinallo, C., L. Mittempergher, G. Frugiset D. Mariotti (1999).** Clonal propagation in the genus *Ulmus*: improvement of rooting ability by *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes.*J. Hortic. Sci. Biotech.* 74:502–506.

-Rodier. J, Bazin .C, Broutin J. C, Chambon. P, Champsaur. H, Rodi .L (1996), L'analyse de l'eau. 8 ème édition, Dunod, Paris, 1383 pp.

-Rodriguez, MN., RD. Villalonga, RAJ. Castillo, AJL. Marques, LR. Gonzalez, SP. Llaneset FM. Peguero (2001). Influence of application of a biofertilizer based on Azospirillum on germination of seed and production of vegetable crops. Centro Agricola 28:38–41.

-Ryu, R. et C.L. Patten (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4TyrR in Enterobacter cloacae UW5. Am. Soc. Microbiol., 19: 1-35.

-Sahin F, R. Cakmakci F. Kantar (2004). Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. Plant Soil, 265:123–129.

-Salantur A, A. Ozturk, S. Akten, F. Sahinet F. Donmez (2005). Effect of inoculation with nonindigenous and indigenous Rhizobacteria of Erzurum (Turkey) origin on growth and yield of spring barley. Plant Soil, 275:147–156.

-Salisbury, FB.et CW. Ross (1992). Plant physiology. Wadsworth, Belmont, CA.

-Saxena, A.K et KVBR. Tilak (1998). Free-living nitrogen fixers: Its role in crop production. In : Microbes for Health, Wealth and Sustainable Environment, Malhotra Publ Co, New Delhi. Edited by Verma AK, 25–64.

-Sharma, K., G. Dak, A. Agrawal, M. Bhatnagar R. Sharma (2007). Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of Cicer arietinum seed sand seedling growth. J. Herb. Med. Toxicol., 1: 61-63.

-Slack P. T (1987), Analytical methods manual. 2nd edition, British Food Manufacturing Industries Research Association, Leatherhead

-Subbarao, N.S (1988). Phosphate solubilizing micro-organism. In: Biofertilizer in agriculture and forestry. Regional Biofertilizer Development Centre, Hissar, India, pp 133–142.

- Sundara, B., V. Natarajan, K. Hari (2002).** Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane yields. *Field Crops Res.* 77:43–49.
- Susana. L, Maruri-Avidal. L, Arias .CF (2008).** Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J. Virol.* 82:5368–5380
- Susana. L, Montero .H, Rojas .M, Arias .CF (2008).** Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82:1496–1504
- Suslow, T.V (1982).** Rôle of root-colonizing bacteria in plant growth. Pages 187-222 in M.S. Mount et G.H. Lacy. (réds.), *Phytopathogenic prokaryotes*. Vol. 1. Académie Press, New York.
- Tien, T.M, M.S. Gaskin, D.H. Hubbel (1979).** Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Micro.*, 37(5): 1016-1024.
- Timmusk SNS., B. Nicander, U. Granhallet E. Tillberg (1999).** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 31:1847–1852.
- Tsakelova, EA., SY. Klimova, TA. Cherdyntseva, AI. Netrusov (2006).** Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42:117–126
- Vacheron, J., Desbrosses, G Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Locco, Y., Muller, D. (2013).** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning, *Front Plant Sci.* 4(356): 1-19.
- Van Loon, LC., PA. Bakker et CM. Pieterse (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453–483.
- Van Loon, LC., PBJ. Geraatset HJM. Linthorst (2006).** Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 11:184–190
- Vargas, DP, R. Ferrera-Cerrato, JJ. Almaraz-Suarez, AG. Gonzalez (2001).** Inoculation of plant growth-promoting bacteria in lettuce. *Terra* 19:327–335.

- Verma, SC., JK.Ladhaet AK. Tripathi (2001).** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91:127–141
- Vessey, J.K (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571–586.
- Weller, D. M (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407
- Whitelaw, M.A (2000).** Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69:99–151.
- Williams, PM., M. Sicardi de Mallorca (1982).** Abscisic acid and gibberellin-like substances in root nodule of *Glycine max.* *Plant Soil* 65: 19-26.
- Yang, J., JW. Kloepper, CM. Ryu (2009).** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14:1–4.
- Zaidi, SFA (2003).** Biocontrol of *Fusarium oxysporium* by plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in soybean. *Ann. Agr. Res.* 24:676–678.

Annexes

Listes des annexes

Annexe 1: composition des milieux de cultures

1. La gélose nutritive:

Extrait de viande	1g/L
Extrait de levure	2.5g/L
Peptone	5g/L
Nacl	5g/L
Agar	15g/L
PH	7

2. Milieu NBRIP:(National Botanical Research Institute's phosphate)

Glucose	30g/L
Mgcl ₂	15g/L
MgSO ₄	0.75g/L
Kcl	0.6g/L
NH ₄	0.3g/L
Agar	15g/L
PH	7

3. Solution phytate (rajouté dans le milieu NBRIP par filtration):

Phytate	3g
Eau distillée	9ML

4. Milieu LB liquide:

Tryptophane	10g/L
Extrait de levure	5g/L
Nacl	5g/L
Agar	15g/L
PH	7

5. Réactifs de Salkowski :

Eau distillée	27.8ML
H ₂ SO ₄	22.2ML
FeCl ₃	0.6g

6. Solution d'auxine:

Eau distillée	50ML
Auxine	0.2g

7. Milieu NFB « Nitrogen Free Broth »

Eau distillée	500mL
Acide malique	2.5g
K ₂ HPO ₄	0.25g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1g
NaCl ₂ 2H ₂ O	0.01g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.005g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.002g
Fe EDTA	0.0325g
CaCl ₂	0.01g

KNO ₃	0.5g
PH	6.8

8. Solution de dosage de nitrite:

8.1. Solution A:

Eau distillée	43.75ML
Solution Hcl	6.25ML
N-(1Naphyle) ethylènediamine	0.01g

8.2. Solution B:

Eau distillée	43.75ML
Solution Hcl	6.25ML
Acide sulfanique	0.5g

Intitulé : Caractérisation de quelques modes d'action des PGPR chez 30 souches bactériennes isolées de la rhizosphère et le rhizoplan du blé dur

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biotechnologie et génomique végétale

Résumé

Les rhizobactéries jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre du sol, parmi ces bactéries, il y a celles qui ont montré leur capacité à favoriser la croissance des plantes, elles sont connues sous le terme de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), elles agissent positivement sur la croissance de la plante, en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à caractériser 30 souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère et le rhizoplan de blé dur (*Triticum durum*), à partir des deux régions de l'est algérien (El Khroub et Ain Abid de la wilaya de Constantine). D'abord, nous avons commencé par caractériser les propriétés morphologiques et phénotypiques des souches isolées. La caractérisation de leurs enzymes respiratoires a été également réalisée et finalement la mise en œuvre de quelques modes d'actions de ces bactéries comme leur capacité à produire des auxines, à solubiliser la phytate et à dégrader la nitrate. Les résultats obtenus nous ont servi de sélectionner et de classer les bactéries les plus performantes pour stimuler la croissance de la plante.

Mots clés : PGPR, rhizosphère, rhizoplan, blé dur.

Laboratoire de recherche : Biochimie, Génétique et Biotechnologies Végétales

Jury d'évaluation :

Président du jury :	BENABDOUN F. M.	(M.C.B – SNV UFM Constantine I).
Rapporteur :	KECHID M.	(M.C.B – INATAA UFM Constantine I).
Examineur :	TEMAGOULT M.	(M.A.A - SNV UFM Constantine I).

Date de soutenance : 25/06/2018