

**UNIVERSITE ABDELMALEK ESSAADI
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES - Tanger**

**Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur
Formation Doctorale : Sciences et Techniques de l'Ingénieur**

THESE DE DOCTORAT

**Présentée
Pour l'obtention du**

DOCTORAT EN SCIENCES ET TECHNIQUES DE L'INGENIEUR

Par : *Saida AARAB*

Discipline : Biotechnologie

Spécialité : Microbiologie

***Sélection et caractérisation de bactéries solubilisatrices de
phosphates isolées à partir des sols rhizosphériques du riz et de
légumineuses du Nord marocain***

Soutenue le 11 Mai 2013 devant le Jury :

Pr. A. FILALI MALTOUF	Université Mohammed V, Rabat	<i>Président</i>
Pr. M. MEGIAS GUIJO	Université de Seville, Espagne	<i>Rapporteur</i>
Pr. M. MISBAH EL IDRISSE	Ecole Normale Supérieure, Rabat	<i>Rapporteur</i>
Pr. Y. OUHDOUCH	Université Cadi Ayyad, Marrakech	<i>Rapporteur</i>
Pr. M. BAKKALI	Université Abdelmalek Essaâdi, Tanger	<i>Examineur</i>
Pr. A. LAGLAOUI	Université Abdelmalek Essaâdi, Tanger	<i>Invité</i>
Dr. M. EL MZIBRI	CNESTEN, Rabat	<i>Invité</i>
Pr. F. J. OLLERO MARQUEZ	Université de Seville, Espagne	<i>Co-encadrant</i>
Pr. A. ARAKRAK	Université Abdelmalek Essaâdi, Tanger	<i>Directeur de thèse</i>

***Structure de recherche accréditée d'accueil :
UAE/09FST : Equipe de Recherche en Biotechnologies et Génie des Biomolécules de la FST de Tanger***

Le présent travail a été réalisé dans l'Equipe de Recherche en Biotechnologies et Génie des Biomolécules de la Faculté des sciences et Techniques de Tanger, en collaboration avec l'unité de recherche de Département de Microbiologie et le Département de Microbiologie et Parasitologie, Université de Séville, Espagne.

Ce travail a bénéficié du soutien financier de :

- La coopération Maroco-Espagnole (AECI) en 2009: Action Intégrée N° (A/023017/09): (Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato de los arrozales de Marruecos).
- Le renouvellement du projet en 2010: Action Intégrée N° (A/030647/10).

Publications

Aarab, S., Ollero, J., Megías, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A., 2012. Isolation and Identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of *Lupinus hirsitus* in the north of Morocco. *Moroccan Journal of Biology*. (accepté). ISSN :1114-8756 N° Dépôt légal: 2005/0007

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A., 2009. Sélection des isolats rhizobiens solubilisant le phosphate tricalcique : Inoculation des graines du triticales (Variété Momtaz). *COVAPHOS III*, 5 : 147-152. ISBN: 9954-8734-2-7.

Communications Internationales

Orales

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Megías, M., Ollero, J., Arakrak, A. Sélection des *Pseudomonas* spp. solubilisant les phosphates inorganiques à partir de la rhizosphère du riz cultivé au Nord-Ouest du Maroc. *3^{ème} Colloque International de Biotechnologie Microbienne, Innovation Technologique et Valorisation des Biomolécules*. 15 - 17 Mars 2012, Tanger, Maroc.

Aarab, S., Hassani Zerrouk, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Effet des souches de *Pseudomonas* sp. sur la solubilisation du phosphate tricalcique et sur la germination des graines du riz. *8^{èmes} Journées Biotechnologiques de l'Association Tunisienne de la Biotechnologie*. 20-23 Décembre 2009, Sousse, Tunisie.

Affichées

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Screening and Application of Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) for Rice Production in calcareous Soil in northwest of Morocco *First International American Moroccan Agricultural Sciences Conference (AMAS Conference I) March 18-19, 2013, Rabat, Morocco*.

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Beneficial effect of *Pseudomonas* spp isolated from the rice fields in northwest Morocco. *Integrated Soil Fertility Management in Africa: from Microbes to Markets*. 22-26 Octobre 2012, Nairobi, Kenya.

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Megías, M., Ollero, J., Arakrak, A. Sélection des rhizobactéries solubilisatrices de phosphates calciques isolées de la rhizosphère de différentes légumineuses. *3^{ème} Colloque International de Biotechnologie Microbienne, sous le thème « Innovation Technologique et Valorisation des Biomolécules »*. 15-17 Mars 2012, Tanger, Maroc.

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Solubilisation du phosphate tricalcique par des bactéries isolées de la rhizosphère du riz. *3^{ème} Colloque International de Biotechnologie Microbienne, sous le thème « Innovation Technologique et Valorisation des Biomolécules »*. 15-17 Mars 2012, Tanger, Maroc.

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Effet de la source du carbone sur l'activité solubilisatrice du phosphate tricalcique par des *Pseudomonas* sp. *3^{ème} édition du Congrès International - Amélioration de la Production Agricole - Plan Maroc Vert*. 17-18 Mars 2011, Settat, Maroc.

Aarab, S., Hassani Zerrouk, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Effet du carbone sur l'activité solubilisatrice du phosphate tricalcique chez les *Pseudomonas* sp. *8èmes Journées Biotechnologiques de l'Association Tunisienne de la Biotechnologie*. 20-23 Décembre 2009, Sousse, Tunisie.

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Sélection des isolats rhizobiens solubilisant le phosphate tricalcique : inoculation des graines du triticale (variété Momtaz). *3ème Conférence Internationale sous le thème « La valorisation des phosphates et les composés phosphatés »*. 18-20 Mars 2009, Marrakech, Maroc.

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Étude de l'activité solubilisatrice de phosphate inorganique par des rhizobia isolés de différentes légumineuses. *4ème Congrès International de Génétique et Biologie Moléculaire et au 4ème Congrès International de Biotechnologie*, 06-08 Novembre 2008, Ouarzazate, Maroc.

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Isolement et sélection des isolats de *Rhizobium* pour la solubilisation du phosphate tricalcique. *19èmes Journées Scientifiques de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques - 3ème Congrès International de Biotechnologie « Association Maghrébine de Biotechnologie*. 24 - 27 Mars 2008, Hammamet, Tunisie.

Communications Nationales

Affichées

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Effet des Rhizobactéries sur la croissance du riz. *4ème édition de l'Atelier Annuel iCré@doctorant UAE 2010*. 20 - 23 Avril 2010, Assilah, Maroc. (**Prix du meilleur Poster**).

Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., Arakrak, A. Effet des isolats rhizobiens sur l'inoculation des semences du triticale (variété Momatz). *2ème workshop de la SMBBM - La biochimie et la Biologie Moléculaire au service de la qualité, l'hygiène, la sécurité alimentaire et de l'environnement*. 5 juin 2008, Mohammedia, Maroc.

À la mémoire de mes chers parents, que je souhaiterais embrasser vos mains, et à toi, ma sœur Fatima. Aucun mot ne peut exprimer à juste valeur l'amour que je vous porte tous. Malgré votre absence, vous êtes toujours dans mon cœur !

Remerciement

Avant tout, je rends grâce à notre Seigneur Dieu, le Miséricordieux, le Tout Puissant et le Plus Clément, pour la réalisation de ce travail. Sans Sa précieuse aide, je n'aurais jamais pu surmonter les difficultés de la vie ; *Al Hamdo Li Allah.*

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse *Mr. A. Arakrak*, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Tanger, pour m'avoir permis de mener à bien ce travail et pour m'avoir épaulée toujours pendant ces années. J'aimerais souligner sa générosité, sa disponibilité et son grand soutien tout au long de ce travail.

Je remercie vivement les *Professeurs Mr. M. Bakkali* et *Mr. A. Laglaoui* de l'Equipe de Recherche en Biotechnologies et Génie des Biomolécules à la Faculté des Sciences et Technique de Tanger, pour leurs encouragements, leurs conseils auront toujours été d'une grande valeur et avisés et leurs qualités humaines qu'ils n'ont cessé de manifester tout au long de la réalisation de ce travail, et aussi pour leur précieuse aide lors de la collecte des échantillons et aussi pour l'identification taxonomiques des plantes. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance et mon grand respect.

Je voudrais également remercier *Mr. M. Megias*, catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla y Director del Grupo de Investigación BIO 169 del PAIDI de la Junta de Andalucía, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la permission d'y réaliser une partie de ma thèse de doctorat.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance à *Mr. J. Ollero*, Profesor en Universidad de Sevilla, pour son accueil chaleureux et sa bienveillance au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait profiter de ses connaissances enrichissantes.

Je remercie également, *Mr. M. El Mzibri*, Directeur de laboratoire au Centre National de l'Energie, des sciences et des Techniques Nucléaires à Rabat, pour m'avoir très gentiment accueillie au sein de son laboratoire et mis à ma disposition les équipements ainsi que les compétences de son équipe.

Je désire exprimer mes remerciements les plus respectueux à *Mr. A. Filali Maltouf*, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat, pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse. Mes sincères remerciements sont aussi adressés aux membres de jury, *Mr. M. Bakkali* et *Mr. A. Laglaoui*, Professeurs à la Faculté des Sciences et Techniques de Tanger, et

Mr. M. El Mzibri, Directeur de laboratoire au Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires à Rabat, qui me font l'honneur de leur intérêt pour ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements à *Mr. M. Misbah El Idrissi*, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure à Rabat, et *Mr. Y. Ouhdouch*, Professeur à la Faculté des Sciences à Marrakech, pour avoir accepté d'être rapporteurs. Qu'ils acceptent ici mes sentiments de gratitude pour le grand intérêt qu'ils ont accordé au sujet de ma thèse.

Je remercie et encourage les doctorantes et les doctorants du département de « Biologie » de la Faculté des Sciences et Techniques du Tanger, qui sont mes collègues, mes ami(e)s, mes sœurs et mes frères. Merci pour votre soutien amical inébranlable, votre spontanéité et votre bonne humeur dont tous les mots de remerciements ne suffisent jamais pour vous montrer à quel point vous m'avez fait un grand plaisir. Je vous souhaite tout le succès et le bonheur aussi bien dans la vie professionnelle que personnelle.

Ma gratitude va aussi à la grande famille du Département de Microbiologie de la Faculté de Biologie de Séville. *Quiero darles las gracias por todo el apoyo, la gran ayuda, el buen humor, y por todos los momentos agradables que pasamos juntos. Especialmente: Pajaritos, Roci, Nuria, Angeles, Charo, Ramón, Inés, Ana...*

Je voudrais également remercier toute l'équipe de la société ResBioAgro et plus particulièrement *Mr. H. Manyani* et *Mr. M. Dary* pour l'aide et la disponibilité dont ils ont fait preuve à mon égard pendant mon séjour à Séville et le soutien qu'ils m'ont accordée.

J'adresse une pensée toute particulière à tous ceux que j'ai le plaisir de rencontrer pendant la réalisation de ma thèse de doctorat et qui de près ou de loin, par leur sollicitude, leurs conseils et leur gentillesse, ont contribué à la réalisation de ce travail, *Halima, Ferdaous, Macarena, Isabel, Bouchra, Majida, Hanae, Luis, Cacau, Fabio, Alba, Fabiola...* Que chacun trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Un grand merci à mes sœurs, mes frères, mes belles sœurs et beaux frères, pour leur chaleureux amour et leur grand soutien moral et financier sans faille.

Il est probable que j'oublie quelques personnes, et j'espère qu'elles ne m'en tiendront pas rigueur. Si elles me connaissent bien, elles sauront que c'est involontaire.

Liste des tableaux

Tableau 1	<i>Composition du tampon de migration et de charge</i>	46
Tableau 2	<i>Composition du mélange réactionnel pour l'amplification d'ADNr 16S</i>	46
Tableau 3	<i>Composition du mélange réactionnel pour la BOX-PCR</i>	51
Tableau 4	<i>Caractéristiques physico-chimiques des sols de culture de riz à Larache</i>	54
Tableau 5	<i>Isolats sélectionnés en se basant sur le diamètre des halos de solubilisation.</i>	56
Tableau 6	<i>Isolats capables de produire de l'AIA</i>	58
Tableau 7	<i>Isolats capables de produire de l'HCN</i>	
Tableau 8	<i>Isolats capables de produire des sidérophores</i>	59
Tableau 9	<i>Diamètre des halos de solubilisation de P, production d'AIA, d'HCN et des sidérophores.</i>	60
Tableau 10	<i>Solubilisation des autres sources de P inorganique et évaluation des autres milieux de base utilisés pour la sélection des BSP (NBRIIP, YED-P).</i>	62
Tableau 11	<i>Tableau récapitulatif des résultats des tests de fixation libre d'azote, dégradation d'urée, d'ACC désaminase et de production d'AHL pour les 25 isolats retenus.</i>	66
Tableau 12	<i>Tableau récapitulatif des résultats d'activités hydrolytiques extracellulaires pour les 25 isolats retenus.</i>	68
Tableau 13	<i>Concentration de P solubilisé, le pH final du milieu de culture après 7 jours d'incubation et la concentration d'AIA produit par les vingt bactéries triées.</i>	73
Tableau 14	<i>Test d'antagonisme des souches étudiées vis-à-vis des bactéries phytopathogènes.</i>	75
Tableau 15	<i>Test d'antagonisme des souches étudiées vis-à-vis des champignons phytopathogènes et mode d'inhibition (Contact / Distance).</i>	77
Tableau 16	<i>Identification moléculaire des vingt souches selon le séquençage de l'ADNr 16S.</i>	80 81
Tableau 17	<i>Longueur aérienne et rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les seize bactéries testées après quatre semaines de croissance en pot.</i>	83
Tableau 18	<i>Longueur aérienne et rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les trois souches après quatre semaines de croissance en pot</i>	86
Tableau 19	<i>Test qualitatif de solubilisation de P inorganique des isolats rhizosphériques issus du champ un mois après l'inoculation.</i>	89
Tableau 20	<i>Différents paramètres évalués suite à la récolte du riz après trois mois de croissance.</i>	90

Liste des figures

Figure 1	<i>Cycle du P dans les sols cultivés.</i>	5
Figure 2	<i>Test qualitatif de solubilisation de phosphate tricalcique sur PVK solide montrant les halos de solubilisation donnés par certaines BSP.</i>	55
Figure 3	<i>Nombre total des BSP obtenues à partir de la rhizosphère du riz et des légumineuses naturelles.</i>	56
Figure 4	<i>Test qualitatif de production d'AIA montrant trois colonies de bactéries, GR70, Lh9 et Lh5, sur la membrane de nitrocellulose, entourées par des halos rosâtres de différents diamètres.</i>	57
Figure 5	<i>Halos de solubilisation formés en solubilisant les différentes sources de P inorganique.</i>	61
Figure 6	<i>Test de dégradation d'urée : l'halo rosâtre causé par l'alcalinisation du milieu présente la réaction positive par la souche AMG113 (Contrôle positif).</i>	63
Figure 7	<i>Test de dégradation d'ACC : La souche GP70 montre une réaction négative, le reste des bactéries montre une réaction positive.</i>	64
Figure 8	<i>Différentes activités hydrolytiques des bactéries étudiées</i>	67
Figure 9	<i>Différents profils électrophorétiques des LPSs sur gel de polyacrylamide obtenus</i>	69
Figure 10	<i>Concentrations de P solubilisé par les vingt souches après 7 jours d'incubation et les valeurs du pH final des milieux de culture.</i>	71
Figure 11	<i>Concentrations d'AIA produit par les vingt souches retenues.</i>	72
Figure 12	<i>Halos d'inhibition obtenus par certaines bactéries étudiées en présence des bactéries phytopathogènes (<i>Clavibacter michiganensis</i>, <i>Pseudomonas savastanoi</i> et <i>Ralstonia solanacearum</i>).</i>	74
Figure 13	<i>Différents modes d'inhibition exercés par les bactéries étudiées vis-à-vis des champignons phytopathogènes</i>	76
Figure 14	<i>Effet antagoniste des bactéries étudiées sur différents champignons phytopathogènes.</i>	78
Figure 15	<i>Distribution des bactéries étudiées selon le genre suite à l'identification moléculaire.</i>	79
Figure 16	<i>Plantes du riz inoculées après un mois de croissance en chambre de culture</i>	82
Figure 17	<i>Longueur de la partie aérienne des plantes inoculées avec les seize bactéries retenues après quatre semaines de croissance en pot.</i>	84
Figure 18	<i>Effet de l'inoculation sur le développement des plantes du riz</i>	
Figure 19	<i>Rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les seize bactéries retenues après quatre semaines de croissance en pot.</i>	85
Figure 20	<i>Longueur de la partie aérienne des plantes inoculées avec les trois bactéries et le mélange après quatre semaines de croissance en pot.</i>	87
Figure 21	<i>Rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les trois bactéries et le mélange après quatre semaines de croissance en pot.</i>	
Figure 22	<i>Parcelle expérimentale au semis (à gauche) et un mois après l'inoculation avec les quatre bactéries les plus efficaces (à droite).</i>	88
Figure 23	<i>Gel d'agarose montrant l'empreinte génomique BOX-PCR</i>	90

Liste des abréviations

°C: Degré Celsius	ml: Millilitre
µg: Microgramme	mm: Millimètre
µl: Microlitre	mM: Millimoles
µM: Micromolaire	MSP: Microorganismes Solubilisant le Phosphate
µs/cm: Microseconde par centimètre	NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ACC: Aminocyclopropane carboxylate	NBRIP: National Botanical Research Institute's phosphate
ADN: Acide désoxyribonucléique	P: Phosphore
ADNr: ADN ribosomale	PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ADP: Adenosine 5'-diphosphate	pb : Paire de base
AHLs: N-acyl-L-homoserine lactones	PCR: Réaction de Polymérisation en Chaîne
AIA: Acide Indole Acétique	PDA: Potato Dextrose Agar
Al: Aluminium	PGPB: Plant Growth-Promoting Bacteria
ARN: Acide ribonucléique	p/v: Poids/volume
ATP: Adénosine triphosphate	PVK: Pikovskaya
BSP: Bactéries Solubilisant le Phosphate	Rpm: Rotations par minute
Ca: Calcium	SAR: Systemic Acquired Resistance
CAS: Chrome Azurol S	SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
CMC: carboxyméthylcellulose	spp.: Espèce
DGGE:	TAE: Tris/acetate
dNTP: Désoxyribonucléotide triphosphate	TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine
EC: Conductivité électrique	TSA : Tryptic Soy Agar
EDTA: Ethylènediamine tétracétate	UFC: Unité formatrice de colonies
Fe: Fer	UV: Ultraviolet
GA: Gibbérelline	V: Volt
H: Heure	Var: Variété
HCN: Acide cyanhydrique	v/v: Volume/volume
HHL: N-hexanoyl-L-homoserine lactone	X-gal: 5-bromo-4-chloro 3-indolyl-β-D-galactoside
ISR: Induced Systemic Resistance	YED: Yeast Extract Dextrose
Kb: Kilobase	
LPS: Lipopolysaccharides	
LSD: Plus petite différence significative	
mg: Milligramme	
min: Minutes	

Résumé

La rhizosphère est une zone riche en matière organique issue des exsudats racinaires et qui contribue à une forte colonisation bactérienne surtout à l'entourage des racines. Certaines de ces bactéries peuvent avoir un effet positif sur la croissance et la santé de la plante d'une manière directe ou indirecte. Ces rhizobactéries bénéfiques sont identifiées par le terme PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). L'exploitation de ces bactéries en tant que bio-engrais et/ou biopesticides est une alternative prometteuse afin de réduire et même substituer les intrants chimiques vue les différents effets néfastes de ces derniers. Dans ce contexte, différentes rhizobactéries solubilisant le phosphate inorganique ont été isolées *in vitro* puis testées sur des plantes de riz, variété Puntal, afin de mettre en œuvre un biofertilisant efficient.

Dans un premier temps, 123 souches ont été sélectionnées (diamètres de solubilisation ≥ 4 cm) parmi une collection de 392 isolats issus de la rhizosphère de différentes variétés de riz et aussi de différentes légumineuses, sur la base de leur capacité à solubiliser le phosphate tricalcique dans le milieu Pikovskaya (PVK) solide. En plus, nous avons examiné chez ces bactéries la production d'acide indole acétique (AIA), d'acide cyanhydrique (HCN) et des sidérophores. Un total de 25 isolats a été retenu pour la poursuite des essais. Dans un second temps, nous avons cherché plus d'activités PGP afin d'évaluer nos isolats *in vitro*, telles que la fixation d'azote atmosphérique, la production des exo-enzymes hydrolytiques et l'ACC désaminase. De plus, on a testé chez ces rhizobactéries la capacité à inhiber certains champignons et bactéries phytopathogènes *in vitro*. Au niveau moléculaire, les résultats de séquençage d'ADN 16S montrent que les meilleurs isolats se sont identifiés comme *Enterobacter*, *Aeromonas* et *Pseudomonas*.

Dans une dernière partie, il était crucial d'évaluer le potentiel d'utilisation de ces rhizobactéries comme PGPR vis à vis du riz en menant des expériences d'inoculation, en pot et dans le champ. Cette expérience est une étape essentielle dans le screening des bactéries rhizosphériques les plus efficientes en présence de la plante, et le développement par la suite d'un biofertilisant à base de ces agents biologiques. Effectivement, les résultats obtenus affirment l'effet positif de certaines BSP rhizosphériques en faveur de la croissance du riz dans les conditions contrôlées, qui s'est manifesté par des stimulations significatives de la longueur de la plante et de rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire. Les augmentations les plus importantes ont été obtenues en présence des trois bactéries, PR29, PP22 et GR70. Ces bactéries ont été retenues pour l'essai d'inoculation au champ, en plus

d'une quatrième bactérie, ER76, qui a donné la concentration la plus élevée de P solubilisé *in vitro*. Suite à l'inoculation du champ avec cet inoculant combiné à base de ces 4 bactéries, on a obtenu des résultats encourageants concernant le rendement en grains et aussi la qualité du produit en comparaison avec le témoin fertilisé (urée) et la parcelle traitée avec le compost végétal. Les résultats de cette étude encouragent à poursuivre des expériences supplémentaires sur l'inoculation avec les quatre BSP, en particulier aux champs, afin d'affiner l'efficacité de ces souches et d'optimiser leur utilisation comme bio-inoculant pour une productivité plus importante du riz.

Mots-clés: Rhizosphère, BSP, PGPR, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, biofertilisant, biopesticide, Riz.

Abstract

The rhizosphere is rich of organic matter that comes from root exudates and contributes to a high bacterial colonization especially around the roots. Some of these bacteria can have a positive effect on the growth and health of the plant either directly or indirectly. These beneficial rhizobacteria are termed as PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). The exploitation of these bacteria as biofertilizers and / or biopesticides is an efficient approach to reduce or even to replace chemical fertilizers that have many negative effects. In order to make the rice cultivation sustainable and less dependent on fertilizers, various inorganic phosphate solubilizing bacteria (PSB) were screened for different plant growth promotion (PGP) activities *in vitro* and tested on rice plants, var. Puntal, to develop an efficient bio-inoculant.

Initially, 123 bacteria were selected for their high P solubilization halo (diameter ≥ 4 cm) from a collection of 392 isolates with tricalcium phosphate solubilizing ability on Pikovskaya (PVK) agar, obtained from the rhizosphere of rice and different legumes. We examined these bacteria for indole acetic acid (IAA) production, hydrogen cyanide (HCN) production and siderophores production. A total of 25 isolates were screened. Secondly, more PGP activities were estimated *in vitro*, such as nitrogen fixation, hydrolytic exo-enzymes production and ACC deaminase activity. The bacteria were evaluated also for their ability to inhibit *in vitro* fungi and bacteria plant pathogenic. On the basis of 16S rDNA nucleotide sequences, all selected isolates were identified as *Enterobacter* sp., *Aeromonas* sp. and *Pseudomonas* sp.

In the last part, it was essential to determine the effects of inoculation with selected rhizobacteria on the growth of rice plants. This step is determinative for the screening of the most efficient bacteria and for the development of biofertilizers composed by these biological agents. Therefore, growth parameters of plants inoculated were measured at 30 days. The results of inoculation affirm the positive effect of certain rhizospheric PSB on the growth of rice under controlled conditions, which was manifested by significant increase of shoot height and dry weights of roots and shoots. The most important stimulations were detected for the plants inoculated with the isolates PR29, PP22 and GR70. A combined inoculant composed by these three bacteria and a fourth strain, ER76, which gave the highest concentration of P solubilized *in vitro*, was used to inoculate the field. We obtained encouraging results for the grain yield and the quality of the product as compared to the fertilized control (urea) and the plot treated with vegetable compost.

The results of this study are a beginning for other experiments of inoculation in field with mixed inoculants containing the four PSB to better understand their interaction with plant, as well as to optimize their use as biofertilizers for rice.

Keywords: Rhizosphere, PSB, PGPR, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, biofertilizer, biopesticide, Rice.

ملخص

منطقة الجذور هي منطقة غنية بالمواد العضوية وتشهد تكاثر جرثومي مهم. بعض هذه البكتيريا يمكن أن يكون لها تأثير إيجابي على نمو وصحة النبات بشكل مباشر أو غير مباشر. و يطلق مصطلح PGPR على هذه البكتيريا النافعة، والتي يتم استغلالها كأسمدة حيوية و/أو كمبيدات حيوية مما يعد بديلا واعدًا للحد من المواد الكيماوية. و في هذا السياق، تم عزل مجموعة متنوعة من البكتيريا المحللة للفسفور الغير عضوي أو BSP و اختبارها على الأرز، لهدف الحصول على سماد بيولوجي فعال.

تم اختيار 25 من البكتيريا BSP المعزولة من منطقة الجذور لأصناف متنوعة من نباتات الأرز و البقوليات و ذلك على أساس قدرتها الكبيره على إذابة الفوسفات بالإضافة إلى مجموعة من الخصائص الأخرى النافعة للنبات كإنتاج AIA و HCN. لاحقا، درسنا عند هذه البكتيريا باقي الخصائص ذات التأثير الإيجابي على نمو النبات مثل تثبيت النتروجين الجوي و إنتاج الأنزيمات و قدرتها على كبح الفطريات و البكتيريا المسببة للأمراض النباتية. في الجزء الأخير من البحث، قمنا بتقييم استخدام هذه البكتيريا كأسمدة للأرز بإجراء تجارب التلقيح، بغرفة الزراعة و في الحقل. تشكل هذه التجربة خطوة أساسية لفرز البكتيريا الأكثر كفاءة بوجود النبات.

إن نتائج البحث تؤكد التأثير الإيجابي لبعض البكتيريا على نمو الأرز في غرفة الزراعة والذي يتجلى من خلال تحسين طول الساق، و وزن الجذر الجاف و الساق الجاف. و تم الحصول على نتائج مشجعة في اختبار التلقيح في الحقل بخصوص محصول الحبوب و تحسين جودة المنتج بوجود البكتيريا الأربعة الأكثر كفاءة PR29, PP22, GR70 و RE76.

تشجع نتائج هذه الدراسة لمواصلة تجارب التلقيح خاصة في الحقول لاستخدام هذه البكتيريا على الوجه الأمثل كسماد بيولوجي لرفع إنتاجية الأرز و كذلك استخدامها لتحسين نمو نباتات أخرى.

الكلمات المفتاحية: منطقة الجذور، البكتيريا، الأرز، التلقيح، PGPR، BSP، AIA، HCN.

Sommaire

<i>Financement</i>	i
<i>Activités Scientifiques</i>	ii
<i>Dédicaces</i>	iv
<i>Remerciement</i>	v
<i>Lise des tableaux</i>	vii
<i>Listes des figures</i>	viii
<i>Liste des abréviations</i>	ix
<i>Résumé</i>	x
<i>Abstract</i>	xii
<i>ملخص</i>	xiv

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------------	---

Chapitre I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. PHOSPHORE COMME ELEMENT NUTRITIF POUR LA VEGETATION.....	4
1.1. Importance de phosphore	4
1.2. Phosphore dans le sol	4
1.2.1. Phosphore organique.....	5
1.2.2. Phosphore minéral.....	6
1.3. Impact des produits agricoles chimiques : fertilisants et pesticides	6
1.3.1. Inconvénients liés aux engrais phosphatés.....	7
2. BACTERIES SOLUBILISANT LE PHOSPHATE (BSP) COMME SOLUTION ALTERNATIVE	9
2.1. Interaction microorganismes-plantes	9
2.1.1. Définition de rhizosphère.....	9
2.1.2. Effet rhizosphérique.....	9
2.2. Bactéries solubilisant le phosphate (BSP)	10
2.2.1. Définition de BSP.....	10
3. RHIZOBACTERIES FAVORISANT LA CROISSANCE DES PLANTES (PGPR) ET LEUR MODES D'ACTION	12
3.1. Définition des PGPR	12
3.1.1. Genre <i>Pseudomonas</i>	13
3.2. Mode d'action des PGPR	14
3.2.1. Biofertilisation (PGPR à effet fertilisant).....	15
3.2.1.1. Amélioration de la nutrition azotée : Fixation bactérienne d'azote atmosphérique.....	15
• <i>Association symbiotique</i>	16
• <i>Fixation libre</i>	17
3.2.1.2. Amélioration de la disponibilité du P.....	18

• <i>Phosphate organique</i>	18
• <i>Phosphate minéral</i>	19
• <i>Processus de solubilisation du P minéral</i>	20
3.2.2. <i>Phyostimulation (PGPR à effet stimulant)</i>	21
3.2.2.1. <i>Acide indole acétique (AIA)</i>	22
3.2.2.2. <i>Aminocyclopropane carboxylate (ACC) désaminase</i>	23
3.2.3. <i>Biocontrôle (PGPR à effet protecteur)</i>	24
3.2.3.1. <i>Antibiose</i>	25
• <i>Production d'acide cyanhydrique (HCN)</i>	26
3.2.3.2. <i>Parasitisme</i>	26
3.2.3.3. <i>Compétition</i>	26
• <i>Production des sidérophores</i>	27
3.2.3.4. <i>Réduction de la virulence des phytopathogènes</i>	28
3.2.3.5. <i>Stimulation de la résistance systémique induite (ISR)</i>	28
3.3. Inoculation avec des BSP	29
3.3.1. <i>Inoculation avec une BSP ayant d'autres activités phytobénéfiques</i>	29
3.3.2. <i>Inoculation avec un inoculant combiné de PGPR</i>	30
4. BIOFORMULES A BASE DES RHIZOBACTERIES QUALIFIEES DE PGPR..	33
4.1. Caractères des bactéries utilisées comme inoculants	33
4.2. Facteurs affectant l'efficacité des bio-inoculants	34

Chapitre II MATERIEL & METHODES

1. MATERIEL VEGETAL ET COLLECTE DES ECHANTILLONS DE SOLS.....	36
1.1. Matériel végétal	36
1.2. Echantillons de sols : Sites d'étude et Echantillonnage	36
2. METHODES	36
2.1. Isolement, purification et conservation des rhizobactéries	36
2.1.1. <i>Isolement des bactéries <i>Pseudomonas</i></i>	37
2.1.2. <i>Isolement des autres bactéries rhizosphériques</i>	37
2.2. Sélection des bactéries solubilisant le phosphore (BSP)	37
2.3. Recherche des activités PGP	38
2.3.1. <i>Production d'acide indole acétique (AIA)</i>	38
2.3.2. <i>Production d'acide cyanhydrique (HCN)</i>	38
2.3.3. <i>Production des sidérophores</i>	38
2.3.4. <i>Test qualitatif de solubilisation : utilisation des sources différentes de P inorganique</i>	39
2.3.5. <i>Fixation libre d'azote</i>	39
2.3.6. <i>Dégradation d'urée</i>	40
2.3.7. <i>Détection d'activité ACC désaminase</i>	40
2.3.8. <i>Détection d' AHL (Acyl Homosérine Lactone)</i>	41
2.3.9. <i>Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires</i>	41
2.3.9.1. <i>Détermination de l'activité chitinolytique</i>	41
2.3.9.2. <i>Détermination de l'activité amylolytique</i>	42

2.3.9.3. Détermination de l'activité cellulolytique.....	42
2.3.9.4. Détermination de l'activité lipolytique.....	42
2.3.9.5. Détermination de l'activité protéolytique.....	42
2.4. Détermination de profil LPS (Lipopolysaccharides).....	43
2.5. Evaluation des autres activités PGP.....	43
2.5.1. Dosage de phosphore solubilisé.....	43
2.5.2. Quantification d'AIA.....	44
2.5.3. Evaluation d'antagonisme.....	44
2.5.3.1. Vis-à-vis des bactéries phytopathogènes.....	44
2.5.3.2. Vis-à-vis des champignons phytopathogènes.....	45
2.6. Caractérisation moléculaire des BSP.....	45
2.6.1. Extraction d'ADN génomique.....	45
2.6.2. Electrophorèse d'ADN génomique.....	45
2.6.3. Amplification d'ADNr 16S.....	46
2.6.4. Récupération d'ADN du gel d'agarose.....	47
2.6.5. Séquençage d'ADNr 16S.....	47
2.6.6. Traitement informatique des séquences d'ADNr 16S.....	47
2.7. Essai d'inoculation sous les conditions de la chambre de culture.....	47
2.7.1. Inoculation primaire : la sélection des BSP.....	47
2.7.1.1. Préparation des pots.....	47
2.7.1.2. Désinfection des graines.....	48
2.7.1.3. Inoculation des pots.....	48
2.7.1.4. Mesure de la productivité des plantes.....	48
2.7.2. Inoculation secondaire : les 3 meilleures souches bactériennes.....	49
2.8. Essai d'inoculation sous les conditions du champ.....	49
2.8.1. Préparation d'inoculant.....	49
2.8.2. Taille et description de l'unité expérimentale.....	49
2.8.3. Survie des souches dans la rhizosphère du riz.....	50
2.8.3.1. Isolement et purification des rhizobactéries.....	50
2.8.3.2. Sélection des BSP.....	50
2.8.3.3. Comparaison des profils BOX-PCR.....	51
2.8.3.3.1. Extraction d'ADN génomique.....	51
2.8.3.3.2. Amplification d'élément BoxA: BOX-PCR.....	51
2.8.4. Effet d'inoculation du riz sous les conditions du champ.....	52
2.9. Analyses statistiques.....	53

Chapitre III RESULTATS

1. ISOLEMENT ET SELECTION DES BSP.....	54
1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols des rizières.....	54
1.2. Isolement et sélection des BSP.....	55
2. DETERMINATION <i>IN VITRO</i> DES ACTIVITES PGP.....	57
2.1. Production d'acide indole acétique (AIA).....	57
2.2. Production d'acide cyanhydrique (HCN).....	58

2.3. Production des sidérophores.....	59
2.4. Solubilisation des autres sources de P inorganique.....	61
2.5. Utilisation des différentes sources d'azote (N).....	63
2.5. 1. Fixation libre d'azote.....	63
2.5. 2. Dégradation d'urée.....	63
2.6. Détection d'activité ACC désaminase.....	64
2.7. Détection d'AHL.....	65
2.8. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires (chitinase, amylase, cellulase, lipolyse, protéolyse).....	67
3. SELECTION DES BSP POUR LA POURSUITE DES TESTS.....	69
4. RCHERCHE <i>IN VITRO</i> DES AUTRES ACTIVITES PGP.....	70
4.1. Dosage de phosphore solubilisé.....	70
4.2. Quantification d'AIA.....	72
4.3. Antagonisme.....	74
4.3.1. Contre des bactéries phytopathogènes.....	74
4.3.2. Contre des champignons phytopathogènes.....	76
5. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES BSP SELECTIONNEES.....	79
6. ESSAI D'INOCULATION AVEC LES BSP SELECTIONNEES.....	82
6.1. En pot.....	82
6.1.1. Première inoculation : les seize BSP retenues.....	82
6.1.2. Deuxième inoculation : les trois meilleures souches bactériennes.....	86
6.2. Dans le champ.....	88
6.2.1. Isolement et sélection des BSP.....	88
6.2.2. Comparaison des profils BOX-PCR.....	89
6.2.3. Evaluation d'effet d'inoculation du riz avec les quatre bactéries retenues...	90

Chapitre IV DISCUSSION

1. ISOLEMENT ET SELECTION DES BACTERIES SOLUBILISANT LE P (BSP).....	92
2. EVALUATION DES ACTIVITES A EFFET STIMULANT : BIO-STIMULATION.....	94
2.1. Production d'AIA.....	94
2.2. Détection de l'activité ACC désaminase.....	95
3. EVALUATION DES AUTRES ACTIVITES A EFFET FERTILISANT : BIOFERTILISATION.....	96
3.1. Disponibilité d'azote pour la plante : Fixation libre d'azote et dégradation d'urée	96
3.2. Disponibilité du phosphore.....	96
3.2.1. Solubilisation des autres sources de P inorganique.....	96
3.2.2. Dosage du P solubilisé.....	98
4. EVALUATION DES ACTIVITES A EFFET PROTECTEUR : BIO-CONTRÔLE.....	100
4.1. Production d'HCN.....	100
4.2. Production des sidérophores.....	101

4.3. Production d’AHL.....	102
4.4. Antagonisme.....	102
4.4.1. Contre les bactéries phytopathogènes.....	102
4.4.2. Contre les champignons phytopathogènes.....	103
4.4.3. Enzymes hydrolytiques.....	104
5. EFFET D’INOCULATION DU RIZ AVEC LES BSP.....	105
5.1. Inoculation en pot.....	105
5.2. Inoculation au champ.....	108

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	110
---	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	113
---	------------

ANNEXES

INTRODUCTION GENERALE

Le riz est la deuxième céréale alimentaire produite dans le monde avec un taux de production annuel d'environ 500 millions tonnes. Suite à la pression de l'extension exponentielle de la population mondiale, l'augmentation de la productivité des systèmes rizicoles, et généralement celle des produits agricoles, semble d'ordre urgent afin de couvrir les besoins alimentaires et prévenir de la famine. Or, parmi les contraintes qui menacent l'agriculture, on trouve l'épuisement des ressources naturelles et l'abaissement des taux de rendement à cause de la réduction de la superficie des sols agricoles en raison de l'industrialisation et l'urbanisation. Pour y faire face et garantir la sécurité alimentaire, on fait appel aux fertilisants et les pesticides. Ces produits chimiques sont parfois appliqués en excès dans la majorité des systèmes d'agriculture.

Néanmoins, cette pratique irrationnelle est une nuisance aussi bien pour l'environnement que pour l'homme. En effet, le lessivage de ces produits purement minéraux contribue à une pollution significative des sols, des eaux de surface et des nappes phréatiques tout en affectant le déséquilibre écologique. En plus, l'accumulation des résidus toxiques sur les produits agricoles peuvent menacer la santé de consommateur. On peut envisager aussi le développement d'une résistance chez les agents phytopathogènes vis-à-vis des pesticides de synthèse. De point de vue économique, le prix de ces fertilisants est élevé et hors porté des petits agriculteurs.

Comme le phosphore est un facteur limitant pour nombreuses productions agricoles à cause de sa carence en forme soluble (Harris *et al.*, 2006), les engrais phosphatés présentent une partie très importante de ces fertilisants chimiques appliqués à l'agriculture. Toutefois, les plantes utilisent juste une portion minime de ces amendements et le reste est rapidement converti en composés insolubles inassimilables par la plante (Del Campillo *et al.*, 1999), d'où une exigence permanente pour les apports chimiques engendrant des complications économiques et écologiques (Del Campillo *et al.*, 1999 ; Harris *et al.*, 2006).

Malgré la grande efficacité de ces produits agricoles chimiques, leurs multiples inconvénients ont mis en cause leur utilisation, et la recherche des approches alternatives semblent d'ordre urgent. Suite à ces contraintes, le défi des agronomes c'est de trouver des stratégies qui permettront d'améliorer le rendement et de lutter contre les phytopathogènes tout en gardant l'écosystème intact. Celles-ci font appel à l'exploitation des microorganismes naturellement impliqués dans les cycles géochimiques de la matière. Ainsi, les bio-engrais et les bio-pesticides à base d'agents biologiques ont donc logiquement émergé comme alternative

prometteuse de fertilisation chimique traditionnelle. Cette technique présente un grand intérêt économique et écologique pour une agriculture durable.

La microflore phytobénéfique du sol a été rapportée par nombreux travaux, et les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sont regroupées sous le terme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). La possibilité d'augmenter le rendement du riz suite à son inoculation avec les PGPR a été le but de plusieurs travaux (Verma *et al.*, 2001 ; Meunchang *et al.*, 2006 ; Beneduzi *et al.*, 2008 ; Khalimi *et al.*, 2012). En effet, ces rhizobactéries stimulent la croissance des plantes de différentes manières, directes et indirectes. Évidemment, ces rhizobactéries promotrices stimulent directement la plante en améliorant la nutrition minérale via l'augmentation du stock du phosphore assimilable, la promotion de la relation symbiotique rhizobienne et la séquestration du fer pour la plante par la production des sidérophores. Les PGPR peuvent affecter aussi la physiologie végétale en modifiant l'équilibre hormonal. En effet, certaines rhizobactéries sont capables de produire des phytohormones telles que les auxines, et de diminuer le niveau d'éthylène produit par la plante au cours des stress abiotique et biotique par l'activité d'ACC désaminase. Quant aux mécanismes indirects, certaines PGPR ont un effet protecteur en faveur de la plante contre différents pathogènes. Ces agents de biocontrôle peuvent diminuer les maladies phytopathogènes grâce à plusieurs modes d'action d'antagonisme incluant la production des métabolites toxiques, des enzymes hydrolytiques, et aussi la compétition nutritionnelle et spatiale. En outre, certains agents de lutte biologique peuvent renforcer la résistance systémique de la plante contre un large spectre d'agents pathogènes.

Effectivement, les premiers travaux confirmant la stimulation de la croissance végétale et la protection des plantes suite à l'inoculation des graines avec des rhizobactéries sont ceux de Burr *et al.* (1978) et Kloepper *et al.* (1980). Après, c'était le démarrage de plusieurs études traitant les populations bactériennes rhizosphériques, surtout celles bénéfiques à la végétation. Pendant cette dernière décennie, de nombreuses espèces bactériennes sont isolées et exploitées pour leurs activités à la fois de « bio-engrais » et de « bio-pesticide », telles que *Rhizobium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Streptomyces*, *Enterobacter* et *Pseudomonas* (Hilali *et al.*, 2001 ; Orhan *et al.*, 2006 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2007 ; Cassán *et al.*, 2008 ; Loqman *et al.*, 2009 ; Morales-García *et al.*, 2011 ; Noori & Saud, 2012). En tenant en compte l'augmentation de la productivité tout en protégeant le consommateur et l'environnement, la tendance actuelle est vers une riziculture organique, biologique et écologique. Cette stratégie

prend en considération la fertilisation des deux parties : la plante et le sol, et l'exploitation des interactions microbiennes rhizosphériques en faveur de ces deux parties.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce présent travail, est de vérifier si le riz et certaines légumineuses naturelles abritent dans leur rhizosphère des bactéries solubilisant le phosphate, capables de réagir comme PGPR, et d'améliorer la croissance du riz. Ces objectifs ont été réalisés selon les démarches suivantes :

- Isolement des rhizobactéries autochtones à partir de légumineuses et de variétés différentes du riz (*Oryza sativa*) collectées respectivement au Nord et au Nord-Ouest du Maroc en se basant sur leur capacité à solubiliser le phosphate minéral ;
- Recherche des activités PGP et sélection *in vitro* de celles ayant plus d'activités ;
- Evaluation *in vitro* des PGPR sélectionnées sur des bactéries et des champignons phytopathogènes telluriques ;
- Caractérisation des souches sélectionnées par méthodes moléculaires ;
- Etude d'effet des souches PGPR sur la croissance du riz, variété Puntal, sous les conditions de la chambre de culture ;
- Evaluation, au champ, d'effet des souches donnant des meilleurs résultats en pots.

Pour cela, une synthèse bibliographique relative aux BSP ayant des activités PGPR a été réalisée, et plusieurs approches expérimentales ont ensuite été retenues.

Chapitre I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. PHOSPHORE COMME ELEMENT NUTRITIF POUR LA VEGETATION

1.1. Importance de phosphore

Le phosphore (P) est, avec l'azote et le potassium, l'un des trois éléments majeurs dans la nutrition minérale pour les végétaux car il est essentiel pour la croissance et le développement de la plante (Bushman *et al.*, 2009). Il est l'un des constituants irremplaçables dans des réactions indispensables présentées par les couples suivants : l'ADN-ARN qui est le support de la vie et de l'information génétique en assurant la réplication, l'ATP-ADP qui est le support de l'énergie nécessaire pour tous les processus vitaux comme ceux de synthèse, et le NADP-NADPH₂ qui est primordial pour les réactions d'oxydoréduction.

Le P est nécessaire pour des fonctions physiologiques vitales chez la plante comme la photosynthèse et la formation de toutes les membranes cellulaires (Wu *et al.*, 2005). Il entre dans la composition des phospholipides, des phosphoprotéines et de nombreux co-enzymes (Ozanne, 1980). Il représente environ 0.2% du poids sec de la plante. Cet élément régularise le développement et la reproduction de plante ainsi que la fructification, la maturation et la qualité du produit, et la mise en réserve des sucres (Khan *et al.*, 2009). Cet élément est principalement absorbé pendant la croissance végétale pour être transféré pendant le stade reproductif vers les fruits et les graines (Awasthi *et al.*, 2011). En plus, le P est mobile dans les plantes, puisque en cas de carence, il se déplace des tissus âgés vers les tissus jeunes qui sont plus actifs. Il favorise aussi la résistance des plantes au froid et améliore leur défense vis-à-vis des agents pathogènes. Alors, la disponibilité de cet élément au niveau du sol en quantités adéquates est très importante surtout pendant les premiers stades de la croissance des plantes et aussi lors du développement des organes reproductifs.

En outre, le P peut même affecter la nutrition azotée chez les légumineuses. La carence en P dans le sol a un effet inhibiteur sur la nodulation ainsi que la fixation d'azote. En effet, Saul *et al.* (1999) ont montré que l'apport de superphosphate augmente la concentration d'azote dans le ray-grass et dans le trèfle souterrain.

1.2. Phosphore dans le sol

Dans la solution du sol, le phosphore soluble se trouve sous la forme d'ions phosphates H₂PO₄⁻ et HPO₄²⁻ dont leurs concentrations diffèrent selon le pH du milieu. Et ces ions sont les formes absorbées par les plantes. Une grande partie de P soluble est rapidement adsorbée

ou précipitée par les ions et les particules du sol ou bien immobilisée par les microorganismes, en devenant ainsi indisponible pour la plante. D'où sa considération comme facteur limitant pour beaucoup des produits agricoles. Le cycle du phosphore dans les sols agricoles est donné dans la figure 1.

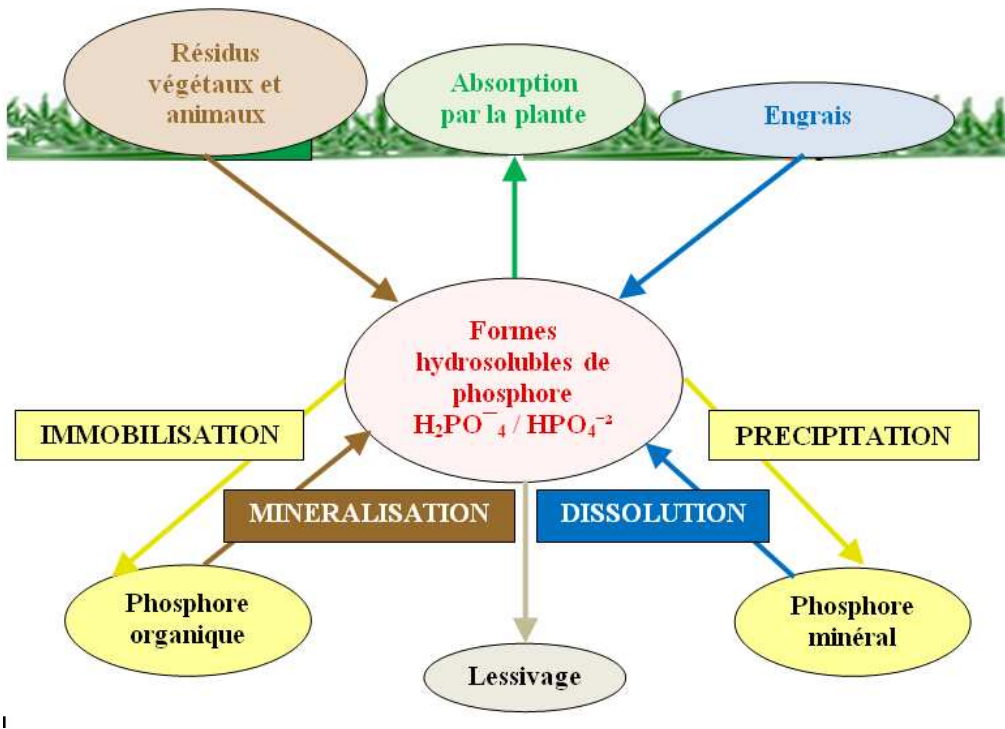


Figure 1 : Cycle du P dans les sols cultivés.

Suite au processus d'immobilisation, d'adsorption et de précipitation des ions phosphates, le P combiné est présent dans le sol sous deux formes : organique et minéral. Ces deux formes sont disponibles pour les plantes seulement après la minéralisation du phosphate organique et la dissolution du phosphate minéral.

1.2.1. Phosphore organique

Les formes organiques de P sont associées à la matière organique stable et les fractions qui dérivent des microorganismes, des végétaux et des animaux en décomposition. Le P organique représente 30 à 50% du P total du sol (Rodriguez & Fraga, 1999). La grande portion est présentée sous forme des phytates qui sont la réserve principale du phosphore que l'on trouve dans les graines et dans bon nombre de racines et tubercules, et c'est la forme la plus stable (Harley & Smith, 1983).

1.2.2. Phosphore minéral

Le phosphore minéral est associé aux composés minéraux comme l'aluminium et le fer dans les sols acides, et à des composés calciques dans les sols alcalins, comme la majorité des sols marocains.

Les deux formes, soit organique ou minérale, ne sont pas assimilables par la plante. Et la majorité des sols agricoles renferment des réserves importantes du P insoluble. Environ 95-99% de la teneur totale en P est sous la forme insoluble, non assimilable par les plantes (Vassileva *et al.*, 1998). Lorsque la teneur en P assimilable est inférieure à 250-300 mg de P₂O₅/kg de terre, l'ajout du P soluble devient obligatoire qui est apporté sous la forme des fertilisants phosphatés.

1.3. Impact des produits agricoles chimiques : fertilisants et pesticides

Après la récolte, les éléments nutritifs qui ont servi à la croissance des produits agricoles, doivent être compensés au sol afin d'en conserver la fertilité. Ceci fait appel aux applications des fertilisants chimiques qui sont utilisés aussi pour augmenter la productivité afin de répondre aux besoins de la population mondiale qui est en extension continue. Ces engrais subissent des transformations chimiques et biologiques qui contribuent à la libération des ions dans le sol et qui peuvent être absorbées par les racines des plantes, mais une grande partie est perdue et accumulée dans le sol.

Quant à la lutte chimique, malgré la grande efficacité des pesticides utilisés contre les agents phytopathogènes ou les parasites, les effets secondaires de ces produits chimiques ont remis en cause leur usage. En effet, des études ont montré que certains pesticides présentent une toxicité aigue pour l'homme et les organismes non cibles partageant l'écosystème avec les agresseurs dont les rhizobactéries phytobénéfiques font partie (Ahemad & Khan, 2010). De plus, les phytopathogènes visés peuvent acquérir une résistance à ces produits suite à l'utilisation répétée des mêmes molécules chimiques.

L'application intensive de ces produits et l'accumulation au niveau du sol de toutes ces particules purement chimiques peuvent contribuer à des forts dégâts concernant l'état écologique des systèmes culturaux (Villarreal-Sanchez *et al.*, 2003). En conséquence, divers types de pollution ont apparus en touchant les trois compartiments ; le sol, l'atmosphère et les

milieux aquatiques, en causant des déséquilibres intenses des cycles biogéochimiques de la matière (Tanaka *et al.*, 2006).

1.3.1. Inconvénients liés aux engrais phosphatés

Le phosphore est un facteur limitant pour nombreux produits agricoles à cause de sa faible concentration sous la forme soluble dans les sols cultivables. Cet élément est fourni au sol sous formes des engrais phosphatés. Après les différentes transformations auxquelles ces fertilisants chimiques sont soumises au niveau du sol, le phosphore est enfin libéré sous forme des deux ions : H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} selon le pH du milieu (Stevenson, 1986 ; Bushman *et al.*, 2009), et qui sont absorbées par les racines.

Néanmoins, le P soluble appliqué sous la forme des fertilisants chimiques est soumis aussi au même processus de fixation car une grande partie de ces ions hydrosolubles est précipitée ou adsorbée, alors indisponible pour les plante (Stevenson, 1986). Dans le sol alcalin, comme c'est le cas de la majorité des sols marocains (FAO, 2006), une partie considérable de ces ions réagit avec le calcium pour se précipiter sous forme de phosphate dicalcique ou tricalcique et par la suite la formation des apatites (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Alors que dans les sols acides, le P soluble est adsorbé aux particules d'argile et aux hydroxydes de fer et d'aluminium en formant par la fin de strengite ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et variscite ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Whitelaw, 2000). Dans les deux cas, on assiste à la formation des minéraux très stables et peu solubles, donc le P devient moins disponible pour les plantes ce qui diminue l'efficacité des engrais phosphatés. Il a été estimé que juste une portion de 5-25% des fertilisants phosphatés appliquée aux agro-écosystèmes est absorbé par les plantes (Wild, 1988). D'où un apport permanent de ces engrais reste toujours indispensable.

Mais du fait des applications répétées et parfois excessives d'engrais phosphatés provoquent généralement l'augmentation du niveau de saturation en P du sol (Beauregard, 2010). Suite à l'érosion du sol et au lessivage, le P est transporté jusqu'aux courants d'eau et aussi aux eaux souterraines. La pollution des eaux par cet élément favorise la croissance des organismes dépendant du P, comme les algues et le phytoplancton en créant des populations denses ou fleurs d'eau. Dans ces conditions, l'oxygène est bloqué d'arriver aux organismes aquatiques, et en absence d'énergie lumineuse, les plantes aquatiques n'arrivent pas à réaliser la photosynthèse, perturbant ainsi la vie aquatique. Ce phénomène est appelé "eutrophisation".

En plus, Beaugard (2010) a démontré que la composition des fertilisants phosphatés ajoutés au sol ainsi que la dose de P appliquée avaient un impact sur la distribution des microorganismes dans les différentes parcelles du champ, en particulier les populations bactériennes et fongiques. Il a été observé que la fertilisation en P minéral a permis de hausser significativement les flux de P et le P soluble du sol, mais aussi de diminuer le degré d'activité et de biomasse de certains groupes microbiens dont les champignons et les bactéries Gram positives (Beaugard, 2010).

D'autre part, la plus part de ces fertilisants phosphatés commercialisés sont de prix élevé et polluants à produire. En effet, le processus de production de P_2O_5 nécessite de soufre importé et suivant une procédure d'extraction par l'acide sulfurique très polluante produisant des dépôts riches en fluor et des gaz à effet de serre en menaçant ainsi l'atmosphère et l'eau (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Vassilev & Vassileva, 2003).

De ce fait, l'usage de ces produits chimiques utilisés en agriculture, soit dans le but de fertilisation ou de protection a été mis en cause, et il a été nécessaire de trouver de nouvelles approches pour améliorer la production agricole qui seraient moins polluantes, moins coûteuses mais aussi efficaces. Alors, parmi les solutions alternatives qui ont attiré l'attention des agronomes c'est l'utilisation rationnelle des microorganismes impliqués naturellement dans les cycles biogéochimiques de la matière. Ainsi, des nouvelles stratégies telles que le développement des bio-engrais et bio-pesticides à la base des microorganismes ont donc logiquement émergé comme alternatives efficaces, durables et moins coûteuses que la voie chimique. Dans ce contexte, l'amélioration de la fertilité des agro-écosystèmes en solubilisant le P inorganique présente une approche rationaliste pour augmenter la production agricole. Et d'ailleurs, plusieurs travaux ont confirmé la capacité de différentes espèces bactériennes de solubiliser des composés phosphatés inorganique tels que le phosphate tricalcique, dicalcique, l'apatite et le phosphate naturel. Et d'ailleurs, l'effet positif de ces bactéries surtout celles associés aux racines, les rhizobactéries (Antoun & Kloepper, 2001), sur la croissance des plantes est bien documenté.

2. BACTERIES SOLUBILISANT LE PHOSPHATE (BSP) COMME SOLUTION ALTERNATIVE

2.1. Interaction microorganismes-plantes

La majorité des bactéries dissolvant le phosphate ont été isolées de la rhizosphère, c'est-à-dire ces bactéries sont capables de coloniser les racines des plantes et d'où leur dénomination des « rhizobactéries » (Antoun & Kloepper, 2001). Effectivement, cette partie du sol est le lieu de fortes activités microbiennes influencées par les excréctions racinaires qui sont une source d'énergie pour cette microflore rhizosphérique. En retour, ces microorganismes peuvent affecter la croissance de plante et sa santé positivement ou négativement.

2.1.1. Définition de rhizosphère

La rhizosphère c'est le sol qui adhère aux racines des plantes. Elle est fortement influencée par l'activité des racines (Brimecombe, 2001). Cette zone est composée par trois compartiments : l'endorhizosphère, le rhizoplan et l'exorhizosphère (Gobat *et al.*, 2003). L'endorhizosphère est présentée par les racines des plantes renfermant les microorganismes vivant à l'intérieur de ces tissus végétaux, les endophytes (Kloepper *et al.*, 1988). Le rhizoplan c'est la surface des racines incluant les particules du sol fortement adhérentes. L'exorhizosphère se réfère au sol lié aux racines et soumis à l'effet des rhizodépôts, par opposition au sol distant non-rhizosphérique.

Couramment, l'exorhizosphère s'identifie comme rhizosphère (Barea *et al.*, 2005). C'est au niveau de la rhizosphère que se déroulent des processus très importants comme les cycles géochimiques de la matière ainsi que les différentes interactions entre les plantes et les microorganismes.

2.1.2. Effet rhizosphérique

La rhizosphère est une zone de forte interaction entre le sol, les plantes et les microorganismes. L'activité microbienne est plus intense dans cette zone car c'est la partie la plus riche en matière organique (Brimecombe, 2001). Il a été rapporté que les racines libèrent plus de 40% des produits de photosynthèse au niveau de cette zone (Whipps, 1990). En

conséquence, la biologie ainsi que la chimie de cette zone diffèrent de celles du sol non adhérent aux racines.

Ces exsudats racinaires, ou rhizodépôts, servent de source d'énergie et de nourriture pour la microflore rhizosphérique (Whipps, 2001), affectant ainsi la biodiversité de ces populations microbiennes soit en stimulant ou en inhibant certaines espèces. Ce phénomène est identifié comme « effet rhizosphérique » (Morgan & Whipps, 2001).

La composition des rhizodépôts est affectée par différents facteurs environnementaux tel que la température, le pH, l'humidité, la lumière et le type du sol, et aussi par des facteurs biotiques tels que l'âge et l'espèce des plantes (Picard *et al.*, 2000 ; Singh & Mukerji, 2006). Par conséquent, la modification de l'un de ces facteurs entraîne un changement au niveau de la densité et la diversité de la microflore rhizosphérique. Parmi ces populations rhizosphériques, les bactéries sont plus abondantes que les champignons et les Actinomycètes, avec une densité de l'ordre de 10^{12} /g du sol (Foster, 1988). Elles sont dénommées des « rhizobactéries » vue leur forte colonisation de la rhizosphère (Antoun & Kloepper, 2001).

2.2. Bactéries solubilisant le phosphate (BSP)

2.2.1. Définition de BSP

La solubilisation du phosphate minéral et sa conversion en forme soluble disponible pour les plantes est un phénotype commun au niveau de plusieurs rhizobactéries, d'où leur appellation « bactéries solubilisant le phosphate » BSP (Pérez *et al.*, 2007). Auparavant, l'effet positif exercé par les BSP en dissolvant le phosphate n'a pas eu assez d'attention comme c'est le cas pour la fixation symbiotique d'azote atmosphérique. Mais de nombreux travaux tels que Chabot *et al.* (1996), Antoun *et al.* (1998), Peix *et al.* (2001b) et Hilali *et al.* (2001), ont démontré la colonisation et la stimulation de la croissance de certaines plantes non légumineuses telles que le maïs, la laitue, le radis, l'orge et le blé en présence des souches de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium*, en soulignant l'importance de biosolubilisation du phosphate et son intervention dans la stimulation obtenue.

Dans ce contexte, plusieurs travaux au long de ces dernières années ont démontré la capacité de certaines bactéries rhizosphériques à solubiliser les complexes phosphatés et les rendre assimilables pour les plantes (Rodriguez & Fraga, 1999 ; Chung *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2007 ; Oliveira *et al.*, 2009). Récemment, Awasthi *et al.*, (2011) ont

récapitulé les BSP et leurs interactions avec la plante. Ces bactéries jouent un rôle primordial dans le cycle biogéochimique du P dans les écosystèmes naturels et agricoles (Chang & Yang, 2009).

Parmi les genres bactériens ayant cette activité solubilisatrice, on trouve *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Burkholderia* et *Azotobacter* (Kumar *et al.*, 2001 ; Chung *et al.*, 2005 ; Rudresh *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2012 ; Muleta *et al.*, 2013). La majorité de ces BSP solubilisent plus efficacement les complexes phosphatés calciques (Ca-P) que les autres complexes, ferriques et aluminiques (Fe-P et Al-P), notamment dans les cultures liquides comme il a été rapporté dans la littérature (Son *et al.*, 2006 ; Pérez *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2009 ; Chang & Yang, 2009). Ainsi, l'application de ces bactéries au niveau du sol, surtout les sols alcalins, peut augmenter la teneur des sols en P soluble en contribuant à l'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes ainsi que la productivité végétale.

De ce fait, l'application de ces BSP peut contribuer à long terme à la diminution de la dépendance de l'agriculture vis-à-vis des engrais phosphatés. Justement, plusieurs études ont démontré la stimulation de croissance végétale et l'augmentation de la productivité des plantes suite à l'inoculation avec ces bactéries dissolvant le P inorganique comme le riz (Meunchang *et al.*, 2006), le maïs et la laitue (Chabot *et al.*, 1993 ; Hameeda *et al.*, 2008), le blé (Harris *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008). En outre, Sapsirisopa *et al.* (2009) ont obtenu une amélioration significative de la germination, de la croissance et de la productivité d'une variété thaïlandaise du riz inoculée avec une souche BSP, *Bacillus megaterium* A12ag, dans les conditions de stress salin, mieux que celles obtenues soit en présence de l'autre souche productrice d'ACC désaminase, *Bacillus licheniformis* B2r, ou de fertilisants chimiques.

Une autre propriété bénéfique liée à ces BSP, appelées aussi des « phosphobactéries » (Chen *et al.*, 2008) est présentée par l'interaction bénéfique entre ces rhizobactéries dissolvant le phosphate et les bactéries fixatrices d'azotes symbiotiques avec les légumineuses en améliorant la relation symbiotique rhizobienne. En effet, Rosas *et al.* (2006) ont rapporté que la co-inoculation du soja (*Glycine max* L.) avec des souches BSP, *Pseudomonas putida* (SP21 et SP22) et *Bradyrhizobium japonicum* TIIIB, a affecté positivement le nombre des nodules et le poids sec de la plante.

Des résultats identiques ont été exposés auparavant concernant le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculé avec la souche *Burkholderia cepacia* SAOCV2 dissolvant le P inorganique et

antagoniste des champignons phytopathogènes (Peix *et al.*, 2001a). Récemment, Badawi *et al.* (2011) ont obtenu des résultats positifs importants concernant la relation symbiotique entre l'arachide cultivée et la souche *Bradyrhizobium* sp. USDA 3456 (le poids et le nombre des nodules, et l'activité d'enzyme nitrogénase) et une stimulation significative de la croissance racinaire et aérienne de plante, le rendement et la qualité du produit en présence d'une souche BSP, *Serratia marcescens* EG en comparaison avec le contrôle non inoculé ou le reste des tests d'inoculation après 75 jours de croissance au champ.

3. RHIZOBACTERIES FAVORISANT LA CROISSANCE DES PLANTES (PGPR) ET LEURS MODES D'ACTION

3.1. Définition des PGPR

Les interactions plante-rhizobactéries au niveau de la rhizosphère peuvent être délétères, neutres ou positives pour la plante. Et les BSP qui améliorent la nutrition phosphatée des plantes en augmentant la disponibilité du P soluble dans le sol, font partie d'un groupe plus vaste des rhizobactéries qui affectent positivement la plante. Ces rhizobactéries sont connues sous le nom de « rhizobactéries favorisant la croissance des plantes » ou bien PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Le terme « PGPR » a été créé pour la première fois par Kloepper et Schroth en 1978. Il regroupe toutes les bactéries phytobénéfiques non symbiotiques vivant dans la rhizosphère. Ces rhizobactéries sont souvent en association avec la plante, proches des racines ou à l'intérieur des tissus végétaux d'où leur dénomination des « endophytes » (Kloepper *et al.*, 1988). L'effet positif conféré par ces PGPR pour la plante se manifeste surtout par la stimulation de croissance racinaire, l'amélioration du rendement et de qualité du produit, l'augmentation du taux de germination et de surface des feuilles et le biocontrôle (Karlidag *et al.*, 2007 ; Rajkumar *et al.*, 2008 ; Lucas *et al.*, 2009 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012). En effet, ces rhizobactéries peuvent influencer la physiologie de la plante ainsi que l'espace racinaire grâce aux différents mécanismes qui peuvent être directes ou indirectes.

En fonction de nombreuses études effectuées dans ce volet, les PGPR regroupent différentes espèces bactériennes. Parmi les PGPR utilisées dans l'inoculation des plantes et ayant donné de résultats significativement appréciables, celles appartenant au genre *Rhizobium* (Hilali *et al.*, 2001), *Bacillus* (Orhan *et al.*, 2006), *Azospirillum* (Cassán *et al.*, 2008), *Pseudomonas*

(Lucas *et al.*, 2009), *Serratia* (De Vleeschauwer & Höfte, 2007), *Pantoea* (Khalimi *et al.*, 2012) et *Enterobacter* (Morales-García *et al.*, 2011).

Les PGPR sont associées aux nombreux types végétaux, et peuvent coloniser différentes parties de la plante ; la surface des racines ou bien la partie interne de la plante en colonisant différents organes. D'ailleurs, Ramesh *et al.*, (2009) se sont intéressés aux endophytes PGPR associés à plusieurs plantes (l'aubergine, le concombre et l'arachide). Certaines de ces bactéries appartenant à *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter*, ont diminué l'infection d'aubergine avec *Ralstonia solanacearum* par 70% tout en stimulant la croissance de la plante dans les conditions de la chambre de culture (Ramesh *et al.*, 2009).

3.1.1. Genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* spp. ce sont des bactéries ubiquistes sous forme des bacilles à Gram-négatif, aérobies strictes. Elles arrivent à coloniser le sol, surtout la rhizosphère et les racines, et à y maintenir une forte densité de population (Haas & Keel, 2003). Elles représentent plus de 10% de la microflore rhizosphérique cultivable (Tarnawski *et al.*, 2003). Et d'ailleurs, Joseph *et al.* (2007) ont rapporté que ce genre c'était le plus dominant au niveau de la rhizosphère de pois chiche en comparaison avec les autres genres isolés, *Bacillus*, *Rhizobium* et *Azotobacter*. La grande compétence de ce genre au niveau de la rhizosphère est due particulièrement à son taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries et aussi à leur capacité à utiliser différentes sources d'énergie issues des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000).

Les PGPR renferment beaucoup des souches de *Pseudomonas*. Ce groupe a acquis une attention particulière du monde entier, et il a été l'objet de plusieurs études réalisées sur les rhizobactéries phyto-bénéfiques. Les premiers effets phyto-bénéfiques obtenus suite à l'inoculation avec les souches appartenant à ce genre, notamment *Pseudomonas* spp. fluorescents, ont été rapportés par Burr *et al.* (1978) et Kloepper et Schroth (1978). A la suite de l'intérêt suscité de ces publications, une grande part du travail de recherche agronomique a été consacrée pour ces bactéries, en particulier les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Et d'ailleurs, Lemanceau (1992) a discuté les différentes activités positives caractérisant les *Pseudomonas* spp. fluorescents en faveur de la plante.

Les *Pseudomonas* spp sont parmi les BSP les plus abondantes au niveau de la rhizosphère

(Muleta *et al.*, 2013). En plus de leur pouvoir à solubiliser le P, plusieurs souches appartenant à ce genre sont capables de produire des phytohormones en particulier l'AIA (Patten & Glick, 2002 ; Ahmad *et al.*, 2005 ; Gravel *et al.*, 2007). En outre, les antagonistes les plus efficaces présents dans le sol appartiennent aux *Pseudomonas* spp. fluorescents et les espèces les plus importantes sont *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. aeruginosa* (Haas & Défago, 2005 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012). Le biocontrôle conféré par ces souches est dû à une combinaison synergétique des activités à effet protecteur comme la production des sidérophores, d'acide cyanhydrique, des antibiotiques et des différents exo-enzymes hydrolytiques (Haas & Défago, 2005 ; Trivedi *et al.*, 2008). En plus, Bakker *et al.* (2007) ont montré la grande efficacité de ces souches dans le biocontrôle et la suppression des phytopathologies via le processus d'ISR.

Ces multiples caractéristiques intrinsèques les rendent particulièrement intéressantes pour leur usage dans la bio-fertilisation et le biocontrôle. D'ailleurs, des résultats encourageants ont été obtenus en faveur du maïs, la laitue (Chabot *et al.*, 1993), le colza (Patten & Glick, 2002), la tomate (Gravel *et al.*, 2007), le poivron rouge (Rajkumar *et al.*, 2008), la marjolaine (Banchio *et al.*, 2008) et l'haricot (Shahab *et al.*, 2009). Récemment, deux souches de *P. fluorescens* ayant des caractères phytobénéfiques diversifiés à effet fertilisant, stimulant et protecteur, ont stimulé la germination et la croissance du blé et du piment tout en diminuant l'infection par plusieurs champignons phytopathogènes (Gull & Hafeez, 2012 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012).

En plus, certaines souches appartenant à ce groupe peuvent améliorer l'absorption des éléments tels que l'azote et le potassium. En effet, la co-inoculation de soja (*Glycine max* L.) et de luzerne (*Medicago sativa* L.) avec des souches BSP, *Pseudomonas putida* (SP21 et SP22), *Bradyrhizobium japonicum* TIIIB et *Sinorhizobium meliloti* 3DOh13, avaient un effet positif sur le nombre des nodules, leur poids sec et celui de la plante (Rosas *et al.*, 2006).

3.2. Mode d'action des PGPR

Compte tenu de l'importance des PGPR comme alternatives prometteuses pour les produits chimiques, de nombreux travaux ont porté sur la caractérisation et l'apprentissage de différents mécanismes dont ces bactéries phytobénéfiques peuvent influencer la croissance et le développement de la plante. Les modes d'action de ces bactéries bénéfiques sont compliqués et peuvent affecter la balance microbienne au niveau de la rhizosphère et aussi provoquer des altérations physiologiques chez la plante.

Et les différentes activités phytobénéfiques exercées par les rhizobactéries peuvent être classifiées en trois grands groupes : Biofertilisation, Biostimulation et Bioprotection (Nihorimbere *et al.*, 2011).

3.2.1. Biofertilisation (PGPR à effet fertilisant)

Les PGPR à effet fertilisant ce sont les rhizobactéries qui favorisent la disponibilité des nutriments au niveau de la rhizosphère. Ces PGPR biofertilisants stimulent directement la croissance végétale en améliorant la disponibilité des éléments minéraux pour la plante, ou indirectement en affectant positivement les associations symbiotiques entre les microorganismes et leurs plantes hôtes (Vessey, 2003). Dans ce cas, les PGPR n'entrent pas forcément en interaction directe avec la plante, mais elles influencent les conditions abiotiques et biotiques de la rhizosphère. Les exemples les plus importants sont les bactéries fixatrices non symbiotiques d'azote atmosphérique et la solubilisation de phosphate.

3.2.1.1. Amélioration de la nutrition azotée : Fixation bactérienne d'azote atmosphérique

L'azote (N) représente le premier élément nutritif sur la liste des besoins minéraux des végétaux. Il est un constituant primordial pour la synthèse des molécules importantes telles que les acides nucléiques, les acides aminés et des composés azotés organiques issus de processus de fixation biologique d'azote (Egamberdieva & Kucharova, 2008). Par l'intermédiaire de la chlorophylle, l'azote contribue à l'activité photosynthétique qui représente la base de tous les processus biologiques qui se passent dans la plante. Cet élément est présent sous deux états : libre (dans l'atmosphère) et combiné (soit minéral ou organique au niveau du sol). L'azote du sol provient en majorité de l'atmosphère grâce à l'activité des microorganismes du sol. Une autre origine est liée aux activités humaines, surtout les apports d'engrais minéraux ou organiques.

Il est un facteur déterminant pour la productivité agronomique malgré son abondance dans la nature, car l'azote atmosphérique n'est disponible que pour une portion minime des microorganismes associés à certaines plantes (Shridhar, 2012). Les végétaux peuvent s'alimenter en azote par deux voies :

- soit en assimilant l'azote du sol sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) et qui sont issues surtout d'engrais azotés et une partie de la minéralisation d'azote organique ;
- soit en transformant l'azote atmosphérique d'une forme gazeuse non assimilable par les plantes à une forme plus disponible (NO_3^- ou NH_4^+) grâce au processus microbien nommé « la fixation biologique d'azote atmosphérique ».

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est assurée exclusivement par les procaryotes par l'intermédiaire de l'enzyme nitrogénase. Ce processus microbien consiste à réduire l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3) qui est offert à la plante comme source d'azote. La fixation biologique d'azote c'est le mécanisme principal permettant l'introduction d'azote dans la biosphère, selon deux modes :

- *Association symbiotique*

Cette association existe entre la plante et les microorganismes de la rhizosphère associés aux racines en formant des structures racinaires particulières appelées « nodosités » et « mycorhizes ». Les nodosités, appelées aussi des nodules, se sont formé lors de la symbiose rhizobienne. Ce type d'association consiste en relation symbiotique entre les rhizobiums et les racines des légumineuses. Quant aux mycorhizes, ils sont formés lors de la symbiose entre les champignons et la plante hôte. Dans les deux associations, la plante fournit de l'énergie sous forme des exsudats racinaires à ces microorganismes, tandis que ces derniers fournissent à leur tour de l'ammoniac ou des composés synthétisés via des processus enzymatiques. Dans les deux cas, les agents fixateurs symbiotiques acquièrent une niche exclusive, tandis que la plante hôte reçoit en retour son propre besoin en azote (Andrew *et al.*, 2007).

Or, et selon plusieurs chercheurs, cette fixation symbiotique n'est pas identifiée comme une des activités phytobénéfiques des PGPR, car l'identification classique des PGPR déclarée par Kloepper *et al.* (1989) est que ces bactéries sont définies comme des rhizobactéries qui vivent d'une manière libre près des racines. Alors que la stimulation de croissance de la plante hôte est obtenue suite à une association symbiotique donc la fixation symbiotique d'azote atmosphérique n'est pas considérée comme une activité PGP (Antoun & Prévost, 2005).

Néanmoins, ces bactéries symbiotiques ne sont classifiées comme des PGPR que quand elles favorisent le développement d'une plante non-légumineuse. D'ailleurs, plusieurs rhizobiums partagent nombreux propriétés caractérisant les PGPR comme la solubilisation de P, la production des phytohormones, des sidérophores, d'acide cyanhydrique et même elles arrivent à coloniser les racines des non légumineuses et à stimuler leur croissance comme c'est le cas de l'orge inoculé avec la souche BSP, *Mesorhizobium mediterraneum* PECA21, dans les conditions de la chambre de culture (Peix *et al.*, 2001b).

D'ailleurs, dans les systèmes de rotation, souvent ces rhizobiums se comportent comme des PGPR endophytes pour les plantes non légumineuses telles que le riz cultivé en rotation avec le trèfle (Yanni *et al.*, 1997) et le maïs cultivé en rotation avec l'haricot (Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001). Cependant, certaines de ces bactéries symbiotiques peuvent exercer un effet délétère contre la plante non légumineuse. En effet, des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ont été isolées à partir du blé cultivé en rotation avec le trèfle, et ayant un effet négatif sur la croissance du blé malgré leurs nombreuses caractères phytobénéfiques *in vitro* telles que la solubilisation de P inorganique et la production d'AIA (Hilali, *et al.*, 2001). Ainsi, avant d'inoculer les graines des légumineuses avec les souches rhizobiennes, il faut s'assurer de leur effet comme PGPR sur le développement de la plante choisie en rotation (Hilali *et al.*, 2001).

- ***Fixation libre***

La fixation non symbiotique a été parmi les premiers mécanismes bactériens identifiés comme susceptibles d'induire une augmentation de croissance végétale. Les rhizobactéries ayant cette activité bénéfique sont souvent rapportés comme des biofertilisants qui contribuent à la réduction d'apport des fertilisants chimiques. Cette fixation est assurée par des bactéries diazotrophes libres vivant au niveau de la rhizosphère ou à l'intérieur des tissus de la plante et qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique.

Le premier genre bactérien identifié comme PGPR grâce à cette activité phytobénéfique c'était l'*Azospirillum* utilisé comme inoculum pour le blé (Baldani *et al.*, 1987). Et après, plusieurs genres diazotrophes ont été isolés, soit des endophytes tels que *Pantoea* sp. et *Azoarcus* sp. issu du riz, *Burkholderia* sp. et *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolés de canne à sucre, patate douce, café et d'autres plantes (Pan & Vessey, 2001 ; Verma *et al.*, 2001 ; Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003) ou bien rhizosphériques tels que

Azotobacter sp. et *Bacillus* sp. (Dobbelaere *et al.*, 2003).

La fixation libre d'azote atmosphérique est considérée comme l'un des mécanismes microbiens les plus importants que les PGPR peuvent utiliser pour stimuler la croissance des plantes tout en minimisant la dépendance de l'agriculture vis-à-vis des engrais azotés (Shridhar, 2012). De nombreux travaux ont rapporté la capacité de ces PGPR à promouvoir le développement et la croissance des plantes (Orhan *et al.*, 2006 ; Beneduzi *et al.*, 2008 ; Banchio *et al.*, 2008). Certaines de ces bactéries sont aussi capables de produire des hormones qui pourront stimuler davantage la croissance des plantes. Certaines bactéries peuvent synthétiser plus d'un type de phytohormones comme une souche d'*Azotobacter* qui produit de la gibbérelline (GA), de l'auxine et de la cytokinine, et des isolats d'*Acetobacter* qui sont capables de produire l'AIA et GA (Hyoung *et al.*, 2006). De même, une souche d'*Azospirillum brasilense* est capable de produire trois types d'hormones : l'AIA, GA et de la zéatine (Cassán *et al.*, 2008).

3.2.1.2. Amélioration de la disponibilité du P

Malgré l'abondance du P dans le sol, sous la forme minérale ou organique, il est un nutriment majeur limitant pour l'agriculture car la grande partie est insoluble. En plus, la nutrition minérale de plantes est fortement dépendante de la disponibilité de P soluble dans le sol. Certaines bactéries qui sont associées aux racines peuvent dissoudre des composés phosphatés, organiques et/ou minéraux, et augmenter par la suite le taux du P soluble dans le sol, assimilable par la plante (Prasanna *et al.*, 2011) d'où leur désignation comme des PGPR-Biofertilisants. Ces souches sont identifiées comme des « solubilisatrices » de P et parfois sont nommées des « phosphobactéries » (Chen *et al.*, 2008). Ainsi, l'enrichissement du sol en P soluble via des processus biologiques est une alternative rationaliste qui peut empêcher la dégradation des écosystèmes et d'améliorer leur productivité.

- ***Phosphate organique***

La forme organique du P présente 30 à 50% de P total du sol, surtout sous la forme de phytates du sol synthétisés par les plantes (Rodriguez, & Fraga, 1999), c'est la forme organique la plus stable. Une autre source du P organique est liée à l'intervention humaine. En

effet, certains produits utilisés dans la vie quotidienne tels que les détergents, contribuent à l'accumulation et l'augmentation des réserves de P organique insoluble dans l'environnement.

Afin que cette source organique de P soit disponible et absorbée par les plantes, elle doit être décomposée par des microorganismes qui existent au niveau de la rhizosphère, en libérant les ions phosphates. Le phénomène est appelé « minéralisation ». Cette minéralisation du phosphate organique est assurée par des enzymes, les phosphatases ou « phosphohydrolases » (Prasanna *et al.*, 2011), produites par la microflore rhizosphérique (Rodriguez, & Fraga, 1999; Oliveira *et al.*, 2009).

Les bactéries capables de minéraliser le phosphate organique regroupent différents genres tels que *Bacillus*, *Pantoea* et *Burkholderia* (Rodriguez & Fraga, 1999 ; Tao *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2009). D'après Tao *et al.* (2008), les bactéries solubilisant le phosphate organique sont moins abondantes que celles dissolvant le P inorganique quand l'isolement est basé sur la technique de « halos de solubilisation ». A cause de l'incorporation du P issu du processus de minéralisation dans la cellule bactérienne, il est très difficile à cerner le phosphate organique minéralisé (Tao *et al.*, 2008). Ainsi, la technique la plus adéquate pour le triage de ces bactéries c'est l'évaluation d'activité enzymatique des phosphatases (Oliveira *et al.*, 2009).

- ***Phosphate minéral***

La majorité des sols agricoles renferment des réserves importants de P sous la forme insoluble dont une partie considérable est issue suite aux apports continus des fertilisants phosphatés. Car une grande portion de P inorganique soluble appliqué aux sols sous forme des engrais chimiques est rapidement précipitée ou fixée selon le pH du sol. Heureusement, et depuis que Gerretsen (1948) a montré la présence de certains microorganismes qui pouvait améliorer la nutrition phosphatée de certaines plantes à partir de P insoluble de calcium ou de fer, de nombreux chercheurs ont tenté d'isoler des souches dites « solubilisatrices » de P ou « Phosphobactéries » en vue de les inoculer aux végétaux en présence de P insoluble.

Ainsi, plusieurs microorganismes (bactéries, champignons, levures et Actinomycètes) ont été triés en se basant sur cette activité (Chabot *et al.*, 1996, Whitelaw, 2000 ; Oliveira *et al.*, 2009). Ces microorganismes qui sont concentrés au niveau de la rhizosphère où l'activité de solubilisation de P est plus accentuée (Vesquez *et al.*, 2000), sont impliqués certainement dans le cycle de P. Cette activité devient encore forte dans les sols renfermant des réserves

importantes de P insoluble (Goldstein, 1986). De nombreux travaux ont rapporté l'augmentation d'activité solubilisatrice de phosphate *in vitro* en augmentant le substrat phosphaté (Son *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008).

- ***Processus de solubilisation du P minéral***

Lors de la solubilisation biologique des phosphates calciques, un abaissement du pH du milieu de culture a été confirmé par plusieurs travaux qui ont traité la biosolubilisation de phosphate calcique (Alam *et al.*, 2002 ; Babana, 2003 ; Chen *et al.*, 2006 ; Pérez *et al.*, 2007 ; Prasanna *et al.*, 2011 ; Muleta *et al.*, 2013). Cette acidification est due à la production des acides organiques par les BSP, tels que l'acide citrique, acide gluconique, acide ketogluconique, acide lactique, acide succinique, acide formique, acide oxalique et acide propionique (Rashid *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2006 ; Pérez *et al.*, 2007 ; Sagervanshi *et al.*, 2012 ; Muleta *et al.*, 2013).

Il est accepté que la production de ces acides organiques par les BSP soit le mécanisme principal qui aboutit à la solubilisation du phosphate minéral. En effet, les groupements hydroxyles (-OH) et carboxyles (-COOH) de ces acides organiques chélatent les cations métalliques attachées au P, soit Ca^{2+} , Al^{3+} ou Fe^{3+} , et le P est libéré ainsi sous la forme soluble (Chen *et al.*, 2006 ; Khan *et al.*, 2009). Cette hypothèse a été confirmée aussi par De Werra *et al.* (2009) qui ont montré que la capacité de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 à solubiliser le phosphate minéral est fortement liée à la production d'acide gluconique.

Cependant, le processus de solubilisation biologique du phosphate inorganique n'est pas bien élucidé par les chercheurs. En effet, Illmer & Schinner (1995) ont confirmé que la production des acides organiques joue un rôle très important dans la biosolubilisation du phosphate inorganique mais ce n'est pas le seul mécanisme. En plus, ils ont rapporté que le mécanisme qui aboutit à la solubilisation de phosphate calcique est différent de celui de solubilisation du phosphate aluminique (Illmer & Schinner, 1995). Alors que Kang *et al.* (2008) ont trouvé qu'en présence du sol dans le milieu de culture, la solubilisation de phosphate naturel est plutôt corrélée à la concentration des protons H^+ qu'à la concentration d'acide organique produit, le citrate.

Ainsi, la solubilisation des composés phosphatés, en particulier calciques, est due à l'effet combiné d'abaissement du pH (libération des protons) et de production d'acides organiques

(anions organiques) (Khan *et al.*, 2009). En plus, Hamdali *et al.* (2012) ont confirmé l'intervention des sidérophores dans le processus de solubilisation de phosphate naturel par des Actinomycètes issus des mines de Togo, et l'absence de production des acides organiques dans le milieu liquide ou des halos de solubilisation dans le milieu solide. Ils ont même obtenu une alcalinisation importante au cours de cette biosolubilisation du phosphate naturel. Des résultats identiques ont été obtenus avant lors de la solubilisation du phosphate naturel par des Actinomycetes isolés des mines marocaines (Hamdali *et al.*, 2008a)

Parmi les facteurs qui peuvent affecter fortement la solubilisation biologique de phosphate inorganique, on peut citer la nature des acides organiques produits par les phosphobactéries (Pérez *et al.*, 2007), la source de carbone assimilé par ces phosphobactéries (Delvasto *et al.*, 2008), la source d'azote (Sagervanshi *et al.*, 2012), la nature du substrat phosphaté et sa concentration dans le milieu (Pérez *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008), la nature du sol (Kang *et al.*, 2008) et finalement l'agent microbien dissolvant ce substrat phosphaté et sa densité dans le milieu (Chen *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2009).

En plus de ces facteurs cités auparavant, Son *et al.* (2006) ainsi que Sagervanshi *et al.* (2012) ont exposé dans leurs travaux d'autres paramètres, surtout abiotiques, qui affectent la solubilisation de P inorganique par une souche *Pantoea agglomerans* R-42 isolée de la rhizosphère de soja (Son *et al.*, 2006), et des BSP isolées des sols acides (Sagervanshi *et al.*, 2012) tels que le pH, la température et la concentration des sels dans le milieu de culture.

3.2.2. Phytostimulation (PGPR à effet stimulant)

Les phytohormones sont des molécules organiques qui servent comme des signaux chimiques pour le control de la croissance et le développement de la plante. Une phytohormone peut accomplir son rôle dans le site même de sa synthèse ou bien être transportée pour agir dans d'autres organes. Les phytohormones sont synthétisées par les végétaux, mais aussi par les PGPR comme il était rapporté par plusieurs travaux (Gravel *et al.*, 2007 ; Cassán *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2012).

Ainsi, ces rhizobactéries classifiées comme des PGPR-Biostimulants jouent un rôle déterminant dans le développement et la croissance de la plante. Car elles influencent directement la plante et la stimulent via la production ou le changement de la concentration de ces régulateurs de croissance (auxines, cytokinines, gibbérélines et inhibiteurs d'éthylène).

3.2.2.1. Acide indole acétique (AIA)

L'acide indole acétique (AIA) est l'une des hormones physiologiquement les plus importantes chez les végétaux. Elle régule la croissance de la plante et son développement en affectant la division cellulaire, l'élongation des cellules et leur différenciation. Cette hormone est produite par les végétaux et aussi par certaines rhizobactéries, à partir du tryptophane, précurseur commun d'AIA chez les microorganismes, et qui est présent dans les exsudats racinaires. Effectivement, ces rhizodépôts sont composés par différentes métabolites tels que les acides aminés incluant le tryptophane (Kamilova *et al.*, 2006). D'ailleurs, certaines rhizobactéries peuvent la produire même en absence de précurseur, comme il a été démontré par Ahmad *et al.* (2005) et Shahab *et al.* (2009). La concentration d'AIA augmente avec la concentration de son précurseur dans le milieu (Ahmad *et al.*, 2005).

Le système racinaire est particulièrement sensible aux fluctuations des concentrations d'AIA exogène (Ahmad *et al.*, 2005). En effet, cette hormone exogène, produite par les rhizobactéries, est absorbée par la plante, et elle peut stimuler la germination, la croissance racinaire en augmentant le nombre des racines secondaires et celle des poils absorbants, la division cellulaire ainsi que l'élongation des cellules (Patten & Glick, 2002 ; Glick *et al.*, 2007b ; Cassán *et al.*, 2008 ; Shahab *et al.*, 2009). En conséquence, la surface d'absorption des nutriments devient plus importante, améliorant ainsi la nutrition de plante et sa croissance.

En plus, certaines souches BSP utilisées pour la co-inoculation des légumineuses avec des rhizobiums sont caractérisées par la production des phytohormones, en particulier l'AIA (Badawi *et al.*, 2011). Ainsi, l'amélioration de la nodulation obtenue pendant les tests menés au champ, pourrait être due en partie à l'effet stimulant de cette phytohormone sur la prolifération du système racinaire en augmentant en conséquence les sites d'infection par les rhizobiums et améliorant aussi l'absorption des nutriments.

Cependant, à part cet effet stimulant d'élongation et/ou de prolifération cellulaire, l'AIA d'origine exogène peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance des racines comme il a été démontré par Ahmad *et al.* (2005) chez *Sesbania aculeata* et *Vigna radiata* en présence des souches d'*Azotobacter* et de *Pseudomonas* spp. fluorescents, capables de produire cette hormone. En plus de l'effet de concentration d'AIA exogène, la sensibilité des racines envers cette hormone dépend de l'espèce végétale et aussi de l'espèce bactérienne produisant l'hormone (Ahmad *et al.*, 2005). Cette inhibition peut être expliquée par la production d'ACC, précurseur d'éthylène, car selon la littérature, l'AIA peut induire la synthèse d'ACC

en stimulant l'enzyme ACC synthétase qui va convertir la S-adénosylméthionine en ACC (Glick *et al.*, 2007a ; 2007b).

Toutefois, des études ont démontré la capacité de certaines rhizobactéries, considérées comme PGPR, à réduire l'effet négatif des fortes concentrations d'AIA en le dégradant et le diminuant de l'entourage des racines comme c'est le cas de la souche *P. putida* isolée par Gravel *et al.* (2007) à partir de la rhizosphère de la tomate.

3.2.2.2. Aminocyclopropane carboxylate (ACC) désaminase

L'éthylène est une phytohormone qui joue un rôle important pendant les différents stades de la plante. Cependant, pendant le stress, elle est produite par la plante comme réponse pour la nouvelle situation stressante. Ainsi, l'éthylène affecte négativement la plante, en inhibant l'élongation racinaire, la nodulation et le transport des auxines, et en stimulant la vitesse de la sénescence et l'abscission (Glick *et al.*, 2007b).

L'une des méthodes majeure que les PGPR utilisent pour faciliter la croissance et le développement des plantes c'est la réduction des taux d'éthylène par la désamination de l'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), précurseur de l'éthylène (Penrose & Glick, 2003). L'enzyme catalysant cette réaction, l'ACC désaminase, hydrolyse l'ACC présent dans la rhizosphère en ammoniac et cétobutyrate. Afin de maintenir l'équilibre, la plante secrète plus d'ACC dans les exsudats en diminuant sa concentration ainsi que celle d'éthylène synthétisé au niveau des tissus végétaux. De cette manière, les PGPR enlèvent l'état de stress et améliorent la croissance végétale.

Cet enzyme, l'ACC désaminase, se trouve chez les microorganismes qui sont capables d'utiliser l'ACC comme source d'azote, appartenant aux Gram positives et négatives et aussi certains champignons (Saleem *et al.*, 2007). Les rhizobactéries ayant cette activité enzymatique peuvent favoriser l'élongation des racines, assurant ainsi une bonne nutrition. D'ailleurs, cet effet positif a été confirmé par Li *et al.* (2000) en réalisant une mutation induite au niveau du gène codant pour l'ACC désaminase chez une souche *Enterobacter cloacae* UW4, qualifiée de PGPR pour le canola. Les résultats obtenus après l'inoculation ont montré que cette souche a perdu l'effet stimulant vis-à-vis d'élongation racinaire de canola.

Nombreuses études durant ces dernières décennies ont rapporté le rôle promoteur exercé par les PGPR ayant l'activité ACC désaminase sur la croissance des plantes tout en renforçant

leur résistance sous différents types de stress, abiotique tel que la salinité (Cheng *et al.*, 2007b), des contaminants organiques (Huang *et al.*, 2005) et des métaux lourds (Reed & Glick, 2005), ou biotique causé par les phytopathogènes (Wang *et al.*, 2000).

En plus, et comme l'AIA exogène peut provoquer la production d'ACC en induisant la synthèse d'enzyme ACC synthétase (Glick *et al.*, 2007b), l'excès des molécules d'ACC, exsudé par les racines, est catabolisé par les rhizobactéries ACC désaminase positives. En conséquence, les taux d'éthylène sont diminués au niveau des racines de la plante, et l'état du stress est enlevé tout en stimulant la croissance du système racinaire et la hauteur aérienne de la plante qui devient plus résistante pour les différents effets inhibiteurs d'éthylène produit lors de stress (Glick *et al.*, 2007a).

En conclusion, la croissance végétale et le développement racinaire dépendent de l'équilibre entre l'effet de l'AIA et de l'ACC désaminase produits par les plantes et/ou les PGPR.

3.2.3. Biocontrôle (PGPR à effet protecteur)

L'agression de la plante par un pathogène peut être inhibée ou bloquée par les barrières physiques (cuticule, paroi végétale) et/ou chimiques (métabolites antimicrobiens). Ainsi, l'invasion est stoppée et même restreinte si le phytopathogène a traversé la paroi végétale grâce à une réponse immunitaire induite par la reconnaissance d'agent agresseur (Jones *et al.*, 2006). En plus, tous les organes de la plante deviennent plus résistants grâce à la résistance systémique acquise, ou « SAR » (*Systemic Acquired Resistance*) développée dans l'ensemble de la plante (Durrant *et al.*, 2004). Toutefois, des rhizobactéries peuvent exercer un effet protecteur en faveur de la plante et renforcer sa défense contre les pathogènes existants dans le sol.

Ces PGPR-Bioprotectrices peuvent protéger les plantes contre une gamme relativement large d'agents pathogènes. Ce type de défense est classifié sous le concept de lutte biologique. L'effet protecteur conféré par ces agents biologiques, appelés aussi des biopesticides, est assuré par l'antagonisme vis-à-vis du pathogène sans avoir d'effet néfaste pour la plante. Ainsi, comme il a été rapporté par Haas et Défago (2005), le sol devient suppressif envers l'effet nocif de ces phytopathogènes. Plusieurs travaux ont rapporté la capacité de certaines rhizobactéries dissolvant le phosphate à protéger la plante notamment contre les champignons phytopathogènes (Rajkumar *et al.*, 2008 ; Gull & Hafeez, 2012 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012).

Parmi les bactéries les plus étudiées dans ce contexte, celles qui appartiennent aux genres *Bacillus*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, et *Pseudomonas*. Récemment, au Maroc, Hamdali *et al.* (2008b) et Loqman *et al.* (2009) ont isolé des souches d'Actinomycètes, à partir de différentes mines de phosphates et des rhizosphères de vignes saines sauvages respectivement, ayant une activité antagoniste contre des phytopathogènes, tels que *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium dahliae* et *Botrytis cinerea*. Par ailleurs, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont été identifiées comme antagonistes très puissants contre des agents phytopathogènes (Rajkumar *et al.*, 2008 ; Trivedi *et al.*, 2008). Selon la littérature, des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été parmi les souches les plus exploitées dans le volet de biocontrôle comme il a été affirmé par Bakker *et al.* (2007). Ces bactéries produisent différents types de sidérophores et d'antibiotiques (Haas & Défago, 2005 ; Ahmad *et al.*, 2008).

Ces agents de biocontrôle sont caractérisés par la spécificité d'interaction selon l'agent agresseur. En plus, leurs multiples modes d'action contre les organismes nuisibles minimisent l'apparition de résistance chez les pathogènes. En effet, ces bactéries bénéfiques peuvent agir directement sur le pathogène par l'antibiose, le parasitisme ou la compétition ou indirectement par l'induction des mécanismes de la résistance systémique chez la plante ou par l'atténuation des facteurs de virulence chez l'agent pathogène.

3.2.3.1. Antibiose

L'antibiose c'est l'inhibition de la croissance d'agent agresseur par des métabolites secondaires produits par l'agent antagoniste. Ces métabolites sont des composés organiques généralement de faible poids moléculaire, diffusibles ou volatiles, ayant un effet antifongique ou antibactérien, à savoir : le 2,4- diacetylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la pyolutéorine, la pyocyanine, la pyrrolnitrine, la tropolone ou encore des lipopeptides cycliques dont la majorité a été détecté chez le genre *Pseudomonas* (Picard *et al.*, 2000 ; Raaijmakers *et al.*, 2002 ; Haas & Défago, 2005 ; Noori & Saud, 2012).

Les rhizobactéries capables de produire ces métabolites jouent un rôle très important dans le biocontrôle contre un large spectre des phytopathogènes. L'antibiose est souvent accompagnée par le parasitisme et la compétition.

- ***Production d'acide cyanhydrique (HCN)***

L'acide cyanhydrique (HCN) est un métabolite secondaire produit par nombreuses rhizobactéries. Il joue un rôle très important dans le biocontrôle car il a un effet antibiotique surtout antifongique. L'HCN inhibe le transport des électrons, ainsi le processus qui aboutit à l'acquisition d'énergie sera perturbé provoquant ainsi la mort de l'organisme. Cet acide peut intervenir dans l'antibiose aussi en inhibant certains enzymes primordiaux du pathogène, comme le cytochrome C oxydase (Haas & Défago 2005). Nombreuses rhizobactéries ont été identifiées comme productrices de ce composé volatil (Ahmad *et al.*, 2008 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012).

3.2.3.2. Parasitisme

Ce mode d'antagonisme consiste en l'interaction directe avec le pathogène, et où les tissus vivants de ce dernier sont la source nutritive et l'habitat pour l'agent antagoniste. La bactérie antagoniste attaque directement le pathogène en produisant des enzymes hydrolytiques comme les protéases, les lipases, les chitinases et les glucanases (Whipps, 2001 ; Rajkumar *et al.*, 2008 ; Gull & Hafeez, 2012). L'altération des parois conduit à la lyse des cellules éliminant ainsi l'agent pathogène, en particulier les champignons (Hamdali *et al.*, 2008b). En effet, Ramyasmruthi *et al.* (2012) ont obtenu une réduction de 50% de l'infection fongique causée par le champignon phytopathogène *Collectotrichum gloeosporioides* OGC1 chez le piment (*Capsicum* spp.) inoculé avec une souche *P. fluorescens* isolée de la rhizosphère de la même espèce végétale, et ayant plusieurs enzymes hydrolytiques ; la chitinase, la cellulase, la lipase et la protéase.

3.2.3.3. Compétition

La compétition entre l'antagoniste et le pathogène, soit nutritionnelle ou spatiale, favorise la réduction de nombreuses maladies végétales. La compétition pour les nutriments, tel que le carbone, contribue à l'inhibition de germination des spores fongiques dans le sol (Alabouvette *et al.*, 2006). De même, la compétition spatiale consiste à la colonisation des niches au niveau des racines par les PGPR. En conséquence, les sites d'attaque par les agents phytopathogènes deviennent occupés par les PGPR diminuant ainsi l'attachement des pathogènes aux racines et les infections qu'ils causent par la suite (Benítez *et al.*, 2004).

- ***Production des sidérophores***

Quant aux micro-éléments qui jouent un rôle vital pour la machinerie cellulaire végétale ou bactérienne, on trouve que la compétition pour le fer est la plus documentée. Les PGPR les plus efficaces sont celles capables de produire les sidérophores, des molécules extracellulaires de faibles poids moléculaires ayant une grande affinité pour l'ion ferrique (Fe^{3+}) (Haas & Défago, 2005). Les sidérophores leur permettent de chélater le fer du milieu dans des conditions appauvries en fer en inhibant ainsi la croissance des agents phytopathogènes (Ramesh *et al.*, 2009).

Les bactéries les plus compétitives sont celles produisant des sidérophores caractérisés par une très grande affinité pour le fer dont le genre *Pseudomonas* regroupe nombreuses souches ayant cette capacité, surtout des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Haas & Défago, 2005). Parmi les sidérophores ayant une grande affinité vis-à-vis du fer, la pyoverdine qui est le pigment diffusible extracellulaire qui caractérise les *P. fluorescens* spp. (Meziane *et al.*, 2005).

Ce mode d'action est très efficace surtout contre les champignons phytopathogènes. D'ailleurs, Gull & Hafeez (2012) ont montré que malgré l'intervention des métabolites secondaires à effet antifongique dans le biocontrôle, la production de différents types des sidérophores par des souches de *Pseudomonas* antagonistes contre le champignon *Rhizoctonia solani* est le mécanisme principal pour l'inhibition de cet agent phytopathogène.

A part les champignons, d'autres phytopathogènes peuvent être atteints par ce mode d'action. En effet, cette compétition contribue à l'abaissement de fer dans le milieu en menaçant l'existence des organismes phytopathogènes incluant les nématodes. En effet, Siddiqui & Shaukat, (2003) ont rapporté la capacité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* IE-6 à diminuer la densité de la population des nématodes au niveau des racines. Cette souche a été capable de produire des sidérophores qui ont causé la carence en fer.

A part ce mode de biocontrôle basé sur la compétition pour le fer, les sidérophores peuvent renforcer autrement la défense de la plante contre les phytopathogènes en stimulant la résistance systémique chez la plante. Ce processus est appelé « ISR » (Induced Systemic Resistance) (Jourdan *et al.*, 2008).

Cependant, la synthèse des sidérophores est inhibée quand le fer présent dans le milieu dépasse un certain seuil. D'après Terano *et al.* (2002), la production de la pyochéline, produit

par une souche de *P. fluorescens* isolée à partir de la rhizosphère de l'orge, n'a pas été détectée quand le fer ajouté au milieu a dépassé 25 μM sans affecter la croissance de la bactérie.

3.2.3.4. Réduction de la virulence des phytopathogènes

Un autre mécanisme de protection de la plante assuré par les PGPR-Bioprotectrices est présenté par la dégradation des facteurs de phytopathogénicité sécrétés par les pathogènes. En effet, certaines bactéries bénéfiques sont capables de dégrader différentes toxines (Malathi *et al.*, 2002) ou bien d'altérer le métabolisme de l'agent pathogène en dégradant les facteurs de régulation impliqués dans le quorum-sensing afin d'empêcher l'activation du processus de virulence (Uroz *et al.*, 2003).

3.2.3.5. Stimulation de la résistance systémique induite (ISR)

Récemment, un nouveau mode de protection des végétaux similaire à la SAR a été mis en évidence. Il est basé sur la stimulation des mécanismes de défense systémique dans la plante par des rhizobactéries non pathogènes sans provoquer les symptômes visibles de maladie. Ce phénomène est appelé « résistance systémique induite » ou ISR (Induced Systemic Resistance) (Jourdan *et al.*, 2008). Grâce à cette résistance induite, la plante devient beaucoup plus résistante aux agressions, et peut se protéger contre une large gamme d'agents pathogènes (champignons, bactéries, virus, certains insectes et nématodes) (Durrant & Dong, 2004 ; Haas & Défago, 2005).

L'ISR est induite plus particulièrement par les PGPR incluant des bactéries à Gram positif telles que des souches de *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 2004), et des bactéries à Gram négatif qui sont les plus étudiées. En plus des entérobactéries comme *Serratia* ou *Pantoea agglomerans* qui interviennent dans la mise en alerte de la plante hôte, la plupart des souches à Gram-négatif impliquées dans l'induction d'ISR appartiennent au genre *Pseudomonas* (Bakker *et al.*, 2007 ; Jourdan *et al.*, 2008).

L'ISR se manifeste par une protection de l'ensemble des organes de la plante. En effet, les mécanismes de défense développés par la plante suite à cette induction se propagent à travers toutes les parties de la plante sans migration des rhizobactéries déclenchant cette résistance (Ongena & Thonart, 2006). En conséquence, l'ISR peut être divisée en trois étapes principales

que sont : l'élicitation, c'est la perception des éliciteurs bactériens (des molécules actives produites par ces rhizobactéries phyto-bénéfiques) par les cellules de la plante; la transmission d'un signal systémique afin de propager l'état induit dans la plante entière et l'expression des mécanismes de défense de la plante contre le pathogène (Jourdan *et al.*, 2008).

Les éliciteurs bactériens impliqués dans l'ISR, ou les déterminants, sont de natures variées. On note les flagelles (Meziane *et al.*, 2005), les antibiotiques (Ongena *et al.*, 2007) et les sidérophores (Jourdan *et al.*, 2008). Les lipopolysaccharides (LPS) ont aussi une activité élicitrice comme dans le cas de la souche de *Pseudomonas putida* WCS358 que ses LPS ont conduit à l'induction d'ISR chez *Arabidopsis thaliana* et l'haricot contre des pathogènes foliaires comme *Pseudomonas syringae* ou *Botrytis cinerea* (Meziane *et al.*, 2005). De même, il a été rapporté aussi que les N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) seraient impliqués dans l'expression de l'ISR (Schuhegger *et al.*, 2006).

Les multiples modes d'action de ces PGPR-Bioprotectrices contre les organismes nuisibles minimisent l'apparition de résistance chez les pathogènes. En plus, les avantages principaux résident dans leur compatibilité écologique et dans leur spécificité vis-à-vis des pathogènes ciblés. Ainsi, ce groupe des bactéries phyto-bénéfiques a été repris sous le terme « Rhizobactéries Probiotiques » (Haas & Keel, 2003). Ces PGPR-Bioprotectrices peuvent être utilisées aussi comme compléments ou en alternance avec les produits classiques de la lutte chimique dans une perspective de lutte intégrée afin de réduire l'apparition de résistances chez les agents nuisibles.

3.3. Inoculation avec des BSP

Les bactéries rhizosphériques qualifiées de PGPR appartiennent aux différents genres bactériens, et peuvent favoriser la croissance végétale par un seul mécanisme d'action, ou par une combinaison synergique de plusieurs activités biochimiques.

3.3.1. Inoculation avec une BSP ayant d'autres activités phyto-bénéfiques

Suite à l'effet synergique de différents caractères phyto-bénéfiques présents chez une bactérie BSP, la diversité de ces activités positives, à effet phytostimulant ou phytoprotecteur, pourrait contribuer à une stimulation plus importante que celle attendue en présence d'une bactérie ayant un seul caractère PGP. En effet, la souche *Bacillus* sp. SVPR30 utilisée pour

l'inoculation du riz, est capable de solubiliser le phosphate tricalcique, de produire l'AIA, des sidérophores et de fixer l'azote (Beneduzi *et al.*, 2008).

De même, une amélioration de la croissance de l'aubergine ainsi qu'une réduction de l'infection causée par *Ralstonia solanacearum* ont été notées suite à l'inoculation avec des endophytes, des *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. et *Bacillus* spp. dans les conditions de chambre de culture (Ramesh *et al.*, 2009). Cette promotion de croissance obtenue et l'inhibition des phytopathogènes ont été dues aux différents caractères PGP des bactéries tels que la production d'AIA, des sidérophores et des antibiotiques (Ramesh *et al.*, 2009).

De plus, Ramyasmruthi *et al.* (2012) ont obtenu une stimulation de la germination de 100% des graines de piment ainsi qu'une réduction de 50% de l'infection causée par le champignon phytopathogène *Collectotrichum gleosporidose* OGC1 suite à l'inoculation avec la souche *Pseudomonas fluorescens* ayant plusieurs activités phytobénéfiques comme la solubilisation de P, la production d'AIA et la production des sidérophores ainsi que des activités à effet antagoniste telles que la production de la chitinase et de HCN.

D'autres stimulations significatives de la croissance ont été rapportées en présence des PGPR à plusieurs activités PGP en faveur de différentes plantes, comme le riz inoculé avec la souche *Serratia* sp. CMR165 (Nico *et al.*, 2012), et le blé inoculé avec des souches *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 en présence du champignon phytopathogène *R. solani* (Gull & Hafeez, 2012). Les deux souches PGPR sont caractérisées par différentes caractères positifs tels que la solubilisation du P, la production d'AIA, des enzymes hydrolytiques et des antibiotiques.

En plus, les bactéries PGPR peuvent manifester multiples propriétés phytobénéfiques selon les besoins vitaux de la plante qui changent durant des différentes périodes du cycle de sa vie (Penrose & Glick, 2003 ; Glick *et al.*, 2007b).

3.3.2. Inoculation avec un inoculant combiné de PGPR

Pour renforcer l'effet phytobénéfique conféré par les PGPR, la co-inoculation ou l'inoculation combinée offre un bénéfice plus important. Effectivement, nombreuses études ont démontré la combinaison synergique des propriétés phytobénéfiques d'un mélange composé par des PGPR seules ou des PGPR et d'autres microorganismes phytobénéfiques, telles que le travail mené par Rudresh *et al.* (2005) qui ont obtenu une amélioration de la germination, de la biomasse totale et de la productivité du pois chiche suite à l'inoculation avec un mélange de

trois microorganismes : *Rhizobium* sp., *Bacillus* sp. et *Trichoderma* sp. en pot et au champ en comparaison avec le control non inoculé ou inoculé avec un seul microorganisme. La souche *Rhizobium* IC 2091 a été triée pour infecter la plante hôte, le pois chiche, alors que *Bacillus megaterium* sub sp. *phospaticum* PB est une BSP, et *Trichodermaspp* est un antagoniste surtout contre les champignons phytopathogènes (Rudresh *et al.*, 2005).

De même, Orhan *et al.* (2006) ont obtenu des stimulations significatives concernant la croissance et la productivité de la framboise ainsi que la nutrition minérale de ce fruit inoculé avec la souche *Bacillus* M3 (fixatrice d'azote, productrice des phytohormones et BSP) en combinaison avec la souche *Bacillus* OSU-142 (fixatrice d'azote, productrices des phytohormones et antagoniste) dans le champ. En plus, ils ont rapporté que la composition minérale du sol a été affectée en particulier le taux de P soluble qui a augmenté suite à l'inoculation avec les deux souches (Orhan *et al.*, 2006). Les mêmes souches, *Bacillus* M3 et *Bacillus* OSU-142, en combinaison avec une autre bactérie phyto-bénéfique *Microbacterium* FS01 (fixatrice d'azote), ont été utilisées pour l'inoculation du pommier (*Malus domestica* L.) (Karlidag *et al.*, 2007). Des améliorations significatives ont été obtenues au champ concernant la nutrition minérale des pommiers ainsi que la croissance et la productivité du fruit (Karlidag *et al.*, 2007). Ils ont noté aussi une amélioration significative de qualité du produit tel que le poids du fruit ainsi que sa composition nutritionnelle (Karlidag *et al.*, 2007).

Quant à Rajkumar *et al.* (2008), ils ont réussi à améliorer la croissance du poivron et à diminuer son infection avec *Rhizoctonia solani* par 45-65% en l'inoculant avec deux souches, *P. fluorescens* SE21 et RD41, ayant différentes activités à effet phyto-protecteur tel que la production des sidérophores, des enzymes hydrolytiques et d'HCN, phyto-stimulant comme la production d'AIA, et phyto-fertilisant comme la solubilisation de phosphate inorganique. Quant au rôle primordial des régulateurs de croissance, Cassán *et al.* (2009) ont rapporté la stimulation de la germination du maïs et du soja inoculés avec deux souches *Azospirillum brasilense* Az39 et *Brayrhizobium japonicum* E109 caractérisés par la production de plusieurs types des régulateurs de croissance, l'AIA, la GA et la zéatine.

De plus, Lucas *et al.* (2009) ont réussi à diminuer l'infection du riz par le champignon *Pyricularia oryzae*, dans le champ au sud d'Espagne, en utilisant un inoculum combiné de deux souches capables de produire des auxines, *Pseudomonas fluorescens* Aur6 qui est une BSP et ACC désaminase positive, et la souche *Chryseobacterium balustinum* Aur9. Ces deux

souches ont été rapportées comme des PGPR pour d'autres plantes aussi comme la tomate et le poivron (Lucas *et al.*, 2009).

Et récemment, Khalimi *et al.* (2012) ont isolé deux souches de *Pantoea agglomerans*, PaJ et BS2a, à partir de la rhizosphère d'arachide et testé comme inoculum sur le riz. Ils ont obtenu des augmentations significatives des différents paramètres de croissance évalués pendant cette étude, et ont rapporté que les résultats de la co-inoculation du riz ont été mieux que ceux d'inoculation avec une seule bactérie (Khalimi *et al.*, 2012).

En conclusion, l'exploitation de ces rhizobactéries qualifiées de PGPR, soit des bio-fertilisants et/ou des bio-protecteurs, est une option rationaliste qui peut contribuer à l'amélioration des conditions écologiques dans les sols cultivés et à la réalisation d'une agriculture durable. En plus, ces agents phytobénéfiques stimulent le développement des plantes tout en produisant des aliments sains pour l'homme (Villarreal-Sanchez *et al.*, 2003). Et malgré que l'interaction PGPR-plante et les différentes activités phytobénéfiques montrées par les PGPR ne sont pas bien élucidées et définies, le marché, soit pour la fertilisation biologique ou les biopesticides microbiens, est en progression et l'industrie des produits à base des microorganismes est active et en croissance. D'ailleurs, plusieurs bactéries sont déjà mises sur le marché, en tant que biofertilisants ou biopesticides, telles que *Bacillus subtilis* (Kodiak® et Serenade®), *Pseudomonas* (AtEze® et RIZOFOSliq®) *Azospirillum brasilense* (RHIZOFLO® et NoctinAzo®).

4. BIOFORMULES A BASE DES RHIZOBACTERIES QUALIFIEES DE PGPR

4.1. Caractères des bactéries utilisées comme inoculants

Pour qu'une bactérie soit qualifiée de PGPR, elle doit se caractériser par trois particularités : avoir un effet bénéfique en faveur de la plante, être capable de coloniser les racines et être capable de survivre et de se multiplier au niveau de la rhizosphère au moins pendant le temps nécessaire pour exprimer son effet phytobénéfique (Barea *et al.*, 2005). Ainsi, une sélection doit être faite avant de confirmer et d'exploiter une bactérie comme bio-inoculum. Outre les caractères phytobénéfiques *in vitro*, un bon inoculum doit être préparé par des souches d'une grande efficacité sous les conditions du terrain. Car, les bons résultats obtenus *in vitro* ne sont pas souvent reproductifs dans le champ, alors un test d'inoculation est obligatoire afin d'évaluer le comportement de la bactérie en présence de la plante (en pot), suivi du test d'inoculation dans le biotope réel (le champ). L'éventuel changement des performances des bactéries phytobénéfiques peut être dû aux différents facteurs liés à la plante elle-même, surtout la composition des exsudats, ou bien des facteurs environnementaux tels que le climat, le sol et la microflore indigène du sol, qui peuvent affecter leur croissance et modifier leur effet sur la plante. Ce test d'inoculation de la plante dans des conditions du champ contribue à la suppression des bactéries ayant des effets délétères sur la croissance de la plante et son développement (Hilali *et al.*, 2001).

En plus, la persistance au niveau de la rhizosphère est nécessaire afin d'assurer la continuité des effets phytobénéfiques exercés par les rhizobactéries. En effet, comme l'inoculum entre en interaction directe avec la plante au niveau de la rhizosphère, zone caractérisée par une forte activité microbienne, les rhizobactéries utilisées pour l'inoculation doivent être très compétitives afin de survivre et de bien coloniser le territoire (Cattelan *et al.*, 1999) et d'y garder une forte densité pendant une durée relativement longue tout en conservant leurs effets phytobénéfiques (Arora *et al.*, 2001). Sauf qu'actuellement la majorité des PGPR ont été rapportées comme des mauvaises colonisatrices. En conséquence, le terme PGPR est remplacé par PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (Bashan & Holguin, 1998 ; Cattelan *et al.*, 1999). En plus, Harris *et al.* (2006) ont montré que cette condition concernant la forte colonisation des racines n'est pas souvent indispensable pour avoir l'effet positif prévu de la bactérie phytobénéfique.

De plus, il est conseillé d'inoculer une plante avec les PGPR isolées de la rhizosphère de la même plante. Car ces PGPR sont mieux adaptées aux différentes conditions, biotiques et

abiotiques, entourant les racines (Morales-García *et al.*, 2011). Cependant, nombreuses études ont rapporté des stimulations significatives obtenues en présence des PGPR exogènes, tel que le travail de Khalimi *et al.* (2012) qui ont testé l'effet de deux souches de *Pantoea agglomerans*, PaJ et BS2a, isolées à partir de la rhizosphère d'arachide, sur le riz. De même, Lucas *et al.* (2009) sont arrivés à diminuer l'infection du riz avec le champignon *Pyricularia oryzae*, en présence d'inoculum combiné de deux souches, *Pseudomonas fluorescens* Aur6 et *Chryseobacterium balustinum* Aur9, issues de la rhizosphère de *Lupinus hispanicus* et de *Lupinus albus* respectivement. Ces deux souches se sont comportées comme antagonistes en faveur du le riz tout en stimulant sa croissance (Lucas *et al.*, 2009).

4.2. Facteurs affectant l'efficacité des bio-inoculants

L'étape de production d'inoculum est la dernière étape de la mise en œuvre d'un bio-inoculum, et le support d'inoculum est la fraction qui va garantir la conservation de la viabilité des souches PGPR et la maintenance de leurs différentes activités phytobénéfiques le plus long temps possible. Cependant, d'autres facteurs indépendants de l'inoculum, peuvent intervenir dans la productivité des inoculants, tels que les sols ou la plante visés par le traitement. En effet, Naiman *et al.* (2009) ont rapporté que l'inoculation du blé avec des souches d'*Azospirillum* et *Pseudomonas* commercialisées comme des PGPR a affecté la biodiversité de la microflore cultivable présente au niveau de la rhizosphère du blé, et l'effet phytobénéfique attendu n'a pas été obtenu suite à l'inoculation en démontrant l'intervention de la microflore indigène dans le comportement d'inoculant (Naiman *et al.*, 2009).

Contrairement à ces résultats, Piromyou *et al.* (2011) ont rapporté que l'introduction de deux souches indigènes (*Pseudomonas* sp. SUT 19 et *Brevibacillus* sp. SUT 47) et deux souches commercialisées comme bio-fertilisant (*Azospirillum* sp. et *Azotobacter* sp.) ou l'utilisation du compost n'avait pas d'impact sur la structure de la microflore rhizosphérique de maïs (*Z. mays* L.). En effet, ils ont remarqué que les profils PCR-DGGE de la population microbienne rhizosphérique changent plutôt selon l'âge de la plante que selon les différents traitements, soit conduits en pot ou dans le champ (Piromyou *et al.*, 2011). En outre, ils ont obtenu un effet positif de deux bactéries indigènes vis-à-vis de la croissance de maïs plus important que celui conféré par les bactéries commercialisées (Piromyou *et al.*, 2011).

En plus, les bactéries BSP ont souvent été isolées en utilisant le glucose à forte concentration (1%) qui est un composé minime dans les exsudats racinaires. En conséquence, ces BSP sont

toujours des faibles colonisateurs au niveau de la rhizosphère (Harris *et al.*, 2006). En outre, Nico *et al.* (2012) ont rapporté qu'une souche BSP, *Pseudomonas* sp. PAC, ne peut dissoudre le P, minéral et organique, qu'en présence de glucose comme source de carbone, et la promotion du riz par cette souche a été exclusivement liée à l'ajout du glucose au milieu. Ainsi, la stimulation de la croissance végétale dans le champ serait fortement liée à la quantité de glucose exsudé par la plante inoculée, et qui est exigée par la bactérie PGPR pour solubiliser le P.

En conclusion, il existe plusieurs facteurs qui peuvent affecter le comportement des PGPR. En plus, l'interaction PGPR-plante est plus compliquée qu'un simple effet-réponse, mais c'est une relation fortement influencée par les microorganismes déjà présents dans le sol, et aussi par la physiologie de la plante qui change selon les paramètres abiotiques.

Chapitre II

MATERIEL & METHODES

1. MATERIEL VEGETAL ET COLLECTE DES ECHANTILLONS DE SOLS

1.1. Matériel végétal

Les bactéries ont été isolées à partir des sols de la rhizosphère des plantes suivantes:

- légumineuses naturelles provenant du Nord du Maroc : *Medicago marina*, *Lotus corniculatus*, *Lotus creticus*, *Calycotome villosa*, *Lupinus angustifolius* (région de Tanger), *Lupinus hirsitus*, *Vicia sativa* (région de Chefchaouen), et *Lupinus luteus* (région de Larache) ;
- variétés du riz cultivées dans la région de Larache: Elio, Puntal et Guadiamar.

1.2. Echantillons de sols : Sites d'étude et Echantillonnage

Les échantillons du sol rhizosphérique des différentes légumineuses ont été collectés de la région de Tanger, Larache et Chefchaouen. Quant aux plantules du riz, elles ont été collectées avec le sol rhizosphérique des différents sites de culture des rizières de la région de Larache. Les échantillons ont été mis dans des flacons en plastic stériles et conservés à 4°C.

De même, une collecte de sol de l'horizon 0-20 cm des différents sites des rizières a été réalisée pour une analyse physicochimique (tableau 4).

2. METHODES

2.1. Isolement, purification et conservation des rhizobactéries

On a récupéré le sol rhizosphérique adhérent aux racines des plantes. Deux grammes de chaque échantillon du sol rhizosphérique sont suspendus dans 18 ml de solution saline stérile à 0.9% (poids/volume). Les solutions ont été mises en agitation pendant 1h (200 rpm, 28°C). Un échantillon de 1ml de chaque solution obtenue a été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} .

2.1.1. Isolement des bactéries *Pseudomonas*

L'isolement des souches appartenant au genre *Pseudomonas* a été effectué sur le milieu King B (King *et al.*, 1954) auquel on a ajouté de l'ampicilline (40 µg/ml), du chloramphénicol (65 µg/ml) et de cycloheximide (40 µg/ml) (Annexe 1).

Des aliquotes de 100 µl de chaque dilution ont été ensemencés sur le milieu King B solide. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 3 jours. Les colonies ont été isolées et purifiées par épuisement sur même milieu. Ces souches ont été désignées par la lettre « P » pour « *Pseudomonas* ».

2.1.2. Isolement des autres bactéries rhizosphériques

Afin d'isoler les autres bactéries rhizosphériques, surtout celle de Gram négatif, on a utilisé le milieu TSA (Tryptic Soy Agar) enrichi en cycloheximide (40 µg/ml). On a étalé 100 µl de chaque dilution sur les boîtes contenant ce milieu TSA. Les boîtes sont par la suite incubées à 28°C pendant 3 jours. Les colonies ont été isolées et purifiées par épuisement sur même milieu. Les souches obtenues à l'isolement sur le milieu TSA sont désignées par la lettre « R » pour « Rhizobactéries ».

2.2. Sélection des bactéries solubilisant le phosphore (BSP)

La sélection des bactéries capables de solubiliser le phosphate tricalcique, ou bien les BSP, a été faite sur le milieu PVK (Pikovskaya, 1948) solide qui contient comme seule source de phosphore, 5 g/l de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Annexe 1).

Des aliquotes de 10 µl de cultures bactériennes fraîches ont été déposés sur le milieu PVK. Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Nous avons mesuré pour chaque isolat le diamètre total (diamètre du halo + diamètre de colonie), et le diamètre de colonie. Le diamètre du halo de solubilisation a été calculé en soustrayant le diamètre de colonie de diamètre total.

Les isolats qui ont donné des diamètres de solubilisation ≥ 4 cm ont été conservés dans des géloses inclinées qui vont être maintenues à 4°C, et aussi dans 25% de glycérol stérile qui vont être maintenus à -20°C.

2.3. Recherche des activités PGP

2.3.1. Production d'acide indole acétique (AIA)

Pour détecter la production d'AIA, on a ajouté 0.05% de tryptophane au milieu TSA. Après stérilisation et solidification du milieu, une membrane de nitrocellulose stérile a été déposée directement sur le milieu de culture, et l'inoculation a été faite directement sur la membrane (3 bactéries par boîte), en déposant 10 µl de culture bactérienne sur la surface de la membrane. Après incubation à 28°C, la membrane contenant les colonies a été déposée sur un papier filtre Whatman N°2 imprégné du réactif de Salkowski (2% de FeCl₃ (0.5 M), 35% d'acide perchlorique) (Bric *et al.*, 1991). Les bactéries qui synthétisent de l'AIA sont identifiées par la formation des halos rouges qui cernent les colonies.

2.3.2. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

Les isolats ont été soumis pour le test de production d'acide cyanhydrique selon la méthode de Bakker et Schippers (1987). On a ajouté 4.4 g de glycine /l au milieu de TSA. Après stérilisation et solidification du milieu, les boîtes de pétri ont étéensemencées par 100 µl de la culture bactérienne fraîche. Un papier filtre (Whatman N°1) de 9 cm de diamètre imprégné d'une solution composée de 0.5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium, a été déposé dans le couvercle de chaque boîte en position inverse. Les boîtes de pétri sont ensuite scellées et incubées à 28°C pendant 4 jours. Le changement de couleur du papier filtre de jaune en orange indique la synthèse de HCN.

2.3.3. Production des sidérophores

Cette activité a été recherchée en utilisant un milieu pauvre en fer, le milieu Chrome Azurol S (CAS) selon la méthode de Schwyn et Neilands (1997) modifiée. Ce milieu est composé par 3 fractions, A, B et C (Annexe 3). La fraction A ayant la couleur violette foncée, s'ajoute à la fraction B sous agitation en donnant un mélange de coloration bleue foncée. Quant à la fraction C, avant d'ajouter l'agar, le pH est ajusté à 6.8 en ajoutant de NaOH 50% (p/v).

On a déposé des aliquotes de 10 µl de culture bactérienne fraîche sur le milieu TSA. Après une incubation de 5 jours à 28°C, on a fait couler sur la surface une couche mince du milieu

CAS préparé auparavant, autoclavé et refroidi à 50°C. Puis, les boîtes ont été gardées à l'obscurité pendant 24 heures.

La réaction positive est basée sur la compétition entre le complexe ferrique d'indicateur CAS et les sidérophores produits par les bactéries à tester. Quand le fer est capté par les sidérophores ayant plus d'affinité pour l'ion ferrique, la couleur du milieu CAS est modifiée du bleu en orange à l'entourage de la colonie (Schwyn & Neilands, 1997).

2.3.4. Test qualitatif de solubilisation : utilisation des sources différentes de P inorganique

La solubilisation des autres sources de P inorganique a été recherchée en utilisant le milieu PVK (Pikovskaya, 1948) modifié. Le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a été substitué par 0.5% de $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$, de CaHPO_4 , de FePO_4 ou d' AlPO_4 . On a employé aussi d'autres milieux utilisés pour la sélection des BSP, et qui sont le milieu YED et NBRIP, enrichis du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme source de phosphore (Annexe 2).

Les boîtes contenant les différents milieux ont été inoculées avec des aliquotes de 10 μl des cultures bactériennes. Elles sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Les résultats ont été notés soit (+) ou (-) selon la formation ou non des halos de solubilisation à l'entourage des colonies.

2.3.5. Fixation libre d'azote

La capacité des isolats à fixer l'azote atmosphérique a été évalué en examinant l'activité réductrice d'acétylène en éthylène. Le milieu de culture utilisé c'est le milieu Burk (Burk, 1930) sans azote (Annexe 3). Des tubes de 10 ml contenant 3 ml de ce milieu semi-solide (0.18% d'agar), ont été inoculés avec 100 μl de culture bactérienne. Les tubes ont été fermés hermétiquement et incubés en obscurité à 28°C. Après 24 h, on a injecté 1 ml de l'acétylène dans les tubes et on les a incubés de nouveau.

Après chaque 72 h, des échantillons gazeux (1 ml) ont été prélevés afin de doser l'éthylène par la chromatographie en phase gazeuse. Et l'éthylène produit est proportionnelle au taux d'azote moléculaire fixé.

2.3.6. Dégradation d'urée

L'urée c'est la seule forme organique d'azote assimilée par les plantes (Bardgett, 2005). Sauf qu'il est absorbé beaucoup moins facile. L'uréase c'est l'enzyme qui est capable d'hydrolyser l'urée en produisant de l'ammoniac et de l'anhydride carbonique, et de faciliter ainsi son absorbance par les plantes. CO_2 et NH_3 produits se combinent en donnant du carbonate d'ammonium $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$. Ce dernier alcalinise le milieu en changeant la coloration du milieu. La recherche d'une uréase consiste donc à l'alcalinisation du milieu contenant de l'urée comme seule source d'azote pour les bactéries. Comme indicateur de pH, on utilise le rouge de phénol.

Les boites contenant le milieu sélectif pour cette activité ont été inoculées avec les bactéries à évaluer (Annexe 3). Après l'incubation, les colonies positives s'entourent par une coloration rouge violacée sur un fond jaune.

2.3.7. Détection d'activité ACC désaminase

Pour détecter l'activité d'enzyme d'ACC désaminase, on a inoculé des tubes contenant 5 ml de TSB avec les souches, puis mis en agitation à 28°C durant 24 h. Un tube non inoculé a servi comme contrôle négatif. Les cultures ont été lavées deux fois avec la solution saline à 0.9% stérile.

On a préparé 3 tubes pour chaque souche : le premier avec 5 ml de milieu minimum M9 (Annexe 3), le deuxième avec 5 ml de M9 contenant 3 mM d'ACC comme seule source d'azote et le dernier avec 5 ml de M9 sans ACC. Tous ces tubes ont été inoculés avec les cultures bactériennes lavées et incubés en agitation à 28°C. Les absorbances ont été notées après 24 h et 48 h d'incubation à 600 nm. La souche a été considérée ACC désaminase positive si elle a donné une valeur d'absorbance basse dans le tube sans ACC et élevée dans le tube contenant de l'ACC en montrant la multiplication de la bactérie suite à l'utilisation d'ACC comme source d'azote. Les résultats ont été notés (+) pour les souches capables d'hydrolyser l'ACC et (-) pour les souches n'ayant pas cette enzyme.

2.3.8. Détection d'AHL (Acyl Homosérine Lactone)

Les N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) sont des substances qui jouent un rôle très important dans la communication entre les bactéries Gram négatives, ou quorum sensing. Selon plusieurs travaux, ces molécules sont également capables de stimuler le phénomène d'ISR. La détection des AHLs est basée sur l'utilisation de mutants bactériens (biosenseurs) incapables de produire leurs propres AHLs mais capables d'induire une réaction colorée en présence des AHLs exogènes.

On a déposé des cylindres de fer stériles dans les boîtes avant de verser le milieu TSA autoclavé et refroidie à 50°C. Dans des tubes contenant 4 ml de TSA à 0,8% refroidis à 42°C, on a introduit 400 µl de culture fraîche d'*A. tumefaciens* NT1 ayant le plasmide pZRL4, utilisé comme biosenseur, et 80 µl de X-gal (5-bromo-4-chloro 3-indolyl-β-D-galactoside) stérile. Le contenu a été versé sur la surface des boîtes de TSA gardant encore les cylindres. Ces derniers ont été enlevés après la solidification du milieu. Dans chaque puits, on a déposé 200 µl de surnageant de culture de la bactérie à évaluer. Le control négatif a été présenté par 200 µl d'eau, tandis que le control positif a été composé de 195 µl d'eau et du 5 µl de HHL (5 µg/µl). Après incubation, les colonies positives, sont entourées par une coloration bleue indiquant la production d'AHL.

2.3.9. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les exo-enzymes ayant une activité hydrolytique pourraient jouer un rôle important dans le biocontrôle, tels que la chitinase, la protéase et la lipolyse. La recherche de ces enzymes a été faite selon des tests qualitatifs sur des boîtes contenant le substrat spécifique pour chaque enzyme recherché. Les boîtes inoculées avec les bactéries ont été incubées à 28°C pendant 7 jours. Les résultats ont été notés (+) pour les bactéries capable de dégrader le substrat, et (-) pour celles incapables de l'utiliser.

2.3.9.1. Détermination de l'activité chitinolytique

La chitine est une molécule très abondante après la cellulose. C'est un composé structural de plusieurs organismes, tels que les champignons, les protozoaires et les insectes (Hoster *et al.*, 2005). Afin de mettre en évidence cette activité, on a utilisé comme substrat la chitine colloïdale comme source de carbone. Le processus suivi afin de préparer la chitine colloïdale

est présenté dans l'annexe 4. Les boîtes contenant le milieu sélectif (Annexe 4) ont été incubées avec les bactéries. Après incubation, les colonies positives s'entourent avec des halos transparents.

2.3.9.2. Détermination de l'activité amylolytique

L'amidon est une molécule de réserve énergétique chez la plante. C'est le constituant principal de plusieurs organes végétaux tels que les graines et les tubercules. L'activité amylase a été recherchée sur l'agar d'amidon contenant l'amidon de pomme de terre comme source de carbone (Annexe 4). Quant à la révélation, après la croissance des bactéries, on a versé du lugol sur la surface des boîtes. Les colonies positives se sont entourées avec des halos transparents sur un fond de coloration bleue foncée.

2.3.9.3. Détermination de l'activité cellulolytique

Comme substrat pour l'enzyme cellulase, on a utilisé le carboxyméthylcellulose (CMC), un dérivé de cellulose, le constituant principal des parois cellulaires des végétaux. Et la composition du milieu est dans l'annexe 4. L'activité cellulolytique a été révélée par le rouge Congo qui se lie de manière stable aux molécules non dégradables de CMC. Ainsi et après la croissance des colonies, les boîtes ont été remplies d'une solution de rouge Congo (0.1%) (p/v). Après 30 min, on a fait deux lavages avec NaCl (1 M) de 5 min de durée. Les colonies qui ont l'enzyme recherché se sont entourées avec un halo jaunâtre sur un fond rouge.

2.3.9.4. Détermination de l'activité lipolytique

Quant à la lipolyse, cette enzyme vise les liaisons esters dans les matières grasses. Afin de détecter cette activité, on a ajouté de la tributyrine au milieu comme substrat (Annexe 4). Après incubation, les colonies positives se sont caractérisées par des halos transparents sur un fond opaque.

2.3.9.5. Détermination de l'activité protéolytique

Les protéases sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines. Pour mettre en évidence cette activité, on a utilisé l'agar au lait (Annexe 4). Après l'incubation des boîtes

inoculées avec les bactéries, les colonies positives se sont entourées par des halos transparents sur un fond opaque blanc.

2.4. Détermination de profil LPS (Lipopolysaccharides)

Afin de différencier entre tous les isolats, nous avons réalisé un profil électrophorétique des lipopolysaccharides en conditions dénaturantes. Les lipopolysaccharides sont des molécules qui entrent dans la composition de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Les LPS sont constitués par trois parties : le lipide A qui permet d'ancrer la molécule dans la bicouche phospholipidique, un oligosaccharide de cœur et un polysaccharide formé par des unités répétitives des monosaccharides formant l'antigène de type O. L'électrophorèse en gel d'acrylamide de ces LPS donne un profil saccharidique caractéristique pour chaque bactérie.

Cette méthode a été choisie pendant ce travail afin d'évaluer la diversité des bactéries testées. Pour ce but, on a appliqué la technique SDS-PAGE qui consiste en l'extraction des LPS. Après la préparation des échantillons suivant le protocole expliqué dans l'annexe 5, on a chargé le gel d'acrylamide par 15µl d'échantillon dans chaque puits. Ces échantillons de LPS se sont ensuite migrés sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (Annexe 5). Après la visualisation des bandes, les différents profils ont été comparés. On a obtenu ainsi des profils saccharidiques caractéristiques pour chaque souche bactérienne.

2.5. Evaluation des autres activités PGP

2.5.1. Dosage de phosphore solubilisé

Le test quantitatif de solubilisation du phosphate a été réalisé en inoculant 50ml du milieu PVK liquide préparé comme cité dans l'annexe 1 avec 500 µl de culture bactérienne. Trois répétitions ont été faites pour chaque isolat. Les milieux autoclavés et non inoculés ont servi de contrôles. Les milieux inoculés et les contrôles ont été incubés à 28°C sous agitation (180 rpm) pendant 7 jours. Les milieux ont été centrifugés à 13,000 rpm pendant 20 min. Le P soluble du surnageant a été déterminé par la méthode colorimétrique d'Ames (Ames, 1966).

La concentration de P de nos échantillons a été déterminée graphiquement à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 6). Et la concentration de P solubilisé a été déterminée en soustrayant la concentration de P soluble du contrôle de la concentration de P soluble obtenu

dans le surnageant des milieux inoculés. Les concentrations de P solubilisé par les bactéries sont exprimées en mg/l (ou en $\mu\text{g/ml}$).

Le pH final des milieux de culture a été déterminé aussi à l'aide d'un pH-mètre. Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions.

2.5.2. Quantification d'AIA

L'analyse quantitative d'AIA a été procédée de la façon suivante : les bactéries ont été mises en cultures dans le milieu minimum (MM9) (Annexe 7) pour inoculer d'autres tubes contenant le même milieu M9 enrichi de tryptophane ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$). Les milieux ont été mis en incubation à 28°C pendant 24 heures. Tous les milieux ont été centrifugés à 13,000 rpm durant 3 min. Le surnageant (1 ml) a été mélangé avec 4ml de réactif de Salkowski (150 ml de H_2SO_4 concentré, 250 ml d'eau distillée, 7.5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 M)) (Gordon & Weber, 1951). La densité optique a été prise après 20 min d'incubation du mélange réactionnel à une longueur d'onde de 535 nm.

Le développement d'une coloration rosâtre indique la production de l'AIA. Les concentrations de l'AIA ont été déterminées d'après la courbe d'étalonnage de l'AIA (Annexe 4). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions.

2.5.3. Evaluation d'antagonisme

Nous avons effectué le test d'antagonisme entre les rhizobactéries isolées et certaines bactéries et champignons phytopathogènes. Ces agents pathogènes proviennent de laboratoire de la société ResBioAgro (Séville, Espagne).

2.5.3.1. Vis-à-vis des bactéries phytopathogènes

Des bactéries phytopathogènes (*Pseudomonas savastanoi*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris* var. citri, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora* et *Pseudomonas syringae*) ont été utilisées pour ensemercer des tubes de TSB. Après l'incubation à 28°C pendant 48 h, ces tubes ont servi à inoculer les boîtes de milieu Mueller-Hilton en les inoculant avec $100 \mu\text{l}$ de la culture bactérienne. Quand les boîtes deviennent

sèches, on les a inoculées avec les bactéries à tester. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 3 jours. Les halos qui entourent chaque bactérie à tester (antagoniste) ont été notés.

2.5.3.2. Vis-à-vis des champignons phytopathogènes

On a évalué l'antagonisme des bactéries à tester vis-à-vis de certains champignons phytopathogènes (*Colletotrichum acutatum*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Botryotinia fuckeliana* et *Fusarium oxysporum*). Dans chaque boîte de PDA, quatre bactéries à tester ont été inoculées à l'aide du cure dent stérile à une distance équivalente du centre de la boîte PDA en traçant la forme « T », et une rondelle de champignon âgé de 5 jours a été coupé et posé au centre de la boîte. Les boîtes ont été incubées à 22°C pendant 7 jours. L'effet antifongique des bactéries antagonistes s'est manifesté par une inhibition de la croissance du champignon phytopathogène à distance ou par contact.

2.6. Caractérisation moléculaire des BSP

2.6.1. Extraction d'ADN génomique

Afin d'extraire l'ADN génomique, on a procédé par deux façons : en utilisant le kit Quantum prep Aquapure Genomic DNA (Bio-Rad) en suivant les instructions du fabricant, ou bien manuellement (Annexe 8).

2.6.2. Electrophorèse d'ADN génomique

Afin de s'assurer de la présence d'ADN génomique et de sa pureté, on a exercé une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose. On a ajouté de bromure d'éthidium (1 µg/ml) au gel d'agarose (0,8%) avant sa solidification. Les différents échantillons d'ADN (5 µl) ont été mélangés avec le tampon de charge (Tableau1), et déposés dans les puits du gel. Et comme marqueur de taille, on a utilisé l'ADN de phage λ, digéré par l'enzyme de restriction *Hind* III. L'électrophorèse a été lancée dans le tampon TAE 0,5X (Tableau 1) à 100 V pendant 20 min en utilisant l'appareil Mupid-21 (Cosmo Bio). Les bandes ont été visualisées sous les UV à 260 nm.

Tableau 1 : Composition du tampon de migration et de charge

Tampon TAE	Tris-HCl 30 mM, 0,002% (v/v) EDTA 0,5 M Acide acétique glacial 0,00114% (v/v) Le pH est ajusté à 8
Tampon de charge	Bleu de bromophénol 0,25% (p/v) Xylène cyanol 0,25% (p/v) Glycérol 30% (v/v)

2.6.3. Amplification d'ADNr 16S

Le gène 16S de l'ADNr a été amplifié pour toutes les bactéries par la technique PCR en utilisant les amorces bactériens universels fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Le mélange réactionnel de PCR a été de 20 µl (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition du mélange réactionnel pour l'amplification d'ADNr 16S

Eléments du mélange	Volume de prise (µl)
Tampon PCR (1X)	2 µl
dNTP (0.2 mM)	0.4 µl
Amorce F (0.2 µM)	0.4 µl
Amorce R (0.2 µM)	0.4 µl
<i>Taq</i> polymérase (0.1 U)	0.1 µl
Eau	15.7 µl
ADN	1 µl

Le mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur selon le programme suivant:

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min
 - Dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 30 s
 - Hybridation de l'amorce à 57°C pendant 45 s
 - Extension de l'amorce à 72°C pendant 2 min
 - Elongation finale à 72°C pendant 5 min
- } 35 cycles

Le produit PCR a été vérifié par l'électrophorèse sur gel d'agarose (0.8%) contenant de bromure d'éthidium (1 µg/ml) dans le tampon TAE 0,5X à 100 V pendant 20 min. Après la

migration, les bandes ont été visualisées sous les UV (260 nm). Par la suite, les photos du gel ont été prises avec l'appareil de captation d'image Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

2.6.4. Récupération d'ADN du gel d'agarose

Pour récupérer le gène 16S amplifié de gel d'agarose, les bandes visualisées sous la lumière UV ont été coupées avec une lame fine. L'ADN a été purifié après avec le kit PCR Clean-up Gel Extraction (Macherey-Nagel, Germany) suivant les instructions du fabricant.

2.6.5. Séquençage d'ADNr 16S

Le séquençage du gène 16S de l'ADNr amplifié a été effectué par les services de séquençage de Sistemas Genómicos (Valence, Espagne).

2.6.6. Traitement informatique des séquences d'ADNr 16S

Les séquences obtenues suite au séquençage ont été comparées aux autres séquences disponibles dans la base de données GenBank en utilisant le programme BlastN (Basic Local Alignment and Search Tool) sur la page de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

2.7. Essai d'inoculation sous les conditions de la chambre de culture

Le riz, *Oryza sativa* var. Puntal, a été choisie comme plante modèle afin d'évaluer la performance des souches en présence de la plante dans les conditions de chambre de culture en utilisant un support inerte (vermiculite/perlite) pauvre en phosphore.

2.7.1. Inoculation primaire : la sélection des BSP

2.7.1.1. Préparation des pots

Les pots utilisés ont été en verre (12 cm de diamètre * 17 cm longueur) contenant un mélange de vermiculite et perlite (4:1). Ils ont été remplis de 200 ml de la solution nutritive de Rigaud et Puppò (1975) sans P (Annexe 9). L'expérience a compris les traitements suivants : (i) le contrôle négatif non inoculé contenant le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme source de P, (ii) Pots inoculés avec les isolats et contenant le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme source de P, (iii) le contrôle positif non

inoculé contenant le P soluble apporté sous la forme $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. Les pots contenant le phosphate insoluble ont reçu 230 μl de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ à 10% comme seule source de P. Les pots ont été couverts avec du papier aluminium et autoclavés à 121°C pendant 20 min.

2.7.1.2. Désinfection des graines

Les graines ont été stérilisées en surface en les trempant dans l'alcool éthylique 95% pendant 1min, dans l'eau de javel pendant 20 min, suivi de 5 rinçages avec de l'eau stérile. Au dernier rinçage, les graines ont été laissées gonfler pendant 2 heures. La pré-germination a été réalisée dans des boîtes de Pétri contenant agar/eau à 1% (p/v), à 25°C et à l'obscurité jusqu'à apparition de radicelles.

2.7.1.3. Inoculation des pots

Six graines bien germées ont été semées dans chaque pot. Et chaque graine était inoculée avec 1ml de culture bactérienne jeune âgée d'une nuit d'incubation en agitation à 28°C. Trois répétitions ont été faites pour chaque isolat. Les pots ont été par la suite couverts de films de plastique pour maintenir l'humidité et éviter les contaminations, et placés dans la chambre de culture ayant les conditions suivantes : la photopériode est de 16/8 heures jour/nuit d'une intensité de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 26/18°C.

Une semaine après le semis, les films en plastiques ont été troués en face de chaque plant en gardant 5 plants d'apparence uniforme par pot. En plus, les pots ont été arrosés avec la solution nutritive sans P (Annexe 9), puis et selon les besoins des plantes, un arrosage à l'eau du robinet a été effectué.

2.7.1.4. Mesure de la productivité des plantes

Après 30 jours de croissance, les plantules ont été récoltées, lavées à l'eau de robinet, séchées à 80°C pendant 48 h. La longueur de la partie aérienne a été notée, et aussi les deux parties, aérienne et racinaire, ont été pesées séparément.

2.7.2. Inoculation secondaire : les 3 meilleures souches bactériennes

Pour cet essai, on a choisi les bactéries les plus efficaces en se basant sur les résultats obtenus suite au 1^{er} essai d'inoculation du riz, en particulier ceux du rendement en matière sèche. Ainsi, les 3 souches, PP22, GR70 et GP70, ayant donné le meilleur rendement en matière sèche, ont été utilisées pour ré-inoculer individuellement ou en mélange, la même variété du riz suivant la même procédure d'inoculation citée auparavant. Néanmoins, on a effectué certaines modifications :

- Augmenter l'effectif de répétitions : 7 répétitions au lieu de 3.
- Diminuer le nombre des graines : 4 graines au lieu de 6.
- Effectuer la co-inoculation: évaluer l'effet synergique des 3 bactéries.

Après 30 jours de semis, on a mesuré la productivité des plantes de la même façon ci-dessus.

2.8. Essai d'inoculation sous les conditions du champ

2.8.1. Préparation d'inoculant

Avant de préparer l'inoculant composé du mélange de 4 bactéries les plus efficaces, PP22, ER76, GR70 et PR29, on a effectué un test d'antagonisme entre ces bactéries choisies afin de confirmer la tolérance l'une envers l'autre. Par la suite, quatre flacons contenant 250 ml du milieu TSB ont été ensemencés avec les 4 bactéries. Les flacons inoculés ont été incubés en les plaçant sur un incubateur agitateur à 28°C pendant 48 h.

Les quatre milieux inoculés ont été rassemblés ensemble en donnant un volume de 1 L d'inoculant. On a complété le volume d'inoculant à 25 litres avec l'eau.

Les graines désinfectées ont été trempées dans cette solution bactérienne et gardées une nuit avant le semis.

2.8.2. Taille et description de l'unité expérimentale

La réalisation des tests d'inoculation dans le champ s'est déroulée sous la surveillance de la société ResBioAgro en Juin 2011 à Séville, en Espagne. Les parcelles expérimentales étaient de 1160 m² de superficie.

Après inondation du champ, les semences du riz (*Oryza sativa* var. Puntal) inoculées sont dispersées dans la parcelle. Un mois après le semis, l'inoculant préparé comme auparavant, a été répandue sous pression sur toute la parcelle expérimentale.

Quant aux autres parcelles, contrôle et organique (ou écologique), les fertilisants ont été ajoutés au sol et y incorporés avant d'inonder les champs. En effet, la parcelle contrôle a reçu un fertilisant chimique, l'urée 46%, alors que la parcelle écologique a reçu un fertilisant organique sous la forme d'un compost d'origine végétal.

2.8.3. Survie des souches dans la rhizosphère du riz

L'objectif essentiel de cette étape est d'évaluer la persistance des quatre souches appliquées comme inocula pour le riz au niveau de la rhizosphère de cette céréale dans les conditions naturelles et de vérifier leur survie dans le nouveau micro-biotope.

Une récolte au hasard des trois plantules a été faite un mois après la 1ère inoculation. Les échantillons ont été prélevés de la couche superficielle du sol (0-20 cm) et transportés dans des sachets en plastique stériles et conservés à 4°C.

2.8.3.1. Isolement et purification des rhizobactéries

Le sol rhizosphérique des plantules du riz de l'horizon 0 – 20 cm, a été récupéré. Deux gramme de chaque échantillon du sol rhizosphérique a été suspendu dans 18ml de solution saline stérile à 0.9% (poids/volume). Les solutions ont été mises en agitation pendant 1h (200 rpm, 28°C). Un échantillon de 1ml de chaque solution obtenue a été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} . Chaque dilution a été utilisée pour inoculer des boîtes de TSA. Les boîtes ont été incubées à 28°C. Après la croissance des colonies, ces dernières ont été purifiées sur le même milieu TSA.

2.8.3.2. Sélection des BSP

En se basant sur les résultats de solubilisation de différentes sources de P inorganique, et choisissant les milieu ayant donnés des diamètres importants de solubilisation pour les 4 bactéries utilisées dans le champ: PP22, ER76, GR70 et PR29, la sélection des nouvelles BSP

a été faite sur le milieu PVK solide qui contient comme seule source de P 5 g/l de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ et de CaHPO_4 et aussi sur le milieu NBRIP solide contenant $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, suivant le même protocole appliqué auparavant pour la sélection des BSP. Après 7 jours de croissance, les résultats ont été notés soit (+) ou (-) selon la présence ou l'absence des halos de solubilisation à l'entourage des colonies.

2.8.3.3. Comparaison des profils BOX-PCR

Afin d'évaluer la diversité génétique des nouvelles BSP et de les comparer aux isolats utilisés dans l'inoculation du champ, on s'est basé sur la caractérisation par une rep PCR utilisant l'amorce BOXA1R.

2.8.3.3.1. Extraction d'ADN génomique

Après la sélection des BSP présentes dans la rhizosphère des plantules du riz, on a procédé à l'extraction d'ADN génomique de ces bactéries de la même manière citée auparavant.

2.8.3.3.2. Amplification d'élément BoxA: BOX-PCR

Afin de comparer les isolats obtenus à partir du champ et les 4 bactéries utilisées dans l'inoculation de la rizière, on a procédé à les différencier génétiquement. Des parties non codantes au niveau de l'ADNr ont été amplifiées en utilisant l'amorce BOXA1R (3'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-5'). Le mélange réactionnel de PCR a été de 20 μl (Tableau 3).

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel pour la BOX-PCR

Élément du mélange	Volume de prise (μl)
Tampon PCR (1X)	2 μl
dNTP (0.2 mM)	0.4 μl
Amorce BOX (0.2 μM)	0.4 μl
<i>Taq</i> polymérase (0.1 U)	0.1 μl
Eau	16.5 μl
ADN	1 μl

Le mélange réactionnel est incubé dans un thermocycleur selon le programme suivant:

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 9 min
 - Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 1 min
 - Hybridation de l'amorce à 52°C pendant 1 min
 - Extension de l'amorce à 72°C pendant 5 min
 - Elongation finale à 72°C pendant 10 min
- } 35 cycles

Un volume de 10 µl du produit PCR additionné de 2 µl du tampon de charge a été déposé dans le gel d'agarose horizontal à 0,8% contenant de bromure d'éthidium (1 µg/ml). La migration a été réalisée dans le tampon TAE 0,5X, à 100 V pendant 30 min. Le marqueur 1 kb a été utilisé comme marqueur de taille. Après la migration, les bandes sont visualisées sous les UV (260 nm). Par la suite, les photos du gel ont été prises avec l'appareil de capture d'image Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

2.8.4. Effet d'inoculation du riz sous les conditions du champ

Afin d'évaluer l'effet de l'inoculation avec les 4 bactéries choisies sur le riz dans les conditions du champ, des mesures de rendement concernant la production et des paramètres industriels tels que la qualité du produit ainsi que la pureté du produit agricole, ont été notés après la récolte en Octobre 2011. Les 3 paramètres évalués sont:

- La production : le paramètre de production a été mesuré en pesant le produit issu d'une surface de 3 m² puis la production totale a été estimée pour toute la parcelle ;
- La qualité du riz : 100 g de graines du riz a été pris au hasard pour compter : les graines intactes, brisées et qui contiennent des taches noires ou blanchâtres ;
- L'impureté du riz : c'est un paramètre qui mesure la saleté menée par le grain tel que la paille et les feuilles. Ce critère est pris en considération pendant le stockage du produit.

2.9. Analyses statistiques

Les différents tests *in vitro* des activités PGP ont été réalisés en triplicata, à l'exception de celles correspondant au test d'antagonisme.

L'ensemble des résultats a été analysé à l'aide du programme de statistique STATGRAPHICS Plus 4.0, et notamment par l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test du LSD protégé de Fisher dont le seuil d'erreur $p < 0.05$.

Chapitre III
RESULTATS

1. ISOLEMENT ET SELECTION DES BSP

1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols des rizières

Les BSP ont été isolées à partir de la rhizosphère de huit légumineuses naturelles collectées du Nord du Maroc et de trois variétés du riz cultivées dans la région de Larache, et dont les caractéristiques physico-chimiques des sols de ces rizières sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des sols de culture de riz à Larache

Sols	S367	S212	S508	S414
Granulométrie %				
Argile	62	75	38	45
Limon	33	20	33	35
Sable	5	5	29	20
pH _{H2O}	8.05	8.10	8.24	7.95
CE (µS/cm)	284	560	262	254
MO %	2.58	2.97	1.66	1.97
N mg/kg	2045	2297.20	1242.20	1420.20
C/N	7.30	7.49	7.74	8.05
Bases échangeables meq/100g				
Ca	33.10	31.13	21.32	21.85
Mg	2.18	4.09	1.88	2.19
K	0.62	0.59	0.34	0.47
Na	1.17	3.35	0.72	0.82
CEC	22.10	19.67	16.45	15.62
CaCO ₃ actif %	4.7	4.2	4.2	4.8
Fer mg/kg	369.39	885.83	82.36	272.83
Manganèse mg/kg	340.15	245.38	199.05	232.44
Cuivre mg/kg	7.52	10.61	<2.50	5.91
Zinc mg/kg	6.56	7.15	3.41	5
Bore mg/kg	1.36	1.98	0.98	1.5
P µg/g sol	25.25	28.49	26.57	21.79

Notre choix s'est porté sur quatre sols de la riziculture de Larache. Ce sont des sols argileux avec des pH basiques. Le calcaire actif est moins représenté, donc la disponibilité des autres éléments ne sera pas affectée. La mesure de la salinité montre que seul le sol S212 est salin avec une conductivité électrique de 560 µS/cm par comparaison aux autres sols.

La matière organique est bien représentée pour tous les sols; le rapport C/N est bas (de l'ordre de 8) indiquant une bonne activité biologique.

Le complexe absorbant saturé en calcium avec une très forte dominance du calcium échangeable (entre 21.32 et 33.10) sur les autres cations. D'autre part, les teneurs en éléments métalliques sont élevées à l'exception de zinc qui présente des traces.

Enfin, ce sont des sols présentant une richesse moyenne en phosphore extractible par la méthode OLSEN (Tableau 4).

1.2. Isolement et sélection des BSP

Nous avons obtenu 701 isolats dont 113 ont été isolés de la rhizosphère des légumineuses naturelles en utilisant le milieu TSA, et 588 issus à partir de la rhizosphère des trois variétés du riz, avec 283 bactéries isolées en utilisant le milieu King B sélectif pour les bactéries du genre *Pseudomonas*.

L'ensemble de ces rhizobactéries ont été testées pour leur pouvoir solubilisateur de phosphate inorganique. Les bactéries dissolvant le phosphate tricalcique, ou les BSP, s'entourent sur milieu PVK solide par des halos transparents indiquant la dégradation de phosphate tricalcique insoluble incorporé au milieu comme seule source de P (Figure 2).

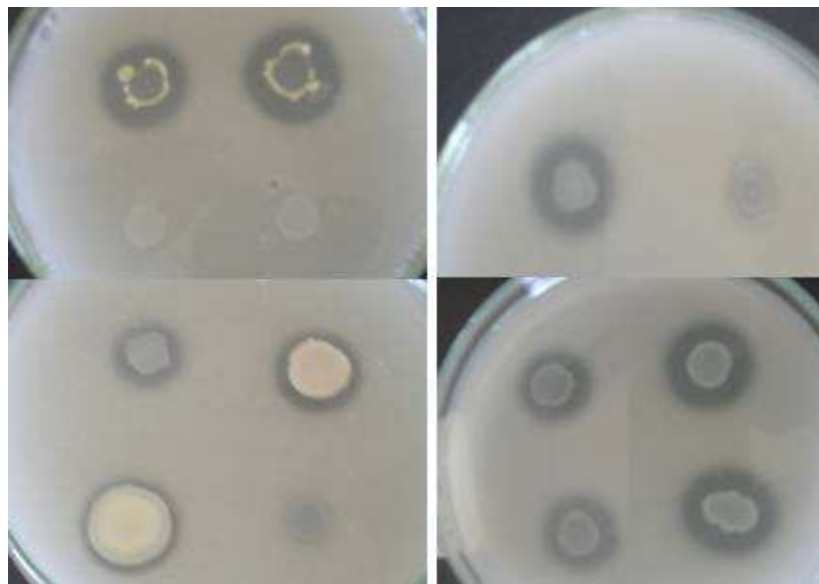


Figure 2 : Test qualitatif de solubilisation de phosphate tricalcique sur PVK solide montrant les halos de solubilisation donnés par certaines BSP.

Tous les sols rhizosphériques évalués pendant cette étude renferment des BSP. En effet, un total de 392 isolats (56%) (Figure 3) ont été capables de solubiliser le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dans le

milieu PVK solide en donnant différents diamètres de solubilisation arrivant jusqu'à 1.2cm. En prenant en compte les milieux d'isolement, sur les 392 bactéries sélectionnées, 50% ont été issues du TSA et 50% du King B (Figure 3).

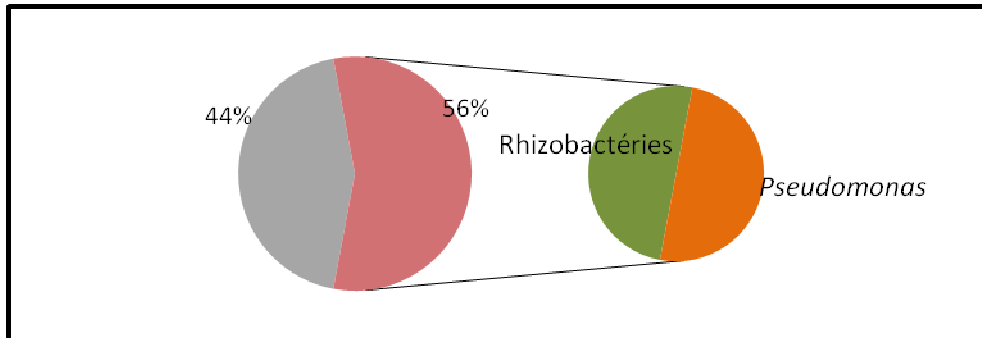


Figure 3 : Nombre total des BSP obtenues à partir de la rhizosphère du riz et des légumineuses naturelles.

Vu que le diamètre des halos de solubilisation est proportionnel à l'efficacité des bactéries pour la solubilisation de phosphate inorganique, on s'est basé sur le diamètre des halos qui doit être égal au moins à 0.4 cm, pour la sélection des isolats les plus performants afin de poursuivre d'autres tests. Ainsi, le nombre de bactéries solubilisant efficacement le phosphate tricalcique a été réduit à 123 isolats (Tableau 5).

Tableau 5 : Isolats sélectionnés en se basant sur le diamètre des halos de solubilisation.

Origine d'isolat	Légumineuses					Riz		
	Lcr	Vs	La	Ll	Lh	E	P	G
Nombre des isolats sur King B	0	0	0	0	0	28	27	18
Nombre des isolats sur TSA	5	9	6	1	14	2	6	7

Lcr : *Lotus creticus* ; Vs : *Vicia sativa* ; La : *Lupinus angustifolius* ; Ll : *Lupinus luteus*, Lh : *Lupinus hirsitus*. E: Elio, P: Puntal, G: Guadiamar.

Comme la plante modèle choisie pour le test d'inoculation est le riz, une proportion importante de ces bactéries a été consacrée aux isolats issus du riz. En effet, 72% des isolats retenus proviennent des 3 variétés : Elio, Puntal ou Guadiamar (Tableau 5).

En tenant compte du milieu d'isolement, les bactéries considérées comme étant du genre *Pseudomonas* ont été les majoritaires avec un pourcentage de 59% (Tableau 5). Quant aux

isolats originaires de la rhizosphère des légumineuses naturelles, le nombre le plus élevé des BSP a été obtenu pour *Lupinus hirsitus* (14 isolats) (Tableau 5).

2. DETERMINATION *IN VITRO* DES ACTIVITES PGP

2.1. Production d'acide indole acétique (AIA)

Dans le but de sélectionner les isolats ayant des activités de stimulation de la croissance végétale, on s'est intéressé à l'une des phytohormones que les rhizobactéries peuvent produire, l'acide indole acétique (AIA) qui appartient aux auxines physiologiquement les plus actives et qui affecte fortement le développement des plantes. Dans ce but, on a testé qualitativement la production de cette phytohormone par les bactéries dans le milieu TSA renfermant le tryptophane comme précurseur d'AIA.

Ce test qualitatif de production d'AIA nous a permis de trier les bactéries qui ont été cernées avec un halo rosâtre quand la membrane de nitrocellulose a été mise en contact avec le réactif de Salkowski (Figure 4).

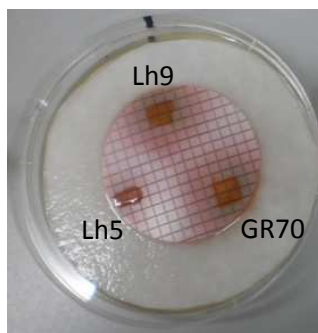


Figure 4 : Test qualitatif de production d'AIA montrant trois colonies de bactéries, GR70, Lh9 et Lh5, sur la membrane de nitrocellulose, entourées par des halos rosâtres de différents diamètres.

Sur les 123 isolats évalués, 11 bactéries (9%) ont été capables de produire de l'AIA. Parmi les bactéries issues du riz, 6 isolats sont AIA positives, appartenant soit à la variété Puntal ou Guadiamar, tandis que les 5 isolats restants sont issus de *Lupinus hirsitus*.

Quant aux isolats issus du milieu King B, aucune bactérie n'a produit cette phytohormone (Tableau 6).

Tableau 6 : Isolats capables de produire de l'AIA

Origine d'isolat	Légumineuses					Riz		
	Lcr	Vs	La	Ll	Lh	E	P	G
Nombre des isolats sélectionnés	5	9	6	1	14	30	33	25
Nombre des bactéries capables de produire l'AIA	0	0	0	0	5	0	2	4

Lcr : *Lotus creticus* ; Vs : *Vicia sativa* ; La : *Lupinus angustifolius* ; Ll : *Lupinus luteus*, Lh : *Lupinus hirsitus*. E: Elio, P: Puntal, G: Guadiamar.

2.2. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La production de l'HCN est une autre activité PGP recherchée chez les rhizobactéries triées et qui est liée surtout au biocontrôle des plantes. Un pourcentage de 8% des 123 bactéries choisies ont été capables de produire ce gaz. Elles sont toutes issues de la rhizosphère du riz. Alors que les isolats de légumineuses naturelles n'ont pas cette activité (Tableau 7).

Tableau 7 : Isolats capables de produire de l'HCN

Origine d'isolat	Légumineuses					Riz		
	Lcr	Vs	La	Ll	Lh	E	P	G
Isolats sélectionnés	5	9	6	1	14	30	33	25
Bactéries capables de produire l'HCN	0	0	0	0	0	6	2	2

Lcr : *Lotus creticus* ; Vs : *Vicia sativa* ; La : *Lupinus angustifolius* ; Ll : *Lupinus luteus*, Lh : *Lupinus hirsitus*. E: Elio, P: Puntal, G: Guadiamar.

Selon les résultats de l'AIA et l'HCN et aussi l'importance du diamètre des halos de solubilisation équivalent au moins à 0.7cm, on a sélectionné 41 isolats pour la poursuite des tests, avec 14 isolats sont issus de la rhizosphère de deux légumineuses ; *Lupinus luteus* et *Lupinus hirsitus*, et 27 isolats issus de la rhizosphère du riz.

2.3. Production des sidérophores

Vue l'importance du fer pour la nutrition et la protection des plantes, la production des sidérophores qui sont des molécules d'une grande affinité aux ions du fer (Fe^{3+}), a été évaluée aussi comme activité PGP surtout pour le biocontrôle.

Tableau 8 : Isolats capables de produire des sidérophores

Origine d'isolement	Légumineuses		Riz		
	Ll	Lh	E	P	G
Isolats sélectionnés	1	13	8	13	6
Bactéries capables de produire des sidérophores	0	0	8	12	6

Ll: *Lupinus luteus*, Lh : *Lupinus hirsitus*. E: Elio, P: Puntal, G: Guadamar.

Sur les 41 isolats triés selon les résultats de diamètre de solubilisation, d'AIA et d'HCN, 26 bactéries sont arrivées à chélater le fer en produisant des sidérophores dans le milieu CAS utilisé pour la détection de ces métabolites (Tableau 8). Aucune souche issue de *L. hirsitus* ou *L. luteus* n'a donnée l'halo orange caractérisant la production des sidérophores sur le milieu CAS (Tableau 8).

En conclusion, et selon les résultats précédents, on a trié 25 isolats pour la poursuite des expérimentations. Ces isolats sont soit positifs pour l'AIA ou pour l'HCN, ou capables de produire les sidérophores (tableau 9).

La coloration Gram a montré que toutes les 25 bactéries sont des bacilles Gram (-).

Le tableau 9 récapitule les différentes souches triées en récapitulant les résultats obtenus concernant les premiers caractères PGP de triage ; La production d'AIA, d'HCN et des sidérophores.

Tableau 9 : Diamètre des halos de solubilisation de P, production d'AIA, d'HCN et des sidérophores.

Isolats	Halos (cm)	AIA	HCN	Sidérophores	Gram
Lh10	0.9 (± 0.2)	+	-	-	-
Lh9	0.8 (± 0.1)	+	-	-	-
Lh5	0.7 (± 0.1)	+	-	-	-
Lh66	0.8 (± 0.15)	+	-	-	-
Lh71	0.6 (± 0.12)	+	-	-	-
PP7	1.1 (± 0.12)	-	+	+	-
PP14	0.9 (± 0.15)	-	+	+	-
PP17	0.7 (± 0.2)	-	-	+	-
EP15	1.2 (± 0.15)	-	+	+	-
PP31	1 (± 0.15)	-	-	+	-
PP16	1 (± 0.12)	-	-	+	-
PP22	0.9 (± 0.21)	-	-	+	-
ER66	0.4 (± 0.06)	-	+	+	-
ER68	0.6 (± 0.06)	-	+	+	-
ER76	0.8 (± 0.15)	-	+	+	-
ER77	0.5 (± 0.06)	-	+	+	-
ER85	0.6 (± 0.1)	-	+	+	-
GR70	0.9 (± 0.21)	+	-	+	-
GR1	0.6 (± 0.15)	-	+	+	-
GR18	1.1 (± 0.12)	+	-	+	-
GR46	0.5 (± 0.12)	+	-	+	-
GR55	0.4 (± 0.1)	+	-	+	-
GP70	0.8 (± 0.15)	-	+	+	-
PR66	0.4 (± 0.1)	+	-	-	-
PR29	0.7 (± 0.15)	+	-	+	-

Les BSP sont indiquées soit par les initiations de légumineuse, Lh pour *Lupinus hirsitus*, soit par deux lettres pour celles obtenues du riz, la 1ère lettre c'est P (Puntal), G (Guadiamar) ou E (Elio), suivi par la 2ème lettre, P (Isolats obtenus sur milieu King B) ou R (Isolats obtenus sur milieu TSA) (Tableau 9).

2.4. Solubilisation des autres sources de P inorganique

La sélection classique des BSP se fait dans des milieux de culture renfermant le phosphate calcique. Or, dans les sols acides, le P soluble est rapidement précipité par les cations du sol, Fe^{3+} et Al^{3+} en donnant des complexes insolubles. De ce fait, on a remplacé le phosphate tricalcique par d'autres sources de P inorganique communément présentes dans les deux types du sol, acide et alcalin.

Les résultats obtenus montrent que la majorité des bactéries testées s'entouraient des halos de solubilisation dans les boîtes renfermant des autres sources de phosphate calcique (Figure 5). L'importance des diamètres des halos diffèrent d'un milieu à l'autre pour la même bactérie. Les halos ont été plus clairs sur le milieu PVK contenant CaHPO_4 comme source de P insoluble (Figure 5).

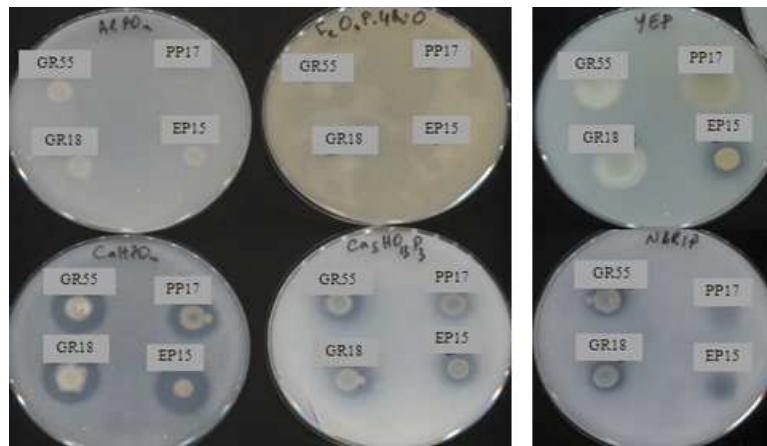


Figure 5 : Halos de solubilisation formés en solubilisant les différentes sources de P inorganique.

Les résultats présentés dans le tableau 10 montrent que les bactéries ont été capables de solubiliser les autres sources de P minéral qui ont substitué le phosphate tricalcique dans le milieu PVK. En effet et à part ER66 et GR70, des halos de solubilisation ont été observés autour de 23 bactéries dans les boîtes renfermant $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ et CaHPO_4 comme source de P. Tandis qu'elles sont toutes incapables de dissoudre le phosphate du fer et d'aluminium (Tableau 10, Figure 5).

Tableau 10 : Solubilisation des autres sources de P inorganique et évaluation des autres milieux de base utilisés pour la sélection des BSP (NBRIP, YED-P).

Isolats	PVK modifié				NBRIP	YED-P
	CaHPO ₄	Ca ₅ HO ₁₃ P ₃	FePO ₄	AlPO ₄		
Lh10	+	+	-	-	+	+
Lh9	+	+	-	-	+	+
Lh5	+	+	-	-	+	+
Lh66	+	+	-	-	+	+
Lh71	+	+	-	-	+	-
PP7	+	+	-	-	+	+
PP14	+	+	-	-	+	+
PP17	+	+	-	-	+	-
EP15	+	+	-	-	+	+
PP31	+	+	-	-	+	+
PP16	+	+	-	-	-	+
PP22	+	+	-	-	+	-
ER66	-	-	-	-	-	+
ER68	+	+	-	-	+	+
ER76	+	+	-	-	+	+
ER77	+	+	-	-	+	+
ER85	+	+	-	-	+	+
GR70	-	-	-	-	+	-
GR1	+	+	-	-	+	+
GR18	+	+	-	-	+	-
GR46	+	+	-	-	+	-
GR55	+	+	-	-	+	-
GP70	+	+	-	-	+	-
PR66	+	+	-	-	+	+
PR29	+	+	-	-	+	-

Quant aux deux milieux, NBRIP et YED, qui renferment le phosphate tricalcique comme source de P, certaines souches, PP16, ER66, Lh71, PP17, PP22, GR70, GR18, GR46, GR55, GP70 et PR29, ne sont pas arrivées à dissoudre le phosphate tricalcique quand on a changé le milieu de base, PVK, par NBRIP et YED, malgré qu'elles avaient été isolées auparavant sur cette activité en utilisant le milieu PVK comme milieu de base (Tableau 10).

En outre, la préférence a été pour le milieu NBRIP. En effet, 92% des bactéries ont été capables de dissoudre le P insoluble présent dans le milieu NBRIP, alors que juste 64% des bactéries ont donné des halos de solubilisation sur le milieu YED-P. Ce qui montre l'influence de certains composés et leurs concentrations dans les milieux de culture utilisés pour la sélection de BSP sur l'activité solubilisatrice de phosphate inorganique.

2.5. Utilisation des différentes sources d'azote (N)

2.5.1. Fixation libre d'azote

Parmi les processus microbiens dont les PGPR peuvent améliorer la nutrition azotée, la fixation libre d'azote atmosphérique. Suite au dosage par la chromatographie en phase gazeuse d'éthylène qui est proportionnel à la quantité d'azote atmosphérique fixé, aucune des vingt-cinq souches retenues ne possède cette activité nitrogénase.

2.5.2. Dégradation d'urée

En se basant sur le changement de coloration du milieu de culture grâce à l'indicateur du pH, le rouge de phénol, un total de cinq bactéries, Lh9, Lh10, Lh5, Lh71 et GR18, sont arrivées à hydrolyser l'urée en donnant des halos rosâtres à l'entourage des colonies (Figure 6).



Figure 6 : Test de dégradation d'urée : l'halo rosâtre causé par l'alcalinisation du milieu présente la réaction positive par la souche AMG113 (Contrôle positif).

2.6. Détection d'activité ACC désaminase

Pour détecter cette activité, on a évalué la croissance des bactéries testées dans le milieu M9 qui renferme l'ACC, le substrat d'enzyme ACC désaminase, comme seule source d'azote (Figure 7).

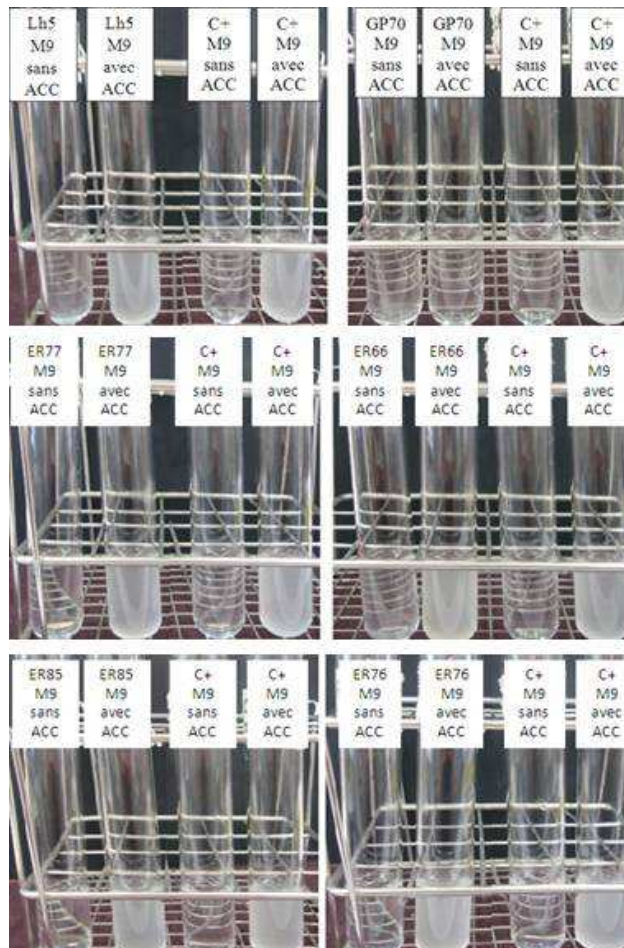


Figure 7 : Test de dégradation d'ACC : La souche GP70 montre une réaction négative, le reste des bactéries montre une réaction positive.

La comparaison des résultats obtenus par rapport au témoin positif (CKB1), montre que les bactéries, ER85, ER68, ER76, ER66, ER77 et Lh5, ont été capables de dégrader l'ACC et l'utiliser comme source d'azote grâce à l'enzyme ACC désaminase (Figure 7, Tableau 11).

2.7. Détection d'AHL

Les molécules N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) jouent un rôle primordial dans le dialogue moléculaire chez les populations bactériennes. Afin de mettre en évidence ce phénomène, on a utilisé la souche *A. tumefaciens* NT1 comme bio-indicateur, et la coloration du milieu en bleu autour des puits contenant le surnageant de cultures fraîches des bactéries retenues, indique la production d'AHL.

Les résultats trouvés indiquent que 64% d'isolats ont cette propriété (Tableau 11). La concentration d'AHL produit diffère d'une bactérie à l'autre vue le diamètre des halos à l'entourage des puits.

Tableau 11 : Tableau récapitulant les résultats des tests de fixation libre d'azote, dégradation d'urée, d'ACC désaminase et de production d'AHL pour les 25 isolats retenus.

Isolats	Fixation de N	Uréase	ACC désaminase	AHL
Lh10	-	+	-	+
Lh9	-	+	-	+
Lh5	-	+	+	-
Lh66	-	-	-	+
Lh71	-	+	-	-
PP7	-	-	-	+
PP14	-	-	-	+
PP17	-	-	-	+
EP15	-	-	-	+
PP31	-	-	-	-
PP16	-	-	-	+
PP22	-	-	-	+
ER66	-	-	+	+
ER68	-	-	+	+
ER76	-	-	+	+
ER77	-	-	+	+
ER85	-	-	+	+
GR70	-	-	-	+
GR1	-	-	-	-
GR18	-	+	-	-
GR46	-	-	-	-
GR55	-	-	-	-
GP70	-	-	-	-
PR66	-	-	-	+
PR29	-	-	-	-

2.8. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires (chitinase, amylase, cellulase, lipolyse, protéolyse)

Quant aux différentes activités enzymatiques, les isolats ayant ces enzymes hydrolytiques, s'entouraient avec des halos transparents ou de couleur différente du milieu de culture. Des exemples d'hydrolyse de différents substrats par les enzymes recherchés sont présentés dans la figure 8.

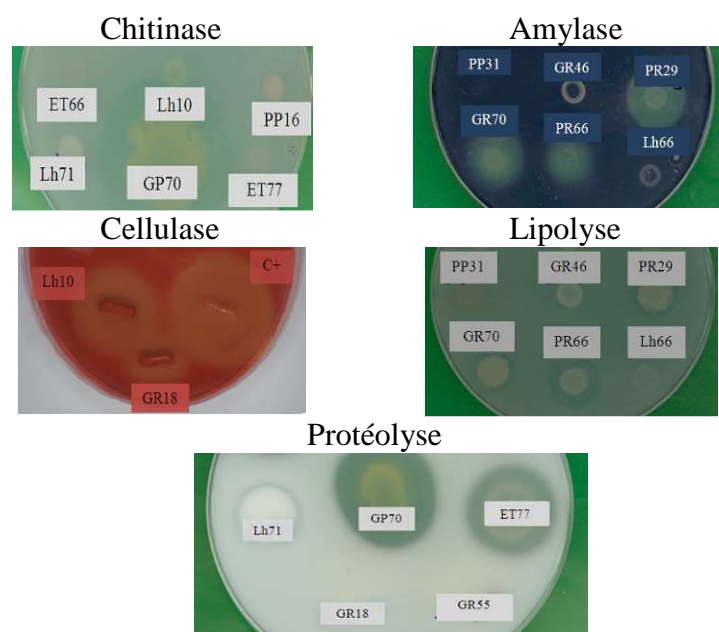


Figure 8 : Différentes activités hydrolytiques des bactéries étudiées

Sur les vingt-cinq bactéries étudiées, 9 isolats n'ont aucune de ces activités recherchées (Tableau 12). Alors que 64% d'isolats ont au moins une activité hydrolytique. La protéase est l'activité la plus abondante au sein des isolats.

Les bactéries GR70, PR66, PR29 sont les isolats ayant plus d'activités enzymatiques. En effet, ces trois souches possèdent quatre activités hydrolytiques, chitinolytique, amylique, lipolytique et protéolytique.

Quant à l'activité cellulolytique, les quatre bactéries, Lh10, Lh9, Lh66 et GR18, seulement ont été capables de dégrader le carboxyméthylcellulose.

Tableau 12: Tableau récapitulant les résultats d'activités hydrolytiques extracellulaires pour les 25 isolats retenus.

Isolats	Chitinase	Amylase	Cellulase	Lipolyse	Protéolyse
Lh10	-	-	+	-	+
Lh9	-	-	+	-	+
Lh5	-	-	-	-	+
Lh66	-	-	+	-	-
Lh71	-	-	-	-	+
PP7	-	-	-	-	-
PP14	-	-	-	-	-
PP17	-	-	-	-	-
EP15	-	-	-	-	-
PP31	-	-	-	-	-
PP16	-	-	-	-	+
PP22	-	-	-	-	-
ER66	-	-	-	-	+
ER68	-	-	-	-	+
ER76	-	-	-	-	+
ER77	-	-	-	-	+
ER85	-	-	-	-	+
GR70	+	+	-	+	+
GR1	-	-	-	-	-
GR18	-	-	+	-	-
GR46	-	-	-	-	-
GR55	-	-	-	-	-
GP70	+	-	-	+	+
PR66	+	+	-	+	+
PR29	+	+	-	+	+

3. SELECTION DES BSP POUR LA POURSUITE DES TESTS

Les membranes des bactéries Gram négatives sont constituées sur la face interne de phospholipides et de lipoprotéines, et sur la couche externe de polysaccharides dont les lipopolysaccharides (LPS) en font partie. La composition de ces LPSs diffèrent d'une souche à l'autre. En conséquence, chaque souche possède son propre profil électrophorétique de LPS issu suite à la technique SDS-PAGE. Ainsi, pour différencier entre les 25 souches, on s'est procédé à la comparaison des profils LPS.

Après le traitement des gels d'acrylamide avec le nitrate d'argent, les polysaccharides de surface sont colorés en jaune en partie lipidique des LPS. On obtient par la suite nombreuses bandes situées à différents niveaux suite à la différenciation de leur composition (Figure 9). Et en se basant sur les différents profils LPS obtenus, on a observé une hétérogénéité au sein des isolats retenus.

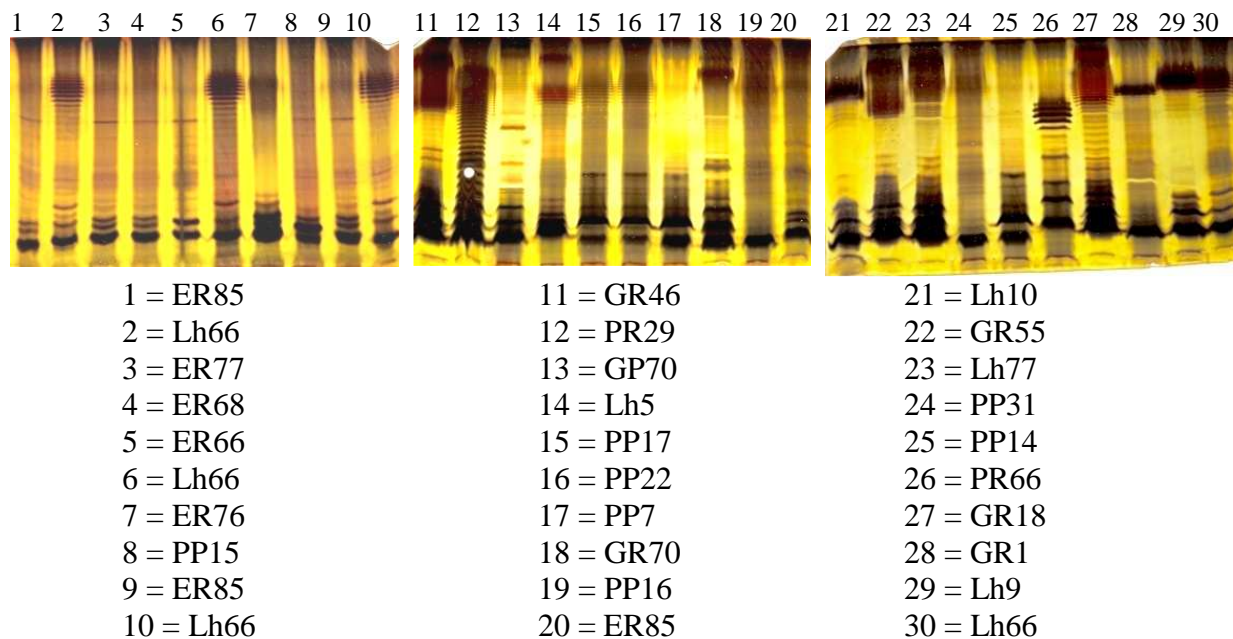


Figure 9: Différents profils électrophorétiques des LPSs sur gel de polyacrylamide obtenus

Toutefois, certaines bactéries partagent le même profil LPS. En effet, concernant les isolats issus de *L. hirsutus*, les deux bactéries Lh9 et Lh10 ont même composition de LPS.

Quant aux isolats du riz, le profil obtenu pour la bactérie PP14 est identique à celui de la bactérie PP7. De même pour les deux bactéries isolées de la variété Guadiamar, GR46 et GR55. Les mêmes résultats ont été notés aussi concernant certaines souches originaires de la

variété Elio. Les trois bactéries ER85, ER68 et ER77, ont données des profils semblables (Figure 9).

En conséquence et suite aux différentes activités PGP évaluées auparavant, on a éliminé les isolats suivants : Lh9, PP14, GR46, ER85 et ER68. Pour la suite des tests, on a gardé alors 20 bactéries.

4. RCHERCHE *IN VITRO* DES AUTRES ACTIVITES PGP

4.1. Dosage de phosphore solubilisé

On a procédé au dosage de P solubilisé selon la méthode d'Ames. Les concentrations de P solubilisé obtenues après 7 jours d'incubation ainsi que les valeurs du pH final des milieux de culture ont été notées (Figure 10).

Les concentrations de P obtenues ont oscillé entre 608.28 mg/l et 70.98 mg/l solubilisées par ER76 et PP7 respectivement. On n'a pas trouvé une corrélation significative entre l'activité solubilisatrice dans le milieu solide et liquide ($r = -0.66$, $p \geq 0.10$). En effet, la souche PP7 a donné un diamètre de solubilisation important dans le milieu PVK solide (1.1 cm), alors qu'elle a solubilisé moins de P en donnant la concentration la plus basse (70.98 mg/l) en comparaison avec le reste des isolats. Tandis que les deux souches ER77 et ER66, se sont montrées moins efficaces dans le test qualitatif que le test quantitatif. En effet, elles ont donné les diamètres les plus bas dans le milieu PVK solide (0.5 et 0.4 cm respectivement), toutefois elles ont donné des concentrations importantes de P solubilisé, 339.39 et 131.17 mg/l respectivement.

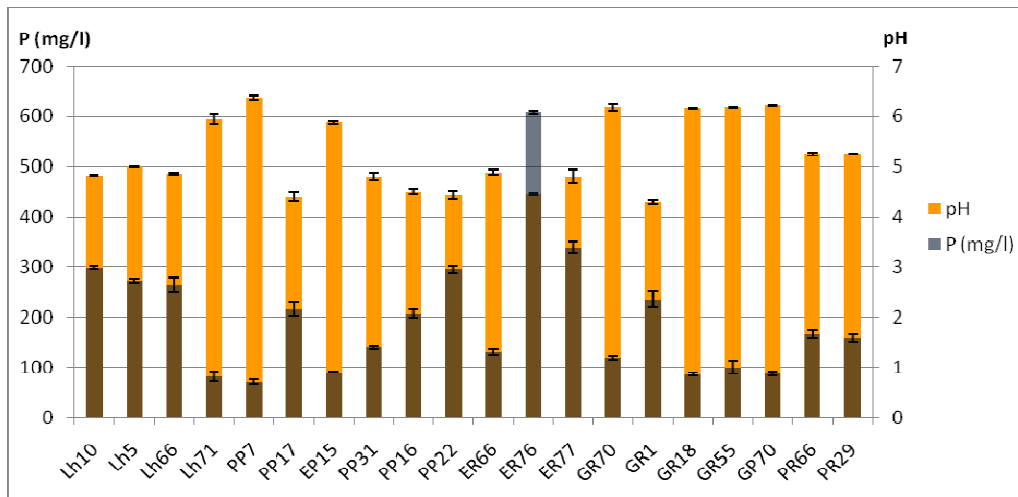


Figure 10 : Concentrations de P solubilisé par les vingt souches après 7 jours d'incubation et les valeurs du pH final des milieux de culture.

Quant au pH final des milieux de culture, une acidification a accompagné la biosolubilisation de P minéral en comparaison avec le pH du milieu non inoculé (témoin) ayant un pH 6.72 (Figure 10). La valeur de pH arrive jusqu'à 4.3 en présence de GR1, et la valeur de pH la moins acide a été de 6.38 obtenue par la bactérie PP7 qui a donné la concentration la plus faible de P solubilisé (Tableau 13).

En effet, une corrélation significative a été trouvée entre la quantité de P solubilisé et le pH du milieu de culture ($r = -0,68$, $p < 0.01$) indiquant une relation négative entre les deux paramètres. Cette relation inversée entre le pH et la concentration de P solubilisé indique le rôle significatif d'acidification du milieu dans le processus de solubilisation de P par les bactéries.

4.2. Quantification d'AIA

Vue l'importance de l'AIA sur la croissance de la plante et la sensibilité des racines vis-à-vis de concentration de cette phytohormone, on a quantifié l'AIA produit par chaque souche. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 10 et le tableau 13.

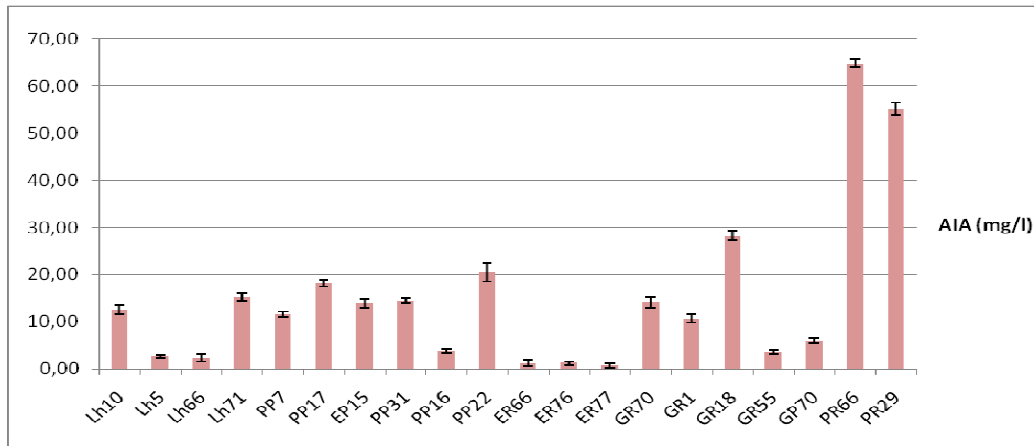


Figure 11 : Concentrations d'AIA produit par les vingt souches retenues.

Selon la figure 11, les bactéries testées ont été toutes capables de produire de l'AIA. Les concentrations obtenues se différencient d'une souche à l'autre (Figure 11). Les valeurs les plus élevées ont été synthétisées par PR66 et PR29 en produisant 64.85 et 55.09 mg/l respectivement (Tableau 13). Alors que les valeurs les plus faibles ont été synthétisées par les trois bactéries, ER77, ER66 et ER76 en produisant respectivement 0.68, 1.20 et 1.22 mg/l d'AIA.

En plus, certaines souches de *Pseudomonas*, PP22, PP17, PP31, PP7, PP16, EP15 et GP70 ont produit des valeurs plus ou moins importantes d'AIA malgré que le test qualitatif d'AIA ait été négatif (Tableau 9). Et les souches les plus efficaces ont été PP22 et PP17 en produisant respectivement 20.46 et 18.14 mg/l (Figure 11 ; Tableau 13).

Quant aux souches obtenues de *Lupinus hirsitus*, elles ont produit des valeurs différentes de cette phytohormone. Ainsi, les concentrations d'AIA synthétisées par ces souches ont oscillé entre 15.26 et 2.38 mg/l, données respectivement par Lh71 et Lh66.

Tableau 13 : Concentration de P solubilisé, le pH final du milieu de culture après 7 jours d'incubation et la concentration d'AIA produit par les vingt bactéries triées.

Isolats	P solubilisé (mg/l)	pH final	AIA (mg/l)
Lh10	298.66 j	4.83 cd	12.55 g
Lh5	272 i	5 d	2.81 cd
Lh66	264.31 i	4.87 cd	2.38 bc
Lh71	81.94 ab	5.95 f	15.26 h
PP7	70.98 a	6.38 h	11.52 fg
PP17	216.55 g	4.4 ab	18.14 i
EP15	91.1 bc	5.88 f	13.99 h
PP31	140.33 e	4.8 c	14.49 h
PP16	208.37 g	4.5 b	3.82 d
PP22	295.71 j	4.44 ab	20.46 j
ER66	131.17 de	4.89 cd	1.20 ab
ER76	608.28 l	4.46 ab	1.22 ab
ER77	339.39 k	4.81 c	0.68 a
GR70	119.56 d	6.18 g	14.12 h
GR1	235.69 h	4.3 a	10.66 f
GR18	85.87 b	6.15 g	28.29 k
GR55	100.59 c	6.18 g	3.60 cd
GP70	87.67 bc	6.23 gh	5.97 e
PR66	165.85 f	5.25 e	64.85 m
PR29	158.33 f	5.25 e	55.09 l

Les moyennes de même colonne suivies de même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de signification de 5%.

4.3. Antagonisme

En plus des activités stimulatrices de croissance évaluées auparavant, on s'est intéressé aussi à une évaluation directe d'effet d'antagonisme des bactéries retenues vis-à-vis de certains phytopathogènes (bactéries et champignons).

4.3.1. Contre des bactéries phytopathogènes

Les bactéries ayant un effet antagoniste sont entourées par des zones transparentes, non peuplées par les bactéries phytopathogènes, appelés les halos d'inhibition (Figure 12).

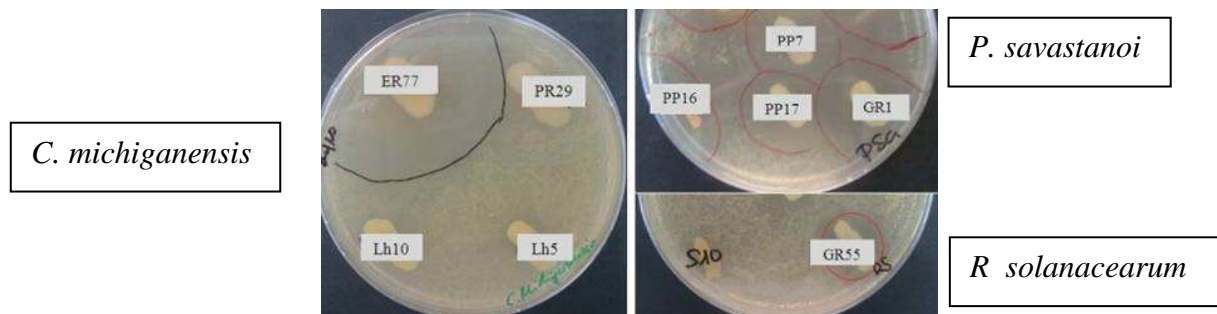


Figure 12 : Halos d'inhibition obtenus par certaines bactéries étudiées en présence des bactéries phytopathogènes (*Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas savastanoi* et *Ralstonia solanacearum*).

Les isolats exerçant une forte inhibition contre les bactéries phytopathogènes sont celles ayant données des halos d'inhibition dépassant les 5 mm. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Test d'antagonisme des souches étudiées vis-à-vis des bactéries phytopathogènes.

Isolats	<i>P. savastanoi</i>	<i>C. michiganensis</i>	<i>X. campestris</i> var. citri	<i>R. solanacearum</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>P. syringae</i>
Lh10	-	+/-	-	-	-	-
Lh5	-	+/-	-	-	-	-
Lh66	-	-	-	-	-	-
Lh71	-	-	-	+	-	-
PP7	++	+	-	+	-	-
PP17	++	+	-	+	-	-
EP15	+	+	+/-	-	-	+
PP31	-	+	-	-	-	-
PP16	++	+++	+	+	-	+/-
PP22	+/-	-	-	+	-	-
ER66	+	-	+	+/-	-	-
ER76	+/-	+	+	+	-	-
ER77	++	+++	+	+	+	+/-
GR70	+/-	-	-	+	-	-
GR1	++	+	-	+	-	-
GR18	-	+	-	+	-	-
GR55	-	+	-	++	-	-
GP70	+	+	+	+	+	+
PR66	-	-	-	-	-	-
PR29	-	+/-	-	+	-	-

- = aucune inhibition ; +/- = halos d'inhibition <2 mm ; + : <6 mm ; ++ : <18 mm ; +++ : >18 mm.

P. savastanoi = *Pseudomonas savastanoi* ; *C. michiganensis* = *Clavibacter michiganensis* ; *X. campestris* var. citri = *Xanthomonas campestris* variété citri ; *R. solanacearum* = *Ralstonia solanacearum* ; *E. amylovora* = *Erwinia amylovora* ; *P. syringae* = *Pseudomonas syringae*.

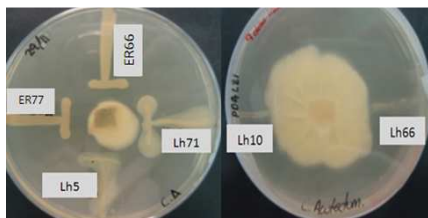
Parmi les bactéries étudiées, les six souches, PP16, PP17, GR1, ER77, GR55 et PP7, ont montré un fort effet antagoniste, particulièrement contre *P. savastanoi* et *C. michiganensis*. En plus, aucun des isolats issus de *L. hirsutus* n'a manifesté une inhibition considérable envers les bactéries phytopathogènes testées (Tableau 14).

Quant à l'agent phytopathogène *Ralstonia solanacearum*, elle a subi une inhibition plus ou moins importante par la majorité des bactéries retenues. Tandis que le reste des bactéries

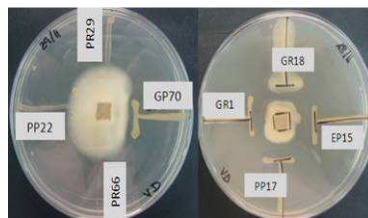
pathogènes, *X. campestris* var. *citri*, *E. amylovora* et *P. syringae*, a manifesté une forte résistance aux bactéries testées (Tableau 14).

4.3.2. Contre des champignons phytopathogènes

Concernant le test d'antagonisme réalisé contre des champignons phytopathogènes, on a remarqué deux types d'inhibition de croissance d'agent pathogène. Les champignons ont été inhibés soit immédiatement après leur contact direct avec les bactéries antagonistes (inhibition de contact), soit leur croissance a été bloquée avant même d'avoir un contact avec la bactérie antagoniste (inhibition à distance) (Figure 13).



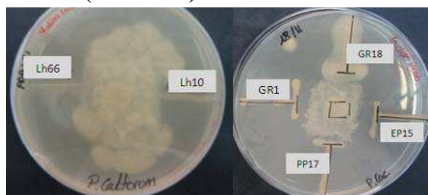
Vis-à-vis de *Colletotrichum acutatum*: Antagonisme de distance exercé par ER66 et ER77 (à gauche), et antagonisme de contact exercé par Lh5 (à gauche), Lh10 et Lh66 (à droite).



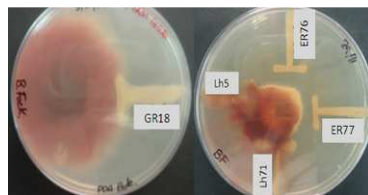
Vis-à-vis de *Verticillium dahliae*: Antagonisme de distance exercé par GP70 (à gauche), et par GR1, GR18, EP15 et PP17 (à droite).



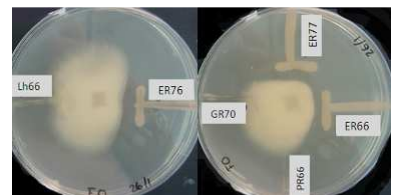
Vis-à-vis de *Phytophthora cinnamoni*: Antagonisme de distance exercé par ER66 (à gauche), et antagonisme de contact exercé par GP70 (à droite).



Vis-à-vis de *Phytophthora cactorum*: Antagonisme de contact exercé par Lh10 et Lh66 (à gauche), et par PP17 et GR18 (à droite), et antagonisme de distance exercé par GR1 et EP15 (à droite).



Vis-à-vis de *Botryotinia fuckeliana*: Antagonisme de contact exercé par GR18 (à gauche), et antagonisme de distance exercé par ER76 et ER77 (à droite).



Vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*: Antagonisme de contact exercé par Lh66 (à gauche), et antagonisme de distance exercé par ER76 (à gauche), et par ER77 et ER66 (à droite).

Figure 13 : Différents modes d'inhibition exercés par les bactéries étudiées vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

Les résultats du tableau 15 montrent qu'un pourcentage de 70% des bactéries évaluées a inhibé au moins un des six champignons à l'essai. En plus, certaines bactéries ont manifesté les deux types d'inhibition selon l'agent pathogène, telle que la souche Lh5 et PP16.

Néanmoins, certains isolats ont exercé le même mode d'inhibition contre les champignons phytopathogènes, telles que les bactéries GR1, ER66, ER76 et ER77 en réagissant à distance contre les six champignons phytopathogènes, et les deux bactéries Lh10 et Lh66 en inhibant les champignons par contact direct (Tableau 15).

Tableau 15 : Test d'antagonisme des souches étudiées vis-à-vis des champignons phytopathogènes et mode d'inhibition (Contact / Distance).

Isolats	<i>C. acutatum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>P. cinnamoni</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>B. fuckheliana</i>	<i>F. Oxysporum</i>
Lh10	+ (C)	-	-	+ (C)	-	-
Lh5	+ (C)	+ (D)	-	+ (C)	-	-
Lh66	+ (C)	-	-	+ (C)	-	+ (C)
Lh71	-	-	-	-	-	+ (C)
PP7	-	+ (D)	-	-	-	-
PP17	-	+ (D)	-	+ (C)	-	-
EP15	+ (D)	+ (D)	-	+ (D)	-	+ (C)
PP31	-	-	-	-	-	-
PP16	-	+ (D)	+ (D)	+ (D)	-	+ (C)
PP22	-	-	-	-	-	-
ER66	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)
ER76	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)
ER77	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)	+ (D)
GR70	-	+ (D)	-	+ (C)	-	-
GR1	-	+ (D)	-	+ (D)	-	-
GR18	-	+ (D)	-	+ (C)	+ (C)	+ (C)
GR55	-	-	-	-	-	-
GP70	-	+ (D)	+ (C)	+ (C)	+ (C)	+ (C)
PR66	-	-	-	-	-	-
PR29	-	-	-	-	-	-

D = Inhibition à distance ; C = Inhibition par contact.

C. acutatum = *Colletotrichum acutatum* ; *V. dahliae* = *Verticillium dahliae* ; *P. cactorum* = *Phytophthora cactorum* ; *P. cinnamoni* = *Phytophthora cinnamoni* ; *B. fuckheliana* = *Botryotinia fuckheliana* ; *F. oxysporum* = *Fusarium oxysporum*.

En plus, 15% de bactéries testées ont manifesté un large spectre d'action vis-à-vis des champignons phytopathogènes testés pendant cette étude (Figure 14). En effet, les trois bactéries ER77, ER66 et ER76 ont montré une inhibition contre tous les champignons testés, suivies par la bactérie GP70 (Figure 14).

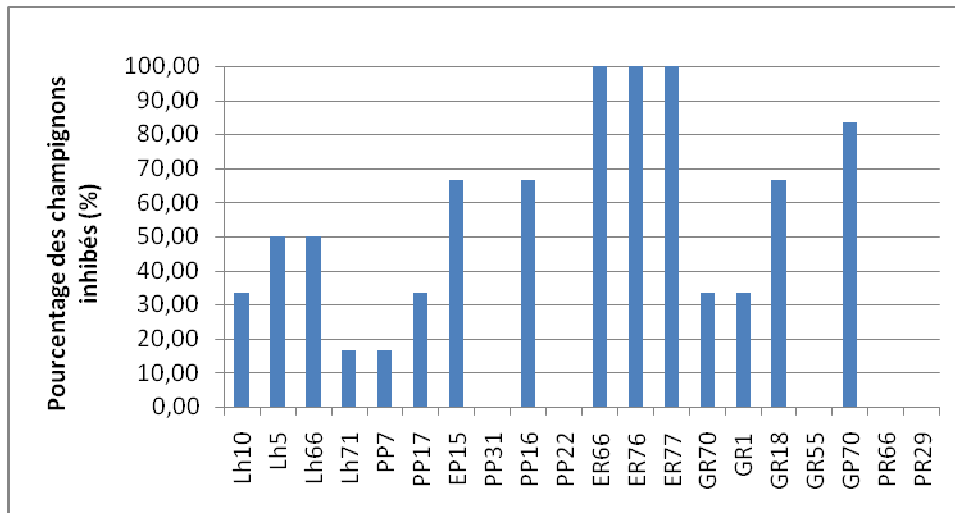


Figure 14 : Effet antagoniste des bactéries étudiées sur différents champignons phytopathogènes.

Cependant, certaines souches n'ont montré aucun effet antagoniste, comme c'est le cas des bactéries PP31, GR55, PP22, PR66 et PR29 qui ne sont pas arrivées à inhiber aucun de six champignons phytopathogènes testés (Figure 14).

5. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES BSP SELECTIONNEES

La diversité génétique des isolats a été examinée en se basant sur le séquençage du gène 16S de l'ADNr. Les BSP isolées pendant cette étude appartiennent à trois différents genres : *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Aeromonas* (Figure 15).

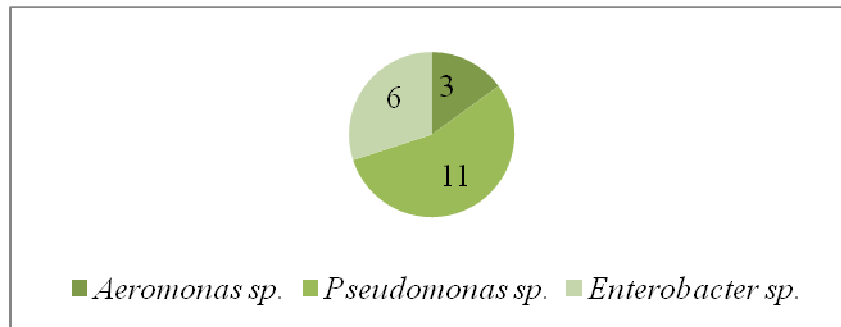


Figure 15 : Distribution des bactéries étudiées selon le genre suite à l'identification moléculaire.

En effet, en se basant sur un pourcentage de similitude de 97% ou plus (Tableau 16), onze bactéries sont plus proches aux *Pseudomonas spp.*, six souches ont été identifiées comme des *Enterobacter spp.*, alors que trois sont plus similaires à certaines espèces *Aeromonas spp.* (Tableau 16).

Tableau 16 : Identification moléculaire des vingt souches selon le séquençage de l'ADNr16S.

Isolats	Longueur du gène ADNr 16S séquéncé	Espèce le plus proche (Souche)	% d'identité
Lh10	999	<i>Enterobacter ludwigii</i> (EN-119 = DSMZ 16688 = CIP 108491)	98% (929/947)
Lh5	1014	<i>Enterobacter aerogenes</i> (JCM1235)	97% (975/1001)
Lh16	935	<i>Enterobacter amnigenus</i> (JCM1237)	98% (895/910)
Lh71	1071	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (LMG 2693)	99% (1059/1074)
PP7	1022	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (520-20)	98% (973/992)
PP17	999	<i>Pseudomonas corrugata</i> (Slade 939/1)	98% (981/997)
EP15	1404	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (520-20)	99% (1396/1404)
PP31	609	<i>Pseudomonas trivialis</i> (P 513/19)	98% (594/609)
PP16	575	<i>Pseudomonas proteolytica</i> (CMS 64)	98% (561/575)
PP22	931	<i>Pseudomonas putida</i> (IAM 1236)	97% (862/893)
ER66	1021	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (DBK11)	99% (1020/1021)
ER76	1438	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (520-20)	99% (1430/1438)
ER77	957	<i>Pseudomonas lini</i> (DLE411J)	99% (945/957)
GR70	1009	<i>Aeromonas media</i> (RM)	98% (982/999)

Tableau 16 : Identification moléculaire des vingt souches selon le séquençage de l'ADNr 16S (suite).

Isolats	Longueur du gène ADNr 16S séquencé	Espèce le plus proche (Souche)	% d'identité
GR1	1019	<i>Pseudomonas fulva</i> (AJ 2129)	98% (975/992)
GR18	1020	<i>Enterobacter asburiae</i> (JCM6051)	98% (1004/1021)
GR55	1465	<i>Enterobacter ludwigii</i> (EN-119 = DSMZ 16688 = CIP 108491)	97% (1320/1360)
GP70	926	<i>Pseudomonas fulva</i> (AJ 2129)	98% (804/817)
PR66	959	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> (CECT 4199)	98% (276/281)
PR29	918	<i>Aeromonas media</i> (RM)	99% (902/909)

En plus, toutes les bactéries isolées de la rhizosphère du riz retenues en utilisant le milieu King B appartiennent au genre *Pseudomonas*. Ce qui confirme la spécificité de ce milieu pour l'isolement des bactéries appartenant à ce groupe bactérien (Tableau 16).

En outre, parmi les isolats obtenus suite à l'isolement par le milieu TSA, et suite au séquençage d'ADNr 16S, les bactéries GR1, ER77, ER76 et ER66 ont été identifiées comme des souches de *Pseudomonas*.

Quant aux quatre isolats issus de la rhizosphère de *L. hirsitus*, le séquençage a montré qu'ils sont plus proches de certaines souches d'*Enterobacter* : *E. ludwigii*, *E. aerogenes*, *E. amnigenus* et *E. cancerogenus*.

6. ESSAI D'INOCULATION AVEC LES BSP SELECTIONNEES

6.1. En pot

6.1.1. Première inoculation : les seize BSP retenues

En tenant compte des isolats ayant le plus d'activités PGP, en particulier la concentration de P solubilisé et d'AIA, et aussi l'ACC désaminase, on a retenu seize bactéries pour l'essai d'inoculation. En effet, et afin d'évaluer l'effet des bactéries en présence du riz, nous avons effectué un test d'inoculation dans les conditions de la chambre de culture (Figure 16).

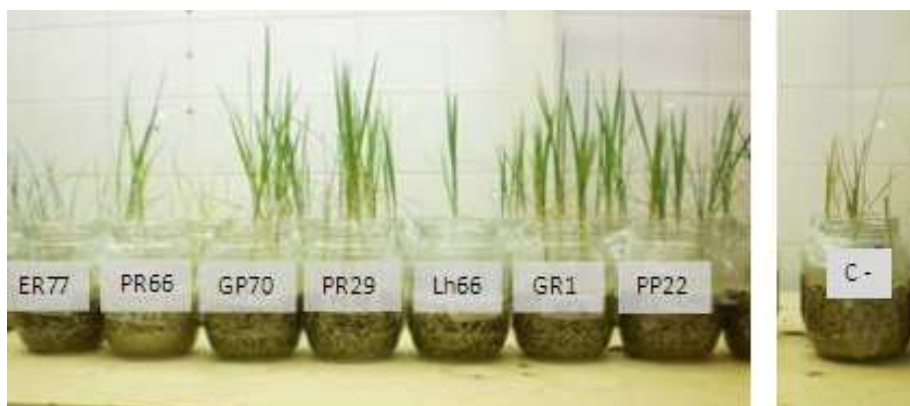


Figure 16 : Plantes du riz inoculées après un mois de croissance en chambre de culture

Dans cet essai, le P était le facteur limitant, comme le montre clairement la réponse du riz à la fertilisation phosphatée (contrôle positif). Dans ces conditions, l'inoculation avec les 16 bactéries testées a entraîné des augmentations significatives ($p < 0.05$) des différents paramètres étudiés en comparaison avec le contrôle non inoculé (Tableau 17; Figure 17 et 19).

Tableau 17: Longueur aérienne et rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les seize bactéries testées après quatre semaines de croissance en pot.

Souche	Longueur aérienne (cm)	Matière sèche racinaire (g/pot)	Matière sèche aérienne (g/pot)
GR55	13,85 bcd	0,05 a	0,09 a
GR70	26,05 ij	0,37 g	0,57 g
PR29	26,83 j	0,47 h	0,67 h
GR1	24,77 hi	0,36 g	0,51 f
GP70	25,58 ij	0,31f	0,50 f
PP22	23,73 h	0,39 g	0,52 fg
PP7	14,03 cd	0,05 a	0,09 a
ER76	10,51 a	0,11 b	0,18 b
ER77	10,50 a	0,12 bc	0,19 b
PR66	20,49 fg	0,19 d	0,34 d
Lh66	18,83 ef	0,18 d	0,25 c
PP17	12,75 bcd	0,11b	0,16 b
GR18	12,23 ab	0,09 b	0,10 a
Lh71	14,45 d	0,10 b	0,14 ab
Lh5	17,11 e	0,22 e	0,29 cd
Lh10	19,16 f	0,23 e	0,41 e
C+	21,56 g	0,25 e	0,53 fg
C-	12,49 bc	0,15 c	0,31 d

Les moyennes de même colonne suivies de même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de signification de 5%.

En effet, après 30 jours, la majorité des souches ont stimulé de façon significative la longueur des plantes (Figure 17). Ces stimulations ont été observées notamment en présence des bactéries PR29, GR70 et GP70 en arrivant à 114.81, 108.57 et 104.80% d'augmentation en comparaison avec le témoin non inoculé (C-).

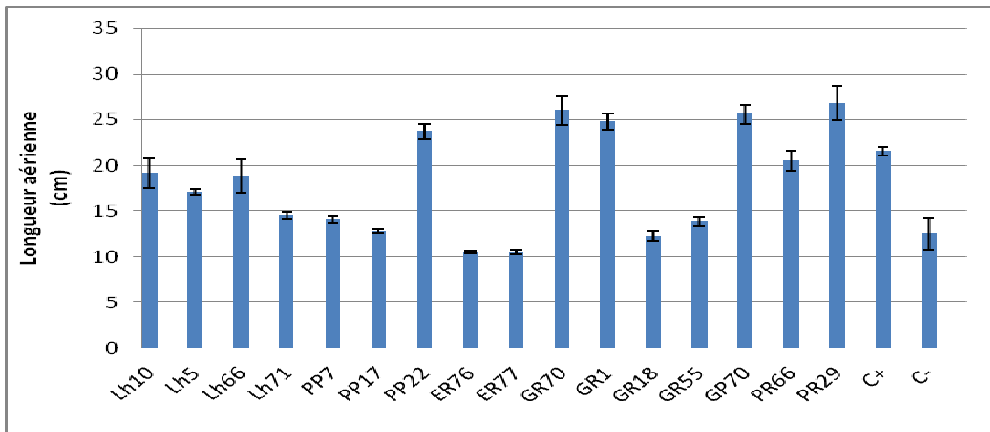


Figure 17 : Longueur de la partie aérienne des plantes inoculées avec les seize bactéries retenues après quatre semaines de croissance en pot.

De même, une stimulation significative a été observée en présence de certaines souches concernant le rendement en matière sèche des plantes (tableau 17 et figure 19). En effet, des augmentations significativement importantes ont été notées pour le poids sec de la partie aérienne des plantes inoculées avec la bactérie PR29 en réalisant une augmentation de 116% comparativement au témoin non inoculé suivie par 83.87 et 67.74% données respectivement par GR70 et PP22. Egalement pour la matière sèche de la partie racinaire, la stimulation de croissance racinaire la plus élevée a été notée pour les plantes inoculées avec GR70, PR29, GR1, GP70 et PP22 et qui dépassent 100% par rapport au témoin négatif (Figure 18).

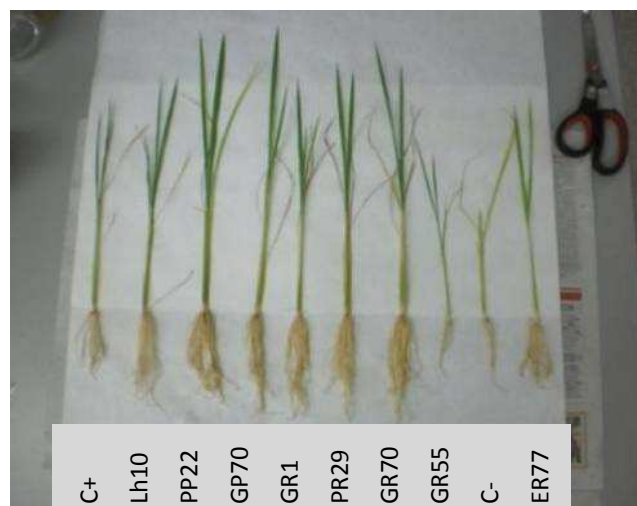


Figure 18 : Effet de l'inoculation sur le développement des plantes du riz.

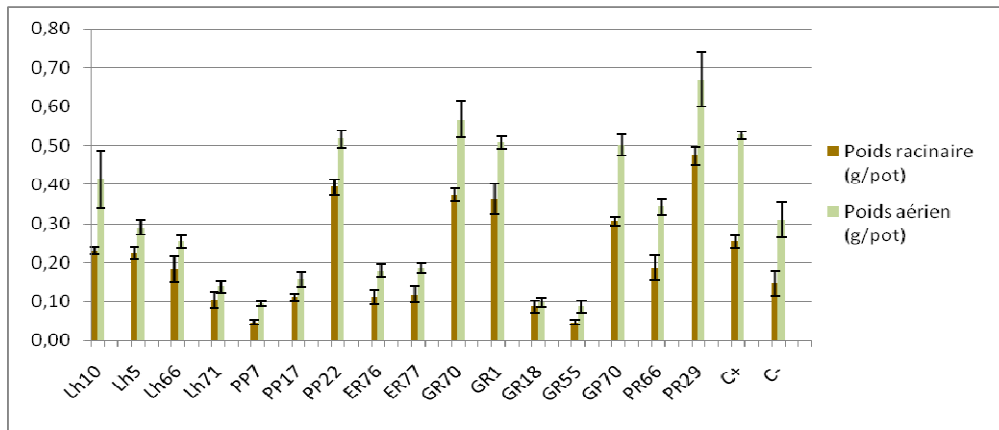


Figure 19 : Rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les seize bactéries retenues après quatre semaines de croissance en pot.

Concernant les isolats de *L. hirsutus*, la souche Lh10 a été la plus efficace concernant les trois paramètres évalués, en comparaison avec les trois autres souches. Cependant, les stimulations obtenues ont été modérées par rapport au témoin positif ou au reste des souches (Tableau 17 et figure 19).

Tenant compte du témoin positif (C+), une différence non significative à un seuil de probabilité de 5% a été obtenue avec certaines bactéries, telles que la souche PR66 pour la longueur aérienne, les souches PP22, GP70, GR1 et GR70 pour la matière sèche de la partie aérienne, et la souche Lh10 et Lh5 pour le rendement en matière sèche de la partie racinaire (Tableau 17 et Figure 19). En outre, on a eu des stimulations significativement plus élevées que le témoin positif comme le cas du rendement en poids sec des racines inoculées avec les bactéries GR70, PR29, GR1, PP22 et GP70 (Tableau 17 et Figure 19). De même pour la partie aérienne, précisément en présence de la bactérie PR29.

Tandis que certaines bactéries ont manifesté un effet neutre vis-à-vis des plantes en comparaison avec le témoin non inoculé. En effet, parmi les souches dont l'inoculation n'avait pas donné des résultats significativement positifs concernant la longueur aérienne, on trouve les deux bactéries PP7 et PP17, et concernant la matière sèche aérienne, la bactérie PR66 (Tableau 17 ; Figure 17 et 19). Sachant que ces trois bactéries ont été isolées de la rhizosphère de la même variété de riz (Puntal), elles auraient dû être moins stressées dans le nouveau biotope.

Cependant, quelques souches ont montré une diminution ou effet délétère concernant les trois paramètres étudiés en comparaison avec le témoin non inoculé, telles que GR55 et GR18 (Tableau 17 ; Figure 17 et 19).

Ainsi, le test d'inoculation du riz en pot a mis en évidence l'importance de certaines bactéries rhizosphériques qui peuvent stimuler la croissance de cette céréale. Et la stimulation obtenue suite à l'inoculation avec ces bactéries a dépassé celle issue en présence de P soluble (contrôle positif) comme le cas de la souche PR29 qui était la souche la plus performante, suivie par les 3 bactéries PP22, GR70 et GP70, qui ont donné des résultats plus proches. Ainsi, afin de trier entre ces 3 bactéries, on a procédé au 2^{ème} test d'inoculation.

6.1.2. Deuxième inoculation : les trois meilleures souches bactériennes

Parmi les bactéries testées, la souche PR29 était la plus efficiente vu la stimulation importante obtenue des différents paramètres de croissance du riz évalués pendant le 1^{er} test d'inoculation, suivie par les trois bactéries, PP22, GR70 et GP70.

Comme leurs résultats ont été proches, on a effectué un 2^{ème} test d'inoculation mais en augmentant l'effectif de répétitions afin d'en trier les deux souches les plus performantes, pour les utiliser par la suite, avec la souche PR29, dans l'essai d'inoculation dans le champ.

D'après les résultats obtenus et présentés dans le tableau 18, on a remarqué que les trois souches, PP22, GR70 et GP 70 ont un effet stimulateur significatif sur les trois paramètres.

Tableau 18: Longueur aérienne et rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les trois souches après quatre semaines de croissance en pot.

Souches	Longueur aérienne (cm)	Matière sèche aérienne (g/pot)	Matière sèche racinaire (g/pot)
GP70	27.78 c	0.49 b	0.32 b
PP22	26.04 bc	0.49 b	0.41 c
GR70	27.48 c	0.59 c	0.38 c
Mélange	26.48 bc	0.51 b	0.37 c
C+	25.04 b	0.54 bc	0.28 b
C-	13.27 a	0.34 a	0.19 a

Les moyennes de même colonne suivies de même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de signification de 5%.

La stimulation la plus élevée de longueur aérienne a été obtenue surtout pour les plantes inoculées avec les deux souches GR70 et GP70 (Tableau 18 ; Figure 20).

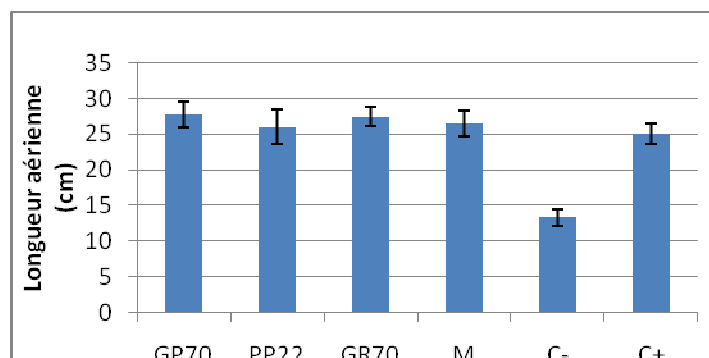


Figure 20 : Longueur de la partie aérienne des plantes inoculées avec les trois bactéries et le mélange après quatre semaines de croissance en pot.

En plus, la matière sèche de cette partie a augmenté de 74% en présence de la souche GR70 (Tableau 18 ; Figure 20). Quant à la matière sèche des racines, la meilleure stimulation a été obtenue suite à l'inoculation avec les souches GR70 et PP22 avec des valeurs 100 et 116% respectivement en comparaison avec le témoin négatif (Tableau 18 ; Figure 21).

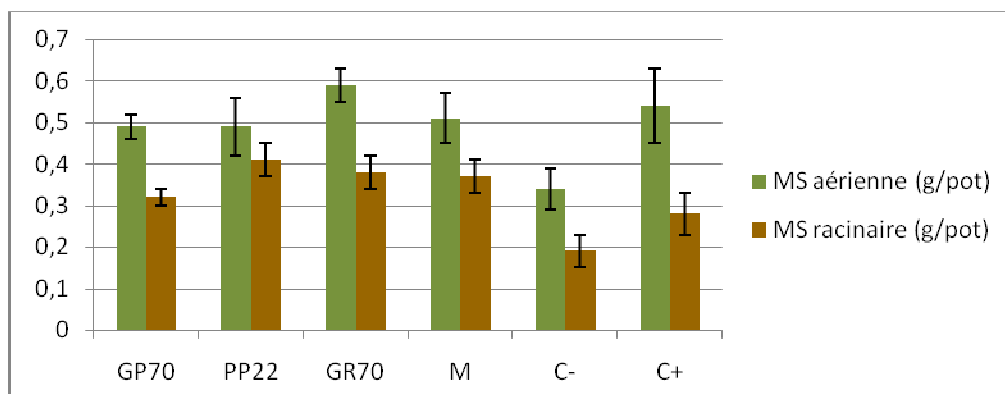


Figure 21 : Rendement en matière sèche de la partie aérienne et racinaire du riz inoculé avec les trois bactéries et le mélange après quatre semaines de croissance en pot.

Quant au mélange de bactéries, on a remarqué l'apparition d'un effet synergique stimulant des trois souches vis-à-vis des trois paramètres évalués. En effet, les résultats (tableau 18 et figure 20) obtenus pour la longueur aérienne sont significativement élevés par rapport au contrôle négatif et du même ordre que les autres traitements (Tableau 18). Pour la matière sèche aérienne les résultats sont similaires à ceux des différents isolats sauf pour la souche GR70

qui présente une valeur significativement élevée (0.59 g/pot). Cependant, seule GP70 a montré une valeur significativement faible (0.32 g/pot) pour la matière sèche racinaire (Tableau 18 et Figure 21).

En conclusion, les souches qui ont montré une bonne stimulation de croissance du riz par rapport au contrôle négatif, sont les deux bactéries PP22 et GR70. Ainsi, pour le test d'inoculation dans le champ, on a choisi les trois souches : PR29, GR70 et PP22, et aussi la souche ER76 vu son pouvoir important de solubilisation de phosphate dans le milieu PVK liquide (Tableau 13).

6.2. Dans le champ

6.2.1. Isolement et sélection des BSP

Un mois après la 1^{ère} inoculation de la parcelle expérimentale, des plantes du riz ont été récoltées et transportées au laboratoire afin d'isoler les rhizobactéries à partir du sol rhizosphérique (Figure 22).

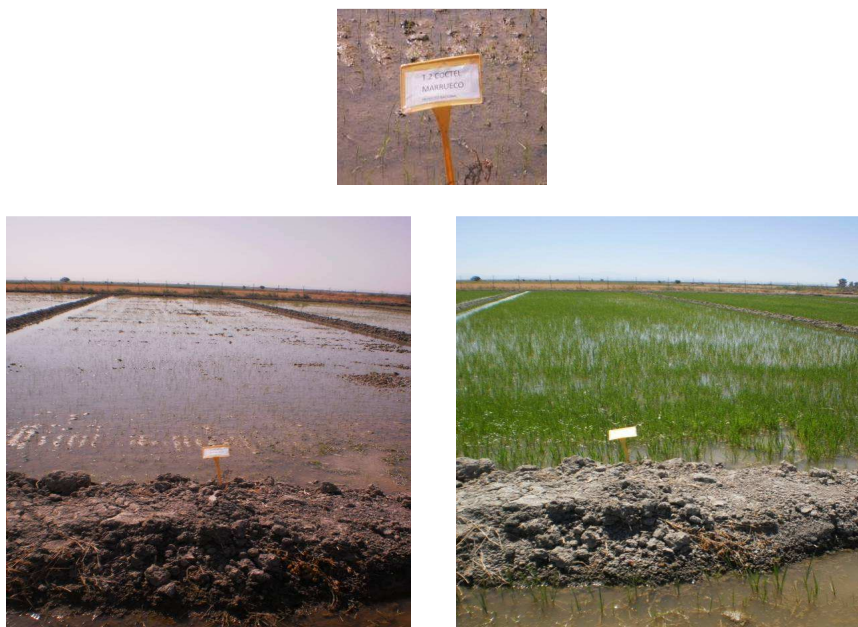


Figure 22 : Parcelle expérimentale au semis (à gauche) et un mois après l'inoculation avec les quatre bactéries les plus efficaces (à droite).

Suite à l'isolement et purification des rhizobactéries ayant une morphologie (la forme, la coloration et la taille de colonies) identique aux quatre bactéries utilisées dans l'inoculation, un total de 17 isolats a été obtenu. En se basant sur la caractérisation phénotypique des quatre bactéries utilisées dans l'inoculation du champ, PP22, PR29, ER76 et GR70, concernant la solubilisation du phosphate inorganique, on a soumis les nouvelles bactéries isolées de la rhizosphère des plantules du riz, cultivé dans le champ, à un test qualitatif de solubilisation de P. Les résultats de solubilisation de phosphate inorganique sont illustrés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Test qualitatif de solubilisation de P inorganique des isolats rhizosphériques issus du champ un mois après l'inoculation.

Isolats	PVK modifié		NBRIP
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	CaHPO ₄	
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	+	+	+
10	-	-	-
11	+	+	+
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	+	+	+
16	+	+	+
17	-	-	-

6.2.2. Comparaison des profils BOX-PCR

Suite au test qualitatif de solubilisation de P, on a trié les quatre isolats, 9, 11, 15 et 16 pour l'identification moléculaire afin de les comparer avec les quatre souches utilisées comme inocula. Pour identifier les nouvelles BSP, l'ADN des quatre nouvelles bactéries a été extrait et amplifié en utilisant l'amorce BOXA1R. Les différents profils obtenus sont présentés sur la figure 23.

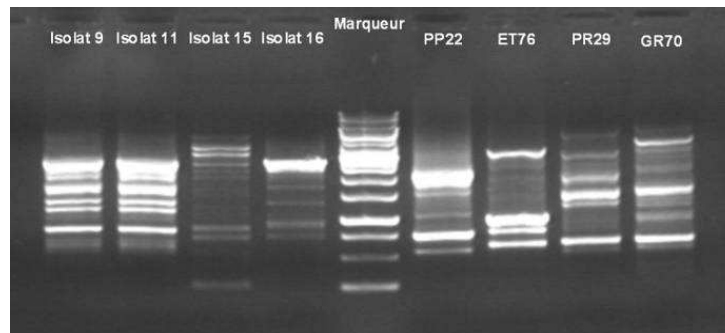


Figure 23 : Gel d'agarose montrant l'empreinte génomique BOX-PCR

Les profils obtenus (Figure 23) montrent une diversité génétique entre les bactéries nouvellement isolées du sol rhizosphérique issu du champ et celles des bactéries utilisées dans le test d'inoculation de cette parcelle expérimentale. Ainsi, les isolats 9, 11, 15 et 16 sont différents des isolats PP22, ER76, PR29 et GR70. Ce qui confirme l'absence de quatre bactéries introduites dans le prélèvement analysé de nouveau biotope, le champ.

6.2.3. Evaluation d'effet d'inoculation du riz avec les quatre bactéries retenues

Après la récolte du riz (3 mois de croissance), la production ainsi que la qualité du produit ont été évalués. Le tableau 20 présente les résultats obtenus concernant les différents paramètres évalués.

Tableau 20 : Différents paramètres évalués suite à la récolte du riz après trois mois de croissance.

	Production (Kg/ha)	Graines entières %	Graines Brisées %	Graines tachées %	Impureté %
Contrôle (urée)	11686	60	7	0.5	1
Inoculant combiné (PR29, PP22, GR70 et ER76)	8166	68	5	0.36	0.4
Ecologique (compost)	7650	66.2	5.8	0.48	0.7

La production la plus élevée a été obtenue dans la parcelle contrôle, fertilisée avec l'urée. Or et en comparaison avec la parcelle écologique, la production obtenue dans la parcelle inoculée avec les quatre bactéries retenues a été plus élevée de 6.74% (Tableau 20).

En outre, la qualité du produit du riz inoculé avec l'inoculant combiné (PR29, PP22, GR70 et ER76) a été la plus estimée en comparaison avec les deux autres parcelles. En effet, la valeur des graines entières ont été plus élevées dans le produit issu de la parcelle inoculée avec les bactéries testées comparativement aux deux autres parcelles, le control et l'écologique, en donnant une valeur de 68% (Tableau 20). En plus, les graines brisées ou tachées ont été moins abondantes dans le produit de la parcelle inoculée en comparaison avec le control et la parcelle écologique (Tableau 20).

De point de vue économique et en se basant sur les impuretés qui accompagnent le produit après la récolte, on a observé que le produit issu du riz inoculé avec les quatre bactéries, a été le plus « propre ». Ce qui affectera positivement le cout de production, et indirectement le prix de vente en faveur du client.

Chapitre IV
DISCUSSION

Le phosphore (P) est l'un des éléments majeurs pour la croissance des plantes. Cependant, c'est un facteur limitant pour plusieurs produits, car la majorité des sols consacrés pour l'agriculture renferment des quantités importantes du P sous forme insoluble. En plus, presque 75-90% de P soluble apporté sous la forme de fertilisants chimiques est précipité par les cations métalliques dans le sol (Stevenson, 1986). La capacité de certaines rhizobactéries à solubiliser le P inorganique précipité dans le sol et le rendre assimilable pour les plantes représente une approche très prometteuse pour améliorer la disponibilité du P dans le sol tout en minimisant les apports des fertilisants phosphatés gardant ainsi l'environnement intact. Dans la majorité des sols marocains qui sont des sols calcaires, le P est précipité sous forme PCa d'où l'importance de nous intéresser aux microorganismes capables de solubiliser le phosphate calcique.

Notre hypothèse de recherche adoptée pour cette étude a consisté à vérifier si les légumineuses naturelles ainsi que le riz abritent dans leur rhizosphère des bactéries dissolvant le P inorganique qui sont caractérisées par des propriétés phytobénéfiques, des activités PGP, et qui peuvent stimuler la croissance du riz. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons isolé des rhizobactéries à partir de huit légumineuses naturelles du nord marocain et à partir du riz cultivé dans la région de Larache, au Nord-Ouest du Maroc.

1. ISOLEMENT ET SELECTION DES BACTERIES SOLUBILISANT LE P (BSP)

Dans la rhizosphère, les exsudats racinaires représentent une source d'énergie pour la microflore rhizosphérique. En conséquence, l'activité microbienne est très intense dans la rhizosphère en comparaison avec le sol non rhizosphérique (Brimecombe, 2001), et dont les bactéries sont les microorganismes les plus abondants. Certaines de ces rhizobactéries, identifiées comme des PGPR, exercent des effets positifs significatifs sur la croissance et le développement de la plante grâce aux plusieurs activités phytobénéfiques telles que la solubilisation de phosphate inorganique.

En effet, plusieurs études au cours de ces dernières années ont rapporté la capacité de certaines rhizobactéries à dissoudre le P inorganique (Peix *et al.*, 2001 ; Chung *et al.*, 2005 ; Prasanna *et al.*, 2011 ; Muleta *et al.*, 2013), et d'où leur appellation « bactéries solubilisant le phosphate » BSP (Pérez *et al.*, 2007). Ces BSP sont plus abondantes au niveau de la rhizosphère que dans le sol non rhizosphérique en présentant un taux de 1 à 50% de la microflore rhizosphérique face à 0.1 - 0.5% pour les champignons solubilisant le P (Chen *et*

al., 2006). En plus, il a été rapporté que les BSP sont plus efficaces concernant cette activité de solubilisation que les champignons (Peix *et al.*, 2001 ; Alam *et al.*, 2002 ; Oliveira *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2012). En conséquence, pendant notre étude, on s'est intéressé plus aux bactéries qui colonisent la rhizosphère des plantes qu'aux champignons. En plus c'est la première étude au Maroc à notre connaissance, concernant l'isolement des BSP existant au niveau de la rhizosphère du riz. Sachant que d'autres équipes marocaines s'intéressent aussi à la biosolubilisation du phosphate inorganique, surtout naturel, comme c'est le cas de Hamdali *et al.* (2008a ; 2008b), en isolant les Actinomycètes à partir des mines phosphatées marocaines.

Suite au test qualitatif de solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dans le milieu PVK solide, 392 BSP ont été obtenues sur 701 bactéries issues de la rhizosphère des légumineuses naturelles et des différentes variétés du riz cultivées au Nord-ouest du Maroc montrant l'abondance de cette population au niveau de la rhizosphère. De même, Muleta *et al.* (2013) ont rapporté que sur plus de 72% des bactéries associées à la rhizosphère du café (*Coffea arabica*) ont été des BSP.

En plus et selon les diamètres des halos de solubilisation obtenus dans les boîtes contenant le milieu PVK, on a trouvé que les souches isolées de la rhizosphère du riz ont donné des halos plus importants que celles issues des légumineuses naturelles.

Vu la grande importance des souches appartenant au genre *Pseudomonas* pour leurs effets à la fois fertilisant et protecteur (Gull & Hafeez, 2012 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012), on s'est intéressé aussi à l'isolement des bactéries appartenant à ce genre. La majorité des BSP isolées dans cette étude appartient au genre *Pseudomonas*, car on a trouvé que certaines bactéries isolées sur le milieu TSA ont été identifiées par le séquençage du gène 16S d'ADNr comme des *Pseudomonas* spp. en montrant l'abondance de ce genre au niveau de la rhizosphère du riz. Similaire à nos résultats, Muleta *et al.* (2013) ont isolé des BSP à partir de la rhizosphère du café, et les *Pseudomonas* spp. ont été les plus dominants présentant un taux de 33.9% des BSP totales.

On a isolé aussi des souches appartenant à l'*Enterobacter* à partir de la rhizosphère de légumineuses et du riz. Le troisième genre obtenu pendant cette étude c'était l'*Aeromonas*. Ce dernier genre a été présent surtout au niveau de la rhizosphère du riz, et pas celle des légumineuses naturelles.

Egalement, des *Pseudomonas* spp. et des *Enterobacters* spp. ont été parmi les bactéries BSP isolées de la rhizosphère du riz (Prasanna *et al.*, 2011) et du l'haricot vert (Kumar *et al.*, 2012) cultivés en Inde. De même, Muleta *et al.* (2013) ont trouvé que parmi les bactéries BSP isolées de la rhizosphère du café cultivé en Ethiopie, des souches appartenant au *Pseudomonas* et *Aeromonas*. Ce qui montre l'association de ces bactéries à la rhizosphère de différentes plantes. D'ailleurs, Brimecombe *et al.* (2001) ont souligné l'importance de tous les facteurs, liés à la plante ou au sol, à affecter la composition et l'activité de la communauté microbienne rhizosphérique.

2. EVALUATION DES ACTIVITES A EFFET STIMULANT : BIO-STIMULATION

2.1. Production d'AIA

Comme les BSP font partie d'un groupe bactérien plus large appelé les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), elles peuvent stimuler la croissance végétale par d'autres activités phytobénéfiques. La première propriété phyto-stimulatrice, sur laquelle on s'est basé dans cette étude pour le tri des isolats bactériens, était la production d'AIA. Cette hormone est l'un des régulateurs qui influencent la physiologie des plantes et leur croissance. Et l'AIA est l'une des auxines physiologiquement les plus actives et c'est le produit commun de métabolisme du tryptophane par plusieurs PGPR (Ahmad *et al.*, 2005 ; Joseph *et al.*, 2007).

Sur les 25 rhizobactéries retenues, onze isolats ont été positifs concernant le test qualitatif d'AIA. De même, plusieurs travaux ont rapporté la capacité des bactéries isolées de différentes rhizosphères à produire cette hormone (Patten et Glick, 2002 ; Joseph *et al.*, 2007 ; Ahmad *et al.*, 2008). Selon le séquençage d'ADN 16S, toutes les souches AIA positives appartiennent au genre *Enterobacter* et *Aeromonas* alors qu'aucune souche *Pseudomonas* n'a été capable de produire l'AIA dans le milieu solide (TSA enrichi de tryptophane).

Vu la sensibilité des racines vis-à-vis de la concentration de l'AIA, on a dosé cette phytohormone produite par les vingt bactéries retenues. Les concentrations produites ont été significativement différentes, et comprises entre 64.85 mg/l et 0.68 mg/l. Les deux souches PR66 et PR29 ont été celles qui ont synthétisé les plus fortes concentrations, tandis que les souches ER77, ER66 et ER76 ont produit des quantités très faibles d'AIA.

En plus, et selon le test quantitatif d'AIA, tous les *Pseudomonas* spp. produisent cette hormone en donnant différentes concentrations. Ce qui est en accord avec plusieurs travaux qui ont rapporté la capacité des souches de *Pseudomonas* à produire cette phytohormone, et même à des concentrations très importantes (Patten & Glick, 2002 ; Joseph *et al.*, 2007 ; Ahmad *et al.*, 2008).

2.2. Détection de l'activité ACC désaminase

L'activité enzymatique ACC désaminase a été recherchée aussi chez les isolats retenus (25 bactéries). Cet enzyme joue un rôle primordial en agissant sur l'équilibre phytohormonal de la plante (AIA/Ethylène) (Glick *et al.*, 2007b). Elle hydrolyse l'ACC, le précurseur d'éthylène qui inhibe l'élongation des racines, en favorisant ainsi le développement racinaire (Penrose & Glick, 2003).

Cette enzyme n'a été détectée que chez la souche Lh5 (*Enterobacter ludwigii*), issue de *Lupinus hirsitus*. Quant aux isolats issus du riz, à part la bactérie EP15, toutes les souches isolées en particulier de la rhizosphère de variété Elio, ont été capables d'hydrolyser l'ACC. En plus, elles appartiennent toutes au *Pseudomonas*. De même, Penrose et Glick (2003) ont isolé sept bactéries issues de différentes rhizosphères, dont quatre ont été identifiées comme *Enterobacter cloacae*, deux isolats comme *Pseudomonas putida* et une bactérie comme *Pseudomonas fluorescens*. Toutes ces bactéries ont été capables d'hydrolyser l'ACC et de promouvoir la germination de canola, et son développement racinaire (Penrose & Glick, 2003). Également, Gravel *et al.* (2007) ont rapporté la présence de cette enzyme chez une souche *Pseudomonas putida* isolée de la rhizosphère de tomate. Tandis qu'aucune des trois bactéries PR29, PR66 et GR70, identifiées comme *Aeromonas*, n'a pu dégrader l'ACC.

3. EVALUATION DES AUTRES ACTIVITES A EFFET FERTILISANT : BIOFERTILISATION

3.1. Disponibilité de l'azote pour la plante : Fixation libre d'azote et dégradation de l'urée

Parmi les processus bactériens dont les BSP peuvent améliorer la croissance végétale, on cite la promotion de la nutrition azotée par la fixation libre d'azote atmosphérique ou par la dégradation des formes d'azote organique. De cette manière, ces « biofertilisants » peuvent augmenter le rendement cultural.

Au niveau de la rhizosphère, il existe plusieurs rhizobactéries qui sont capables de fournir la source d'azote pour la plante (Beneduzi *et al.*, 2008 ; Shridhar, 2012). Cependant, aucune souche des isolats étudiés dans ce travail, n'a été capable de fixer l'azote atmosphérique, montrant que ces rhizobactéries retenues ne disposent pas de l'enzyme nitrogénase.

Quant à l'urée, l'un des apports azotés utilisés dans la fertilisation des sols agricoles, il figure parmi les formes organiques que les plantes peuvent absorber directement du sol sans passer par la minéralisation microbienne (Bardgett, 2005). Sauf que cette absorption est beaucoup moins facile. Et d'ailleurs, certaines rhizobactéries au niveau du sol sont capables de convertir l'urée en ammoniac, en facilitant ainsi son absorbance par les racines. Effectivement, les isolats issus de *L. hirsitus* ont été les plus efficaces concernant la dégradation d'urée. Tandis que le reste des souches se sont montrées incapables d'hydrolyser ce substrat, ce qui démontre l'absence d'enzyme uréase.

3.2. Disponibilité du phosphore

3.2.1. Solubilisation des autres sources de P inorganique

On a évalué chez les vingt cinq isolats la capacité de solubiliser d'autres sources de P inorganique. Alors on a substitué le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ et CaHPO_4 comme seule source de P en gardant le même milieu de base, le milieu Pikovskaya (PVK). Selon les résultats obtenus, à part les deux bactéries, ER66 et GR70, toutes les bactéries se sont montrées capables de solubiliser le phosphore de nature calcique. De même, plusieurs travaux ont isolé des rhizobactéries qui ont dissout d'autres sources de P à part le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, telles que

CaHPO₄, Ca₅HO₁₃P₃ et le phosphate naturel (Son *et al.*, 2006 ; Hamdali *et al.*, 2008a ; Chang *et al.*, 2009 ; Muleta *et al.*, 2013)

Comme dans les sols acides, les ions phosphates sont rapidement précipités par les cations du sol, Fe³⁺ et Al³⁺ en donnant des complexes insolubles, on a évalué aussi chez les isolats testés le pouvoir de solubilisation de phosphate ferrique et aluminique. Selon les résultats obtenus, les bactéries ont été toutes incapables de dissoudre ces deux sources du P. Ces résultats sont en accord avec ceux présenté par Chang et Yang (2009) qui ont isolé des souches capables de dissoudre le Ca₃(PO₄)₂, tandis qu'elles n'ont pas donné des halos de solubilisation dans le milieu contenant FePO₄ et AlPO₄ comme seule source de P. Des résultats similaires ont été rapportés par Pérez *et al.* (2007) et Oliveira *et al.* (2009)

En plus, Son *et al.* (2006) ont obtenu des concentrations significativement importantes de P solubilisé par *P. agglomerans* R-42 quand le substrat phosphaté été le Ca₃(PO₄)₂, CaHPO₄ et Ca₅HO₁₃P₃ en comparaison avec celles obtenues suite à la dissolution de FePO₄ et l'AlPO₄. De même, Sagervanshi *et al.* (2012) ont confirmé que le substrat phosphaté le plus solubilisé par des bactéries issues des sols culturaux acides, c'était le Ca₃(PO₄)₂.

L'absence du pouvoir solubilisateur des souches évaluées vis-à-vis de phosphate ferrique et aluminique pourrait être expliqué par l'inadaptation des protocoles utilisés pour l'évaluation de la biosolubilisation de ces deux sources minérales (Pérez *et al.*, 2007). En plus, la toxicité des ions Fe³⁺ et Al³⁺ peuvent avoir un effet inhibiteur sur l'activité solubilisatrices de ces bactéries.

Quand on a changé le milieu de base PVK par d'autres milieux utilisés dans la sélection des MSP, le milieu NBRIP et YEP contenant le phosphate tricalcique comme source de P, on a remarqué que le comportement des bactéries a été différent. En effet, certains isolats n'ont pas donné des halos de solubilisation qui, auparavant avaient été isolés sur ce critère en utilisant un milieu de base PVK. En plus, la préférence a été pour le milieu NBRIP que le milieu YED-P.

Des résultats similaires ont été rapportés par Pradhan et Sukla (2005) en évaluant la capacité de solubilisation de phosphate tricalcique dans le milieu liquide chez deux souches de champignons, *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp., issus de la rhizosphère du riz. Ils ont testé les différents milieux de base utilisés pour la sélection des BSP, PVK (Pikovskaya, 1948), NBRIP (Nautiyal, 1999), AYG (Halder *et al.*, 1991) et deux autres milieux préparés selon

Kim *et al.* (1997) et Vassilev *et al.* (1998). Les concentrations obtenues de P solubilisé par les deux champignons ont été différentes selon les milieux de culture (Pradhan & Sukla, 2005). De même, Sagervanshi *et al.* (2012) ont rapporté que la solubilisation du P minéral par des bactéries issues des sols acides, a été plus importante dans le milieu PVK en comparaison avec les autres milieux utilisés, AYG, NBRIY et NBRIP.

Ce qui montre l'intervention de certains composants des milieux de culture ainsi que les concentrations dans le processus de biosolubilisation du P minéral. Et d'ailleurs, Son *et al.* (2006) ont démontré dans leur travail l'importance de la concentration de certains composés du milieu de culture, en particulier les sels et la source d'azote, dans la biosolubilisation du P inorganique. Ainsi, la biosolubilisation de P inorganique dépend de plusieurs facteurs, nutritionnels ou physiologiques ainsi que les conditions de culture.

3.2.2. Dosage du P solubilisé

Les vingt souches ont été soumises au test quantitatif de solubilisation de phosphate tricalcique afin de quantifier cette activité. Les concentrations de P solubilisé les plus élevées sont données par les bactéries appartenant au *Pseudomonas*, l'un des genres bactériens qui renferment les BSP les plus puissantes (Rodriguez & Hilda, 1999). Les autres espèces identifiées comme *Aeromonas* spp. et *Enterobacter* spp. sont rapportés aussi comme des solubilisatrices du P inorganique (Song *et al.*, 2001 ; Chung *et al.*, 2005 ; Shoebitz *et al.*, 2009 ; Muleta *et al.*, 2013).

En plus, on a trouvé une corrélation négative de l'activité solubilisatrice entre le milieu PVK solide et liquide. Sauf que cette relation entre les halos de solubilisation et les concentrations de P solubilisé n'est pas significative ($r = -0.66$, $p \geq 0.10$). Ce qui montre l'importance des deux tests de biosolubilisation du P, qualitatif et quantitatif, dans la sélection des BSP.

En accord avec ce résultat, Alam *et al.* (2002) n'ont pas obtenu une corrélation positive significative entre la concentration de P solubilisé à partir du phosphate tricalcique et le diamètre d'halo de solubilisation. De même, Pérez *et al.* (2007) ont rapporté la capacité de certaines bactéries à dissoudre FePO_4 et AlPO_4 dans le milieu liquide alors qu'elles n'ont donné aucun halo de solubilisation dans les boîtes renfermant les mêmes sources de P inorganique.

De plus, Chang et Yang (2009) ont confirmé l'absence de corrélation entre les résultats obtenus dans le test qualitatif et quantitatif de solubilisation de P inorganique. En plus, la souche *Bacillus smithii* F18 a donné de petits halos, alors qu'elle était capable de solubiliser cinq différents substrats du P minéral dans le milieu liquide (Chang & Yang, 2009).

Contrairement à tout ces résultats, Muleta *et al.* (2013) ont trouvé une forte corrélation positive significative entre l'indice de solubilisation et la concentration de P solubilisé par des BSP issues de la rhizosphère du café.

Un abaissement du pH a été noté au cours de la solubilisation de P dans le milieu liquide en comparaison avec le pH du milieu non inoculé (témoin) ayant un pH 6.72. Cette acidification est arrivée jusqu'à 4.3 en présence de GR1. Un tel abaissement du pH a été rapporté par la majorité des travaux traitant la biosolubilisation du P inorganique (Chen *et al.*, 2006 ; Pérez *et al.*, 2007 ; Chang et Yang, 2009 ; Oliveira *et al.*, 2009 ; Sagervanshi *et al.*, 2012), soit par les bactéries ou les champignons (Alam *et al.*, 2002).

Une corrélation négative significative a été trouvée entre le pH et la concentration du P solubilisé ($r = -0.68$, $p < 0.01$). De même, une corrélation négative entre la quantité de P solubilisé et le pH du milieu de culture a été rapporté par nombreux chercheurs, comme Alam *et al.* (2002) ($r = -0.57$, $p < 0.05$), Babana (2003) ($r = -0.76$, $p < 0.001$) et Chen *et al.* (2006) ($r = -0.80$, $p < 0.01$). De ce fait, cette relation significative inversée entre le pH et la concentration de P solubilisé indique l'importance de l'acidification du milieu dans la biosolubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pendant cette étude.

Selon la littérature, cet abaissement du pH est causé essentiellement par les acides organiques produits par les BSP montrant le rôle significatif de ces composés dans la solubilisation de P inorganique notamment calcique (Son *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2006 ; Pérez *et al.*, 2007). Et d'ailleurs, King *et al.* (2002) ont obtenu une corrélation entre la concentration d'acide citrique produit et le P solubilisé plus forte que celle obtenue entre le pH et le P solubilisé. Effectivement, le groupement carboxyle chélate les cations, en particulier Ca, attachés au phosphate en libérant ainsi le P. De même, une corrélation positive a été obtenue par Kang *et al.* (2008) entre la concentration de citrate et la concentration de P solubilisé par *Aspergillus* sp PS-104 à partir de phosphate naturel.

Parmi les acides organiques les plus produits pendant la biosolubilisation de phosphate tricalcique, on trouve l'acide citrique, l'acide gluconique, l'acide ketogluconique, l'acide

lactique, l'acide succinique, l'acide formique et l'acide propionique (Lin *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2006 ; Pérez *et al.*, 2007 ; Sagervanshi *et al.*, 2012 ; Muleta *et al.*, 2013).

Cependant, Chen *et al.* (2006) ont rapporté la biosolubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu liquide en absence de toute production d'acide organique. En plus, certaines études ont démontré l'absence d'une corrélation significative entre la concentration du P solubilisé et la concentration des acides organique produits (Alam *et al.*, 2002 ; Muleta *et al.*, 2013).

En outre, il a été rapporté par Rodriguez et Fraga (1999) qu'à part les acides organiques produits, certains composés à pouvoir chélateur peuvent intervenir dans le processus de solubilisation. Ainsi, Hamdali *et al.* (2008a ; 2012) ont affirmé la participation des sidérophores dans la solubilisation de phosphate naturel. En outre, ils ont noté une alcalinisation au cours de la solubilisation de P inorganique et absence des acides organiques dans le milieu de culture en présence des Actinomycètes. Ainsi, le processus de solubilisation du P inorganique par les microorganismes est un phénomène très compliqué, et qui est affecté par plusieurs facteurs (type de microorganismes, enzymes impliquées dans la solubilisation du P...).

4. EVALUATION DES ACTIVITES A EFFET PROTECTEUR : BIO-CONTRÔLE

En plus de la fertilisation ou la stimulation de la croissance végétale, il a été rapporté que les PGPR peuvent regrouper des antagonistes très puissants contre un large spectre des agents phytopathogènes, surtout certaines souches appartiennent au genre *Pseudomonas* telles que *P. fluorescens* (Raaijmakers *et al.*, 2002 ; Rajkumar *et al.*, 2008).

4.1. Production d'HCN

La production de l'HCN est considérée comme l'un des caractères phytobénifiques indirects, car ce composé volatil produit par plusieurs rhizobactéries peut inhiber les microorganismes phytopathogènes assurant ainsi le biocontrôle de la plante (Brimecombe *et al.*, 2001). La production de ce métabolite secondaire par les rhizobactéries phytobénéfiques a été rapportée par plusieurs travaux (Bakker *et al.*, 2007).

Concernant les isolats obtenus, toutes les souches qui ont été capables de produire l'HCN sont des bactéries du genre *Pseudomonas*, isolées soit de la rhizosphère du riz, variété Puntal, Elio ou Guadamar. Alors qu'aucune souche d'*Enterobacter* ou *Aeromonas* n'a synthétisé ce gaz.

De résultats identiques ont été obtenus par Ahmad *et al.* (2008) qu'ont isolé des rhizobactéries appartenant à différents genres tels qu'*Azotobacter*, *Mesorhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*. La production de l'HCN a été spécifique pour les souches de *Pseudomonas* suivies par celles de *Bacillus*. En plus, Noori & Saud (2012) ont obtenu des souches à partir de la rhizosphère du riz, et qui ont été toutes HCN positives. En plus, toutes ces bactéries ont été identifiées comme des *Pseudomonas* spp.

Contrairement à ces résultats, les bactéries obtenues par Joseph *et al.* (2007) à partir de la rhizosphère de pois chiche, et qui ont été identifiées comme *Pseudomonas* spp. ont été toutes incapables de produire l'HCN.

4.2. Production des sidérophores

Les sidérophores sont des molécules d'une grande affinité aux ions du fer (Fe^{3+}). Et la production de ces molécules par les rhizobactéries est l'un des caractères PGP qui peut jouer un rôle direct dans la lutte biologique en diminuant la disponibilité de fer pour les phytopathogènes dans la rhizosphère et le rendre plus valable pour la bactérie bénéfique et/ou pour la plante (Beneduzi *et al.*, 2008), ou indirecte en induisant une résistance systémique pour la plante (Höfte & Bakker, 2007).

Suite au test universel proposé par Schwyn et Neilands (1997) pour la détection des sidérophores en utilisant un milieu appauvri en fer, la majorité des vingt cinq isolats retenus ont donné des halos de coloration orange dans le milieu CAS confirmant la captation du fer par les sidérophores produits dans le milieu.

En outre, toutes les bactéries identifiées comme *Pseudomonas* ont été capables de produire les sidérophores. Tandis qu'aucune bactérie de la rhizosphère de *L. hirsutus* n'a montré cette activité.

De même, Terano *et al.* (2002) ont isolé des rhizobactéries à partir de la rhizosphère d'une autre graminée, l'orge, capables de produire des sidérophores dans des conditions limitées en fer, en particulier la pyochéline. Et ces souches appartiennent toutes à l'espèce *P. fluorescens*.

Des résultats similaires ont été obtenus par Joseph *et al.* (2007) qui ont rapporté la capacité des rhizobactéries de produire des sidérophores avec les souches de *Pseudomonas* comme les productrices les plus puissantes.

Nos résultats s'accordent aussi avec ceux rapportés par Noori & Saud (2012) qui ont trouvé que tous les *Pseudomonas* spp. isolés de la rhizosphère du riz ont été capables de produire les sidérophores. Et d'ailleurs, Haas & Défago (2005) ont détaillé l'efficacité des *Pseudomonas* spp., en particulier les *P. fluorescens*, à produire des sidérophores à grande affinité pour le fer.

4.3. Production d'AHL

Afin de réguler certains processus cellulaires au sein de toute la population bactérienne, les bactéries communiquent entre elles par des signaux diffusibles. Le phénomène est appelé le « quorum sensing ». Les molécules intervenant dans la communication moléculaire entre les bactéries à Gram négatif, sont les N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs). Effectivement, la majorité des bactéries testées ont été capables de produire l'AHL.

En plus, les bactéries identifiées comme *Pseudomonas* présentent la portion la plus importante des isolats produisant l'AHLs. Et d'ailleurs, il a été rapporté que la plupart des rhizobactéries Gram négatives impliquées dans l'ISR des plantes appartiennent surtout au genre *Pseudomonas*, auquel nombreuses métabolites appelés des « éliciteurs » ont été découverts et qui déclenchent cette résistance végétale (Bakker *et al.*, 2007 ; Jourdan *et al.*, 2008).

Cet effet éliciteur des AHLs a été confirmé avant par l'étude menée par Schuhegger *et al.* (2006). Les AHLs produits par *Serratia liquefaciens* MG1 et *Pseudomonas putida* IsoF ont été capables de stimuler le phénomène de « la résistance systémique induite », ou ISR, chez la tomate contre le champignon pathogène *Alternaria alternata* (Schuhegger *et al.*, 2006).

4.4. Antagonisme

4.4.1. Contre les bactéries phytopathogènes

La production des molécules ayant des effets antagoniste vis-à-vis des microorganismes phytopathogènes du sol, joue un rôle très important dans la lutte biologique (Ramesh *et al.*, 2009 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012).

Les résultats du test d'antagonisme effectué contre les bactéries phytopathogènes montrent que des zones d'inhibition ont été formées à l'entourage des bactéries testées. Ces zones de différents diamètres confirment la production des substances toxiques ou lytiques. Ces métabolites permettent aux bactéries antagonistes au niveau de la rhizosphère de coloniser fortement l'espace rhizosphérique.

L'importance des zones d'inhibition a été notée surtout en présence des souches PP16 et ER77, et qui sont identifiées comme *Pseudomonas proteolytica* et *Pseudomonas lini* respectivement, en confirmant la grande efficacité de ce genre dans l'inhibition et la suppression des phytopathogènes.

D'ailleurs, nombreuses espèces de *Pseudomonas* ont été utilisées avec succès dans le contrôle biologique contre plusieurs phytopathogènes (Antoun & Prévost, 2005 ; Bakker *et al.*, 2007 ; Höfte & Bakker, 2007).

Il est possible que l'effet répressif observé soit dû notamment à la production à certaines concentrations de l'HCN et des sidérophores ou à une interaction synergique de ces deux composés avec d'autres métabolites non évalués pendant cette présente étude. Car certaines souches ont ces deux activités PGP et même des activités hydrolytiques, alors qu'elles n'ont pas montré une forte inhibition des bactéries phytopathogènes.

4.4.2. Contre les champignons phytopathogènes

Quant aux résultats obtenus concernant l'inhibition des champignons phytopathogènes, les bactéries antagonistes ont réagi selon deux modes d'action ; inhibition de contact ou à distance. Ce qui montre l'intervention des modes différents dans l'antagonisme contre les champignons phytopathogènes.

En effet, l'inhibition à distance pourrait être assurée par la sécrétion des métabolites à effets antifongiques, solubles ou volatiles. Selon les résultats obtenus, ce mode d'action a été observé notamment en présence des isolats issus du riz, et dont la majorité est caractérisée par la production d'HCN.

Trivedi *et al.* (2008) ont eux aussi démontré la capacité d'une souche *Pseudomonas corrugata* à inhiber la croissance de deux champignons phytopathogènes, *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum*, grâce à des composés volatils plutôt que diffusables. Cependant,

plusieurs activités phytoprotectrices ont été identifiées chez cette souche, telles que la production des sidérophores, d'acide cyanhydrique, des antibiotiques et des différents enzymes, et leur effet synergique pourrait être lié à l'effet répressif observé (Trivedi *et al.*, 2008).

En plus, les bactéries qui ont montré un effet antagoniste pour tous les champignons phytopathogènes sont toutes des souches *Pseudomonas* spp.. Des résultats identiques ont été rapportés par plusieurs études qui ont confirmé la grande efficacité des souches de *Pseudomonas* à inhiber des champignons phytopathogènes tels que *Rhizoctonia solani* (Rajkumar *et al.*, 2008 ; Gull & Hafeez, 2012) ; *Pyricularia oryzae* (Lucas *et al.*, 2009 ; Noori & Saud, 2012) et *Collectotrichum gleosporidose* OGC1 (Ramyasmruthi *et al.*, 2012).

Quant à l'inhibition de contact, elle pourrait être assurée principalement par la compétition sur les nutriments présents dans le milieu de culture. Ce type d'inhibition a été noté surtout en présence des souches obtenue de *L. hirsutus*. En plus, certaines bactéries testées ont montré les deux types d'inhibition selon l'agent pathogène, comme les souches GP70, GR18et Lh5. On en peut déduire que le mécanisme d'attaque induit chez certaines bactéries antagonistes, diffère selon les phytopathogènes.

4.4.3. Enzymes hydrolytiques

Suite au test qualitatif de production des enzymes hydrolytiques extracellulaires, 64% des isolats étudiés ont au moins une activité hydrolytique. La protéase est l'activité la plus abondante au sein des bactéries testées. De même, la production des enzymes à fonction hydrolytique a été identifiée chez les bactéries qui ont montré un effet inhibiteur sur des agents phytopathogènes, en particulier les champignons, telles que la chitinase et la protéase (Hamdali *et al.*, 2008b ; Gull & Hafeez, 2012 ; Ramyasmruthi *et al.*, 2012).

Cependant, Sindhu & Dadarwal (2001) ont rapporté que ces enzymes hydrolytiques ne sont pas souvent corrélées avec l'inhibition des champignons. Effectivement, dans cette étude, ces enzymes n'ont pas d'effet antagoniste important soit contre les bactéries ou les champignons phytopathogènes. Car, parmi les enzymes hydrolytiques les plus importants dans le biocontrôle contre les champignons phytopathogènes on trouve les chitinases, et les bactéries produisant cette enzyme dégradent la chitine, le constituant principal de la paroi fongique, et l'utilisent comme source d'énergie, provoquant ainsi la suppression de l'agent

phytopathogène. Néanmoins, certains isolats testés ayant l'enzyme à effet chitinolytique ne sont pas arrivés à inhiber aucun champignon testé, comme c'est le cas de deux souches PR66 et PR29.

Ahmad *et al.* (2008) ont isolé des rhizobactéries capables d'inhiber la croissance des champignons phytopathogènes en absence de production des chitinases par des bactéries antagonistes. Or, elles ont été capables de produire d'autres métabolites importants pour le biocontrôle, tels que l'HCN, l'ammoniac et les sidérophores.

5. EFFET D'INOCULATION DU RIZ AVEC LES BSP

5.1. Inoculation en pot

Le riz est l'une des céréales les plus cultivées dans le monde. De nombreux chercheurs ont rapporté que l'inoculation du riz avec des bactéries PGPR pouvait augmenter significativement la hauteur des plantes, les biomasses racinaires et aériennes et le rendement en grains (Meunchang *et al.*, 2006 ; Beneduzi *et al.*, 2008 ; Khalimi *et al.*, 2012 ; Ng *et al.*, 2012). Dans cet essai, le P était le facteur limitant, comme le montre clairement la réponse du riz à la fertilisation phosphatée (contrôle positif). Ce test d'inoculation du riz en pot a mis en évidence l'importance de certaines bactéries rhizosphériques qui peuvent stimuler la croissance de cette céréale. En effet, l'inoculation avec certaines bactéries sélectionnées a entraîné des augmentations significatives de différents paramètres étudiés en comparaison avec le contrôle négatif non inoculé. Après 30 jours, on a noté des stimulations significatives de la hauteur des tiges, du rendement en matière sèche des deux parties aériennes et racinaires, surtout en présence des souches PR29, GR70, PP22, GR1 et GP70, identifiées comme des *Aeromonas* spp. et *Pseudomonas* spp.. En comparaison avec le témoin positif, des stimulations significatives du rendement en matière sèche racinaire ont été obtenues avec ces dernières souches. Pour la matière sèche aérienne seule la souche PR29 a montré une stimulation significative dépassant celle obtenue en présence de P soluble (témoin positif).

Des résultats similaires ont été rapportés par Çakmakçi *et al.* (2006) qui ont obtenu une productivité significativement améliorée de betterave à sucre inoculée avec des PGPR et aussi une meilleure germination en comparaison avec les apports des fertilisants (azotés et phosphatés). Les PGPR évaluées consistaient en un mélange de bactéries fixatrices d'azote et des BSP, ce qui indique la possibilité d'intervention des autres paramètres dans la stimulation

du produit tels que la production des phytohormones. En conséquence, cette amélioration de la croissance du riz obtenue en présence des souches les plus efficaces telles que PR29, PP22 et GR70, pourrait être due à la production d'AIA en combinaison avec la solubilisation du P minéral.

D'ailleurs, des stimulations de croissance des différentes plantes inoculées avec des bactéries dissolvant le P et productrices d'AIA ont été rapportées par plusieurs travaux. En effet, une amélioration significative des paramètres de croissance et de la biomasse des racines du blé a été rapportée en présence des souches d'*Azotobacter chroococcum* dissolvant le P et produisant de l'AIA (Kumar *et al.*, 2001). Une augmentation de la croissance des racines et de la partie aérienne du riz a été obtenue en présence de la souche *Bacillus* sp. SVPR30 ayant plusieurs caractères PGP comme la solubilisation du P calcique, forte production d'AIA, de sidérophores et fixation libre d'azote atmosphérique (Beneduzi *et al.*, 2008). Des résultats analogues ont été obtenus par Shahab *et al.* (2009) pour l'haricot inoculé avec la souche *Pseudomonas aeruginosa* CMG860, capable de solubiliser le P et de produire de l'AIA.

Bien que l'enzyme ACC désaminase favorise l'élongation racinaire en hydrolysant le précurseur d'éthylène, l'ACC (Penrose & Glick, 2003), les bactéries ayant cette activité enzymatique dans cette présente étude, n'ont pas stimulé la croissance du riz, comme c'était le cas pour les deux souches ER76 et ER77. En présence de ces deux souches, on a noté un effet neutre ou même délétère, malgré qu'elles aient un fort pouvoir de solubilisation de phosphate tricalcique dans le milieu liquide.

Ces résultats pourraient être expliqués par l'insuffisance d'activité de l'enzyme ACC désaminase. Toutefois, Penrose et Glick (2003) ont confirmé que les microorganismes ayant différents niveaux d'activité enzymatique d'ACC désaminase peuvent réagir comme des PGPR. Et la stimulation de plante par ces PGPR à ACC désaminase n'est pas forcément liée au niveau d'activité enzymatique d'ACC (Penrose & Glick, 2003).

On peut déduire que cette enzyme n'est induite que dans des situations stressantes comme il a été rapporté dans la littérature (Glick *et al.* 2007a ; 2007b). Car le seul facteur de stress dans ce test d'inoculation c'était le manque du P soluble, et qui a été surmonté suite à la solubilisation du phosphate tricalcique par les deux souches.

En plus, les souches ER76 et ER77 ont produit de faibles concentrations d'AIA suite au test quantitatif. Ainsi, la production de l'AIA par les bactéries isolées de la rhizosphère des

plantes, et souvent associée à leur capacité à stimuler la croissance végétale. Cet effet a été affirmé par Patten et Glick (2002) qui ont obtenu une stimulation significative de développement racinaire de plantes du colza et d'haricot mungo, inoculées avec la souche *P. putida* GR12-2 productrice de l'AIA en comparaison avec son mutant AIA-déficient.

En conséquence, cette amélioration de la croissance obtenue pendant cette étude pourrait être due à la combinaison de deux activités phytobénéfiques : la production d'AIA et la solubilisation du P minéral plutôt qu'à l'enzyme ACC désaminase.

D'ailleurs, Il faut signaler que la bactérie PR29, qui était la plus performante en présence du riz, a été isolée de la rhizosphère de la même variété Puntal du riz utilisé dans le pot. Ainsi, on peut conclure que la réponse des plantes dépend fortement de la concentration d'AIA, ainsi que de la souche bactérienne et de son origine d'isolement (Patten & Glick, 2002 ; Ahmad *et al.*, 2005 ; Gravel *et al.*, 2007 ; Beneduzi *et al.*, 2008; Shahab *et al.*, 2009).

Alors que certaines bactéries n'ont eu aucun effet positif pour la croissance du riz, au contraire, certaines ont montré une inhibition significative concernant les rendements en matière sèche étudié en comparaison avec le contrôle négatif, tel que GR55, PP7 et PP17. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Hilali *et al.* (2001) qui ont rapporté l'existence de souches ayant un effet bénéfique, neutre ou même délétère malgré leur caractérisation *in vitro* pour certaines activités PGP. Cet effet négatif observé pourrait être causé par la production de métabolites à effet toxique ou inhibiteur pour la plante.

En effet, il a été démontré que la rhizosphère renferme des souches ayant un effet délétère sur la croissance des plantes et leur développement et qui est dû à la production de métabolites comme des phytotoxines, des hormones, ou à la compétition nutritionnelle (Nehl *et al.*, 1996 ; Sturz & Christie, 2003).

Ainsi, après la sélection des isolats phytobénéfiques en se basant sur les tests *in vitro* des différentes activités phytobénéfiques, un test d'inoculation est obligatoire afin d'évaluer l'effet de la bactérie en présence de la plante.

En conclusion, suite aux deux tests d'inoculation du riz en pot, on a choisi les trois souches les plus efficaces, PR29, PP22 et GR70 et une quatrième souche, ER76 retenue pour sa capacité d'ACC désaminase et aussi son fort pouvoir de solubilisation de P dans le milieu PVK liquide, pour l'inoculation du riz dans le champ.

5.2. Inoculation au champ

Parmi les nouvelles techniques d'identification moléculaire les plus pointues, on trouve celles basées sur l'amplification par la technique de PCR des familles de séquences intergéniques (Gao *et al.*, 2001). Ces familles regroupent des séquences courtes répétées et hautement conservées qu'on trouve surtout au sein du génome des bactéries Gram négatives. Parmi ces familles, on trouve l'élément BOX de 154 pb composé par trois unités : BoxA, BoxB et BoxC (Van Belkum & Hermans, 2001). Afin de caractériser les BSP triées de la rhizosphère du riz cultivé dans le champ, on s'est basé sur la technique de PCR-BOX.

En effet, pour révéler la diversité génétique des BSP nouvellement isolées, on a amplifié l'élément BoxA en utilisant l'amorce BoxA1R. Comme on a utilisé pour le test d'inoculation un mélange de quatre souches ; deux souches d'*Aeromonas* (PR29 et GR70) et deux autres de *Pseudomonas* (PP22 et ER76), la technique BOX-PCR nous a permis de distinguer entre les souches de même genre (Lanoot *et al.*, 2004).

Après l'extraction d'ADN génomique et l'amplification de la séquence répétée désignée, les profils électrophorétiques obtenus après la migration du produit de la BOX-PCR sur gel d'agarose, sont caractéristiques pour chaque isolat vue la conservation de ces séquences répétitives au sein des populations bactériennes. En se basant sur ces différents profils BOX, on a noté que les bactéries utilisées dans l'inoculation de la parcelle et celles isolées du champ sont génétiquement différentes en confirmant l'absence des bactéries-inoculants au niveau de l'échantillon de la rhizosphère analysé. Il est possible que ces quatre souches introduites soient endophytes ou éliminées par la microflore autochtone.

Nombreuses études ont rapporté que les PGPR, introduites à un sol, peuvent initialement coloniser les racines et l'entourage en arrivant à 10^7 - 10^8 UFC/g, mais après certaines semaines, souvent cette densité diminue (Tang *et al.*, 1995 ; Landa *et al.*, 2003). Or, Hameeda *et al.* (2008) ont ré-isolé les souches utilisées dans l'inoculation du maïs, *Serratia marcescens* EB 67 et *Pseudomonas* sp. CDB 35. En effet, les deux bactéries stimulatrices du maïs ont survécu au niveau de la rhizosphère de cette céréale dans les conditions de champ même 96 jours après le semis malgré qu'elles ont des origines différentes (Hameeda *et al.*, 2008).

De même, Khalimi *et al.* (2012) ont rapporté que 30 jours après le semis, la densité des deux souches, *Pantoea agglomerans* Pj et Bs, dans la rhizosphère du riz dont les graines ont été inoculées avec ces deux bactéries, a atteint 2.41×10^6 et 2.47×10^6 UFC/g respectivement. Ces

souches ont été obtenues de la rhizosphère d'arachide et elles se sont adaptées avec la rhizosphère du riz en favorisant la croissance de nouvelle plante hôte (Khalimi *et al.*, 2012).

Cependant, les résultats acquis dans la parcelle expérimentale en comparaison avec le contrôle (l'urée) et la parcelle organique (compost), soulignent l'efficacité des quatre BSP utilisées dans l'inoculation. En effet, et au cas où ces BSP ne sont pas des endophytes, l'augmentation du rendement en grains ainsi que l'amélioration de la qualité du produit (graines) obtenues dans la parcelle inoculée avec les quatre BSP retenues, pourraient être dues à l'effet synergique bénéfique conférée par ces PGPR dans les conditions naturelles, surtout aux premiers stades de croissance, malgré leur faible pouvoir de colonisation au cours du temps.

Telle conclusion a été affirmée aussi par Harris *et al.* (2006) qui ont rapporté que la colonisation des racines par une souche bénéfique à forte densité n'est pas souvent nécessaire pour avoir l'effet phytobénéfique prévu en faveur de la plante inoculée. En effet, ils ont eu une stimulation du rendement du blé inoculée avec une souche solubilisatrice du P minéral malgré qu'elle était la bactérie qui a montré une faible persistance en comparaison avec le reste des isolats (Harris *et al.*, 2006).

En conclusion, les bactéries dissolvant le P inorganique sont d'une grande importance pour l'agriculture, mais afin de bien profiter de P solubilisé par ces BSP et des autres nutriments disponibles dans le sol, les plantes ont besoin d'avoir un système racinaire bien développé afin d'avoir accès très important à l'eau et aux nutriments. En conséquence, il est préférable que la BSP sélectionnée pour l'inoculation doit se caractériser par la production des phytohormones, en particulier l'AIA, vue l'importance immense de cette hormone dans la stimulation de la croissance et son grand effet même à des concentrations minimales.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'usage des produits de synthèse, soit les fertilisants chimiques ou bien les pesticides, continue jusqu'à présent malgré leur contribution à une pollution importante de l'environnement et à un déséquilibre écologique considérable. Et il est nécessaire de développer des alternatives durables, moins coûteuses et écologiquement compatibles. L'approche biologique semble être la solution la plus prometteuse par recours à l'exploitation de la microflore rhizosphérique vue sa grande capacité à stimuler la croissance des cultures agricoles ainsi que son rôle important dans la protection contre différents pathogènes. Notre objectif à long terme c'est d'évaluer les rhizobactéries dissolvant le P calcique et les investiguer dans le but de recyclage de P dans les sols marocains.

Dans ce contexte, cette présente étude a conduit, pour la première fois, à l'isolement et à l'identification des souches BSP associées à certaines variétés du riz cultivé au Nord-Ouest du Maroc. En plus, d'autres isollements ont été obtenus à partir de légumineuses du Nord marocain. Des essais réalisés au laboratoire ont permis d'évaluer ces souches et d'examiner leurs différentes propriétés phytobénéfiques *in vitro*. Les bactéries retenues sont caractérisées par une diversité des activités phytobénéfiques, ayant effet stimulant, fertilisant ou bien protecteur.

Afin de confirmer la productivité de ces BSP comme PGPR, on a procédé au test d'inoculation en pot. Les résultats obtenus ont montré des stimulations significatives concernant la longueur du riz, ainsi que le rendement en matière sèche, surtout en présence des BSP produisant l'AIA. En conséquence, les bactéries dissolvant le P inorganique sont d'une grande importance pour l'agriculture, mais afin de bien profiter de P solubilisé par ces rhizobactéries et des autres nutriments disponibles dans le sol, les plantes ont besoin d'avoir un système racinaire bien développé assurant ainsi un accès très important à l'eau et aux nutriments.

Cette expérience a contribué à la sélection des bactéries les plus performantes en présence de la plante modèle, le riz, et qui pourraient être qualifiées comme PGPR vis-à-vis de cette céréale dans le champ. Il s'agit de trois souches, PP22, PR29 et GR70 qui ont donné des résultats importants concernant la croissance du riz et le rendement en poids sec, alors que la quatrième souche, ER76, c'est la bactérie qui a solubilisé plus du P *in vitro*. Les quatre souches ont été identifiées comme des bactéries appartenant aux *Pseudomonas* et *Aeromonas*. Afin de confirmer l'efficacité de ces souches comme biofertilisants dans les conditions naturelles, un autre test d'inoculation du riz, variété Puntal a été effectué au champ. Il s'agit

d'un inoculant combiné composé de quatre bactéries, PP22, PR29, GR70 et ER76. Ce test a permis d'évaluer l'effet des facteurs biotiques et abiotiques sur le comportement de ces quatre souches vis-à-vis du riz. Des résultats encourageants ont été obtenus concernant le rendement en grains ainsi que la qualité du produit en comparaison avec le contrôle fertilisé et la parcelle traitée avec le compost.

Cette étude ouvre donc des perspectives très intéressantes concernant les applications biotechnologiques visant une amélioration des rendements et la préservation de l'environnement pour un développement durable.

En effet, les résultats obtenus encouragent à :

- Poursuivre des expériences supplémentaires concernant l'inoculation avec les quatre bactéries, en particulier aux champs marocains, afin de mieux comprendre leur comportement au niveau de la rhizosphère dans les conditions naturelles (leur persistance au niveau de la rhizosphère, et à l'intérieur de la plante) et aussi d'optimiser les paramètres liés au volume d'inoculant appliqué, sa concentration, ainsi que l'intervalle séparant les différents ensemencements au cours de différents stades de croissance du riz, dans le but d'avoir une productivité plus importante que celle obtenue.
- Procéder des essais complémentaires d'inoculation *in vivo*, puis *in situ* avec des souches antagonistes en présence d'agents pathogènes (surtout *Pyricularia oryzae*) et de la plante (riz), afin d'élucider leur efficacité comme « biopesticides ».
- Essayer ces quatre bactéries sur d'autres céréales, en particulier le blé, et autres plantes d'intérêt agronomiques, pour évaluer leur effet comme PGPR.
- Tester la co-inoculation du riz avec un mélange des BSP efficaces et d'autres microorganismes phytobénéfiques tels que les endomycorhizes.
- Faire une identification plus précise des BSP sélectionnées par d'autres méthodes moléculaires : "MultiLocus Sequence Analysis" ou MSLA (identification d'espèces du même genre), hybridation ADN-ADN.....

- Produire un « bioinoculant » à base de ces bactéries efficaces, et c'est l'étape majeure d'exploitation des résultats obtenus pendant cette étude. Et d'ailleurs c'était le but à long terme de cette thèse de Doctorat.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahemad, M., Khan, M.S., 2010.** Plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. *EurAsia J. BioSci.* **4**: 88-95.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* **163**: 173-181.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S., 2005.** Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turk. J. Biol.* **29**: 29-34.
- Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C., 2006.** Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur. J. Plant Pathol.* **114**: 329-341.
- Alam, S., Khalil, S., Ayub N., Rashid, M., 2002.** *In vitro* Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Intl. J. Agric. Biol.* **4**: 454-458.
- Ames, B. N., 1966.** Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* **8**: 115-118
- Andrew, J.W., Jonathan, D., Andrew, R., Lei, S., Katsaridou, N.N., Mikhail, S., Rodionov, A.D., 2007.** Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other *α*-proteobacteria. *Biometals* **20**: 501-511.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., Lalande, R., 1998.** Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* **204**: 57-67.
- Antoun, H., Kloepper, J.W., 2001.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: *Encyclopedia of Genetics*. Brenner, S., Miller, J.F. (eds), Academic Press, New York, 1477-1480.
- Antoun, H., Prévost, D., 2005.** Ecology of plant growth promoting rhizobactérie. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (ed), Springer, The Netherlands, 1-39.
- Awasthi, R., Tewari, R., Nayyar, H., 2011.** Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: Effects on growth and physiology of crops. *International Research Journal of Microbiology* **2**(12): 484-503.
- Babana, A.H., 2003.** Mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali. *Thèse de doctorat*. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation de l'Université Laval Québec.

- Badawi, F.Sh.F., Biomy, A.M.M., Desoky, A.H., 2011.** Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. *Annals of Agricultural Science* **56**: 17-25.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C., 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239-243.
- Bakker, A.W, Schippers, B., 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. Biochem.* **19**: 451-7.
- Baldani, V.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1987.** Inoculation of fieldgrown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol. Fertil. Soil* **4**: 37-40.
- Banchio, E., Bogino, P.C., Zygadlo, J., Giordano, W., 2008.** Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology* **36**: 766-771.
- Bardgett, R.D., 2005.** Integrating below-ground ecology into sustainable grassland management. In: *Proceeding of a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress*. Jarvis, S.C., Murray, P.J., Roker, J.A. (eds), Optimisation of nutrient cycling and soil quality for sustainable grasslands, Oxford, 45-52.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., 2005.** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56** (417): 1761-1778.
- Bashan, Y., 1998.** Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture, *Biotech. Adv.* **16**: 729-770.
- Beauregard, M.S., 2010.** Impacts de la fertilisation phosphatée sur la biodiversité microbienne de sols agricoles. *Thèse de doctorat*. Faculté des Etudes Supérieures de l'Université Laval Montréal.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia, L.M.P., 2008.** Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology* **39**: 311-320.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codon, A.C., 2004.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* **7**(4): 249-260.
- Brick, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E., 1991.** Rapid *In situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 535-538.
- Brimecombe, M.J., De Lelj, F.A., Lynch, J.M., 2001.** The Rhizosphere. The Effect of Root Exudates on Rhizosphere Microbial Populations. In: *The Rhizosphere. Biochemistry and*

Organic Substances at the Soil-Plant Interface. Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (eds), Marcel Dekker, New York, 95-140.

Burk, D., 1930. The influence of nitrogen gas upon the organic catalysis of nitrogen fixing by *Azotobacter*. *Journal Physical Chemistry* **34**: 1174-1194.

Burr, T.J., Schroth, M.N., Suslow, T.V., 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathol.*, **68**: 1377-1383.

Bushman, L., Lamb, J., Randall, G., Rehm, G., Schmitt, M., 2009. The nature of phosphorus in soils. Phosphorus in the agricultural environment. *University of Minnesota Extension*.

Çakmakci, R., Dönmez, F., Aydın, A., Sahin, F., 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 1482-1487.

Cassán, F., Perrig, D., Sgroj, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V., 2008. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European journal of soil biology* **45** (1): 28-35.

Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J., 1999. Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 1670-1680.

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P., 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Plant Soil* **184**: 311-321.

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M. P., 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Micribiol.* **39**: 941-947.

Chang, C.H., Yang, S.S., 2009. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresour. Technol.*, **100**: 1648-1658.

Chen, Y.P., Rekha, P.D, Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* **34**: 33-41.

Chen, Z., Ma, S., Liu, L., 2008. Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. *Bioresource Technology* **99**: 6702-6707.

Cheng, Z., Park, E., Glick, B.R., 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 912-918.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H.M., Dekkers, L.C., Lugtenberg, B., 2000. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1340-1345.

Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., Sa, T., 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 1970-1974.

Del Campillo, M.C., Van der Zee, S.E.A.T.M., Torrent, J., 1999. Modelling long-term phosphorus leaching and changes in phosphorus fertility in excessively fertilized acid sandy soils. *Eur. J. Soil Sci.* **50**: 391-399.

Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Muñoz, J.A., González, F., Blázquez, M.L., Igual, J.M. García-Balboa, C., 2008. Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy* **92**: 124-129.

De Vleeschauwer D., Hofte M., 2007. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural resources, 2007.

De Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Maurhofer, M., 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4162-4174.

Durrant, W.E., Dong, X., 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 185-209.

Egamberdieva, D., Z. Kucharova, 2008. Cropping effects on microbial population and nitrogenase activity in saline arid soil. *Turk. J. Biol.* **32**: 85-90.

FAO., 2006. Utilisation des engrais par culture au Maroc 1er édition, Rome, 2006.

Foster, R.C., 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* **6**: 189-203.

Gao, J., Terefework, Z., Chen, W., Lindström, K., 2001. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *Journal of Biotechnology* **91**: 155-168.

Gerretsen, F.C., 1948. The influence of microorganisms on the phosphate uptake by the plant. *Plant Soil* **1**: 51-81.

Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J., 2007a. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol.* **119**: 329-339.

- Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B., 2007b.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**: 227-242.
- Goldstein, A.H., 2007.** Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. In: *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Velázquez, E., Rodríguez-Barrueco, C. (Eds), Springer, Dordrecht, 91-96.
- Gobat, J.P., Aragno, M., Matthey, W., 2004.** The Living Soil: Fundamentals of Soil Sciences and Soil Biology. Science Publishers, Enfield NH, USA, 475p.
- Goldstein, A.H., 1995.** Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hort.* **12**: 185-193.
- Gordon, S. A., Weber, R.P., 1951.** Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* **26**: 192-195.
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J., 2007.** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* **39**: 1968-1977.
- Gull, M., Hafeez, F.Y., 2012.** Characterization of siderophore producing bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. *African Journal of Microbiology Research* **6**(33): 6308-6318.
- Gutiérrez-Zamora, M. L., and Martínez-Romero, E., 2001,** Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.), *J. biotechnol.* **91**: 177-126.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., Poole, P.S., 2002.** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* **245**: 83-93.
- Haas, D., Defago, G., 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(4): 307-319.
- Haas, D., Keel, C., 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol.* **41**: 117-153.
- Halder, A.K., Mishra, A.K., Chakarbarthy, P.K., 1991.** Solubilization of inorganic phosphate by *Bradyrhizobium*. *Ind. J. Exp. Biol.* **29**: 28-31.
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M. J., Ouhdouch, Y., 2008a.** Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology* **38**: 12-19.

- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., Ouhdouch, Y., 2008b.** Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 2565-2575.
- Hamdali, H., Moursalou, K., Tchangbedji, G., Ouhdouch, Y., Hafidi, M., 2012.** Isolation and characterization of rock phosphate solubilizing actinobacteria from a Togolese phosphate mine. *Afr. J. Biotechnol.* **11**(2): 312-320.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O.P., Wani, S.P., Reddy, G., 2008.** Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research* **163**: 234-242.
- Harley, J.L., Smith, S.E., 1983.** Mycorrhizal symbiosis. *Academic press*, London et New York, 483p.
- Harris, J. N., New, P. B., Martin, P. M., 2006.** Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilising bacteria on plants. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 1521-1526.
- Hilali, A., Prévost, D., Broughton, W. J., Antoun, H., 2001.** Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc, *Can. J. Microbiol.* **47**: 590-593.
- Höfte, M., Bakker, P.A.H.M., 2007.** Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In: *Soil biology: Microbial siderophores*. Varma, A., Chincholkar, S.B. (eds), Springer, Berlin, 121-133.
- Hoster, F., Schmitz, J.E., Daniel, R., 2005.** Enrichment of chitinolytic microorganisms : Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 434-442.
- Huang, X.D., El-Alawai, Y., Gurska, J., Glick, B. R., & Greenberg, B. M., 2005.** A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal* **81**: 139-147.
- Hyoung, S.L., Munusamy, M., Kim, C.W., Choi, S., Chung, K.Y., Tong, M.S., 2006.** Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylotrophic isolates. *Biol Fertil Soils* **42**: 402-408.
- Illmer, H., Schinner, F., 1995.** Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 257-263.
- Jones, J.D.G., Dangl J.L., 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.

- Joseph, B., Patra, R.R., Lawrence, R., 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* **2**: 141-152.
- Jourdan, E., Ongena, M., Thonart, P., 2008.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**(4): 437-449.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N., Lugtenberg, B., 2006.** Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **19**: 250-256.
- Kang, S.C., Pandey, P., Khillon, R., Maheshwari, D.K., 2008.** Process of rock phosphate solubilization by *Aspergillus* sp PS 104 in soil amended medium. *Journal of Environmental Biology* **29**(5): 743-746.
- Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M., Sahin, F., 2007.** Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae* **114**: 16-20.
- Khalimi, K., Suprpta, D.N., Nitta, Y., 2012.** Effect of *Pantoea agglomerans* on growth promotion and yield of rice. *Agriculture Science Research Journals* **2**(5): 240-249.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S., Rasheed, M., 2009.** Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J. Agric. Biol. Sci.* **1**(1): 48-58.
- Kim, K.Y., Jordan, D., Krishnan, H.B., 1997.** *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbial Lett* **153**: 273-277.
- King, E.O., Ward, M.K., Randey, D.E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. and Clin. Med.* **44**: 301-307.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980.** *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease suppressive soils. *Current Microbiology* **4**: 317- 320.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Schroth, M.N., 1988.** *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. In: ISI Atlas of Science, Institute for Scientific Information, Philadelphia, 60-64
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R.M., 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**: 39-44.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M., Zhang, S.A., 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* **94**: 1259-1266.

- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., 1978.** Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, 879-882.*
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C., Negi, S., 2012.** Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. *Recent Research in Science and Technology* **4**: 01-05.
- Kumar, V., Behl, R.K., Narula, N., 2001.** Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiol. Res.* **156**: 87-93.
- Landa, B.B., Mavrodi, D.M., Thomashow, L.S., Weller, D.M., 2003.** Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* **93**: 982-994.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., Liu, Z., Swings, J., 2004.** BOX-PCR Fingerprinting as a Powerful Tool to Reveal Synonymous Names in the Genus *Streptomyces*. Emended Descriptions are Proposed for the Species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *System. Appl. Microbiol.* **27**: 84-92.
- Lemanceau, P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie* **12**: 413-437.
- Li, J., Ovakim, D.H., Charles, T.C., Glick, B.R., 2000.** An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Current Microbiology* **41**: 101-105.
- Lin, T.F., Huang, H.I., Shen, F.T., Young, C.C., 2006.** The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresour. Technol.* **97**: 957-960.
- Loqman, S., Ait Barka, E., Clément, C., Ouhdouch, Y., 2009.** Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 81-91.
- Lucas, J.A., Solano, B.R., Montes, F., Ojeda, J., Megias, M., Mañero, F.J.G., 2009.** Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research* **114**: 404-410.
- Malathi, P., Viswanathan, R., Padmanaban, P., Mohanraj, D., Ramesh Sundar, A., 2002.** Microbial detoxification of *Colletotrichum falcatum* toxin. *Current Science* **83**: 745-749.

- Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C., Höfte, M., Bakker, P.A.H.M., 2005.** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 177-185.
- Meunchang, S., Thongra-Ar, P., Sanoh, S., Kaewsuralikhit¹, S., Ando, S., 2006.** Development of Rhizobacteria as a biofertilizer for rice production. *International workshop on sustained management of the soil-rhizosphere system for efficient crop production and fertilizer use*, Land Development Department, Bangkok, 1-7.
- Morales-García, Y.E., Juárez-Hernández, D., Aragón-Hernández, C., Mascarua-Esparza, M.A., Bustillos-Cristales, M.R., Fuentes-Ramírez, L.E., Martínez-Contreras, R.D., Muñoz-Rojas, J., 2011.** Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología* **43**: 287-293.
- Morgan, J.A.W., Whipps, J.M., 2001.** Methodological approaches to the study of rhizosphere carbon flow and microbial population dynamics. In: *The Rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant Interface*. Pinton, A., Varanini Z., Nannipieri P. (eds), Marcel Dekker, New York, 373-409.
- Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E., Granhall, U., 2013.** Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **12**: 73-84.
- Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J., 2003.** Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth, *Microb. Ecol.* **46**: 454-464.
- Naiman, A.D., Latronico, A., Salamone, I.E.G., 2009.** Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* : Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology* **45**: 44-51.
- Nautiyal, C., 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 265-270.
- Nehl, D.B., Allen, S.J., Brown, J.F., 1996.** Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl. Soil Ecol.* **5**: 1-20.
- Ng, L.C., Sariah, M., Sariam, O., Radziah, O., Abidin, M.A.Z., 2012.** Rice seed bacterization for promoting germination and seedling growth under aerobic cultivation system. *Australian Journal of Crop Science* **6**(1): 170-175.
- Nico, M., Ribaudó, C.M., Gori, J.I., Cantore, M.L., Cura, J.A., 2012.** Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Appl. Soil Ecol* **61**: 190-195.

Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., Thonart, P., 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology Agronomy Sociology and Environment* **15**: 327-337

Noori, M.S.S., Saud, H.M., 2012. Potential Plant Growth-Promoting Activity of *Pseudomonas* sp Isolated from Paddy Soil in Malaysia as Biocontrol Agent. *J Plant Pathol Microb.* **3**: 120. doi:10.4172/2157-7471.1000120.

Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimarães, C.T., Schaffert, R.E., Sá, N.M.H., 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol. Biochem.* **41**: 1782-1787.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* **9**: 1084-1090.

Ongena, M., Thonart, P., 2006. Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. In: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Teixeira da Silva, J.A. (ed), Global Science Books, Japan, 447-463.

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae* **111**: 38-43

Ozanne, P.G., 1980. Phosphate nutrition of plants: A general treatise. In: *The Role of Phosphorus in Agriculture*. Khasawneh, F.E., Sample, E.C., Kamprath, E.J. (Eds), American Society of Agronomy, Madison WI., 559-589.

Pan, B., Vessey, J.K., 2001. Response of the endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* on solid media to changes in atmospheric partial O₂ pressure, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4694-4700.

Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3795-3801.

Peix, A., Mateos, P.F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E., Velazquez, E., 2001a. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber condition. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**: 1927-1935.

Peix, A., Rivas-Boyer, A. A., Mateos, P. F., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E., Velazquez, E., 2001b. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate

solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 103-110.

Penrose, D.M., Glick, B.R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobactérie. *Physiol. Plant.* **118**: 10-15.

Pérez, E., Sulbaràn, M., Ball, M.M., Yarzàbal, L.A., 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 2905-2914.

Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R., Guckert, A., 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (3): 948-955.

Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* **17**: 362-370.

Piromyou, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N., 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology* **47**: 44-54.

Pradhan, N., Sukla, L.B., 2005. Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil. *African J. Biotechnol.* **5**: 850-854.

Prasanna, A., Deepa, V., Murthy, P.B., Decaraman, M., Sridhar, R., Dhandapani, P., 2011. Insoluble phosphate solubilization by bacterial strains isolated from rice rhizosphere soils from southern India. *International Journal Soil Science* **6**(2): 134-141.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M., De Souza, J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 537-547.

Rajkumar, M., Lee, K.J., Freitas, H., 2008. Effects of chitin and salicylic acid on biological control activity of *Pseudomonas* spp. against damping off of pepper. *South African Journal of Botany* **74**: 268-273.

Ramyasmruthi, S., Pallavi, O., Pallavi, S., Tilak, K., Srividya, S., 2012. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research* **2** (1): 16-24.

Ramesh, R., Joshi, A.A., Ghanekar, M.P., 2009. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World J. Microbiol Biotechnol.* **25**: 47-55.

- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., Latif, F., 2004.** Organic acids production and phosphates solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **7**: 187-196.
- Reed, M.L.E., Glick, B.R., 2005.** Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 1061-1069.
- Rigaud, J., Puppo, A., 1975.** Indole-3-acetic-acid catabolism by soybean bacteroids. *Journal of General Microbiology* **88**: 223-228.
- Rodriguez, H., Fraga, R., 1999.** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**: 319-339.
- Rosas, S.B., Andrés, J.A., Rovera, M., Correa, N.S., 2006.** Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology & Biochemistry*. **38**: 3502-3505.
- Rudresh, D.L., Shivaprakash, M.K., Prasad, R.D., 2005.** Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Applied Soil Ecology* **28**: 139-146.
- Sagervanshi, A., Kumari, P., Nagee, A., Kumar, A., 2012.** Media optimization for inorganic phosphate solubilizing bacteria isolated from anand argiculture soil. *International Journal of Life Science & Pharma Research* **2**(3): 245-255.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S., 2007.** Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**: 635-48.
- Sapsirisopa, S., Chookietwattana, K., Maneewan, K., Khaengkhan, P., 2009.** Effect of salt-tolerant *Bacillus* inoculum on rice KDML 105 cultivated in saline soil. *Asian J. Food Agro Ind.* 69-74.
- Saul, G.R., Kearney, G.A., Flinn, P.C., Lescun, C.L., 1999.** Effect of superphosphate fertilizer and stoking rate on the nutritive value of perennial ryegrass and subterranean clover herbage. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**: 537-545.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., 2006.** Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* **29**: 909-918.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1997.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
- Shahab, S., Ahmed, N., Khan, N.S., 2009.** Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *Afr. J. Agric. Res.* **4** (11): 1312-1316.

- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2002.** Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in tomato against *Meloidogyne javanica*. *J. Phytopath.* **150**: 469-472.
- Sindhu, S.S., Dadarwal, K.B., 2001.** Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiol. Res.* **156**: 353-358.
- Singh, G., Mukerji, K.G., 2006.** Root exudates as determinant of rhizospheric microbial biodiversity. In: *Microbial activity in the rhizosphere*. Mukerji, K.G, Manoharachary, C., Singh, J. (eds.), Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 39-53.
- Son, H.J., Park, G.T., Cha, M.S., Heo, M.S., 2006.** Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology* **97**: 204-210.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., 2003.** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobactérie. *Soil Till. Res.* **72**: 107-123.
- Stevenson, F.J., 1986.** Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur micronutrients. John Wiley & Sons, New York.
- Tanaka, H., Kyaw, K.M., Toyota, K., Motobayashi, T., 2006.** Influence of application of rice straw, farmyard manure and municipal biowastes on nitrogen fixation, soil microbial biomass N and mineral N in a model paddy microcosm. *Biol Fertil Soils* **42**: 501-505.
- Tang, W., Pasternak, J.J., Glick, B.R., 1995.** Persistence in soil of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 and genetically manipulated derived strains. *Can. J. Microbiol.* **41**: 445-451.
- Tarnawski, S., Hamelin, J., Locatelli, L., Aragno, M., Formin, N., 2003.** Examination of Gould's modified S1 (mS1) selective medium and Angle's non-selective medium for describing the diversity of *Pseudomonas* spp. In soil and root environments. *FEMS Microbiology Ecology* **45**: 97-104.
- Tao, G.C., Tian, S.J., Cai, M.Y., Xie, G.H., 2008.** Phosphate-Solubilizing and -Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. *Pedosphere*. **18**(4): 515-523.
- Terano, H., Nomoto, K., Takase, S., 2002.** Siderophore production and induction of iron-regulated proteins by a microorganism from rhizosphere of barley. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (11): 2471-2473.
- Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L.M.S., 2008.** In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. *Microbiological Research* **163**: 329-336

- Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y., 2003.** Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* **149**: 1981-1989.
- Van Belkum, A., Hermans, P.W.M., 2001.** BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 48 of *Antibiotic Resistance Methods and Protocols*, Gillespie, S.H. (ed), Humana, Totowa NJ, 159-168.
- Vassilev, A., Berova, M., Zlatev, Z., 1998.** Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biologia Plantarum* **41**(4): 601-606.
- Vassilev, N., Vassileva, M., 2003.** Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 435-440.
- Vassileva, M., Vassilev, N., Fenice, M., Federici, F., 1998.** Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphate and P plant acquisition. *Bioresource Technol.* **79**: 263-271.
- Verma, S.C., Ladha, J.K., Tripathi, A.K., 2001.** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* **91**:127-141.
- Vessey, J.K., 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**: 571-586.
- Villarreal-Sanchez, J.A., Ilyina, A., Mendez, L.P., Torres, V.R., Rodriguez, R., Lopez B.C., Martinez, J.R., 2003.** Isolation of microbial groups from a seaweed extract and comparison of their effects on a growth of pepper culture (*Capsicum Annuum L.*). *Áecth. Mock* **44**: 92-96.
- Wang, C., Knill, E., Glick, B.R., Défago, G., 2000.** Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 898-907.
- Whipps, J.M., 2001.** Microbial interactions and biocontrôle in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**: 487-511.
- Whipps, J.M., 1990.** Carbon economy. In: *The rhizosphere*. Lynch, J.M. (ed), John Wiley, Chichester, 59-97
- Whitelaw, M.A., 2000.** Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advan. Agron.* **69**: 99-144.

Wild, A., 1988. Russell's soil conditions and plant growth. Wild, A. (ed), Longman, London, 113-167.

Wu, C., Wei, X., Sun, H.L., Wang, Z.Q., 2005. Phosphate availability alters lateral root anatomy and root architecture of *Fraxinus mandshurica* rupr. seedlings. *Journal of Integrative Plant Biol.* **47** (3): 292-301.

Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F., Stolfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P. F., Ladha, J. K., and Dazzo, F. B., 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* **194**: 99-114.

ANNEXES

Annexe 1

Isolement des *Pseudomonas* spp.**King B**

Peptone	10g
Glycérol	10 ml
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄	1.5 g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 7.2. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20min.

Isolement des BSP

PVK

Glucose	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
NaCl	0.2g
KCl	0.2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.1g
MnSO ₄ , H ₂ O	0.002g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.002g
Extrait de levure	0.5g
Phosphate tricalcique (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	5g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 6,9 et le milieu est autoclavé à 121°C pendant 20min.

Annexe 2**Autres milieux classiques utilisés pour l'isolement des BSP**

YED

Glucose	10g
Extrait de levure	5g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 6.8-7.0, Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20min. On y ajoute 2% (v/v) d'une solution stock stérile de phosphate tricalcique à 10%

NBRIP

Glucose	10g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25g
KCl	0.2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 6.8-7.0, Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20min.

Annexe 3

Activités PGP des BSP

Production des sidérophores

CAS	
Fraction A	
CAS (Chrome Azurol S)	60.5 mg
Solution ferrique (1mM FeCl ₃ .6H ₂ O, 10mM HCl)	10ml
Eau bidistillée	50ml
Fraction B	
Hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (HDTMA)	72.9 mg
Eau bidistillée	40ml
Fraction C	
Pipes	30.24 mg
Agar	15g
Eau distillée	750ml

Après l'autoclavage des fractions (A+B) et C à 120°C pendant 20min, on les mélange en donnant un milieu de couleur bleu verdâtre.

Fixation d'azote (Nitrogénase)

Burk	
Saccharose	20g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.02g
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0.29g
Fe-EDTA (1.64%)	4ml
Eau distillée	Compléter à 1L

Après la stérilisation du milieu à 120°C pendant 20min, on y ajoute 4% de tampon phosphate 0.5M.

Annexe 3 (suite)

Hydrolyse d'urée (Uréase)

Uréase	
Glucose	1g
Peptone	1g
NaCl	0.5g
KH ₂ PO ₄	2g
Rouge de phénol	0.012g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 7. Après la stérilisation du milieu à 120°C pendant 20min et son refroidissement à 45°C, on y ajoute 50ml d'urée à 40% stérilisée par filtration

Composition du milieu minimum (MM9)

M9	
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	12.8g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0.5g
NH ₄ Cl	1g
MgSO ₄ (1M)	2ml
glucose (20%)	20ml
CaCl ₂ (1M)	0.1ml
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 6.8-7.0. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20min.

Annexe 4

Composition des milieux de culture utilisés pour la détection des exo-enzymes hydrolytiques

Activité chitinolytique

Chitine colloïdale	
Chitine colloïdale *	0.8g
K ₂ HPO ₄	2.7g
KH ₂ PO ₄	0.3g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.7g
NaCl	0.5g
KCl	0.5g
Extrait de levure	0.13g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 6.8-7.0. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20min.

*Chitinase colloïdale

Préparation de la chitine : On mélange 4g de la chitine (Sigma C7170, Chitin from crab shells) avec 36ml de HCl concentré. Le mélange est mis en agitation pendant 2h pour se dissoudre. Le mélange est de couleur marron. On verse ce mélange dans une éprouvette de 1l, et on complète à 1l par l'eau distillée, on remue l'éprouvette pour homogénéiser le contenu et on laisse se décanter pendant une nuit. On élimine le surnageant ayant la couleur claire, on complète de nouveau par l'eau distillée à 1l, et on laisse se décanter toute la nuit. On répète les mêmes étapes 4 fois. Après le dernier lavage, la solution se mélange vigoureusement et on la passe à travers un tamis métallique de 0,5 mm et se conserve dans une bouteille opaque à 4°C.

Activité amylolique

Amidon de pomme de terre	
Amidon soluble	10g
Extrait de levure	3g
Peptone	5g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 6.8-7.0. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20min.

Annexe 4 (suite)

Activité cellulolytique

CMC	
Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0,5g
NH ₄ Cl	1g
Extrait de levure	3g
CMC	7g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 6.8-7.0. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20min.

Activité lipolytique

Tributyryne	
Tributyryne	5ml
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Agar	20g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 7.2. Le mélange est soumis aux ondes soniques (10min) pour l'homogénéiser, puis il s'autoclave à 120°C pendant 20min.

Activité protéolytique

Agar lait	
Fraction A	
Lait en poudre	50g
Eau distillée	500ml
Fraction B	
Agar	20g
Eau distillée	500ml

La fraction A est autoclavée à 115°C pendant 10min. La fraction B est autoclavée à 120°C pendant 20min. Après la stérilisation et à une température de 55-60°C, on mélange les deux fractions aseptiquement, puis on verse dans les boîtes de Pétri.

Annexe 5

Préparation des échantillons LPS (Lipo-polysaccharide)

Préparation des échantillons

1^{er} jour

- Un volume de 1,5ml du milieu de culture bactérienne fraîche est centrifugé à 13000rpm pendant 5min. Le culot est suspendu dans 1ml de NaCl à 0,9% afin d'être lavé. Le mélange est vigoureusement mixé en utilisant le vortex, puis centrifugé à 8000rpm pendant 5min. On garde le culot. Cette étape est répétée 4 fois. Par la suite, le culot est repris dans 125µl de tampon 1 (60mM Tris-HCl, SDS à 2%, 1mM EDTA, pH 6.8). Le mélange est fermement mixé en utilisant le vortex, puis porté à l'ébullition pendant 6min. On y ajoute 875µl de tampon 2 (60mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 6.8), et les tubes sont bien mixés. On y ajoute 3µl d'ARNase (10 mg/ml) et 10µl d'ADNase (1 mg/ml). Le mélange est incubé 4 à 5 heures à 37°C. On y ajoute 15µl de protéinase K (1mg/ml), et on incube le mélange de nouveau pendant une nuit à 37°C.

2^{ème} jour

- On ajoute au mélange 15µl de protéinase K (1mg/ml). Le mélange est encore incubé pendant une nuit à 37°C.

3^{ème} jour

- Un volume de 350µl du mélange est transféré à un nouveau tube d'Eppendorf, et le reste est conservé à -20°C. On y ajoute le même volume de tampon de charge. Les échantillons sont bouillis durant 6min, puis centrifugés à 12000rpm pendant 7min. Un volume de 600µl de surnageant est transféré à un nouveau tube d'Eppendorf. Ce sont les échantillons qui vont servir à charger les gels d'électrophorèse SDS-PAGE.

Annexe 5 (suite)

Préparation des solutions

Tampon 1	
Tris	1.45g
EDTA	74.4mg
SDS	4g
Eau distillée	200ml
pH est ajusté à 6,8 avec HCl 1M	
Tampon 2	
Tris	1.45g
EDTA	74.4mg
Eau distillée	200ml
pH est ajusté à 6,8 avec HCl 1M	
Tampon de charge	
Tampon 1	5,9ml
Glycérol pur stérile	4ml
Solution saturée de bleu de bromophénol	0,6ml
β -mercaptoéthanol	0,8ml

Préparation des gels d'acrylamide (SDS-PAGE)

Le gel utilisé pour l'électrophorèse SDS-PAGE est composé par deux parties : un gel de concentration et un gel de séparation. Les quantités de chaque solution utilisée dans la préparation des deux gels de polyacrylamide en utilisant l'appareil Mini Protean II (Bio-Rad) sont présentées dans le tableau suivant :

- Gels d'acrylamide

Composition	Gel de séparation	Gel de concentration
Eau distillée	3.6ml	2.35ml
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	-	945 μ l
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5ml	-
SDS 10% (p/v)	100 μ l	37.5 μ l
40% Acrilamide/Bis (29:1)	3.73ml	375 μ l
TEMED	10 μ l	4 μ l
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)	66.6 μ l	30 μ l

Les tampons utilisés pour la préparation des gels sont les suivants :

Annexe 5 (suite)

- **Préparation des tampons**

Tampon du gel de séparation

Tris	6g
Eau distillée	150ml
pH est ajusté à 8.8 avec HCl 1M	
Compléter à 300ml	

Tampon du gel de concentration

Tris	54.45g
Eau distillée	60ml
pH est ajusté à 6,8 avec HCl 1M	
Compléter à 100ml	

La solution de gel de séparation est coulée entre les deux lames de verre de l'appareil d'électrophorèse en laissant une hauteur de 3 à 4 cm pour le second gel (le gel de concentration). Afin de se débarrasser des bulles d'air et obtenir une surface lisse, on ajoute sur la surface d'éthanol absolue. Après le temps nécessaire pour la polymérisation du gel de séparation de 20 à 30min, on jette l'éthanol, on rince abondamment avec d'eau distillée, puis on dessèche avec du papier filtre sans toucher la surface du gel. On verse par la suite le 2eme gel, le gel de concentration jusqu'au bord supérieur. Enfin, on y insère le peigne de manière qu'il n'y ait pas de bulle d'air. Après la solidification du gel (20-30min), le peigne est enlevé, puis le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse qui est rempli avec le tampon de migration

- **Tampon de migration 5X**

Tris	15g
Glycine	72g
SDS	50g
Eau distillée	Compléter à 1L

Le pH est ajusté à 8.3

Les échantillons sont déposés dans les puits (15 μ l) du gel. La migration se fait d'abord à 200V pendant 10min (pré-run), puis à 170V. L'électrophorèse est arrêtée une fois que le bleu de bromophénol atteint environ 1cm du bas du gel.

Annexe 5 (suite)

Après la fin de la migration, les gels se sont révélés selon les étapes suivantes :

- **Fixation**

On incube le gel pendant 3h en agitation dans une solution composée par l'éthanol à 30% (v/v) et acide acétique à 10% (v/v).

- **Oxydation**

On met le gel pendant 10min et en agitation dans une solution composée par périodate de sodium à 0.7% (p/v) dissout dans la solution de fixation.

- **Coloration**

Le gel est coloré au nitrate d'argent à 0.1% de (p/v), toujours en agitation et à l'obscurité. Après 30min, le gel est lavé avec de l'eau distillée.

- **Révélation**

Les différentes bandes sont visualisées en utilisant comme réactif le carbonate de sodium à 3% (m/v) et formaldéhyde à 0.035% préparés dans l'eau distillée. Une fois les bandes bien claires, on ajoute d'eau distillée pour arrêter la coloration.

Annexe 6

Dosage du P solubilisé

Dosage de phosphore solubilisé (Méthode d'AMES)

- **Réactifs**

Solution A : acide ascorbique à 10% (poids/volume)

Solution B : molybdate d'ammonium ($4\text{H}_2\text{O}$) à 0,42% est dissout dans l'acide sulfurique à 1N.

- **Procédure**

Préparer le réactif combiné en mélangeant 1 volume de A et 6 volumes de B et laisser dans la glace pour la journée. On ajouter 2,1 ml de réactif combiné à 0,9 ml d'échantillon, puis, on incube le mélange réactionnel pendant 20 min à 45 °C. L'absorbance est lue à 820 nm.

La concentration de P soluble a été calculée d'après la courbe d'étalonnage de KH_2PO_4 préparée comme suivant :

- **Solution mère de 100mg de P/l**

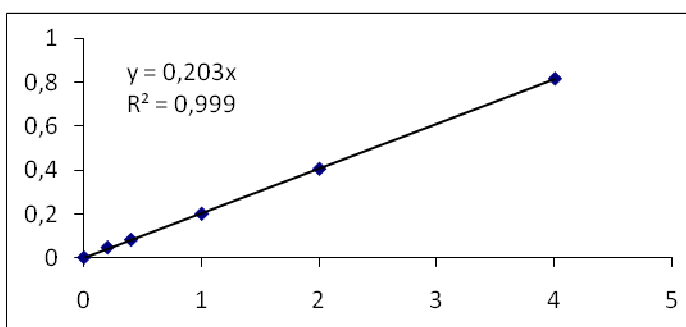
On prépare une solution étalon de phosphore de 100mg de P/l en dissolvant 0,4394g de KH_2PO_2 dans environ 800ml d'eau distillée, puis on complète à 1000ml.

- **Solutions étalons de phosphore**

Dans une série des fioles de 100ml on introduit des volumes croissant de la solution mère de phosphore et on complète à 100ml avec de l'eau distillée.

- **Courbe étalonnage**

Concentration de P (mg/l)	Absorbance à 820nm
0	0
0.2	0.046
0.4	0.081
1	0.2
2	0.405
4	0.817



Annexe 7

Dosage d'AIA produit

- *Solution stock de 0.1mg/ml d'AIA*

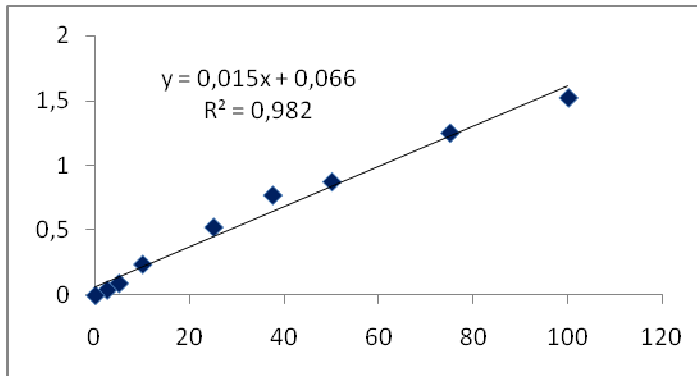
On prépare une solution mère de 100mg/ml en dissolvant 0,5g d'AIA en 5ml d'éthanol 96%. A partir de cette solution mère, on prépare une deuxième solution de 1mg/ml en utilisant l'eau distillée au lieu d'éthanol. La deuxième solution est encore diluée afin de préparer la troisième solution ayant une concentration de 0.1mg/ml d'AIA.

- *Solutions étalons d'AIA*

Dans une série des tubes, on introduit des volumes croissant en μl de la solution stock de 0.1mg/ml d'AIA et on complète à 1ml avec le milieu M9. On ajoute à ces tubes 4ml du réactif de Salkowski.

- *Courbe étalonnage*

Concentration d'AIA (mg/ml)	Absorbance 535nm
0	0.002
2.5	0.044
5	0.095
10	0.241
25	0.526
37.5	0.772
50	0.875
75	1.250
100	1,520



Annexe 8

Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique d'une manière manuelle utilisant le phénol chloroforme :

On transfère un volume de 1,5ml d'une culture bactérienne d'une nuit à un tube Eppendorf stérile. Les tubes sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 3min. On garde le culot auquel on ajoute 565µl de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8). Puis, on mélange les tubes vigoureusement en utilisant le vortex. On y ajoute 30µl de détergeant SDS à 20% et 5µl de protéinase K (20mg/ml). Par la suite, les tubes sont mixés vigoureusement et incubés à 37°C pendant une nuit. Après, les lysats sont agités délicatement, puis on y ajoute 600µl du phénol/chloroforme. Les tubes sont bien mélangés par le vortex, et centrifugés à 13 000rpm pendant 5min. La phase supérieure est transférée à un nouveau tube Eppendorf stérile, et auquel on rajoute 600µl de phénol/chloroforme. Les tubes sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 5min. cette étape est répétée plusieurs fois jusqu'à la disparition de la couche blanchâtre correspondante aux protéines. Afin d'éliminer le phénol, la phase supérieure est transférée à un nouveau tube Eppendorf stérile, auquel on ajoute le même volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1). Les tubes sont centrifugés à 13 000rpm pendant 3min. Pour faire précipiter l'ADN, la phase supérieure est transférée à un autre tube Eppendorf, et reçoit 60µl d'acétate d'ammonium (7,5M) et 480µl d'isopropanol. Les tubes sont centrifugés à 13 000rpm pendant 20min. Le culot obtenu et qui correspond à l'ADN est lavé avec l'éthanol 70% froid (300µl à 500µl). Après la centrifugation (13 000 rpm, 3min), le culot est séché sous vide, puis suspendu dans 150-200µl de TER (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 10mg/ml ARNase, pH 8). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 15min-20min, puis conservés à -20°C.

Annexe 9

Solution nutritive utilisée pour les plantes de riz

Solution nutritive de Rigaud & Puppo

KNO ₃	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
K ₂ SO ₄	0.2 g
(avec P) KH ₂ PO ₄ / sans P	0.2 g/0g
Cl ₂ Ca 2H ₂ O	0.1 g
Fe-EDTA	0.02 g
Solution de Gibson	1 ml
H ₂ O distillée	Compléter à 1 L

Le pH du milieu est ajusté à 6,5-7,0. Le milieu est autoclavé pendant 20 min à 121°C.

Solution de Gibson (de micronutriments)

H ₃ BO ₃	2.86 g
MnSO ₄ · H ₂ O	2.08 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08 g
Na ₂ MoO ₄	0.13 g
H ₂ O distillée	Compléter à 1 L