

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTE DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité/option : Biologie moléculaire et cellulaire : Biologie moléculaire
des procaryotes.

Thème : Etude de la production de l'acide 3-indole acétique et de l'activité
antifongique d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée à partir de la
rhizosphère du blé de la wilaya de Guelma.

Présenté par :- BELAID NABILA

-CHERIFI MARWA

- TEBANI LEILA

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{lle} BOUMAZA A. MAA. Univ. 08 Mai 1945/ Guelma.

Examineur : M^m TORCHE A. MAA. Univ. 08 Mai 1945/ Guelma.

Encadreur : M^{lle} KHENAKA K. MAB. Univ. 08 Mai 1945/ Guelma.

2012-2013

Remerciement

Avant toute chose, nous tenons à remercier Allah le tout puissant, pour nos avoir donnée la force et la patience.

Nous remercions madame **Khenaka Karima**, qu'elle trouve ici l'expression de nos profonde reconnaissances pour nos avoir accordé sa confiance et guider dans nos travail, ses compétences, ses précieux conseils et sa disponibilité.

Nous exprimons notre respectueux remerciement à monsieur le professeur **Benouareth .D** le doyen de la faculté de science de la nature et de la vie et science de la terre et de l'univers. Nous remercions également madame **Torche** et madame **Boumaza** qui ont accepté d'évaluer et juger notre travail malgré leurs nombreux autres obligatoires.

Nous tenons à remercier toutes les personnels techniques du laboratoire de microbiologie et de biochimie.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Aux deux êtres les plus chers, mes parents ma mère Wassila et mon père Khemissi pour tout ce qu'ils m'ont offert d'affection et sacrifices sans limites, pour tout le soutien, la confiance et leurs mots d'encouragement

A mes sœurs,

Nawel, Samel, Sihem, Lemya, Meryem et Sana

A mon frère,

Zakaria

A des petits boturgeons,

Fadi, Jihed, Hanine et Iade

Tous mes proches et mes amis

Tous mes enseignants

Tous les personnes qui de diverses façons et à différents moment apporte leur aide

Nabila

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert d'affection et sacrifices sans limites, pour tout le soutien, la confiance et leurs mots d'encouragement

A ma sœur

Boutheina

A mon frère

Chouaib

Tous mes proches et mes amis

Tous mes enseignants

Tous les personnes qui de diverses façons et à différents moments ont apporté leur aide

Marwa

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert d'affection et sacrifices sans limites, pour tout le soutien, la confiance et leurs mots d'encouragement

A ma sœur :

Soumia

A mes frères :

Zakaria, Chaouki

Tous mes proches et mes amis

Tous mes enseignants

Tous les personnes qui de diverses façons et à différents moments ont apporté leur aide

Leila

Liste des abréviations

ABA : acide abscissique.

AIA : acide 3 indole acétique.

API 20 NE : Appareillage et Procédés d'Identification des Non Entérobactéries (galerie Biochimique).

CO₂: dioxyde de carbone.

C₂H₂ : Éthylène.

G+C: guanine + cytosine.

DRB: deleterious rhizobacteria.

DO : densité optique.

GA : gibbéréline.

N₂: azote atmosphérique.

O₂ : oxygène.

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PH: potentiel d'hydrogène.

PIRG: Percent of Radial Growth Inhibition.

TSB: tryptic-soy-broth.

Liste des figures

Figure 1. Schéma de la partie rhizosphérique d'une plante.	2
Figure 2. Association mycorhizienne	9
Figure 3. Coupe transversal de racine montrant les principaux types de mycorhizes.	10
Figure 4. Exemples de sidérophores classes selon leurs groupements fonctionnels.	11
Figure 5. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.	13
Figure 6. La structure chimique de gibberelline A ₃	14
Figure 7. La structure chimique de cytokinine.	15
Figure 8. Formule chimique de l'éthylène.	16
Figure 9. Les différents types d'auxines.	16
Figure 10. La biosynthèse de l'AIA par la voie de l'indole3-acétaldoxime.	17
Figure 11. Effet de l'acide 3-indolacétique sur la rhizogénèse.	18
Figure 12. Les champs de prélèvement du blé dur A et du blé tendre B.	19
Figure 13. Prélèvement et purification des souches fluorescentes sur le milieu B de King	20
Figure 14. La galerie Api 20 NE	22
Figure 15. La fluorescence à l'œil nu et sous la lampe à ultra violet.	26
Figure 16. Résultat de test de la croissance dans le milieu mannitol) de mobilité.	27
Figure 17. Résultat de l'effet antagoniste contre <i>Fusarium oxysporum</i> .	29
Figure 18. Les courbes de la concentration de production de l'AIA (mg/ml) en fonction de la concentration de tryptophane (mg/ml) et la durée d'incubation(h).	32

Liste des tableaux

Tableau 1. Concentrations de tryptophane étudiées.....	24
Tableau 2. Résultat de test d'identification de la souche isolée par la galerie Api 20 NE.....	28
Tableau 3. Valeurs des diamètres des pourcentages d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum</i> par <i>Pseudomonas fluorescence</i>	29
Tableau 4. Concentrations (mg/ml) de la production de l'acide 3 indole acétique en fonction du temps d'incubation et la concentration du tryptophane.....	31

Produced with ScanTopDF

Table des matières

Introduction	1
Revue bibliographique	
1. La rhizosphère.....	2
1.1 Définition.....	2
1.2 Rôles de la rhizosphère.....	3
1.3 La faune et la flore de la rhizosphère.....	3
1.3.1 La faune.....	3
1.3.2 La flore rhizosphérique.....	4
1.3.3 Les facteurs conditionnant la flore rhizosphérique.....	6
2. Les exsudats racinaires.....	6
3. Les différents types d'interaction dans la rhizosphère.....	7
3.1 Les interactions entre les microorganismes.....	7
3.1.1 Parasitisme.....	7
3.1.2 Amensalisme.....	7
3.1.3 Compétition.....	7
3.1.4 Commensalisme.....	7
3.1.5 Antagonisme.....	8
3.1.6 Symbiose.....	8

3.2 Les interactions entre les plantes et les microorganismes.....	8
3.2.1 Les microorganismes inhibant la croissance de plante.....	8
3.2.2 Les mycorhizes.....	9
3.2.3 Les rhizobactéries promotrices de croissance.....	10
4. Les principaux facteurs de stimulation de la croissance de plantes	
4.1 La production des sidérophores.....	11
4.2 La solubilisation de phosphate.....	12
4.3 L'inhibition de microorganismes pathogènes.....	12
4.4 L'induction du système de résistance de plante.....	12
4.5 Détoxification du milieu.....	13
4.6 Fixation symbiotique de l'azote.....	13
4.7 La production de phytohormones.....	14
4.7.1 Les gibbèrellines.....	14
4.7.2 Les cytokinines.....	14
4.7.3 L'acide abscissique.....	15
4.7.4 L'éthylène.....	15
4.7.5 Les auxines.....	16
Matériel et méthodes	
1. Prélèvement des échantillons du sol.....	19
2. Préparation des solutions mère du sol et des dilutions.....	19
3. Culture bactérienne et purification des souches.....	20

4. Identification de souche.....	20
4.1 Coloration de Gram.....	20
4.2 Recherche de l'oxydase.....	21
4.3 Recherche de la catalase.....	21
4.4 La mobilité.....	21
4.5 La galerie API NE.....	21
5. Production et dosage d'auxines.....	23
6. Etude de la capacité d'inhibition de phytophagène.....	24
7. Analyse statistique.....	25

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des souches bactériennes.....	26
2. Identification de la souche fluorescente.....	26
2.1 Tests préliminaires d'identification.....	27
2.2 Identification phénotypique par la galerie API 20 NE.....	27
3. Etude de la capacité d'inhibition de phytopathogène.....	29
4. Dosage de la production de l'acide 3indole acétique.....	31
Conclusion.....	34
Références bibliographiques.....	35

Annexes

Résumé

Introduction

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Les plantes, comme la plupart des êtres vivants, vivent au contact de nombreux micro-organismes. Le contact entre plantes et micro-organismes est permanent. Il s'établit dès que la graine tombe au sol, se poursuit et se développe lors de la germination et de la croissance du végétal, et se termine à la mort de celui-ci.

La rhizosphère, c'est le terme qui désigne la région du sol directement formée et influencée par les racines des plantes et les micro-organismes associés [1]. En effet, La rhizosphère est un biotope caractérisé par une niche biologique unique avec une importante diversité microbienne. C'est une zone d'intense activité microbiologique en raison des exsudats racinaires des plantes, ces activités bénéfiques peuvent être directs par le biais des relations de symbiose avec les plantes, ou indirects via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère qui modifient les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs et la répartition des ressources.

Parmi les rhizobactéries, les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et elles sont capables de former différentes associations avec leurs hôtes. Dans certaines situations, ces associations peuvent être dangereuses pour la plante comme le pathovars de *Pseudomonas syringae*, alors que, dans la plupart des cas, les autres espèces appartenant à ce genre sont très bénéfiques pour la croissance des plantes, c'est l'exemple de *Pseudomonas fluorescences*, *Pseudomonas aeruginosa*, *pseudomonas putida* [2, 3]. Ces rhizobactéries bénéfiques sont connues par leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires par l'inhibition de la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes, de plus, elles peuvent produire des phytohormones telles que les auxines. En fait, l'acide indole-acétique (AIA) est la principale auxine connue, cette phytohormone possède un intérêt économique très important par rapport à ces effets multiples et bénéfiques sur la croissance des plantes [4, 5].

L'objectif de ce travail est l'isolement et l'étude des bactéries rhizosphériques appartenant au groupe de *Pseudomonas spp. Fluorescents*, à partir de la rhizosphère du blé tendre et du blé dur de la région de Guelma. La stratégie d'étude de ce travail consiste à : (i) isoler les rhizobactéries de ce groupe sur le milieu B de King, (ii) identifier ces bactéries par des tests biochimiques, (iii) la mise en évidence et la quantification de l'AIA produit en absence et en présence de différentes concentrations de tryptophane, (iv) l'étude de l'activité antifongique de souches isolées vis-à-vis un champignon phytopathogènes de type *Fusarium oxysporum*.

Revue bibliographique

Produced with ScanTOPDF

1. La rhizosphère

1.1 Définition

Le terme rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner (Bactériologiste spécialiste de microbiologie du sol) [6]. Le mot rhizosphère vient du grec 'rhizo' signifiant 'racine' et 'sphère' qui représente le champ d'influence du système racinaire (figure 1). En raison du volume qu'elle occupe par rapport au volume de la plante, la rhizosphère aussi appelée « la moitié cachée » du système racinaire [7].

La rhizosphère représente la région du sol sous l'influence directe de la racine [7] ; c'est un système complexe, hétérogène, dynamique et interactif qui dépasse la simple notion d'interface entre le sol et les plantes [8].

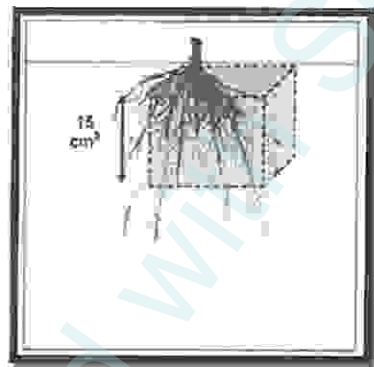


Figure 1. Schéma de la partie rhizosphérique d'une plante [6].

La rhizosphère est généralement divisée en deux parties:

- La rhizosphère au sens strict correspond à la fine couche de sol qui adhère fermement aux racines.
- Le rhizoplan ou surface des racines dont la microflore est extraite par agitation vigoureuse des racines [3, 9].

pathogène à l'intérieur de la plante [9]. Les PGPR renforcent aussi la capacité défensive, en stimulant des mécanismes de défense inductibles chez l'hôte, rendant celle-ci moins susceptible et beaucoup plus résistante à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé : résistance systémique induite [31].

4.5 La détoxification du milieu

Les phytotoxines sont des composés avec des structures chimiques très variées, ils sont produits par des microorganismes saprophytes et parasites du sol. Ils inhibent, à de faibles concentrations la croissance et le développement des plantes. Dans le sol, certaines bactéries comme *Pseudomonas fluorescens* éliminent ces phytotoxines [9].

4.6 La fixation symbiotique de l'azote

C'est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries principalement appartenant au genre *Rhizobium*. Cette association donne lieu à des interactions multiples entre les partenaires et induit la formation d'un nouvel organe « le nodule » qu'il est formé sur les racines (figure 5), à l'intérieur desquels l'azote moléculaire atmosphérique est réduit en ammoniac [35].

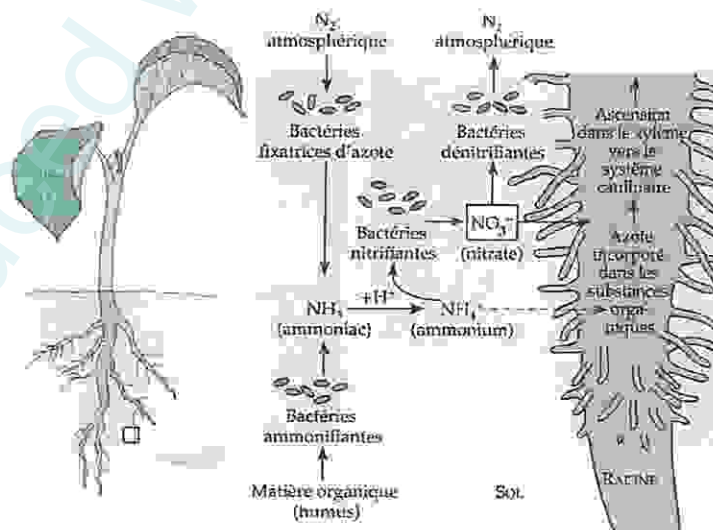


Figure 5. La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique [13].

Figure 4. Exemples de Sidérophores classés selon leurs groupements fonctionnels [15].

4.2 La solubilisation de phosphate

Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère. Cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes. Plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* ont été identifiées comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (*Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*) [15].

4.3 L'inhibition de microorganismes pathogènes

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogène dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibactériennes [31]. Plusieurs rhizobactéries sont douées de cette propriété (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*,...) elles peuvent produire des métabolites inhibiteurs de croissance comme lipopeptides, des enzymes hydrolytiques qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques [31].

Les rhizobactéries qui possèdent ce type d'activité ont un grand rôle économique, elles sont utilisées comme des agents de lutte biologique qui consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme. De plus, La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. En fait, La lutte biologique est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger sur l'environnement et sur l'homme. L'utilisation de plusieurs modes d'action par un seul agent antagoniste et sa capacité d'adaptation à la rhizosphère contribuent à ce que la lutte biologique devient plus durable que les produits chimiques [19].

4.4 L'induction du système de résistance des plantes

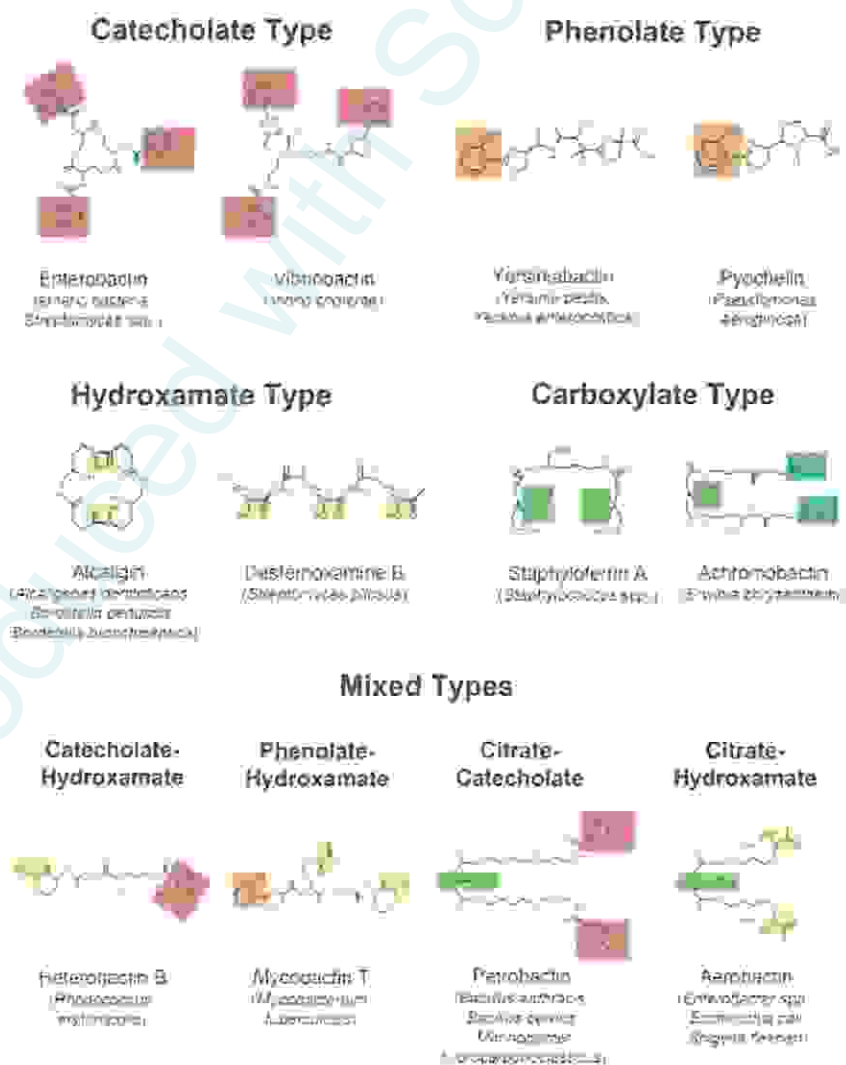
L'induction des systèmes de résistance se manifeste par des modifications au niveau de la composition des parois cellulaires, la production des substances bioactives appelées phytoalexines et/ ou la production des protéines qui inhibent le développement de l'agent

synthèse des métabolites antifongiques tels les antibiotiques, les enzymes qui lysent les cellules fongiques, ou bien par compétition envers les nutriments ou la colonisation des racines [3].

4. Les principaux facteurs de la stimulation de la croissance de plantes

4.1 La production des sidérophores

Le terme sidérophore du grec Sideros (fer) et Phore (porteur) ce qui signifie « Porteur de fer ». Ce terme a été énoncé la première fois par Lankfond en 1973 [32]. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire (200 à 2000 Da) ayant une très grande affinité pour le fer ferrique, ils sont synthétisés et sécrétés par les bactéries en condition de carence de fer. A ce jour plus de 500 sidérophores de structures chimiques différentes ont été répertoriés dont le rôle est de solubiliser, chélater et extraire le fer [33,34]. D'une manière générale, les sidérophores sont classés selon leur structure chimique et leur groupements fonctionnels en : cathécolates, hydroxamates, carboxylates ou des phénolates (figure 4).



une augmentation substantielle de la capacité d'assimilation des sels minéraux notamment le phosphate, l'azote et l'eau disponible dans le sol. Ces nutriments sont ensuite transférés à la plante par les hyphes et plus particulièrement par des structures ramifiées appelées arbuscules. La symbiose endomycorhizienne confère un apport nutritionnel et une grande résistance aux stress salin et hydrique [30].

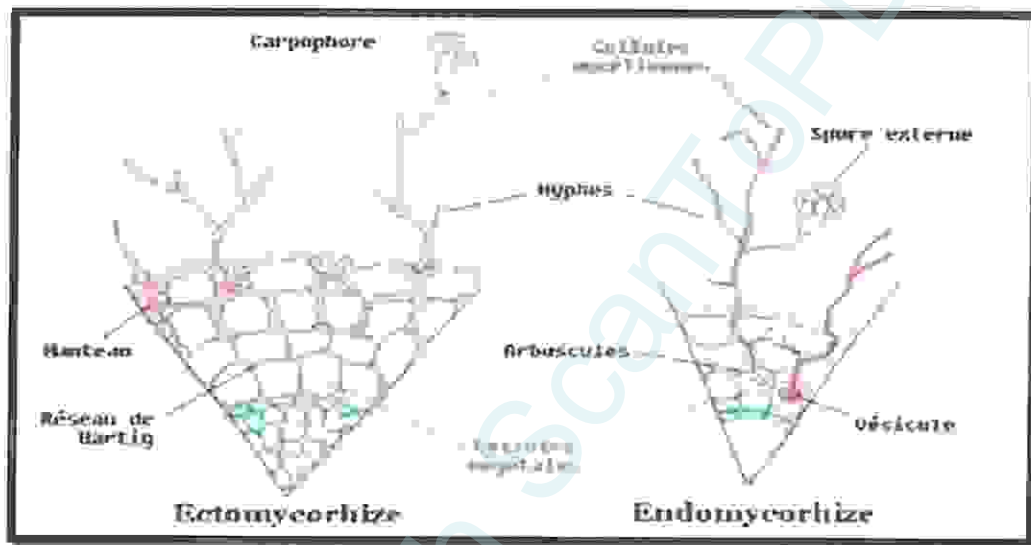


Figure 3. Coupes transversales de racines montrant les principaux types de mycorhizes [21].

3.2.3 Les rhizobactéries promotrices de la croissance

L'expression de rhizobactéries promotrice de la croissance (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) a été d'abord utilisée pour décrire des bactéries du sol colonisant les racines des plantules (après la germination des semences) et favorisant leur croissance [3].

Plusieurs genres bactériens sont décrits dans la littérature pour leur effet bénéfique sur la croissance des plantes, tels que : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Phodobacter*, *Azospirillum* [31].

En effet les rhizobactéries peuvent avoir des effets sur la croissance de plantes avec des mécanismes directs ou indirectes. Les mécanismes directs de la promotion de croissance sont principalement la fixation de l'azote atmosphérique (N_2) qui est transféré aux plantes, la production des sidérophores, la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphore, la synthèse des phytohormones et des vitamines et la diminution de la toxicité de certains polluants de sol tels que les métaux lourds [3]. D'autres rhizobactéries peuvent améliorer la croissance de plantes indirectement par la protection contre les phytopathogènes, par de

végétales ou empêchent l'activité enzymatique entraînant ainsi l'interruption d'une voie métabolique [3].

Des polysaccharides produits par quelques microbes pathogènes peuvent bloquer les tissus vasculaires des plantes et causer leur fanage [3].

3.2.2 Les mycorhizes

Les mycorhizes (du grec : mukes = champignons, rhiza = racine) représentent une association symbiotiques entre les racines des végétaux et le mycélium des mycètes (figure 2), cette relation est très bénéfiques pour la croissance de la plante ainsi que pour le champignon [25, 27].

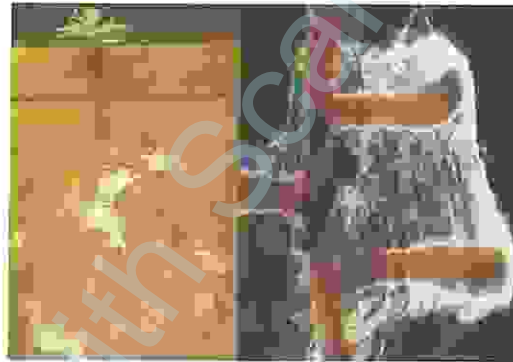


Figure 2. Association mycorhizienne [27].

Les associations micorhiziennes ont tous le même principe de bénéfice pour les deux partenaires, cependant, ils peuvent être divisé en groupe selon le positionnement du champignon par rapport aux racines, selon ce principe on distingue :

➤ Les ectomycorhizes

Ils sont principalement situés à la surface de la racine de la plante (figure 3), ils infectent principalement des arbres, dont les pins et le chêne et forment un mâchon mycélien sur les petites racines. Cependant, elles ne produisent ni vésicules, ni arbuscules [28].

➤ Les endomycorhizes

Ils représentent le type de mycorhize le plus répandu [29]. Ces champignons se trouvent à l'intérieur des tissus racinaires de la plante (figure 3), leur mycélium extra-racinaire permet

3.1.5 Antagonisme

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyper parasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose [21].

3.1.6 Symbiose

Le terme symbiose du grec *sym* (ensemble) et *biosis* (vivre). La symbiose représente une association étroite et durable entre deux organismes distincts dont les bénéfices sont réciproques pour les deux partenaires [25].

Il existe différents degrés de dépendance des partenaires à la symbiose. Selon ce critère, on distingue les associations symbiotiques facultatives (les partenaires peuvent exister indépendamment) et les associations obligatoires (l'association est essentielle à leur survie) [25].

Dans la rhizosphère, cette association confère une source de carbone, d'azote, des nutriments et constitue un des facteurs majeurs dans l'évolution des espèces [26, 27].

3.2 Les interactions entre les plantes et les microorganismes

3.2.1 Les microorganismes inhibant la croissance de plantes

Les microorganismes empêchant la croissance de plantes ou *Deleterious Rhizobacteria* (DRB) colonisent la rhizosphère et empêchent la croissance de plantes sans causer des symptômes évidents de la maladie. Elles sont présentes à la surface des racines et peuvent se multiplier dans les espaces intercellulaires des cellules corticales, leurs effets néfastes sur la croissance des plantes sont dus principalement à la concurrence pour les éléments nutritifs, à la production d'enzymes extracellulaires (qui liquéfient les membranes cellulaires végétales), à la production de métabolites qui inhibent les processus physiologiques des plantes, comme les phytotoxines, les régulateurs de croissance de plantes, les substances volatiles, ou les antibiotiques. Les toxines microbiennes affectent la perméabilité de la membrane des cellules

molécules organiques absorbables par les racines ou bien indirectement en améliorant sa nutrition minérale par solubilisation ou minéralisation de certains éléments [19].

3. Les différents types d'interaction dans la rhizosphère

3.1 Les interactions entre les microorganismes

Les interactions entre les micro-organismes au niveau de la rhizosphère sont dues à la richesse de cette zone en matière organique et au nombre élevé des populations microbiennes. Ces interactions sont principalement catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de micro-organismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne [21].

3.1.1 Parasitisme

Il représente l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme [22].

3.1.2 Amensalisme

C'est une association dans laquelle une espèce inhibe le développement de l'autre, par la production des substances ayant un effet négative sur la croissance [23].

3.1.3 Compétition

Les deux partenaires se développent sur le même substrat ce qui a un effet négatif sur leur vitesse de croissance [23].

3.1.4 Commensalisme

C'est une association biologique facultative entre deux espèces ou l'un des deux profite de la protection et la nourriture acquise par le deuxième [24].

Le Commensalisme existe au niveau de la rhizosphère notamment par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, CO₂, O₂, le potentiel osmotique, etc.) par un micro-organisme rendant ainsi le climat favorable pour le développement de l'autre. Aussi, certains organismes dégradent ou neutralisent des substances toxiques favorisant ainsi la croissance des autres [21].

1.3.3 Les facteurs conditionnant la flore rhizosphérique

D'une façon générale, l'activité microbienne dans la rhizosphère est influencée par des facteurs climatiques de l'environnement (humidité, aération, température, teneur en CO₂...) et par des facteurs édaphiques (teneur du sol en eau et oxygène, pH, teneur en éléments assimilable...) [18].

La profondeur des racines jouent aussi un facteur de variation de la flore rhizosphérique le nombre de microorganismes diminue selon l'augmentation de la distance [3].

2. Les exsudats racinaires

L'exsudation est définie comme la libération de composés solubles de faible poids moléculaire. Au niveau de la rhizosphère, les racines libèrent beaucoup de matières organiques sous forme de mucilage, plus de 40% des produits de photosynthèse passent dans le système racinaire [19].

Les exsudats représentent la partie la plus importante de substances libérées par les racines, surtout dans la région apicale [9]. C'est également celle la plus rapidement métabolisée par les micro-organismes. Ils sont généralement constitués de deux fractions majeures : les macromolécules de haut poids moléculaire tels les mucilages qui sont composés à 95% de sucres (polysaccharides) et 5% de protéines, ce sont essentiellement des produits carbonés issus de la photosynthèse. De même, il y a des exsudats solubles composés de molécules de petite taille par exemple : les sucres simples, des acides aminés, des acides organiques, des facteurs de croissance, des enzymes, des phénols, des stérols ou encore des vitamines, ces fractions métaboliques secondaires représentent une grande partie de la diversité des exsudats racinaire, cependant, la nature de ces substances est variable selon le type du sol, l'âge, l'état physiologique de la plante et la disponibilité de matière nutritive [20].

Les exsudats racinaire constituent un vecteur de dialogue moléculaire entre la plante et les organismes de la rhizosphère ou confèrent une source essentielle d'énergie et ils présentent une barrière de défense contre les agents pathogènes. Ces éléments constituent une source nutritionnelle pour la microflore rhizosphérique, et qui agissent soit en stimulant ou en inhibant certaines espèces (effet rhizosphérique). Les microorganismes stimulés peuvent agir directement sur la plante en mettant à sa disposition des phytohormones, des vitamines ou des

Dans la rhizosphère, la densité des champignons est estimée par 10^6 unités par gramme de sol. Les genres : *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Phoma* et *Gliocladium* représentent les champignons les plus fréquents [16]. Ils sont caractérisés par un mycélium pluricellulaire, ils sont hétérotrophes et ils résistent mieux que les bactéries à la sécheresse et à l'acidité.

Certains champignons sont associés aux racines des plantes supérieures, en formant les mycorhizes qui facilitent la croissance et la nutrition des espèces végétales [16].

c- Les algues et les protozoaires

Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de 10^3 unités par gramme de sol. Les algues sont représentées par des espèces de *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae* et les Diatomées [14].

d- Les rhizobactéries

Dans la rhizosphère, les bactéries sont les organismes les plus nombreux (leur densité est de l'ordre de 10^9 unité par gramme de sol) et les plus variés [3]. Elles prolifèrent dans les milieux les plus riches en azote, et une faible quantité en acides : elles sont surtout abondantes autour des racines de certaines plantes (graminées, légumineuses), au sein de la rhizosphère. La plupart entre elles sont hétérotrophes et saprophytes, elles décomposent les celluloses, les sucres, qui constituent des sources d'énergie. Les bactéries protéolytiques hydrolysent les protéines des protoplastes et libèrent des acides aminés, qui subissent à leur tour l'ammonification [17].

Les bactéries de la rhizosphère jouent des rôles essentiels dans la nutrition, la promotion de la croissance des plantes, et les interactions dans la rhizosphère [17].

Certaines bactéries, plus spécialisées, jouent des rôles particuliers, à titre d'exemple, les autotrophes qui tirent leur énergie de l'oxydation de certains composés minéraux et ils assimilent le carbone du CO_2 . De même, la plus part des bactéries nitrifiantes jouent un rôle important dans le cycle des éléments fondamentaux du sol, en particulier en intervenant dans les processus d'oxydoréduction, dans le cycle de l'azote, le cycle de soufre, et le cycle du fer [17].

La faune rhizosphérique joue un rôle important dans l'équilibration des différentes relations. Chaque espèce occupe une niche qui lui est propre et joue un rôle particulier dans le recyclage de la matière organique, l'échange globaux d'énergie, les fonctions et les propriétés du sol (structure, fertilité, qualité). Elle assure aussi la fragmentation des débris végétaux et la fabrication de l'humus ce qui augmente considérablement les surfaces de contact avec les micro-organismes [13]. Cependant, cet équilibre est relativement fragile, le plus souvent, ces animaux sont extrêmement sensibles à des faibles variations de pH, d'humidité, de température et de matière organique [12].

1.3.2 La flore rhizosphérique

a- Les actinomycètes

Ce sont des bactéries à Gram positif avec un pourcentage élevé en GC, la plupart de ces bactéries sont filamenteuses et elles peuvent atteindre 10^7 unités par gramme de sol, ces bactéries manifestent souvent un antagonisme vis-à-vis des bactéries et des champignons voisins; cet antagonisme résulte de la sécrétion de substances antibiotiques [14].

Les actinomycètes jouent principalement un rôle de protection des racines de la plante. Ces bactéries peuvent subir des différenciations morphologiques durant leur cycle de vie. En réponse à des conditions défavorables tel qu'un déficit en nutriment et en eau, et ce n'est que lorsque les conditions redeviennent favorable que les spores peuvent germer et former de nouveau le mycélium végétatif [15]. Dans la rhizosphère, les actinomycètes appartenant au genre *Frankia* sont extrêmement importants pour de nombreux types de plantes. Cette association est appelée : association actinorhizienne [16].

b- Les champignons

Leur rôle dans le sol est considérable et très variés, il s'exerce surtout dans la phase de décomposition, la plus part sont aptes à décomposer les celluloses, certains sont susceptibles d'hydrolyser les composés de nature phénolique, plus résistants : lignine, tannins. Les pourritures brunes ou molles (active en milieu neutre) décomposent les celluloses préférentiellement aux composés phénoliques : la lignine libérée, est peu transformée. Les pourritures blanches des milieux acides, au contraire, s'attaquent aussi la lignine et aux composés tanniques, libérant des composés phénoliques, à petite molécule, donc solubles.

1.2 Rôles de la rhizosphère

En effet, il existe une double relation fonctionnelle qui est établie dans la rhizosphère, ces relations concernent l'effet des racines sur le milieu environnant, ainsi que la réponse de la microflore à l'activité racinaire [10].

Le rôle de la rhizosphère peut être résumé dans les points suivants :

- la rhizosphère est le siège de processus physiques et chimiques spécifiques liés à l'alimentation hydrique et minérale des plantes [10].
- Elle est apparue comme le lieu privilégié des échanges de matières et d'énergie : la libération de composés organiques, l'absorption d'eau et d'ions, la synthèse des métabolites microbiens divers et variés [11].
- Elle contribue à modifier les propriétés des sols : propriétés biologiques, biodiversités et activités microbiennes, fertilité et qualité des sols [10].
- Elle est le passage obligé de tous les éléments minéraux depuis le sol vers les plantes [11].
- Elle présente d'importance écologique (implication dans les cycles géo-biologiques comme le cycle de carbone, le cycle d'azote et de phosphore) [8].
- Elle a une fonction directe avec la croissance et la santé de la plante [10].

1.3 La faune et la flore de la rhizosphère

Le sol rhizosphérique est considéré comme 'un système écologique' dont les fonctions sont nombreuses, car ce système dépasse le simple support dans lequel les plantes s'enracinent, il est surtout un réservoir vivant qui héberge une population nombreuse d'espèces de taille et de modes de nutrition très variables [6, 8].

1.3.1 La faune

La faune rhizosphérique est constituée principalement d'organismes microscopique appelé la microfaune (<0,2mm) comme les protozoaires, les nématodes rotifères et les acariens. D'autres sont des animaux qu'on attribuera à la méso faune (0,2 à 4mm) comme les insectes, les microarthropodes et enfin la macrofaune tels que les vers de terre, les mollusques [12].

4.7 La production des phytohormones

Les phytohormones jouent un rôle régulateur fondamental lors de la croissance et le développement des plantes. Ces substances sont élaborées en quantités variables par la plante au cours de son développement. Suite à leur production dans certains organes de la plante, elles sont ensuite transportées de cellule en cellule ou via le système vasculaire vers leur lieu d'action. Les phytohormones comprennent 6 groupes de substances majeures : les gibbérellines (GA), les cytokinines, les brassins stéroïdes, des hormones à effets mixtes comme l'acide abscissique (ABA), l'éthylène (C₂H₂) et les auxines [9]. En effet, certains types de phytohormones peuvent être produits par des rhizobactéries au dépend de métabolites présents dans la rhizosphère, ce qui a un effet promotrice sur la croissance des plantes.

4.7.1 Les gibbérellines

Les gibbérellines forment une grande famille de régulateurs de croissance, ils représentent des composants tétracycliques qui sont découverts la première fois en 1938. Les gibbérellines sont nommées G ou Ga suivi d'un chiffre de 1 à 125, dont la Ga₃ est la mieux connue (figure 6). [36, 37].

Ces phytohormones possèdent différents effet positif sur la croissance des plantes, elles induisent divers changements morphologiques et physiologiques chez les plantes par la stimulation de la floraison, la croissance des feuilles et le développement des fruits [18].

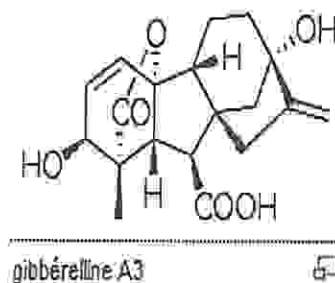


Figure 6. La structure chimique de gibbérelline A3 [38].

4.7.2 Les cytokinines

Les cytokinines sont des substances proches des bases puriques (figure 7) qui sont découverte dans les années 1950 par Carlos Muller.

Les cytokinines forment une classe de phytohormones qui stimulent les divisions cellulaires, l'élargissement et le développement des tissus. Ce sont des signaux impliqués dans la médiation du stress environnemental des racines vers les parties supérieures de la plante. La production de cytokinines a été rapportée chez *Pseudomonas fluorescens* [15, 36].

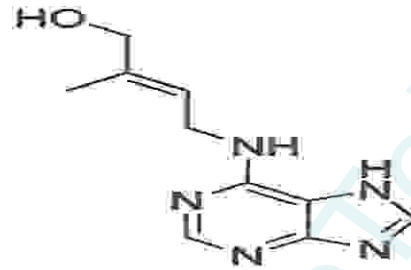


Figure 7. La structure chimique de cytokinine [38].

4.7.3 L'acide abscissique

Cet acide est impliqué dans les processus de développement tels que la germination, l'induction du transport des produits de la photosynthèse et la synthèse des protéines de réserve. Cette hormone est surtout impliquée dans des processus d'adaptation au stress hydrique en régulant la fermeture des stomates. Plus récemment des travaux ont mis en évidence le rôle de l'acide abscissique dans la défense contre les microorganismes pathogènes [38, 39].

4.7.4 L'éthylène

L'éthylène est la seule phytohormone gazeuse (figure 8). Il est connu pour être l'hormone des blessures, parce que sa production dans la plante peut être induite par n'importe quelle perturbation physique ou chimique des tissus. Parmi ses nombreux effets sur la croissance et le développement de la plante, la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines. Certaines rhizobactéries ont la capacité de diminuer le stress provoqué par la forte concentration de l'éthylène, elles sont capables de produire une AAC-désaminase (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate désaminase). Cette enzyme clive l'AAC précurseur immédiat de l'éthylène. L'AAC-désaminase diminuerait la production d'éthylène au niveau des racines de la plante hôte et résulterait en leurs allongements.

Plusieurs espèces de genre *Pseudomonas* tels que *P. fluorescens* peuvent diminuer le stress éthylène donc elles peuvent stimuler la croissance de plantes soumissent au stress tels que les inondations ou encore les sols contaminés par les métaux lourds [15].

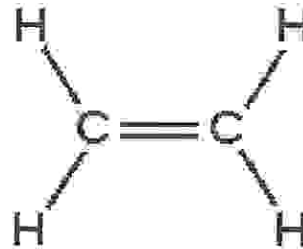


Figure 8. La formule chimique de l'éthylène [15].

4.7.5 Les auxines

Les auxines sont généralement considérées comme la phytohormone majeure dans le contrôle de la croissance et développement des plantes. La molécule d'auxine naturelle est découverte par Went en 1926 [15].

a- Structure chimique de l'auxine

L'acide indole-acétique (AIA) est la principale auxine connu chez les plantes et même la première hormone végétale découverte. Mais il existe d'autres molécules naturelles actives, dont l'acide indole-3-butyrique, l'acide 4-chloro-indole-3-acétique, l'acide phényl acétique (figure 9) [38].

L'acide indole-3-acétique est un acide faible avec un pKa d'environ 4,85. Sa formule brute est $C_{10}H_9NO_2$, il est formé d'un noyau indole et d'une courte chaîne latérale carbonée portant le groupement carboxyle [38].

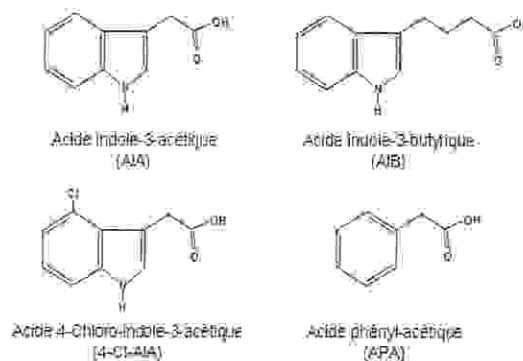


Figure 9. Les différents types d'auxines [38].

b-La biosynthèse de l'acide 3-indolacétique par les plantes

La biosynthèse d'auxine est complexe car il existe cinq voies différentes menant à la production des auxines, quatre dépendant du tryptophane et une indépendante du tryptophane. On distingue :

- La voie de l'indole 3- acétaldoxime, le tryptophane est tout d'abord transformé en indole-3-acétaldoxime. L'acide 3-indolacétique est alors obtenu via des réactions d'oxydation de l'indole-3-acétaldoxime (figure 10).
- La voie indole3-acétamide.
- La voie tryptamine.
- La voie d'acide indole 3- pyruvique [36].

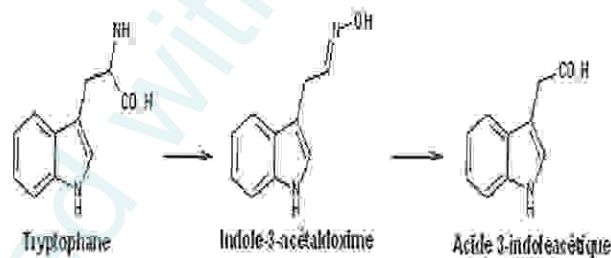


Figure 10. La biosynthèse de l'AIA par la voie de l'indole 3- acétaldoxime [38].

c- La production de l'acide 3-indolacétique par les rhizobactéries

L'AIA n'est pas l'apanage des plantes, il est également synthétisée par des microorganismes, en effet, les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante. Plusieurs espèces bactérienne ont été rapporté pour leur production d'AIA au dépend de tryptophane, ces espèces appartiennent pour la majorité au genre *Pseudomonas* [36].

d- Rôles de l'acide 3-indolacétique dans la croissance de plantes

Cette phytohormone possède un intérêt économique très important par rapport à ces effets multiples et bénéfiques sur la croissance des plantes.

- La division cellulaire

L'AIA est impliqué dans le contrôle de la division cellulaire chez les plantes. Il joue le rôle d'un signal qui déclenche la division cellulaire, il est requis pour que les cellules puissent entrer dans le cycle cellulaire [40].

- Formation des racines latérales

L'AIA a des rôles dans l'organogénèse. Il agit aussi à forte concentration sur la rhizogénèse favorisant l'apparition des racines et l'élongation des tiges (figure 11) [40].

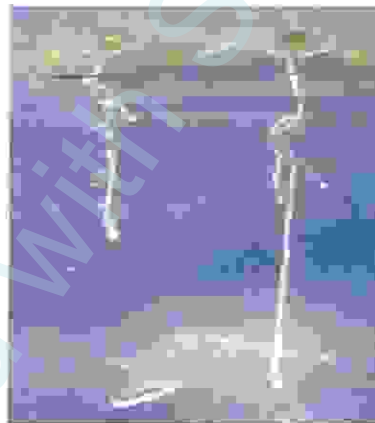


Figure 11. Effet de l'acide 3-indolacétique sur la rhizogénèse [40].

- Le développement des fruits

Il joue également un rôle majeur à toutes les étapes de la reproduction. Les concentrations les plus élevées en AIA ont été retrouvées dans des fruits en développement ce qui montre son importance pour la croissance des fruits [40].

Matériel et Méthodes

Produced with ScanTOPDF

1. Prélèvement des échantillons du sol

Les échantillons du sol rhizosphérique sont prélevés à partir des champs de blé dur et de blé tendre (figure 12) cultivés dans la région d'Oued Zenati et plus précisément dans Ain Makhlouf. Cette région est située à 40Km (coté sud-ouest) de Guelma.



Figure 12. Les champs de prélèvement du blé dur(A) et du blé tendre (B).

A partir de chaque champ deux échantillons ont été prélevés. Tous les prélèvements sont effectués de manière aseptique selon les étapes suivantes :

A l'aide d'une tarière stérile (flambée avec de l'alcool sur place), on creuse à différents endroits bien déterminés de la zone étudiée, des trous d'une profondeur de 10cm environ. À l'aide d'une spatule stérile, les échantillons (les 4 échantillons) sont ensuite prélevés au niveau des racines profondes des plantes, puis ils sont transférés dans des bocaux appropriés stériles et étiquetés. Les échantillons sont conservés à une température égale à 04°C jusqu'à l'analyse.

2. Préparation des solutions mère du sol et des dilutions

À partir d'un échantillon de sol, 10g sont homogénéisés avec 100ml d'eau physiologique (annexe 01) stérile pendant 20minutes à température ambiante. L'homogénéisation est réalisée par agitation pour assurer la dispersion des cellules

microbiennes. Des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) sont réalisées afin de diluer la charge microbienne et pour obtenir des colonies séparées.

3. Culture bactérienne et purification des souches

A partir de chaque tube 100µl sont prélevés et étalés à la surface du milieu B de King (Annexe 01) à l'aide d'un râteau. Pour chaque dilution trois répétitions ont été effectuées, les boîtes de Pétri sont incubées pour une durée de 48h à 72 h dans une étuve à 30°C.

Après incubation les colonies sont prélevées selon leur fluorescence et leur morphologie, la fluorescence est révélée à l'œil nu et par une lampe à ultra-violette, les colonies fluorescentes sont repiquées dans des tubes contenant le même milieu de culture (figure 13).

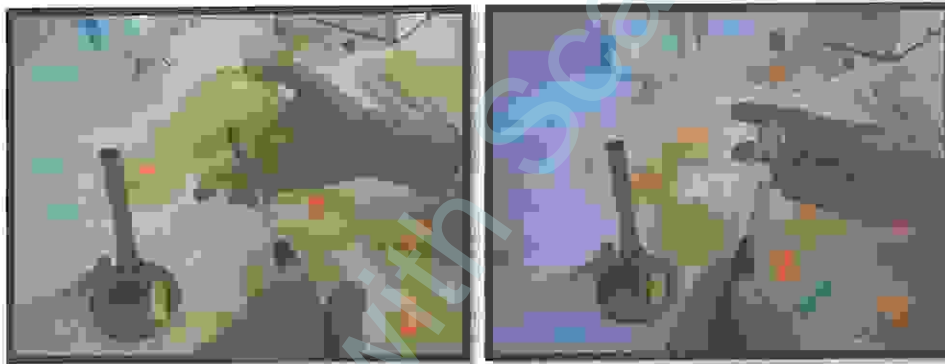


Figure 13. Prélèvement et purification des souches fluorescentes sur le milieu B de King.

4. Identification de souche

4.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant le classement des bactéries en deux groupes distincts : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif.

C'est la coloration de base en bactériologie, elle est basée sur l'affinité des souches fixées en colorants (violet de gentiane et fuchine) selon la nature de leur paroi, dont le résultat final est des cellules colorées en rose (bactéries à Gram négatif) et d'autres colorées en violet (bactéries à Gram positif) [41].

4.2 Recherche de l'oxydase

Une oxydase est une enzyme catalysant une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O_2) comme accepteur d'électron. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau (H_2O) ou en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le réactif peut se trouver sous deux formes : soit en solution, soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif.

L'oxydase dans cette étude est recherchée par la méthode des disques, une colonie bactérienne est déposée sur un disque d'oxydase placé sur une lame, à l'aide d'une pipette pasteur. Une réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette [42].

4.3 Recherche de la catalase

L'enzyme catalase est produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène.

Sur une lame propre, une colonie bactérienne est déposée au centre, ensuite quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène sont déposées. L'apparition des bulles de gaz indique la présence de la catalase [43].

4.4 La mobilité

La mobilité est mise en évidence dans le milieu Mannitol-mobilité (annexe 01) du fait du faible teneur en agar du milieu (gelose mole), les bactéries peuvent ainsi s'y déplacer.

4.5 La galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE (figure 14) est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux comporte 20 micro-cupules contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum ainsi les bactéries cultivées seulement sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification par un logiciel d'identification.

➤ Préparation de la galerie

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, ensuite environ 5 ml d'eau distillée stérile sont réparties dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide (figure 14). La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte.

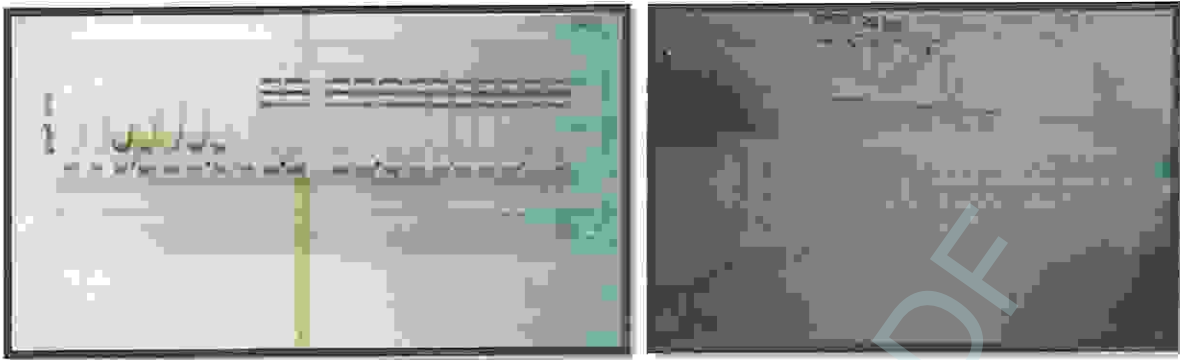


Figure 14. La galerie API 20 NE.

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune (18-24 heures), une à quatre colonies d'aspect morphologique identique sont prélevées par des touches successives puis mises en suspension dans une ampoule API contenant du Na Cl 0,85 %. Une densité suffisante (0,5 de MacFarland) (annexe 01) est exigée.

➤ Inoculation de la galerie

Les tubes des tests NO₃ à PNG sont remplis en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement, pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, qui empêcheraient le contact entre les bactéries à identifier et le réactif ou substrat à tester, la pointe de la pipette est posée sur le côté de la cupule tout en inclinant légèrement la boîte d'inoculation vers l'avant. Les tubes et cupules des tests | GLU | à | PAC | sont remplis en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe. Enfin, les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) sont remplies d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.

A la fin, la boîte d'incubation est fermée et incubée à 30° C pendant 24 heures.

➤ La lecture de la galerie

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (annexe 02). Les résultats de toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPNG) sont notés sur la fiche de lecture. Les deux tests NO₃, TRP sont révélés par l'ajout des réactifs spécifiques.

- **Test NO₃ :**

Dans la cupule NO₃ des gouttes de réactifs Nit1 et Nit2 sont ajoutées, après 05 minutes la couleur rouge est indiquée une réaction positive, à noter sur la fiche des résultats. La réaction négative peut être due à la production d'azote.

- **Test TRP :**

Des gouttes de réactif de Kovacs, la couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

5. Production et dosage d'auxine

L'auxine étudiée c'est l'indole-3- acide acétique(AIA). La quantification de l'AIA est évaluée par une méthode colorimétrique et l'absorbance est déterminée par spectrophotomètre [44].

- **La préparation de solution de tryptophane**

La solution de tryptophane est préparée par l'ajout de 500mg de tryptophane à 100ml de milieu TrypticsoyBroth (TSB) (annexe 01), la solution de tryptophane est stérilisée par filtration à l'aide un papier filtre de 0,2 µm, cette solution est conservé dans un flacon ombré à 4°C jusqu'à l'utilisation [45].

- **Dosage de la production de l'indole-3- acide acétique**

La synthèse de l'AIA au dépend de tryptophane comme précurseur est étudié à différentes concentration de tryptophane, les concentrations étudiées sont : 0mg/ml, 0.25mg/ml, 0.5mg/ml et 1mg/ml. De même, la production de AIA est étudiée à deux intervalles de temps (après 24 et 48 h d'incubation)

Le dosage est réalisé selon le tableau ci-dessous (tableau 1). Chaque tube est ensuite inoculé avec 20 µl d'une suspension bactérienne de 18 h avec une charge microbienne équivalente à 0,5 Mac Farland. Après inoculation et agitation, les tubes sont incubés à l'étuve de 30°C pendant 24 et 48 h. trois répliquas sont réalisés pour chaque intervalle de temps et chaque concentration en tryptophane.

Tableau 1. Concentrations de tryptophane étudiées.

Milieu TSB initiale dans le tube	4ml	4ml	4ml	4ml
Solution de tryptophane	1ml	0,5ml	0,25ml	0ml
Milieu TSB stérile	0ml	0,5ml	0,75ml	1ml
Volume finale	5ml	5ml	5ml	5ml
Concentration de tryptophane	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	0mg/ml

Après incubation, le contenu de chaque tube est centrifugé à 4000g pendant 10min à 4°C, ensuite, le surnageant de chaque tube est récupéré. Pour le dosage de AIA 1ml de surnageant est mélangé avec 4ml de réactif de Salkowski (annexe 01), les tubes sont incubés pendant 20min à l'obscurité à une température ambiante. L'absorbance est mesurée à 535nm [16].

6. Etude de la capacité d'inhibition de phytopathogène

Ce test est réalisé pour vérifier la capacité de la souche à inhiber la croissance de microorganismes phytopathogènes. Dans cette étude la souche isolée est testée contre un champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum*).

La souche de *Fusarium oxysporum* est cultivée sur la gélose Sabouraud (annexe 01), à partir de cette culture, des disques sont coupés et déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (annexe 01), ensuite, une culture fraîche de la souche bactérienne est étalée par stries sur les quatre coins de la boîte de Pétri (d'une distance de 1,5 cm du bord de la boîte). Des boîtes de Pétri qui ne contiennent que le disque de champignon sont utilisés comme contrôle. Trois répétitions sont utilisées pour chaque test [47].

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72 h et la lecture des résultats est réalisée par mesure de diamètre de croissance de champignons, les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition = $[(R1-R2)/R1]*100$

R1 = diamètre de croissance de champignon dans la boîte de control

R2 = diamètre de croissance de champignon dans les boîtes tests

7. Analyse statistique

Les données sont traitées par le logiciel statistique origine version 6. Elles sont soumises à une analyse de la variance ANOVA à un seul facteur.

Produced with ScanTOPDF

Résultats et discussion

Produced with ScanTOPDF

1. Isolement et purification des souches bactériennes

La culture des suspensions de sol dilué sur le milieu B de King est permet de révéler la présence de pyoverdine à l'œil nu ou à une lampe UV. La présence du pigment fluorescent est révélée dans toutes les boites, seulement les boites où les colonies sont bien séparées sont utilisées pour l'isolement de souches pures, grâce à la forte dissociation et la diffusion de la pyoverdine dans le milieu de culture, l'isolement est basée seulement sur la morphologie des colonies bien séparées. Parmi 30 souches isolées, une seule est révélée fluorescente et qui a été purifiée après par plusieurs repiquage sur le milieu B de King (figure 15).

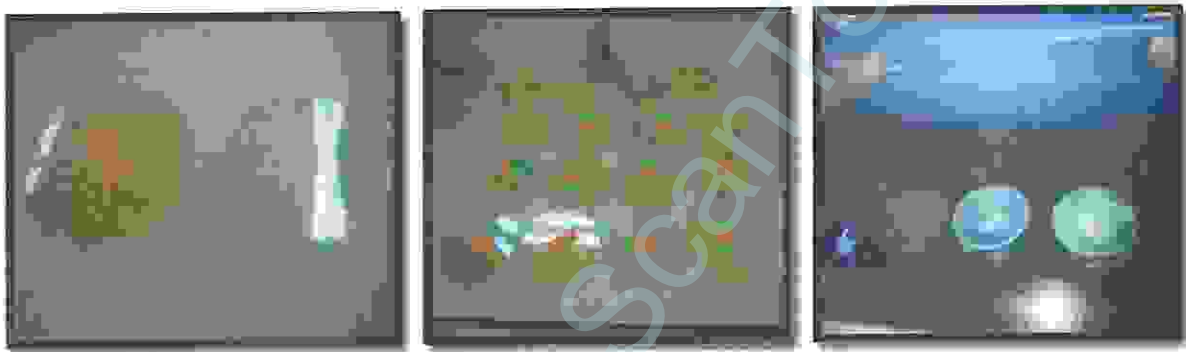


Figure 15. La révélation de la présence de la pyoverdine à l'œil nu et sous la lampe à ultraviolet.

2. Identification de la souche fluorescente

2.1 test préliminaire d'identification

Ces tests sont réalisés afin de s'orienter vers la galerie Api la plus convenable pour l'identification phénotypique de la souche, il s'agit de : la coloration de Gram, le test de catalase, le test d'oxydase et la mobilité.

L'observation au microscope après la coloration de Gram est révélée la présence des bacilles bien isolées colorées en rose, ce qui signifie que la souche est une bactérie à Gram négatif. L'apparition de couleur violette sur le disque est indiquée la présence de la cytochrome oxydase. La souche étudiée est incapable de dégrader l'eau oxygénée (catalase négative). La culture sur milieu mannitol mobilité est montrée une dégradation de mannitol et une diffusion de croissance au niveau de la piqure ce qui indique que la souche est mobile (figure 16).

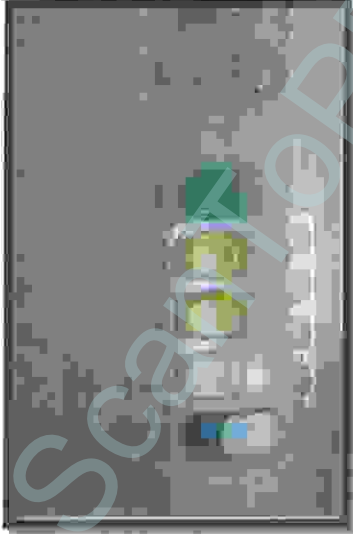


Figure 16. Résultat de test de la croissance dans le milieu mannitol mobilité.

2.2 Identification phénotypique par la galerie Api 20 NE

Après les tests préliminaires d'identification, la galerie Api 20NE est apparue la plus convenable pour l'identification. Le résultat de la lecture de la galerie est résumé dans le (tableau 2).

Tableau 2. Résultat de test d'identification de la souche isolée par la galerie Api 20 NE.

Test	Résultat	
NO3	+	
TRP	-	
GLU	+	
ADH	-	
URE	-	
ESC	+	
GEL	+	
PNG	-	
GLU	-	
ARA	-	
MNE	-	
MAN	+	
NAG	+	
MAL	-	
GNT	-	
CAP	-	
ADI	+	
MLT	+	
CIT	-	
PAC	-	
OX	+	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>

3. Etude de la capacité d'inhibition de phytopathogène

Les résultats de test d'antagonisme de *Pseudomonas fluorescens* contre *Fusarium oxysporum* sont résumés dans le (tableau 3). la souche testée est inhibée la croissance mycélienne par un minimum de 12,5% et un maximum de 30% , ce qui a donné une moyenne de :22,50% .

Tableau 3. Valeurs des pourcentages d'inhibition de *Fusarium oxysporum* par *Pseudomonas fluorescens*.

Diamètre de croissance		% d'inhibition	moyenne± écartype
Boîtes contrôles	Boîtes tests		
4,00 cm	2,80 cm	30,00	22,50 ± 7,35
4,00 cm	3,00 cm	25,00	
4,00 cm	3,50 cm	12,50	

Comme elles représente la figure 17, Lors de la compétition *in vitro* sur boîte de Pétri, la structure de champignon phytopathogène apparait altérée et désorganisée suggérant la sécrétion de molécules de défense par la bactérie *Pseudomonas fluorescens* qui le entour.

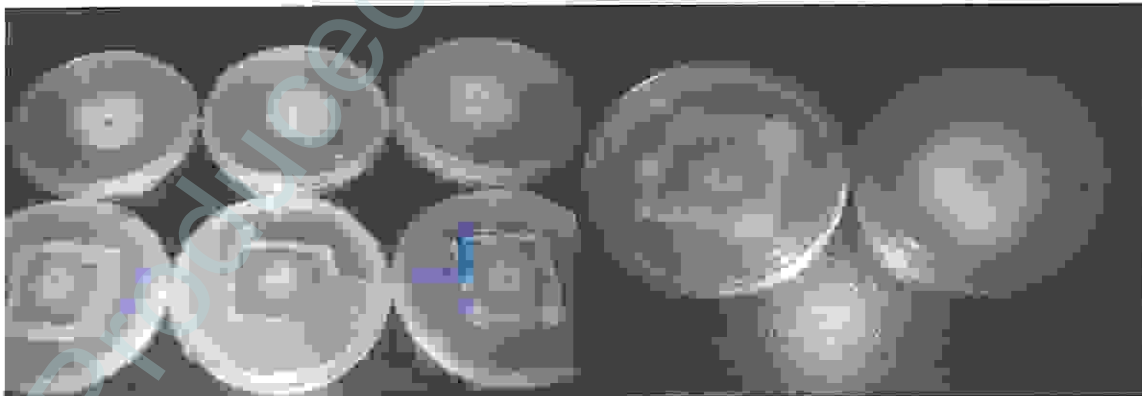


Figure 17. Résultat de l'effet antagoniste contre *Fusarium oxysporum*.

Dans l'ensemble, les bactéries ayant un impact positif sur la croissance de la plante (par le biais d'un effet protecteur ou via une stimulation de sa croissance) ont communément été regroupées sous le terme de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, ou PGPR

(Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Parmi cette flore elle figure l'espèce *Pseudomonas fluorescens* par ses effets très positifs sur la croissance de plantes, et qui a dans cette étude un effet antagoniste contre *Fusarium oxysporum*.

En effet, *Fusarium oxysporum* est un champignon qui appartient à la communauté microbienne tellurique, notamment dans la microflore rhizosphérique et présente des formes phytopathogènes hautement spécifiques sur les hôtes variables, induisant des flétrissements vasculaire appelé aussi la fusariose qu'elle est exprimé par la pourriture racinaires et du collet chez les plantes [48].

Plusieurs études ont rapporté la capacité de rhizobactéries promotrices de croissance à inhiber ce champignon [49, 50], Van Peer et ses collaborateurs [51] ont observé une accumulation de composés antifongiques significativement plus rapide chez les plants traités par *Pseudomonas fluorescens* après l'infection par *Fusarium oxysporum*, alors qu'aucune différence n'avait pu être détectée avant l'introduction du pathogène.

Selon la littérature, cette inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes, comme elle peut être liée à la production de plusieurs types de métabolites.

L'inhibition du champignon peut être liée à la production de la pyoverdine qui représente un sidérophore produit par *Pseudomonas fluorescens*, ce métabolite a une grande affinité pour le fer, elle peut inhiber la croissance par compétition avec le pathogène pour le fer [51,52]. Selon d'autre étude, l'activité antifongique est due à la production d'acide organique [53,54]. Cependant, d'autres suggèrent que l'effet inhibiteur est dû à la production de cyanure d'hydrogène, qui représente un métabolite secondaire produit par cette bactérie et qui a une activité antifongique [47].

Plusieurs espèces appartenant au genre *Pseudomonas* (*P.putida*, *P.aeruginosa*, *P.chlororaphis* et *P.cepacia*,...) sont capables d'inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum* [51, 52, 53, 55, 56]. Dans une étude, *Pseudomonas fluorescens* a inhibé la croissance par un pourcentage de 65% [47].

4. Dosage de la production de l'acide 3 indole acétique

Les résultats de la production de l'AIA en absence et en présence de tryptophane à différentes concentrations ainsi que en fonction de la durée d'incubation sont résumés dans le tableau 4.

Selon ces résultats, la souche de *Pseudomonas fluorescens* étudiée est capable de produire l'AIA même en absence de tryptophane, à 24 h d'incubation une production de 0,06 mg/ml est observée, une variation non significative de cette production est observée à 48 h ($P > 5\%$).

La production de l'AIA augmente significativement ($P < 5\%$) avec l'augmentation de la concentration de tryptophane, à la dose maximale de tryptophane étudiée, une production de 0,11 mg/ml est enregistrée après 24 h et de 0,17 mg/ml après 48 h d'incubation. En effet, à partir de la dose 0,25 mg/ml une corrélation linéaire est observée entre la production de l'AIA et la dose de tryptophane (figure 18), où le coefficient de détermination R^2 était de l'ordre de 0,911 après 24 h d'incubation et 0,997 après 48 h.

Tableau 4. Concentrations (mg/ml) de la production de l'acide 3 indole acétique en fonction du temps d'incubation et la concentration du tryptophane (annexe 03).

Concentration de tryptophane	24 h	48 h	P
0mg/ml	0,06167 ± 0,00924	0,07933 ± 0,0261	0,3311
0,25mg /ml	0,065 ± 0,00794	0,07667 ± 0,00874	0,16208
0,5mg /ml	0,06667 ± 0,01069	0,10567 ± 0,01242	0,0146
1mg /ml	0,11233 ± 0,0225	0,17667 ± 0,03055	0,04253
P*	0,00604	0,00146	

P : Probabilité de l'analyse de la variance en fonction du temps.

P* : Probabilité de l'analyse de la variance en fonction de la dose de tryptophane.

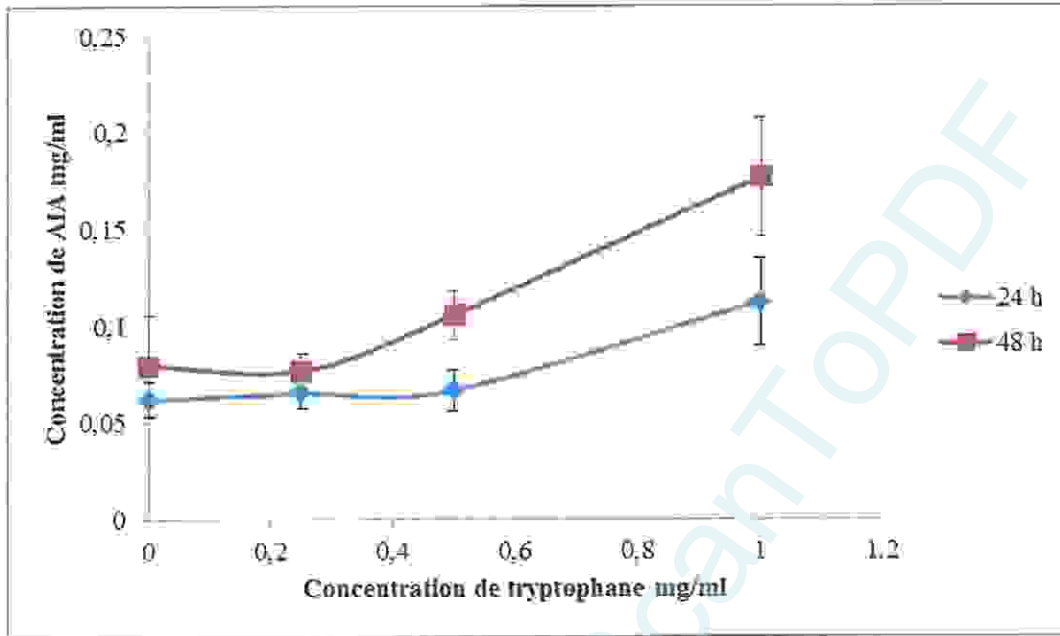


Figure 18. Relations entre la concentration de tryptophane et la production de l'acide 3 indole acétique selon la durée d'incubation.

Selon la littérature, la production de l'AIA par les rhizobactéries est réalisée selon différentes voies, dont la plupart utilisent le tryptophane des exsudats racinaires comme précurseur de production, les voies les plus répandues qui utilisent le tryptophane sont : la voie de l'indole-3-acétamide, la voie de Tryptamine, la voie de Tryptophane oxydase en chaîne latérale et la voie de Indole-3-acetonitrile [57].

En effet, la voie de Tryptophane oxydase en chaîne latérale est connue seulement chez l'espèce *Pseudomonas fluorescens* CHA0, dans cette voie, le tryptophane est directement converti en indole-3-acétaldéhyde, ensuite il est transformé en AIA. D'autres espèces telles que *Pseudomonas syringae* utilisent la voie d'indole-3-acétamide, dans cette voie, le tryptophane est d'abord transformé en indole-3-acétamide par le biais de trp-2-mono oxygénase, ensuite, l'indole-3-acétamide est converti en AIA par l'intermédiaire de l'IAM hydrolase [57].

Plusieurs études ont rapporté la capacité des différentes espèces du genre *Pseudomonas* à produire les phytohormones de type auxines et plus précisément l'AIA [15, 58]. Une

production entre 3,316 mg/l et 76,69 mg/l est observée en absence de tryptophane et de même, une production entre 3,977mg/l et 67,687 mg/l est observée avec une quantité de 50 mg de tryptophane. Dans une autre étude, une souche de *Pseudomonas sp* isolée de la rhizosphère de pomme de terre est capable de produire l'AIA avec une dose de 56,5 µg/ml avec 0,5 mg/ml de tryptophane et 52,6 µg/ml en absence de ce précurseur [15].

Produced with ScanTOPDF

Conclusion

Produced with ScanTOPDF

Conclusion

Cette étude a permis l'isolement de l'une des bactéries promotrices de croissance qui vivent dans la rhizosphère du blé dur. Les tests biochimiques d'identification ont permis de s'orienter vers l'espèce *Pseudomonas fluorescens*. La souche isolée produit des sidérophores sous forme de pyoverdine et qu'ils représentent des chélateurs de fer très puissants. Les tests réalisés ont permis de quantifier la production d'une phytohormone de type auxine, plus précisément, l'acide 3-indole acétique, la souche isolée peut produire l'acide 3-indole acétique en absence et en présence de tryptophane à différentes concentrations, dont, la concentration de l'acide 3-indole acétique augmente avec l'augmentation de la dose de tryptophane, de même, la concentration de cette hormone augmente avec la durée d'incubation. *Pseudomonas fluorescens* possède un effet antagoniste vis-à-vis *Fusarium oxysporum* qui est un champignon phytopathogène.

Après ces résultats nous pouvons conclure que la souche *Pseudomonas fluorescens* a deux effets bénéfiques pour la plante, elle est classée comme un régulateur de croissance à travers la production de la phytohormone et comme un agent de lutte biologique à travers l'inhibition de *Fusarium oxysporum*.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussée, d'une part, l'étude quantitative et qualitative des autres phytohormones, l'étude qualitative des auxines produites et l'étude qualitative des molécules responsables de l'inhibition de *Fusarium oxysporum*, et d'autre part, l'étude de l'effet directe sur des plantes en réalisant des inoculum *in vivo*.

Références bibliographiques

Produced with ScanTOPDF

- [1]. **N. Ataei**. 2005. Isolation and identification of *Pseudomonas fluorescens* auxin hormone producers and study their effects on the growth and yield of wheat. M. Sc. Thesis, Al-Zahra University, 690 p.
- [2]. **B. Sasirekha, S. Shivakumar, S. B. Sullia**. 2012. Statistical optimization for improved indol-3-acetic (IAA) production by *Pseudomonas aeruginosa* and demonstration of enhanced plant growth promotion. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 12(4): 863-865 p.
- [3]. **S. Khamna, A. Yokota, J. F. Peberdy, S. Lumyong**. 2010. Indole-3-acetic acid production by *streptomyces sp* isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Eur Asian Journal of Biosciences, 4: 23-24 p.
- [4]. **Z. Bendaira, K. Boucemina, K. Khenaka, K. Bouchair, M. Menad**. 2008. Etude in vitro de l'impact de l'antimoine et du chrome sur la rhizoflore bactérienne de *Lygeum Spartum* et d'*Hedysarum pallidum*: isolement et identification de souches résistantes à ces métaux. Université Mentouri Constantine, 3-8 p.
- [5]. **N. Khakipour, K. Khavazi, H. Mojallali, E. Pazira, H. Asadirahmani**. 2008. Production of auxin hormone by *Fluorescent Pseudomonas*. American-Eurasian Journal Agriculture & Environment Sciences, 4 (6): 687-688 p.
- [6]. **P. Stengel, L. Bruckler, J. P. Balesdent**. 2009. Le sol. Edition Quae, 62-72 p.
- [7]. **R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri**. 2007. The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil -plant interface. Second Edition, CRC Press, 1-4 p.
- [8]. **J. M. Gobat, M. Aragno, W. Matthez**. 2003. Le sol vivant : Bases de pédologie biologie des sols. Presses Polytechniques et Universitaires, Lausan, 568 p.
- [9]. **O. Merouane, A. Satour**. 2012. La production de l'auxine (AIA) par les actinomycètes rhizosphériques. Université Mentouri Constantine, 2-4 p.
- [10]. **M. C. Girad, C. Water**. 2005. Sol et environnements. Dunod, Paris, 306-317 p.
- [11]. **S. Meyer, C. Reeb, R. Bosdeveix**. 2008. Botanique: biologie et physiologie végétales. 2^{em} Edition Maloine, Paris 328-334 p.

- [12]. **P. Arpin, G. Kilbertus, J. F. Ponge, G. Vannier.** 1980. Importance de la microflore et de la microfaune en milieu forestier. Actualité d'écologie forestière : sol, flore, faune, Pesson, P. (Ed.), 1-3 p.
- [13]. **J. G. Fuchs, B. Sa, J. M. Herisse, Agref.** 1999. Fertilité de sol : Les produits biologiques bien les connaître pour mieux les utiliser. Institut de recherches et de consultations en agronomie et écologie appliquées, 17-22 p.
- [14]. **S. Brahim.** 1998. Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactérie et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Université Laval, 18-23 p.
- [15]. **S. Mezaache.** 2012. Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat Abbas Sétif, 26-27 p.
- [16]. **C. Djaballah.** 2010. Biodiversité des actinomycètes *Halophiles* et *Haltoleants* isolés de la Sebkhha de Ain Mila. Université Mentouri Constantine, 14-18 p.
- [17]. **M. T. Madigan, J. M. Martinko.** 2007. Biologie des microorganismes. Pearson Education, Paris, 478-634 p.
- [18]. **R. P. Freitas.** 2012. Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes, leur développement et leur résistance aux pathogènes. Université Paris Est-Créteil Val De Marne, 19-22 p.
- [19]. **L. Aouar.** 2012. Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Université Mentouri Constantine, 5-35 p.
- [20]. **S. K. Sabbag.** 2008. Adaptation à la pénétration racinaire de deux *ustilaginaceae* parasites du maïs : *Ustilago maydis* et *Sporisorium reilianum* - Analyse microscopique et transcriptomique. Université Toulouse III -Paul Sabatier, 26-28 p.
- [21]. **A. Lagrange.** 2009. Etudes écologiques et microbiologiques des espèces du genre *constusaria* (*cyperaceae*), Pionnières des sols ultramafiques en Nouvelle Calédonie : Perspective d'application à la restauration écologique. Université de la Nouvelle-Calédonie, 47-54 p.
- [22]. **M. Barroca.** 2005. Hétérogénéité des relations parasites-oiseaux : importance écologique et rôle évolutif. Université de Bourgogne, 3-4 p.

- [23]. **N. Nehem**. 2008. Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 43-44 p.
- [24]. **B. Massias**. 2008. Développement et mise au point d'outils moléculaires pour l'identification des flores complexes bactériennes. Thèse de Doctorat de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), 14-19 p.
- [25]. **S. Halary**. 2009. Etude des symbioses de mytilidés des écosystèmes marins profonds à base chimiosynthétique par des techniques de FISH, de microscopie et de traitement d'images. Université Pierre Et Marie Curie, 3-14 p.
- [26]. **M. T. Brissac**. 2009. Nature, diversité et spécificité de l'association *Lucinidae* / bactéries sulfo-oxydantes. Université Pierre Et Marie Curie, 21-28 p.
- [27]. **D. G. Strullu, R. Pikrin, C. Planchette, J. Carbaye**. 1989. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et Documentation - Lavoisier, 26-28 p.
- [28]. **A. Boulanger**. 2009. Analyse d'un nouveau système CUT impliqué dans l'acquisition et l'utilisation du N-acétylglucosamine par *Xanthomonas campestris pathovar campestris*. Université de Toulouse, 2-4 p.
- [29]. **E. Duboux, M. Nicole**. 2004. Biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes. Dunod, Paris, 6-56 p.
- [30]. **A. Besserer**. 2008. Etude des mécanismes d'action des strigolactones sur les champignons endomycorhiziens à arbuscules. Université de Toulouse - Paul Sabatier, 15-16 p.
- [31]. **A. Adam**. 2008. Elicitation de la résistance systématique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non pathogène. Université de Liège, 7-10 p.

- [32]. **K. Elouarzaki**. 2010. Développement de dispositifs moléculaire fonctionnalisés par un sidérophore pour la reconnaissance moléculaire spécifique en diagnostic clinique. Université d'Angers /Université Sultan Moulay Slimaine, 17 p.
- [33]. **E. Yétérien**. 2010. Bases moléculaires de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université de Strasbourg, 21-24 p.
- [34]. **S. Bertrand**. 2009. Les sédérophores de *Seedosporium apiospermum* : identification, synthèse et applications. Université D'Angers, 22-28 p.
- [35]. **R. S. Suero**. 2009. Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicyque dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. Université de Toulouse, 61 p.
- [36]. **J. L. Castaing**. 2011. Caractérisation de l'interaction des protéines IMA/MIF2 et CsNS au niveau moléculaire et physiologique. Université de Bordeaux1, 127-131 p.
- [37]. **F. G. Miranda**. 2006. La régulation transcriptionnelle dépendant de l'éthylène, caractérisation fonctionnelle d'un facteur transrationnel du type MBF1 et de famille des ERF chez la tomate. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 921 p.
- [38]. **W. Nultsh**. 1998. Botanique Générale. Université de Boeck, 460-468 p.
- [39]. **A. Valérie**. 2012. La glycosyltransphérase UG T76B1 d'*Arabidopsis* régule la signalisation hormonale lors de l'interaction avec l'Oomycète *Hyaloperonospora Arabidopsidis*. Ecole Pratique des Hautes Etudes, 17-18 p.
- [40]. **A. A. Robin**. 2011. Rôle d'ETTINLARF3 dans le développement du carpelle chez *Arabidopsis Thaliana*. Thèse de Doctorat de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, 6-20 p.
- [41]. **T. N. Kahlouche, Ghezlane, B. Athmani, S. Guemouri**. 2008. Microbiologie: Travaux pratiques. Office de publication universitaire, 90-95 p.

- [42]. **S. Guenoune**. 2009. Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine d'El Harrouche. Université Mentouri Constantine, 29 p.
- [43]. **B. Harzallah**. 2011. Étude de la biodegradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'Ibn Ziad. Université Mentouri Constantine, 31 p.
- [44]. **R. Shimaila, C. C. Trevor, R. G. Bernard**. 2012. Isolation and characterization of new plant growth- promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61: 217-218 p.
- [45]. **G. Lenin, M. Jayanthi**. 2012. Indol acetic acid, gibberelic acid and siderophore production by PGPR isolates from rhizosphere soils of *Catharanthus roseus*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(4): 933-935 p.
- [46]. **C. D. Merten, G. Buchel, E. Kothe**. 2008. Metal induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Journal homepage Soil Biology and Biochemistry*, 41: 154-162 p.
- [47]. **M. S .S. Noori, H. M. Saud**. 2012. Potential plant growth promoting activity of *pseudomonas sp* isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *Journal plant pathologie & microbiologie*, 3 (120): 2-3 p.
- [48]. **F. Bensaid, D. Toua, M. Benchabane**. 2006. Antagonisme microbien et sols résistants aux Fusariose vasculaires. Université Saad Dahlab Blida, 163 p.
- [49]. **K. Hibar, M. D. Remadi, M. El Mahjoub**. 2007. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum f. sp. Radias- lycopersici* by *Trichoderma ssp*. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 2: 47-58 p.
- [50]. **P. Lemanceau, C. Alabouvette**. 1991. Biological control of *Fusarium* diseases by *Fluorescent pseudomonas* and non pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection*, 10: 279-286 p.
- [51]. **V. R. Peer, G. J. Niemann, B. Schippers**. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas sp* strain WCS417r. *Phytopathology*, 81: 728-734 p.
- [52]. **O. Couillerot, C. P. Combaret, J. C. Mellado, Y. M. Loccoz**. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely – related *fluorescent pseudomonas* as biocontrol agents of soil-born phytopathogene. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 505 p.

- [53]. **M. M. Aeslah, K. T. A. Laith, B. Lyazzat, S. Baharuddin.** 2011. Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. Cubens* by *Pseudomonas fluorescens* and Baba in vitro. *World Applied Sciences Journal*, 15(2): 189-191 p.
- [54]. **I. Hmissi, S. Gargouri, B. Sifi.** 2011. Attempt of protection against *Fusarium culmorum* using rhizobium. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 6: 75-86 p.
- [55]. **S. Sageera, I. Murtaza, L. Omi, A. Arif.** 2012. Biological control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus sp* by *Pseudomonas fluorescens* isolated from wheat rhizosphere soil of Kashmir. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4: 24-34 p.
- [56]. **B. B. Asha, N. S. Chandra, C. A. C. Udaya, C. Srinivas, S. R. Niranjana.** 2011. Biological control of *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici* causing wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Microbiology Research*, 3: 79-84 p.
- [57]. **D. K. Maheshwari.** 2011. *Bacteria in agrobiologie: plant nutrient management.* Springer, London, 145- 146 p.
- [58]. [http: www. Wikipedia. Org](http://www.Wikipedia.Org) (date de consultation 26/05/2013).

Annexes

Produced with ScantOPDF

Annexe 01. La composition des milieux utilisés**Eau physiologique**

Composition en g/l

Na cl.....	9 g
Eau distillé.....	1 litre

B de King

Composition en g/l

Peptone.....	20 g
Glycérol.....	1,5 ml
Phosphate bi potassique anhydre (K ₂ HPO ₄).....	1,5 g
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ ·7H ₂ O).....	1,5 g
L'agar.....	20 g
L'eau distille.....	100 ml
PH=7	

Mannitol-Mobilité

Peptone pancréatique de viande.....	20 g
Agar-agar.....	4,5 g
Mannitol.....	20 g
Nitrate de potassium.....	1,5 g
Rouge de phénol solution à 1%.....	2,5 ml

La solution de 0.5 Mac Farland

L'étalon 0.5 Mac Farland est préparé en versant 0.5ml d'une solution de BaCl₂ dihydrate a 1% (10g/l), dans une éprouvette de 100ml compléter a 100ml avec du H₂SO₄ a 1% (10ml/l) ainsi préparé, il doit avoir une DO de 0.08 à 0.11 lue à 625nm.

TrypticsoyBroth (TSB)

Composition en g/l

Tryptone.....	17,0 g
Nacl.....	5,0 g
Peptone.....	3,0 g
Glucose.....	2,5 g
K ₂ Hpo ₄	2,5 g
Eau distillé.....	1litre
PH=7	

Le réactif de Salkowski

Solution aqueuse de FeCl ₃ filtrée (6,75g/50ml).....	7,5ml
L'acide sulfurique.....	150ml
L'eau distillé stérile.....	250ml

Sabouraud

Composition en g/l

Glucose.....	20,0 g
Agar.....	15,0 g

Peptone.....10,0 g

PH 6,8-7,0 à 25°C

Potato Dextrose Agar (PDA)

L'extrait de pomme de terre (200g de potato +1000ml d'eau distillé.....200 ml

Glucose.....20 g

Agar.....20 g

Produced with ScanTOPDF

Tableau de lecture de la galerie API 20 NE.

test	Composants actifs	QTE (mg/m)	Reactions/enzymes	Résultats negatif	Resultats positif
NO ₃	Potassium nitrate	0,136	Réduction des nitrates en nitrites	Incolore	Rose-rouge
			Réduction des nitrites en Azote	Rose	incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	Formation d'indole (tryptophane)	Incolore/vertpale/ Jaune	Rose
GLU	D-glucose	1,92	Fermentation (Glucose)	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-argenine	1,92	Arginine DIHydrolase	Jaune	Orange/rose/ Rouge
URE	Urée	0,76	UREase	Jaune	Orange/rose/ Rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0,56 0,072	Hydrolyse (Bgalactosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris/marron/ Noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	0,6	Hydrolyse(protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du piment noir
PNPG	4-nitrophényl-BD-galactopyranoside	0,22	B-galactosidase (para-nitrophényl-BD-galactopyranosidedase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1,56	Assimilation (GLUcose)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1,4	Assimilation(arabinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1,4	Assimilation (mannose)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1,36	Assimilation (mannitol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	Assimilation (N-acétyl-glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1,4	Assimilation (maltose)	Transparence	Trouble
GNT	Potassium gluconate	1,84	Assimilation (potassium gluconate)	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	0,78	Assimilation (acide carpique)	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	1,12	Assimilation (acide adipique)	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	1,56	Assimilation (malate)	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	2,28	Assimilation (tri sodium citrate)	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	0,8	Assimilation (acide phénylacétique)	Transparence	Trouble
OX	Voire notice du oxydase	-	Cytochrome-oxydase	Voir notice du test oxydase	

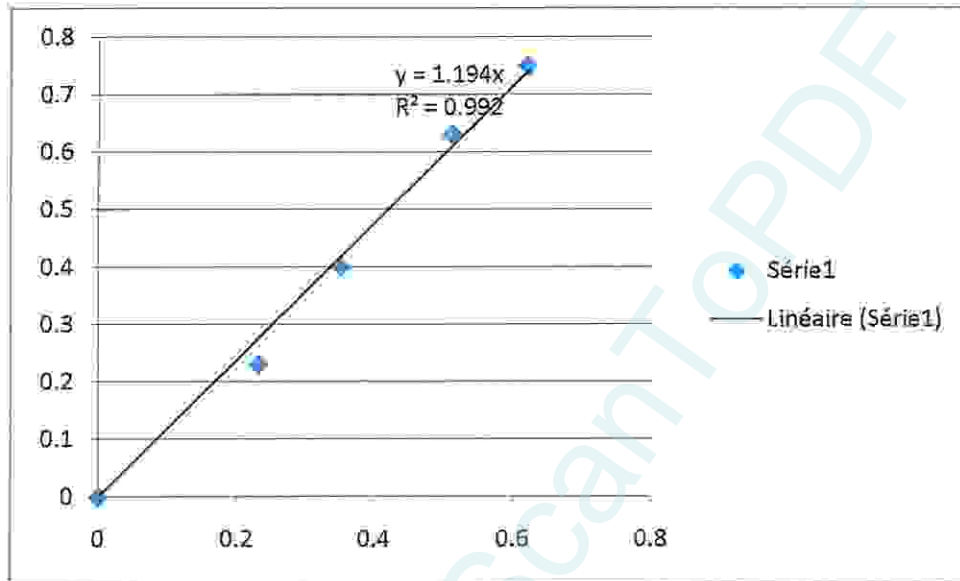


Figure 19. La courbe d'étalonnage.

Résumé

Produced WITH ScantOPDF

Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement et l'étude des bactéries rhizosphériques appartenant au groupe de *Pseudomonas* spp *fluorescents*, à partir de la rhizosphère du blé tendre et du blé dur de la région de Guelma. Ainsi que l'étude de la capacité de ces souches à produire l'acide 3-indolacétique (AIA) et à inhiber *in vitro* *Fusarium oxysporum*.

Grâce à la forte diffusion de la pyoverdine sur le milieu B de King, une seule souche fluorescente est isolée. Les tests biochimiques d'identification par la galerie api 20NE ont permis de s'orienter vers l'espèce *Pseudomonas fluorescens*. La détection et la quantification de l'AIA est révélée par la méthode colorimétrique de Salkowski, le test est réalisé en milieu TSB en présence de tryptophane à différentes concentrations (0-0,25-0,5 et 1 mg/ml) et la lecture est réalisée en deux intervalles de temps, après 24 h et 48 h d'incubation. La souche isolée produit l'AIA même en absence de tryptophane, de même cette production augmente avec l'augmentation de la concentration de tryptophane et avec la durée d'incubation, dont la production la plus importante est de 0,17 mg/ml.

L'espèce phytopathogène *Fusarium oxysporum* est révélée sensible à l'action de *Pseudomonas fluorescens*, un pourcentage d'inhibition de la croissance de l'ordre de 30% est observé.

La souche rhizosphérique isolée révèle des activités promotrices très intéressantes à travers la production de l'AIA et l'inhibition de phytopathogène, et il est indispensable de confirmer ces capacités directement *in vivo* sur des plantes.

Mots clés : Le sol rhizosphérique, *Pseudomonas fluorescens*, l'acide 3-indolacétique, *Fusarium oxysporum*.

Abstract

The objective of this work was the study of rhizosphere bacteria belonging to the group of *fluorescent Pseudomonas spp.*

Strains were isolated from wheat rhizosphere (common and durum wheat) of agricultural areas of Guelma using the King's B medium. Due to the forte dissociation of this pigment, just one fluorescent bacterium was obtained. The ability of this strain to product 3-indol acetic acid (IAA) was studied using Salkowski colorimetric method, the test is carried out in tryptic soy broth (TSB) medium in the presence of tryptophan at different concentrations (0, 0.25, 0.5 and 1mg/ml) and the reading is carried out in two times lots, after 24h and 48h. The antifungal activity of this strain was tested against *Fusarium oxysporum* using Potato dextrose agar (PDA) medium.

The isolated strain can produce IAA even in the absence of tryptophan with concentration of 0.11233 mg/ml after 24 h and 0.17 mg/ml after 48h. The production of IAA increase with increasing of tryptophan concentration, in addition, this production is more enhanced after 48 h of incubation. The highest recorded production of IAA was 0.17mg/ml.

The phytopathogen (*Fusarium oxysporum*) is revealed sensitive to the action of *Pseudomonas fluorescens*. An inhibition percentage of 30% is observed.

The isolated strain was revealed interesting promoter activities through the production of IAA and inhibition of the phytopathogen, which make interesting to study these capabilities directly on plants.

Key words: Rhizosphere, *Pseudomonas fluorescens*, 3-indoleacetic acid, *Fusarium oxysporum*.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة البكتيريا المعزولة من المنطقة الجذرية لنبات القمح اللين و الصلْب في منطقة قالمة و كذلك دراسة قدرة هذه السلالات على انتاج حمض اندول استينيك و تثبيط انتشار الفطر *Fusarium oxysporum* مخبريا .

بسبب انتشار *pyoverdinen* على الوسط *B de King* تم عزل سلالة واحدة و التعرف عليها بواسطة الاختبارات البيوكيميائية (*Api 20NE*) الذي اكد ان نوع السلالة هي *Pseudomonas fluorescens* . تم تحديد كمية حمض اندول استينيك المركبة بالطريقة اللونية باستعمال سالكوسكي . الاختبار اجري في وسط يحتوي على *TSB* في وجود تراكيز مختلفة من التريبتوفان (1 , 0,5 , 0,25 , 0) (مغ/ملل) و يتم تنفيذ القراءة في فترتين زمنيتين بعد حضانة لمدة 24 و 48 ساعة .

السلالة المعزولة قامت بتكوين حمض اندول استينيك حتى في غياب التريبتوفان . وهذا التركيب يرتفع مع زيادة تركيز التريبتوفان في الوسط حيث ان اكير نسبة وصلت الي 0,17 مغ/ملل .

النوع الفطري الممرض *Fusarium oxysporum* حساس لعمل *fluorescens pseudomonas* نسبة تثبيط نمو الفطر قدرت ب 30 % .

السلالة المعزولة من المنطقة الجذرية تظهر وظيفتين مهمتين من خلال انتاج حمض اندول استينيك و كبح الكائنات الممرضة النباتية و انه من الضروري تأكيد هذه القدرات مباشرة في النباتات الحية .

الكلمات المفتاحية: منطقة الجذور *Pseudomonas fluorescens* حمض اندول استينيك *Fusarium oxysporum* .