

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Béjaia (UAMB)
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*

*Département de microbiologie
Option : microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes*

Mémoire de Magister

Présenté par

Mme DAHEL-ADOUR Djamila

**En vue de l'obtention du Diplôme de Magister
En biologie**

Thème

**Isolement de bactéries stimulatrices de la croissance de l'orge et mise
en évidence de leur effet antifongique contre les phytopathogènes**

Devant le jury:

Mr BENALLAOUA S.	Président	Professeur	UAMB
Mr NABTI El-H.	Rapporteur	MCA	UAMB
Mr AISSAT K.	Examineur	MCA	UAMB
Mme BEDJOU F.	Examinatrice	MCA	UAMB

Année universitaire 2012/2013

Remerciement

*Je tiens particulièrement à remercier Monsieur **NABTI El-H** pour m'avoir fait l'honneur d'être le rapporteur de mon mémoire, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.*

*J'ai l'honneur de formuler ma gratitude et profonde reconnaissance à l'égard du Professeur **BENALLAOUA. S** d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance*

*Je suis reconnaissante Au Docteur **BEDJOU. F** d'avoir manifesté de l'intérêt pour ce travail en me faisant l'honneur de le juger et d'examiner ce manuscrit*

*Je tiens à remercier profondément Docteur **AISSAT. K** d'avoir donné de son temps pour examiner et corriger ce travail*

Merci à tous mes collègues du laboratoire et à toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Ce mémoire représente l'aboutissement du soutien, d'affection et des encouragements que mes parents m'ont prodigués tout au long de ma vie, les mots que j'écrirai ne pourront pas suffire pour vous exprimer ma gratitude. Alors ma douce maman et mon gentil papa, que j'ai tout le temps embêté, je vous dis simplement, je vous aime !

A mon mari pour sa patience et ces encouragements qui m'ont aidé à surmonter les difficultés rencontrées au cours de cette année.

A mes frères et sœurs

A ma deuxième famille (belle mère, beau père, belles sœurs et beaux frères)

A ma grande famille

A mes amies

A toutes mes copines de la promotion

A toute personne intéressée par ce modeste travail

Liste des abréviations

PGPR: plant growth promoting rhizobacteria

ACC: acide aminocyclopropane carboxylique

ISR : résistance systémique induite

SAR: résistance systémique acquise

ROS: espèces réactives de l'oxygène

AM: Mycorhizes Arbuscules

A_w : activité de l'eau

EPS : exo-polysaccharide

LPS : lipopolysaccharide

IAA : acide indole acétique

PCA : plate count agar

YMA : yeast mannitol agar

TSA : trypticase Soja Agar

NFB : Nitrogen Fixing Bacteria

PGI: pourcentage d'inhibition

Liste des figures

Figure 01 : épi d'orge à deux rangs (gauche) et à six rangs (droite) (Adapté de Leonard et Martin 1973).....	20
Figure 02 : plante d'orge	20
Figure 03 : La jaunisse nanisante de l'orge.....	25
Figure 04 : symptômes de rhynchosporiose sur feuilles	26
Figure 05 : symptômes des stries foliaires sur l'orge	26
Figure 06 : symptômes de l'oïdium sur feuille de l'orge	26
Figure 07 : symptômes de ramulariose sur feuille de l'orge.....	27
Figure 08 : symptômes de charbon de l'orge	27
Figure 09 : symptômes de l'ergot.	28
Figure 10 : symptômes de septoriose.	28
Figure 11 : symptômes de fusariose sur la graine.	28
Figure 12 : Photo des pots semés avec les graines de l'orge.....	33
Figure 13 : Résultats du test de germination de l'orge au laboratoire..	44
Figure 14 : Longueurs des tiges de l'orge inoculée par les différentes 20 souches choisit.	46
Figure 15: Quelques activités	51
Figure 16 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence des souches isolées	62
Figure 17 : Quelques activités antifongiques	62
Figure 18 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de <i>Streptomyces albogriseolus</i>	63
Figure 19 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de <i>Micrococcus luteus</i>	65
Figure 20 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de <i>Bacillus megaterium</i>	66
Figure 21 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de <i>Pseudomonas sp.</i>	68

Liste des tableaux

Tableau I : agents de lutte biologique commercialisés pour la lutte contre les agents pathogènes du sol.....	12
Tableau II : Antibiotiques produits par Rhizobacteria.....	15
Tableau III : Origine des différents échantillons du sol et leurs caractéristiques.....	30
Tableau IV : Les valeurs de l'humidité des différents échantillons.....	43
Tableau V : Les valeurs du pH-eau et pH-KCl des différents échantillons.....	43
Tableau VI : Caractères biochimiques et physiologiques des quatre souches étudiées.....	47
Tableau VII : Matrice des similarités basée sur 1150 nucléotides du gène d'ADNr 16S des souches	48
Tableau VIII : Résultats des différentes activités testées pour les 04 souches.....	52

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I : Généralité sur les microorganismes de la rhizosphère

I. PGPR.....	3
II. Mécanismes indirects des PGPR	4
II.1. Fixation de l'azote libre.....	4
II.2. Production de sidérophores	5
II.3. Solubilisation du phosphore	6
III. Mécanismes directs des PGPR.....	6
III.1. Modification du taux de régulateurs de croissance des plantes	7
III.2. Induction de la résistance systémique	8
IV. Mycorhizes arbuscules (AM).....	9

Chapitre II : Microorganismes impliqués dans la lutte biologique

I. Définition de la lutte biologique	11
II. Critère de sélection des agents de lutte biologique	13
III. Mécanismes de l'antagonisme.	13
III.1. Hyperparasitisme (ou mycoparasitisme chez les champignons)	13
III.2. Antibiose (ou formation de substances antibiotiques).....	13
III.3. Compétition nutritive	15
III.4. Modification du milieu	16
III.5. Production d'enzymes hydrolytiques.....	16
III.6. Inhibition des enzymes ou des toxines produites les par microorganismes	17
III.7. Induction des mécanismes de défense de plante	17

Chapitre III : généralités sur l'orge

I. La production céréalière	19
II. Description de la plante de l'orge	19
III. Écologie et méthodes de culture de l'orge.	21
IV. Techniques culturales	21
V. Les principales maladies qui attaquent l'orge	24

Chapitre IV : Matériel et méthodes

I. Echantillonnage	30
II. Tests physicochimiques du sol.....	31
III. Sélection des échantillons qui améliorent la croissance de l'orge	31
IV Sélection des bactéries qui améliorent la croissance de l'orge <i>in vitro</i>	32
V. Impact sur la germination et la croissance des graines de l'orge <i>in vivo</i>	32
VI. Identification des bactéries.....	34
VI.1. identification phénotypique	34
VI.2. Identification phylogénétique des souches	34
VII. Recherche des propriétés d'intérêt agricole	36
VII.1. Détermination de l'activité cellulasique	37
VII.2. Détermination de l'activité estérasique	37
VII.3. Détermination de l'activité lipolytique	37
VII.4. Détermination de l'activité chitinasique	37
VII.5. Détermination de l'activité protéasique	38
VII.6. Détermination de l'activité amylasique.....	38
VII.7. Détermination de l'activité phosphatasique	39
VII.8. Détermination de l'activité uréasique	39
VII.9. Détection des bactéries productrices de sidérophores.....	39
VII.10. Synthèse d'hormone : AIA (Acide Indole Acétique : auxines)	40
VII.11. Mise en évidence de l'activité antifongique	41

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Tests physicochimiques du sol.....	43
II. test préliminaire de sélection des échantillons qui améliorent la croissance de l'orge	44
III test de germination de l'orge <i>in vitro</i> avec les souches pures.....	45
IV. test de germination et la croissance des graines de l'orge <i>in vivo</i>	45
V. Identification des bactéries.....	46
V.1. Identification phénotypique	46
V.2. Identification phylogénétique des souches	48
VI. Recherche des propriétés d'intérêt agricole	50
VI.1. Détermination de l'activité estérasique et lipasique	53
VI.2. Détermination de l'activité protéasique	53
VI.3. Détermination de l'activité chitinasique	54
VI.4. Détermination de l'activité phosphatasique	55
VI.5. Détermination de l'activité amylasique.....	57
VI.6. Détermination de l'activité cellulasique	58
VI.7. Détermination de l'activité uréasique	58

VI.8. Détection des bactéries productrices de sidérophores.....	60
VI.9. croissance sur milieu NFb.....	60
VI.10. Synthèse d'hormone : AIA (Acide Indole Acétique : auxines)	61
VI.11. Mise en évidence de l'activité antifongique	61
 Conclusion	 70

Références bibliographiques

Introduction

Les céréales et leurs dérivés constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins.

La filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole en Algérie. La surface totale emblavée de céréales en Algérie est de 3,3 millions ha en 2010. Avec cette augmentation de 100 000ha, l'Algérie a vécu une réduction de la production céréalière par rapport à l'année précédente. En effet, la production totale se rapproche à 61.2 millions de quintaux. La récolte du blé dur est importante mais, en revanche, l'orge sera en net recul par rapport à l'année 2009. A noter, cette filière a consommé durant la même année environ 331 305 quintaux entre engrais azotés et engrais phosphatés, soit un taux d'augmentation de 61% par rapport à l'année dernière.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour améliorer la croissance des plantes. Parmi ces méthodes, l'utilisation des bactéries rhizosphériques est la plus étudiée. Ces bactéries sont nommées PGPR (rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes) exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes par la stimulation de leur croissance ou par l'induction des mécanismes de défense.

Ainsi, la co-inoculation des plantes par les PGPR et les agents de lutte biologique est considérée comme une approche innovante dans la gestion de la santé de la plante et l'amélioration du rendement et de la qualité de la récolte (Felici et *al.* ; 2008). Mais leur utilisation est limitée par les conditions environnementales, en particulier la salinité et la dessiccation (Teixido' et *al.* ; 2005).

Actuellement plusieurs formulations de PGPR sont commercialisées qui semblent promouvoir la croissance par au moins un mécanisme : suppression des maladies des plantes (bioprotecteurs), l'amélioration de l'acquisition des nutriments (engrais biologiques), ou la production de phytohormone (biostimulants). Les bactéries dans le genre *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, et

Agrobacterium sont les agents de lutte biologique principalement étudiées et de plus en plus commercialisées (Ma'rcia do Vale Barreto Figueiredo et al., 2010).

Beaucoup de travaux ont été publiés ces dernières années sur l'application des bactéries rhizosphérique pour améliorer le rendement des récoltes, et la santé des plantes soit sous serre ou en plein champs. C'est dans cette optique que notre travail est dirigé; il s'agit d'un isolement des bactéries d'échantillons rhizosphériques de la cote ouest de la wilaya de Bejaïa, suivit de leur purification et identification physiologique et phylogénétique pour déterminer les similitudes avec d'autres souches. Après avoir eu les souches pures, un test de leur pouvoir d'amélioration de la croissance de l'orge in vitro et in vivo. Ce dernier test a été effectué dans des pots et sous serre. Les souches qui présentes des activités positives, ont subit une caractérisation de leur capacité de synthèse des enzymes extracellulaires essentiellement les enzymes hydrolytiques, et d'autres activités à intérêts agricoles, comme la mise en disposition des éléments nutritifs essentielle pour la croissance des plantes et la production des phytohormones. En dernier, des tests d'antagonismes contre des champignons phytopathogènes ont été réalisés in vitro.

I/ Les PGPR

Un grand nombre d'organismes macro- et microscopiques comme les bactéries, champignons, protozoaires et algues coexistent dans la rhizosphère. Les plus abondants sont les bactéries. Les plantes libèrent des composés organiques via les exsudats racinaires, qui attirent sélectivement les bactéries bénéfiques, créant ainsi un environnement sélectif de faible diversité (Van Loon ; 2007). Les bactéries de la rhizosphère bénéfique pour les plantes sont appelées PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), ces dernières sont abondantes dans la rhizosphère des plantes sauvages. Les PGPR appartiennent à plusieurs genres comme *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, et *Bacillus*. L'effet positif des PGPR se traduit par divers mécanismes. Ces derniers sont subdivisés en deux groupes : mécanismes directs et indirects (Saleem et *al.* ; 2007). Bien que la différence entre les deux ne soit pas claire, les mécanismes indirects, en générale, sont ceux qui se déroulent à l'extérieur de la plante, alors que les mécanismes directs s'effectuent dans la plante et affectent directement son métabolisme. En conséquence, les mécanismes indirects sont généralement liés aux éléments nutritifs ou les mécanismes de défense contre d'autres microorganismes à l'extérieure de la plante. Alors que les mécanismes directs englobent ceux qui affectent la régulation de croissance de la plante, soit en créant un gradient extra zonal des racines vers le sol, soit le microorganisme produit un régulateur de croissance qui s'intègre dans la plante, conduisant à une amélioration de la capacité d'adaptation. Deux phénomènes importants sont inclus dans ce groupe : induction systémique des métabolites secondaires impliqués dans la défense contre les plantes phytopathogènes et la protection contre les conditions de salinité élevés (Solano et *al.*, 2009).

Cependant, l'existence de micro-organismes capables d'empêcher les maladies qui se produisent dans la plante sans la participation directe de la plante est également connue. Ceci se produit par occupation de la niche ou par production de substance inhibitrice des microorganismes pathogènes. Lorsque le contact physique entre le microorganisme pathogène et le micro-organisme protecteur a lieu, on parle donc du bio-contrôle (Solano et *al.*, 2009).

II/ Mécanismes indirects des PGPR

Les mécanismes indirects sont divisés en deux groupes, soit une amélioration de la nutrition de la plante ou augmentation de ses performances contre les pathogènes. Le premier groupe englobe la fixation de l'azote libre, la production de sidérophores et la solubilisation du phosphore. Le deuxième groupe comprend l'hydrolyse des molécules synthétisées par les pathogènes, synthèse d'enzymes capables d'hydrolyser la paroi des champignons et production d'acide cyanhydrique. Parmi les mécanismes indirects d'importance agricole est la mobilisation et l'apport de nutriments. Une telle mobilisation d'éléments nutritifs permet la diminution de l'utilisation des produits chimiques dans le sol, puisque la quantité d'engrais chimiques nécessaire pour avoir un bon rendement serait inférieure (Solano et *al.*, 2009).

II-1/ Fixation d'azote libre

Les bactéries fixatrices de N₂ sont les premières PGPR utilisées pour l'amélioration de la croissance des plantes, notamment le rendement. La première apparition de ces bactéries a lieu après la deuxième guerre mondiale. Ces bactéries se sont avérées nombreuses dans les champs céréaliers dans l'Union Soviétique elles vivent librement et sont capables de fixer l'azote dans la rhizosphère mais sans établir de telle symbiose avec la plante. Bien qu'elles ne pénètrent pas dans les tissus de la plante, une relation étroite existe, ces bactéries vivent proche des racines là où elles fixent l'azote atmosphérique qui n'est pas utilisé par ces bactéries mais il est absorbé par la plante. Ce lien est donc défini comme non spécifique ou « faible » symbiose. En outre, les bactéries sont capables de fixer l'azote pour satisfaire leurs besoins, et le reste sera utilisé par la plante. (Glick et *al.* ; 1998, Solano et *al.* ; 2009).

Cependant, l'amélioration de la croissance par les PGPR a été incorrectement attribuée à la fixation d'azote pendant plusieurs années, jusqu'à l'utilisation des isotopes d'azote. Cette technique a prouvé que l'avantage des bactéries fixatrices d'azote libres consiste en la production des régulateurs de croissance des plantes qu'à la fixation d'azote. Ce genre de production des régulateurs de croissance de plantes est discuté plus tard (Khan et *al.* ; 2009, Solano et *al.* ; 2009).

II-2/ Production de sidérophores

Le fer est un élément essentiel pour la nutrition des plantes. Une carence en cet élément engendre une altération de plusieurs réactions métaboliques à cause du rôle qu'il joue comme un cofacteur de plusieurs enzymes impliquées dans la respiration, la photosynthèse et la fixation d'azote. Le fer est très abondant dans le sol, mais il n'est pas assimilé par la plante et les microorganismes du sol, puis que la forme dominante est Fe^{3+} , la forme oxydée réagit pour former des oxydes et des hydroxydes insolubles, inaccessibles pour la plante ou les microorganismes. Par ailleurs, les plantes ont développés deux stratégies pour absorber le fer. La première consiste à la sécrétion de composé organiques capables de chélater le fer pour le rendre soluble, le fer donc diffuse vers la plante où il sera réduit et absorbé par un système enzymatique présent dans la membrane cellulaire. La deuxième stratégie consiste à absorber le complexe formé par le composé organique et le Fe^{2+} , où il sera réduit à l'intérieur de la plante puis il facilement absorbé. Certaines bactéries de la rhizosphère sont capables de libérer des molécules chélatant le fer dans la rhizosphère, par conséquent, exercer la même fonction que celle des plantes. Les sidérophores sont des composés de faible poids moléculaire, (<1kDa), ils ont un groupement fonctionnel capable de lier réversiblement le fer. Les groupements les plus fréquents sont les hydroximates et catéchols, dans lesquels la distance entre les groupements impliqués est optimale pour lier le fer. La concentration en sidérophores dans le sol est d'environ 10-30 M. plusieurs espèces bactériennes productrices de sidérophores sont identifiées, elles appartiennent aux genres *Pseudomonas*, dont la plus fréquente est *Pseudomonas fluorescens* qui sécrète des sidérophores de type pyochelin et pyoverdine. Les bactéries de la rhizosphère produisent ces composés pour augmenter leur potentiel de compétitivité, ces composés ont une activité antimicrobienne et améliorent l'apport du fer à la plante. Les bactéries productrices de sidérophores renforcent la santé de la plante à différents niveaux : elles augmentent la nutrition en fer, inhibent la croissance de microorganismes par production d'antibiotiques et empêchent la croissance des microorganismes phytopathogènes en limitant le fer disponible. Habituellement, ce sont les champignons qui sont incapables d'assimiler le complexe sidérophore-fer, par conséquent, leur croissance est inhibée par les bactéries productrices de sidérophores. Ajoutant à ça ces bactéries interviennent aussi dans la diminution de l'utilisation des pesticides et des fertilisants par les plantes (Khan et al. ; 2009, Solano et al.; 2009).

II-3/ Solubilisation du phosphore

Après l'azote, le phosphore est le nutriment le plus limitant pour les plantes. Cependant, les réserves du phosphore, bien qu'elles soient abondantes, elles ne sont pas disponibles sous leur forme assimilable par les plantes. Ces dernières sont capables d'absorber la forme mono- et di- basique du phosphate. A côté des formes inorganiques du phosphore dans le sol, on trouve une quantité importante de la forme organique. Cette forme du phosphore est estimée à environ 30 - 50% du total de phosphore dans le sol. Certains microorganismes sont donc l'aptitude de minéraliser le phosphore en le transformant ainsi à sa forme soluble pour les plantes, plusieurs genres bactériens possèdent cette capacité, il s'agit de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, et *Erwinia*.

En effet, les bactéries utilisent deux mécanismes pour solubiliser le phosphate : par libération des acides organiques qui mobilisent le phosphore par des interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate et la libération des phosphatases responsables de libérer les groupements du phosphate liés à la matière organique. La plus part de ces bactéries sont capables de solubiliser le complexe Ca-P, Fe-P, Mn-P et Al-P. Généralement, ces mécanismes sont déficients dans les sols basiques. Ainsi, les résultats obtenus avec les PGPR capables de solubiliser le phosphate sont parfois erratiques, probablement en raison de la composition du sol.

Par ailleurs, l'inoculation, des plantes cultivées dans des sols pauvres en phosphore, avec ce genre de PGPR a permis d'obtenir un bon rendement. Cependant, parfois, ces inocula ne sont efficaces avec d'autres cultures. Sans doute, la connaissance de leurs mécanismes et de leurs écologies dans la rhizosphère amélioreront leur utilisation dans l'agriculture durable (Vessey ; 2003, Khan et *al.* ; 2009, Solano et *al.* ; 2009).

III/ Les mécanismes directs des PGPR

Les mécanismes directs se déroulent à l'intérieur de la plante et affectent directement son métabolisme et son humilité. Ces mécanismes se basent sur un transfert du signal envoyé par la bactérie. Les régulateurs de la croissance de la plante sont classé parmi ces mécanismes, ils agissent au même temps avec l'induction du système de résistance (ISR : induction du système de résistance). Ce phénomène est devenu récemment une issue importante pour l'amélioration de la

protection des plantes contre les facteurs du stress biotiques et abiotiques (Khan et al. ; 2009, Solano et al. ; 2009).

III-1/ Modification du taux de régulateurs de la croissance des plantes

Les régulateurs de la croissance des plantes produits par les bactéries sont décrits avant 40 ans en arrière. Il est donc démontré que la modification de la physiologie de la plante par la production des régulateurs de croissance est un mécanisme très important. Plusieurs facteurs interviennent : la concentration des régulateurs de la croissance de plantes, le rapprochement des bactéries à la surface des racines, la capacité du régulateur à diffuser dans le sol et à être transporté à travers la paroi des cellules végétales et la compétitivité des bactéries à coloniser et survivre dans des zones où il y a une concentration importante en exsudats racinaires. Les PGPR produisent donc plus qu'un seul type de régulateur de croissance de plantes, ils peuvent causer un effet synergique quand leur action est couplée. (Khan et al. ; 2009, Solano et al. ; 2009).

En outre, la production des hormones comme les gibbérellines ou cytokinines a été révélée chez certaines bactéries. Les cytokinines sont connues comme des inducteurs de la division cellulaire, elles sont produites en grande quantité par les bactéries libres. Les gibbérellines sont peu rencontrés, ils sont produits par nombre limité de PGPR, seulement deux espèces sont capables de les produire en concentration significative : *Bacillus pumilus* et *Bacillus licheniformis*. Quant aux auxines, elles sont dérivées de métabolisme du tryptophane, leur effet dépend de leur concentration, de l'organe affecté et de l'état physiologique de la plante. Les auxines synthétisées par les plantes diffèrent de celles produites par les micro-organismes par leur voie de biosynthèse qui inhérente à l'espèce végétale ou microbienne. Plus de 80% de bactéries telluriques sont capables de produire les auxines avec effet remarquable. Les auxines secrétées par les rhizobactéria affectent principalement le système racinaire en augmentant le poids, la taille, le nombre de ramifications et la surface en contact avec le sol. En effet, les auxines induisent la différenciation des tissus de la tige comme ceux de la racine. Tous les effets cités précédemment peuvent varier considérablement selon la concentration de l'auxine qui atteint le système racinaire, y compris l'excès, qui pourrait être inhibiteur.

L'éthylène est un autre régulateur de croissance. Cette substance est d'un effet potentiel sur la physiologie de la plante, elle affecte la germination des graines, la croissance des racines, le détachement des feuilles, le développement et la maturation des fruits, et également le système de la défense de la plante et ses réponses aux différents stress. Les facteurs tels que la lumière, la température, la salinité, les microorganismes phyto-pathogènes et la nutrition peuvent causer des variations remarquables dans la concentration en éthylène. Lorsque la quantité de ce dernier diminue, le système racinaire augmente. Dans cette approche, différents PGPR sont utilisés pour réduire la concentration élevée d'éthylène dans la plante, ce qui permet d'améliorer certains processus physiologiques dans la plante. Il est connu que la biosynthèse de l'éthylène commence dans le cycle de la méthionine, une molécule d'acide aminocyclopropane-carboxylique (ACC) résulte de chaque cycle. L'enzyme responsable de la production d'ACC est l'ACC-synthétase. Ainsi, le modèle proposé pour la régulation de l'éthylène dans la plante par les PGPR est basé sur la capacité de certaines bactéries à dégrader l'ACC, (précurseur direct de l'éthylène). La dégradation de ce composé crée un gradient de concentration d'ACC (extra zonal) favorisant son exsudation et, par conséquent, une réduction du niveau d'éthylène à l'intérieur. Ceci, en combinaison avec les auxines qui peuvent être produites par le même micro-organisme, ayant un impact considérable sur le développement racinaire de la plante, l'éthylène est donc réduit par le biais d'une ACC-désaminase bactérienne, compétitive de l'ACC oxydase végétale (Zahir et al. ; 2009). Donc, l'éthylène et l'auxine sont deux types de régulateurs de croissance liés dont l'équilibre entre les deux est indispensable pour la formation de nouvelles racines (Fuentes-Ramirez et Caballero-Mellado ; 2005, Khan et al. ; 2009, Khalid et al. ; 2009, Solano et al. ; 2009).

III-2/ Induction de la Résistance Systémique (ISR)

Au début des années 90, nombreux chercheurs ont révélé d'importants mécanismes impliqués dans la productivité et défense des plantes. Ces chercheurs ont constaté que certaines bactéries peuvent empêcher l'attaque des microorganismes pathogènes avant que ces derniers aient atteint la plante. La différence avec le bio-contrôle est que les bactéries bénéfiques n'agissent pas physiquement sur le microorganisme pathogène mais déclenchent une réponse directe dans la plante contre les attaques microbiennes microorganisme phyto-pathogènes. Cette réponse est systémique, c'est-à-dire que les bactéries agissent

sur la plante dans une zone restreinte, mais la réponse s'étend dans toute la plante. Cette réponse est atténuée par les changements métaboliques divers. En fait, *le priming* ou *biopriming* est l'état physiologique d'une plante qui est systématiquement induit par les bactéries saprophytes contre l'attaque des pathogènes, mais, l'effet n'est détecté que lorsque l'attaque se produise. Puisque le métabolisme énergétique est détourné au métabolisme secondaire, cet état physiologique est habituellement couplé à un abaissement de croissance. Pour que la protection soit efficace, un laps de temps est nécessaire entre le contact des PGPR/plantes et l'attaque de microorganisme pathogène afin d'exprimer les gènes, de la plante, impliqués dans la défense. Ce mécanisme était connu sous le nom de "résistance systémique induite par l'intérimaire des rhizobacteria", mais actuellement, il est appelé "la résistance systémique induite" (*ISR*). L'*ISR* a été rapporté dans le modèle plante-microorganisme pathogène- bactérie bénéfique, *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae*DC3000- *P.fluorescens* WSC417r. La réponse défensive induite par *P. fluorescens* WSC417r dans *A. thaliana* contre *P. syringae* DC3000 est due au JA (acide jasmonique) et à l'éthylène. Depuis, elle est retrouvée dans plusieurs espèces végétales : l'haricot, le tabac, la tomate et le radis. Il s'agit donc de renforcement de la « *réponse immunitaire* » de la plante, ce qui soulève la possibilité d'existence d'une "*vaccination*" de la plante. Cette dernière peut également acquérir une immunité après une attaque de microorganisme pathogène. Cette réponse a été décrite avant l'*ISR*, elle s'appelait *la résistance systémique acquise* (*SAR*). Pendant une attaque de microorganisme pathogène, les espèces réactives de l'oxygène (*ROS*) sont produites dans les zones nécrotiques, causant la mort du tissu (Van Loon ; 2007, Solano et al. ; 2009).

IV/ Mycorhizes Arbuscules (MA)

Les MA appartiennent aux phylum : *Glomeromycota*, vivent en symbiose avec plus de 80% d'espèces végétales vivant sur la terre. La symbiose joue un rôle important également dans des écosystèmes naturels et dans les agro écosystèmes. Dans un sens étroit, la symbiose signifie un rapport mutualiste entre les MA et l'hôte. Les avantages attribués à une symbiose fonctionnelle d'MA incluent l'amélioration de la croissance des plantes due à l'amélioration de l'absorption des nutriments, particulièrement le phosphore (P), l'eau, atténuation du stress biotique et abiotique.

Les MAF peuvent également agir sur les systèmes hormonaux de la plante. En plus, ils augmentent la superficie d'absorption dans le système racinaire de la plante, les hyphes d'MA fournissent plus de surface d'échange pour des interactions avec d'autres micro-organismes de la rhizosphère.

L'environnement au tour des Hyphes mycorrhizals s'appelle l'« hyphosphère ». Entre 10 et 20% des photosynthèses nettes sont exigées pour la formation, l'entretien et la fonction des structures fongiques de la rhizosphère. La quantité de carbone produite affecte fortement les interactions microbiennes dans la rhizosphère, une phase pré-symbiotique et symbiotique peut être identifiée dans la symbiose d'MA. La première phase peut être développée en trois étapes comprenant la germination des spores, l'identification de l'hôte et la colonisation sa colonisation. La phase pré symbiotique peut également être caractérisée comme une phase parasite, bien que cette limite ne soit pas toujours acceptée dans la communauté fongique rhizosphérique. Des associations de mycorhizes sont généralement classifiées comme mutualismes, mais d'autres études prouvent que ce n'est pas toujours le cas. Il semble avoir un ensemble de réponses de plante à la colonisation mycorrhizienne ayant un effet positif (mutualisme), neutre (commensalisme) ou négatif (parasitisme) (Solano et *al.* ; 2009).

Au début du XX^e siècle, quasi-simultanément en phytopathologie et en entomologie, l'appellation de lutte biologique fut proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre des organismes vivants. L'étude de Sanford (1926) sur les facteurs influençant la pathogénicité de la bactérie *Streptomyces scabies* matérialise ce concept en observant l'effet des microorganismes saprophytes sur la diminution de l'intensité des symptômes de ce phytopathogène dans le sol. Quelques années plus tard, Weidling met en évidence que le champignon *Trichoderma lignorum* parasitait d'autres champignons du sol (Jijakli, 2003).

I/ Définition de la lutte biologique

Selon Garrett (1965) cité par Roger (1990), « tout facteur réduisant la survie ou l'activité d'un parasite par l'introduction d'un organisme vivant, excepté l'homme, qui diminue des pertes causées par le parasite », se agent de la lutte biologique. En 1968, l'académie nationale des sciences aux USA donna une définition plus large, c'est « toute action mettant en jeu des organismes ou modifiant l'hôte, y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite. » (Roger, 1990).

Par ailleurs, plusieurs microorganismes et insectes présents dans l'environnement naturel servent d'agents potentiels de lutte biologique. Ils ne sont pas pathogènes et n'affectent pas l'environnement, sont plus facile à reproduire et à manipuler, et peuvent créer des effets durables. Les agents de bio-contrôle tels que les PGPR et *Trichoderma harzianum* peuvent être préconisés comme alternative aux pesticides (Chinnasamy, 2005).

Le tableau I montre les principaux agents de la lutte biologique commercialisés au monde.

Tableau I : agents de lutte biologique commercialisés pour la lutte contre les agents pathogènes du sol (Jijakli ; 2003).

	Antagonistes	Espèces ciblées	Pays
Bactéries	<i>Agrobacterium radiobacter</i> Souche 84	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	USA
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Streptomyces</i> <i>scabies</i>	USA, Suède
	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>	USA
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>	USA
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas tolaasi</i> , <i>Fusarium</i>	USA, Australie
	<i>Streptomyces griseovirides</i>	<i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> <i>barassicola</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp. et <i>phytophthora</i> spp.	USA, UE
Champignons	<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> et <i>S. minor</i>	Autriche, Allemagne, Hongrie Suisse, USA
	<i>Fusarium oxysporum</i> (non pathogène)	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i>	USA
	<i>Gliocaldium virens</i> <i>Gliocaldium catenulatum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> et <i>Pythium</i> spp.	USA Finlande
	<i>Phlebia gigantea</i>	<i>Heterobasidium annosum</i>	Finlande, Danemark, Norvège, GB
	<i>Pythium oligandrum</i>	<i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Aphanomyces</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i>	Tchéquie
	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Verticillium dahliae</i> , <i>V. aldo-atrum</i> et <i>Rhizoctonia solani</i>	USA
	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Sclerotinia</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i> , pourritures du bois et des produits du bois	USA, UE, Nouvelle- Zélande
	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp.	Inde

II/ Les critères de sélection des agents de la lutte biologique

Les critères de sélection auxquels devrait répondre un agent de lutte biologiques sont les suivants (Jijakli, 2003) :

- Stabilité génétique ;
- Efficacité à faible concentration ;
- Faible exigence nutritionnelle ;
- Capacité de survie et d'adaptation aux différentes conditions environnementales ;
- Efficacité sur un grand nombre de pathogènes et d'hôtes ;
- Production aisée et peu coûteuse (production en masse) ;
- Préparation facile et efficace de l'inoculum ;
- Absence de production de métabolites secondaires toxiques ;
- Résistance aux pesticides ;
- Compatibilité avec d'autres traitements ;
- Absence de caractère pathogène et éco-toxicologie acceptable.

III/ Mécanismes de l'antagonisme

Pour l'organisme élimine les pathogènes, les mécanismes suivants doivent apparaître :

III-1/ Hyperparasitisme (ou mycoparasitisme chez les champignons) :

L'agent antagoniste attaque le pathogène en perçant les hyphes et les envahit (Roger, 1990). L'adhérence donc de l'agent antagoniste aux hyphes de champignons pathogènes peut être visualisée par microscope optique ou électronique, elle est souvent considérée comme un indice d'établissement d'une relation parasitaire. La colonisation des sclérotas de *Sclerotinia sclerotiorum* (pathogène des cultures maraîchères : haricot et carottes) par *Coniothyrium minitans* qui produit des pycnides sur ces sclérotas parasités, peut être observée en microscope optique. Il s'en suit une réduction de la production d'apothécies et d'ascospores qui constituent l'inoculum primaire de *S. sclerotiorum* (Jijakli, 2003).

III-2/ Antibiose (ou formation de substances antibiotiques)

L'antibiose consiste en la production et la sécrétion des molécules qui tuent ou réduisent la croissance du microorganisme pathogène cible, c'est le mécanisme le

plus connu par lequel les microorganismes peuvent lutter contre les maladies de la plante (Weyens et *al.*, 2010).

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et / ou la sporulation des agents phyto-pathogènes, d'autres provoquent la distorsion des hyphes fongiques en modifiant l'aspect des colonies ou entraînant le relargage des composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité membranaire (Jijakli, 2003).

Il a été remarqué que le champignon *Trichoderma* exerce une action fongistatique à distance (antibiotiques volatils) atteignant surtout les jeunes hyphes. Il s'agit surtout de *Trichoderma virid*, alors que *T. harzianum* inhibe la formation de sclérotés chez *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum*. Quant aux bactéries, elles produisent fréquemment des antibiotiques freinant ou arrêtant le développement des parasites, comme l'agrocine d'*Agrobacterium radiobacter* (Roger, 1990).

Pseudomonas fluorescent et certaines espèces de *Bacillus* jouent un rôle actif dans la répression des micro-organismes pathogènes par sécrétion des métabolites extracellulaires inhibiteurs de la croissance de ces pathogènes à basse concentration.

En effet, les antibiotiques produits par les PGPR sont : phloroglucinol 2.4 diacétylique, acide phenazine-1-carboxylique, phenazine-1-carboxamide, pyolutéorine, pyrrolnitrine, oomycine A, viscosinamide, butyrolactones, kanosamine, zwittermycine A, aerugine, rhamnolipides, cépacinamide A, écomyciné, acide pseudomonique, azomycine, antibiotiques antitumoraux FR901463, cépafungines et karalicine et antiviraux (Tableau II). Ces antibiotiques sont connus pour leur activité contre les virus, les bactéries, les champignons, les insectes, les mammifères et les helminthes (Dilantha et *al.*, 2005).

Tableau II : Antibiotiques produits par Rhizobacteria (Dilantha et al., 2005).

Antibiotiques	PGPR	Pathogène	Plante
DAPG	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. ultimum</i>	Sucre Betterave
Aerugine	<i>P. fluorescens</i>	<i>Phytophthora</i> <i>C. orbiculare</i>	Poivre Concombre
Phenazine	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>F. oxysporum</i>	Tomate
PCA	<i>P. fluorescens</i>	<i>G. g. Var. tritici</i>	Blé
Pyrrolnitrin	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>F. sambucinum</i>	Pomme de terre
Pyrrolnitrin	<i>P. cepacia</i>	<i>F. sambucinum</i>	Pomme de terre
Pyrrolnitrin	<i>P. cepacia</i>	<i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i>	Tournesol
Pantocin A,B	<i>P. agglomerans</i>	<i>Erwinia herbicola</i>	Pomme

III-3/ Compétition nutritive

En relation avec une occupation rapide du milieu, la compétition a été mise en évidence tant dans la rhizosphère que sur le phylloplan. Dans les sols répressifs où les agents pathogènes se développent mal, par opposition aux sols réceptifs où ils se multiplient rapidement, la biomasse est particulièrement dense. Pour déclencher la germination de chlamydospores de *Fusarium*, des concentrations élevées en nutriments sont indispensables. La compétition pour le fer est un des mécanismes attribués à *Pseudomonas fluorescens* (Weyens et al., 2010). Par conséquent, la production de sidérophores dans la rhizosphère est d'une importance primordiale pour l'inhibition des champignons et des pathogènes (Jijakli, 2003 ; Weyens et al., 2010).

En effet, La compétition pour les éléments nutritifs a été suivie par marquage radioactif des composés carbonés. Ainsi, les levures (*Sporobomyces roseus* et *Cryptococcus laurentii*) antagonistes de *Botrytis cinerea* colonisent plus rapidement les blessures de pommes que la souche de *Saccharomyces cerevisiae* non antagonistes. Ces levures absorbent plus rapidement les sucres marqués au carbone 14 (glucose, fructose et saccharose) que les conidies de *B. cinerea*. Par ailleurs, les espèces antagonistes se différencient des non antagonistes par une consommation plus rapide du ¹⁴C-fructose, mais pas des autres sucres (Jijakli, 2003).

Des expériences sur le phylloplan ont montré que la densité des levures atteint 10⁴-10⁵ /cm² et la compétition pour les exsudats, le miellat ou les graines de pollen est

active et serait en grande partie responsable de la diminution de 50% des attaques des parasites nécrotrophes (Roger, 1990).

III-4/ Modification du milieu.

La modification du milieu, en particulier du pH, qui, lorsqu'il est abaissé devient inhibiteur pour les bactéries. C'est l'une des actions bénéfiques de l'engrais vert enterré dans le sol; mais le même phénomène se répète aussi sur le phylloplan. L'augmentation du pH protège le fraisier contre l'attaque de *Botrytis cinerea* (Roger, 1990).

III-5/ Production d'enzymes hydrolytiques

La lyse des parois cellulaires est un autre mécanisme potentiel pour que les bactéries associées aux plantes contrôlent éliminent les microorganismes phyto-pathogènes. Ce mécanisme est bien établi dans le bio-contrôle des rhizosphères contre champignons. Il est conçu que les bactéries endophytiques isolées des racines de pomme de terre produisent de grande quantité d'enzymes hydrolytiques (cellulase, chitinase et glucanase). Parmi ces enzymes, les chitinases sont d'importance majeure puisque la chitine est le constituant principal de la paroi cellulaire des champignons. De nombreuses souches de *S. proteamaculans* 568 ; *P. putida* W619 et *S. maltophilia* R551-3 utilisent la chitine comme source de carbone. Il a été rapporté que les chitinases purifiées de *Bacillus subtilis* AF1, *Serratia plymuthica* et de *Serratia marcescens* sont dotées d'une activité antifongique considérables. En outre, le rôle de la chitinolyse dans l'élimination des microorganismes pathogènes dans les racines a été mis en évidence après avoir appliqué certains inocula de PGPR dans le traitement des maladies des racines du blé et de la tomate. Les gluconases constituent un autre groupe important d'enzymes hydrolytiques puisqu'elles dégradent le β -1,3-glucane des parois. La production de β -1,3-glucanases par *Burkholderia cepacia* inhibe de la prolifération de divers champignons phyto-pathogènes dans la rhizosphère tels que *Rhizoctonia solani*, *Serratia rolfsii* et *Phytium ultimum*. De plus, Tanaka et Watanabe (1995) ont observé qu'un effet synergique peut se produire, en présence d'une chitinases et une β -1,3-glucanases, et agit d'une manière plus efficace (Weyens et al., 2010).

III-6/ Inhibition des enzymes ou des toxines produites les par microorganismes

Afin de dégrader les polymères dans des parois de cellulaires de plante et faciliter l'infection fongique, les champignons pathogènes produisent des enzymes extracellulaires (exo- / endo – polygalacturonases, pectino-lyases, cellulases et chitinase). Une éventuelle inhibition de l'activité de ces enzymes permettra de réduire la virulence du microorganisme pathogène. Par exemple, l'espèce *Bacillus megaterium* B 153-2-2 productrice d'une endo-protéinase inhibe totalement l'activité enzymatique de la cellulase, la pectino- lyase de la pectinase produites par *Rhizoctonia solani* (Weyens et al., 2010).

III-7/ Induction des mécanismes de défense de plante

Après contact de la plante avec un microorganisme nécrotique ou une bactérie saprophyte productrice de substances antimicrobiennes, une certaine immunité physiologique sera induite dans la plante. Cette dernière sera donc protégée contre les attaques virales, bactériennes ou fongiques. D'autre part, la résistance induite lors de la colonisation des racines des plantes par certains PGPR, est classée comme résistance systémique induite (ISR). L'ISR est caractérisé par une action à distance, une résistance durable, et une protection contre un grand nombre de microorganismes. Les bactéries à Gram négatif sont considérées comme meilleurs inducteurs de cette résistance, il s'agit principalement de *Pseudomonas* et de *Serratia*. Cependant, un certain nombre de bactéries à Gram positif peut induire ce type de résistance. L'ISR peut activer de multiple et potentiels mécanismes de défense, à savoir : l'augmentation de l'activité des chitinases, de b-1,3-glucanases, des peroxydases, protéinases, accumulation des substances antimicrobiennes de faible poids moléculaire (phytoalexines), formation des bio-polymères protecteurs (la lignine, la cellulose, les glycoprotéines et l'hydroxyproline). En outre, un simple agent inducteur peut contrôler une grande variété de microorganismes pathogènes (Weyens et al., 2010).

L'induction de la résistance est également observée chez certains champignons dotés du pouvoir antagoniste : *Trichoderma harzianum* et *Pythium oligandrum* : ce dernier se caractérise par sa capacité de pénétrer à l'intérieur des tissus racinaires et d'y stimuler des mécanismes de résistance. Chez la tomate prétraitée avec *P. oligandrum*, une formation de barrières structurales et une accumulation de

composés phénoliques fongi-toxiques impliqués dans la limitation du développement de *Fusarium oxysporum* f.sp. sont observées (Jijakli ; 2003).

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière.

I/ La production céréalière

La production des céréales, occupe environ 80% de la superficie agricole utile du pays, La superficie emblavée annuellement en céréales se situe entre 3 et 3,5 million d'ha. Les superficies annuellement récoltées représentent 63% des emblavures. Elle apparait donc comme une spéculation dominante.

I-1/ Les industries de transformations

-L'industrie de transformation occupe une place « leader » dans le secteur des industries agroalimentaires, en raison des capacités importantes de triturations dont elle dispose ; (+230%) par rapport à la taille du marché domestique, réparties entre les moulins publics (95%) et privés (135%), soit respectivement une capacité de trituration de l'ordre de 19000 et de 27000 T/jour.

-L'industrie céréalière privée compte actuellement 253 PME privés qui contrôlent 80% du marché domestique en 2005 (Chehat, 2007).

-Chiffre d'affaire des ERIAD en 1998 est évalué à 86 milliards de DA soit 1,03 milliard de dollars.

I-2/ La consommation

-La consommation des produits céréaliers se situe à un niveau d'environ 205 kg /hab/an (Chehat, 2007).

-Les céréales et leurs dérivés constituent l'épine dorsale du système alimentaire algérien, et elles fournissent plus de 60% de l'apport calorifique et 75 à 80% de l'apport protéique de la ration alimentaire (Observatoire méditerranéens CEHEAM/IAMM).

I-3/ Les importations

-En relations avec le marché mondial, les produits céréaliers représentent plus de 40% de la valeur des importations des produits alimentaires. Les produits céréaliers occupent le premier rang (39,22 %), devant les produits laitiers (20,6%), le sucre et sucreries (10%) et les huiles et corps gras (10%) (FAO).

II/ Description de la plante de l'orge:

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est une plante annuelle, autofécondée très semblable au blé dans la morphologie de ses organes végétatifs et floraux.

Contrairement au blé, où l'on retrouve plusieurs niveaux de ploïdie, l'orge spontanée et l'orge cultivée sont des espèces diploïdes possédant le même nombre chromosomique ($2n = 14$). Cette espèce, bien qu'appartenant à la même tribu (Triticeae) que le blé, est placée dans la sous-tribu Hordeinae du fait de différences au niveau de la structure de ses épis. Contrairement à l'épi de blé (et ceux d'autres genres de la sous-tribu Triticinae) qui n'a qu'un seul épillet inséré à chaque nœud du rachis, l'épi d'orge comporte deux épillets par nœud. Chaque épillet d'orge produit une seule fleur fertile, contrairement aux épillets de blé qui peuvent produire de 3 à 5 fleurs chacun. Cependant l'orge et le blé sont génétiquement assez proches pour permettre la production d'hybride inter génique sous conditions expérimentales, bien que la fertilité des plants hybrides obtenus soit très réduite. Les variétés d'orge sont regroupées d'après les caractéristiques de leurs épis, en orges à six rangs et en orges à deux rangs. Les orges à six rangs comportent des épillets fertiles regroupés par trois sur chaque plan de l'axe vertical de l'épi. Les deux épillets latéraux des orges à deux rangs sont stériles et ne produisent qu'un seul caryopse par groupes de trois épillets. Dans ce dernier cas, l'épi apparaît comme un épi distique quand on l'observe sur le plan transversal. Autrement, les caractéristiques végétatives et florales de l'orge sont similaires à celles du blé (Nevo, 1986 ; Schery, 1972).



Figure 01: épi d'orge à deux rangs (gauche) et à six rangs (droite) (Adapté de Leonard et Martin 1973)



Figure 02: plante d'orge montrant **a)** épis terminal, **b)** partie supérieure du pédoncule floral, **c)** feuille rattachée au noeud (« flag leaf»), **d)** région internodale, **e)** limbe de la feuille, **f)** internode sous le pédoncule floral (adapté de Leonard et Martin 1973)

III/ Écologie et méthodes de culture de l'orge

Considérant l'origine de l'orge et ses caractéristiques de croissance, les conditions écologiques propices à sa culture devraient être relativement similaires à celles décrites pour le blé. Cependant, cette espèce possède un potentiel d'adaptation supérieur à celui du blé, comme le démontrent les nombreuses variétés issues des programmes de sélection et d'amélioration génétique plus récents.

La culture de l'orge se fait autant dans les régions froides délimitées aux latitudes 55-65°N que dans les régions tropicales et sub-tropicales en altitude qui possèdent une saison sèche prolongée. L'orge est plus tolérante aux conditions extrêmes de température que le blé. De nombreuses variétés hâtives d'orge (Diktat, Hudson) ont été sélectionnées pour être cultivées dans les régions tempérées. Cet avantage prévaut en haute altitude dans les régions tropicales et subtropicales où des variétés peuvent être cultivées avec succès jusqu'à près de 3500 m d'altitude dans les Andes, en Afrique de l'Est et dans les régions montagneuses de l'Asie du sud. Des variétés résistantes à la sécheresse et aux températures élevées ont aussi été développées pour les régions semi-désertiques d'Afrique du Nord et de l'Est, d'Asie centrale, de Chine, du Pakistan, d'Inde et d'Australie (Reitz, 1970). Cette espèce est aussi tolérante à la salinité. Certaines variétés, comme la variété "Mariout", sont cultivées dans le delta du Nil et dans les sols salins de diverses régions du monde où les concentrations de sels dépassent les 3500 ppm (équivalents Na⁺). Par contre, et de façon similaire aux autres céréales originaires des régions tempérées, la culture de l'orge n'est pas favorisée sous des conditions de climats tropicaux chauds et humides. La production d'orge est optimisée sur des sols alcalins à légèrement acides à texture moyenne et bien drainés mais produit peu sur des sols sablonneux, pauvres et fortement acidifiés (pH < 4.7) (Nevo, 1986).

Les méthodes de culture sont semblables à celles utilisées pour le blé et l'évolution des techniques de préparation des sols, semences, irrigation, moisson, etc., a été similaire à celle développées pour le blé au cours des derniers 10 000 ans.

IV/ Techniques culturales

Obtenir un grain bien fait et bien plein, au moyen de pratiques culturales respectueuses de l'environnement et les moins coûteuses possibles, tel est l'objectif

du producteur et ce vers quoi tendent les préconisations techniques (Gate et *al.*, 1996).

Selon Vilain (1989), l'obtention d'un rendement élevé requiert l'utilisation d'un matériel végétal possédant un potentiel de production élevé, susceptible d'exploiter au mieux les ressources disponibles du milieu. Deux types de techniques culturales lui sont appliquées :

- les unes sont destinées à accroître le niveau des facteurs et des conditions de croissance;
- les autres visent plus particulièrement à valoriser et à préserver le potentiel de production.

IV-1/ Travail du sol

Différentes combinaisons de productions végétales, de rotations et de méthodes de travail du sol peuvent influencer de diverses manières sur la qualité des sols et de l'eau. Le travail du sol vise à mettre celui-ci dans un état tel que les plantes y trouvent les conditions de développement idéales en lui donnant la structure physique la plus favorable à la culture pratiquée et en favorisant l'activité biologique du sol (Aubert, 1977). Ainsi que le travail du sol a pour rôle d'enfouir les résidus de récolte et les fertilisants ou les amendements. Il permet aussi de maîtriser les populations d'adventices (Viaux, 1999).

Le labour constitue la principale étape du travail du sol pour l'installation de la culture. Il s'effectue entre 12 et 25 cm, il est recommandé d'éviter les labours trop profonds qui demandent beaucoup de puissance et qui ont pour effet de diluer la matière organique et les éléments minéraux (Simon et *al.*, 1989 in Boulal et *al.*, 2007).

Le sol doit respecter les conditions d'une bonne germination et d'une bonne levée : humidité, aération, température, absence d'obstacles (cailloux, mottes) gênant le passage de la plantule. Pour cela, il est nécessaire de préparer un lit de semence, c'est à dire de travailler la couche superficielle du sol qui accueille les graines avec un soin particulier (Prévost, 1990).

IV-2/ Choix des variétés

Le choix variétal est un choix stratégique qui permet de réduire d'une manière générale les coûts de production, et en particulier, de réduire l'utilisation des produits phytosanitaires (Viaux, 1999).

Les principaux critères de choix des variétés sont : la productivité, la précocité, l'alternativité, la résistance au froid, la sensibilité aux principales maladies ou encore la tolérance aux variations hydriques et au niveau des facteurs de croissance (Vilain, 1989).

Le choix de la variété est indissociable du choix de la date et de la densité de semis, facteurs qui eux-mêmes ont des conséquences en matière de développement parasitaire, de maladies et d'adventices (Viaux, 1999).

IV-3/ Semis

Le semis consiste à placer les graines à une certaine profondeur dans le lit de semences. Il faut placer les graines à une profondeur régulière de 4 à 6 cm pour faciliter la levée des plantules (Benaouda, 1994 in Boulal et *al.*, 2007).

La date de semis ne doit pas être trop précoce pour les céréales à pailles. Pour ces cultures, il faut rechercher un bon compromis entre de bonnes conditions d'implantation et le risque de favoriser le développement de maladies ou de mauvaises herbes qui nécessiteront l'utilisation importante de produits phytosanitaires (Viaux, 1999).

La dose de semis est étroitement liée avec la densité du peuplement recherchée pour chaque espèce et variété cultivée (Belaid, 1990).

IV-4/ Fertilisation

La texture des sols présente une grande importance agronomique car elle joue un rôle déterminant dans la fertilité, donc pour la productivité des cultures (Ramade, 2003).

Toute méthode de production végétale, qu'elle soit extensive ou intensive, traditionnelle ou biologique, prélève dans le sol les éléments fertilisants dont elle a besoin. Ces prélèvements varient selon le type de sol et l'intensité de production et augmentent avec la production de biomasse (Kellil, 2011).

Selon Kellil (2011), les pratiques de gestion des éléments fertilisants pour améliorer le rendement des engrais et réduire les pertes d'éléments fertilisants dans l'environnement. Ces pratiques comprennent entre autres :

- l'évaluation des besoins en éléments fertilisants en faisant régulièrement des tests sur le sol et les cultures avant d'épandre des éléments fertilisants;
- le choix du bon moment pour épandre des éléments fertilisants afin d'adapter l'alimentation aux besoins de la croissance des cultures;
- l'épandage des éléments fertilisants à proximité des racines;
- le choix du produit fertilisant en fonction de sa stabilité chimique dans le sol;
- la succession de cultures qui consomment de l'azote et des cultures qui fixent l'azote.

IV-5/ Irrigation

L'irrigation des céréales constitue une solution pour assurer l'amélioration et la stabilité des rendements. Les besoins en eau des céréales dépendent des conditions climatiques, de la nature du sol et aussi des stades critiques au déficit hydrique qu'impliquent une meilleure gestion de l'irrigation (Boulal et *al.*, 2007).

En Algérie, Ameroun et *al.* (2002) in Boulal et *al.* (2007), la meilleure période d'irrigation se situe généralement durant la phase allant de la montaison au début de la formation du grain. Durant cette phase, les besoins en eau de la céréale sont relativement importants où la culture est très sensible au stress.

Dans les zones semi-arides des Hauts Plateaux ont montré qu'une seule irrigation de 80 mm au stade épiaison était suffisante pour atteindre des gains de rendement de l'ordre de 70 à 81 % en fonction des espèces (Kribaa, 2003; Ameroun et *al.*, 2002 in Boulal et *al.*, 2007).

VI/ Les principales maladies qui attaquent l'orge :

V-1/ Les maladies bactériennes :

Pseudomonas : est un genre pathogène pour les céréales tel que le blé, l'orge, seigle et triticales. La maladie de porriture de la base des glumes est provoqué par *pseudomonas syringae pathovare atrofaciens* et l'apparition de nécrose bactérienne causé par *pseudomonas syringae pathovare syringae*.

xanthomonas: ce genre attaque l'orge et le blé et provoque des rayures bactériennes par l'agent causal *xanthomonas campestris PV translucens* (Soltner, 1995).

Clavibacter : cause la mosaïque bactérienne du blé et de l'orge dont l'agent causal est *clavibacter michiganensis sub espèce sptesselerius* (Boukhris 1992)

V-2/ les maladies virales :

Les maladies les plus importantes en incidence et en sévérité sur l'orge sont :

La jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est une maladie virale transmise par les pucerons bien connue des agriculteurs. En piquant la plante pour se nourrir, le puceron transmet le virus BYDV (barley yellow dwarf virus) aux plantes.

L'importance de la maladie dépend de plusieurs facteurs, la douceur du climat, la précocité de l'attaque et la durée de présence des pucerons dans la parcelle, mais aussi du nombre de pucerons ailés et de leur pouvoir infectieux. La présence de repousses de graminées ou de parcelles de maïs à proximité des parcelles d'orge, aggrave également les risques d'apparition de la maladie.



Figure3 : La jaunisse nanisante de l'orge.
<http://www.bayer-agri.fr>

Lorsque l'orge est attaquée par la JNO, les dernières feuilles prennent une couleur rouge lie de vin et les plantes sont rabougries par foyer (Amandine, 2003).

Les mosaïques

Elles sont aussi des maladies virales transmises par un vecteur, non pas par un ravageur aérien cette fois mais par le *Polymixa graminis*, une « plasmodiophorale », parasite des racines des céréales, très voisin des champignons de sol. Deux types de mosaïques s'attaquent à l'orge d'hiver, la mosaïque jaune, VMJO et la mosaïque modérée, VMMO. Malheureusement, il n'existe jusqu'à présent aucun moyen de lutte contre le vecteur des mosaïques, le *Polymixa*, ni contre les virus eux-mêmes. La seule solution efficace et disponible actuellement, pour éviter le développement de ces maladies virales, est d'avoir recours à des variétés résistantes. C'est grâce à la sélection de variétés résistantes à la fois à la mosaïque jaune et à la mosaïque

modérée, que les agriculteurs peuvent continuer à cultiver aujourd'hui de l'orge d'hiver dont les parcelles touchées par ces deux maladies virales. (Amandine, 2003)

V-3/ Les maladies fongiques :

La rhynchosporiose (*Rhynchosporium secalis*)

La rhynchosporiose apparaît souvent en foyers. Elle se voit sur les limbes et à l'insertion des feuilles. En fin de cycle, le centre des tâches se dessèche et devient blanc. Les effets « pulvérisation » sur le feuillage sont assez nets courbures des feuilles, nombreux impacts de gouttes, etc.



Figure 4: symptômes de rhynchosporiose sur feuilles d'orge. <http://www.bayer-agri.fr>

La strie foliaire (*Pyrenophora graminea*).

Pyrenophora graminea (anamorphe *Drechslera graminea*) est transmise par les semences. Des lignes longitudinales jaunes, devenant brunes, apparaissent sur les feuilles des plantes infectées. L'épiaison est médiocre et les grains sont mal remplis. Il s'agit de la maladie transmise par les semences la plus importante de l'orge. Elle attaque les cultures d'hiver et de printemps.

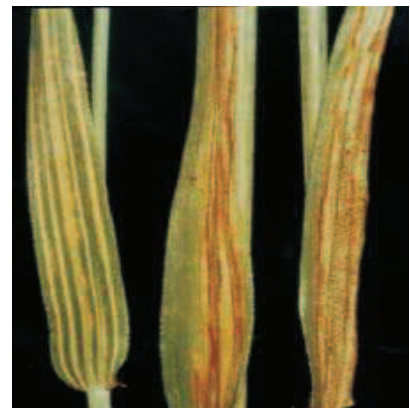


Figure 5 : symptômes des stries foliaires sur l'orge . <http://www.bayer-agri.fr>

L'oïdium (*Erysiphe graminis*).

Erysiphe graminis forme des plages de mycélium superficiel blanc puis gris sur les feuilles, les gaines et les épis d'orge. Les feuilles restent vertes et actives pendant un certain temps après l'infection, puis les zones infectées meurent progressivement. Les conidies sont formées en grand nombre et se présentent sous forme de poudre blanche à la surface du mycélium. Elles sont dispersées par le vent à des distances considérables et infectent les feuilles

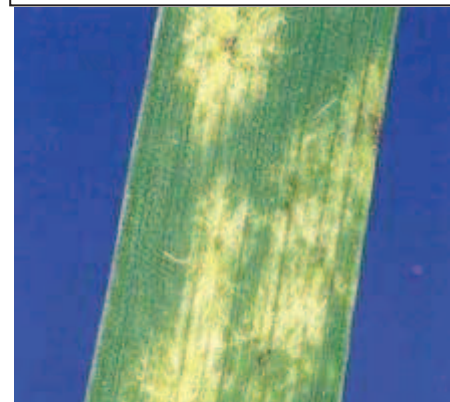


Figure 6 : symptômes de l'oïdium sur feuille de l'orge. <http://www.bayer-agri.fr>

saines. L'oïdium est donc favorisé par l'alternance de conditions humides et sèches.

La ramulariose (*Ramularia collo-cygni*)

Les tâches de la ramulariose sont visibles sur les 2 côtés de la feuille. La ramulariose a été identifiée pour la 1^{ère} fois en France en 2002. Les tâches de la ramulariose se présentent comme de « mini-tâches » d'helminthosporiose, mais elles sont plus claires, marrons, rectangulaires et suivent les nervures.



Figure7 : symptômes de ramulariose sur feuille de l'orge. <http://www.bayer-agri.fr>

Le charbon (*Ustilago hordei* , *Ustilago nuda*).

Ustilago hordei cause le charbon couvert de l'orge. Les plantules sont contaminées de manière systémique par des spores portées à l'extérieur des semences ou persistant dans le sol. Peu après la floraison, les talles contaminées produisent des épis infectés. Les plantes malades sont rabougries et les grains sont remplis d'une masse de spores noires enveloppées par une membrane transparente jusqu'à la récolte.



Figure8 : symptômes de charbon de l'orge. <http://www.bayer-agri.fr>

Ustilago nuda provoque le charbon nu de l'orge. L'infection est transmise par les semences. Le champignon pénètre l'endosperme au cours de la formation du grain. Les semences infectées produisent des plantes qui sont infectées de manière systémique. Les épis malades sont visibles juste après l'épiaison. Des spores noires sont libérées entre les glumes et les grains, et produisent une poussière noire libre (charbon nu). Elles sont transportées par le vent vers des épis sains qu'elles infectent.

Ergot

L'ergot est une maladie des plantes provoquée par un champignon, *Claviceps purpurea*, qui infecte les grains en développement des céréales et des graminées. Les symptômes de la maladie se manifestent au stade de gonflement du grain, lorsque l'ergot proprement dit, aussi appelé sclérote, pousse dans l'épi à la place des grains.



Figure9: symptômes de l'ergot. <http://www.bayer-agri.fr>

Les sclérotés sont formés d'un corps dur issu du mycélium du champignon. Leur capacité à survivre aux conditions hivernales leur permet de compléter leur cycle de reproduction. L'enveloppe protectrice des sclérotés est dure et de couleur brun-noire violacée, et l'intérieur varie du blanc au gris. Les sclérotés ont souvent une forme allongée et dépassent des glumes dans les épis approchant le stade de maturité. Leur taille peut être jusqu'à 10 fois plus grande que celle des grains qu'ils remplacent. (Pearse, Penny 1999).

Les septorioses

La Septoriose provoquée par *Septoria nodorum*, est devenue anecdotique et bon nombre de variétés actuelles présentent un bon niveau de résistance. Par contre, depuis la fin des années 80, *Septoria tritici* est devenue une maladie grave et motive les sélectionneurs qui ont amorcé des programmes spécifiques. La tolérance à cette maladie n'est évaluée que depuis trois ans au CTPS et, manifestement, il existe de la variabilité génétique vis-à-vis de cette maladie.



Figure 10: symptômes de septoriose. <http://www.bayer-agri.fr>

La fusariose

La fusariose est l'une des maladies les plus répandues des petites céréales provoquée par *Fusarium graminearum* où les symptômes sont décelables peu après la floraison. Des épillets atteints (glumes et fleurons) semblent avoir mûri

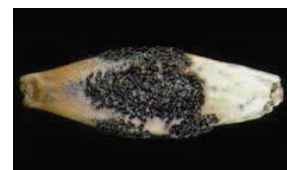


Figure 11: symptômes de fusariose sur la graine. <http://www.bayer-agri.fr>

(blanche) prématurément par comparaison aux épis sains qui sont verts. Le champignon peut s'attaquer à la totalité ou à une partie de l'épi. Le blanchiment des épis où la fusariose apparaît de 3 à 5 jours après l'infection.

V-4/ Autres ravageurs:

Un grand nombre d'espèces animales pouvant occasionner des déprédations sur la culture d'orge, mais seulement un petit nombre d'entre elles présente une importance économique; parmi ces espèces, on peut citer : Les vers blancs, les pucerons, les mouches grises, la mineuse d'orge et les oiseaux (Oufroukh et Hamadi ,1988).

I/ Echantillonnage

Les bactéries du sol sont connues pour leur production de molécules bioactives. Le but de cette étude, comme déjà expliqué, est de sélectionner des souches qui améliorent la croissance de l'orge. Donc, le choix est décidé pour les bactéries rhizosphériques. Les cotes de la wilaya de Béjaïa sont très riches en ce genre de microorganismes.

Dix échantillons du sol, et un échantillon de la phylosphère et l'endosphère des figues de barbarie (*Opuntia ficus-indica* L.) sont collectés dans la cote ouest de la wilaya de Béjaïa en Janvier 2011. Les sites de prélèvement sont choisis d'une manière aléatoire. Des carottes de 20cm de long sont utilisées pour les échantillons du sol, les prélèvements sont réalisés stérilement. Les échantillons obtenus sont transportés au laboratoire à basse température (4°C) dans une glacière où ils sont immédiatement traités aux fins d'isolement bactérien.

Tableau III: Origine des différents échantillons du sol et leurs caractéristiques

N° d'échantillon	Région	Type de sol
01	Saket	Agricole de couleur jaune
02	Saket	Agricole de couleur rouge
03	Saket	Agricole, noir
04	Thighremt	Foret, à coté de la rivière, rhizosphere des myrte (<i>Myrtus sp.</i>)
05	Thighremt	Très proche de la mer, rhizosphere des myrte (<i>Myrtus sp.</i>)
06	Aith mendil	Très rouge, rhizosphère de l'olivier
07	Aith mendil	Rhizosphère de figue de barbarie
08	Aith mendil	Rhizosphère du trèfle
09	Aith mendil	Sol très proche de la mer
10	Aith mendil	Agricole, rhizosphère de pomme de terre
11	Aith mendil	Phylosphère et rhizosphère de figue de barbarie

II/ Tests physicochimiques du sol

a/ Humidité

C'est la perte au séchage d'un produit frais (sol) à haute température jusqu'à stabilité du poids (Mathieu et Pieltain, 2003).

2g de chaque échantillon du sol sont soumis à la dessiccation à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids stable.

Les résultats des taux d'humidité sont déterminés selon l'équation suivante :

$$\text{L'humidité (\%)} = (P1-P2) \times 100 / (P1-P3)$$

P1 : Poids initial de l'échantillon et du creuset ;

P2 : Poids final de l'échantillon et du creuset après séchage ;

P3 : Poids du creuset vide.

b/ pH-eau

Peser 20g de terre (<2mm) séchée à 40°C dans un bécher. Ajouter 50ml de solution d'eau déminéralisée et agiter une minute avec une baguette de verre. Laisser reposer 2h. Plonger l'électrode dans le liquide surnageant et effectuer la mesure. Laisser la lecture se stabiliser pendant plusieurs secondes. Noter les valeurs à la deuxième décimale près.

c/ pH-KCl

Peser 20g de terre (<2mm) séchée à 40°C. Ajouter 50ml de solution de chlorure de potassium (1M). Agiter 5minutes à l'aide d'une baguette de verre. Laisser reposer 2h au moins mais pas plus de 24h.

Plonger l'électrode dans le liquide surnageant et effectuer la mesure. Laisser la lecture se stabiliser durant plusieurs secondes.

III/ Sélection des échantillons qui améliorent la croissance de l'orge

Origine des graines

Les graines d'orge de la variété tichedrett ont été fournies par le CCLS (Coopérative des Céréales et Légumes Secs) de Bordj Bou Arreridj. Les graines sont sélectionnées en fonction de la taille.

Stérilisation des graines

Les graines de l'orge sans stérilisées en les trempant dans l'éthanol 70% pendant 2 minutes, puis incubées dans une solution d'hypochlorite de sodium (2%) pendant 15minutes. Les graines sont ensuite lavées 6 fois par une eau desionisée stérile (Buddrus-Schiemann, 2009).

Test de germination

Les échantillons de sol sont homogénéisés dans des conditions d'asepsie. 10g de chaque échantillon est dilué dans 90ml de PBS. 5 graines stérilisées sont ensuite trempées dans chaque solution mère de PBS pendant 20minutes avec agitation. Pour le témoin, les 5 graines sont trempées dans de PBS stérile.

Des flacons de 250ml contenant 25ml de PCA, bien sellés avec le coton cardé et le papier aluminium, sont stérilisés dans l'autoclave.

Les 5 graines d'orge déjà incubées dans les solutions bactériennes sont déposées à la surface de PCA dans des conditions d'asepsie. Les flacons sont incubés à l'obscurité à température ambiante de laboratoire pendant une semaine (Sachin, 2009). La germination est estimée par la longueur moyenne du germe des graines de l'orge dans chaque flacon.

IV/ Sélection des bactéries qui améliorent la croissance de l'orge

Les solutions d'échantillons de sol qui ont permis une meilleure germination des graines de l'orge sont retenus. Ainsi, les échantillons 3, 9, 10 et 11 sont considérés positifs.

Des déluions décimales, allant jusqu'à 10^{-3} , sont réalisées pour ces échantillons. 1ml de chaque dilution estensemencé sur des milieux variés pour voir leur composition bactérienne. Les milieux utilisés sont gélose nutritive, Nfb, Jensen, YMA et M2. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48h à 7jours. Plusieurs repiquages successifs sont faits pour purifier les souches.

Le test de germination est refait en utilisant la même méthode et les mêmes conditions mais avec des souches pures cultivées dans le bouillon nutritif. La croissance est mesurée par la longueur de la tige.

VI/ Impact sur la germination et la croissance des graines de l'orge :

Afin de tester l'effet des quatre souches isolées et identifiées sur la germination et la croissance de l'orge une expérience est réalisée en pots.

Des pots en plastique de 1,5L de volume sont préalablement stérilisés à l'eau de Javel et remplis avec du sol agricole tamisé (texture homogène) (pH H₂O=8.60, pH

KCL= 7.70, H%= 7.70 %), Un lot de cinq pots est prévu pour chaque traitement (souches et témoin).



Figure 12 : Photo des pots semés avec les graines de l'orge

Les graines d'orge étudiées sont stérilisées selon le protocole de Götz et *al.* (2006) : Les graines imprégnées dans l'éthanol 70° pendant 1min, avec agitation douce. Elles sont ensuite remises dans une solution d'hypochlorite de sodium à 12%/15min. Enfin les graines sont récupérées et rincées abondamment à l'eau distillée stérile (6 lavages au minimum). Une fois stérilisées à leur surface, les graines sont plantées à raison de cinq par pot à une profondeur de 1 cm.

Dix ml de la suspension bactérienne de chaque souche étudiée sont rajoutés respectivement à chaque lot traité. Dix ml de bouillon nutritif stérile sont rajoutés au lot témoin.

Les cent cinq pots de l'expérience sont placés sous serre selon un plan de randomisation totale pour éviter l'effet de l'emplacement. Ces derniers sont séparés les uns des autres par une distance de 30 cm afin d'éviter l'interférence d'éventuelles contaminations bactériennes que celles étudiées.

Les pots sont arrosées chaque jour par l'eau du puits (Bashan, 1986 ; Nabti et *al.*, 2007).

L'expérience est réalisée dans des conditions de lumière/obscurité (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) naturelle à une température de 25-35°C (température diurne et nocturne), isolée de toute précipitation, pendant la période du mois de juillet.

Analyse statistique :

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique avec le logiciel ***XLSTAT pro version 7.5.2*** pour la réalisation du test de Fisher LSD avec une différence significative $P \leq 0.05$. Une analyse de la variance (ANOVA) est utilisée pour l'interprétation des résultats.

VI/ Identification des bactéries

VI-1/ identification phénotypique

Les bactéries qui ont montré une amélioration de la croissance des graines de l'orge sont sélectionnées et identifiées.

L'aspect macroscopique est déterminé sur milieu solide spécifique pour chaque souche après 5 jours d'incubation. La coloration de Gram a été effectuée. Et quelques tests biochimiques sont nécessaires pour donner une idée sur les différences entre les souches sélectionnées.

VI-2/ Identification phylogénétique des souches

Afin de compléter l'analyse phénotypique des souches isolées, une identification phylogénétique est réalisée sur la base du séquençage du gène d'ADNr 16S et sa comparaison avec les séquences d'autres bactéries. L'affiliation de la bactérie sera effectuée sur la base du pourcentage de similitude entre les séquences.

Les manipulations génétiques sont réalisées au laboratoire Resbiog, Faculté de pharmacie, université de Séville (Espagne).

Culture bactérienne

Une colonie bactérienne pure de chaque isolat est ensemencée sur milieu TSA solide (trypticase soja agar ; voir Annexe I) et incubée à 37°C/24h. Pour l'enrichissement, une colonie sera récupérée à l'aide d'un cure-dent stérile et déposée dans 5 ml de bouillon nutritif (BN) puis mise à incuber (37°C/une nuit).

Isolement et dosage de l'ADN

Afin d'extraire l'ADN bactérien, 1ml de chaque culture bactérienne (BN) est centrifugé à 8000g $\times$ g/5min, Seul le culot est gardé. Ce dernier sera suspendu dans 180 μ l du tampon T1 et agité. Le mélange est additionné de 25 μ l de la protéinase K puis vortexé. L'ensemble est incubé sous agitation continue à 56°C (2 h).

200 μ l du tampon B3 sont ajoutés à chaque échantillon. Le mélange est vigoureusement vortexé puis incubé à 70°C/10min. ensuite, récupéré et vortexé. Une centrifugation à 11000 $\times$ g /5 min (4°C) est finalement effectuée pour se débarrasser des résidus.

Le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf, additionné de 210 μ l d'éthanol (96%) puis agité au vortex.

Afin d'isoler l'ADN, Une deux Kit TOPO r Vector (Karlsruhe,Germany) est utilisé.

L'échantillon est transféré sur une micro-colonne contenant une membrane de silicone qui sert à récupérer l'ADN. Une centrifugation à 11000 $\times$ g/min (4°C) (Eppendorf 5417R) est appliquée pour écarter le surnageant et récupérer le culot sur la membrane de la microcolonne. Cette dernière subira ensuite plusieurs rinçages en utilisant différents tampons (BW 500 μ l ; B5 600 μ l). Une centrifugation à 11000 $\times$ g/min (4°C) est réalisée après chaque lavage. Seul le culot suspendu sur la membrane de la micro-colonne est gardé.

Pour l'élution de l'ADN pur, la micro-colonne sera transférée dans un autre tube Eppendorf (1.5ml) contenant 10 μ l du tampon BE. Le tout est séché à 70°C/10min puis centrifugé à 11000 $\times$ g /min (4°C). Enfin, Le surnageant est récupéré et l'ADN pur est dosé à l'aide du spectrophotomètre UV à 260 nm (Marmur and doty, 1962).

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour un volume réactionnel de 50 μ l, les réactifs suivants sont ajoutés au tube-test de la PCR :

Tampon de PCR (10 $\times$) 2,5

ADN (100 ng) 3

(50mM) dNTP 0, 5

(100ng) Amorce P1 1

(100ng) Amorce P2 1

Taq polymerase (5U/ μ l) 0.2 μ l

Eau bi-distillée 41,8 μ l

Le mélange est déposé dans un thermocycleur (Primus 96 advanced, Sigma-Germany) pendant (2,5h). Un témoin est utilisé en parallèle, il contient le même mélange réactionnel sauf de l'ADN.

Electrophorèse sur gel d'agarose :

Une électrophorèse sur gel d'agarose (1g agarose+100 ml tampon d'électrophorèse) est réalisée pour séparer les bandes d'ADN selon leur poids moléculaire. La migration est effectuée sous 100mA/190V pendant 1h.

La plaque d'électrophorèse est récupérée ensuite déposée dans une solution de bromure d'éthidium (1µg /l ml d'eau distillée) pendant 30 min pour la visualisation des bandes d'ADN aux UV).

L'ADN 16S est récupéré selon son poids moléculaire ; puis cloné en utilisant le Kit Invitrogen « TOPO Cloning Kit pCR 2.2 TUCA® Germany).

Séquençage :

150ng de plasmide pCR sont récupérés et l'ADN est séquencé par un séquenceur automatique ABI PRISM 2730 DNA analyzer, Applied biosystems ; USA).

Analyse phylogénétique :

Les séquences obtenues sont alignées, l'arbre phylogénétique est calculé par le maximum de vraisemblance (Likelihood method) (Felsenstein, 1981) avec un filtre de 50%. La similitude des séquences (P distances) est calculée par la méthode de la matrice des distances (Saitou and Nei, 1987).

VII/ Recherche des propriétés d'intérêt agricole

VII-1/ Activités enzymatiques

Afin de déterminer l'utilité des isolats dans la fertilisation des sols, certaines enzymes (cellulase, amylase, protéase, lipase, estérase, uréase, phosphatase) sont recherchées. De plus, la présence de la chitinase, et la production des sidérophores qui sont impliquées dans l'attaque contre les champignons phytopathogènes (lutte biologique) ont fait l'objet de notre étude.

VII-1-1/ Détermination de l'activité cellulasique

Pour révéler l'activité cellulasique, un repiquage des souches est effectué sur milieu de Carder. (1986) contient en g/l: Na_2HPO_4 (6) ; KH_2PO_4 (3) ; NaCl (0,5) ; NH_4Cl (1); Extrait de levure (3) ; CMC (carboxyméthylcellulose) (7) ; Agar (15) pendant 48h/30°C, dans le but d'avoir des cultures jeunes.

Les boîtes sontensemencées par la méthode des cylindres d'agar, puis incubées pendant 8 jours à 30°C (Carrim et *al.*, 2006).

Après l'incubation, une solution de rouge Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies. Après 20 minutes, la surface est inondée avec 1M de NaCl puis laissée au repos une nuit. Par ailleurs, l'apparition d'un halo clair autour des disques traduit la présence d'une cellulase extracellulaire.

VII-1-2/ Détermination de l'activité estérasique

Le milieu de culture utilisé contient en g/l : peptone (10) ; NaCl (5.0) ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1) ; Tween 80 (1%, v/v) et Agar (18). Le pH est ajusté à 7,4. Le milieu estensemencé et incubé à 30°C/48h. La présence d'une activité estérasique est traduite par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Carrim et *al.*, 2006).

VII-1-3/ Détermination de l'activité lipolytique

La recherche de l'activité lipolytique est réalisée de la même manière que l'activité estérasique. Toutefois, le tween 80 est remplacé par le tween 20, et le résultat positif est déterminé par la présence d'un halo clair autour des colonies (Carrim et *al.*, 2006).

VII-1-4/ Détermination de l'activité chitinasique (Kopečný et *al.*, 1996).

Le milieu de culture suivant est utilisé, il est composé de la manière suivante en g/l : La chitine colloïdale : 0.8 à 0.6, K_2HPO_4 : 2.7, KH_2PO_4 : 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.7, NaCl : 0.5, KCl : 0.5, Extrait de levure : 0.13, Agar : 15.

Le milieu estensemencé par la méthode des disques et l'incubation dure 7 jours minimum/ 30°C. L'activité chitinasique se manifeste par un halo transparent autour de ces disques.

Préparation de la chitine colloïdale

1g de chitine est suspendu dans 9 ml de HCl concentré. La solution est laissée sous agitation pendant 2 heures jusqu'à dissolution (apparition d'une couleur brune). Par

la suite, la solution est transférée dans une fiole de 250 ml et le volume est complété avec de l'eau distillée.

Après un temps du repos (une nuit), le surnageant est décanté et enlevé et le culot est resuspendu dans de l'eau distillée. La procédure de lavage et de décantation est répétée trois fois avec de l'eau de robinet et trois fois avec l'eau distillée.

Enfin, le surnageant est éliminé et la chitine décantée est filtrée à l'aide d'un tamis métallique de 0,5 mm. L'effluent est stocké dans une bouteille opaque à 4°C.

VII-1-5/ Détermination de l'activité protéasique (Bach et Munch, 2000).

Le milieu de culture contient en g/l : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levure (2,5) ; Glucose (1), et Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7 et autoclavé 20 minutes à 120°C.

Parallèlement, 100 ml d'une solution de lait écrémé à 10% autoclavée (120°C/10 min) est préparée et ajoutée au milieu. Ce dernier est ensuiteensemencé par la méthode des disques.

Les bactéries ayant une activité protéasique montrent un halo transparent autour des disques.

VII-1-6/ Détermination de l'activité amylasique (Vinoth Raj et *al.*, 2009)

Afin de mettre en évidence la capacité des souches à dégrader l'amidon soluble, un test d'activité amylasique est réalisé sur gélose à base d'amidon. Le milieu contient en (g/l) : KNO₃ (0,5), K₂HPO₄ (1,0), MgSO₄ (0,2), CaCl₂ (0,1), FeCl₃ (0,001), amidon soluble (10,0), agar (15,0), eau distillée 1000 ml. Le pH est ajusté à 7,2 puis autoclavé à 121°C/30mn. Une solution de lugol (révélateur) est préparée comme suit : 1g d'iode cristallin, 2g de KI, 300ml d'eau distillée. Le tout est mélangé et laissé au repos puis filtré.

Le milieu estensemencé par dépôt d'un disque de 5 mm de chaque souche (âgée d'une nuit) à la surface. L'incubation se fait à 30°C/48-72h. Après apparition des colonies, la solution de lugol préalablement préparée sera éparpillée sur toute la surface du milieu. Ensuite après quelques minutes du contact, l'excès sera éliminé et les boîtes seront lavées à l'eau distillée.

La lecture s'effectue de la manière suivante :

La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noire, ceci implique une absence d'activité amylasique.

En revanche, si l'amidon est hydrolysé, une zone claire apparaîtrait autour des disques d'agar. Ce qui traduit une présence d'activité amylasique chez les souches.

VII-1-7/ Détermination de l'activité phosphatasique (Peix et *al.*, 2001)

milieu YED-P

Le milieu de culture contient en g/l : extrait de levure (5) ; glucose (5) ; Agar (7,5) et 1l d'eau distillée. Le milieu est autoclavé 120°C/20min, ensuite, 20 ml d'une solution du phosphate tricalcique (10%) autoclavée est rajoutée.

Les bactéries à activité phosphatasique (YED-P) montrent un halo transparent autour de leurs colonies.

VII-1-8/ Détermination de l'activité uréasique (Christensen, 1946).

Pour préparer le milieu ; ajouter en g/950ml d'H₂O_d (CSP): Peptone (1), Glucose (1), NaCl (5), Na₂HPO₄ (1,2), KH₂PO₄ (0,8), Rouge de phénol (0,012), Agar (15).

Le milieu est ajusté à pH 6,8 et autoclavé 20 minutes à 120 ° C. Après autoclavage, ajouter 50 ml d'une solution d'urée à 40% préalablement filtrée. Enfin versez le milieu en boîtes de Pétri. Les bactéries qui sont uréase positive montrent un halo rose autour de leurs colonies.

VII-1-9/ Détection des bactéries productrices de sidérophores (Schwyn and Neilands, 1986)

Pour la recherche des protéines fixatrices du Fer, plusieurs milieux sont utilisés :

Partie solide

1.3 g de tampon PIPES sont dissous dans 60 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 et le volume du milieu est ajusté à 80 ml, puis additionné de 1.5 g d'agar. Le milieu est enfin autoclavé à 121°C/30 min.

Solution CAS

Solution (1) : 60,5 mg de chromoazuroIS (CAS) sont dissous dans 50 ml d'eau distillée. Une

solution stock de FeCl₃ x 6H₂O (100 mM) est parallèlement préparée.

Solution (2) : 100 µl de la solution stock sont dilués dans 9,9 ml de HCl (10 mM) à 37%.

Solution (3) : 72,9 mg de HDTMA (bromure de hexadécyl-triméthyl- ammonium) sont suspendus dans 40 ml d'eau distillée.

Les trois solutions sont mélangées comme suit (1+2) + 3x HDTMA. Le mélange est couvert avec du papier aluminium pour empêcher la dégradation de la CAS et la solution stock est autoclavée puis conservée à 4°C.

Milieu MM9

Le milieu contient en g/100ml d'eau distillée : Na₂HPO₄ x 7H₂O (0,28) ; KH₂PO₄ (0,3) NaCl (0,05) ; NH₄Cl (0,1) et extrait de levure 100µl à 10%. 50 ml d'une solution de glucose à 40% (ampoule) sont ajoutés au milieu après autoclavage, pour obtenir un milieu MM9 glucosé à 20%.

Pour la réalisation du test : 10 ml de la solution de FeCl₃ x 6H₂O (1 mM dissout dans 10 mM HCl) sont additionnés de 10 ml de milieu MM9 glucosé à 20%. Le mélange est enfin ajouté au milieu solide à base du tampon PIPES.

VII-10/ Synthèse d'hormone : AIA (Acide Indole Acétique : auxines) :

Ce test permet de voir la capacité de la bactérie à produire la phytohormone (auxine) in vitro, cela à partir de l'indole produit par désamination et hydrolyse de tryptophane présent dans le milieu de culture (Guiraud et Galzy, 1980).

Le milieu minimal NF-b liquide (voir Annexe I) est utilisé. Toutefois, l'acide malique (source de carbone) est remplacé par le glucose à raison de 10%. Une solution de tryptophane est ajoutée à une concentration finale de 0,5mg/l.

Des tubes à essai contenant 5 ml de milieu sont ensemencés par chacune des souches bactériennes puis mis à l'incubation à 30°C/4 jours. Les cultures sont par la suite centrifugées à 13000tr/3min. 1,2 ml de surnagent sont récupérés et additionnés de 4,8 ml de réactif de Salkowsky (150 ml H₂SO₄ 98% + 250 ml H₂O+ 7,5 ml FeCl₃ 0,5M). La solution est agitée au vortex et gardée à température ambiante pendant 20 minutes.

L'absorbance de la coloration rose apparue est mesurée au spectrophotomètre à 535 nm. La concentration de l'AIA est déterminée par établissement d'une courbe d'étalonnage de la DO 535 nm en fonction de la concentration de AIA (Sigma) pur en µg/ml.

VII-11/ Mise en évidence de l'activité antifongique

L'antagonisme microbien implique une interaction directe entre deux microorganismes partageant la même niche écologique (Alabouvette et al., 2006).

Origine des souches fongiques

5 espèces différentes de champignons phytopathogènes sont testées :

Botrytis cinerea (souche de laboratoire de mycologie-UAMB-Algérie), *Verticillium dahliae*, *Phytophthora cinnamomi* (Laboratoire Rizbiog faculté de pharmacie université de Séville-Espagne), *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* (souche de laboratoire LMA de UAMB-Algérie).

Les champignons sont repiqués sur milieu gélosé à extrait de, dans le but d'obtenir des cultures jeunes.

Les 04 souches bactériennes sont utilisées. Ces bactéries sont repiquées sur gélose PCA et incubées à 30°C/48h.

L'interaction entre les souches bactériennes et les champignons phytopathogènes est étudiée sur le milieu TSA (Trypticase Soja Agar). Dans chaque boîte de Pétri contenant du milieu gélosé TSA, trois disques d'agar, contenant chacun une souche bactérienne, sont déposés à la surface de la gélose de manière équidistante du bord (1 cm du bord), et un implant de champignon (4 mm de diamètre) est déposé au centre de la boîte de Pétri.

Des boîtes de pétri contenant que le champignon cible sont préparées en parallèle pour servir de témoins. Les boîtes sont sellées avec le para- film et incubées à 25 ± 2°C/5-7J. Selon la vitesse de la croissance du champignon, la confrontation aura lieu à des périodes différentes après l'inoculation des bactéries.

L'apparition des zones d'inhibition est suivie quotidiennement en comparaison avec les témoins (Saddiki, 1999).

Trois répétitions sont effectuées pour chaque essai.

Le pourcentage d'inhibition (PGI%) de la croissance est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PGI\%} = \text{KR-R1/KR} \times 100$$

□ **KR** : la distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de la colonie contenue dans le témoin.

□ ***R1*** : la distance en mm entre le point d'inoculation du champignon phytopathogène et la marge de la colonie contenue dans la boîte de Pétri traitée.

Les échantillons du sol et l'échantillon de la figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica* L.) sont numérotés : E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11 respectivement.

I/ Tests physico-chimiques

a. Humidité

Les résultats des tests d'humidité sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau IV. Les valeurs de l'humidité des différents échantillons.

Echantillon	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
Humidité (%)	13.4	22.9	22.4	20.2	21.3	7.4	2.8	11.5	8.5	11.15	93.65

On remarque une forte variation des taux d'humidité des sols prélevés, cette variation est due à la composition du sol et la région dont il se trouve. Les échantillons E1, E2, E3, E4, E5, E8, E10 ont un taux d'humidité supérieur à 10. Ces derniers sont des sols agricoles riches en matière organique et en eau. Par contre, les échantillons E6, E7, E9 sont des sols non exploités sont moins humides. L'échantillon E11 qui n'est pas un sol, c'est la feuille de figue de barbarie est très riche en eau.

b. pH

Les résultats des différentes valeurs du pH des 11 échantillons sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau V. Les valeurs du pH-eau et pH-KCl des différents échantillons.

Echantillon	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
pH _{KCl}	7.78	7.24	7.70	5.42	6.69	6.83	6.74	6.77	6.84	6.66	5,63
pH _{eau}	7.34	6.59	7.00	5.28	5.89	5.66	5.42	6.24	6.14	6.06	/

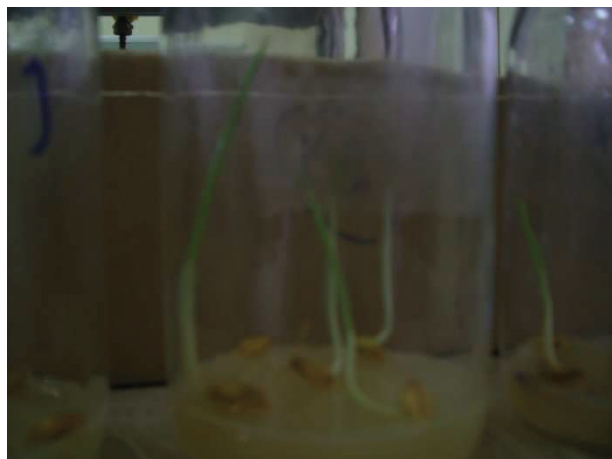
La mesure du pH d'un sol rend compte de la concentration des ions H_3O^+ à l'état dissocié dans le liquide surnageant. Ces ions sont en équilibre avec ceux présents à l'état non dissocié, fixés sur certains composants solides du sol tels que les minéraux argileux, les matières organiques et certains composés dans lesquels l'aluminium est associé à des molécules d'eau et à des OH^- . Pour déterminer la concentration totale des H_3O^+ , on ajoute du KCl à la solution du sol. Les ions K^+ s'échangent avec les ions H^+ qui n'étaient pas dissociés en suspension aqueuse. La différence entre le pH eau et le pH KCl nous donne une idée sur l'acidité potentielle (Denis ; 2000).

Selon Denis (2000), les échantillons E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 ($5 < \text{pH} < 6.5$) sont des sols peu acide et les échantillons E1, E2, E3 ($6.5 < \text{pH} < 7.5$) sont des sols neutre. La diversité bactérienne dans le sol est très influencée par l'humidité et le pH du sol. Dans nos échantillons, on a des valeurs d'humidité et de pH moyenne qui n'inhibent pas la croissance bactérienne ni sa diversité.

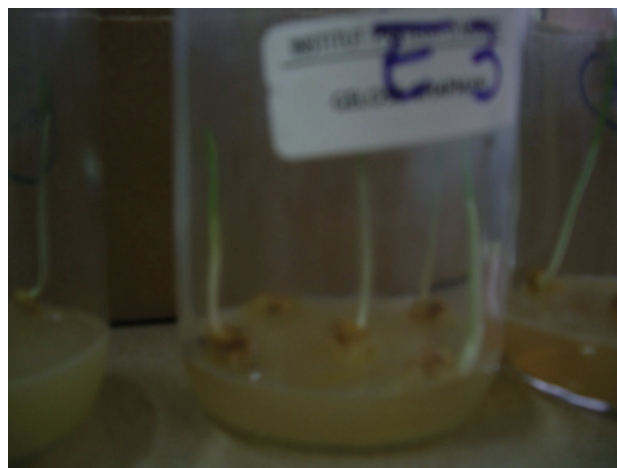
II/ Test préliminaire de germination

Après une semaine à l'obscurité et à température de laboratoire, les flacons inoculés sont récupérés et le nombre et la vitesse de germination des graines (semences) sont comparés au flacon témoin. Les germes qui n'ont pas atteint ou dépassé la longueur du témoin sont écartés.

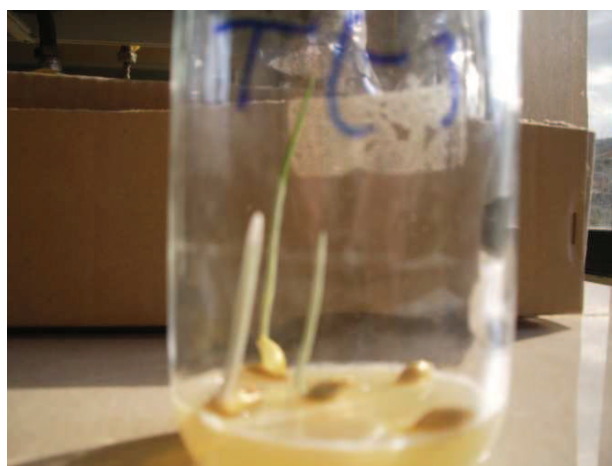
A



B



C



D



Figure 13 : Résultats du test de germination de l'orge au laboratoire.

Des études préalables ont montré que les bactéries du sol peuvent avoir un effet bénéfique ou négatif sur la croissance des plates. Pour faire une présélection des échantillons du sol prélevés, un test préélémentaire est réalisé pour nous permettre de choisir les échantillons riches en bactéries bénéfiques (par amélioration de la croissance) et d'éliminer les échantillons riches en bactéries à effet négatif.

Les résultats des tests préliminaires de germination ont permis de sélectionner les échantillons suivants : **E3, E9, E10, E11** (4 flacons sur 11). Ce sont les quatre échantillons qui ont amélioré la croissance de l'orge dans des flacons au laboratoire.

Ces échantillons de sol sont très riches en bactéries bénéfiques. Mais les quelles des ces dernières ont donné cet effet positive ?

À partir de ces quatre échantillons des différentes dilutions décimales sont obtenues et ensuiteensemencées sur les cinq milieux de culture choisis.

En se basant sur l'aspect des colonies sur boîtes de Pétri, 120 souches sont isolées et repiquées puis utilisées pour réaliser un test de germination pour vérifier l'efficacité de chaque souche, et sélectionner celles qui améliorent de la croissance de l'orge.

III/ Test de germination avec des souches pures

Après purification des souches, le test de germination est refait à nouveau sur les graines de l'orge stérilisées dans des flacons au laboratoire. Ce test nous a permis de sélectionner 20 souches qui ont amélioré la croissance de l'orge avec une différence très importante comparant avec le témoin.

Le choix des 20 souches est basé sur le nombre des graines germées et la hauteur de la première feuille. Pour les 20 souches, on a 5 graines qui ont germé dont la première feuille présente une hauteur de 5cm à 6cm. Les résultats obtenus avec le témoin sont inférieurs à ceux obtenus avec ces dernières (4 graines germés avec une hauteur variée entre 3 et 4cm).

IV/ Test de germination *in vivo*

Vingt souches ont permis l'amélioration de la croissance des graines de l'orge *in vitro*. Mais le but de ce travail est de les utiliser comme fertiliseurs du sol, donc elles doivent résister aux conditions du sol et pouvoir améliorer la croissance des graines dans le sol et résisté aux activités humaines et à l'activité antimicrobienne des autres bactéries, des champignons et de tous les prédateur présent dans le sol. Pour cela un test de germination *in vivo* est réalisé dans des pots sous serre pour pouvoir

maîtriser les conditions météorologiques (pluie, chaleur et humidité) et pour homogénéiser l'environnement au tour des pots. Un plan de randomisation est utilisé pour éviter tout effet de l'emplacement. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 15.

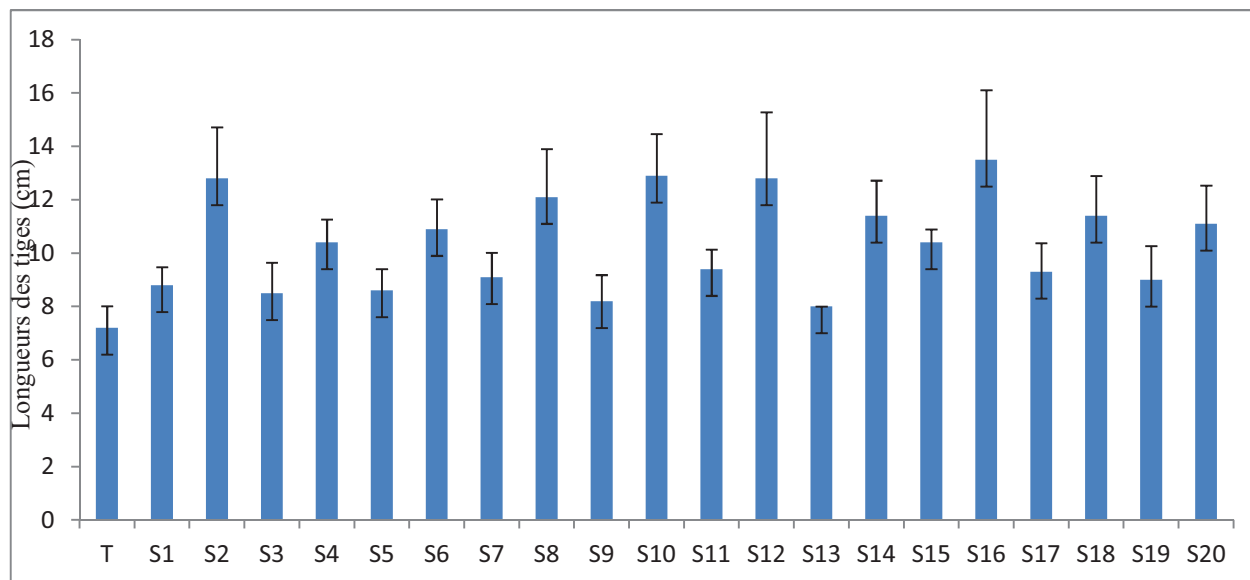


Figure 14 : Longueurs des tiges de l'orge inoculée par les différentes 20 souches choisies. (T : Témoin).

Le test ANOVA nous a permis de choisir 4 souches qui ont montré une différence significative de croissance comparant avec d'autres souches et avec un témoin. Ces 4 souches regroupées dans la classe A par test d'ANOVA, avec des différences très significatives comparées avec le témoin (classe F) (voir Annexe II). En effet, toutes les souches ont montrées des différences significatives avec le témoin sauf une qui est dans la même classe F. Mais les meilleures sont ceux de la classe A (S2, S10, S14, S20) avec des moyennes allant entre 11 et 13 cm de hauteur des tiges. La moyenne du témoin ne dépasse pas 7 cm.

V/ Identification des souches

V-1/ Identification biochimique et physiologique

L'observation de l'aspect cultural et morphologique des colonies isolées et purifiées des quatre souches est réalisée sur milieu TSA. D'autres observations au microscope optique sont aussi faites sur ces dernières, à l'état frais et après coloration de Gram (X100). Et quelques tests biochimiques pour pouvoir diriger le choix des tests suivant. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI: Caractères biochimiques et physiologiques des quatre souches étudiées

Souche	S20	S2	S14	S10
milieu d'isolement	NFb	Jensen	Jensen	YMA
GRAM	G-	G+	G+	G+
forme des cellules	bacilles	filamenteuses	cocci	bacilles
mobilité	mobile	mobiles	immobiles	immobiles
Catalase	négative	négative	positive	négative
nitrate réductase NR	NR-	NR+	NR+	NR+
uréase	négatif	négative	négative	positive
tryptophanase	négatif	négative	négative	négative
TDA	négatif	négative	négative	positive
glucose	glu-	glu+	glu+	glu-
lactose	lac-	lac+	lac-	lac-
mannitol	man+	man+	man+	man+
H₂S	négatif	négatif	négatif	négatif

L'utilisation de 5 milieux d'isolement a permis de maximiser les chances d'avoir des souches à activité PGPR importante. Pour la présente étude les milieux NFb, Jensen et YMA ont permis l'isolement de 4 souches bénéfiques pour la croissance de l'orge. On remarque qu'à partir des résultats d'identification classique que ces 4 souches sont différentes. Il y a une souche à Gram négatif et 3 à Gram positif, et même si on compare leurs aspects sous microscope à l'état frais ou après fixation on remarque des différences de forme et de mobilité. Ces résultats ne peuvent pas préciser la classification de ces souches mais au moins nous permettent de dire que sont 4 souches différentes (ou même dire espèces différentes). Pour les identifier un séquençage du gène de l'ARNr 16S est réalisé.

V-2/ Identification phylogénétique

Sur la base des ressemblances de l'ADNr 16S et l'alignement des séquences.

Analyse phylogénétique et comparaison de la diversité :

Après alignement des séquences, l'analyse des distances est calculée par la méthode de la matrice des distances qui compare la similarité des séquences des souches étudiées par rapport à celles des autres souches d'une banque de données (Saitou et Nei, 1987).

Tableau VII. Matrice des similitudes basée sur 1150 nucléotides du gène d'ADNr 16S des souches.

	<i>Bacillus megaterium</i> 102LT	<i>Bacillus megaterium</i> LH2	<i>Bacillus megaterium</i> MRE	
S10	98%	97,3%	98,4%	
	<i>Streptomyces</i> <i>albogriseolus</i>	<i>Streptomyces</i> <i>albogriseolus</i>	<i>Streptomyces</i> <i>albogriseolus</i>	
S2	98,9%	95%	95,2%	
	<i>Micrococcus luteus</i> TB	<i>Micrococcus luteus</i> SET	<i>Micrococcus luteus</i> MR12	
S14	98,69%	98,2%	98%	
	<i>Pseudomonas</i> sp. VET- 5 16S	<i>Pseudomonas</i> sp. JLF- a399	<i>Pseudomonas</i> sp S2	
S20	97%	98%	99%	

Les pourcentages de similitudes révèlent que la souche S10 présente la similarité la plus élevée avec la souche *Bacillus megaterium* MRE (98,4). Alors que la souche S2, elle est très similaire avec la souche *Streptomyces albogriseolus* (98,9).

Concernant la souche S14, elle présente une similarité avec *Micrococcus luteus* TB (98,6). La souche S20 est la plus proche de *Pseudomonas* sp S2 (99%).

Selon Lucy et al. (2004) plusieurs souches bactériennes sont considérées comme des stimulateurs de la croissance de l'orge. Les plus citées sont

Azospirillum brasilense, *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia mobilis*, *Clostridium Sp.*, *Pseudomonas Sp.*, *Bacillus subtilis* et *Bulkholderia cepacia*. Il y'a des mécanismes d'amélioration en commun pour ces bactéries, mais chaque souche a un effet particulier sur la croissance de l'orge.

Les souches isolées dans cette étude sont *Bacillus megaterium*, *Streptomyces albogriseolus*, *Micrococcus luteus* et *Pseudomonas Sp.* Ces souches ont amélioré la croissance de l'orge *in vivo*.

De nombreuses espèces du genre *Pseudomonas* possèdent des activités PGP sur différentes plantes. Ce qui concerne l'orge, Gunnar et *al.* (2011) ont isolé la souche *P. fluorescens* CHA0 qui stimule la croissance de l'orge par la protection des racines. Alors que Iswandi et *al.* (1987) ont utilisé *Pseudomonas* spp sur un champ d'orge pour une augmentation de rendement entre 15 et 25%. Un autre phénomène est obtenu avec *Pseudomonas putida* GR12-2 productrice de l'ACC désaminase pour réduire l'éthylène, ce qui permet l'élongation des racines (Hall et *al.*, 1996).

Environ 95% des bacilles Gram positif du sol appartiennent au genre *Bacillus* (Barriuso et *al.*, 2008). Les espèces de ce genre sont capables de former des endospores qui leur permettent de survivre dans des conditions défavorables. Certaines espèces sont diazotrophes (Antoun et Prévost., 2005), alors que d'autres sont capables de produire des substances régulatrices de la croissance des végétaux, telles que, les phytohormones, la solubilisation et la mobilisation du phosphate et la production de siderophores...etc. ; mais également des métabolites protecteurs de la santé des plantes vis-à-vis des phytopathogènes comme les antibiotiques et les enzymes extracellulaires (Kumar et *al.*, 2011). C'est pour toutes ces caractéristiques que ces souches sont utilisées comme des bio-fertilisateurs dans plusieurs produits commercialisés, comme Epic, HiStick N/T, Kodiak, Rhizo-Plus, Serenade, Subtilex et System 3. Ces derniers sont destinés pour des cultures de l'orge (Chet et Chernin 2002, Glick et *al.* 1999).

Les actinomycètes constituent un groupe majeur des bactéries du sol. Elles jouent un rôle très important dans le cycle des nutriments (Figueiredo de

Vasconcellos, 2009). En outre, ces bactéries sont connues pour leurs importances économiques comme des producteurs des substances bioactives. 75% de ces substances sont produites par Le genre *Streptomyces* (Franco-Correa et al., 2010). Les *Streptomyces* sont utilisés comme des PGPR dans un produit commercialisé sous le nom de Mycostop. Ce produit est utilisé dans les champs, pour les plantes ornementales et les cultures maraîchères.

Dastager et al. (2010) ont isolé une souche *Micrococcus* Sp. à partir du sol, elle stimule la croissance de niébé par production des hormones et amélioration de la disponibilité des nutriments. D'autres auteurs ont révélé que l'effet PGPR de *Micrococcus luteus* est dû à la production des hormones de croissance sur une culture de l'haricot mungo (Barazani et Friedman, 1999 ; Basharat et al., 2010). Mais aucune publication sur l'interaction de cette souche avec l'orge n'a été éditée.

VI/ Recherche des propriétés d'intérêt agricole

Plusieurs auteurs ont décrit les mécanismes d'amélioration de croissance des plantes par les PGPR. Les résultats obtenus pour les souches isolées durant cette étude sont regroupés dans le tableau VIII.

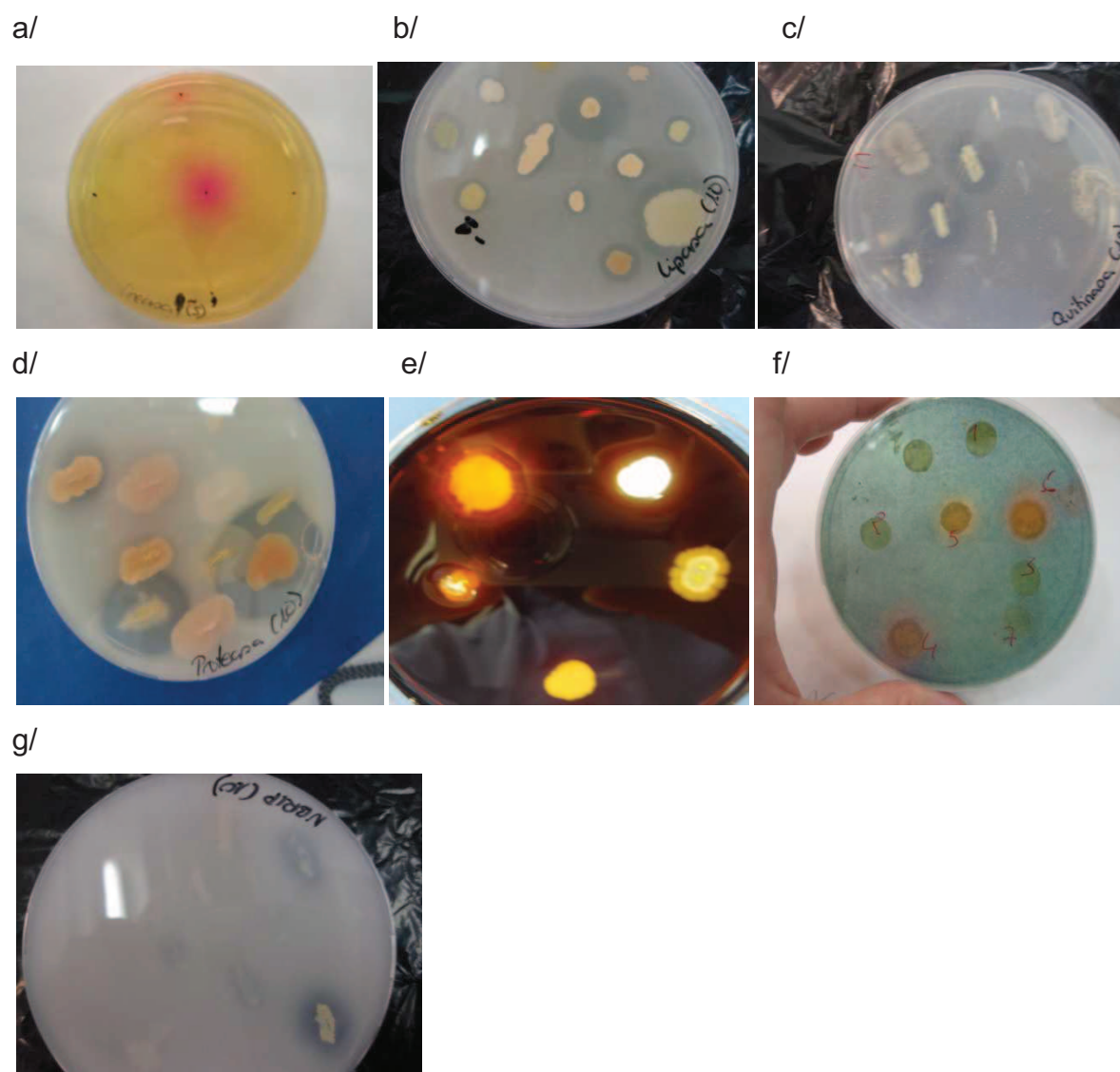


Figure 15 : Quelques activités (a : uréase, b : lipase, c : chitinase, d : protéase, e : amylase, f : siderophore, g : solubilisation du phosphate)

Tableau VIII : Résultats des différentes activités testées pour les 04 souches

Souches	<i>Streptomyces albobriseolus</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Estérase	-	-	+	+
Lipase	+	+	-	+++
Protéase	+	-	-	+
Chitinase	+	+	+	-
Phosphatase	+	+	+	-
Amylase	+	-	+	+
Uréase	+	+	-	-
Sidérophores	-	+	+	-
NFB	+/-	++	+	+
Cellulase	+	-	+	-
quantité IAA (mg/l)	48,86	51,8	100,63	49,37

L'utilisation des bactéries pour la production des enzymes dans le sol, dans le but d'améliorer la biodisponibilité des nutriments pour la plante, ou pour la production des hormones pour améliorer la croissance des plantes, a été étudiée par plusieurs auteurs. Et présente beaucoup d'avantage.

Les enzymes sont des protéines, présentes dans tous les organismes vivants et responsables de la catalyse (accélération) de différentes réactions chimiques. Il existe un nombre très important d'enzymes et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. Selon cette classification, à chaque enzyme correspond un numéro EC (« Enzyme Commission »).

Une enzyme est spécifique d'un substrat, molécule dont elle catalyse la transformation. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée. Leur mode d'action est basé sur la reconnaissance spécifique du substrat par un domaine particulier chez l'enzyme (site actif ou site catalytique). L'activité enzymatique est liée à la structure tertiaire de l'enzyme, et notamment à celle du site

actif. Des facteurs comme le pH ou la température, pouvant influencer cette structure tridimensionnelle ou encore l'état d'ionisation du site actif, affectent fortement l'activité enzymatique. Chaque enzyme possède donc une température et un pH d'activité optimale (Leroy ; 2006).

VI.1. L'activité estérasique et lipasique

Les estérases et les lipases sont des sous classes de la superfamille des hydrolases. Les lipases sont différenciées des estérases par la capacité d'hydrolyser les esters de glycérol des acides gras à longue chaîne, ainsi qu'elles sont active à l'interface lipidique/eau (Laskin et al. ; 2006).

Les lipases hydrolysent les triacylglycérols en monoacylglycérol, diacylglycérol, glycérol et acide gras libres. La distinction entre l'activité lipase et l'activité estérase n'est pas claire. On définit les lipases comme des estérases qui peuvent hydrolyser des triacylglycérols à longue chaîne d'acide gras (Villeneuve et Frogilia, 1997).

La synthèse des lipases et des estérases par les quatre souches est une activité qui contribue à la dégradation de la matière grasse et par conséquent, les souches pourraient participer dans le recyclage, et fournissent les éléments minéraux nécessaires aux plantes.

VI.2. L'activité Protéase

Concernant les quatre souches, 2 sur 4 présentent une activité protéasique positive. Les protéases d'origine microbienne sont probablement les plus largement secrétées parmi toutes les enzymes. En plus, ce sont les enzymes les plus importantes en industrie avec 60% du totale des enzymes vendues (Ningthoujam *et al.*, 2009). Elles sont utilisées dans le domaine alimentaire, l'industrie fromagère, des détergents, industrie de soie, domaine de la pharmacologie et production des médicaments...etc. (El-Safey et Abdul-Raouf, 2004). Leur synthèse se manifeste durant la période de sporulation chez *Streptomyces*, ce qui est de même pour *Bacillus subtilis* (Siddique *et al.*, 2001). D'après Ferracini-Santos et Sato. (2009), les protéases sont produites durant la phase exponentielle de croissance. Mansour *et al.* (1994) ont aussi révélé la capacité des *Streptomyces sp.* à produire des enzymes extracellulaires (amylases et les protéases).

La présence de l'activité protéasique chez la souche de *Bacillus*, peut laisser penser que certaines espèces de ce genre tendent à synthétiser des enzymes

protéolytiques durant le processus de sporulation, ces résultats sont en accord avec ceux de Ferracini-Santos et Sato (2009). Comparé au genre *Bacillus*, les actinomycètes sont moins exploités pour l'activité protéasique. Il ya peu de rapports sur les activités protéasiques des actinomycètes par rapport au *Bacillus* (Ningthoujam et al., 2009). Parmi les souches d'actinomycètes, certaines sont productrices d'enzymes protéolytiques, d'autres non (Ningthoujam et al., 2009).

En revanche, les conditions de culture (source de carbone et d'azote) jouent un rôle important dans les activités protéasiques : certaines souches comme *Streptomyces* et *Bacillus subtilis* sont activées par le saccharose comme source de carbone, d'autres sont activées par l'amidon. Alors que pour la source d'azote, la peptone donne les meilleurs résultats.

Il a été observé chez *Streptomyces* que la caséine est la meilleure source. Le pH du milieu joue aussi un rôle important. Il faut également signaler que les *Streptomyces* sont connus par leur production de plusieurs protéases à plusieurs spécificités (Ningthoujam et al., 2009).

L'activité protéasique peut avoir un effet plus poussé, elle influence indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'AIA et d'autres substances appariées (Mansour et al., 1994).

VI.3. L'activité Chitinase

La chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (Muzzarelli, 1999), la chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. Les enzymes chitinolytiques impliquées dans les processus de dégradation de la chitine sont nombreuses. Parmi elles, les chitinases sont des glycosides hydrolases, qui assurent la rupture des liaisons β -1,4 glycosidiques qui lient les carbones C1 et C4 de deux résidus *N*-acétylglucosamine consécutifs

Les chitinases sont présentes chez de nombreux microorganismes eux-mêmes dépourvus de chitine, mais pour lesquels la chitine constitue une source de nutriments. Ainsi, les bactéries chitinolytiques marines, d'eau douce ou du sol produisent des chitinases qui participent à la biodégradation et au recyclage des chitines produites annuellement dans leur écosystème respectif. Les chitinases

bactériennes sont également impliquées dans des processus digestifs (Cohen-Kupiec et Chet, 1998; Patil et al., 2000). En effet, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent des enzymes chitinolytiques qui, en modifiant la composition des structures chitineuses, favorisent leur adhésion au substrat et la pénétration de leur hôte (Charpentier et Percheron, 1983; Schrempf, 2001) au niveau des lésions formées sur l'exosquelette des Arthropodes. Certaines chitinases bactériennes facilitent également la dégradation de la chitine du puparium de certains insectes, favorisant ainsi l'émergence des adultes (Iverson et al., 1984). Le même principe est utilisé dans la lutte biologique contre les champignons.

Peu d'auteurs ont parlé de l'activité chitinasique de *Micrococcus luteus* et *Bacillus megaterium*. Et aucun n'a parlé de *Streptomyces albogriseolus*, sachant que le genre *streptomyces* est très connu pour la production des enzymes. Et plusieurs publications qui parlent de *Pseudomonas sp.*

VI.4. L'activité Phosphatase

Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Le phosphore constitue le 2^e élément en importance pour la nutrition végétale. Sa concentration dans les sols, varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% (Lindsay, 1979).

Dans les sols agricoles, la dissolution des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol (Tardieux-Roche, 1966a et 1966b; Richardson, 2001). En effet, on trouve dans les sols un nombre important de microorganismes du sol, incluant des bactéries, des champignons et des algues (Berthelin et al., 1991; Goldstein, 1986; Kim et al., 1997; Oehl et al., 2001; Sundara et al., 2002)

Généralement les chercheurs associent la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu (Hedley et al., 1990). En effet, certaines souches bactériennes chimiotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de certains éléments chimiques, avec production d'acides (Pelmont, 1993). Les travaux de Illmer et Schinner (1992) ont conclu que la solubilisation des phosphates naturels n'est pas nécessairement liée à une baisse de pH. Cependant, de nombreux microorganismes libèrent dans leurs milieux des acides organiques en l'occurrence l'acide lactique, gluconique, isovalérique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique,

malonique et succinique (Rodríguez et Fraga, 1999). La production des acides organiques est considérée mécanisme pour la solubilisation du phosphate par les bactéries. Goldstein et Roger (1999), ont montré que l'acidification de l'espace périplasmique par oxydation directe du glucose en acide gluconique, est le processus majeur utilisé par les bactéries Gram négatives lors du processus de la dissolution des phosphates minéraux. Les effets bénéfiques de l'inoculation des cultures avec des microorganismes solubilisant le phosphate, ont été décrit par plusieurs auteurs.

Parmi les genres les plus souvent isolés se retrouvent *Pseudomonas* (Chabot et al., 1993; Illmer et Schinner, 1992), *Bacillus*, *Streptomyces* et *Rhizobium* (Arora et Gaur, 1978; Banik et Dey, 1983; Halder et Chakrabartty, 1993). En effet, plusieurs expériences réalisées en serres et aux champs, ont montré une forte croissance et une augmentation intéressante de la production des plantes inoculées avec les microorganismes solubilisant le phosphore. Ainsi, Domey et Lippman (1989) en inoculant le blé cultivé en serre avec des bactéries solubilisant le phosphore, ont augmenté de 8% le rendement de la partie aérienne et de 17 à 57% l'assimilation du phosphore. Chabot (1993), suite à une expérience aux champs avec ses isolats d'*Enterobacter* et *Pseudomonas* a obtenus, après 60 jours de croissance, des augmentations significatives (7 à 9%) de l'élongation des plants de maïs. Cependant, seul un isolat d'*Enterobacter* a pu provoquer une augmentation de la matière fraîche foliaire (23%) du maïs après 108 jours de croissance. Ces résultats ont été confirmés par Wang et al. (1995) qui en plus a montré que la biomasse sèche et l'absorption d'éléments nutritifs deviennent plus importantes dans un sol sablonneux. De plus, l'inoculation du blé avec différentes combinaisons de bactéries avec en présence de phosphates naturels, a stimulé l'activité de la nitrogénase et favorisé la fixation de l'azote atmosphérique et la solubilisation des phosphates naturels (El-Demerdash et al., 1992; Rojas et al., 2001; Saleh et al., 1998; El-Sawy et al., 1998). Cependant, Toro et al. (1996), en introduisant des graines de haricot inoculées avec des bactéries solubilisant les phosphates de calcium, de fer et d'aluminium plus des bactéries minéralisant les phytates dans un sol contenant *Glomus mosseae* n'a pu obtenir aucun effet général. En plus, aucun effet n'a été obtenu avec les bactéries minéralisant les phytates seuls dans les conditions de l'expérience. Tout ceci indique une compatibilité fonctionnelle spécifique entre les composantes biotiques intégrées dans le système.

Les souches isolées dans cette étude, montre une activité phosphatase positive sauf la souche de *Bacillus*. Cette activité leur a permis d'améliorer la croissance de l'orge avec des taux très importants comparés au témoin. Pour *Bacillus megaterium* ne procède pas cette activité mais elle a amélioré quand même la croissance, on constate que cette souche utilise d'autre mécanisme pour cet effet.

VI.5. L'activité amylase

Trois souches sur quatre sont productrices d'amylase, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces albogriseolus* et *Micrococcus luteus*. Mais *Pseudomonas sp.* ne présente pas cette activité malgré que plusieurs chercheurs ont pu isoler des souches productrices d'amylase.

Les amylases (EC 3.2.1) constituent un groupe très important d'enzyme qui appartient à la 13^{ème} famille des glycosides hydrolases. C'est l'enzyme la plus répandue pour la dégradation de l'amidon en plusieurs produits, comme le dextrine puis progressivement donne des molécules plus petites de glucose.

Les amylases peuvent avoir plusieurs sources, microbiennes et même animales et végétales. Mais la plus demandée en industrie est les amylases microbiennes (Sharma et al., 2010). Ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité, leur production volumineuse à l'échelle industrielle (Vidyalakshmi et al., 2009). Dans leur étude sur *Bacillus Sp*, Obi and Odibo. (1984) ont révélé une production de quantités considérables en α et β -amylases. Ils ont aussi déterminé les différents paramètres (Température et pH) influençant la synthèse des amylases par les actinomycètes dans le sol du milieu de culture.

Plusieurs souches de *Streptomyces* sont des productrices des α -amylases, mais certaines souches ont des activités amylasiques trop faibles (Ningthoujam et al., 2009).

La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature et ainsi fournir des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance.

VI.6. Activité Cellulase

Environ la moitié de carbone est fixée sous forme de cellulose, ce qui fait de la cellulose le composé organique le plus abondant sur Terre (Béguin et Aubert, 1992). Malgré sa faible densité, la cellulose est le matériau organique naturel le plus résistant et le plus stable connu à ce jour. De par sa nature physico-chimique, la cellulose a tendance à s'accumuler dans l'environnement (Bayer et Lamed, 1992).

La cellulose est un polysaccharide linéaire constitué de résidus glucose (Dglucopyranosides) liés en $\alpha(1-4)$.

La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle du carbone (Béguin et Aubert, 1994). Elle est essentiellement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (Ljungdahl et Eriksson, 1985).

Environ 80% des bactéries cellulolytiques isolées jusqu'à présent sont Gram positives et sont réparties en seulement deux phyla (Schwarz, 2001). Certaines appartiennent au phylum des *Actinobacteria* et seulement à l'ordre *Actinomycetales* qui sont des bactéries Gram positives à haut pourcentage en base G+C.

Les autres appartiennent au phylum *Firmicutes* et essentiellement à l'ordre des *Clostridiales* mais aussi quelques-unes à l'ordre des *Bacillales* qui sont des bactéries Gram positives à bas pourcentage en base G+C.

la capacité à dégrader la cellulose semble être essentielle dans la dégradation de la plupart des structures formant les parois végétales, si bien que les bactéries non-cellulolytiques ont une capacité limitée à solubiliser ce genre de substrat (Tap, 2009). Les souches isolées durant cette étude deux entre elles produisent la cellulase ce qui leur permet de bien résister dans le sol, car c'est le nutriment le plus abondant. Par contre les deux autres ne sont pas cellulolytiques, ces dernières utilisent un autre substrat carboné comme source de carbone et l'énergie.

VI.7. L'activité Uréase

L'enzyme uréase (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et carbamate, qui est alors spontanément hydrolysé pour former une molécule d'acide carbonique ainsi qu'une seconde molécule d'ammoniac. L'acide carbonique se dissocie à pH physiologique, et les molécules d'ammoniac s'équilibrent alors avec l'eau pour être protonées. Il en résulte une nette augmentation du pH.

L'urée est largement utilisée en pulvérisation foliaire mais aussi incorporée dans les sols, où elle est toutefois rapidement hydrolysée. Aussi, l'hydrolyse de l'urée en ammonium par les uréases du sol conduit à des pertes d'azote par volatilisation ammoniacale, et des inhibiteurs d'uréases sont couramment ajoutés aux engrais uréiques afin de limiter ce phénomène (Mérigout, 2006).

La volatilisation d'ammoniac est due à la rapidité d'hydrolyse de l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone par les uréases du sol. Il en résulte une augmentation du pH, qui, combinée à la production d'ion ammonium, conduit à l'accumulation d'ammoniac. Les ions ammonium sont en équilibre avec les gaz d'ammoniac en solution aqueuse et, à pH alcalin, la forme ammoniac libre est prédominante. Si l'ammonium est relativement inoffensif, l'ammoniac est très toxique et entraîne de sérieux dommages sur la germination des graines et la croissance des plantules (Bremner & Krogmeier, 1989). En outre, le pH alcalin couplé avec la forte concentration d'ions ammonium, sont des conditions favorisant la volatilisation ammoniacale. Les pertes d'azote issu de l'urée par volatilisation ammoniacale dépendent de plusieurs facteurs: elles sont favorisées dans les sols à pH élevé, avec un faible pouvoir tampon, et par les fortes températures.

La volatilisation ammoniacale est le principal problème lié à l'utilisation de l'urée en tant que fertilisant (Court et al., 1964). Les recherches se sont donc attachées à trouver une méthode efficace et économique afin de contrôler l'évolution de l'urée en ammoniac. L'un des moyens consiste à incorporer l'urée dans le sol. Cependant, cette pratique agricole se limite aux épandages précoces d'engrais, lors du semis par exemple. Les particules d'urée peuvent aussi être recouvertes de soufre qui ralentit la dissolution du granule d'urée (Rao, 1987). Néanmoins, l'approche couramment utilisée afin de remédier au problème de volatilisation ammoniacale, consiste à trouver des composés qui inhibent l'hydrolyse de l'urée. Beaucoup de composés ont été proposés comme des inhibiteurs d'uréases potentiels. Les hydroamates, les composés soufrés hétérocycliques, les xanthates, les quinones et les phosphoroamides en sont quelques exemples. Plus récemment, Reddy & Sharma (2000) ont démontré l'efficacité des additifs chimiques comme le pyrite (FeS_2), le chlorure de potassium (KCl) ou le sulfate de cuivre (CuSO_4). Ces additifs ont l'avantage d'être moins onéreux que les inhibiteurs d'uréases. Ils permettent aussi

l'enrichissement du sol en éléments nutritifs essentiels que sont le soufre, le fer, le potassium, le cuivre, et le sulfate.

Deux souches sur quatre sont productrice des uréases, qui sont *Streptomyces albogriseolus* et *Pseudomonas sp.*

VI.8. Sidérophores

Plusieurs études ont montré la présence de sidérophores dans le sol. Ces sidérophores seraient issus des microorganismes ou des plantes (phytosidérophores) qui les sécrètent afin d'assurer l'apport en fer pour leur croissance. Ainsi, les sidérophores sont utilisés dans les engrais de manière à réguler l'apport en fer chez les plantes, et donc favoriser leur croissance (Shenker et al., 1992; Miller et Malouin, 1994)

Différents facteurs peuvent stimuler la production de sidérophores par les microorganismes. Un des principaux facteurs est la concentration en fer du milieu. En effet, il a été observé que la production de sidérophores est fortement stimulée par la déplétion en fer du milieu de culture. En effet, les sidérophores ne sont sécrétés par le microorganisme que lorsque celui-ci subit un stress ferrique. On parle de carence lorsque la concentration en fer du milieu de culture est inférieure à 0,1 μM (Monzyk B. and Crumbliss, 1982; Neilands, 1984). Cette valeur peut varier en fonction du microorganisme. Pour bon nombre d'espèces, 10 μM en fer constituent une valeur seuil. Le pH peut exercer une influence notable sur la production de sidérophores (Winkelmann, 2007). Le maintien d'un pH neutre, voire légèrement basique, rend le fer moins soluble, donc moins disponible pour les microorganismes, ce qui stimule la sécrétion de sidérophores(Neilands, 1984).

VI.9. Croissance sur milieu NFB

La croissance des quatre isolats sur milieu NF-b laisse penser qu'elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique.

Parmi les actinobactéries, la diazotrophie était limitée au genre *Frankia*. Mais des gènes *nifH* sont identifiés en dehors de *Frankia* (Gtari et al., 2011). Ces dernières années, beaucoup de travaux sont réalisés sur la fixation d'azote par les actinobactéries. Gtari et al., (2011) ont montré que des souches de *Streptomyces Sp* et une souche d'*Arthrobacter Sp* isolées des échantillons du sol en chine sont des fixatrices d'azote.

Concernant le test de fixation d'azote sur milieu NF-b contenant de l'azote, toute

croissance bactérienne serait probablement un indice de bactéries fixatrices d'azote. Toutefois, les actinobactéries oligotrophes ne sont pas des fixateurs d'azote, ce qui nécessite donc au moins deux méthodes de mesure incluant le test de réduction d'acétylène (ARA) et la méthode de Kjeldahl (Gtari et *al.*, 2011).

De plus, Rawat et *al.* (2011) ont isolé plusieurs souches bactériennes fixatrices d'azote, à partir du sol. Ces souches appartiennent au genre *Bacillus*.

D'après Abdelwahab et ELsharouny. (1979), la fixation d'azote libre par certaines espèces de *Bacillus* a été démontrée depuis la fin des années cinquante.

VI.10. Synthèse de l'acide indole acétique (IAA)

Les auxines, et en particulier l'AIA, sont connues pour stimuler la croissance des racines adventives chez les plantes. Aussi, le développement d'un système racinaire vigoureux chez la plante (Mérigout, 2006). Cette hormone végétale joue un rôle dans le développement des racines de la plante hôte, et de ce fait favorise l'adsorption de l'eau et des minéraux, ce qui contribue à un meilleur développement de la plante.

Un grand nombre de bactéries rhizosphérique produisent des auxines, environ 80% de ces bactéries produisent IAA, une des auxines la plus active (Medina, 2007).

Toutes les souches isolées sont productrices de l'IAA, mais avec des taux variables selon l'espèce.

VI.11. Activité antifongique

La recherche de nouvelles stratégies de lutte biologique pour inhiber la croissance des micro-organismes phytopathogènes est devenue largement répandue, en raison des préoccupations environnementales.

Les résultats obtenus en utilisant les souches isolées de la cote ouest de la wilaya de béjaia sont présenté dans la figure 17.

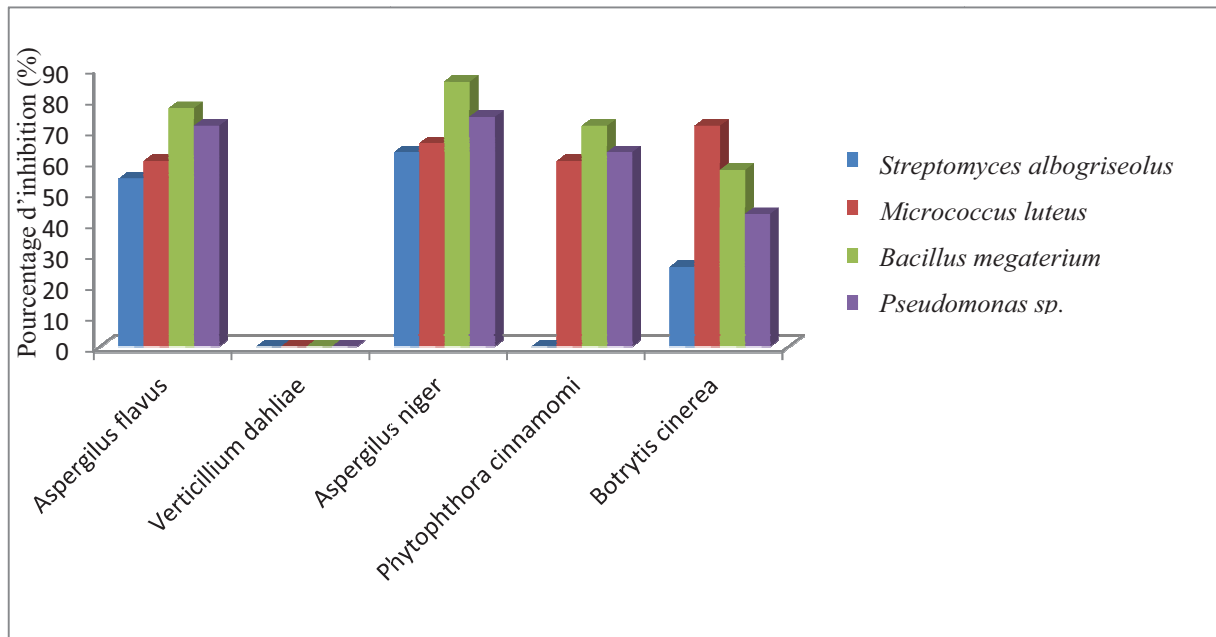


Figure 16: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence des souches isolées

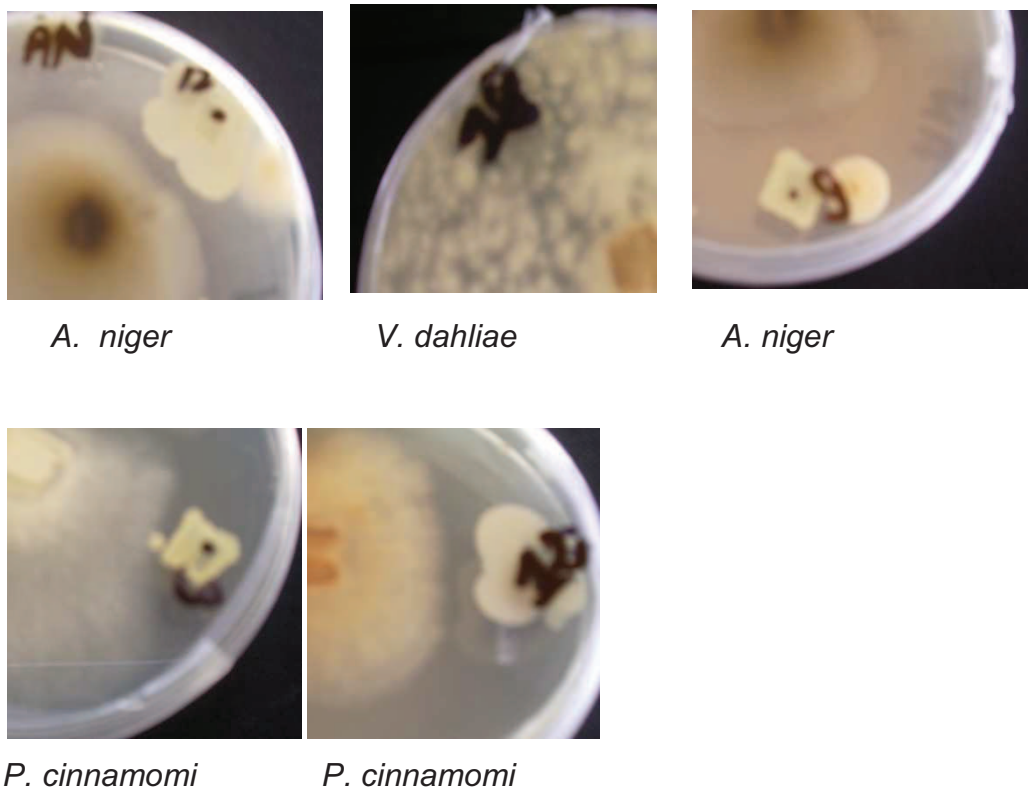


Figure 17 : Quelques activités antifongiques

Dans cette étude, la méthode d'antagonisme en double culture est réalisée in vitro. Les quatre souches bactériennes ont donc fait l'objet de souches-tests : *Micrococcus luteus*, *Streptomyces albogriseolus*, *Pseudomonas sp.*, et *Bacillus megaterium* contre cinq champignons phytopathogènes : *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Phytophthora cinnamomi*, et *Botrytis cinerea*.

Les résultats obtenus montrent des différences significatives entre les souches bactériennes, pour le même phytopathogène et entre les phytopathogènes.

La souche *Streptomyces albogriseolus* inhibe trois champignons (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea*). Les souches *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas sp.* et *Bacillus megaterium* inhibent quatre champignons sur les cinq testés (sauf *Verticillium dahliae*). Donc en moyenne, toutes les souches ont inhibé au moins trois champignons. Pour les champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* sont les plus sensibles car ils sont inhibés par toutes les souches bactériennes avec des pourcentages de 55 %. *Botrytis cinerea* présente une résistance moyenne car il est inhibé à moins de 30% par deux souches sur les quatre testées. *Phytophthora cinnamomi* est inhibé que par trois souches avec des pourcentages supérieurs à 60%.

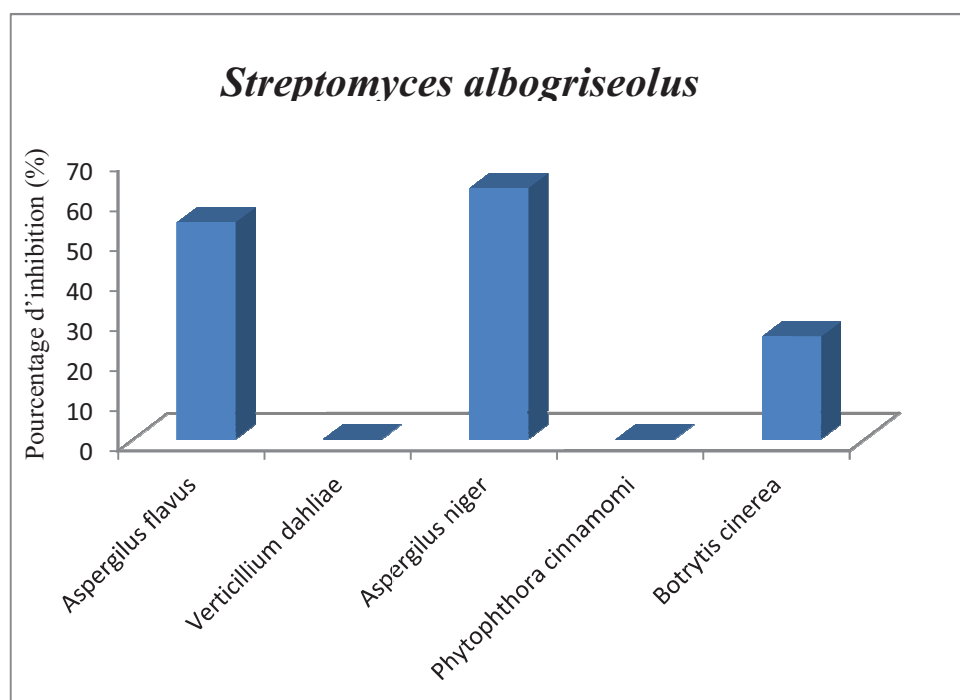


Figure 18: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de *Streptomyces albogriseolus*

La souche *Streptomyces albogriseolus* manifeste un effet antagoniste contre trois champignons et aucun effet contre les deux autres. On a montré précédemment que cette souche produit des chitinases qui sont probablement impliquées dans la dégradation des parois des champignons. L'effet antagoniste peut être du soit à cette enzyme ou encore à la production des antibiotiques et des antifongiques. De plus, il a été démontré que le genre *Streptomyces*, possède une activité antagoniste très remarquable à l'égard de champignon responsable des maladies des plantes (Loqman et al., 2009).

Dans le travail de Gonzalo et al. (2012), il a été constaté que plusieurs isolats de *Streptomyces albogriseolus* isolé à partir du sol calcaire ont un effet antifongique très prononcé contre les souches fongiques et bactériennes phytopathogènes.

Contrairement aux travaux de Ayari et al. (2012) qui ont isolé *Streptomyces* à partir des sédiments, qui ont montré que les souches ne montre aucune activité antagoniste contre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*.

De plus, il a été démontré que le genre *Streptomyces*, possède une activité antagoniste très importante à l'égard de champignon *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise (Loqman et al., 2009). Au contraire avec ce qu'on a obtenu, une inhibition de 30% de *Botrytis cinerea*.

Selon les travaux de Ke Zhao (2011), le genre *streptomyces* ne montre aucune activité antagoniste contre *Verticillium dahliae*. Par contre, les actinomycetes rare montre une inhibition très importante à l'égard de ce champignon.

Nyoman et al. ont isolé 31 souches de *Streptomyces* mais seulement 10 présentent un effet antagoniste à l'égard de *Phytophthora cinnamomi*.

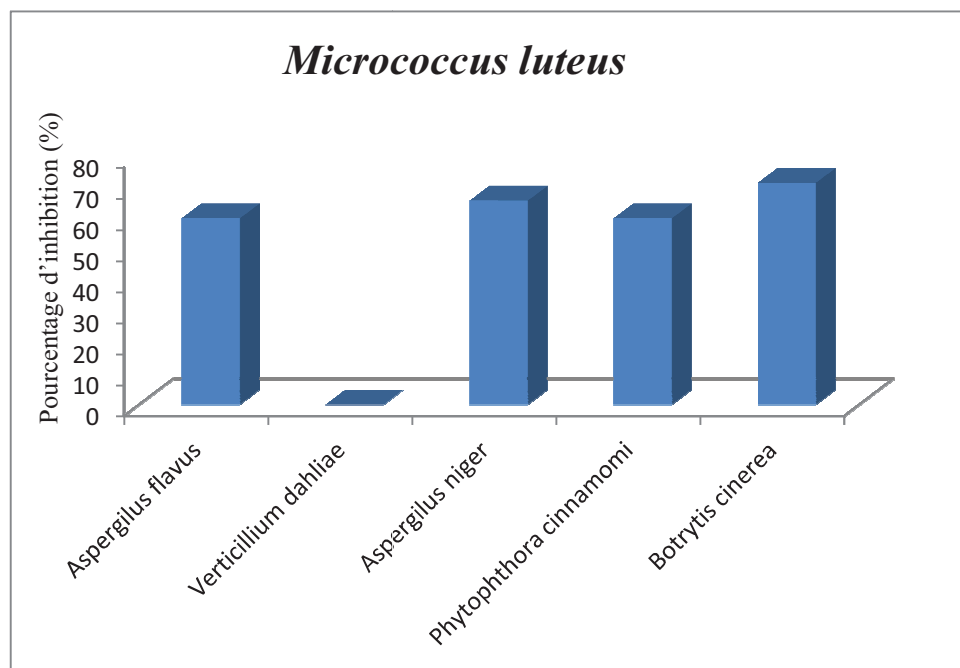


Figure 19 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de *Micrococcus luteus*

La souche *Micrococcus luteus* a montré un effet antagoniste contre quatre champignons et aucun effet sur *Verticillium dahliae*. On a montré précédemment que cette souche produit des chitinases, cellulases et sidérophores qui sont probablement impliquées dans l'effet antagoniste de cette souche. En plus, cet effet peut être dû soit à ces activités ou encore à la production des antibiotiques et des antifongiques.

Les travaux de Shah Md (2010) ont montré que la souche *Micrococcus luteus* ne possède aucune activité antagoniste à l'égard de champignon responsable des maladies des plantes ni contre les bactéries pathogènes.

Aucun article est publié pour l'effet antifongique de cette souche n'a pu être trouvé.

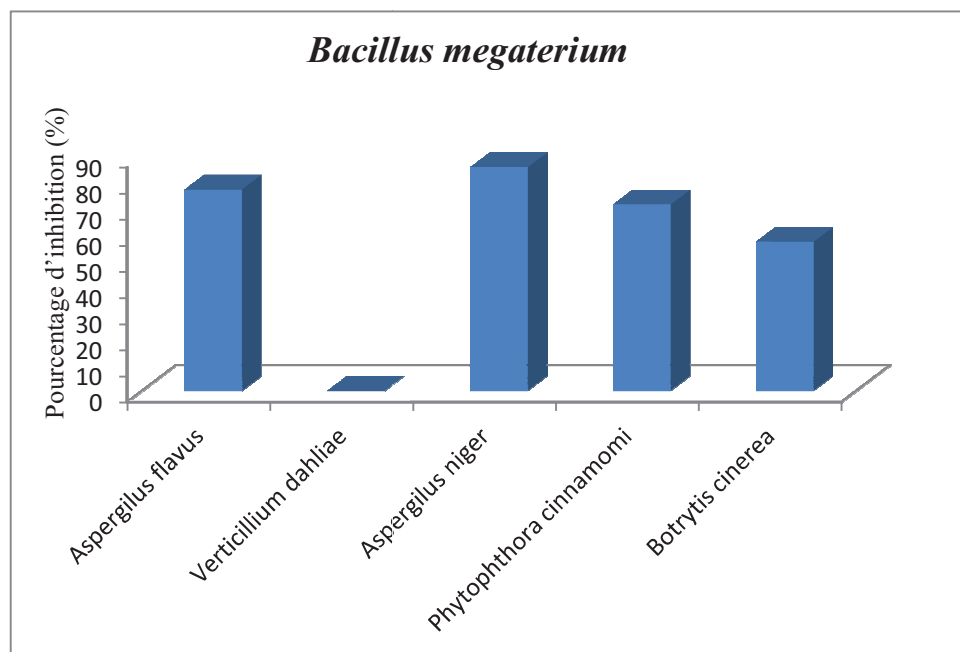


Figure 20 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium n'a aucun effet inhibiteur sur *Verticillium dahliae*, mais il a bien réprimé la croissance des autres champignons testés avec des pourcentages d'inhibition intéressants de 90% pour *Aspergillus niger*, 80% pour *Aspergillus flavus*, 75% pour *Phytophthora cinnamomi*, et 65% pour *Botrytis cinerea*. Notre souche de *Bacillus* montre une très grande richesse en enzymes hydrolytiques (précédemment citées) impliquées dans la dégradation des parois des cellules fongiques (Intra et al., 2011). Ajoutant à cela, cette souche produit différentes enzymes et sidérophores.

Le mode d'antagonisme généralement observé chez les souches de *Bacillus* est « l'antibiose », ce genre produit divers antibiotiques comme ; la Bacillomycine, la fongycine, la mycosubtiline, et la Zwittermycine, ces substances sont efficaces pour éliminer la croissance des pathogènes cibles *in vitro* et/ou *in situ*. Cette évidence permet de supposer que les antibiotiques sont responsables de la formation des zones d'inhibition entre la bactérie et les isolats fongiques montrés dans cette étude (Kim et al., 2008).

Par ailleurs, plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer l'inhibition des champignons pathogènes par *Bacillus*, il s'agit de la production d'antibiotiques ; de sécrétion d'enzymes hydrolytiques ; de compétition pour les nutriments ; combinaison de plusieurs mécanismes à la fois (Calvo et al., 2010). Ces mécanismes sont bien constatés chez notre souche qui produit des lipases et des estérases ; des protéases et des amylases.

Bacillus est connue pour la synthèse d'antibiotiques, qui sont destructifs des champignons phytopathogènes. La zwittermycine A est un antibiotique produit par *Bacillus cereus* et *Bacillus thuringiensis*, elle est très efficace contre une large variété de microorganismes incluant plusieurs champignons pathogènes des plantes (Raaijmakers et al., 2002).

Les peptides antifongiques synthétisés par les espèces de *Bacillus* comportent les mycobacillines, l'iturine, les bacillomycines, les surfactines, les mycosubtilines, les fongistatines, et les subsporines (Sadfi et al., 2002).

D'après Reyes-Ramírez et al. (1994), les enzymes comme les glucanases, lipases, protéases, et chitinases agissent en synergie et parviennent donc dans l'antagonisme à large spectre.

D'après Tri Wahyudi et al. (2011), les *Bacillus* sont fréquemment isolés de la rhizosphère et sont des endophytes communs des plantes. De plus, les bactéries productrices de sidérophores dans des conditions limitées en fer sont les plus inhibitrices des champignons phytopathogènes (sous serre ou sur champs). En effet, la même activité est constatée dans ce travail.

Selon les travaux de Donmez et al. (2011), *Bacillus megaterium* est isolé à partir du sol présente un effet antagoniste remarquable à l'égard de *Botrytis cinerea* in vitro et in vivo. Même constatation ont été fait par Kong et al. (2010) mais à l'égard de *Aspergillus flavus*, avec une réduction de 31%.

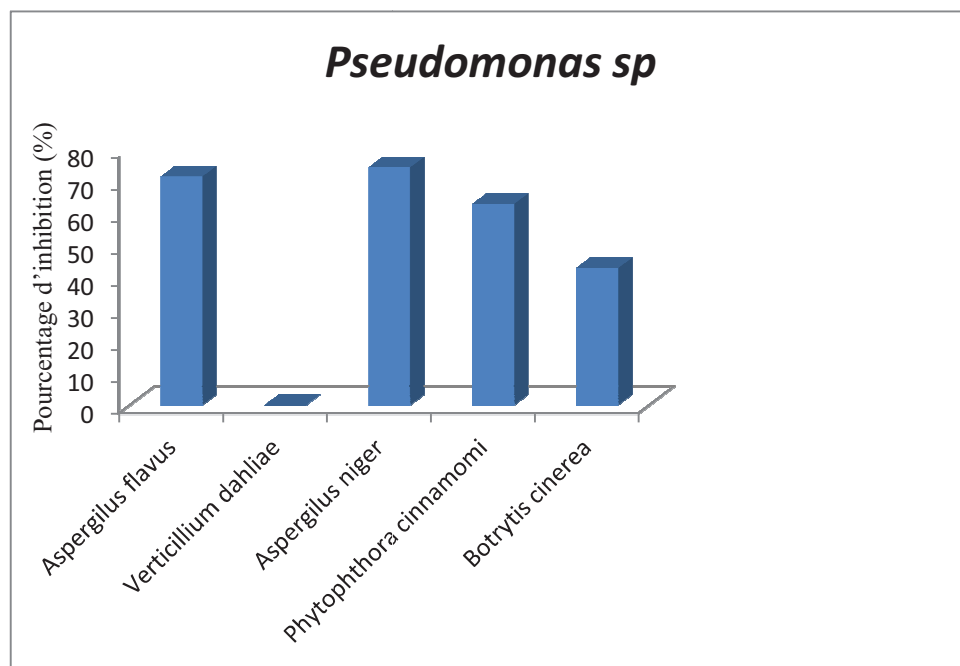


Figure 21 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des phytopathogènes en présence de *Pseudomonas sp.*

Cette bactérie a en effet la capacité de protéger diverses plantes de culture contre des pathogènes du sol comme certains champignons, nématodes ou d'autres bactéries. Un des mécanismes principaux impliqué dans cette capacité de contrôle biologique est la production de composés antibiotiques comme le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine (PLT), la pyrrolnitrine, l'acide cyanhydrique (Baehler et *al.*, 2005) et phénazines, qui sont les plus fréquemment détectés (Haas et Défago, 2005 ; León et *al.*, 2009), ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux. Elles élicitent les réactions de défense des plantes et, de par leur forte affinité pour le fer, elles limitent la croissance saprophyte de certains microorganismes phytopathogènes (Viollet, 2010).

Ces bactéries sont aussi largement retrouvées comme étant des agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes (Viollet, 2010) et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes (Siddiqui et *al.*, 2001).

Les travaux de Erdogan et Benlioglu (2010), sur 59 souches de *Pseudomonas sp.* 4 qui montrent une activité inhibitrice à l'égard de *verticillium dahliae*.

Les études menée par Sayyed et Patel (2010) ont montré que l'efficacité de *Pseudomonas* isolé à partir du sol était beaucoup plus que celle des pesticides chimiques.les champignons testé sont *Aspergillus niger* NCIM 1025, *Aspergillus flavus* NCIM 650, *Fusarium oxysporum* NCIM 1281, *Alternaria alternata* ARI 715, *Cercospora arachichola*, *Metarhizium anisopliae* NCIM 1311. Dans cette étude, l'activité antifongique était principalement due à la production des sédirophore. Dans les mêmes aubjectifs, Bedini et al. (1999) ont sélectionné 300 souches de *Pseudomonas* qui présentent des activités antifongiques à l'égard de : *Botrytis cinerea*, *Cryphonectria parasitica*, *Diplodia mutila*, *Phytophthora caatorum*, et *Phytophthora cinnamomi*.

Conclusion

L'obstacle majeur rencontré lors de l'exploitation des agents de biocontrol est la tolérance aux conditions variables de l'environnement et la stabilité durant la période de stockage des cellules. Ces changements de conditions environnementales peuvent modifier la qualité physiologique de l'agent de biocontrol, ce qui réduit leur exploitation commerciale (Teixido et al. ; 2005).

Dans cette étude, 10 échantillons du sol sont prélevés dans la côte ouest de la wilaya de Béjaia. Des isolements et des purifications ont été réalisés sur cinq milieux de culture, cela a donné 120 isolats bactériens. Un test de sélection selon l'amélioration de l'orge, la persistance et la résistance aux conditions du sol, nous a permis d'avoir 4 souches différentes. Ces souches sont identifiées phylogénétiquement par séquençage de l'ADN 16S. Après alignement et analyse des séquences, ces souches sont affiliées comme suit : *Bacillus megaterium*, *Streptomyces albogriseolus*, *Micrococcus luteus* et *Pseudomonas sp.*

La deuxième partie du travail a consisté à la détermination des activités enzymatiques comme la synthèse des lipases, estérases, chitinases, cellulases, amylases, uréases et protéases, la solubilisation du phosphore, la synthèse de sidérophores. Les résultats ont révélé que nos souches pourraient avoir une application en industrie mais aussi en agriculture. En effet, ces activités ont suggéré la capacité des souches à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes. En l'occurrence, des tests à l'égard de *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Phytophthora cinnamomi*, et *Botrytis cinerea* ont montré l'efficacité des quatre souches à limiter la croissance de ces phytopathogènes à l'exception de *Verticillium dahliae* qui a résisté à toutes les souches.

En perspective, il serait souhaitable de poursuivre ce travail en effectuant d'autres tests à savoir :

- ✓ Pousser l'identification génotypique des isolats pour identifier l'espèce et la souche ;
- ✓ Réaliser des tests d'antagonisme sur champ,
- ✓ Extraire et identifier les molécules impliquées dans la lutte biologique
- ✓ Tester d'autres paramètres de croissance des plantes, comme la longueur des racines, leur nombre, le poids frais et sec des différentes parties de la plante, surface racinaire, teneur en chlorophylle...etc.
- ✓ Réaliser des tests de stimulation de croissance sur champs ;
- ✓ Tester d'autres mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes, et pourquoi pas autre que l'orge et la tomate ;
- ✓ Réaliser des tests d'inoculation simultanés (appliquer plus d'une souche à la fois) ;

Références bibliographiques

- Abdelwahab A.M. et ELsharouny.H.M.(1979).Nitrogen-fixingBacillus spices from Egyptian soils: acetylene reduction and cultural conditions. *Plant and Soil* . 51:187-196.
- Alabouvette C., Olivain C. and Steinberg C. (2006). Biological control of plant diseases. The European situation. *European Journal of Plant Pathology*. 114:329–341.
- Amandine L. (2003) Orge d'hiver, comment contrer les maladies virales de l'automne les Grandes Cultures. Jeunes Agriculteurs Paris Cedex 08.
- Antoun H, Prévost D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. 1–38.
- Arora D., Gaur A.C. (1978). Periodic microbial solubilization of ³²P labeled hydroxyapatite. *Indian J. Microbiol.* 18: 193 - 194.
- Aubert C. (1977) L'agriculture biologique pourquoi et comment la pratiquer.4ème édition, Ed. Agridécisions, Paris, 383 p.
- Ayari A., Morakchi H. and Kirane Gacemi D. (2012) Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African Journal of Biotechnology*.11(2) : 305-311.
- Bach HJ. et Munch JC. (2000). Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol Fertil Soils* 31: 219–224
- Baehler, E., Bottiglieri, M., Péchy-Tarr, M., Maurhofer, M., and Keel, C. (2005). Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Appl. Microbiol.* (in press).
- Banik S., Dey B. K. (1983). Alluvial soil microorganisms capable of utilising insoluble aluminium phosphate as a sole source of phosphorus. *Zbl. Mikrobiol.* 138: 437 - 442.
- Barazani O. and Friedman J. (1999). is iaa the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*. 25(10): 2397- 2406
- Barriuso J., Solano B. R., Lucas J. A., Lobo A. P., Villaraco A. G., Mañero F. J. G. (2008). Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) .Plant Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth. 1-18.
- Bartels D. et Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*. 24 : 23–58.
- Bashan Y. (1986). Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd. Following temporary depression of rhizosphere microflora. *Appl. Environ. Microbial.* 51: 1067-1071.
- Basharat A. ,Anjum N. S.i , Shahida H. (2010) Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World J Microbiol Biotechnol.* 26:1379–1384.
- Bayer E. A. and Lamed R. (1992) The cellulose paradox : pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource ? *Biodegradation*. 3 : 171-188.
- Bedini S., Bagnoli G., Sbrana C., Leporoni C., Tola E., Filippi F., D'andrea F., O'Gara F. et Nuti M.P. (1999). *Pseudomonas* isolated from within fruit badies of *Tuber borchii* are capable of production biological control or phytostimulatory compounds in pure culture. 26(3):223-236.
- Béguin P. and J.P. Aubert (1992) La dégradation de la cellulose par les microorganismes. *Ann. fnst. Past.*3 : 91-115.

Béguin P. and J.P. Aubert. (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13 : 25-58.

Belaid D. (1990) Eléments de phytotechnie générale. Ed. Office des publications universitaires, Ben-Aknoun (Alger), 155 p.

Berthelin, J., Leyval, C., Laheurte, F., De Giudici, P. (1991). Some considerations on the relations between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization. Dans plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects. Éditeurs: Keel, C., Koller, B., Défago, G. IOBC-WPRS Bulletin. XIV (8): 359 - 538.

Boukhris L. (1992) Identification des bactéries phytopathogènes transmissibles par la semence du blé en Algérie. Mémoire Ing. Agro. Département de botanique, INA El Harrach, 73 p.

Boulal H., Zaghoulane O., EL Mourid M. et Rezgui S. (2007) Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. TIGC, INRA, ICARDA, Algérie, 176 p.

Bremner JM, Kromeier MJ (1989) Evidence that the adverse effect of urea fertilizer on seed germination in soil is due to ammonia formed through hydrolysis of urea by soil urease. *Proc Natl Acad Sci* 86: 8185-8188

Buddrus-Schiemann K., el Schmid M., Schreiner K., Welzl G. et Hartmann A. (2009). Root Colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and Impact on the Indigenous Rhizosphere Bacterial Community of Barley. *Microb Ecol PLANT MICROBE INTERACTIONS*.1-13.

Calvo P., Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E., Zúñiga D. (2010). Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 899-906.

Carrim, A. J. I., Barbosa E.C. and Gonçalves Vieira J.D. (2006). Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49 : 353-359.

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. Microbiol.* 39: 941-947.

Charpentier M et Percheron F (1983) The chitin-degrading enzyme system of a *Streptomyces* species. *Int J Biochem.* 15: 289-292.

CHEHAT F ,(2007)., Analyse macroéconomique des filières , la filière blés en Algérie . Projet PAMLIM « Perspectives agricoles et agroalimentaires Maghrébines Libéralisation et Mondialisation » Alger : 7-9.

Chet I. and Chernin L. (2002). Biocontrol, microbial agents in soil.. In: Bitton G _ed._, Encyclopedia of Environmental Microbiology. John Wiley and Sons Inc., New York, USA,. pp 45–465.

Chinnasamy, G. (2005) A proteomics perspective on biocontrol and plant defense mechanism in PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. 233–255.

Christensen W.B. (1946). Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of Bacteriology*.

Cohen-Kupiec R et Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotech.* 9: 270-277.

Court MN, Stephen RC, Waid JS (1964) Toxicity as a cause of the inefficiency of urea as a fertilizer. *J Soil Sci.* 15: 42-48

Dastager S. G., Deepa C.K., Pandey A. (2010). Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant physiology and Biochemistry*. 48: 987-992

Denis B. (2000). Guide des analyses en pédologie, 2eme édition. 266P

Dilantha Fernando W. G., Nakkeeran S. et Zhang Y. (2005) Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in plant control of diseases. *Biocontrol and Biofertilization*, Springer. 67–109.

Domey S., Lippmann G. (1989). Stimulation of plant growth by phosphate solubilizing bacteria. Dans *Interrelationships between microorganisms and plants in soil*. Éditeurs : V. Vancura et F. Kunc. Dev. Soil. Sci. 18 : 457 – 461.

Donmez MF., Esitken A., Yildiz H. et Ercisli S. (2011). Biocontrol of *Botrytis cinerea* strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *Jour. Of Animal and plant sciences*. 21(4):758-763.

El-Demerdash, M. E., Abdel Hafez, A.E., Mostafa, M., Ishac, Y.Z. (1992). Response of wheat plants to inoculation with rhizobia and associative diazotrophs in the presence of rock-phosphate as a fertilizer. *Annals of Agricultural Science Cairo*. 37(2): 379-388.

El-Safey E. M. and Abdul-Raouf. U. M. (2004). production, purification and characterization of protease enzyme From *Bacillus subtilis*. *International Conferences For Development And The Environment In The Arab World*, Assiut Univ., p14.

El-Sawy, M. S., E.A, El-Borollosy, M.A., Nokhal, T.H., Frendrik, I., Sharaf, M.S. (1998). Effectiveness of dual inoculation with diazotrophs and vesicular arbuscular mycorrhizae on the growth and khellin content of *Ammi visnaga*. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*. 6 (2): 357-371.

Erdogan O. et Benlioglu K (2010). Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions *Biological Control*. 53 : 39–45.

Felici C., Vettori L., Giraldi E., Forino L. M. C., Toffanin A., Tagliasacchi A. M. et Nuti M. (2008) Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied soil ecology*. 40 : 260 – 270.

Felsenstein J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences; a maximum likelihood approach. *J.Mol.Evol.*17:368-376.

Ferracini-Santos L., Sato H.H. (2009). Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40:54-60.

Figueiredo de Vasconcellos R.L. (2009). Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso BioControl*. 54:807–816.

Franco-Correa M., Quintana A., Duquea C., Suarez C, Rodriguez M. X., Bareab JM. (2010). Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*. 45: 209–217.

Fuentes-Ramirez L.E. et Caballero-Mellado J. (2005) BACTERIAL BIOFERTILIZERS in Z. A. Siddiqui. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. 143–172.

Gate P., Jezequel S., Castillon P., Braun P. et Laconde J.P. (1996) Pour garantir la production bien remplir le grain et limiter le mitadinage. In: Braun P. et Hébrard J.P. (Eds.), *Blé dur objectif qualité*. Ed. ITCF, Paris. 36-43.

Glick B. R., Pasternak J.J. (1998) Plant growth-promoting bacteria in molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. 2nd Ed, ASN press, Washington DC. glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany*. 60 : 121–126.

Glick B.R., Patten C.L., Holguin G. and Penrose D.M. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press, London, UK.

Goldstein A. H. and Roger R. D. (1999). Biomediated continuous release phosphate fertilizer. *Lockheed Idaho Technologies Co., USA*, pp 19.

Goldstein, A. H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphate: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1: 51 - 57.

Gonzalo C., García-de-la-Fuente R., Abad M., Fornes F. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*. 95: 280–284

Gtari M., Ghodhbane-Gtari F., Nouioui I., Beauchemin N., Tisa L.S. (2011). Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Arch Microbiol*, Short communication.

Guiraud J. P, Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. Usine. Paris. 239p.

Gunnar J. Henkes, Alexandre Jousset, Michael Bonkowski, Michael R. Thorpe, Stefan Scheu, Arnaud Lanoue, Ulrich Schurr and Ursula S. R. Rose (2011). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 maintains carbon delivery to *Fusarium graminearum*-infected roots and prevents reduction in biomass of barley shoots through systemic interactions. *Journal of Experimental Botany*. 62(12) : 4337–4344.

Haas D et Défago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 1-13.

Halder A. K., Chakrabarty P. K. (1993). Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38: 325 - 330.

Hall J.A., Peirson D., Ghosh S. and Glick B.R. (1996). Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Isr. J. Plant Sci.* 44: 37–42.

Hedley M.J., Hussin A. and Bolan N.S. (1990). New approaches to phosphorus fertilisation. Phosphorus requirements for sustainable agriculture in Asia and Oceania. *Proceedings of a symposium, 6-10 March 1989.*: pp. 125-142.

Illmer P. et Schinner E. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24 : 389-395.

Intra B., Mungsuntisuk I., Nihira T., Igarashi Y. and Panbangred W. (2011). Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *Intra et al. BMC Research Notes*. 4:98

Iswandi A., Bossier P., Vandenberghe J. and Verstraete W. (1987). Effect of seed inoculation with the rhizopseudomonad strain 7NSK2 on the root microbiota of maize *Zea mays* and barley *Hordeum vulgare*. *Biol. Fert. Soils*. 3: 153–158.

Iverson K, Bromel M, Anderson AW et Freeman T (1984) Bacterial symbionts in the sugar beet root maggot *Tetanops myopaeformis* (von Röder). *Appl Environ Microbiol* .47: 22-27.

Jijakli. (2003) lutte biologique in phytopathologie in phytopathologie. Lepoivre P. ed De boeck et larviers. a. 289-317.

Kellil H. (2011) Contribution à l'étude du complexe entomologique des céréales dans la région des hautes plaines de l'Est algérien. Mémoire de Magister de l'université El hadj Lakhdar-Batna. P 102.

Khalid A., Arshad M., Shaharoona B., and Mahmood T. (2009) Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Sustainable Agriculture in M.S. Khan et al. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. 133-146.

- Khan M. S., Yu X., Kikuchi A. et Asahina M. (2009a) Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology*. 26 : 125–134.
- Khan M. S., Zaidi AWani., P. A., Ahemad M., et Oves M. (2009b) Functional Diversity Among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Current Status M.S. Khan et al. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. 105-132.
- Kim .W. G., Weon H.Y., Seok, S.J and Lee K. H. (2008). In Vitro Antagonistic Characteristics of *Bacilli* Isolates against *Trichoderma spp.* and Three Species of Mushrooms. *Mycobiology* 36(4): 266-269.
- Kim, K. Y., Jordan, D., Krishnan, H. B. (1997). *Rahnella aquatilis* , a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilise hydroxyapatite. *FEMS Microbiology letters*. 153: 273-277.
- Kong Q. , Shan S., Liu Q., Wang X., Yu F. (2010). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium* .*International Journal of Food Microbiology*. 139: 31-35.
- Kopečný J., Hodrová B. and Stewart C.S. (1996). The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 195-198.
- Kribaa M. (2003) Effet de la jachère sur les sols en céréaliculture pluviale dans les zones semi-arides méditerranéennes. Cas des hautes plaines Sétifiennes en Algérie. Impact des différentes techniques de travail de la jachère sur les caractéristiques structurales et hydrodynamiques du sol. Thèse Doctorat d'Etat, Inst. Nat. Agro., El-Harrach, Alger, 121p.
- Kumar A, Prakash A et Johri. (2011). *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. in D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*.37-59.
- Laskin A. I. , Bennett J. W., Gadd G.M. (2006). *Advances in Applied Microbiology*, Volume 52. Elsevier. 276P.
- León M, Yaryura P M, Montecchia M S, Hernández A I, Correa O S, Pucheu N L, Kerber N L et García A F. (2009). Antifungal Activity of Selected Indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the Soybean Rhizosphere. *International Journal of Microbiology*. 9p.
- LEROY C. (2006). Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques. Thèse de Docteur, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Lindsay W.L. (1979). *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley and Sons, NY.472P.
- Ljungdahl L.G. and K.E. Eriksson. (1985) Ecology of microbial cellulose dégradation. *Adv. Microb. Eco/.*8 : 237-299.
- Loqman S. Ait Barka E. Cle´ment C. OuhdouchY. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:81–91.
- Lucy M., E. Reed and Bernard R. Glick (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 1–25.
- Mansour F.A., Aldesuquy H.S. and Hamedo H.A. (1994). Studies on Plant Growth Regulators and Enzymes Production by Some Bacterie. *Qatar Univ.Sci. J.*14 (2): 281-288.
- Ma´rcia do Vale Barreto Figueiredo, Lucy Seldin, Fabio Fernando de Araujo and Rosa de Lima Ramos Mariano Plant Growth (2010) *Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-24
- Marmur J. and P.Doty. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Mol. Biol.*5:109-118.

Mathieu C. , Pieltain F. (2003) Analyse chimique des sols. Tec et Doc - Lavoisier. 388P

MEDINA J. A. N. (2007). rhizobacteria promoting the growth of plants infected with viruses. these de doctorat de l'université laval québec.

Mérigout p. (2006). étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturaux. influence des phytohormones sur le métabolisme azoté. Thèse de doctorat.

Miller M. J. and Malouin F., (1994).Chapter 13: Siderophore-mediated drug delivery : the design, synthesis, and study of siderophore-antibiotic and antifungal conjugates, dans The Development of Iron Chelators for Clinical Use, I. CRC Press, Editor. p. 275-306.

Monzyk B. and Crumbliss A. L. (1982). *Kinetics and Mechanism of the Stepwise Dissociation of Iron(III) from Ferrioxamine B in Aqueous Acid*; Journal of the American Chemical Society; 104(18); 4921-4929.

Nabti E., Sahnoune M., Ghoul M., Fischer D., Hofmann A., Rothballer M., Schmid M. et Hartmann A. 2010. Restoration of Growth of Durum Wheat (*Triticum durum* var. waha) Under Saline Conditions Due to Inoculation with the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* NH and Extracts of the Marine Alga *Ulva lactuca*. Eng. Life Sci. 4(7) : 354–360.

Neilands J. B. (1984). *Methodology of Siderophores*; Structure and Bonding. 58: 1-24.

Nevo E. (1986) Genetic resources of wild barley in the Near East: structure, evolution and application in breeding. Biol. J. Linn. Soc. 27 : 355-380.

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

Obi S. K. C. and Odibo F. J. C. (1984). Partial Purification and Characterization of a Thermostable Actinomycete 3-Amylase. *Applied and Environmental Microbiology*. 47: 571-575.

Oehl, F., Oberson, A., Fliessbach, M. P. A., Frossard, H. R. E. (2001). Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. Biol. Fertil. Soils. 34: 31-41.

Oufroukh F. et hamadi M. (1988) Maladies et ravageur des céréales. In benchabane K.D. et Ould-Mekgloufi L. 1998. Evaluation phénologique de quelques variétés d'orge (*hordeum vulgare* L.) et leur sensibilité vis-à-vis de *drechslera graminea* Rab.Mém. Ing Agro.INA.El-harrach.p59.

Patil RS, Ghormade V et Deshpande MV (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz Microbial Techn*. 26: 473-483.

Pearse Penny (1999) L'ergot des céréales et des graminées Agriculture et Alimentation Saskatchewan, Commission canadienne des grains.

Peix A., Rivas-Boyero A.A, Mateos P., Rodríguez-Barrueco C., Martínez-Molina E. and Velázquez E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem*. 33: 103–110.

Pelmont J. (1993). Bactéries et environnement. Presse Universitaire de Grenoble, 899 p. Illmer P. and Schnner F. (1992). Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem*. 24: 389- 395.

Prévost P. (1990) Les bases de l'agriculture moderne. Ed. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 262 p.

Raaijmakers J., Vlami M. & Jorge T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 537–547.

- Ramade F. (2003) Elément d'écologie fondamentale. 3ème édition, Ed. Dunod, Paris, 690P.
- Rodríguez, H. and Fraga R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17:319-339.
- Rao DLN (1987) Slow release urea fertilizers-effect on flood water chemistry, ammonia volatilization and rice growth in alkali soil. *Fert Res* 13: 209-221.
- Rawat S., Izhari A. and Khan A. (2011). Bacterial Diversity in Wheat Rhizosphere and their Characterization. *Advances in Applied Science Research*. 2 (2): 351-356.
- Reddy D.D., Sharma K.L. (2000) Effect of amending urea fertilizer with chemical additives on ammonia volatilization loss and nitrogen-use efficiency. *Biol Fertil Soils*. 32: 24-27.
- Reitz, L. P. et J. C. Craddock (1970) Diversity of germ plasm in small grain cereals. *Econ. Bot.* 24 : 315-323.
- Reyes-Ramírez .A., Escudero-Abarca B.I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P.M., and Eleazar Barbozacorona. J. (1994). Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. *Food Microbiology and Safety*. 69 (5).
- Richardson A., E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28,897-906.
- Roger C. (1990) Principe de phytopathologie et principe de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaire Ramandes. 286P.
- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B. R. (2001). Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 181-187.
- Sachin D. (2009) Effect of *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the Growth of Bamboo (*Bambusa bambusa*) and Maize (*Zea mays*) Plants. *Biofrontiers*. 1(1):1-24.
- Saddiki S. (1999). Utilisation du *Bradyrhizobium japonicum* comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes chez le maïs. Thèse pour obtenir le grade de maitre en Science. Université LAVAL. p65.
- Sadfi N., Chérif M. , Hajlaoui M.R., Boudabbous A. and Bélanger R.(2002). Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol.* 52: 323-337.
- Saito A., Fujii T. and Miyashita.K. (2003) Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: involvement of gene-duplication and domain-deletion. *Antonie van Leeuwenhoek* .84: 7–16.
- Saitou N. and Nei M. (1987) The Neighborjoining method: a new method for reconstructing phylogenetic stress .*Mol. Biol.Evol.*4:406-425.
- Saleem M., Arshad M., Hussain S. et Bhatti A. S. (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34 :635–648.
- Saleh, E. A., Nokhal, T. H., El-Borollosy, M. A., Frendrik, I., Sharaf, M. S., El-Sawy, M. (1998). Effectiveness of dual inoculation with diazotrophs and vesicular arbuscular mycorrhizae on growth and medicinal compounds of *datura stramonium*. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*. 6 (2): 343-355.
- Sayyed R. Z. and Patel P. R. (2011) Biocontrol Potential of Siderophore Producing Heavy Metal Resistant *Alcaligenes* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* RZS3 vis-à-vis Organophosphorus Fungicide. *Indian J Microbiol.* 51(3) : 266–272.

- Schery R. W. (1972) Plants for man. Prentice-Hall, Englewoods Cliffs, N. J. : Orge. 434-438.
- Schiraldi C., Di Lernia I. et De Rosa M. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *TRENDS in Biotechnology*. 20(10) : 420-426.
- Schrempf H (2001) Recognition and degradation of chitin by *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* .79: 285-289.
- Schwarz W.H. (2001) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 : 634-649.
- Schwyn B. and Neilands J.B. (1986). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Anal Biochem.* 160(1):47-56.
- Shah Md. A. I., Renukaradhya K. Math , Jong Min Kim , Myoung Geun Yun , Ji Joong Cho , Eun Jin Kim , Young Han Lee , Han Dae Yun (2010) Effect of Plant Age on Endophytic Bacterial Diversity of Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum*) Root and Their Antimicrobial Activities *Curr Microbiol* . 61:346–356.
- Sharma S. , Gul Khan F. et Nabi Qazi G. (2010). Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1821–1828.
- Shenker M., I. Oliver, M. Helmann, Y. Hadar, and Y. Chen; (1992). *Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by Rhizopus arrhizus*; *Journal of Plant Nutrition*. 15: 2173-2182.
- Siddique A., Ahmed S. and Hameed A. (2001). Production of Thermostable Protease by *Streptomyces thermoviolaceus*. *Pak. J. Bot.* 33 (special issue).
- Solano B. R., Maicas J. B., et Mañero J. G. (2009) Biotechnology of the Rhizosphere in Kirakosyan A., Kaufman P.B., Recent Advances in Plant biotechnology. 137-162.
- Soltner D. (1999) Les grandes productions végétales. 19^{ème} édition, Ed. Collection sciences et techniques agricoles, France, 464 P.
- Sundara, B., Natarajan, V., Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*. 77: 43-49.
- Tap J. (2009). Impact du régime alimentaire sur la dynamique structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal humain. These de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie.
- Tardieux-Roche, A. (1966a) Contribution à l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Ann. Agron.* 17 (4) : 403-471.
- Tardieux-Roche, A. (1966b) Contribution à l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Ann. Agron.* 17 (5) : 479-528.
- Teixido N., Canˆamaˆ T.P., Usall J., Torres R., Magan N. et Vinˆas I. (2005) Accumulation of the compatible solutes, glycine–betaine and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock crossprotection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Letters in Applied Microbiology*. 41 : 248–252.
- Toro, M., Azcon, R., Herrera, R. (1996). Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueraria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 21(1-2): 23-29.

- Tri Wahyudi A., Puji Astuti R., Widyawati, A., Meryandini A., and Asih. Nawangsih A. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 3(2): 34-40.
- Van Loon L. C. (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol*. 119 : 243–254.
- Vessey J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255 : 571–586.
- Viaux P. (1999) Une 3^{ème} voie en grande culture. Environnement Qualité Rentabilités. Ed. Agridécisions, Paris, 211P.
- Vidyalakshmi R., Paranthaman R. and Indhumathi. J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry*. 4 (1): 89-91.
- Vilain M. (1989). La production végétale. Volume 2 : La maîtrise technique de la production. 1^{ère} édition, Ed. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 361P.
- Vilain M. (1997). La production végétale. Volume 1 : Les composantes de la production. 2^{ème} édition, Ed. Lavoisier Tec & Doc., Londres, Paris, New York, 478P.
- Villeneuve P. et Fogilia T.A. (1997) Lipase specificities: potential application in lipid bioconversions. *Inform*. 8 : 640-650.
- Vinoth Raj S., Kanikkai Raja A., Babu Vimalanathan A., Manoj G. Tyagi, Naman Hirenkumar Shah, Johnson Amala Justin N.A., Infant Santhos B. and Sathiyaseelan K. (2009) Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology* 1(1): 008–013.
- Viollet A. (2010). Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. Fluorescents non pathogènes. Thèse de Doctorat de Microbiologie des Sols et de l'Environnement. Spécialité : Ecologie Microbienne. Université de Bourgogne.
- Wang, J. L., Luo, Z. C., Loeppert, R. H. (1995). Nutrient status of rhizosphere and phosphorus response of radish. *Journal of Plant nutrition* 18 (3) : 385 – 399.
- Weyens N., Monchy S., Vangronsveld J., Taghavi S., van der Lelie D. (2010) Plant-Microbe Partnerships. 2547-2569.
- Wingler A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants . *Phytochemistry*. 60 : 437–440.
- Winkelmann G. (2007). *Ecology of siderophores with special reference to the fungi*; *Biometals*. 20(34);379-392.
- Zahir Z. A., Ghani U., Naveed M., Nadeem S. M. et Asghar H. N. (2009) Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Arch Microbiol*. 191: 415–424.
- Zhao K., Penttinen P., Qiang Chen, Guan T., Lindström K., . Ao X, Zhang L., Zhang X. (2011). The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of actinobacteria with antimicrobial properties. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Annexe I. Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu)

GNO

Peptone	5g
Extrait de levure	2g
Extrait de viande	1g
NaCl	5g
pH.....	7,5
Agar.....	18g

Milieu NF-b

K ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	4g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl ₂	0.02g
FeCl ₃	0.01g
Na ₂ MoO ₄	0.002g
Acide malique anhydre.....	5g
Agar	18g
Extrait de levure.....	0.05g
Bleu de bromothymol.....	5ml
pH	7,1

Milieu NF-b liquide: même composition que le milieu gélosé sans l'ajout de l'agar et le bleu de Bromothymol

Milieu YMA

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄	0.2g
NaCl.....	0.1g
Agar.....	18g
pH	6.8

Milieu M2

Amidon soluble.....	10g
KNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	2g
Caséine.....	0.3g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.05g
CaCO ₃	0.02g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.01g
Agar.....	18g
pH.....	7.3

Milieu Jensen

Sacharose.....	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5g
NaCl.....	0.5g
K ₂ SO ₄	0.1g
Na ₂ MoO ₄	0.005g
Agar.....	20g
pH.....	6.9

Bouillon PBS

Nacl.....	18, 0 g
Kcl.....	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
pH.....	7

Milieu TSA

Peptone de Caséine (pancréatique).....	15.0g
Peptone de Soja.....	5.0g
Chlore de Sodium.....	5.0g
Agar.....	15.0g

Milieu Luria Bertani (LB)

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Nacl.....	4g
Agar.....	8g

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C /20minutes.

Agar à l'extrait de Malt déshydraté

Quantité /l d'H ₂ O distillée	50g
Extrait de malt.....	30g
Peptone mycologique.....	5g
Agar.....	15g
pH.....	5,4± 0,2

Le milieu est stérilisé à l'autoclave à une température de 115°C/10min

Annexe II

Tableau I : Classement et regroupements des groupes non significativement différents par le test ANOVA

Souches	Longueur moyenne des tiges (cm)	Les classes					
S10	12,9	A					
S2	12,8	A					
S14	11,4	A					
S20	11,1	A					
S16	10,9	A	B				
S12	10,8		B				
S8	10,6		B	C			
S18	10,5		B	C	D		
S6	10,5		B	C	D		
S15	10,5			C	D		
S4	10,4				D	E	
S11	9,4					E	
S17	9,3					E	F
témoin	7,2						F

Résumé

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins. En Algérie, elle constitue l'une des principales filières de la production agricole. Le but de cette étude est d'améliorer la croissance de l'orge par une méthode biologique, qui est moins polluante et moins dangereuse que les méthodes chimiques utilisées actuellement. Pour cela, 10 échantillons du sol de la wilaya de Béjaia ont été prélevés de la cote Ouest de la wilaya de Bejaia. Une sélection selon la capacité d'amélioration de la croissance de l'orge nous a permis de retenir 4 échantillons. Des isolements et des purifications des bactéries ont été réalisés sur cinq milieux de culture, cela nous a donné 120 souches bactériennes différentes morphologiquement. Un test de sélection selon l'amélioration de l'orge, la persistance et la résistance aux conditions du sol, nous a permis d'avoir 4 souches différentes. Ces souches sont identifiées phylogénétiquement par séquençage de l'ADN 16S, après des blastes ces souches sont identifiées comme *Bacillus megaterium*, *Streptomyces albogriseolus*, *Micrococcus luteus* et *Pseudomonas sp.* Ces souches ont montré une variabilité

La deuxième partie de travail a consisté à la détermination de leur mode d'action PGPR. Les tests d'activités enzymatiques comme la synthèse des lipases, des estérases, des chitinases, des cellulases, des amylases, des uréases et des protéases, la solubilisation du phosphore, la synthèse de sidérophores, ont permis de montrer que nos souches pourront avoir une application en industrie mais aussi en agriculture. En effet, ces activités ont suggéré la capacité des souches à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes. Cependant, des tests à l'égard de *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Phytophthora cinnamomi*, et *Botrytis cinerea* ont montré l'efficacité des quatre souches à limité la croissance de ces phytopathogènes à l'exception de *Verticillium dahliae* qui a résisté à toutes les souches.

Summary

Cereals and their derivatives are the staple food in many developing countries, particularly in the Maghreb countries. In Algeria, it is one of the main sectors of agricultural production. The purpose of this study is to improve the growth of barley by a biological method, which is cleaner and safer than chemical methods currently used. For this, 10 soil samples from the wilaya of Bejaia were collected from the west coast of the province of Bejaia. Selected based on the ability to improve the growth of barley has allowed us to retain four samples. Isolations and purifications bacteria were carried out on five culture media, it gave us 120 morphologically different bacterial strains. A screening test according to the improvement of barley, persistence and resistance to ground conditions, we were able to have 4 different strains. These strains are phylogenetically identified by 16S DNA sequencing after blasts these strains were identified as *Bacillus megaterium*, *Streptomyces albogriseolus*, *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* sp. These strains showed variability. The second part of the work consisted in the determination of their mode of action PGPR. Tests of enzymatic activities as the synthesis of lipases, esterases, chitinases, cellulases, amylases, proteases and ureases, the solubilization of phosphorus, the synthesis of siderophores, have shown that our strains may have a application in industry but also in agriculture. Indeed, these activities have suggested the ability of strains to inhibit the growth of phytopathogenic fungi. However, tests with respect to *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger*, *Phytophthora cinnamomi* and *Botrytis cinerea* showed the effectiveness of the four strains limited the growth of the plant pathogens *Verticillium dahliae* except that resisted all strains.

ملخص

الحبوب ومشتقاتها هي الغذاء الرئيسي في العديد من البلدان النامية، ولا سيما في بلدان المغرب العربي. كما هو الحال في الجزائر، تعتبر الحبوب واحدة من القطاعات الرئيسية للإنتاج الزراعي. الغرض من هذه الدراسة هو تحسين نمو الشعير بطريقة بيولوجية، والتي هي أنظف وأكثر أمانا من الطرق الكيميائية المستخدمة حاليا. لهذا، تم جمع 10 عينات من التربة من الساحل الغربي لمحافظة بجاية. الاختيار على أساس القدرة على تحسين نمو الشعير سمح لنا للاحتفاظ على أربع عينات. تم عزل البكتيريا على خمسة مستنبتات مختلفة، منح لنا 120 سلالة بكتيرية مختلفة شكليا. الفحص وفقا لاستمرار تحسين نمو الشعير ومقاومة للظروف الأرض، تمكنا من عزل 4 سلالات مختلفة. ويتم تحديد هذه السلالات من التسلسل S phylogenetique DNA16 بعد مطابقته وقد تم تحديد هذه السلالات، *Bacillus megaterium* *Streptomyces*، *Pseudomonas sp.* *albogriseolus*, *Micrococcus luteus*.

يتألف الجزء الثاني من العمل في تحديد طريقتهم في العمل PGPR. وأظهرت الاختبارات الأنشطة الأنزيمية وتركيب يباسيس، الاسترات، الكتيناز، السلولاز، الأميلاز، البروتيناز الأرياز، والانحلالية من الفوسفور، تركيب siderophores، أن السلالات لدينا قد يكون لها التطبيق في الصناعة ولكن أيضا في مجال الزراعة. في الواقع، قد اقترح هذه الأنشطة قدرة سلالات لتمنع نمو الفطريات. ومع ذلك، أظهرت الاختبارات فيما يتعلق فعالية السلالات الاربع في تحديد نمو الفطريات المسببة للأمراض مثل *Verticillium dahliae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger*, *Phytophthora* *Botrytis cinerea* و *scinnamomi*.

Chapitre 1 : Généralité sur les microorganismes de la rhizosphère

Chapitre 2 : Microorganismes impliqués dans la lutte biologique

Chapitre 3 : Généralité sur l'orge

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes