

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DJILALI LIABES

FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES

Département de Biologie

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par: DJEBBARI FARIDA

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biotechnologie Microbienne

Intitulé

*Etude de l'activité de production de
phytohormones par quelques souches
de PGPR diazotrophes*

Devant le jury composé de :

Président : M' ABBOUNI. B (Professeur, Univ_UDL_SBA)

Examineur: M' BENINE. M (MCA, Univ_UDL_SBA)

Examinatrice : M^{me} KANOUN. K(MCA, Univ_UDL_SBA)

Encadreur : M^{me} GHALEM. M (MCB, Univ_UDL_SBA)

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciements

Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire

Tout d'abord, je remercie mon encadreur Mme GHALEM.M Maitre de conférence de conférence.B pour la qualité de son encadrement exceptionnel, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire.

Mes vifs remerciement à notre responsable de spécialité biotechnologie microbienne et président du jury Mr.ABBOUNI.B Professeur A l'UDL de Sidi Bel Abbes.

J'exprime également mes sincères remerciements à Mr.BENINE.M maitre de conférence.A et Mme. KANOUN.K Maître de conférences A. pour l'intérêt qu'ils ont porté a ce travail et pour avoir accepté de le juger.

Enfin je remercie le responsable du laboratoire microbiologie appliquée pour m'avoir accueilli et de m'avoir fourni tout les moyens nécessaires afin de mener a bien ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui

Particulièrement à mes parents qui m'ont soutenu durant ces années d'études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mes deux sœurs sources de joie et de bonheur ; qui m'ont toujours conseillé, encouragé et soutenu tout au long de mes études.

A mes amies qui m'ont toujours encouragé et à toute personne que je porte dans mon cœur.

Résumé

La production de phytohormones est une propriété importante des bactéries de la rhizosphère qui stimulent et facilitent la croissance des plantes. L'objectif de la présente étude est la détermination des caractéristiques phénotypiques et biochimiques des PGPR diazotrophes isolés à partir des plantes de blé dur, l'évaluation de leur potentiel PGP ainsi que la sélection du meilleur candidat pour l'optimisation de ces paramètres de production de l'acide indole acétique et son identification.

L'étude a été faite sur 9 isolats sélectionnés selon leur capacité à fixer l'azote. L'ensemble des isolats se montrent capables de produire le NH_3 , de solubiliser le phosphate et de produire l'acide indole acétique. L'isolat ayant manifesté le meilleur potentiel de production a fait l'objet d'une optimisation pour la production de l'acide indole acétique. Il s'agit de l'isolat PIA.

L'optimisation de la composition du milieu de culture a révélé que la source de carbone et d'azote les plus favorables pour la production de l'acide indole acétique sont le glucose et la peptone, respectivement. La production atteint un maximum au 6^{ème} jour d'incubation. Les concentrations les plus élevées d'acide indole acétique ont été produites à des concentrations de NaCl 2% et de L-Tryptophane 0.7%. Les résultats ont montré que le pH=9 et la température d'incubation de 30°C sont les conditions optimales pour la production de l'acide indole acétique. L'agitation favorise également la production de l'AIA.

L'isolat PIA a été identifié par les galeries Api 20 E et 50 CH comme étant *Azotobacter Armeniacus* (avec un score d'identification de **99.94%**)

Mots clés : PGPR, blé dur, acide indole acétique, NH_3 , solubilisation du phosphate, Optimisation, tryptophane.

Abstract

The production of phytohormones is an important property of rhizosphere's bacteria which stimulate and facilitate plant growth. The objective of the present study is to determine the phenotypic and biochemical characteristics of diazotrophic PGPRs isolated from durum wheat plants, the evaluation of their PGP potential as well as the selection of the best candidate for the optimization of these production parameters. of indole acetic acid and its identification.

The study was carried on 9 isolates selected for their ability to fix nitrogen. All the isolates have shown ability to produce NH_3 , to solubilize phosphate and to produce indole acetic acid. The isolate with the best production potential was chosen for the optimization of indole acetic acid production. It's the PIA isolate.

Optimization of the culture medium composition revealed that the most favorable carbon and nitrogen source for the production of indole acetic acid are glucose and peptone, respectively. Production reaches a maximum on the 6th day of incubation. The highest concentrations of indole acetic acid was produced at concentrations of 2% NaCl and 0.7% l-tryptophan. The results showed that the pH = 9 and the incubation temperature of 30 ° C are the optimal conditions for the production of indole acetic acid. The agitation seems increase production rate.

The PIA isolate was identified by the API 20 E and API 50 CH system as *Azotobacter Armeniacus* with an identification score of **99.94%**.

Key words: PGPR, durum wheat, indole acetic acid, NH_3 , phosphate solubilization, Optimization, tryptophan.

ملخص

يعد إنتاج الهرمونات النباتية خاصة مهمة لبكتيريا نطاق الجذور التي تحفز وتسهل نمو النبات. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد الخصائص المظهرية والكيميائية الحيوية لـ PGPRs ثنائية التغذية المعزولة من نباتات القمح القاسي ، وتقييم إمكانات PGP الخاصة بهم وكذلك اختيار أفضل مرشح لتحسين معايير إنتاج حمض الإندول الخلي وتحديده.

أجريت الدراسة على 9 عزلات تم اختيارها لقدرتها على تثبيت النيتروجين. تبين أن جميع العزلات قادرة على إنتاج NH_3 ، إذابة الفوسفات ، وإنتاج حمض الإندول الخلي. تم اختيار العزلة ذات أفضل إمكانات إنتاج حمض الإندول الخلي. أنه عزل PIA

أظهر تحسين تركيبة وسط الاستزراع أن أكثر مصادر الكربون والنيتروجين ملائمة لإنتاج حمض الإندول الخلي هي الجلوكوز والبيتون على التوالي. يصل الإنتاج إلى الحد الأقصى في اليوم السادس من الحضانة. تم إنتاج أعلى تركيزات من حمض الإندول الخلي بتركيزات 2% كلوريد الصوديوم و 0.7%. تريبينوفان. أظهرت النتائج أن درجة تحميص الوسط 9 ودرجة حرارة الحضانة 30 د° هي الظروف المثلى لإنتاج حمض الإندول الخلي. يبدو أن التحريك له تأثير ايجابي علي تصنيع حمض الإندول الخلي.

تم تشخيص عزلة PIA بواسطة E 20 API و CH 50 على انها *Azotobacter Armeniacus* بمعدل تطبيق مساوي لـ 99.94%.

الكلمات المفتاحية: PGPR ، القمح القاسي ، حمض الإندول الخلي ، NH_3 ، إذابة الفوسفات ، التحسين ، التربتوفان.

LISTE DES ABREVIATIONS

%	pourcent.
°C	Degré Celsius.
µl	Microlitre.
µm	Micromètre.
ADN_r	Acide desoxyribonucleique recombinant.
ADN_r	Adenosine di-nucleotide ribosomal.
AIA	Acide indole acétique
cm	Centimètre.
CO₂	Dioxyde de carbone.
Do	Densité optique.
Fe	Fer.
FeCl₃	Chlorure de fer.
g	Gramme.
g/l	Gramme par litre.
h	Heure.
H₂O	Eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄	Acide sulfurique
HCN	Acide cyanhydrique.
IS	Indice de solubilisation.
ISR	Résistance systémique induite.
ISR	Induced system resistance.
IV	Indice de vigueur.
Kg	kilogramme.
l	Litre.
m	Mètre
mg	Milligramme.
min	Minute.

ml	Millilitre.
mm	Millimètre.
Mm	Millimolaire
MA	Mycorize arbusculaire.
N	Azote.
NaCl	Chlorure de sodium.
NH₃	Ammoniac
nm	nanomètre.
O₂	Oxygène
Ox	Oxydase
P	Phosphore.
PTC	Phosphate Tri-Calcique
PBH	Poly - β -hydroxy butyrates.
PSB	bactéries solubilisant le phosphate.
PGPR	Plants Growth Promoting Rhizobacteria.
pH	Potentiel d'hydrogène.
RFCP	Rhizobactéries favorisation la croissance des plantes
rpm	Rotation par minute.
Trp	Tryptophane
UV	Ultraviolet
V	Volume
VF	Viande foie.
μg	Microgramme.
μl	Microlitre

Sommaire

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1.1. Généralités.....	2
1.1.1. Généralités sur la rhizosphère.....	2
1.1.2. Les rhizobactéries stimulatrices de la croissance des plantes (PGPR).....	3
1.1.2.1. Définition.....	3
1.1.2.2. Effets directs des PGPR.....	4
1.1.2.3. Effets indirects des PGPR.....	6
1.2. Stimulation de la croissance des plantes par production de Phytohormones.....	8
1.2.1. Production des phytohormones par les PGPR	8
1.2.1.1. Description.....	8
1.2.1.2. Biosynthèse des phytohormones par les PGPR.....	9
1.2.1.3. Effets des PGPR sur l'homéostasie hormonale des plantes.....	9
1.2.2. Les phytohormones stimulatrices de la croissance des plantes.....	10
1.2.2.1. Les auxines (acide indole-acétique).....	10
1.2.2.1.1. Nature et répartition.....	10
1.2.2.1.2. Structure chimique.....	10
1.2.2.1.3. Biosynthèse par les PGPR.....	11
1.2.2.1.4. Facteurs influençant la production de l'AIA.....	12
1.2.2.2. Les gibbérellines.....	12
1.2.2.2.1. Nature et répartition.....	12
1.2.2.2.2. Structure chimique.....	13
1.2.2.2.3. Effet de la production par les PGPR.....	14
1.2.2.2.4. Régulation de l'expression des gènes.....	15
1.2.2.3. Les cytokinines.....	15

1.2.2.3.1.	Nature et répartition.....	15
1.2.2.3.2.	Différentes classes des cytokinines.....	16
1.2.2.3.3.	Mode d'action sur les végétaux.....	18
1.2.2.3.4.	Régulation du métabolisme des cytokinines.....	18
3.	Les Biofertilisants.....	19
3.1.	Définition.....	19
3.2.	Les biofertilisants à base de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR).....	19
3.3.	Les phytohormones en tant que biofertilisants.....	20
3.4.	Intérêts et bénéfices agronomiques.....	22
4.	Biodiversité des PGPR diazotrophes dans la rhizosphère.....	23
4.1.	Les PGPR diazotrophes.....	23
4.2.	Le genre azotobacter.....	24
	-Description.....	24
	-Importance du genre azotobacter.....	25

Chapitre 2 : matériel et méthode

1.	Objectif.....	27
2.	Matériel	27
2.1.	Isolats bactériens.....	27
3.	Méthode.....	27
3.1.	Purification et caractérisation des bactéries du genre Azotobacter.....	27
3.1.1.	Purification	27
3.1.2.	Conservation des isolats.....	27
3.1.3.	Caractérisation des isolats.....	27
3.1.3.1.	Examen macroscopique.....	27
3.1.3.2.	Examen microscopique	28

3.1.3.2.1.	Technique de Coloration de Gram.....	28
3.1.3.3.	Test de la catalase.....	28
3.1.3.4.	Test de mobilité des isolats.....	29
3.1.3.5.	Mise en évidence du type respiratoire.....	30
3.2.	Screening des isolats pour quelques activités PGP.....	31
3.2.1.	Test de la solubilisation du phosphate.....	31
3.2.1.1.	Test de solubilisation du phosphate sur milieu solide.....	31
3.2.1.2.	Test de solubilisation du phosphate en milieu liquide	31
3.2.2.	Screening des isolats pour la production des phytohormones.....	32
3.2.3.	Quantification de la production d'acide indole-acétique.....	32
3.2.4.	Production d'ammoniac (NH ₃)	32
3.3.	Optimisation de la production de l'acide indole acétique.....	33
3.3.1.	Effet de la concentration en L-tryptophane sur la production de l'AIA.....	33
3.3.2.	Effet du pH sur la production de l'AIA.....	33
3.3.3.	Effet de la salinité sur la production de l'AIA.....	34
3.3.4.	Effet de la période d'incubation sur la production de l'AIA.....	34
3.3.5.	Effet de l'agitation sur la production de l'AIA.....	34
3.3.6.	Effet de la température sur la production de l'AIA.....	34
3.3.7.	Effet de la source de carbone sur la production de l'AIA.....	34
3.3.8.	Effet de la source d'azote sur la production de l'AIA.....	35
3.4.	Identification biochimique des isolats par les galeries API20E et 50CH.....	35

Chapitre 3 : Résultats

1.	Purification et caractérisation des bactéries du genre Azotobacter.....	37
1.1.	Test de la catalase.....	38
1.2.	Test de mobilité des isolats.....	39

1.3.	Mise en évidence du type respiratoire.....	39
2.	Screening des isolats pour quelques activités PGP.....	40
2.1.	Test de la solubilisation du phosphate.....	40
2.1.1.	Test de solubilisation du phosphate sur milieu solide.....	40
2.1.2.	Test de solubilisation du phosphate en milieu liquide	41
2.2.	Screening des isolats pour la production des phytohormones.....	43
2.3.	Quantification de la production d'acide indole-acétique.....	43
2.4.	Production d'ammoniac (NH ₃).....	46
3.	Optimisation de la production de l'acide indole acétique.....	48
3.1.	Effet de la concentration en L-tryptophane sur la production de l'AIA.....	48
3.2.	Effet du pH sur la production de l'AIA.....	50
3.3.	Effet de la salinité sur la production de l'AIA.....	50
3.4.	Effet de la période d'incubation sur la production de l'AIA.....	51
3.5.	Effet de l'agitation sur la production de l'AIA.....	52
3.6.	Effet de la température sur la production de l'AIA.....	53
3.7.	Effet de la source de carbone sur la production de l'AIA.....	54
3.8.	Effet de la source d'azote sur la production de l'AIA.....	55
4.	Identification biochimique des isolats par les galeries API20E et 50CH.....	56

Chapitre 4 : Discussion

Discussion.....	60
Conclusion.....	65
Références bibliographiques	66
Annexe.....	71

Liste des figures

Figure 01 : la rhizosphère.....	2
Figure 02 : interactions entre bactéries et racines des plantes dans la rhizosphère.....	3
Figure 03 : modes d'action des PGPR sur les plantes.....	8
Figure 04 : Structures chimiques des principales auxines naturelles.....	11
Figure 05 : Structure chimique de l'Acide gibbérellique.....	14
Figure 06 : Structures chimiques des cytokinines	17
Figure 07 : Schéma représentatif du mode d'action des biofertilisants a base de PGPR/Phytohormones sur les plantes.....	21
Figure08 : Résultats du test mannitol mobilité.....	29
Figure09 : Résultats du test sur le milieu Viande-foie.....	30
Figure10 : Aspects macroscopiques des isolats.....	37
Figure11 : Observation microscopique de l'isolat PIA.....	38
Figure12 : Observation microscopique de l'isolat PIA.....	38
Figure13 : Aspect d'un test catalase positif.....	39
Figure14 : Aspect du milieu mannitol-mobilité ensemencé avec les isolats....	39
Figure15 : Aspect des isolats sur milieu Viande-Foie.....	40
Figure16 : Résultats du test de solubilisation du tricalcuim phosphate par les isolats : PI5, PI7, PI6.....	41

Figure17 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya solide.....	41
Figure18 : Courbe standard du dosage du phosphore produit.....	42
Figure19 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya liquide.....	42
Figure20 : Production d'acide indole acétique par les isolats sur milieu Luria Bertani solide additionné de (5g/l) de L-tryptophane.....	43
Figure 21 : Concentrations d'AIA produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur milieu de culture Luria-Bertani.....	44
Figure22 : Production de l'acide indole acétique chez les isolats sélectionnés fixateurs d'azote, inoculés sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide	45
Figure 23 : Production de l'acide indole acétique chez les isolats sélectionnés fixateurs d'azote, inoculés sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence de (5g/l) de L tryptophane.....	45
Figure24 : Production d'acide indole acétique par les isolats sur milieu Luria Bertani solide additionné de (5g/l) de L-tryptophane.....	46
Figure 25 : Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique.....	46
Figure 26 : Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH ₃	47
Figure27 : Résultats de la capacité des neuf isolats à produire l'ammoniac (NH ₃).....	47
Figure 28 : Concentrations d'ammoniac (NH ₃) produites par les isolats	48
Figure29 : Effet de la concentration du L-Tryptophane (g/ml) sur la production de l'AIA	49

Figure30 : Effet du PH sur la production de l'AIA.....	50
Figure31 : Effet de la salinité sur la production de l'AIA	51
Figure32 : Effet de la période d'incubation sur la production de l'AIA ...	52
Figure33 : Effet de l'agitation sur la production de l'AIA sur la production de l'AIA.....	53
Figure34 : Effet de la température sur la production de l'AIA sur la production de l'AIA	54
Figure35 : Effet de la source de carbone sur la production de l'AIA sur la production de l'AIA	55
Figure36 : Effet de la source d'azote sur la production de l'AIA sur la production de l'AIA	56
Figure 37 : Identax bacterial identification system version 1.2.....	57
Figure 38 : Rapport d'identification des souches PIA.....	58
Figure39 : Profiles biochimiques de la souche PIA.....	59

Liste des tableaux

Tableau01 : Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlées par les PGPR.....	4
Tableau 02: Caractères phénotypiques des espèces <i>d'Azotobacter</i>	25

Chapitre 2

Matériel & Méthode

Chapitre 3

Résultats

Chapitre 4

Discussion

Conclusion et

Perspectives

Références

Bibliographiques

Introduction

Introduction

L'écologie du voisinage des racines appelée rhizosphère, abrite divers microorganismes et qui établissent différentes interactions, sous deux grands modes symbiotique (formation de nodule) et non symbiotique. **(Martinez-Viveros *et al.* 2010)**

Les bactéries qui colonisent la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et améliorent leur croissance par quelconque mécanisme sont appelés PGPR ou « Rhizobactéries Favorisant la Croissance des Plantes (RFCP) » **(Lynch et Whipps, 1990)**. L'ensemble des effets bénéfiques des rhizobactéries sont importants. En effet, les bactéries colonisant les systèmes racinaires peuvent exercer leurs actions bénéfiques de plusieurs mécanismes **(Glick, 2001)**.

Ces mécanismes sont divers tels que la fixation de l'azote, la libération des substances jouant le rôle des agents de biocontrôle comme les antibiotiques ou les sidérophores, et la production de métabolites végétaux bénéfiques tels que les phytohormones **(Pandey et Maheshwari, 2007)**.

Les phytohormones participent à la régulation de la croissance et au développement des plantes, en réponse notamment aux facteurs environnementaux. Le terme d'hormone se réfère à des substances organiques actives à très faible concentration produites par les plantes. **(Khamna *et al.*, 2010)**.

Les bactéries productrices de phytohormones gagnent leur plein dans le monde entier sous les moyens d'exploitation dus à la synergie entre les bactéries et les plantes ont conduit à une agriculture durable **(Narula *et al.*, 2006)**.

L'objectif du présent travail est de mettre en évidence les différentes activités de biofertilisation des souches PGPR diazotrophes des plantes de blé dur, de sélectionner la souche ayant le plus grand potentiel de production et l'optimisation de ces paramètres pour la production de l'acide indole acétique.

1.1 Généralités

1.1.1. Généralités sur la rhizosphère

On désigne par le terme rhizosphère l'ensemble des microrégions du sol en contact avec les racines des plantes supérieures. Le sol rhizosphérique diffère considérablement du sol non rhizosphérique, d'abord par une teneur beaucoup plus élevée en composés organiques utilisables comme substrats par la microflore, ensuite par une composition particulière de l'atmosphère interne du sol (**Metro., 1975**).

Le concept de rhizosphère a été développé par le microbiologiste visionnaire « *Hiltner* » qui perçut dès 1904 que ce volume de sol jouait un rôle singulier dans la régulation de la santé et de la nutrition des plantes, en lien avec la nature des exsudats racinaires. (**Hartmann et al., 2008**).

Au contact de la rhizosphère, les racines des plantes et leur ordre de ramification sont importants pour la croissance des plantes, car ils déterminent la position physique de la plante, et le recrutement de partenaires microbiens bénéfiques (**Bardgett et al., 2014**) Ainsi, la composition, la diversité et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol des racines et de la rhizosphère déterminent les interactions racine-sol qui influencent la croissance des plantes, le développement et le rendement des cultures (**Saleem et al., 2018**).

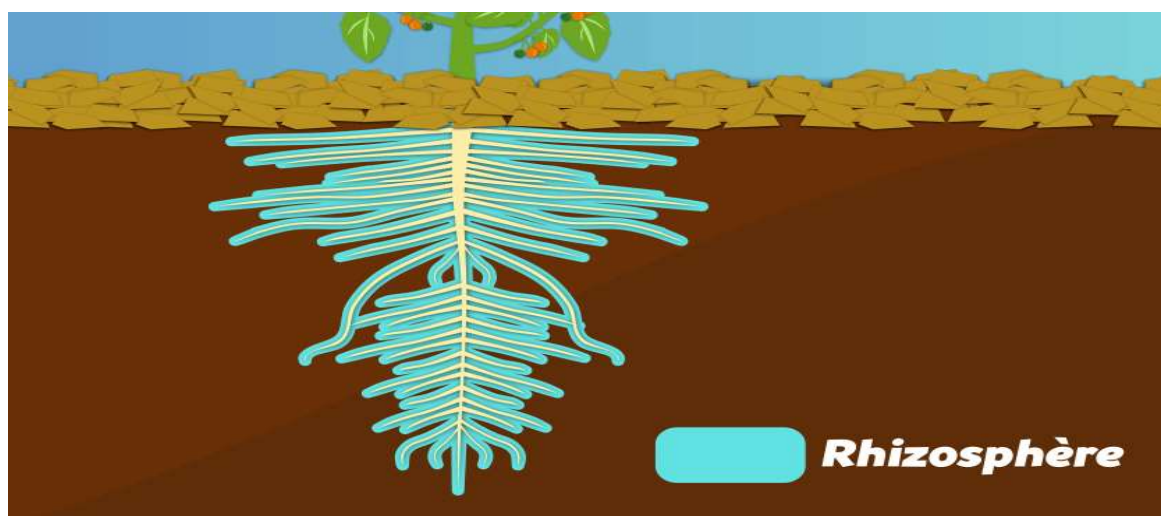


Figure 01 : la rhizosphère (**Ben Belaïd, 2018**).

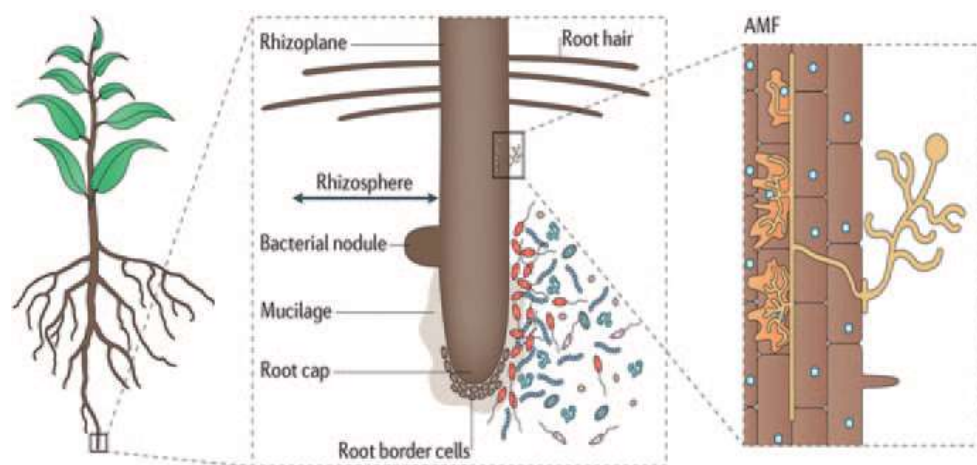
1.1.2. Les Rhizobactéries stimulatrices de la croissance des plantes (PGPR)

1.1.2.1. Définition

La rhizosphère est la zone de sol qui est sous l'influence des exsudats racinaires. Dans cette zone se trouve un groupe particulier de bactéries, les rhizobactéries. Ces dernières sont capables de se multiplier et de rivaliser avec les autres microorganismes pour occuper cette zone riche en éléments nutritifs (Beauchamp, C.J. 1993)

Les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes, connues sous le terme RFCP, stimulent directement la croissance de celles-ci 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. (Beauchamp, C.J. 1993)

La diversité des communautés bactériennes rhizosphériques est influencée à la fois par le sol, sa composition, ses caractères physicochimiques, ainsi que par les exsudats racinaires produites par les plantes (Kang *et al.*, 2012)



Nature Reviews | Microbiology

Figure 02 : interactions entre bactéries et racines des plantes dans la rhizosphère

(Parniske 2008; Philippot *et al.*, 2013).

Tableau01 : Classification des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes contrôlées par les PGPR (**Martinez-Viveros *et al.*, 2010**).

Terme	Définition	Mécanismes	Références
Biofertiliseur	Une suspension contenant des microorganismes vivants qui, une fois appliquée sur des graines, sur une plante ou dans le sol, colonisent la rhizosphère ou l'intérieur de la plante et promeuvent la croissance par l'augmentation de la disponibilité des nutriments principaux pour la plante hôte.	- La fixation biologique de l'azote. - L'utilisation des formes insolubles de phosphate.	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i>, 2004; FuentesRamírez et Caballero Mellado, 2006.
Phytestimulateur	Des microorganismes qui ont la capacité de produire ou de changer la concentration des régulateurs de la croissance.	- Production des phytohormones. - Réduction de la concentration de l'éthylène à l'intérieur de la plante.	Lugtenberg <i>et al.</i>, 2002; Somers <i>et al.</i>, 2004.
Biopesticide ou agent de biocontrôle	Des microorganismes qui stimulent la croissance d'une plante par la production des antibiotiques	- Production des antibiotiques - Production des enzymes qui dégradent les membranes des cellules fongiques	Vessey, 2003; Somers <i>et al.</i>, 2004; Chandler <i>et al.</i>, 2008.

1.1.2.2. Effets directs des PGPR

La promotion directe de la croissance des plantes peut se produire par plusieurs processus :

1. Fixation d'azote

L'azote constitue le plus souvent un facteur limitant, il se trouve fréquemment sous forme gazeuse (N₂), inaccessible aux animaux et aux plantes où aucune espèce végétale n'est capable de fixer l'azote atmosphérique et de l'utiliser directement pour sa croissance (Pujic et Normand, 2009 ; Arora *et al.*, 2012).

Les PGPRs les plus connus pour leur rôle de stimulation des plantes grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique sont : *Azoarcus sp.*, *Azotobacter Paenibacillus* et *Azospirillum brasilense*, qui transforment l'azote atmosphérique en ammoniac en utilisant un système enzymatique complexe connu sous le nom de la nitrogénase (Arora *et al.*, 2012).

2. Solubilisation du phosphate

Le phosphore constitue l'élément le plus important après l'azote, c'est le nutriment vital pour la croissance et la productivité des plantes qui sont capables seulement d'absorber les formes solubles mono- et dibasiques. Il joue un rôle primordial dans les processus métaboliques (La photosynthèse, le transfert d'énergie, biosynthèse macromoléculaire et la respiration), il est présent sous forme insoluble, immobilisé et précipité. Par ailleurs, les microorganismes solubilisant le phosphate sont abondants dans le sol et dans la rhizosphère de la plupart des plantes, ils convertissent les phosphates insolubles en forme soluble, en libérant le phosphate lié par solubilisation et minéralisation, et ceci est réalisé grâce à l'acidification, la chélation et la production d'acides organiques tels que l'acide gluconique. Les espèces appartenant aux genres bactériens comme : *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* et *Serratia* ont la capacité de solubiliser le phosphate dans le sol (Arora *et al.*, 2012 ; Bhattacharyya *et al.*, 2012 ; Gupta *et al.*, 2015)

3. La production de sidérophores

Le fer est l'un des oligoéléments les plus importants pour la croissance microbienne, il agit comme un régulateur global de nombreux processus cellulaires, métaboliques et biosynthétiques. Dans des conditions de carence en fer, les bactéries

aérobies produisent des métabolites secondaires appelés sidérophores. Bien que les champignons phytopathogènes synthétisent des sidérophores, ceux-ci ont généralement une faible affinité pour le fer par rapport à ceux produits par les PGPRs ([Schippers *et al.*, 1987](#) ; [Briat, 1992](#); [Ratul, *et al.*, 2012](#)).

Les sidérophores fixent le fer ferrique (Fe^{3+}) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe^{2+}). Ils sont également utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes en s'appropriant des ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent non disponibles aux champignons pathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance ([Glick et Pasternak, 1998](#) ; [Ongena *et al.*, 2002](#))

4. Production de phytohormones

Les phytohormones agissent comme des messagers pour coordonner les activités cellulaires et réguler divers processus cellulaires chez les plantes, y compris les réponses au stress abiotique et l'interaction plante-agent pathogène. La colonisation des PGPR entraîne de nombreux changements dans le développement des plantes. Ces changements comprennent, sans s'y limiter, la stimulation de la croissance, la modification de l'architecture des racines et des pousses et la synthèse de métabolites secondaires. Comme les hormones régulent la croissance et le développement des plantes, les effets de la colonisation par les PGPR sont directement associés aux changements de concentration, de localisation et de signalisation des hormones ([Dodd *et al.*, 2010](#), [Spaepen *et al.*, 2014](#), [Verbon et Liberman, 2016](#))

1.1.2.3. Effets indirects des PGPR

1. La compétition

Les interactions microbiennes sont conditionnées par la nature et l'intensité de la compétition entre microorganismes. Cette compétition peut s'instaurer pour l'espace et pour les nutriments. ([Lockwood, 1981](#); [Alabouvette, 1983](#)).

[Suslow \(1982\)](#) suggère que les PGPR seraient capables d'exclure les DRB « Deleterious Rhizo-Bacteria » de certaines niches écologiques où la production

d'exsudats racinaires est importante. La répartition des bactéries n'est pas régulière le long de la racine, elle est plus dense aux endroits où la production d'exsudats est plus intense, comme par exemple aux sites d'émergence des racines secondaires et aux jonctions cellulaires (Bowen et Rovira, 1976). L'inoculation de PGPR réduirait l'installation de DRB à ces emplacements.

2. L'antibiose

C'est une activité antagoniste provoquée par des antibiotiques, qui résulte de l'activité de composants toxiques pour le pathogène (tel les phénazines ou le 2,4-diacetylphloroglucinol) synthétisés par les populations microbiennes antagonistes (Strengel *et al.*, 2009).

Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-glucanase, exo- et endopolygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001)

3. La Résistance systémique induite « ISR »

La résistance systémique induite est une forme de résistance stimulée, spécifiquement, par les PGPR (Kloepper et Schroth, 1981).

L'expression de mécanismes de défense systémique chez les plantes peut être initiée suite à l'interaction avec ces PGPR lors d'un phénomène appelé ISR (Induced Systemic Resistance), ce mécanisme rend la plante plus résistante contre d'éventuelles attaques des agents pathogènes (virus, bactéries et champignons). De nombreux composants bactériens tel que les lipopolysaccharides (LPS), sidérophores, lipopeptides cycliques, peuvent induire une résistance systémique des plantes (Gupta *et al.*, 2015 ; Shameer et Prasad, 2017).

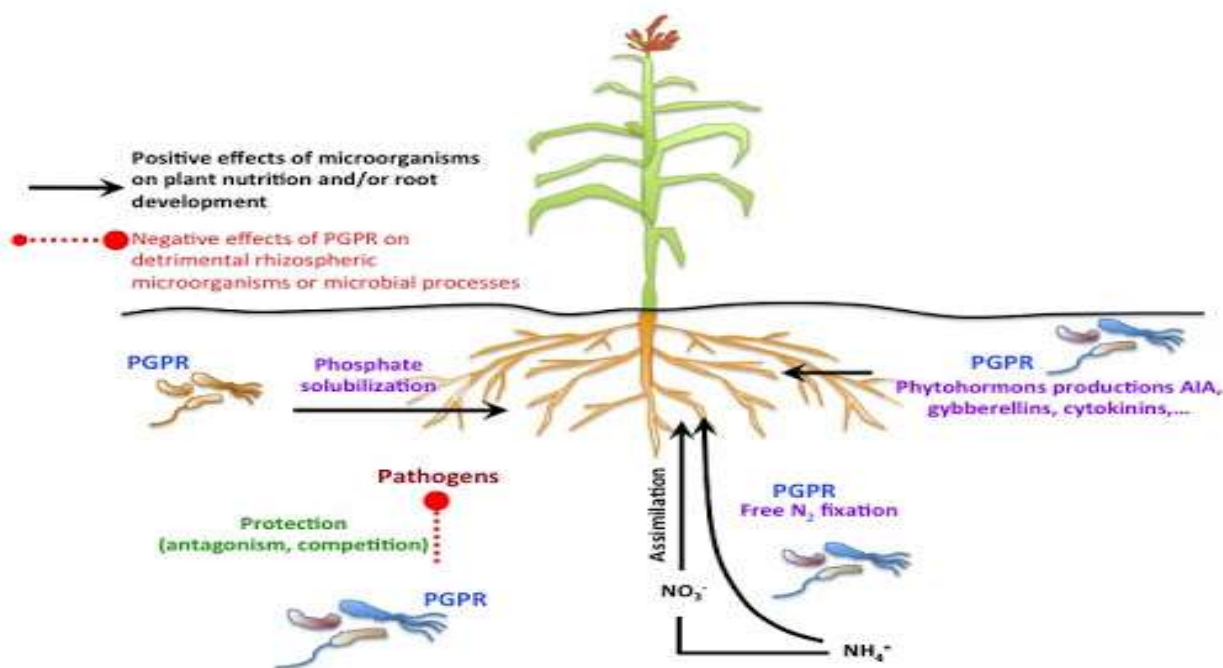


Figure 03 : modes d'action des PGPR sur les plantes (Vacheron *et al.*, 2013).

1.2. Stimulation de la croissance des plantes par production de Phytohormones

1.2.1. Production des phytohormones par les PGPR

1.2.1.1. Description :

Les phytohormones sont des molécules naturellement produites par les plantes, qui peuvent avoir pour effet de stimuler ou d'inhiber la croissance végétale. Les phytohormones qui interviennent dans la stimulation de la croissance des plantes. (Bouriquet *et al.*, 2021)

Il existe deux sources de phytohormones naturellement disponibles pour les plantes : production endogène par les tissus de la plante et exogène par des micro-organismes associés. Les PGPR produisent différentes phytohormones comme : l'AIA (Acide indole acétique : auxines), l'acide gibbérellique et les cytokinines. Ce sont des petites molécules de signal produites en très faible concentration influençant les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques dans les plantes (Han *et al.*, 2005 ; Baca et Elmerich, 2007 ; Kloepper *et al.*, 2007 ;Martínez-Viveros1 *et al.*, 2010).

1.2.1.2. Biosynthèse des phytohormones par les PGPR :

Les racines des plantes sont fortement colonisées par des micro-organismes (par rapport au sol et à d'autres habitats) en raison de la riche composante nutritive des exsudats racinaires (Schlaeppli et Bulgarelli, 2015).

La rhizosphère est un environnement relativement riche en nutriments contenant des acides aminés, des sucres, des acides gras et d'autres composés organiques, qui attirent les microbes (Vorholt, 2012) qui utilisent les divers nutriments libérés par la racine.

À leur tour, les microbes synthétisent des composés biologiquement actifs, y compris des phytohormones (auxines, cytokinines, gibbérellines et ABA). Ces métabolites microbiens jouent un rôle essentiel dans la croissance, et le développement des plantes (Ruiz-Lozano *et al.*, 2012).

Les phytohormones microbiennes affectent le métabolisme des régulateurs de croissance endogènes dans les tissus végétaux (Hashem *et al.*, 2016 ; Sorty *et al.*, 2016) et jouent un rôle clé dans le changement de la morphologie des racines lors d'une exposition à la sécheresse, à la salinité, aux températures extrêmes et à la toxicité des métaux lourds (Spaepen *et al.*, 2008 ; Khan *et al.*, 2011).

1.2.1.3. Effets des PGPR sur l'homéostasie hormonale des plantes :

Il est bien établi que la colonisation du PGPR est associée à des changements profonds dans le développement de la plante hôte et l'homéostasie hormonale . Les phytohormones agissent comme des messagers pour coordonner les activités cellulaires et réguler divers processus cellulaires chez les plantes, y compris les réponses au stress abiotique et l'interaction plante-pathogène. (Dodd *et al.*, 2010)

Comme les hormones régulent la croissance et le développement des plantes, les effets de la colonisation par PGPR sont directement associés aux changements de concentration, de localisation et de signalisation des hormones (Verbon *et Liberman*, 2016).

Il convient de noter que de nombreux processus physiologiques de la plante sont régulés par des interactions complexes entre plusieurs hormones plutôt que par la concentration d'une hormone particulière (O'Brien *et Benkova*, 2013 , Naseem *et al.*, 2015)

1.2.2. Les phytohormones stimulatrices de la croissance des plantes

1.2.2.1. Les auxines (acide indole-acétique)

1.2.2.1.1. Nature et répartition

Plusieurs décennies auparavant, le terme «Auxine» a été introduit dans l'identification des communautés scientifiques (**Went et Thirmann 1937**). Les auxines, sont un groupe d'hormones végétales qui régulent la croissance, en particulier en stimulant l'élongation cellulaire des tiges. Elles jouent également un rôle dans la division et la différenciation cellulaires, dans le développement des fruits, dans la formation des racines issues de boutures, dans l'inhibition de la ramification latérale (dominance apicale) et dans la chute des feuilles (abscission). (**Rafferty et al., 1998**)

L'auxine naturelle la plus importante est la β -Acide indole acétique (AIA), qui est formé soit à partir de l-tryptophane, soit à partir de la dégradation des glucides appelés glycosides. Cette hormone affecte les plantes par son action sur les liaisons chimiques des glucides comprenant les parois cellulaires végétales. Le processus permet d'altérer les cellules de manière irréversible et s'accompagne de l'entrée d'eau et de la synthèse d'un nouveau matériau de paroi cellulaire. (**Rogers et al., 1998**).

Diverses espèces bactériennes sont capables de produire l'acide indole acétique ou ses précurseurs. En effet, il est estimé que 80% des bactéries isolées de la rhizosphère des plantes sont capables de produire l'AIA (**Hayat et al., 2010**)

1.2.2.1.2. Structure chimique

Chez les plantes supérieures, l'auxine principale est l'AIA, mais il existe d'autres molécules naturelles actives, dont l'acide indole-3-butyrique (AIB) et l'acide 4-chloro-indole-3-acétique (4-Cl-AIA), de structures proches, ou encore l'acide phénylacétique (APA), à faible activité auxinique (**Rechenmann., 2019**).

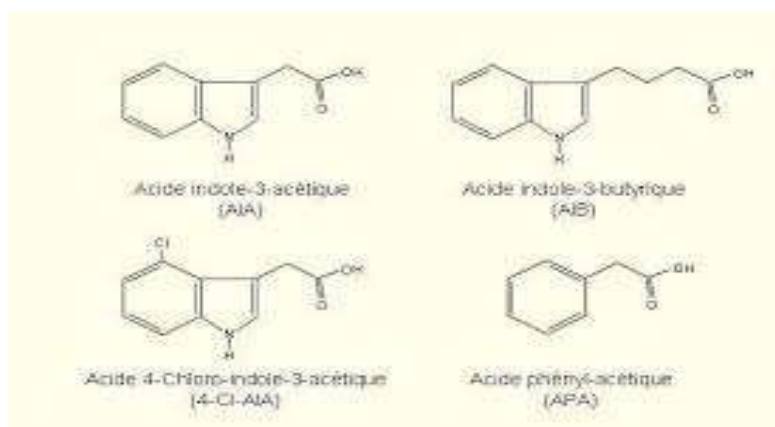


Figure 04 : Structure chimique des principales auxines naturelles (**PERROT-RECHENMANN.,2019**).

L'AIA, de formule brute $C_{10}H_9NO_2$, est formé d'un noyau indole et d'une courte chaîne latérale carbonée portant le groupement carboxyle. Ce dernier semble nécessaire à l'activité auxinique. Certaines auxines possèdent un noyau benzène ou naphthalène. C'est le cas d'un grand nombre de composés obtenus par synthèse chimique, appelés auxines synthétiques, dont l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (**Rechenmann., 2019**).

1.2.2.1.3. Biosynthèse par les PGPR

L'acide indole-3-acétique, est l'auxine majoritaire dans les plantes et la plus étudiée(**Bohn-Courseau.,2010**).Lorsqu'elle est synthétisée par les bactéries, elle a deux fonctions principales. L'AIA bactérienne stimule l'augmentation de la surface et de la longueur racinaire, donnant accès à la plante à un volume d'exploration du sol important pour une meilleure acquisition des éléments nutritifs (**Glick, 2012**).

Cependant, une production excessive d'AIA peut inhiber la croissance racinaire et entraver le développement normal de la plante (**Xie et al., 1996**). Deuxièmement, l'AIA permet un relâchement des parois cellulaires au niveau des radicelles afin de faciliter les exsudations, sources d'énergie pour le développement bactérien (**Glick, 2012**). Elle intervient également dans la germination.

Le principal précurseur de la synthèse de l'IAA est le tryptophane. L'ajout de tryptophane aux milieux de culture entraîne dans tous les cas une production d'IAA

plus élevée. (Dosselaere et Vanderleyden 2001).

En commençant par le tryptophane, au moins cinq voies différentes ont été décrites pour la synthèse de l'AIA, et la plupart des voies présentent des similitudes avec celles décrites dans les plantes, bien que certains intermédiaires puissent différer (Patten et Glick 1996).

1.2.2.1.4. Facteurs influençant la production de l'AIA

La biosynthèse d'AIA est affectée par plusieurs facteurs environnementaux. En particulier, il y a une augmentation de sa production dans des conditions de pH élevé et en présence de plus grandes quantités de tryptophane (Spaepen *et al.*, 2007).

Les facteurs qui modifient la biosynthèse d'AIA sont diversifiés et étendus. Par conséquent, nous ne citerons que ceux liés au stress environnemental et la signalisation des plantes (Spaepen *et al.*, 2007). Le premier groupe des facteurs comprend l'acidification, le stress osmotique de la matrice, et la limitation de la source de carbone, le deuxième groupe des facteurs est intégré à des signaux chimiques produits par les plantes dans des conditions normales ou stressées. Fait intéressant, la limitation du carbone et la réduction du taux de croissance sont liés à l'état physiologique des bactéries qui arrivent à la phase de croissance stationnaire. L'AIA est produit à toutes les étapes de la croissance de la culture, mais augmente de manière significative après la phase stationnaire (Malhotra et Srivastava, 2008) avec une production d'AIA réduite dans des conditions acides (Vande Broek *et al.*, 1999).

1.2.2.2 Les gibbérellines

1.2.2.2.1. Nature et répartition

Les gibbérellines (AG) sont des hormones végétales essentielles à de nombreux processus de développement des plantes, notamment la germination des graines, l'élongation de la tige, l'expansion des feuilles, le développement des trichomes, la maturation du pollen et l'induction de la floraison (Achard et Genschik, 2009).

Historiquement, l'AG a été identifiée pour la première fois dans le champignon pathogène *Gibberella fujikuroi*, l'agent causal de la maladie des "semis insensés" du riz, provoquant un allongement excessif des plantes infectées (**Yabuta et Sumiki, 1938**). Depuis sa découverte initiale, plus de 130 AG ont été identifiés dans les plantes, les champignons et les bactéries, bien que seuls quelques AG aient une activité biologique (**Yamaguchi, 2008**); de nombreux AG non bioactifs existent dans les plantes, et ceux-ci agissent comme des précurseurs des formes bioactives ou sont des métabolites désactivés. Les principaux GA bioactifs, qui comprennent GA₁, GA₃, GA₄ et GA₇, sont dérivés d'un squelette d'acide diterpénoïde carboxylique basique et ont généralement un groupe C3-hydroxyle (**Yamaguchi, 2008**).

La sensibilité des cellules vis à vis de l'acide gibbérellique dépend des conditions de culture, plus ou moins favorables à la croissance (**Fry et Street, 1980**) et en particulier de la présence d'auxine (**Digby et Wareing, 1966**) ou de cytokinines (**Helgeson, 1970**) dans le milieu.

1.2.2.2. Structure chimique

Les gibbérellines (GA) sont un groupe d'acides organiques complexes à la base d'un squelette d'atomes de carbone de 19 ou 20. Le squelette est essentiellement constant pour l'ensemble des 84 membres actuellement connus du groupe, chacun d'entre eux se voyant attribuer un numéro (GA1.2.3...) correspondant à l'ordre de découverte.

Moins d'un tiers des gibbérellines ont l'effectif complet de 20 atomes de carbone et ceux-ci ne sont probablement pas biologiquement actifs en soi, mais sont formés *in vivo* par des processus oxydatifs en analogues actifs de 19 carbones, bien que tous ces dérivés n'aient pas nécessairement un rôle principal dans la régulation de la croissance. La gibbérelline A, (GA) est l'un des plus importants des dérivés bioactifs et sa structure est typique. (**Mander., 1993**)

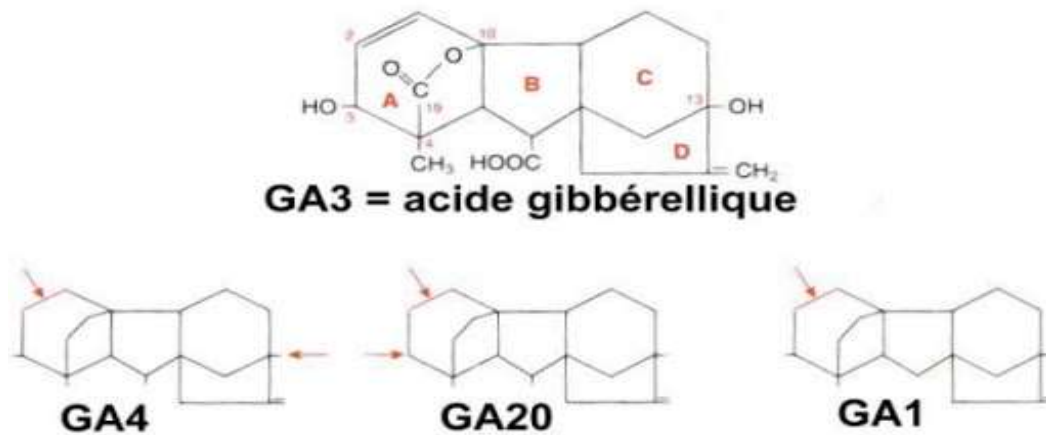


Figure 05 : Structure chimique de l'Acide gibbérellique (Anonyme.,2006).

1.2.2.2.3. Effet de la production par les PGPR

Les PGPR peuvent influencer la quantité de gibbérellines endogène dans les plantes, d'une manière similaire à d'autres hormones. Par exemple, certaines souches de PGPR peuvent synthétiser des gibbérellines (Bottini *et al.*, 2004). Après inoculation de plantes avec des souches de PGPR productrices de gibbérelline la quantité de gibbérellines endogènes dans les pousses des plantes hôtes augmente (Kang *et al.*, 2014).

Certaines souches de PGPR produisant de la gibbérelline stimulent la croissance des pousses dans des plants de riz mutants déficients en synthèse de la gibbérelline. Cela montre que ces souches compensent l'absence de gibbérellines végétales avec des gibbérellines bactériennes ajoutées (Kang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015).

En outre, les PGPR peuvent stimuler la synthèse des propres gibbérellines de la plante. L'Inoculation avec des souches PGPR productrices de gibbérelline entraînent une augmentation de la quantité de gibbérellines dans la plante, y compris celles absentes dans le milieu culturel de ces souches (Kang *et al.*, 2014; Shahzad *et al.*, 2016). L'expression de la synthèse de la gibbérelline, et la teneur en gibbérelline sont augmentées chez les plantes qui ont été exposées aux volatils organiques émis par les PGPR du genre *Bacillus* (Tahir *et al.*, 2017). Pour résumer, l'augmentation des taux de gibbérelline est liée à la présence des PGPR en contact de la plante et qui représente un mécanisme important dans la stimulation de la

croissance des plantes.

1.2.2.2.4. Régulation de l'expression des gènes :

Les gibbérellines (GA) sont impliquées dans presque tous les stades de croissance et de développement des plantes (**Phillips, 1998**) mais sont particulièrement essentielles à la germination des graines, à l'allongement de la tige, à l'expansion des feuilles et à la floraison (**Achard et Genschik, 2009**).

Les GA, comme les brassinolides, stimulent l'élongation cellulaire. La similitude de l'action des gibbérellines avec les brassinolides s'explique par le fait que les gibbérellines libèrent les protéines inhibitrices DELLA comme les BZR1, permettant de réguler l'expression des gènes. La liaison de GA au récepteur (GID1) induit un changement de conformation du GID1, qui se lie à un activateur du protéasome SCF, permettant ainsi la liaison de la protéine DELLA avec le complexe GA-GID1. Le triple complexe GA, conduisant à la dégradation par le protéasome 26S de la protéine DELLA et à la dérégulation du gène GA (**Davière et Achard, 2013 ; Tong et al., 2014**).

La dégradation dépendante du protéasome des protéines DELLA d'une manière spécifique au type cellulaire est nécessaire pour une croissance et un développement normaux (**Davière et Achard, 2013**).

Les gibbérellines induisent l'expression des histones leH1 et leH2B chez les tomates mutantes et sauvages (**van den van den Heuvel et al., 1999**).

1.2.2.3. Les cytokinines

1.2.2.3.1. Nature et répartition

Les cytokinines sont des messagers chimiques (hormones) spécifiques aux plantes qui jouent un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire des plantes et de nombreux processus de développement. (**T. Schmölling., 2013**).

Les cytokinines les plus abondantes sont de type adénine, où la position N6 de l'adénine est substituée par un isoprénoïde, comme dans la zéatine ; ou une chaîne

latérale aromatique, comme dans la kinétine. La zéatine peut être synthétisée de deux manières différentes: la voie de l'ARNt et la voie de l'adénosine monophosphate (Amara *et al.*, 2015).

La production de cytokinine par plusieurs espèces de PGPR a été bien caractérisée (Kado, 1984 ; Kaiss-Chapman et Morris, 1977). Ces micro-organismes, qui appartiennent à divers genres tels que *Pseudomonas*, *Azospirillum* et *Bacillus*, ont été isolés à partir d'un large éventail d'espèces végétales, telles que l'orge, le canola, le haricot et *Arabidopsis* (Alexandre, Jacoud, Faure et Bally, 1996 ; Persello-Cartieaux *et al.*, 2001). Il a également été rapporté que d'autres genres bactériens *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Xanthomonas* possèdent la capacité de produire des cytokinines (Maheshwari *et al.*, 2015).

Le mode d'action de chaque cytokinine est déterminé par un vaste spectre de molécules et des voies métaboliques interconnectées. Les cytokinines étaient la deuxième hormone végétale (après l'éthylène) pour laquelle des récepteurs ont été découverts. Comme c'était le cas pour l'éthylène, les récepteurs de la cytokinine se sont avérés être des capteurs d'histidine kinase (Martine Gonneau., 2003).

1.2.2.3.2 Différentes classes des cytokinines

- **Les cytokinines de synthèse**

1. La benzyl adénine : (ou 6-benzylaminopurine ou BAP) ($C_{12}H_{11}N_5$) est une hormone végétale appartenant au groupe des cytokinines. C'est une molécule qui induit la croissance de la plante, la floraison, la fructification, en stimulant la division cellulaire. C'est aussi l'hormone utilisée lors de l'éclaircissage.

Le BAP est une cytokinine de synthèse de première génération, qui a des propriétés analogues à celles des hormones naturelles mais qui est moins onéreuse à produire². Elle fut synthétisée la première fois dans le laboratoire de Folke Skoog. (Lance, 1990)

2. **La kinétine** : ($C_{10}H_9N_5O$) est un composé de synthèse analogue aux cytokinines, qui régle la croissance cellulaire chez les plantes.

La kinétine a été isolée dans des extraits de levure en 1974 (cytokinines). Elle stimule l'élongation cellulaire et l'organogénèse. (Heller, 1990).

- **Les cytokinines naturelles :**

1. **La zéatine** : ($C_{10}H_{13}N_5O$) est une hormone végétale naturelle isolée à partir du maïs (*Zea mays*) se situant au niveau du phloème. Sa forme ribosylée, la zéatine riboside, se retrouve principalement dans les racines des plantes. Elle appartient à la famille des cytokinines. Elle a deux stéréoisomères *Z* (cis) et *E* (trans). La *Z*-zéatine joue un rôle dans l'arrêt de la dormance de la pomme de terre. C'est la cytokinine la plus répandue dans le règne végétal. (Lance, 1990)
2. **L'isopentényladénine (IPA)** : ($C_{10}H_{13}N_5$) est une hormone naturelle végétale de la famille des cytokinines. C'est la seconde cytokinine découverte à partir de plantes atteintes par la bactérie *Rhodococcus fascians*. (Esnault, 1990)

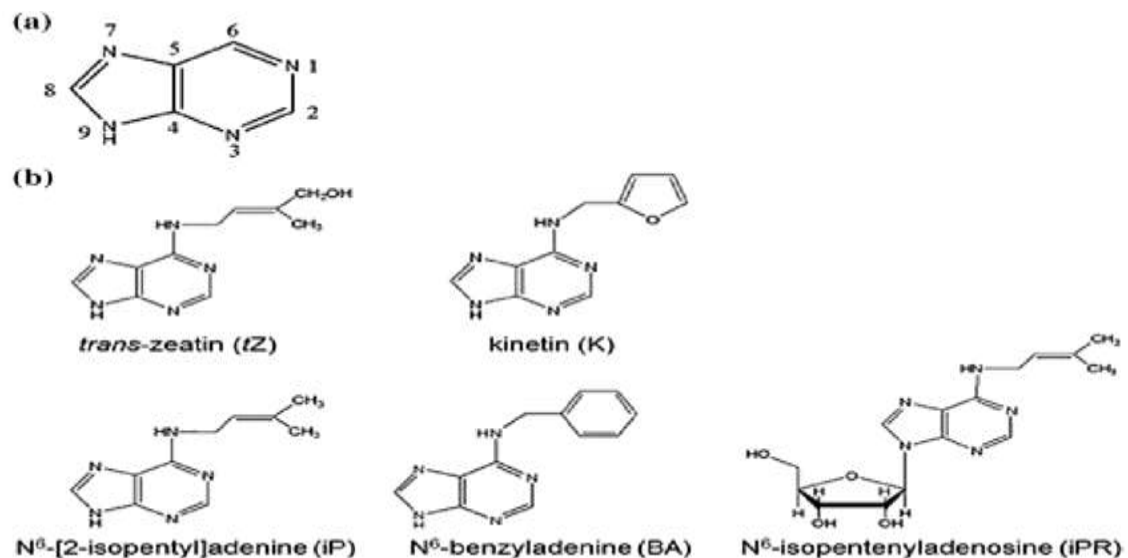


Figure 06: Structures chimiques des cytokinines (Yong.,2015).

1.2.2.3.3. Mode d'action sur les végétaux :

Les cytokinines représentent une autre classe de phytohormones produites par des micro-organismes (**Persello-Cartieaux, Nussaume et Robaglia, 2003**).

Frankenberger et Arshad (1995) élaborent le rôle des auxines, des cytokinines, des gibbérellines, de l'éthylène et des acides abscisiques qui, lorsqu'ils sont appliqués aux plantes, contribuent à augmenter le rendement et la croissance des plantes. Semblable à l'AIA, les réponses des plantes aux applications exogènes de cytokinine entraînent une division cellulaire améliorée, un développement racinaire amélioré, une formation accrue des poils racinaires, une inhibition de l'élongation des racines, l'initiation des pousses ou certaines autres réponses physiologiques (**Amara et al., 2015 ; Frankenberger & Arshad ,1995 ; Jha et Saraf, 2015**).

Les cytokinines sont des aminopurines N6-substituées qui, lorsqu'elles sont appliquées aux plantes, influencent leurs processus physiologiques et développementaux (**Maheshwari, Dheeman, & Agarwal, 2015 ; Salisbury & Ross, 1992**). D'autres processus tels que la formation du système vasculaire embryonnaire, la signalisation nutritionnelle, l'expansion des feuilles, la ramification, la production de chlorophylle, la croissance des racines, la promotion de la germination des graines et le retard de la sénescence sont également fortement influencés par les cytokinines (**Wong, Tan, Ge, Chen et Yong, 2015**).

1.2.2.3.4. Régulation du métabolisme des cytokinines :

L'homéostasie endogène de la cytokinine est régulée spatialement et temporellement par l'équilibre entre synthèse et catabolisme. De nombreuses études ont été menées pour isoler et caractériser les enzymes qui fonctionnent dans la biosynthèse des cytokinines végétales (**Miyawaki et al., 2006**).

Son activité est finement contrôlée par des facteurs environnementaux. Ce contrôle se fait au niveau des adaptations morphogéniques et métaboliques. Les sources d'azote inorganique, telles que le nitrate, sont un facteur majeur de régulation de l'expression génique de l'adénosine phosphate-isopentényltransférase

(IPT), une enzyme clé de la biosynthèse des cytokinines. (Hayashi *et al.*, 2008).

La dégradation des cytokinines semble être un outil très important pour la régulation du « pool » de cytokinines actives dans les cellules végétales. L'activité de la cytokinine oxydase dans les cellules végétales est soumise à un contrôle multiple. La plupart des mécanismes de contrôle dépendent directement de la concentration et / ou de la compartimentation des cytokinines dans la cellule (Motyka., 2004).

3. Les Biofertilisants

3.1. Définition

Les biofertilisants sont des engrais naturels constitués de biomasse viable ou de cellules dormantes de souches microbiennes bénéfiques. Ils sont activés par les interactions des graines ou du sol avec la rhizosphère, augmentant ainsi la disponibilité des nutriments pour les plantes (Alfa *et al.*, 2014).

Les biofertilisants constituent un outil prometteur dans les écosystèmes agricoles en tant que source complémentaire, renouvelable et écologique de nutriments végétaux. Comme ils ont la capacité de transformer des éléments importants sur le plan nutritionnel de formes non utilisables en formes hautement assimilables sans effets délétères sur l'environnement naturel, ils constituent un élément important du système intégré de nutriments végétaux (Alley et Vanlauwe, 2009).

3.2. Les biofertilisants à base de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) :

Les biofertilisants microbiens sont des préparations biologiques de densités suffisantes de souches de micro-organismes, ayant un rôle bénéfique dans les rhizosphères pour la croissance des plantes (Farfour *et al.*, 2015).

Pour la mise au point de ce genre d'inoculum, on commence par isoler les bactéries associées aux plantes. Ceci est réalisé par un vaste échantillonnage de plantes provenant d'une gamme d'habitats (agricole, sec, humide, froid, chaud et

salin). Actuellement, les efforts sont davantage axés sur le rhizomicrobiome car il possède la plus grande diversité microbienne. Une fois que les souches cultivables ont été isolées, elles peuvent être criblées pour leur capacité à améliorer la germination des plantes cultivées. Les isolats prometteurs peuvent ensuite être criblés pour leur capacité à accélérer l'émergence et la croissance précoce des plantes, dans des conditions d'environnement contrôlées. L'expérimentation de la germination et de la croissance précoce des plantes doit être menée dans des conditions de croissance à la fois optimales et stressantes (**Subramanian et al., 2016 a , b**).

3.3. Les phytohormones en tant que biofertilisants

Les engrais organiques comprennent des facteurs favorisant la croissance des plantes et qui ne sont certainement pas les nutriments minéraux en soi ; ces engrais ont pour rôle de stimuler la croissance et le développement des plantes. Ces observations saillantes et positives d'amélioration de la croissance ont été notées par de nombreux agriculteurs/producteurs de l'industrie végétale. (**Gharib et al., 2008**). Ainsi des preuves scientifiques que les facteurs favorisant la croissance par ces biofertilisants qui sont les phytohormones sont en tandem avec les caractéristiques physiologiques observées et le rendement des cultures ont été établies (**Datta et al., 2009**).

Lorsque la lumière, l'eau et les nutriments minéraux ne sont pas limitatifs, les phytohormones, en particulier les cytokinines, dans les biofertilisants, aident à stimuler la croissance des plantes en progressant plus rapidement à travers les différents points de contrôle du cycle cellulaire des plantes conduisant à la production de plus de cellules.

L'utilisation d'engrais organiques et de biofertilisants (avec leurs microbes et leurs phytohormones naturelles et surtout les cytokinines) en complément des méthodes agricoles conventionnelles, contribuent à augmenter les niveaux de phytohormones favorisant la croissance dans l'environnement racinaire souterrain. La productivité et le rendement peuvent être encore améliorés avec la supplémentation de phytohormones comme les cytokinines, les auxines, les gibbérellines, etc., (**Bashan et al. 2014**).

Les cytokinines semblent être l'un des facteurs limitants dans la régulation de la croissance des plantes en raison de sa rareté et de sa fluidité dans le milieu souterrain fragile. Ainsi, on pense que le rendement agricole et la productivité peut être considérablement améliorée avec la supplémentation en cytokinines et d'autres phytohormones aux engrais. La supplémentation en cytokinines dans tout biofertilisant vert futuriste doit de préférence être « naturel » et originaire de micro-organismes (par exemple des bactéries comme *Azospirillum* et *Rhizobium*) qui sont largement disponibles pour le producteurs/agriculteurs (Yong *et al.*, 2009).

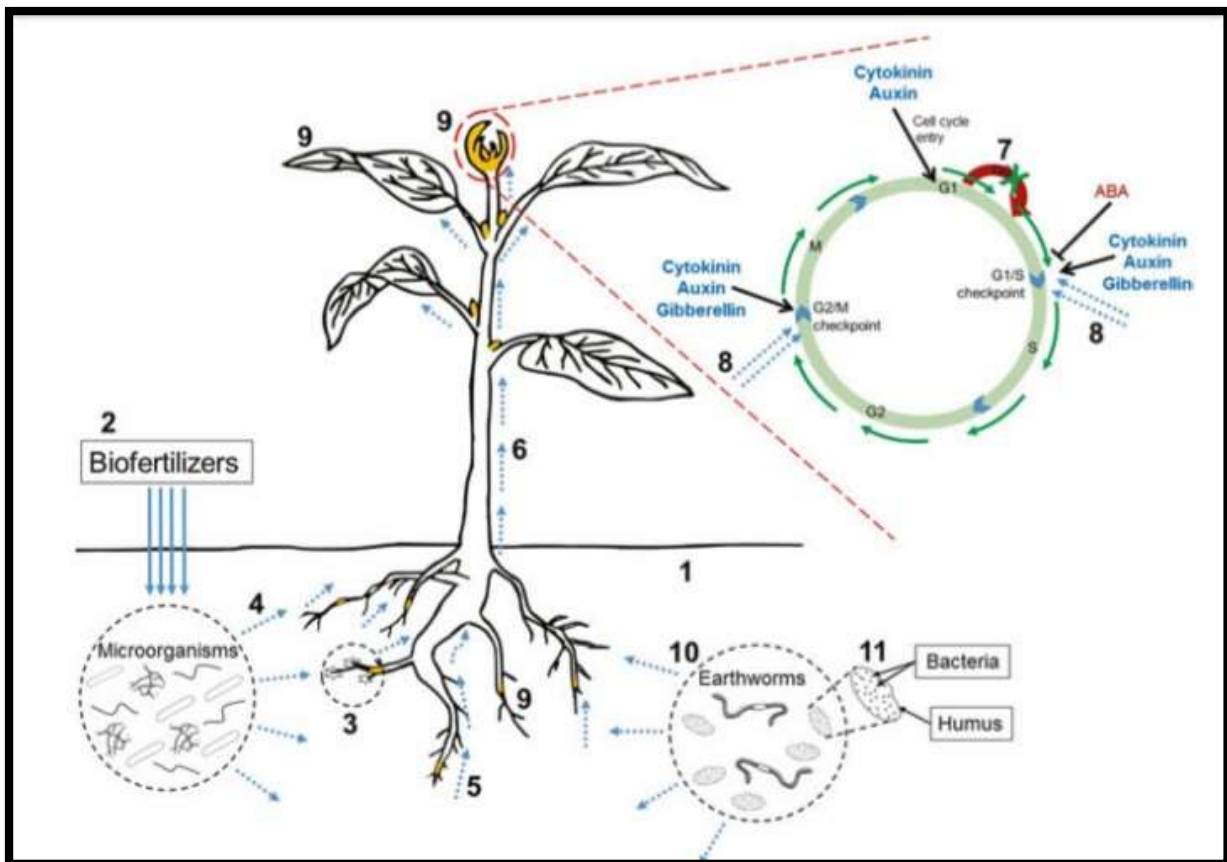


Figure 07 : Schéma représentatif du mode d'action des biofertilisants a base de PGPR/Phytohormones sur les plantes (Yong *et al.*,2015)

- 1) Le sol fournit aux plantes des nutriments généraux comme N, P et K, qui servent de matériaux structuraux cellulaires.
- 2) L'application de biofertilisants introduit des micro-organismes (par exemple bactéries et champignons) dans la rhizosphère.

- 3) Les micro-organismes peuvent vivre en liberté ou en symbiose avec les plantes (au niveau des racines).
- 4) Certains micro-organismes produisent divers enzymes utiles pour améliorer la disponibilité dans le sol de certains nutriments, et d'autres substances utiles dont les phytohormones.
- 5) et 6) les phytohormones présentes dans le sol, sont alors captées par la plante, via les racines, transportés vers/ou à proximité des sites de croissance active.

- 7) et 8) Les phytohormones aident les cellules à contourner la phase G0 et aller au-delà des points de contrôle (G1/S et G2/M) qui entraînent des divisions cellulaires actives conduisant éventuellement à la croissance des plantes.

- 9) Les phytohormones transportées vers les autres parties de la plante régulent également divers processus biologiques tels que l'ouverture des stomates, la production de chloroplastes, le développement des fleurs et développement racinaire.

- 10) Les vers de terre produisent du vermicompost qui contient des phytohormones qui sont libérées dans le sol et peuvent être absorbées par les plantes.

- 11) Le lombricompost contient également de l'humus qui permet aux bactéries bénéfiques (d'origine intestinale de ver de terre et/ou d'origine du sol) de prospérer et de se multiplier, augmentant ainsi la bioactivité du sol.

3.4. Intérêts et bénéfices agronomiques

Une étude a été réalisée pour étudier les effets de phytohormones appliquées de manière exogène, seules ou en mélanges, sur une légumineuse et une céréale poussant dans des chambres avec des conditions contrôlées d'humidité, de température et de cycle lumière/obscurité. Il a été constaté que l'application de phytohormones entraînait une augmentation considérable de la croissance des plants de soja et de maïs. Le mélange de phytohormones formulé avec la plus faible concentration de chacune requise pour améliorer la croissance des plantes, a permis

une amélioration significative de plusieurs paramètres de croissance impliqués dans la productivité. Ainsi, l'ajout de ce mélange aux produits commerciaux en tant qu'engrais peut rendre possible l'amélioration des rendements des légumineuses et des céréales ([Llanes et al., 2016](#))

Dans l'ensemble, des preuves ont été fournies que l'application exogène de phytohormones d'origine microbienne est un outil important pour augmenter la tolérance aux stress abiotiques et biotiques des plantes, offrant des applications pratiques potentielles dans des conditions environnementales changeantes ou extrêmes. ([Ying Ma et al., 2017](#)).

4. Biodiversité des PGPR diazotrophes dans la rhizosphère

4.1. Les PGPR diazotrophes

Une bactérie fixatrice d'azote est un microorganisme capable de capter l'azote atmosphérique, le diazote et de le restituer à la plante sous une forme assimilable : l'ammoniaque. Ces bactéries mesurent environ 1 micromètre de moyenne, ce qui est environ 600 000 fois plus petit qu'un homme. ([Anonyme., 2018](#)).

Parmi les bactéries fixatrices d'azote, on retrouve : Les bactéries diazotrophes sont celles qui représentent le plus grand intérêt. Elles ont la capacité de développer différents types d'associations avec des racines et différents types d'espèces. ([Hemerly, 2014](#)) Ces bactéries vivent dans le sol à l'interface entre le sol et les racines. Cette zone s'appelle la rhizosphère. Les bactéries diazotrophes libres se nourrissent de molécules sécrétées par les racines et en contrepartie, elles fixent le diazote pour le restituer à la plante sous formes d'ammonium.

On peut alors citer 3 exemples de bactéries diazotrophes : *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azomonas*. Ces trois bactéries ont besoin d'une enzyme pour pouvoir fonctionner : la nitrogénase. Elle est indispensable et va permettre de catalyser la réaction de transformation du diazote de l'air en azote assimilable par les plantes. ([Anonyme., 2018](#))

4.2. Le genre *Azotobacter*

-Description

Azotobacter est un genre bactérien appartenant à la sous-classe des Gammaproteobacteria. Selon la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(2005) (Brener *et al.*, 2005). Le genre *Azotobacter* est transféré de la famille des Azotobacteriaceae à la famille des Pseudomonadaceae sur la base des séquences des ADNr 16S. Les cellules du genre *Azotobacter* sont des bacilles à Gram négatif, ovoïdes et relativement larges (2 à 4 µm, jusqu'à 6 µm) et peuvent prendre plusieurs formes (cocci ou batonnets) non sporulés, mobiles grâce des flagelles multiples. Ce sont des bactéries aérobies à métabolisme strictement respiratoire. Contrairement au genre *Azomonas*, *Azotobacter* a la capacité de former des cystes en absence de nutriments. Ceux-ci remplis de poly-β-hydroxybutyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux comme source d'énergie. Le genre comprend plusieurs espèces (*chroococcum*, *beijerinckii*, *vinelandii*, *nigricans*, *armeniacus*, *paspali*...) qui se distinguent par leurs caractères biochimiques et la production de pigments. Les *Azotobacter* sont ubiquitaires et peuvent être isolés de l'eau et du sol où ils y vivent librement. Ils sont plus abondants près des racines et dans la rhizosphère qu'ailleurs dans le sol. Ces bactéries fixent mieux l'azote atmosphérique dans les sols où les apports d'azote minéral sont réduits. Elles ont d'importantes facultés à utiliser les apports minéraux sous forme insoluble qu'il s'agisse de phosphates ou de nitrates (Buchan *et Gibbous*, 1974)

Tableau 02: Caractères phénotypiques des espèces d'*Azotobacter* (Brener *et al.*, 2005)

	<i>A. chroococcum</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. nigricans</i>	<i>A. armeniacus</i>	<i>A. paspali</i>
Morphologie	Bâtonnets ovales cocci	Bâtonnets aux extrémités arrondies.	Bâtonnets aux extrémités arrondies	Bâtonnets aux extrémités arrondies	Bâtonnets aux extrémités arrondies	Bâtonnets aux extrémités arrondies
Dimension	3 à 7µm de long	3,2 à 5,3µm de long	3 à 4,5µm de long	4,1 à 4,9µm de long	5 à 5,7µm de long	7 à 10,9µm
Disposition	En paire	Cellules isolées ou en paires parfois en petite chaînette	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires	Cellules isolées ou en paires
Mobilité	Mobile par des flagelles péritriches	-	Mobile par des flagelles péritriches.	-	Mobile par des flagelles péritriches	Mobile par des flagelles péritriches
Mannitol	+	±	+	±	+	-

-Importance du genre azotobacter :

Les bactéries du genre *Azotobacter*, en plus d'être des diazotrophes, jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. *Azotobacter* étant qualifié de PGPR synthétise des substances biologiquement actives telles que les phytohormones (les auxines) stimulant ainsi la croissance des plantes (Ahmed *et al.*, 2005). Ils facilitent également la solubilité de certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration des sols (Rajae *et al.*, 2007).

Lorsque les *Azotobacter* sont appliqués aux semences, la germination des graines est améliorée dans une mesure considérable. Brakel & Hilger., 1965 ont montré que *Azotobacter* produit l'Acide indol-3-acétique (AIA), lorsque le tryptophane a été ajouté au milieu.

Il a également été conclu que les inoculants d'*Azotobacter* ont un effet promoteur significatif sur les paramètres de croissance tels que la longueur de la racine, la longueur des pousses et la masse sèche des plantules de maïs in vitro et dans des expériences en pot. La double inoculation d'*A. Chroococcum* et de *P. indica* ont eu une répercussion positive sur la longueur des pousses, la longueur des racines, le poids des pousses et des racines fraîches, le poids des pousses et des racines sèches et le nombre de panicules qui affectent la croissance du plant de riz. **(Kamil et al., 2008)**

Il y a une augmentation de l'accumulation de matière sèche dans les plantes inoculées par *Azotobacter*; ces bactéries stimulent le développement du feuillage, des racines, de la ramification, de la floraison et de la fructification qui est déclenché par l'azote fixe et les substances régulatrices de croissance produites. Elles augmentent également la tolérance des plantes au manque d'eau dans des conditions défavorables. **(Zena., 1986)**. **(Sandeep et al., 2011)** a révélé l'existence d'une meilleure croissance des plantes inoculées par *Azotobacter* par rapport aux plantes témoins non inoculées. Une meilleure réponse de croissance des cultures se traduit finalement par une meilleure accumulation de matière sèche **(Sandeep., 2011)**.

1. Objectif

Le présent travail a pour objectif la mise en évidence des différentes activités de biofertilisation des souches PGPR diazotrophes des plantes de blé dur, ainsi que la sélection de la souche ayant le plus grand potentiel de production et l'optimisation de ces paramètres pour la production de l'acide indole acétique.

2. Matériel

2.1. Isolats bactériens

Les isolats ayant fait l'objet de l'étude bactériologique proviennent du sol rhizosphérique des plantes de blé dur, récolté dans, willaya de Sidi Bel Abbes et qui ont été fournis par le laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Sidi Bel Abbes.

3. Méthode

3.1. Purification et caractérisation des bactéries du genre *Azotobacter*

3.1.1. Purification

Trois repiquages successifs à un intervalle de 5 jours sont réalisés sur gélose en boîtes de petri du milieu Ashby en vue d'obtenir des cultures jeunes et pures. Les cultures sont incubées à 30 °C.

3.1.2. Conservation des isolats

La conservation des isolats est réalisée par un ensemencement en stries des cultures pures des isolats en tubes de gélose inclinée (Botton *et al.*, 1990). La technique permet une conservation de 6 à 12 mois à 4°C.

3.1.3. Caractérisation des isolats

3.1.3.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique consiste en l'étude de la morphologie des colonies

permettant ainsi de distinguer les caractéristiques de ces colonies et une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après ([Joffin et Leyral, 2001](#)), les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- La forme des colonies : punctiforme, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesures du diamètre : petite ; moyenne ou grande taille.
- La pigmentation : couleur de la colonie.
- L'élévation : bossue, convexe, plane.
- L'opacité : opaque, translucides, transparente
- Aspect : lisse, rugueuse, sèche.

3.1.3.2. Examen microscopique

3.1.3.2.1. Technique de Coloration de Gram

Un frottis fixé par la chaleur est réalisé sur une lame de verre, puis coloré avec une solution de violet de gentiane pendant une minute ; il est ensuite traité avec une solution de lugol pendant une minute et rincé a nouveau avec l'eau distillé ; la préparation est traitée avec un solvant organique, tel que l'alcool pendant 30 secondes puis rincé à l'eau distillée. Certaines bactéries, dites à Gram positif, résistent à la décoloration par l'alcool. Les autres, appelées bactéries à Gram négatif, sont rapidement décolorées. Une contre-coloration avec la fuchsine est réalisée pendant 10 à 30 secondes ; la lame est ensuite rincée a l'eau distillée. La lame est séchée au-dessus de la flamme du bec bunsen. L'observation microscopique est réalisée par ajout d'une goutte d'huile a immersion sur le frottis et l'observation se fait avec un grossissement de (Gr X 100). Les bactéries à Gram positif apparaissent alors en violet, tandis que les bactéries à Gram négatif, qui acceptent le contre-colorant, sont rouge clair. ([Bejot., 2021](#))

3.1.3.3. Test de la catalase

L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène. La catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en dioxygène ($2H_2O_2 + Catalase \longrightarrow 2H_2O + O_2$).

Sur une lame de microscope et en utilisant une anse de platine flambée dans la flamme

du bec bunsen une colonie est prélevée à partir d'une culture jeune et est placée sur la lame. Ensuite à l'aide de la pipette Pasteur, 1 goutte de H₂O₂ est déposée sur la lame en évitant de mélanger. Les réactions positives se manifestent par une effervescence immédiate (Karen Reiner., 2010).

3.1.3.4. Test de mobilité des isolats

Le milieu de culture mannitol mobilité est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet l'étude la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

L'ensemencement se fait par pique centrale à l'aide d'un fils de platine. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24h. Le milieu passe du rouge au jaune pour indiquer que le mannitol a été fermenté. La présence de bulles dans le milieu indique la présence d'azote gazeux, produit par l'organisme. Le trouble localisé le long du site d'inoculation indique que la bactérie est immobile ; ainsi lorsqu'il est dispersé dans tout le milieu indique qu'il s'agit d'une espèce bactérienne mobile (Janet McDonough., 2012) (Figure08)

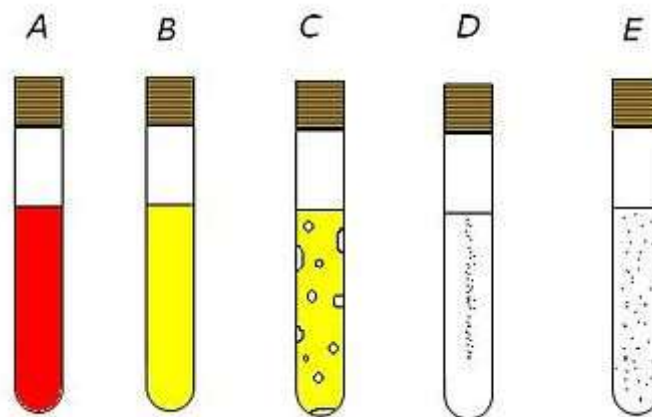


Figure08 : Résultats du test mannitol mobilité

Interprétation des résultats :

- A: pas de dégradation du mannitol.
- B: Dégradation du mannitol.

- C: Dégradation du mannitol avec production de gaz.
- D: Bactérie non mobile, colonies au lieu de l'ensemencement.
- E: Bactérie mobile, répartition des colonies dans le milieu de culture.
- milieu jaune : mannitol + .
- milieu rouge : mannitol – .

3.1.3.5. Mise en évidence du type respiratoire

L'étude du type respiratoire d'une bactérie nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en dioxygène. Le milieu utilisé à cette fin est la gélose viande-foie (gélose VF) (Guillaume., 2004). La gélose VF régénérée par ébullition au bain-marie bouillant pendant environ 30 minutes et est versée dans des tubes stériles correspondants aux souches bactériennes étudiées et qui sont ensemencés lorsque le milieu est encore liquide, vers 45°C. L'ensemencement se fait à la pipette Pasteur scellée (ou boutonnée) et chargée. On introduit la pipette Pasteur au fond du tube et on remonte en spirale. Les tubes sont placés dans l'étuve (à 37°C) pendant 24 heures.

La bactérie est dite soit : aérobie strict, anaérobie strict, microaérophile ou anaérobie aéro-tolérant. (Figure09)

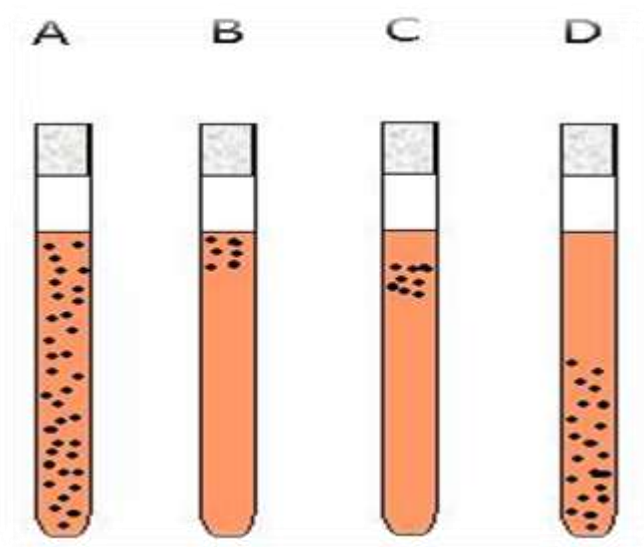


Figure09 : Résultats du test sur le milieu Viande-foie

Interprétation des résultats :

- A : culture sur toute la hauteur : aéro-anaérobie facultatif (AAF) ;
- B : culture seulement en haut : aérobie stricte (AS) ;
- C : culture limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut : micro-aérophile ;
- D : culture seulement 1 cm au-dessous du haut : anaérobie stricte (AnS).

3.2. Screening des isolats pour quelques activités PGP

3.2.1. Test de la solubilisation du phosphate

3.2.1.1. Test de solubilisation du phosphate sur milieu solide

La capacité des isolats bactériens à libérer le phosphore soluble a été testée sur milieu Pikovskaya solide (Pikovskaya, 1948) additionné de 0,5% de PTC comme seule source de phosphore. Les pré-cultures des isolats ajustées à 0.5 McFarland sont déposées sous forme de spots (10 µl) sur le milieu de culture solide Pikovskaya. Après incubation à 30°C pendant 5 jours, Les bactéries solubilisant le phosphate vont former un halo clair autour des colonies (Alam *et al.*, 2002). Le taux de solubilisation est évalué par l'indice de solubilisation. La mesure de l'index de solubilisation est effectuée selon la formule suivante :

$$SI = \frac{(\text{le diamètre de la colonie} + \text{le diamètre de la zone claire})}{(\text{le diamètre de la colonie})}$$

3.2.1.2. Test de solubilisation du phosphate sur milieu liquide

Les quantités de phosphore solubilisés par chaque souche sont estimées par ensemencement de 5ml de milieu PVK liquide en tubes à essais stériles par 100µl des pré-cultures bactériennes âgées de 24h puis incubées a 30 °C pendant 7 jours sous agitation modérée. Les cultures sont ensuite centrifugées a 3000 rpm pendant 10 min. la quantité de phosphore soluble est mesurée dans le surnageant par la méthode colorimétrique de Olsen (Olsen et Sommers, 1995). Un prélèvement de 1ml du surnageant est ajouté à 10 ml de molybdate d'ammonium ((NH₄)₂MoO₄) à 12 mM et 1ml de chlorure d'étain (SnCl₂) a 5 mM. Le volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur bleu est mesurée par spectrophotométrie a une longueur d'onde de 620 nm. Une courbe d'étalonnage

standard est effectuée avec une solution de KH_2PO_4 (Olsen et Sommers, 1995).

3.2.2. Screening des isolats pour la production des phytohormones

Le screening des isolats pour la production des phytohormones est réalisé selon la méthode de Bric *et al.*, (1991) avec quelques modifications. Le milieu de culture solide de Luria-Bertani enrichi en présence et en absence du L-tryptophane (5g/l), additionné d'une concentration de 1% de glucose, de 0.06% de SDS et de 1% de glycérol est utilisé pour la recherche de la production de l'AIA et des gibbérellines chez les isolats testés. Un ensemencement en spot est réalisé à partir de la pré-culture de 24H à l'aide d'une anse de platine. Un papier Whatman stérilisé d'un diamètre de 8 cm est déposé sur la gélose. Les boîtes de Pétri ensemencés sont incubées à 30°C/5j. Le papier Whatman est ensuite prélevé et immergé dans le réactif de Salkowski (12g l⁻¹ de FeCl_3 dans un volume de 429ml l⁻¹ de H_2SO_4), incubé à l'obscurité pendant 30 min pour la mise en évidence de la production de l'AIA. Les bactéries productrices de l'AIA sont caractérisées par la formation d'un halo rouge. La production des gibbérellines est mise en évidence par l'apparition d'une pigmentation verte sous rayons UV de la gélose ensemencée.

3.2.3. Quantification de la production de l'acide indole-acétique

La production de l'AIA est évaluée, selon la technique rapportée par Acuña *et al.*, (2011), sur milieu Luria-Bertani liquide additionné de glucose à 1% en présence et en absence du L-tryptophane (5g/l). Le milieu de culture dilué à 1/10 est réparti dans des tubes à essai stériles et est inoculé avec 100 µl d'une pré culture bactérienne âgée de 24h et ajustée à 0.5Mc Farland. Les tubes sont incubés à 30 °C pendant 5 jours. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm/10min. 1ml de surnageant est ajouté à 2ml du réactif de salkowski. Le mélange est incubé dans l'obscurité pendant 30 min. la lecture des résultats se fait par mesure de la densité optique à 535nm. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

3.2.4. Production d'ammoniac (NH_3)

L'ensemble des isolats bactériens ont été testés pour la production d'ammoniac dans l'eau péptonée. 100 µl de chaque pré-culture a été inoculées dans 02 ml d'eau péptonée. Les

cultures sont incubées à 30c° pendant 96 H (Cappuccino et Sherman, 1992). Elles sont centrifugées à 3000 rpm pendant 20 mn. La quantité du NH₃ est mesurée dans le surnageant des cultures. Un volume du réactif de Nessler est ajouté à quatre volumes du surnageant. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH₃. L'intensité de la couleur bleue mesurée à 425 nm et est directement proportionnelle à la concentration de NH₃ dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution d'ammonium sulfate.

3.3. Optimisation de la production de l'acide indole acétique

Parmi l'ensemble des isolats sélectionnés fixateurs d'azote étudiés ; l'isolat correspondant a toutes les caractéristiques phénotypiques et biochimiques du genre *Azotobacter* et possédant le meilleur potentiel de solubilisation de phosphate ; de production de l'acide indole acétique et du NH₃ a fait l'objet d'une optimisation de ces paramètres pour la production de l'acide indole acétique afin de déterminer les conditions les plus favorables pour une production optimale de l'hormone. Il s'agit de l'isolat PIA

3.3.1. Effet de la concentration en L-tryptophane sur la production de l'AIA

L'effet de la concentration du L-Trp sur la production de l'AIA a été étudié. L'isolat PIA a été cultivée dans des tubes à essai contenant le milieu Luria Bertani liquide dilué a 1/10 additionné de 0.1% de glucose avec différentes concentrations de L-tryptophane (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 0,8 et 0,9%) et incubée à 30 °C pendant 6 jours. Après incubation, la culture bactérienne a été centrifugée et la production d'AiA a été mesurée et estimée à 535 nm en utilisant le réactif de Salkowski

3.3.2. Effet du pH sur la production de l'AIA

Pour évaluer l'effet du pH sur la production de l'AIA, la souche PIA a été cultivée sur milieu de culture Luria Bertani liquide dilué a 1/10 additionné de 0.1% de glucose ; ajusté à différentes valeurs de pH (3,4,5,6,7,8 et 9) et incubé à 30 C° pendant 6 jours La production d'AIA a été contrôlée après centrifugation des cultures a 535nm en utilisant le réactif de Salkowski.

3.3.3. Effet de la salinité sur la production de l'AIA

L'isolat PIA a été cultivé sur milieu de culture Luria Bertani dilué a 1/10 et additionné de 0.1% de glucose avec différentes concentrations de NaCl (1, 2, 3,4, 5%). Après une incubation à 30°C pendant 6 jours la concentration de l'AIA produite a été mesurée et estimée après centrifugation pour chaque culture à 535 nm en utilisant le réactif de Salkowski

3.3.4. Effet de la période d'incubation sur la production de l'AIA

L'isolat PIA a étéensemencée sur milieu LB dilué a 1/10 additionné de 0.1% de glucose et incubée à 30°C pendant 6 jours. La production d'AIA a été mesurée à un intervalle de 24 heures à 535 nm avec addition du réactif de Salkowski.

3.3.5. Effet de l'agitation sur la production de l'AIA

Pour étudier l'effet de l'agitation sur la production de l'acide indole acétique ; deux cultures ont été préparés sur le milieu de culture Luria Bertani liquide dilué a 1/10 additionnée de 0.1% de glucose. Les deux cultures ont été incubées respectivement avec et sans agitation a température ambiante. La production de l'AIA a été mesurée à 6 jours de l'ensemencement a 535nm en utilisant le réactif de Salkowski.

3.3.6. Effet de la température sur la production de l'AIA

La production de l'AIA a été testée à différentes températures d'incubation qui sont de 30, 35, 40, 45 et 50c° par la réalisation d'une culture de l'isolat PIA sur milieu de culture Luria Bertani dilué a 1/10 additionné de 0.1% de glucose. Après une période d'incubation de 6 jours la concentration de l'AIA produite a été évaluée a 535nm en utilisant le réactif de Salkowski

3.3.7. Effet de la source de carbone sur la production de l'AIA

Pour évaluer l'effet de la source de carbone sur la production de l'AIA quatre sources de carbone différentes ont été additionnées séparément au milieu de culture Luria Bertani dilué au 1/10 et qui sont le Mannitol, Saccharose, Glucose et galactose. Un ensemencement de la souche PIA a été réalisé sur les différents milieux avec une incubation à 30 °C pendant 6 jours. L'estimation des résultats a été réalisées par addition du réactif de Salkowski a 535 nm

3.3.8. Effet de la source d'azote sur la production de l'AIA

La souche PIA a été cultivé sur milieu de culture Luria Bertani dilué à 1/10 additionné de 0.1% de glucose avec quartes sources d'azote différentes pour chaque test. Les sources d'azote étudiées sont la tryptone, la peptone, l'extrait de levure et l'extrait de viande. Un ensemencement a été réalisé sur les différents milieux et une incubation à 30 °C pendant 6 jours. La production de l'AIA a été évaluée à 535 nm avec ajout du réactif de salkowski.

3.4. Identification biochimique de l'isolat PIA par la galerie Api 20E et API 50 CH

A l'issus des tests réalisés, le candidat correspondant aux caractéristiques microscopiques, macroscopiques et biochimiques (type respiratoire, mobilité, catalase) des *Azotobacter* et ayant montré le taux de production de phythormones (plus précisément de l'acide indole acétique) le plus élevé a été sélectionné pour faire l'objet d'une identification phénotypique. Il s'agit de l'isolat PIA.

Les galeries API 20 E et API 50 CH sont préparées en suivant les instructions du fabricant (bioMérieux, France) pour réaliser l'ensemencement de l'isolat bactérien retenu.

Le fond et le couvercle des boites d'incubation sont réunis, 5 ml d'eau distillée stérile sont repartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et les galeries sont placées dans les boites d'incubation

Des colonies bactériennes de l'isolat sont diluées dans une solution de NaCl 0.9% (pour API 20 E) et milieu API 50 CHB/E medium. Les inoculums sont ajustés a 0.5 Mc Farland.

Les suspensions bactériennes sont introduites dans les tubes des galeries à l'aide d'une micropipette en évitant la formation de bulles au fond des tubes. Pour les tests CIT, VP et GEL, les tubes et cupules sont remplis. Pour les autres tests, seuls les tubes sont remplis. Les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE nécessitent l'ajout d'huile de paraffine dans leurs cupules afin de créer une anaérobiose.

Les galeries inoculées sont incubées à 30°C pendant 24h. La lecture des

résultats s'est faite en se rapportant aux guides d'utilisation, en prenant en considération le changement de l'aspect de la cupule (couleur) ou en utilisant les réactifs de révélation (VP, NIT1 et NIT2, JAMES...). Les résultats de chaque galerie sont reportés sur les fiches d'identification sous forme de signes (+) pour les tests positifs et (-) pour les tests négatifs. L'interprétation des résultats et l'identification des isolats est effectuées à l'aide de l'outil Identax

1. Purification et caractérisation des bactéries du genre *Azotobacter*

Plusieurs repiquages ont été réalisés pour obtenir des isolats purs et pour permettre leur caractérisation macroscopique et microscopique. Neufs isolats ont été obtenus.

Les isolats sont désignés comme suit : PIA, PIC, PIE, PIF, PI1, PI2, PI5, PI6, PI7.

Les caractéristiques macroscopiques obtenues sont (**Figure10**) :

- Des colonies transparentes, brillantes, petites, opaques, lisses et avec un contour régulier
- Des colonies marron, brillantes ; de taille moyenne, opaques, lisses et avec un contour irrégulier
- Des colonies noires ; moyenne lisses, opaques, brillantes, et avec un contour irrégulier

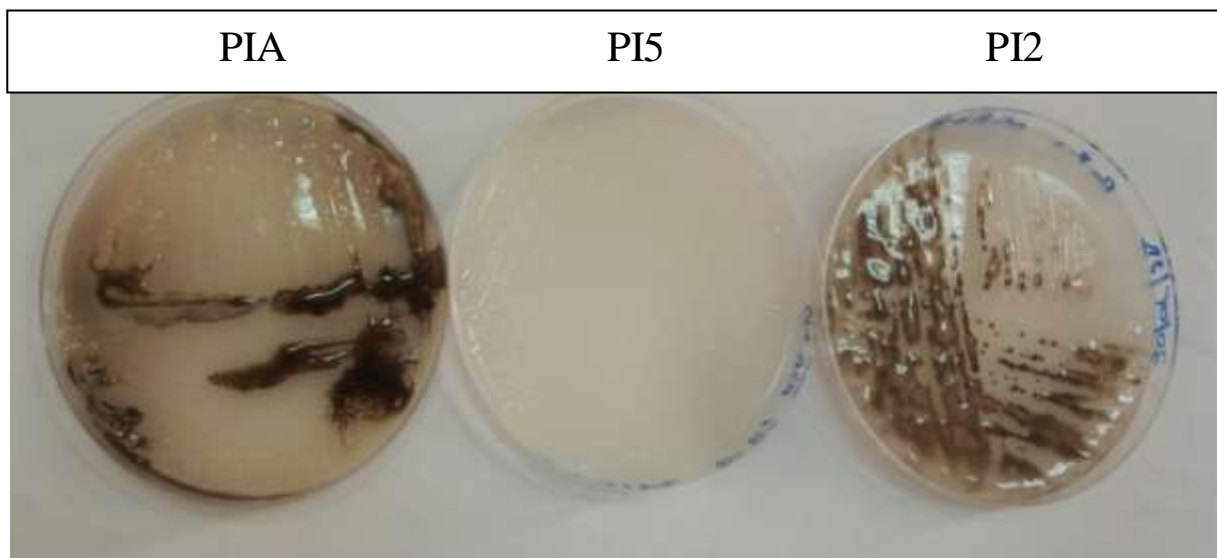


Figure10 : Aspects macroscopiques des isolats.

La coloration de Gram suivie d'une observation microscopique révèle que tous les isolats sont des bacilles à Gram négatif (**Figure11**).

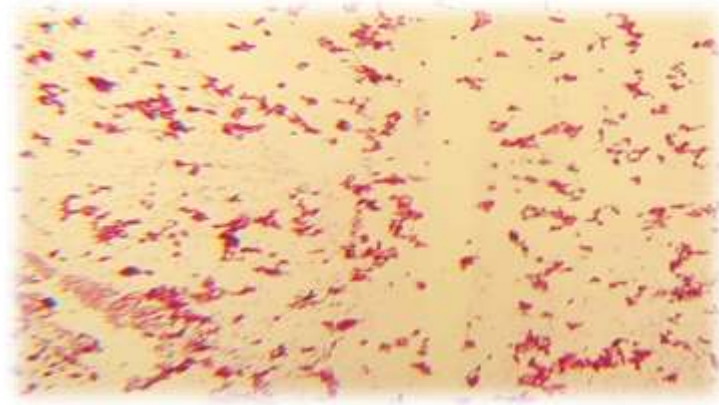


Figure11 : Observation microscopique de l'isolat PIA (Grossissementx100)

Une deuxième observation microscopique des cultures âgées l'aptitude des isolats PIA, PI1, PI2 à la formation des cystes (**Figure12**)

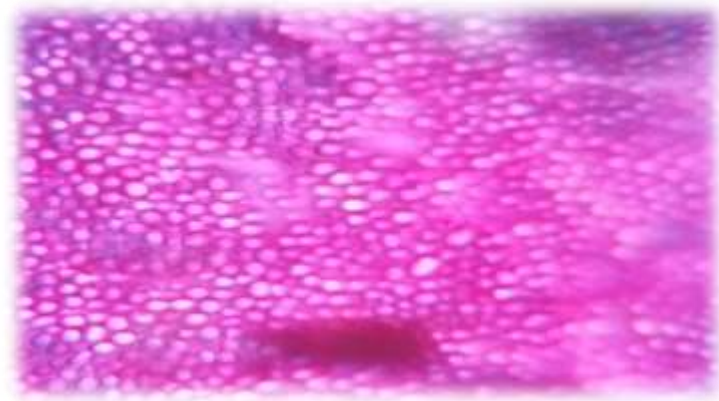


Figure12 : Observation microscopique de l'isolat PIA (Grossissementx100)

1.1. Test de la catalase

L'observation de la formation de bulles sur un fond sombre est la preuve que la bactérie possède l'enzyme catalase ayant servie à la dégradation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et à la formation d'un gaz. Un dégagement gazeux est constaté chez 100% isolats testés de ce fait, tous les isolats sont catalase positive (**Figure 13**).



Figure13 : Aspect d'un test catalase positif

1.2. Test de mobilité des isolats :

La mise en évidence du type respiratoire des neufs isolats testés a été réalisée sur le milieu de culture mannitol mobilité. Le test a révélé une bonne assimilation du mannitol par tous les isolats testés. La mobilité a été constatée chez les isolats : PI7 et PIE. Les isolats : PIA, PIC, PIF, PI1, PI2, PI5, PI6 sont immobiles (**Figure14**).

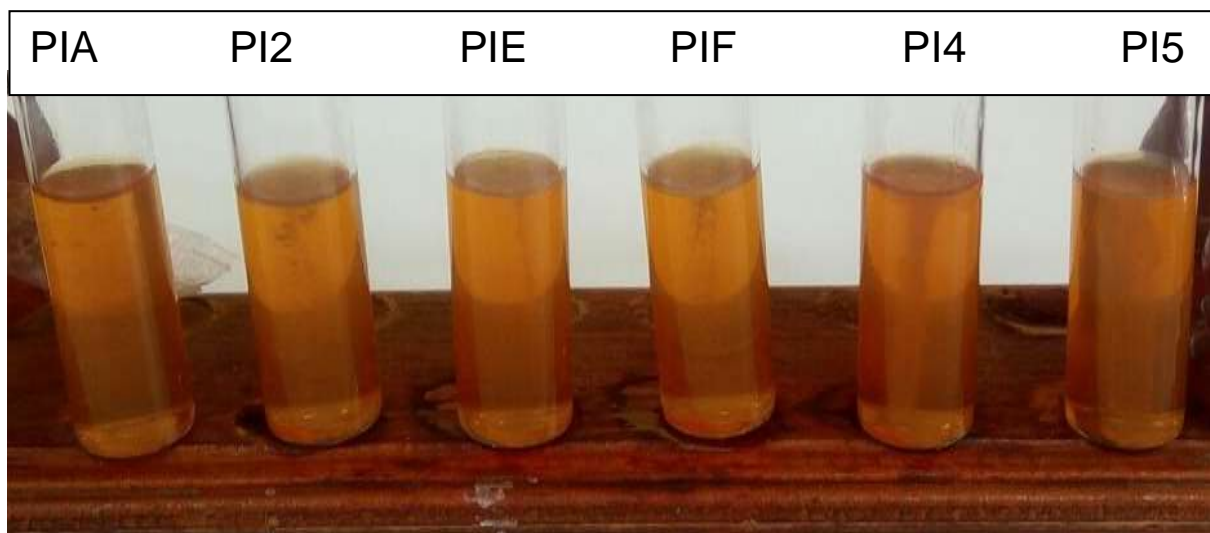


Figure14 : Aspect du milieu mannitol-mobilité ensemencé avec les isolats.

1.3. Mise en évidence du type respiratoire :

La caractérisation du type respiratoire de l'ensemble des isolats a été réalisée sur milieu de culture viande-foie (**Figure15**). Selon le niveau de croissance obtenu tous les isolats sont aérobies stricts : PIA, PIC, PIE, PIF, PI1, PI2, PI5, PI6, PI7.

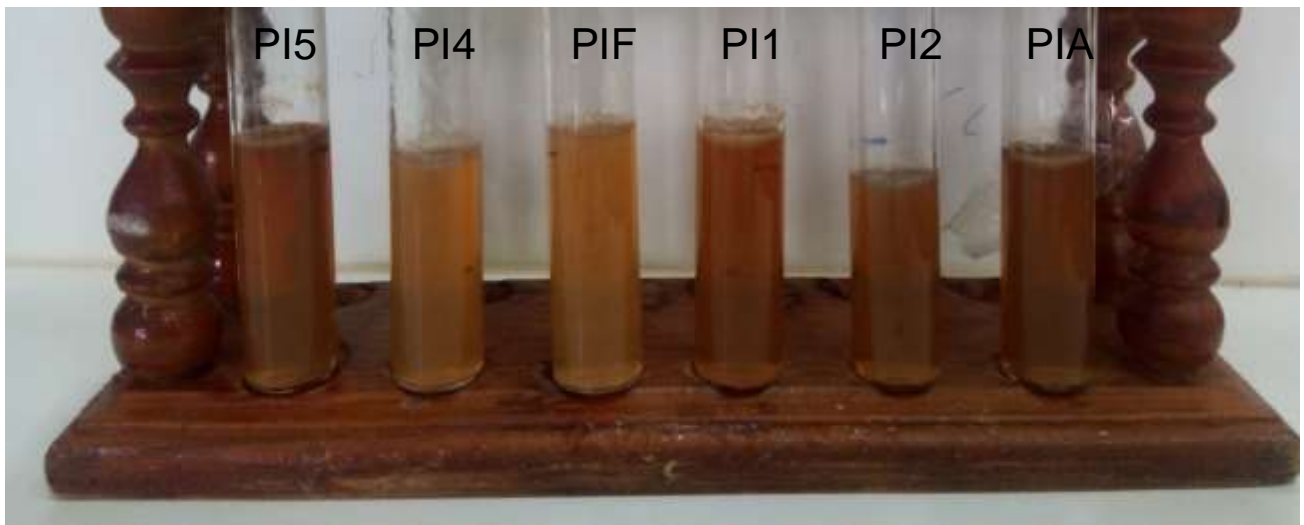


Figure15 : Aspect des isolats sur milieu Viande-Foie

2. Screening des isolats pour quelques activités PGP

2.1. Test de la solubilisation du phosphate

2.1.1. Test Solubilisation du phosphate sur milieu solide

La solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya solide est révélée après 5 jours d'incubation par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies. Elle est réalisée par 77% dont 55% ont exprimés un $IS \geq 2.5$ (**Figure16**). L'indice de solubilisation de l'isolat PI5 a atteint (4.5) suivie des isolats PI1 (3.5). Les isolats PIE et PIC présentent un $IS=0$ ce qui signifie que la solubilisation du phosphate par les deux isolats n'a pas été réalisée en milieu PVK solide.

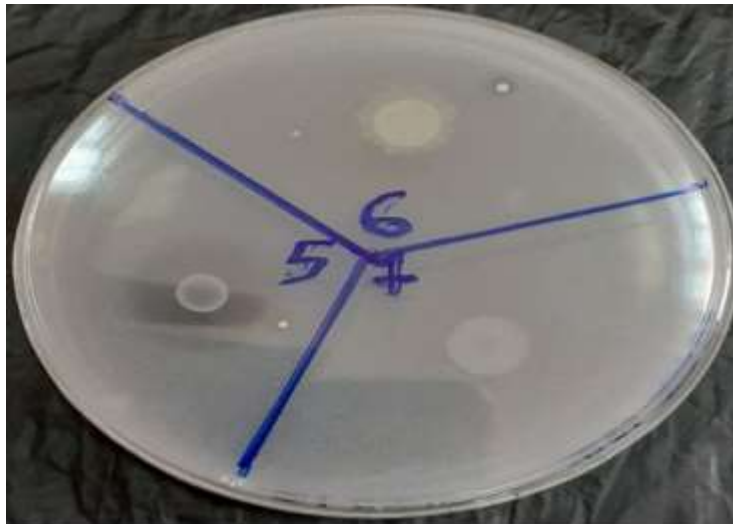


Figure16 : Résultats du test de solubilisation du tricalcuim phosphate par les isolats : PI5, PI7, PI6.

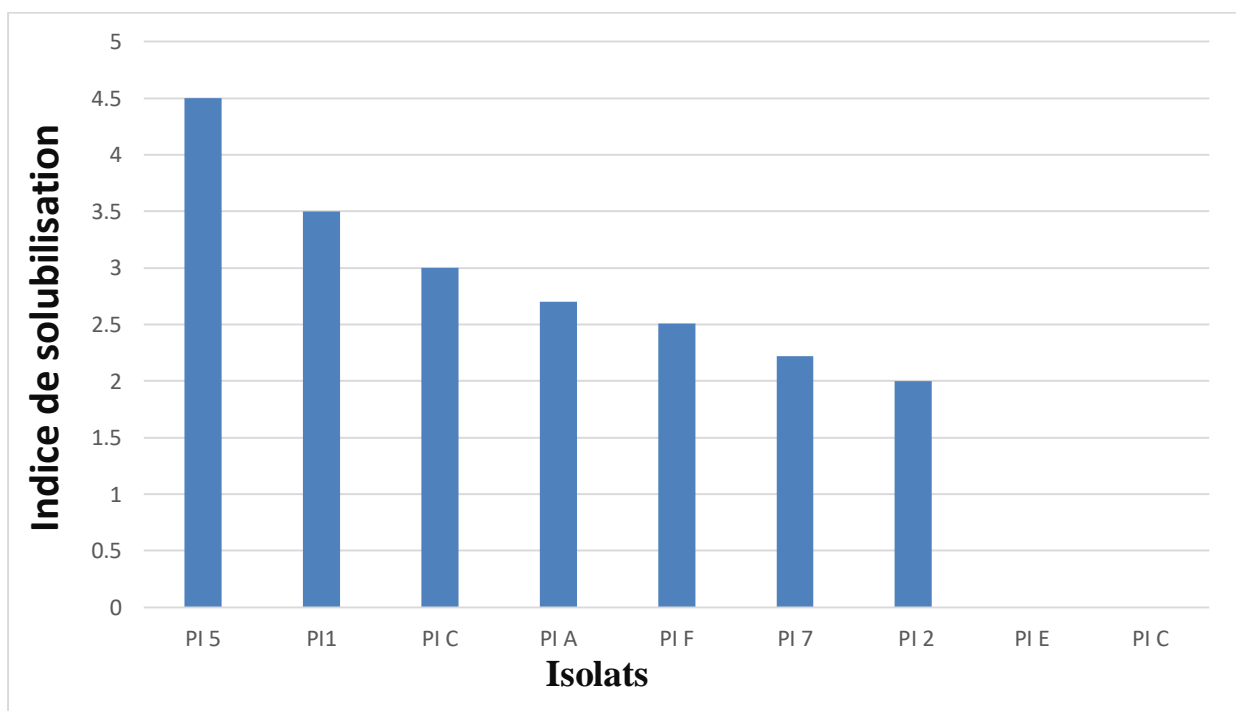


Figure17 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya solide.

2.1.2. Solubilisation du phosphate sur milieu liquide

L'évaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya liquide est réalisée par la méthode colorimétrique d'Olsen ([Olsen et Sommers, 1995](#)). Les taux de phosphore soluble produit sur milieu liquide sont

déterminés en se référant à la courbe d'étalon (Figure18).

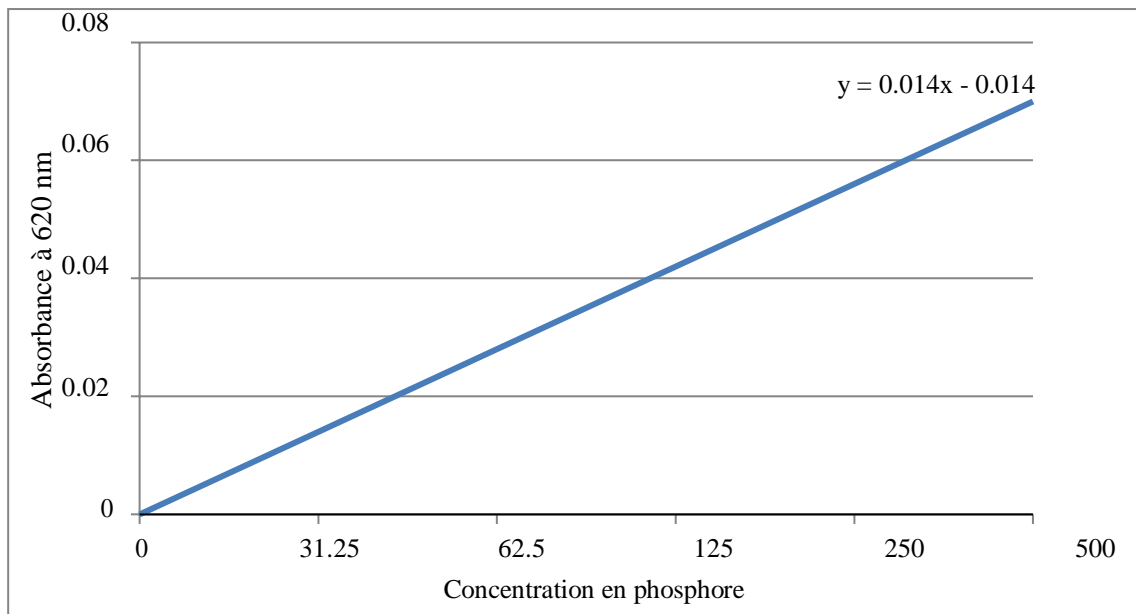


Figure18: Courbe standard du dosage du phosphore produit.

La quantité de phosphate solubilisée sur milieu Pikovskaya liquide varie de 26.42 à 48.17 µg/ml. Le maximum est atteint par l'isolat PIF (48.17 µg/ml) suivie par PIC (44.64µg/ml) et PIE (43.67 µg/ml) (Figure19).

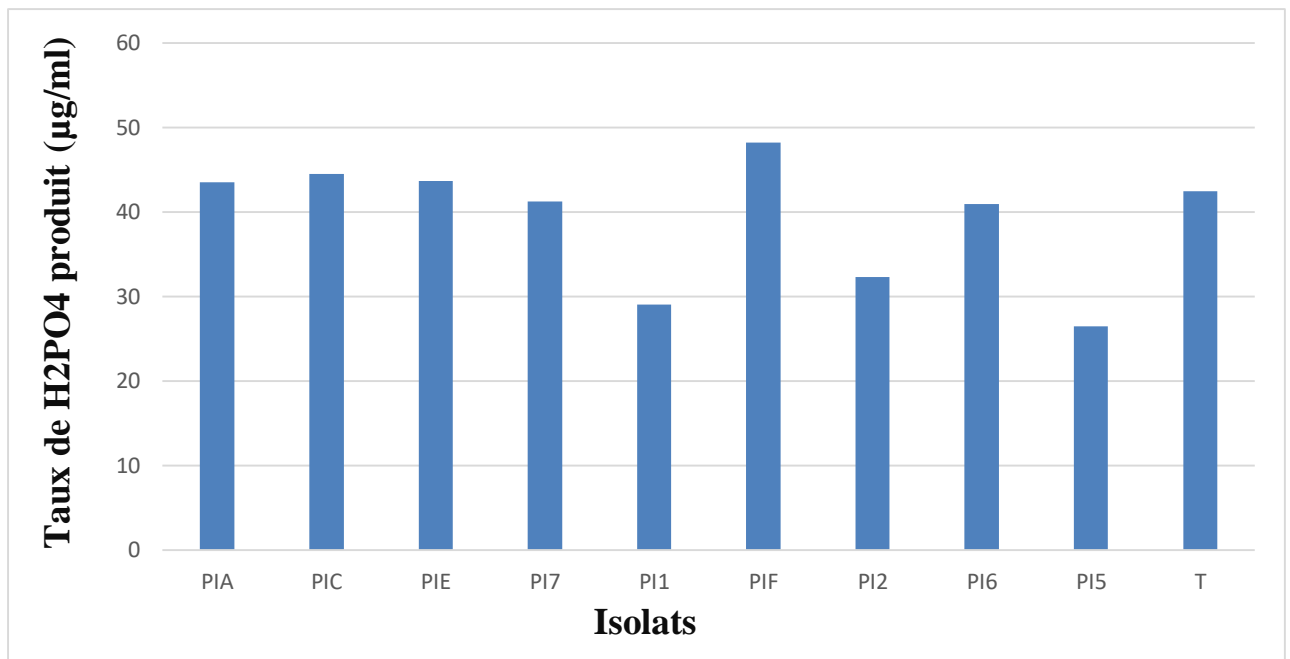


Figure19 : Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya liquide.

2.2. Screening des isolats pour la production des phytohormones

L'activité de production de phytohormones chez les souches sélectionnées isolées fixatrices d'azote est mise en évidence sur milieu de culture Luria-Bertani additionné de 0.06% de SDS et 1% de glycérol, en présence et en absence du L-tryptophane (5g/l) comme précurseur. L'activité de production de l'acide indole acétique est absente chez l'ensemble des souches isolées sur le milieu LB solide en absence du L-tryptophane. Par ailleurs, 8 souches de l'ensemble des isolats testés ont montré une production de l'acide indole acétique en présence du L-Tryptophane qui se manifeste par l'apparition d'une couleur rouge (**Figure 23**). La production de l'acide indole acétique est proportionnelle à l'intensité de la couleur rouge. Seul l'isolat PI7 se montre incapable de produire l'acide indole acétique ce qui se traduit par une absence de virage de couleur. Aucun signe de la production des gibbérellines n'a été mis en évidence chez l'ensemble des isolats.



Figure20 : Production d'acide indole acétique par les isolats sur milieu Luria Bertani solide additionné de (5g/l) de L-tryptophane

2.3. Quantification de la production d'acide indole-acétique

La production de l'acide indole acétique est évaluée, selon la technique rapportée par [Acuña et al., \(2011\)](#), sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence et en absence du L-tryptophane (5g/l). Tous les isolats sélectionnés

fixateurs d'azote s'avèrent capable de produire l'acide indole acétique en présence et en absence du précurseur. Des taux élevés de production sont révélés en sa présence, ainsi l'ajout de 5g/l de L-Tryptophane accroît la production d'acide indole acétique. Le taux maximal de production est de 18.5 ($\mu\text{g/ml}$).

En absence du précurseur deux groupes de production de l'acide indole acétique ont été découverts : le premier groupe consomme l'acide indole acétique contenu dans le milieu sans en faire la production ; le deuxième groupe consomme et produit l'acide indole acétique (**Figure21**).

La culture des isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur le milieu de culture Luria Bertani, additionné d'une concentration de (5g/l) de L-tryptophane, permet une production de (18.5 $\mu\text{g/ml}$) de l'acide indole-acétique chez l'isolat (PIA), les isolats PI1 et PIC ont produits des concentrations de 11.04 $\mu\text{g/ml}$ et 9.37 $\mu\text{g/ml}$, respectivement (**Figure 23**).

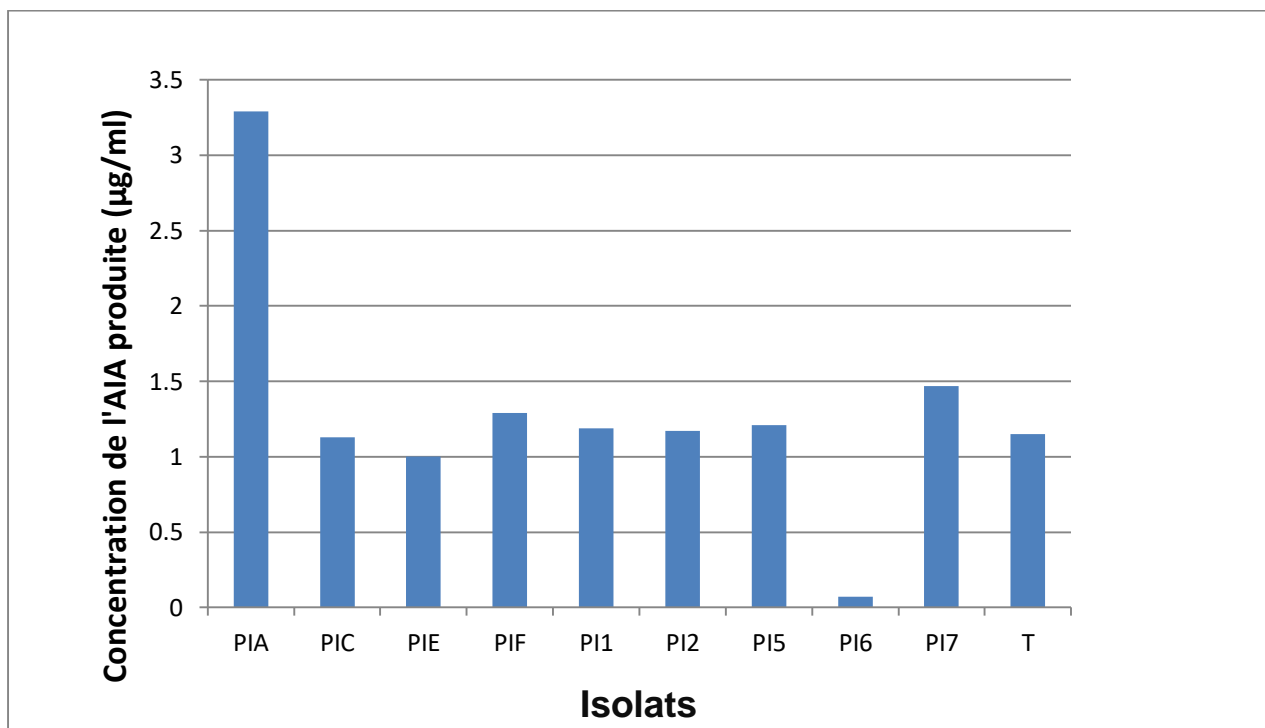


Figure21: Concentrations d'AIA produites par les isolats sélectionnés fixateurs d'azote sur milieu de culture Luria-Bertani.

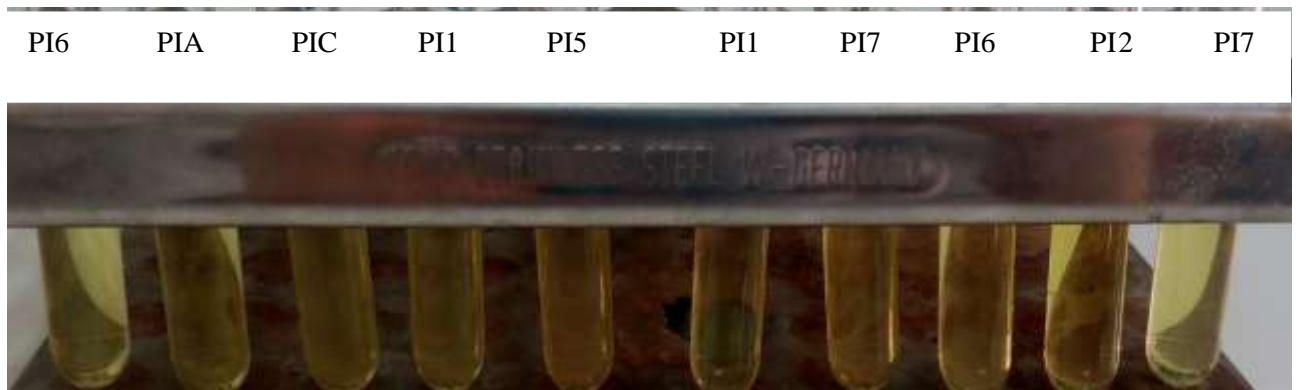


Figure22: Production de l'acide indole acétique chez les isolats sélectionnés fixateurs d'azote, inoculés sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide

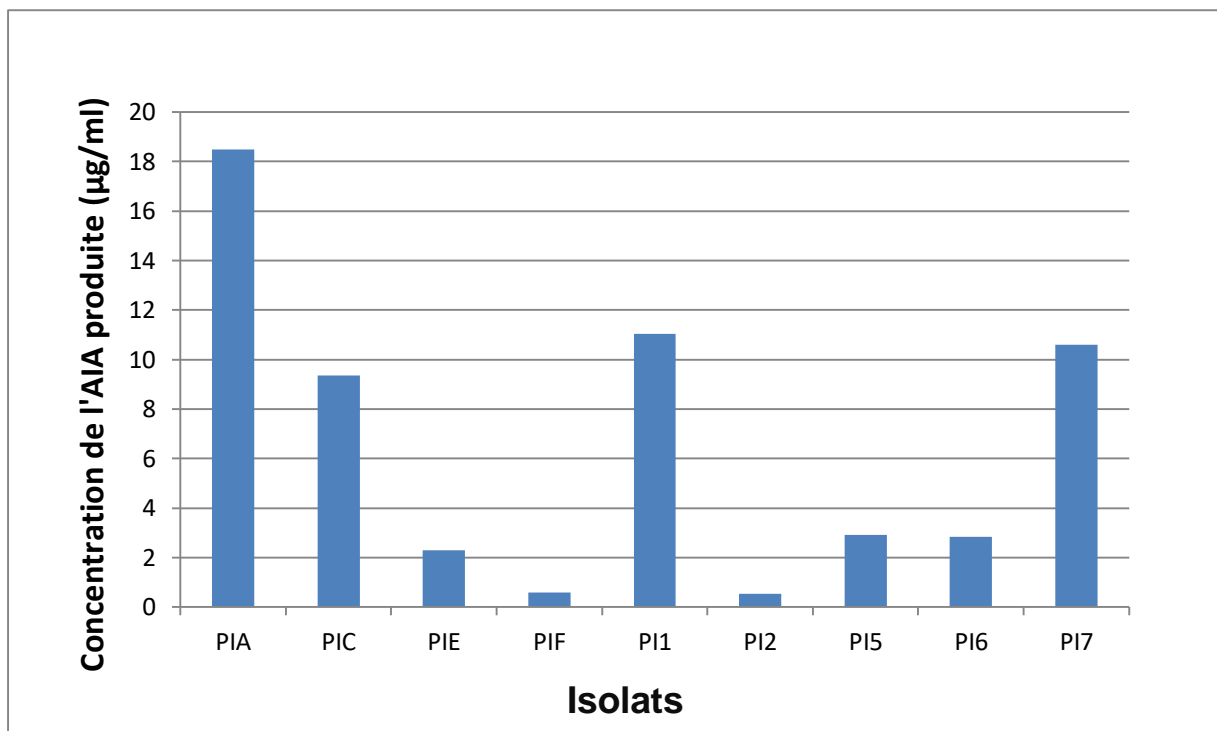


Figure 23 : Production de l'acide indole acétique chez les isolats sélectionnés fixateurs d'azote, inoculés sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence de (5g/l) de L-tryptophane.

Une production modérée de l'acide indole-acétique ([AIA] <10 µg/ml) est observée chez les isolats PIC, PIE, PI5, PI6. En revanche, la production de l'isolat PIF et PI2 n'a pas dépassé 0.59µg/ml.

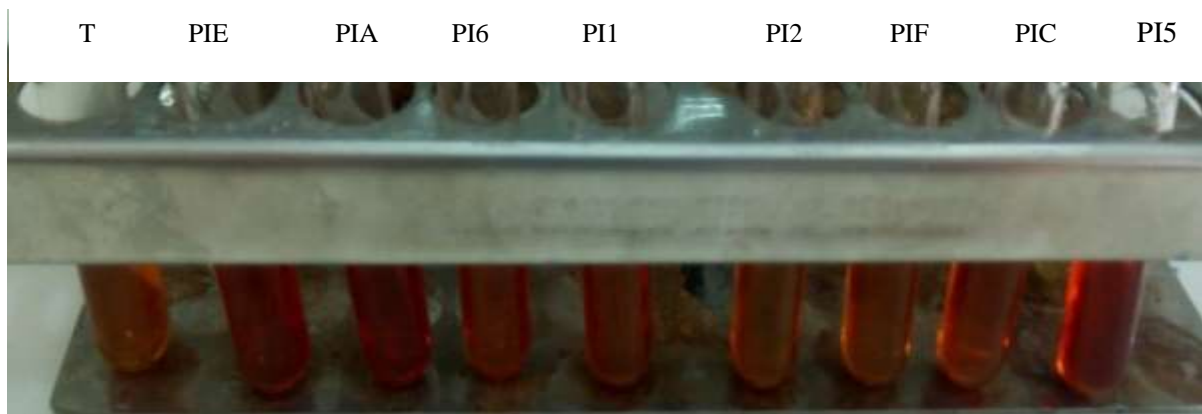


Figure24: Production de l'acide indole acétique chez les isolats sélectionnés fixateurs d'azote, inoculés sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence de (5g/l) de L-tryptophane.

Les taux de production d'acide indole-acétique sont déterminés en se reportant à la courbe étalon (**Figure 25**).

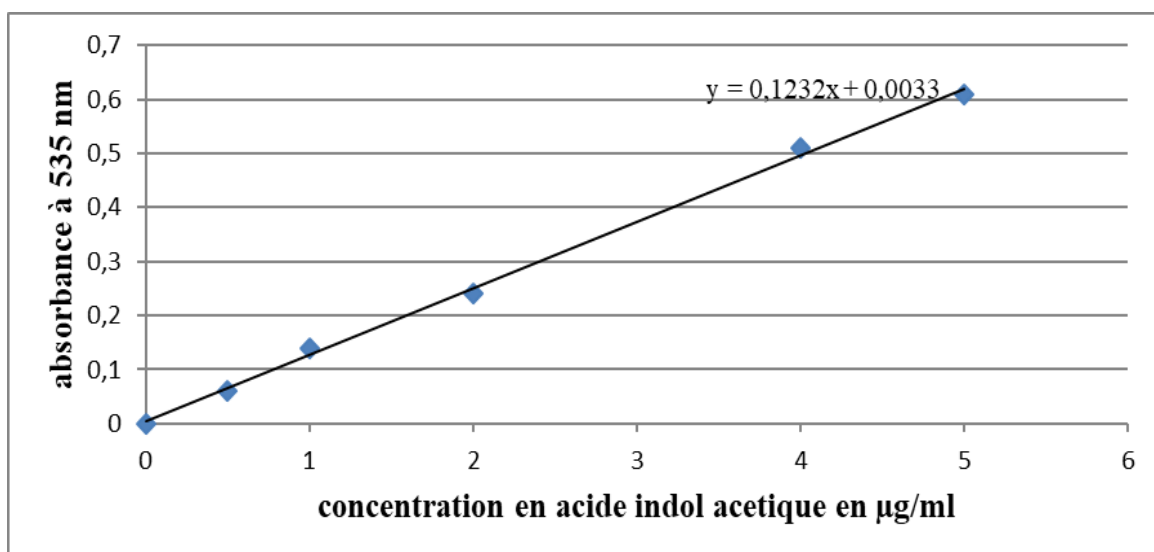


Figure 25 : Courbe standard du dosage de l'acide indole acétique.

2.4. Production d'ammoniac (NH₃)

Ce test est réalisé selon la méthode de **Capuccino et Sherman (1992)** avec modifications. L'ajout du réactif de Nessler après centrifugation des cultures permet une appréciation qualitative de l'aspect du milieu. Les taux de production d'ammoniac sont obtenus en se rapportant à la courbe d'étalon. (**Figure 26**).

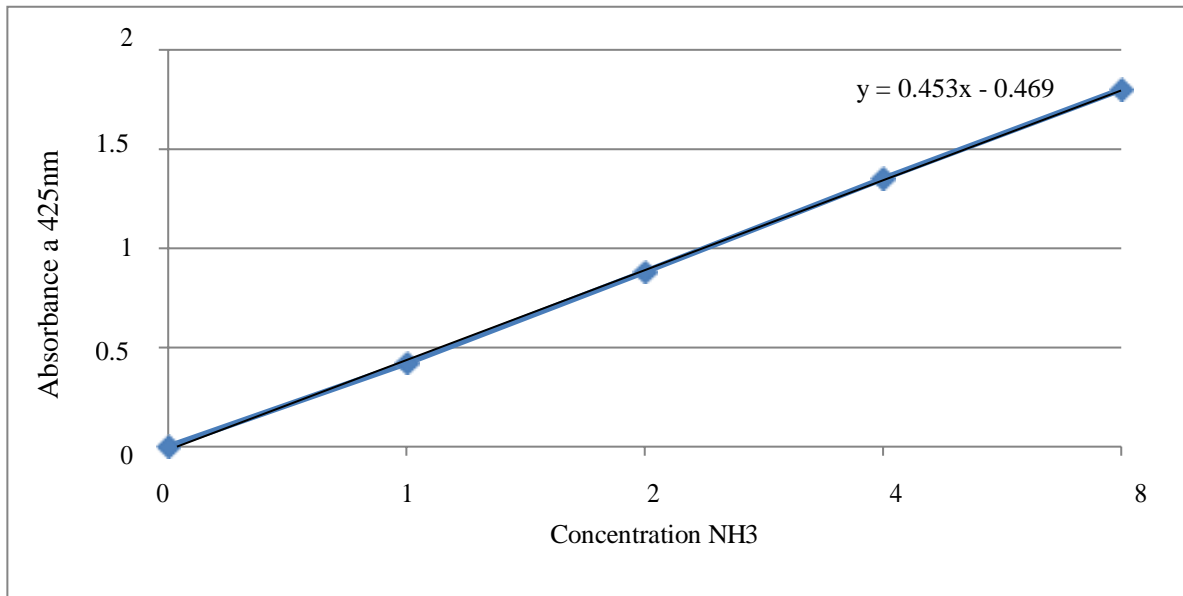


Figure 26: Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH₃.

Parmi les isolats sélectionnés fixateurs d'azote 100% se sont révélés capables de produire l'ammoniac par la formation d'une couleur orange (Figure 27).

PI5 PI6 PI7 PIA PIF PIE PIC PI2 PI1

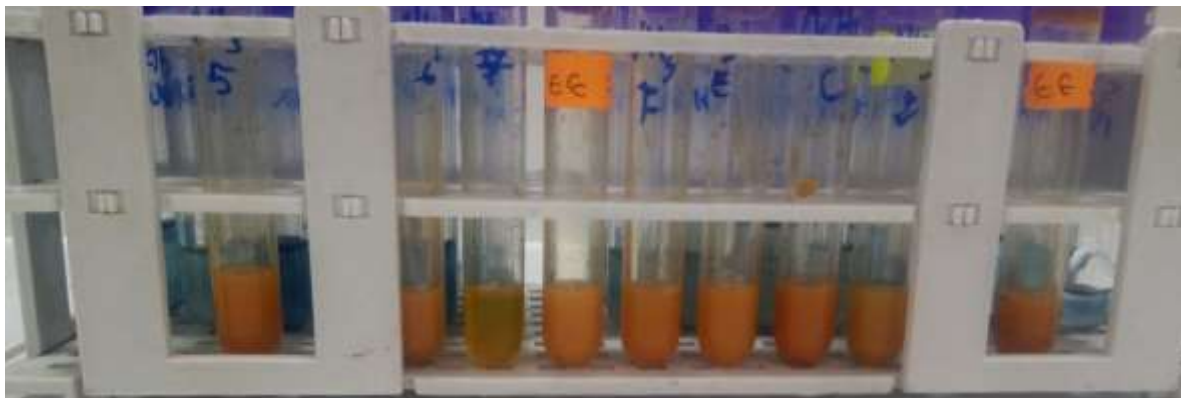


Figure 27: Résultats de la capacité des neuf isolats à produire l'ammoniac (NH₃).

Les taux de production d'ammoniac NH₃ ont variés de 2.33 mg/ml à 6.38 mg/ml. Le taux maximal est observé avec les isolats PIC, PIE, PI2, PI5 (6.38 mg/ml) Pour le reste des isolats, les taux de NH₃ produits varient de 4.32mg/ml a 6.02mg/ml. (Figure 28).

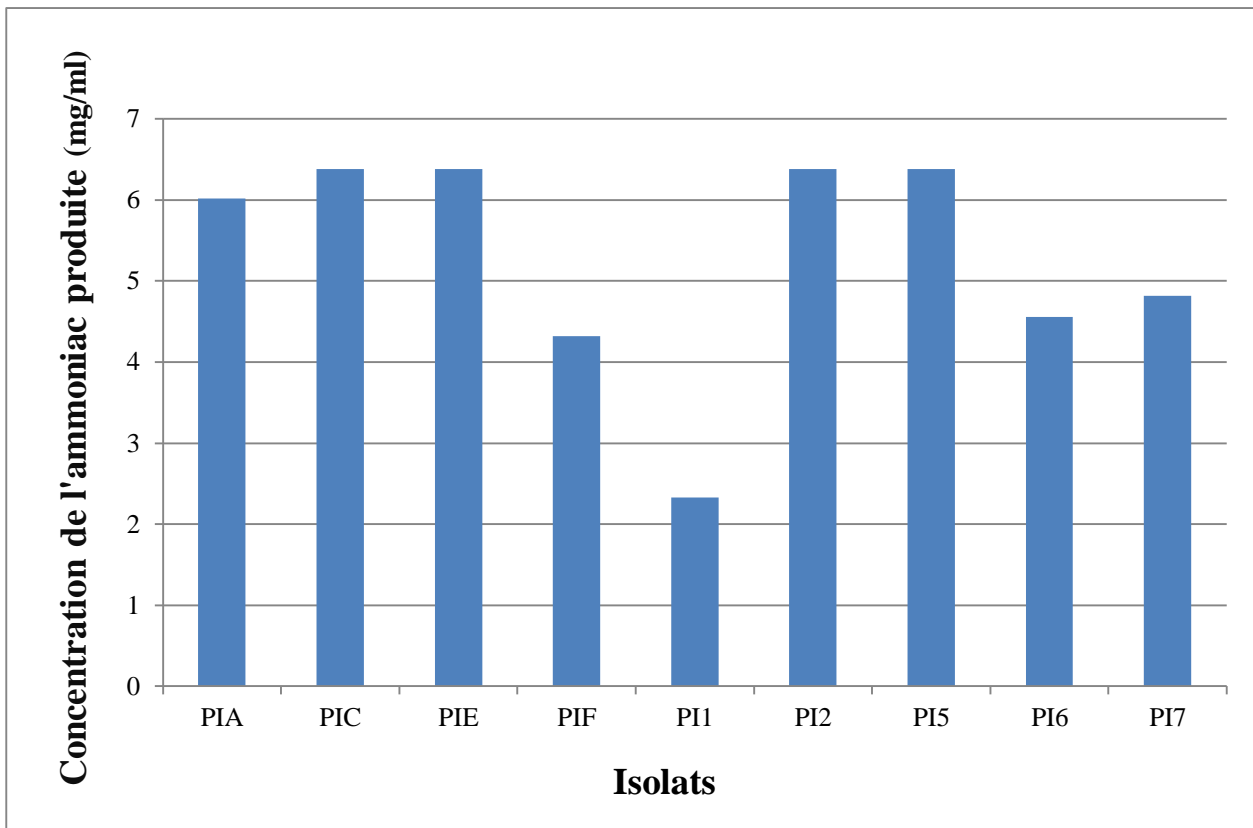


Figure 28: Concentrations d'ammoniac (NH_3) produites par les isolats.

3. Optimisation de la production de l'acide indole acétique

3.1. Effet de la concentration en L-tryptophane sur la production de l'AIA

La capacité des isolats bactériens à produire l'AIA a été testée en utilisant des concentrations croissantes de L-Tryptophane (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8 et 0.9 %). Les taux de l'AIA produits par l'isolat bactérien étudié varient entre 1.68 $\mu\text{g/ml}$ et 6.15 $\mu\text{g/ml}$ en fonction de la concentration du L-tryptophane.

La concentration de l'AIA la plus élevée a été obtenue avec une concentration de 0.7% de L-Tryptophane avec 6.15 $\mu\text{g/ml}$ d'AIA produite. (Figure 29).

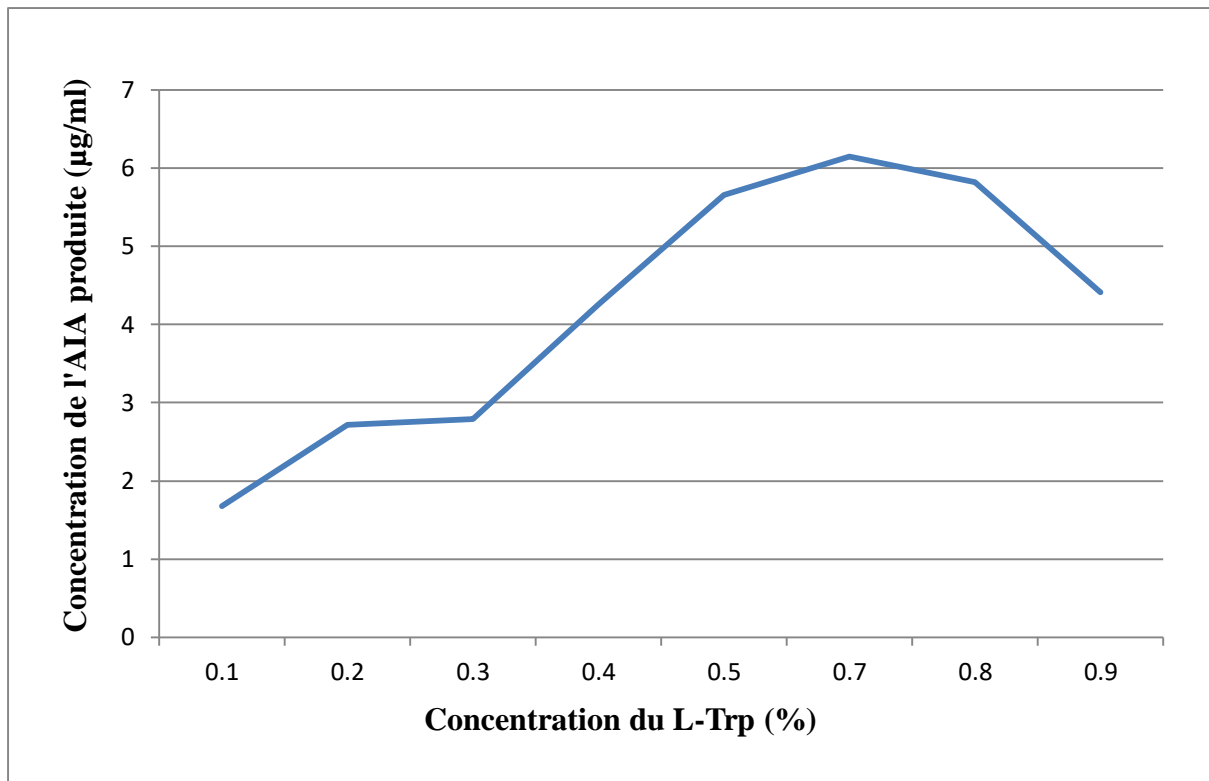


Figure29 : Effet de la concentration du L-Tryptophane (%) sur la production de l'AIA

Le taux de production de l'AIA par l'isolat bactérien augmente avec l'augmentation de la concentration du L- tryptophane avec un optimum de production à une concentration de 0.7 % de L-Tryptophane.

3.2. Effet du pH sur la production de l'AIA

L'effet des variations des valeurs du pH sur la production de l'acide indole acétique a été évalué dans un intervalle de pH allant de 3 à 9 (Figure 30).

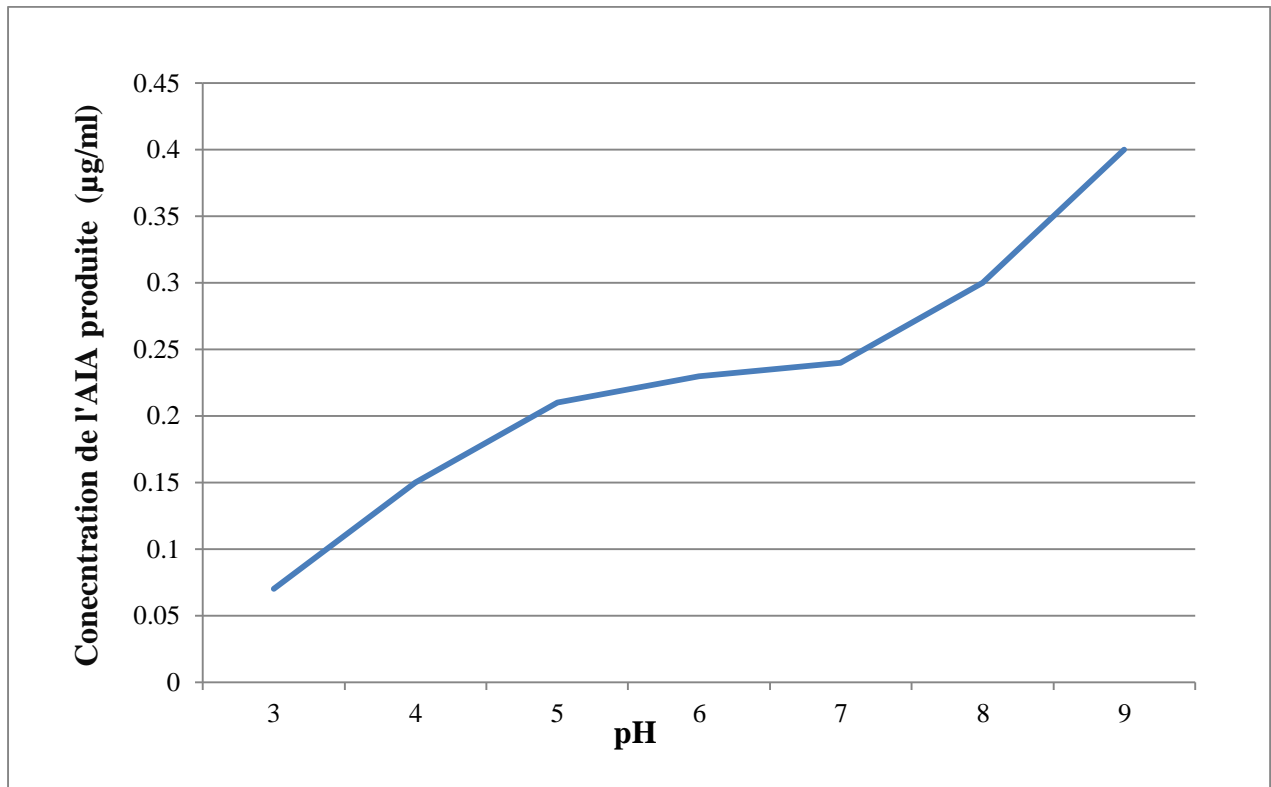


Figure30 : Effet du pH sur la production de l'AIA

Les quantités de l'AIA produites par l'isolat bactérien étudié varient de 0.07 à 0.4 µg/ml. La concentration la plus élevée a été obtenue à pH 9 avec 0.4 µg/ml d'AIA produite. Les concentrations les plus faibles d'AIA ont été obtenues à pH =3 et pH= 4.

3.3. Effet de la salinité sur la production de l'AIA

L'ajout de différentes concentrations de NaCl qui vont de 1 à 5% permet d'évaluer la capacité de l'isolat bactérien PIA à produire de l'acide indole acétique dans les conditions de stress salin (Figure 31).

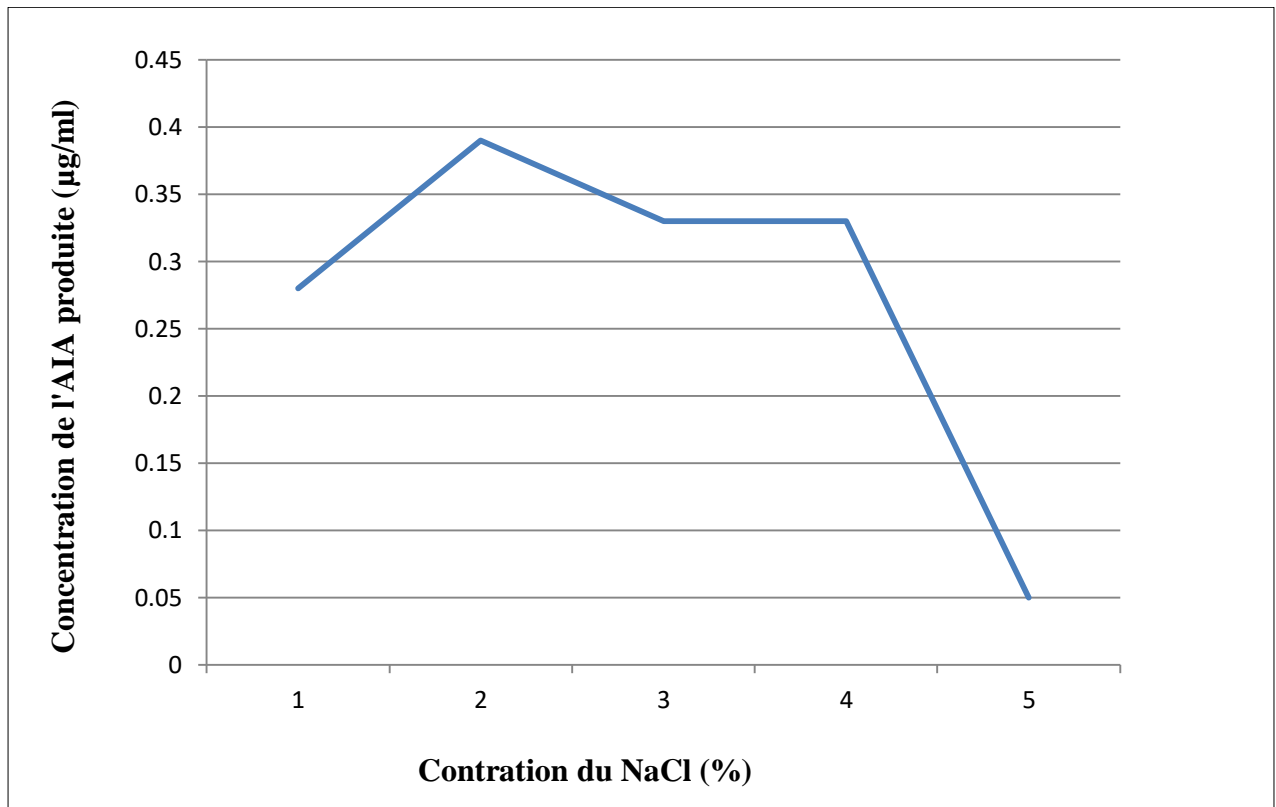


Figure 31 : Effet de la salinité sur la production de l'AIA.

Une production optimale de l'acide indole acétique a été obtenue par addition de 2% de NaCl avec une concentration d'AIA produite de 0.39(µg/ml).

3.4. Effet de la période d'incubation sur la production de l'AIA

L'effet du temps d'incubation sur la production de l'acide indole acétique a été évalué après sur une période d'incubation de 6 jours avec des intervalles de lecture de 24, 48, 72, 144 et 168 heures.

Les valeurs de la densité optique enregistrées chez l'isolat bactérien étudié augmentent progressivement en fonction du temps d'incubation variant entre 0 et 0.4 (µg/ml) (**Figure32**).

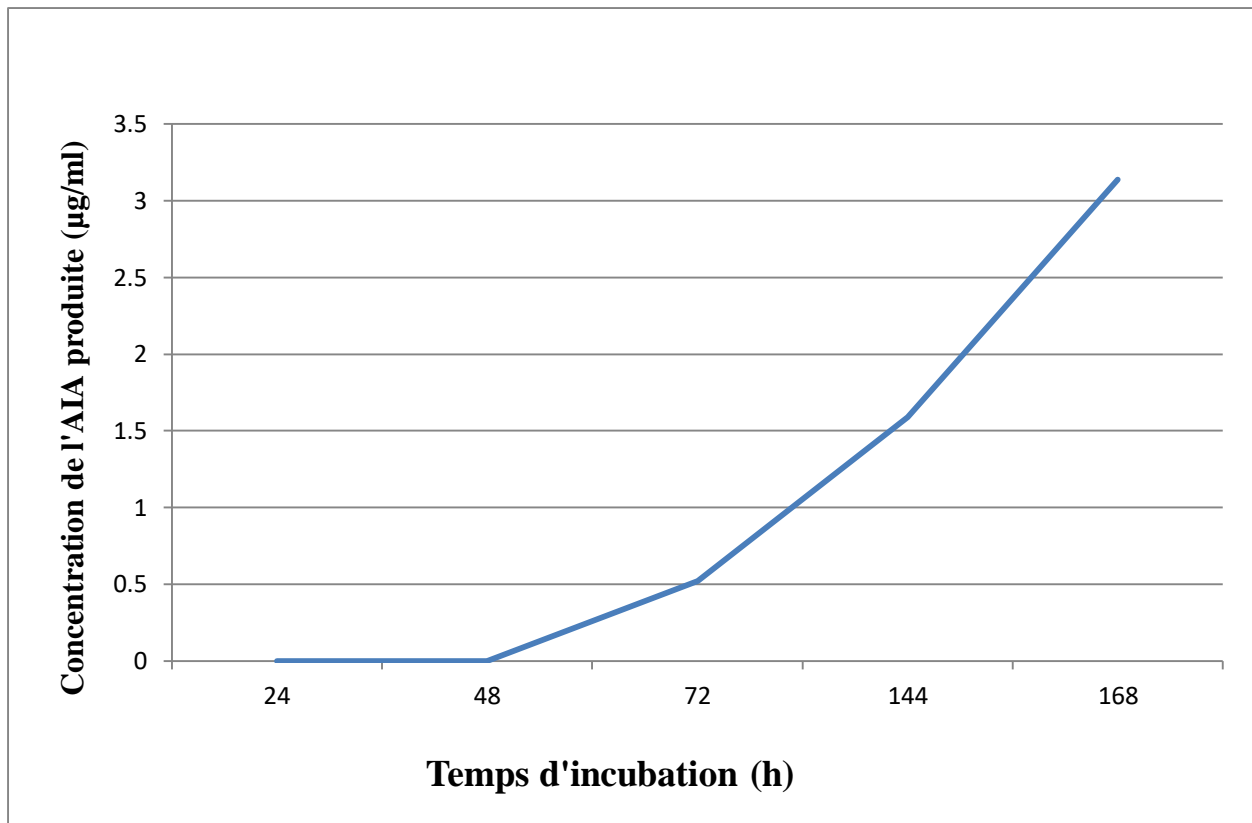


Figure 32 : Effet de la période d'incubation sur la production de l'AIA

Ces valeurs atteignent leur maximum au 6^{ème} jour d'incubation ce qui correspond à un optimum de croissance de 0.4(µg/ml).

3.5. Effet de l'agitation sur la production de l'AIA

La mise en culture de l'isolat sélectionné fixateur PIA en agitation et sans agitation durant toute la durée d'incubation permet de comparer les taux de production de l'acide indole acétique dans ces deux conditions et de déterminer l'effet de ce paramètre sur l'activité de production de l'AIA (**Figure 33**).

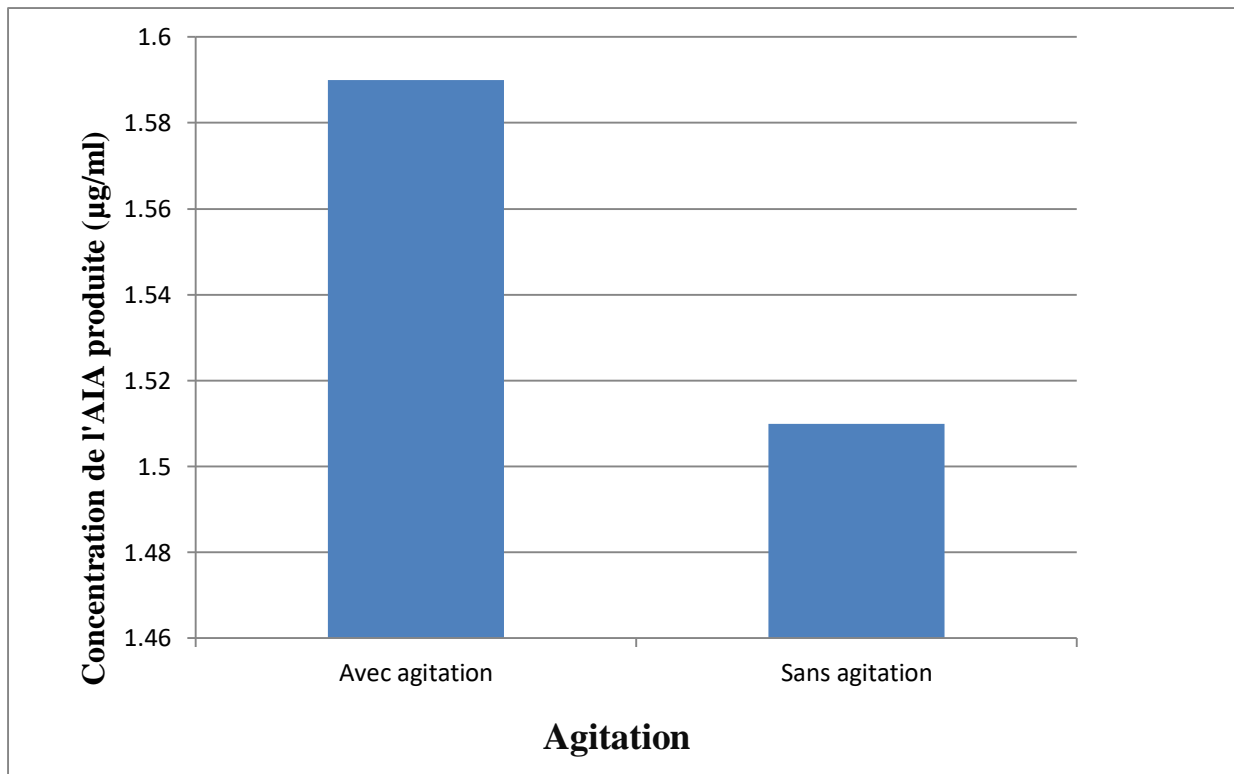


Figure33: Effet de l'agitation sur la production de l'AIA par l'isolat PI A.

L'analyse des résultats obtenus a montré que la production de l'AIA est plus élevée dans des conditions d'agitation (1.59 µg/ml) par rapport à la production en condition statique.

3.6. Effet de la température sur la production de l'AIA

La température d'incubation apparait comme un facteur agissant sur la capacité des isolats à produire l'acide indole acétique. L'effet des différentes températures (30, 35, 40,45 et 50° C) sur la production d'AIA est représenté sur la [\(Figure 34\)](#)

Pour l'isolat sélectionné fixateur d'azote PIA étudié ; la température de 30°C était optimale pour la production de l'AIA avec un taux de production de 2.09 µg/ml. Un décroissement graduel des taux de production d'AIA est constaté aux températures égales ou supérieures à 37°C.

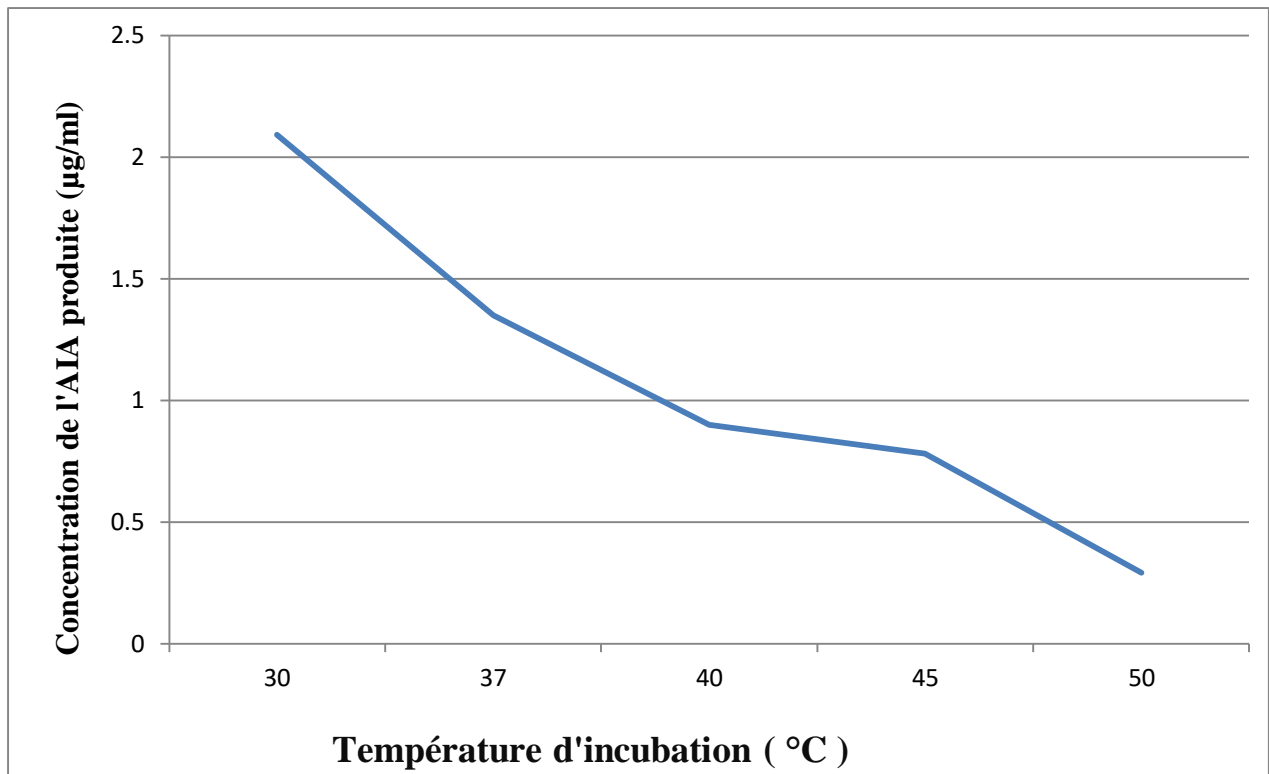


Figure 34 : effet de la température d'incubation sur la production de l'AIA

3.7. Effet de la source de carbone sur la production de l'AIA

L'effet des différentes sources de carbone sur la capacité de l'isolat bactérien à produire l'AIA a été étudié en utilisant plusieurs sources de carbone dans le milieu de culture (**Figure 35**). Les sources de carbone utilisées sont : Le glucose, le mannitol, le saccharose et le galactose.

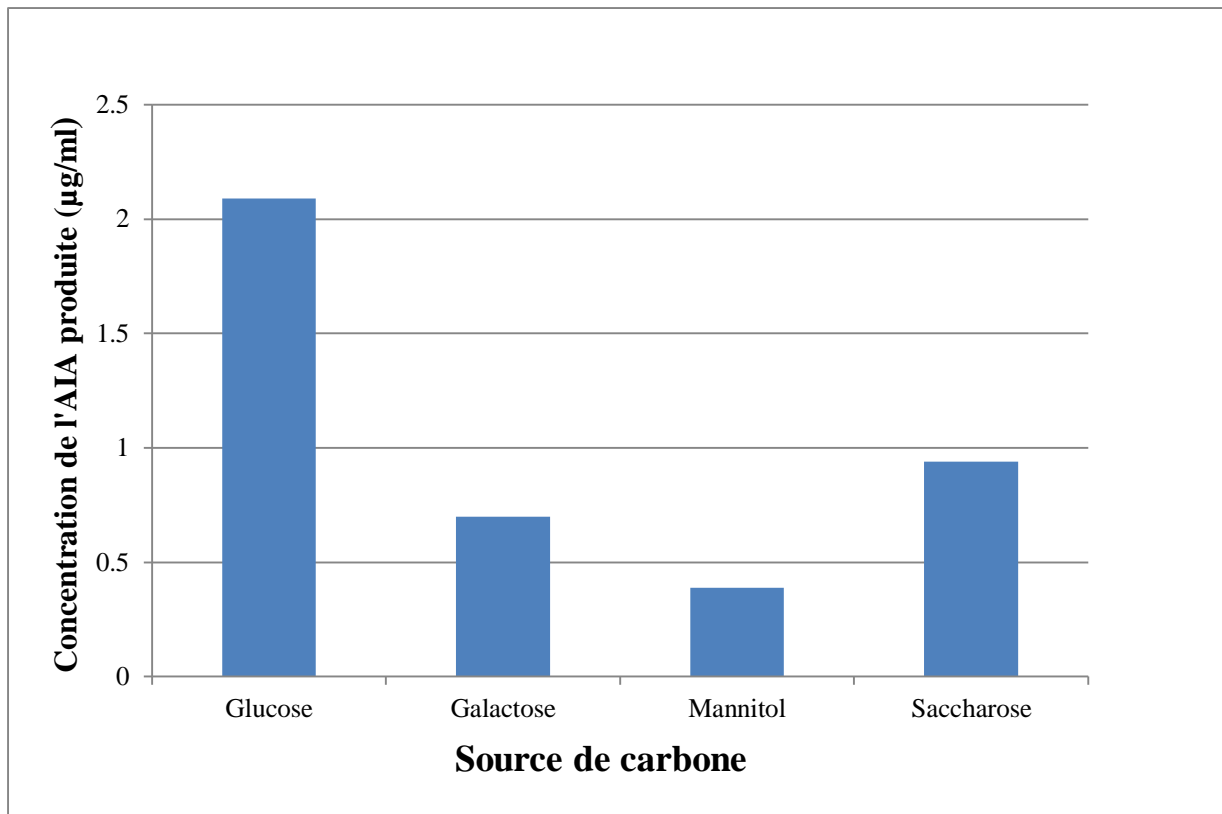


Figure 35 : Effet de la source de carbone sur la production de l'AIA

Les concentrations d'AIA produites varient en fonction des différentes sources de carbone de 0.39 à 2.09 µg/ml où le maximum de production a été obtenu en utilisant le glucose comme source de carbone avec un taux de production de 2.09 µg/ml. Des faibles concentrations ont été obtenues en utilisant le galactose et le mannitol

3.8. Effet de la source d'azote sur la production de l'AIA

Plusieurs sources d'azote ont été testées pour optimiser la production de l'AIA par l'isolat PIA dans le milieu de culture et qui sont : la tryptone, la peptone, l'extrait de levure et l'extrait de viande (**Figure36**). La meilleure concentration produite a été obtenue en utilisant la peptone avec 0.14 µg/ml.

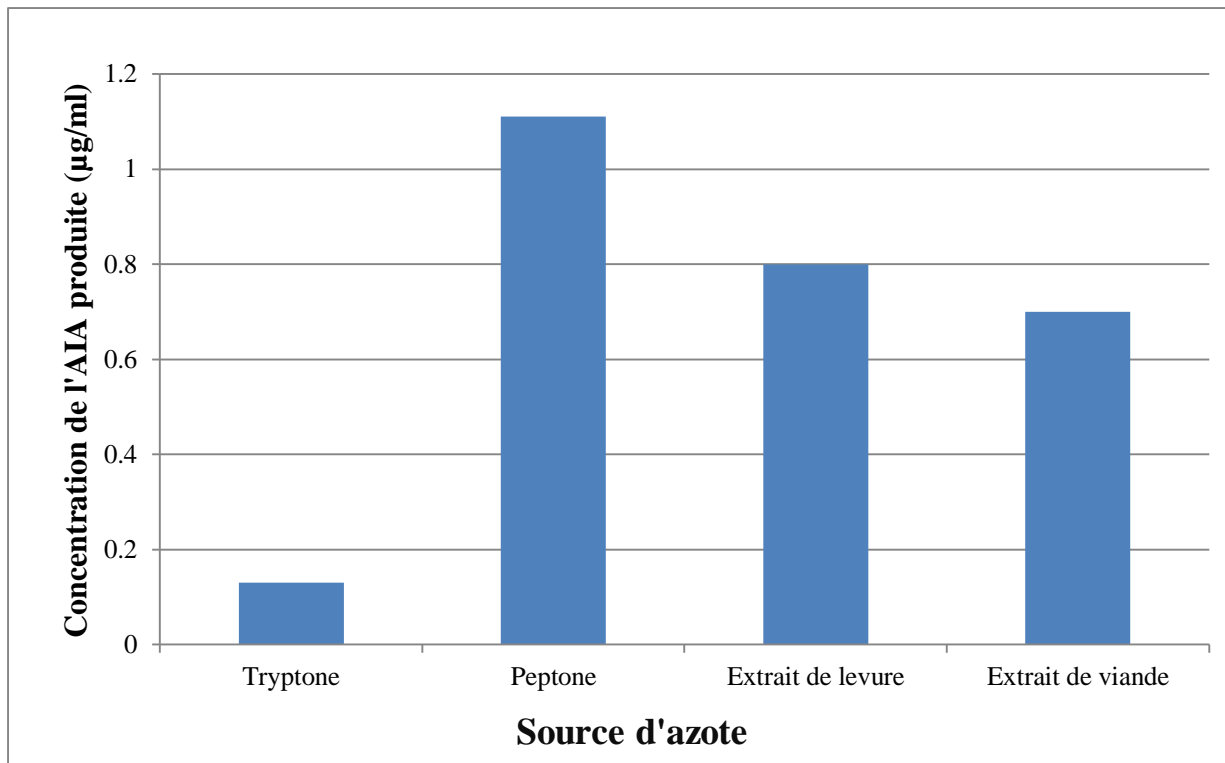


Figure36 : Effet de la source d'azote sur la production de l'AIA

4. Identification biochimique de l'isolat PIA par la galerie Api 20E et API 50 CH

A la lumière des résultats obtenus, la souche PIA a été sélectionnée pour faire l'objet d'une identification phénotypique.

L'identification est réalisée via l'ensemencement des galeries API 20E et API 50 CH et le profil biochimique obtenu a servi à une interprétation pro balistique par l'usage du logiciel informatique Identax bacterial identification system version 1.2 (Figure 37).

Dans ce cas, l'identification de la souche PIA est faite en se référant à une matrice d'identification élaboré à partir des tableaux d'identification fournis dans Bergey's manual of systematic bacteriology pour le genre *Azotobacter* (Brenner *et al.*, 2005). Pour cela, un espace de travail est créé sur l'application identax, la matrice est importée et les résultats sont introduits (Figure 37, Figure 38). A la fin, un résultat s'affiche sur l'écran et un rapport détaillé est établie.



Figure 37: Identax bacterial identification system version 1.2. **a** : création de l'espace de travail. **b** : importation de la matrice d'identification. . **c** : les grilles des résultats. **d** : affichage du résultat sur écran

Selon le Bergey's manual of systematic bacteriology (**Brenner *et al.*, 2005**), la souche PIA partage les caractéristiques suivantes avec les bactéries du genre *Azotobacter* : le type respiratoire, la mobilité , l'incapacité à la production des spores, la forme des cellules, la production de cystes, la production de pigment dans les cultures âgées de plus de trois jours, la production de la catalase, la dégradation du glucose, l'incapacité à la production de H₂S et la dégradation variable du rhamnose, du mannitol, du

sorbitol, du mélibiose et de l'inositol. La souche est identifiée comme appartenant au genre *Azotobacter*.

Suite à l'analyse du profil biochimique de la souche PIA, la souche est identifiée comme *Azotobacter Armeniacus* avec un score d'identification de **99.94%** (Figure 38).

```

-
5 spores -
6 Mobilité -
7 Fluorescence marron - noir +
8 Réduction des nitrates en nitrite -
9 D- Glucuronate -
10 Rhamnose -
11 méso-Inositol +
12 Tréhalose +
13 Amidon +
14 mobilité -
15 32°C +
16 37°C +
17 Uréase -
18 H2S -
19 Fructose +
20 glucose +
21 pyruvate +
22 DL- gluconate -
23 lactose +
24 mannose +
25 xylose +
26 arabinose +
27 fucose -
28 sucrose +
29 trehalose +
30 melibiose +
31 maltose +
32 raffinose +
33 glycerol +
34 mannitol +
35 sorbitol +

++++ Identification results ++++++
Identification OK with a threshold of 95,00%
Best scored taxon: A. armeniacu Score: 99,94%
++++ Other taxa scores ++++++

```

Figure 38 : Rapport d'identification de la souche PIA.



Figure 39 : Profiles biochimiques de la souche PIA.

La capacité des bactéries rhizosphériques à influencer le statut hormonal des plantes, par la production bactérienne ou le métabolisme des hormones, est considéré comme un mécanisme important par lequel elles favorisent la croissance et la productivité des plantes. Ces micro-organismes peuvent influencer directement la croissance des plantes en synthétisant des hormones stimulant la croissance et en métabolisant des hormones inhibitrices de croissance. L'importance des hormones dans la médiation de telles interactions plante/microbe a été mise en évidence par des expériences montrant que l'inoculation de PGPR provoque des changements cruciaux dans l'expression des gènes végétaux à médiation hormonale. Les effets des PGPR sur la régulation hormonale des plantes sont importants non seulement pour favoriser directement la croissance des plantes, mais aussi dans d'autres aspects de l'action du PGPR sur les plantes, tels que l'amélioration de la nutrition minérale ou la résistance des plantes aux stress biotiques. Les hormones végétales régulent des processus d'une importance vitale chez les plantes tels que la nutrition minérale, les relations hydriques, la résistance aux agents pathogènes et les fonctions antioxydantes.

L'isolement de souches PGPR du genre *Azotobacter* ayant le potentiel de produire les phytohormones de croissance qui ont fait l'objet de cette étude a été effectué à partir de la rhizosphère des plantes de blé dur cultivées sur le sol de la région Bouchebka wilaya de Sidi Bel Abbés. Plusieurs repiquages des cultures fournies sont réalisés sur gélose du milieu Ashby afin d'obtenir des isolats de souches bactériennes jeunes et pures caractéristiques du genre *Azotobacter*. La purification a abouti à l'obtention de neuf isolats d'aspects macroscopiques différents.

L'étude de la morphologie et la caractérisation des isolats est faite sur la base de six critères : l'aspect macroscopique des colonies, la forme bacillaire avec une coloration de Gram négative, le type respiratoire aérobie, la réaction de la catalase positive et la formation de cystes.

Parmi les isolats obtenus seuls les isolats PIA, PI1, PI2, PIF présentent des colonies de couleur brune à noir et qui est due à la production d'un pigment hydrosoluble brun foncé qui est la mélanine. Ce processus se produit à des niveaux élevés de métabolisme lors de la fixation de l'azote. Ce trait est caractéristique du genre *Azotobacter*

La production de catalase s'est avérée une caractéristique commune de 100% des isolats sélectionnés fixateurs d'azote. Cette même proportion d'isolats a exprimé un type respiratoire aérobie strict.

Trois des neuf isolats se sont avérés mobile ; cette mobilité est due à la présence de flagelle multiples (**Brener et al., 2005**).

La capacité à la production de cystes, vérifiée par observation microscopique, est révélée chez les isolats PI1, PIA, PIF. Ces bactéries subissent un processus de différenciation pour former les cystes, qui sont des cellules dormantes résistantes aux conditions délétères. Une cyste est constituée d'une cellule ovale contractée, appelée corps central, recouverte d'une capsule à deux couches (**Segura et al., 2014**).

L'importance des bactéries du genre *Azotobacter* dans la lutte biologique et la stimulation de la croissance des racines de plantes est attribuée aux nombreux mécanismes PGP exprimés par celles-ci. Ces diverses propriétés chez les isolats bactériens sont mises en évidence par une multitude de tests qui sont : la production de phytohormones ; la solubilisation du phosphore et la production d'ammoniac.

Pour être utilisé par les plantes, le phosphore organique doit être solubilisé par les PGPR. Parmi les isolats étudiés 77% se montrent capables de solubiliser les phosphates tricalciques en milieu solides avec des $4.5 > IS > 1$. Ces résultats se rapportent aux résultats obtenus par **Narula et al., (2002)** ; **Nosrati et al., (2014)** et **Aidouni et Mesmoudi, (2018)**. L'isolat PI5 a exprimé le meilleur taux de solubilisation sur milieu solide

Ainsi 100% ont exprimés leur potentiel de solubilisation avec un des taux atteignant 48.17 $\mu\text{g/ml}$ en milieu liquide pour l'isolat PIF. Ces résultats restent néanmoins réduits par rapport à ceux obtenus par (**Silini., 2012**). Ces faibles taux seraient la conséquence d'une déficience enzymatique. En effet, la disponibilité des formes solubles du phosphate dans le milieu favorise leur liaison avec les acides organiques libérés formant des complexes organophosphatés difficiles à dégrader par les bactéries (**Ilmer et Schinner , 1995**).

La production de phytohormones de croissance affecte 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. Parmi les plus répondues on retrouve les auxines et plus particulièrement l'acide indole acétique et les gibbérelline. La production de l'acide indole acétique est plus marquée par la présence du L-tryptophane comme précurseur qui se retrouve naturellement dans les

exsudats racinaires pour la microflore de la rhizosphère (**Dastager et al., 2010**). La production de l'acide indole acétique a été rapportée chez l'ensemble des isolats sélectionnés fixateurs d'azote en milieu liquide et s'est avérée indépendante de la présence du précurseur avec des taux plus élevés en sa présence ; en effet, le seuil maximal de production passe de 3.25 µg/ml à 18.5 µg/ml. Des taux similaires de production d'AIA, sont rapportés par **Neeru Narula, (2002), Kamlesh Kukreja, (2002) and, Vivek Kumar(2012)**.

La production d'ammoniac fait également partie des caractéristiques étudiées. Tous les isolats testés se montrent capables de produire de l'ammoniac. Des taux comparables de production sont rapportés par (**Barney et al., 2020**). La production d'ammoniac par les PGPR accumule et fournit de l'azote à leurs plantes hôtes et favorise l'allongement des racines et des pousses et leur biomasse (**Marques et al., 2010**).

L'optimisation des conditions de culture de l'isolat PIA est faite dans l'objectif de relever les conditions de culture permettant une production optimale de l'AIA par l'isolat PIA

L'isolat testé a exprimé une production maximale d'AIA dans le milieu contenant le tryptophane à 0.7% avec un taux de production de 6.15 µg/ml. Le taux d'AIA retrouvé tend à diminuer dans les milieux additionnés de 0.8 et 0.9% de L-Tryptophane. Des variations similaires ont été retrouvés par **Lebrazi et al., (2020), Niehaus et al., (2020), Fadil et al., (2020)**

Des taux de production de plus en plus élevés ont été révélés par l'augmentation des valeurs de pH avec une production maximale à pH=9 qui est de 0.4 µg/ml. Des résultats comparables sont décrits par **Suliasih et Widawati., (2020)** Cette augmentation progressive du taux de production peut s'expliquer par une affinité des bactéries du genre *Azotobacter* pour le milieu alcalin (**Brener et al., 2005**).

L'étude de l'effet de la salinité sur le taux de production de l'AIA révèle un optimum de production à une concentration de NaCl de 2% avec un taux de production de 0.39 µg/ml. Des résultats similaires sont notés par **Lebrazi et al., (2020)**.

La production de l'AIA par l'isolat testé a augmentée progressivement avec l'augmentation de la période d'incubation et a atteint un maximum au 6^{ème} d'incubation. **Dasri et al., (2014)** ont obtenus les mêmes résultats, pour la production de l'AIA qui a commencé après 2 jours d'incubation et atteint le maximum de production au 6^{ème} jour d'incubation.

Les résultats de la production de l'AIA avec et sans agitation révèlent que l'agitation a un effet sur la production de l'AIA avec un taux de production de 1.59 (µg/ml) et 1.51 (µg/ml) sans agitation. Une production plus élevée dans des conditions d'agitation pourrait être due à un meilleur transfert d'oxygène car la disponibilité de l'oxygène influence l'activité des transformations enzymatiques du tryptophane en auxines. **Reinecke et Bandurski., (1987)** ; ont montré l'importance de la concentration d'oxygène pour la production de l'AIA où l'agitation a entraîné de meilleurs niveaux d'excrétion d'AIA. **Sarwar et al., (1992)** ont démontré également que la production de l'AIA dans des conditions d'agitation augmente jusqu'à deux fois par rapport à l'incubation statique dans les conditions de dosage optimale.

Les résultats obtenus à différents degrés de température d'incubation dans l'intervalle de 30 °C à 50 °C montrent que la température optimale pour la synthèse de l'AIA était de 30 °C avec un taux de production de 2.09µg/ml et une diminution du taux de production suite à l'augmentation de la température d'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Khamna et al., (2010)**. **Nita et al., (2011)** sur l'effet de la température sur la production de l'AIA où ils ont trouvé que la température optimale de production était de 30 °C.

Les travaux de **Bastian et al., (1998)** montrent que la synthèse de l'AIA nécessite la présence d'une source de carbone et une source d'azote dans le milieu de croissance. Parmi les sources d'azote et de carbone utilisées une production optimale de l'acide indole acétique a été relevée par l'utilisation de la peptone et du glucose comme source d'azote et de carbone, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par **Mohite., (2013)**

A l'issus des tests réalisés, le candidat correspondant aux caractéristiques

microscopiques, macroscopiques et biochimiques (type respiratoire, mobilité, catalase) des *Azotobacter* et ayant montré le taux de production de phytohormones (plus précisément de l'acide indole acétique) le plus élevé ainsi qu'un important potentiel PGP a été sélectionné pour faire l'objet d'une identification phénotypique. Il s'agit de l'isolat PIA.

La souche PIA a été identifiée en se basant sur une matrice d'identification élaborée à partir des tableaux d'identification fournis dans Bergey's manual of systematic bacteriology pour le genre *Azotobacter* (Brenner *et al.*, 2005). Une identification à l'échelle des espèces, est réalisée grâce à l'outil informatique Identax, suite à l'analyse du profil biochimique de la souche PIA via cet outil, la souche est identifiée comme *Azotobacter Armeniacus* avec un score d'identification de **99.94%**. Le score obtenu est nettement supérieur au score minimal requis pour une identification réussite (95%).

La capacité des bactéries rhizosphériques à influencer le statut hormonal des plantes, par la production bactérienne ou le métabolisme des hormones, est considéré comme un mécanisme important par lequel elles favorisent la croissance et la productivité des plantes. Les phytohormones agissent comme des messagers pour coordonner les activités cellulaires et réguler divers processus cellulaires chez les plantes, y compris les réponses au stress abiotique et l'interaction plante-agent pathogène. Dans la présente étude on s'intéresse à l'activité de production de ces phytohormones par des bactéries rhizosphériques ayant un effet bénéfique sur la croissance des plantes.

L'objectif de cette étude est l'évaluation du potentiel PGP des souches PGPR diazotrophes et l'amélioration de la capacité à produire l'AIA de l'isolat présentant le meilleur potentiel.

Tous les isolats sélectionnés se sont révélés capables de solubiliser le phosphate tricalcique de produire l'acide indole acétique et le NH_3 avec des taux de solubilisation et de production les plus élevés par l'isolat PIA.

Les résultats expérimentaux de l'optimisation nous ont permis de déterminer les meilleures sources d'azote et de carbone nécessaires à la production de l'AIA et qui sont la peptone et le glucose. Concernant les conditions de culture la température de 30°C et le $\text{pH}=9$ ont menés à une production maximale de l'AIA par l'isolat sélectionné. L'étude de l'effet du temps d'incubation révèle que 6 jours d'incubation représentent le temps idéal pour obtenir une production optimale de l'hormone. La capacité de production de l'AIA augmente également avec l'augmentation de la concentration du L-Tryptophane pour atteindre une concentration maximale d'AIA de $(6.15 \mu\text{g/ml})$ à 0.7% de L-Tryptophane. Il existe également un lien entre le degré de salinité du milieu de culture et le taux de production de l'AIA avec un optimum de production à une concentration de NaCl de 2% . L'agitation favorise également la production de l'AIA.

L'ensemble des résultats obtenus démontrent le grand potentiel des PGPR diazotrophes à produire des substances bénéfiques à la croissance et au développement des plantes en particulier les phytohormones comme l'acide indole acétique qui, dans des conditions bien contrôlées, peut être produit en quantités importantes et peut faire ainsi l'objet d'études expérimentales approfondies pour être utilisé comme biofertilisant végétale pour l'amélioration de la production agricole en vue d'une application industrielle à grande échelle.

- **Acuña J. J., Jorquera M. A., Martínez O. A., Menezes–Blackburn D., Fernández Ahmad B., Nigar S., Malik N. A., Bashir S. Ali J., Yousaf S., Bangash J. A., Jan I. (2013).** Isolation and Characterization of Cellulolytic Nitrogen Fixing Azotobacter species from Wheat Rhizosphere of Khyber Pakhtunkhwa. *World Appl. Sci. J.* 27 (1): 51-60.
- **Acuña J. J., Jorquera M. A., Martínez O. A., Menezes–Blackburn D., Fernández M. T., Marschner P., Greiner R., Mora M. L. (2011).** Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.* 11 (3): 1-12.
- **Agnieszka Saeid, Katarzyna Chojnacka.2019.** Fertilizers: Need for New Strategies, In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Organic Farming*, Pages 91-116.
- **Anonyme, 2012** : Définition de la rhizosphère : <https://www.cnrtl.fr/definition/rhizosph%C3%A8re> consulté le 05/06/2021
- **Anonyme, 2012** : Milieu Mannitol-mobilité https://openwetware.org/wiki/BISC209/S12:_Culture_Media Consulté : 09/06/2021
- **Anonyme, 2016** : Description de la production des phytohormones : <http://www.biostimulants.fr/produits-utilisation/types-de-produits/les-biostimulants-microbiens-lexemple-des-micro-organismes-bacteriens/> Consulté le : 11/06/2021
- **Arora NK, Tewari S, Singh S, Lal N, Maheshwari DK .(2012).** PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed.) *Bacteria in agrobiolgy: Stress management*, pp.239-258
- **Brenner, D. J., R.N. Krieg et J.T. Staley(2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., Michigan State University publishers, pp.384402.
- **Bharucha, U., Patel, K. & Trivedi, (2013).** U.B. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agric Res* 2, 215–221
- **Bric J. M., Bostock R. M., Silverstonet S. E. (1991).** Rapid in Situ Assay for

- Indole acetic Acid production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2):535-538.
- **Baca B.E. et Elmerich C. (2007).** Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C., Newton W.E. (Eds). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, Springer, Netherlands. pp. 113-143.
 - **Beauchamp, C.J. 1993** « Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. » *Phytoprotection*, volume 74, numéro 1, p. 19–27.
 - **Brakel J, Hilger F.** Etude qualitative et quantitative de la synthèse de substances de nature auxinique par *Azotobacter chroococcum in vitro*. *Bull Inst Agron Stns Rech Gembloux*. 1965;33:469-487
 - **Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. 2019.**"Auxin." *Encyclopedia Britannica*.
 - **Catherine PERROT-RECHENMANN, 2021.** « AUXINES », *Encyclopædia Universalis*.
 - **Davière JM, Achard P. 2013.** Gibberellin signaling in plants development. *National library of medicin* 140(6):1147-51.
 - **Dweipayan Goswami, Janki N. Thakker & Pinakin C. Dhandhukia | Manuel Tejada Moral (2016).** Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review, *Cogent Food & Agriculture*, 2:1,
 - **Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, Abd Allah EF, Hashem A.2017.** Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Front Microbiol.*;8:2104.
 - **Farah Ahmad, Iqbal Ahmad, M.S. Khan.2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities, *Microbiological Research*, Volume 163, Issue 2, Pages 173-181.
 - **Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M. Lorenz Hiltner 2008.** A pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant*

Soil 312, 7–14.

- **Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. (2005).** Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* 28(1):66–76.
- **K.A. Tsukanova, V.K. Chebotar, J.J.M. Meyer, T.N. Bibikova. (2017).** Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis, *South African Journal of Botany*, Volume 113, Pages 91-102,
- **Karen Reiner.2010.** Catalase test protocole. American society for microbiology.
- **Kloepper J.W., Lifshitz R. and Zablutowicz R.M. (1989).** Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnol*, 7: 39-43.
- **Lebrazi, S., Niehaus, K., Bednarz, H. et al. (2020).** Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from *Acacia cyanophylla* root nodules and their effects on its plant growth. *J Genet Eng Biotechnol* 18, 71.
- **Mander, L. N. 2021.** “Recent Progress in the Chemistry and Biology of Gibberellins.” *Science Progress (1933-)*, vol. 75, no. 1/2 (297), 1991, pp. 33–50. .
- **Maheshwari Dinesh & Dheeman Shrivardhan & Agarwal Mohit. (2015).** Phytohormone-Producing PGPR for Sustainable Agriculture
- **Manuel Le Bris, 2017.** Hormones in Growth and Development. *Reference Module in Life Sciences, Elsevier*,
- **Martínez-Viveros 1, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo and M.L. Mora. (2010).** Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293 – 319
- **Neeru Narula 1, Kamlesh Kukreja, Vivek Kumar and K. Lakshminarayana.2002.** *Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics* Volume 103, No. 1, p. 81 - 87
- **Nelson R. Cabe.2019,** in *Epigenetic Principles of Evolution (Second Edition)*,

- **Pujic, P., Normand, P. 2009.** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofuture*, 26-29.
- **P Lemanceau. 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie, EDP Sciences*, 12 (6), pp.413-437.
- **Patten CL et Glick BR. (1996).** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. Journal. Microbiol*, 42 : 207-220.
- **Prajapati, K., Yami, K., & Singh, A. 2008.** Plant Growth Promotional Effect of *Azotobacter chroococcum*, *Piriformospora indica* and Vermicompost on Rice Plant. *Nepal Journal of Science and Technology*, 9, 85-90.
- **Rachel Backer, J.Stefan Rokem, Gayathri, ILanGUmaran, Jhon Lamont, Dana praslickova, Emily Ricci, Sowmyalakshmi, Subramanian, Donald L. Smith.2018.** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture
- **R. Heller, R. Esnault et C. Lance 1990.** dans *Abrégés Masson Physiologie végétale*, 2. développement
- **Sadhana baggam, S. B. Padal, V Ravi Sankar Ummidi, Ashok Paltati and Nikitha Thanagala. (2017);** ISOLATION OF IAA PRODUCING BACTERIA FROM SOIL AND OPTIMISATION OF CULTURE CONDITIONS FOR MAXIMUM IAA PRODUCTION. *Int. J. of Adv. Res.* 1003-1010
- **Sandeep C, Rashmi SN, Sharmila V, et al. 2011** Réponse de croissance d'*A maranthus gangeticus* à *Azotobacter chroococcum* isolé de différentes zones agroclimatiques du Karnataka. *Journal de Phytologie*. 3(7):29-34.
- **Spaepen S, Vanderleyden J et Remans R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol*, 31(4): 425-448.
- **Silini A. (2013).** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité d'*Azotobacter* et sur la croissance du blé en milieu salin. Thèse de Doctorat. Université de Sétif

- **Suliasih and S Widawati. 2020 IOP Conf. Ser.: Earth Environ.** Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) producing *Bacillus siamensis* from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production.
- **Vande Broek A, Lambrecht M, Eggermont K et Vanderleyden J. (1999).** Auxin supregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum Brasilense*. *Journal Bacteriol*, 181:1338-1342.
- **W.S. Wong, S.N. Tan, L. Ge, X. Chen and J.W.H. Yong.2015.** The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers
- **Wani, Sartaj & Chand, Subhash & Ali, Tahir. (2013).** Potential Use of *Azotobacter chroococcum* in Crop Production: An Overview. *Current Agriculture Research Journal*. 1. 35-38.
- **Wong, W. S., Tan, S. N., Ge, L., Chen, X., & Yong, J. W. H. (2015).** *The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers. Sustainable Development and Biodiversity, 105–158.*
- **Zahida H. Pervaiz, Janet Contreras, Brody M. Hupp, Josh H. Lindenberger, Dima Chen, Qingming Zhang, Caixia Wang, Paul Twigg, Muhammad Saleem. 2020.** Root microbiome changes with root branching order and root chemistry in peach rhizosphere soil, *Rhizosphere*, Volume 16.
- **Zeña GG, Pérou C. 1986.** Effet de différents taux d'Azotobacter et fréquence d'application d'Agrispon sur le rendement et la qualité de la culture de l'oignon (*Allium cepa* L.) à Cajamarca.

1-Milieu Ashby :

Composition en g/l d'eau distillée	est :
	20g
Mannitol	
K ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
Na Cl	0.2g
K ₂ SO ₄	0.1g
CaCO ₃	5g
Agar	15g
Eau distillée q.s.p	1000m

2-Milieu VF (Viande-Foie) :

Base viande foie	30,0g
Glucose	2,0g
Agar	6,0g
Eau distillée qsp	1000ml
pH = 7,0	

3-Milieu luria-bertani (LB):

Tryptone	1g
Na Cl	1g
Extrait de levure	0.5g
Agar	15g
pH=7	

4- Eau péptonée :

Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau	1000ml

5- Pikovskaya Agar :

Composition en g/l d'eau distillée	est :
Extrait de	0.50g

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

6-Milieu mannitol mobilité :

Hydrolysats tryptique de caséine	10,0g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
Eau distillée qsp	1000ml pH = 7

**7-Composition des standards de turbidité de Mc Farland d'après NCCLS site
Dans Sekkour 2008 :**

Standard de turbidité numéro	Di hydrate de chlorure de baryum (1.175%), en ml	Acide sulfurique (1%), en ml	Densité approximative correspondante de bactéries /ml
0.5	0.5	99.5	1.10^8
1	0.1	9.9	3.10^8
2	0.2	9.8	6.10^8
3	0.3	9.7	9.10^8
4	0.4	9.6	12.10^8
5	0.5	9.5	15.10^8
6	0.6	9.4	18.10^8
7	0.7	9.3	21.10^8
8	0.8	9.2	24.10^8
9	0.9	9.1	27.10^8
10	1.0	9.0	30.10^8