



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## **Université Amar Telidji- Laghouat**

**FACULTE : SCIENCES**

**DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES**

### **MEMOIRE DE MASTER**

**Présenté par : KABOUCHE AHLLEM**

**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)**

**FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES**

**OPTION : PROTECTION DES VEGETAUX**

### **Thème**

**MISE EN ÉVIDENCE DE LA PRODUCTION DE PHYTOHORMONES  
PAR DES ACTINOBACTÉRIES ENDOPHYTES.**

**Soutenu juin 2019**

#### **Jury de soutenance:**

**Nom et Prénom**

Dr.Zaamoum Miyada

Boukaya Nassira

**Grade**

Maitre de conférence "A"

Maître assistant "B"

**Qualité**

Encadreur

Co-encadreur



**Promotion : Juin - 2018**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



**جامعة عمار ثليجي - الأغواط**

كلية/معهد : العلوم  
قسم : علوم الزراعة

## مذكرة ماستر

تقديم الطالبة : كعبوش احلام

ميدان : العلوم و علوم الحياة

شعبة : علوم الزراعة

تخصص: حماية النباتات

### موضوع البحث

دراسة قدرة الاكتينوباكثيريا الضمنية على إنتاج بعض الهرمونات النباتية

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية	الصفة
د. زعموم ميادة	أستاذة محاضرة "أ"	مؤطر
بوقاية نصيرة	أستاذة مساعدة "ب"	

الدفعة : جوان -2019

## Table des matières

	page
Résumé .....	I.
ملخص .....	II.
Abstract.....	III.
Dédicace .....	IV.
Remerciements .....	V.
Liste des tableaux .....	VI.
Liste des figures .....	VII.
Liste des abréviations .....	VIII.
<b>Introduction .....</b>	<b>01</b>
<b>Partie I. Revue bibliographique .....</b>	<b>03</b>
<b>I.1. Les actinobactéries .....</b>	<b>03</b>
I.1.1. Historique .....	03
I.1.2. Caractéristiques.....	03
I.1.3. Classification .....	04
I.1.4. Cycle de développement .....	05
I.1.5. Relation plant-actinobactéries.....	06
I.1.5.1. Actinobactéries endophytes .....	06
I.1.5.2. Actinobactéries rhizosphérique .....	07
I.1.6. Intérêt des actinobactéries dans le domaine agronomique .....	07
I.7. Mécanismes impliqués dans le biocontrôle et dans l'effet PGPB ..	08
I.7.1. Mécanismes impliqués dans le biocontrôle .....	08
I.7.2. Mécanismes impliqués dans l'effet PGPB ( <i>Plant Growth Promoting Bacteria</i> ) .....	08
<b>I.2. Hormones de croissance végétales .....</b>	<b>10</b>
I.2.1. Gibbérelline .....	10
I.2.2. Cytokinines .....	11
I.2.3. Acide abscissique .....	12
I.2.4 Auxines .....	13
I.2.4.1. biosynthèse .....	13
I.2.4.2 Transport et stockage .....	13
I.2.4.3. Rôle de l'AIA .....	14
<b>PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>16</b>
II.1. Matériel biologique .....	16
II.2. Méthodes d'étude .....	16
II.2.1. Test de production des protéases .....	16
II.2.2. Test de production des cellulases .....	16
II.2.3. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) .....	17

---

<b>II.3.</b> Activité d'antibiose <i>in vitro</i> .....	<b>17</b>
<b>II.4.</b> Production des sidérophores .....	<b>18</b>
<b>II.5.</b> Solubilisation des phosphates inorganiques en milieu solide .....	<b>18</b>
<b>II.6.</b> Production de l'ammoniaque .....	<b>18</b>
<b>II.7.</b> Production des gibbérellines (AG3) .....	<b>19</b>
<b>II.8.</b> Production de l'acide indole-3-acétique(AIA) .....	<b>19</b>
<b>II.9.</b> Optimisation des conditions de production d'AIA .....	<b>20</b>
<b>II.9.1.</b> Préparation de l'expérimentation .....	<b>21</b>
<b>II.9.2.</b> Planification de l'expérimentation .....	<b>22</b>
<b>II.9.3.</b> Préparation des milieux de culture .....	<b>22</b>
<b>II.10.</b> Traitement de données .....	<b>23</b>
<b>PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>24</b>
<b>III.1.</b> Production d'enzymes lytiques .....	<b>24</b>
<b>III.2.</b> Production de l'acide cyanhydrique (HCN) .....	<b>26</b>
<b>III.3.</b> Production des sidérophores .....	<b>27</b>
<b>III.4.</b> Solubilisation des phosphates inorganiques.....	<b>28</b>
<b>III.5.</b> Libération d'ammoniaque .....	<b>29</b>
<b>III.6.</b> Production des gibbérellines AG3 .....	<b>31</b>
<b>III.7.</b> Production de l'Acide Indole-3-Acétique (AIA) .....	<b>32</b>
<b>III.8.</b> Optimisation des conditions de production d'AIA (acide indole-3-acétique) .....	<b>34</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>38</b>

## **KAABOUCHE Ahlem**

**Thème :** Mise en évidence de la production de phytohormones par des actinobactéries endophytes.

### **Résumé :**

Le présent travail a pour objectif d'étudier les mécanismes impliqués dans le biocontrôle et dans l'effet *PGPB* de certains isolats d'actinobactéries endophytes et rhizosphérique. La majorité des isolats testés ont montré des résultats positifs, ils présentent une activité antifongique vis-à-vis des champignons phytopathogènes, ils sont capables de produire des enzymes lytiques, de l'H<sub>2</sub>CN, des sidérophores, de libérer l'ammoniaque, de solubiliser les phosphates inorganiques et de produire les gibbérellines (AG3) et l'acide indole-3-acétique (AIA).

L'isolat le plus performant, *Saccharothrix* sp. MB15, a été sélectionné pour étudier les conditions culturales permettant d'optimiser la production d'AIA. Six facteurs ont été choisis à savoir la température (°C), la durée d'incubation (Jours), le pH, la concentration en L-Tryptophane (g/l), le volume d'inoculum (ml) et le milieu de culture (*YT* ou extrait de plantules). L'analyse des résultats a montré que l'isolat MB15 a atteint une production maximale de 137,36 µg d'AIA / ml et que le facteur milieu de culture est le seul qui influence la production d'AIA par l'isolat MB15. L'identification des groupements indole produits par l'isolat MB15 a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM), les résultats montrent que l'AIA est le seul indole présent dans le milieu.

À l'issue des résultats obtenus dans ce travail, l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15 s'est caractérisé par une prometteuse possibilité d'utilisation comme biofertilisant.

**Mots clé :** Actinobactéries, *Saccharothrix* sp. MB15, effet *PGPB*, acide indole-3-acétique, optimisation.

**العنوان:** دراسة قدرة الاكتينوبكتيريا الضمنية على إنتاج بعض الهرمونات النباتية.

**ملخص:**

يهدف هذا العمل إلى دراسة الآليات التي ينطوي عليها تأثير المكافحة الحيوية وتأثير PGPB لبعض سلالات بكتيريا البكتيريا العصبية وريزوسفيرية. وأظهرت معظم سلالات الأكتين البكتيريا نتائج إيجابية لهذه الآليات ، وعرضت نشاطاً مضاداً ضد الفطريات الممرضة ، والقدرة على إنتاج الإنزيمات الليفية ، و HCN ، و siderophores ، والأمونيا المطلقة ، والفوسفات غير العضوي غير المذاب ، وإنتاج حمض الجبرلينيك وحامض الأندول 3-أسيتيك (IAA).

. تم اختيار العزلة MB15 *Saccharothrix sp* الأكثر فعالية ، لتسليط الضوء على الظروف الزراعية لتحسين إنتاج IAA. تم اختيار ستة عوامل مثل درجة الحرارة ، فترة الحضانة ، درجة الحموضة ، تركيز L-tryptophan ، حجم اللقاح و وسط الاستزراع (YT أو مستخلص الشتلات). كان أعلى مستوى لإنتاج IAA 137.36 ميكروغرام / dIAA ، وعامل المزارع هو الوحيد الذي يؤثر على إنتاج AIA بواسطة سلالة MB15. تم تأكيد IAA المنتجة بواسطة تحليل كروماتوغرافي طبقة رقيقة (TLC).

النتائج التي تم الحصول عليها في دراستنا تفتح لنا آفاقاً واعدة للتطبيق المحتمل لـ *Saccharothrix sp* Strain MB15 الأسمدة.

**الكلمات المفتاحية:** أكتينوبكتيريا. تأثير PGPB، *Saccharothrix sp*. MB15، وحامض الأندول 3-أسيتيك

**KAABOUCHE Ahlem**

**Memory title:** Study of the potential of actinobacteria to produce some plant hormones.

**Abstract:**

This work aimed to investigate the mechanisms involved in the biocontrol and PGPB effect of some endophytic and rhizospheric actinobacteria strains. Most of actinobacterial strains showed positive results for these mechanisms, they exhibited antifungal activity against phytopathogenic fungi, ability to produce lytic enzymes, HCN, siderophores, released ammonia, solubilized inorganic phosphates and produce gibberellic acid and indol-3-acetic acid (IAA).

The most efficient isolate, *Saccharothrix* sp. MB15 has been selected to highlighting the cultural conditions for optimisation IAA production. Six factors were chosen such as temperature, incubation period, pH, L-tryptophan concentration, the volume of inoculum and culture medium (YT or seedling extract). The highest level of IAA production was 137.36 µg d'IAA /ml) and the culture medium factor is the only one that impacts AIA production by MB15 strain. The IAA produced was confirmed by thin layer chromatography (TLC) analysis.

Results obtained in our study open up promising perspectives for the possible application of Strain *Saccharothrix* sp. MB15 us biofertilizers.

**Keywords:** Actinobacteria, *Saccharothrix* sp. MB15, PGPB effect, Indol-3-acetic, Optimization.



## *Dédicaces*

*Je dédie ce manuscrit à mes chers parents qui m'ont Encouragé à donner le meilleur de moi-même, et qui m'ont fourni Les moyens d'être ce que je suis aujourd'hui.*

*« Tout le poids de l'or du monde n'est rien en comparaison de l'amour d'une mère et d'un père. »*

*Je le dédie aussi à mes sœurs Hania et Souhila  
A mes frères Massoud et Mohamed  
Que dieu les garde tous.*

*A toute la famille KAABOUHE  
A tous mes amis (es) sans exception*

*A toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apportée  
leur aide*

*A tous, du fond de mon cœur je vous dédie ce travail.*

*Ahllem*

# Remerciements

*Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la santé, la patience, la volonté et le courage.*



*Je voudrais remercier du fond du cœur l'enseignante Mme **GOUDJAL ZAAMOUM M.** Maitre de Conférences "A" à l'Université de Laghouat qui a accepté d'encadrer ce travail, et pour son encouragement durant toute ma carrière, ainsi que l'orientation, la confiance et son ouverture d'esprit.*

*J'adresse aussi tous mes remerciements à Monsieur **GOUDJAL Y. MCA** à l'Université de Laghouat, qu'il trouve ici toute ma gratitude pour toutes ses orientations pertinentes, sa grande disponibilité, conseils scientifiques et professionnels. C'était un très grand honneur d'être un de vous étudiants.*

*Mes remerciements s'adressent également à Mlle. **BOUKAYA Nassira**, et à Mme. **ALLALI Khadidja**, pour m'avoir tendus la main pour la réalisation de ce travail.*

*Pour la réalisation de ce travail, je voudrais remercier tous les enseignants du département des sciences agronomiques. Un grand respect à vous.*

*Merci aux ingénieurs du laboratoire de Département d'Agronomie pour leur aide et soutien.*

*Merci à tous mes amis et collègues qui m'ont soutenu de près et de loin ; Ben saad Keltoum, Ben Salem Amel, pour leur encouragements et leur amitié.*

*Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

**Liste des Tableau**

	<b>page</b>
<b>Tableau 01.</b> Domaine d'étude de l'expérimentation.	<b>21</b>
<b>Tableau 02.</b> Matrice d'expériences du plan de Plackett-Burman.	<b>22</b>
<b>Tableau 03.</b> Résultats du test de production de protéases et des cellulase	<b>25</b>
<b>Tableau 04.</b> Production de l'HCN par les isolats d'actinobactéries.	<b>26</b>
<b>Tableau 05.</b> Résultats de la production des sidérophores	<b>27</b>
<b>Tableau 06.</b> Résultat de la solubilisation des différentes sources de phosphates inorganiques par les isolats d'actinobactéries.	<b>28</b>
<b>Tableau 07.</b> Résultats des tests de libération de l'ammoniaque par les souches d'actinobactéries.	<b>30</b>
<b>Tableau 08.</b> Concentrations de l'AG3 dans le surnageant des cultures d'actinobactéries	<b>31</b>
<b>Tableau 09</b> Concentration de l'AIA dans le surnageant des cultures d'actinobactéries.	<b>33</b>
<b>Tableau 10.</b> Matrice d'expériences du plan de Plackett-Burman	<b>34</b>
<b>Tableau 11.</b> Concentrations d'AIA produit par l'isolat <i>Saccharothrix</i> sp. MB15 dans les différentes conditions culturales étudiées.	<b>35</b>

## Liste des figures

	page
<b>Figure 01</b> : Principaux groupes d'actinobactéries.	<b>05</b>
<b>Figure 02</b> : Cycle de développement des Streptomyces sur milieu solide.	<b>06</b>
<b>Figure 03</b> : Structure chimique des gibbérellines.	<b>11</b>
<b>Figure 04</b> : Structure chimique des cytokinines.	<b>12</b>
<b>Figure 05</b> : Structure chimique de l'acide abscissique (ABA).	<b>12</b>
<b>Figure 06</b> : Étapes de biosynthèse de l'acide indole-3-acétique (AIA).	<b>13</b>
<b>Figure 07</b> : Transport d'auxine dans le système racinaire, <b>a</b> ) Le transport polaire amène l'auxine en bas de la racine, <b>b</b> ) L'auxine se concentre en bas de la racine et diffuse dans les cellules adjacentes, <b>c</b> ) Le transport apolaire ramène l'auxine dans la partie supérieure de la plante, <b>d</b> ) Schéma général du transport de l'auxine.	<b>14</b>
<b>Figure 08</b> : Rôle de l'acide indole-3-acétique dans l'amélioration de la croissance végétale	<b>15</b>
<b>Figure 09</b> : Schéma représentatif de la méthode de la production des cellulases.	<b>16</b>
<b>Figure 10</b> : Photographie montrant le test de la production d'HCN (Originale, 2018).	<b>17</b>
<b>Figure 11</b> : Schéma représentant le test d'antibiose selon la méthode des stries croisées (Originale, 2018)	<b>17</b>
<b>Figure 12</b> : Photographies montrant l'ensemencement des souches d'actinobactéries sur le milieu CAS-bleu agar (Originale, 2018).	<b>18</b>
<b>Figure 13</b> : Photographies montrant quelques étapes expérimentales du test de production d'AIA (Originale, 2018).	<b>19</b>
<b>Figure 14</b> : Photographies montrant de dosage de l'AIA (Originale, 2018).	<b>20</b>
<b>Figure 15</b> : Photographie représente la présence d'un halo clair autour des colonies d'actinobactéries.	<b>24</b>
<b>Figure 16</b> : Couleur jaune du papier avant l'incubation (A), après incubation couleur rouge (B).	<b>26</b>
<b>Figure 17</b> : La production de l'ammoniaque indiquée par l'apparition de la couleur jaune brunâtre.	<b>30</b>
<b>Figure 18</b> : photographié représente la Réaction des isolats d'actinobactéries en contact avec le réactif de Salkowski (Originale, 2018).	<b>32</b>
<b>Figure 19</b> : Photographié représente la Chromatographie sur couche mince (CCM), (Originale 2018).	<b>33</b>

**Liste des abréviations :**

% :	pourcent
PGPB :	Plante Growth Promoting Bacteria
PGPR :	Plante Growth Promoting Rhizobacteria
ABA:	Acide abscissique
AIA :	Acide indole-3-acétique
AG3 :	d'acide gibbérellique
C° :	Degré Celsius
ml :	Millilitre
H :	Heure
SMA :	Skim Milk Agar
CMC :	Carboxy Méthyl Cellulose
ISP9 :	International Streptomyces Projet 9
HCN :	L'acide cyanhydrique
Rpm :	Rotation par minute
PVK :	Pikovskaya
YT :	Yeast Extract
Mm :	Millimètre
Min :	Minute
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> :	Phosphates tricalciques
Al(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> :	Phosphates d'alumine
Fe(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> :	Phosphates ferriques
CCM :	Chromatographie sur couche mince

## **Introduction**

Les actinobactéries constituent l'ordre des actinomycétales, ce sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, prenant généralement le Gram-positif. Elles possèdent un coefficient de chargaff (GC%) compris entre 60-70 % (Larpen, 1989). Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les actinobactéries sont importantes en raison de leur rôle dans la fertilisation des sols, et dans la synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stérols, etc.

Les actinobactéries sont des procaryotes très recherchés en biotechnologie grâce à leur rôle important dans la production des composés bioactifs. Ce groupe de bactéries a fourni un nombre considérable d'enzymes, de composés anti tumoraux, d'agents immunosuppresseurs, d'insecticides, d'antiparasites, d'herbicides, d'antioxydants et surtout d'antibiotiques (Solanki *et al.*, 2008). Les actinomycètes qui habitent le sol sont d'importants décomposeurs de la matière organique, ce qui rend le sol fertile (Moody *et al.*, 2001 ; Al-zarban *et al.*, 2002 ; Boughachiche *et al.*, 2005 ; et Ktouni *et al.*, 2005). Cette fonction de biodégradation des actinobactéries est due à la variété d'enzymes qu'elles peuvent synthétiser. En effet, les enzymes sont après les antibiotiques les plus importants produits par les actinobactéries (Lopes *et al.*, 1999).

Les actinobactéries sont connues par leur efficacité dans la protection des cultures contre les maladies d'origine telluriques, et elles exercent sur les plantes divers effets influençant leur développement (Kloepper et Beauchamp, 1992 ; Glick *et al.*, 1995). Elles solubilisent quelques minéraux insolubles présents dans la rhizosphère tel que le phosphore, ils sont capables de fixer l'azote atmosphérique, de produire des sidérophores, et de produire certaines phytohormones telles que les gibbérellines (AG3) et l'acide indole-3-acétique (AIA) (Merck *et al.*, 2009 ; Khamna *et al.*, 2009 ; Solans *et al.*, 2011). Cette dernière phytohormone synthétisée par diverses espèces bactériennes, fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes (Loper et Schroth, 1986).

Plusieurs auteurs ont rapporté que les actinobactéries produisent, en quantité appréciable, des phytohormones, notamment des auxines, et contribuent à l'amélioration des paramètres de croissance des plantes cultivées (El-Tarabily *et al.*, 2009 ; Sadeghi *et al.*, 2012 ; Goudjal *et al.*, 2014 ; Toumatia, 2015, Zamoum *et al.*, 2015 ; 2017). Le travail réalisé par Ahmed *et al.* (2009) ; Khamna *et al.* (2010) ; Goudjal *et al.* (2013) et Nia et Chouyeb, (2012) consiste à étudier les conditions culturales (pH du milieu de culture, Température d'incubation, durée

d'incubation, concentration en L-tryptophane) de biosynthèse d'AIA pour obtenir une production optimale de cette phytohormone.

A la lumière de ces informations, l'objectif de notre travail est d'étudier, dans une première étape, quelques mécanismes impliqués dans le biocontrôle des isolats d'actinobactéries, et en deuxième étape, notre travail consiste à sélectionner le meilleur isolat ayant un pouvoir de biosynthèse de l'acide indole-3-acétique (AIA) pour optimiser les conditions culturales de la production de cette hormone de croissance végétale.

## I. LES ACTINOBACTERIES

### I.1. Historique

L'histoire des actinobactéries peut être divisée en 5 grandes périodes. La première période qui va de 1877 à 1890 environ, a été nommée période médicale du fait que l'intérêt porté à ces micro-organismes était du presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait (Baldacci, 1962).

La seconde période se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinobactéries du sol (Mariat et Seblad, 1990). Cette période couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinobactéries et les premières tentatives pour distinguer deux groupes: les pathogènes et les saprophytes (Mariat et Seblad, 1990).

L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinobactéries. Waksman a découvert, en 1944, la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Leminor, 1989).

Ainsi, la quatrième période (1940-1970) peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinobactéries, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries, de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques (Baldacci, 1962).

Enfin, depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par Hopwood (1973). des méthodes génomiques (Hopwood, 2003) a révolutionné la classification des espèces (Ventura, 2007) puis les méthodes de découverte de métabolites secondaires et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes (Donadio, 2002).

### I.2. Caractéristiques

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif avec un coefficient de Chargaff (GC%) élevé, la majorité saprophytes, largement distribuées dans le sol, l'eau et les plantes. Elles montrent une diversité chimique et morphologique marquée, mais forment une ligne distincte de l'évolution des organismes (Goodfellow et O'donnell, 1989).

Bien que les actinobactéries soient des microorganismes procaryotes, leur morphologie ressemble fortement à celle des microorganismes eucaryotes comme les champignons filamenteux (Osada *et al.* 1998). Les lignes distinctes présentent des similitudes avec les

eubactéries et les champignons. Il existe des formes de transition. mycéliennes typiques et unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. Le diamètre des filaments des formes mycéliennes est toutefois environ dix fois plus faible (0,5 à 1,2  $\mu\text{m}$ ) que celui des mycéliums de champignons (Osada *et al.* 1998).

Les actinobactéries sont répanus dans l'environnement et la plupart des espèces sont chimio-organotrophes, aérobies, mésophiles et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (Goodfellow et Williams, 1983).

Les actinobactéries sont présents en surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur, la zone optimale étant comprise entre 2 et 15 cm (Breton *et al.*, 1989). Les propriétés les plus significatives des sont : leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes et les antibiotiques qui sont les produits les plus importants (Lopes *et al.*, 1999).

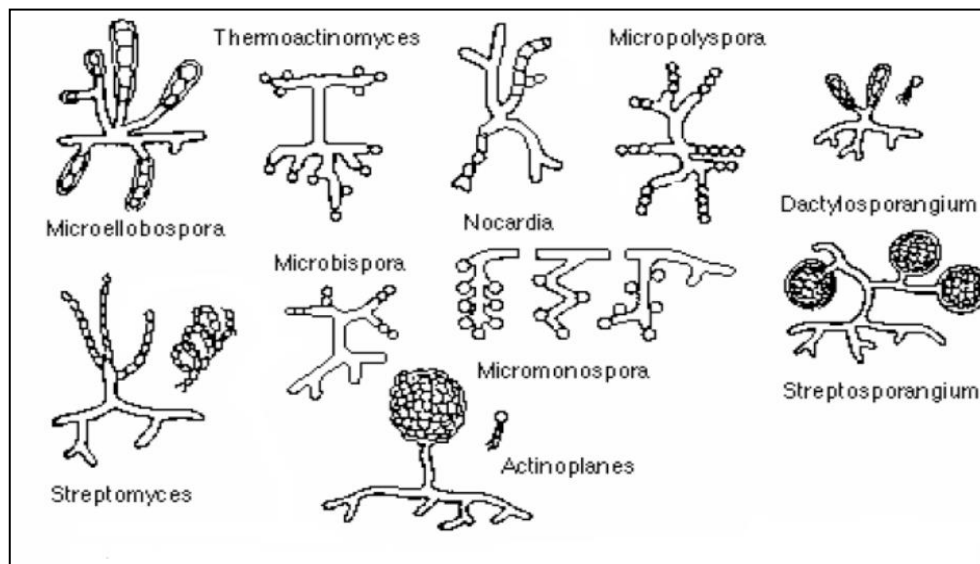
### **I.3.Classification**

Le phylum des actinobactéries tel qu'il figure dans le Bergey's Manual (2004) renferme une seule classe qui est subdivisée en 5 sous-classes, 6 ordres, 13 sous-ordres (dont 9 appartiennent à l'ordre des actinomycétales), 41 familles, 193 genres et plus de 1711 espèces.

Selon et Lechevalier (1965), la position taxonomique du genre *Streptomyces* s'établit comme suit :

Classe :	Actinobacteria
Ordre :	Actinomycétales
Sous-ordre :	Streptomycineae
Famille :	Streptomycetaceae
Genre :	<i>Streptomyces</i> .

L'ordre des actinomycétales comprend des genres d'une grande variabilité morphologique (Figure 01), allant de la forme cocci (*Micrococcus*) à un cycle batonnet-cocciex (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (Oskay *et al.* 2004 ; Srivibool et Sukchotiratana, 2006).

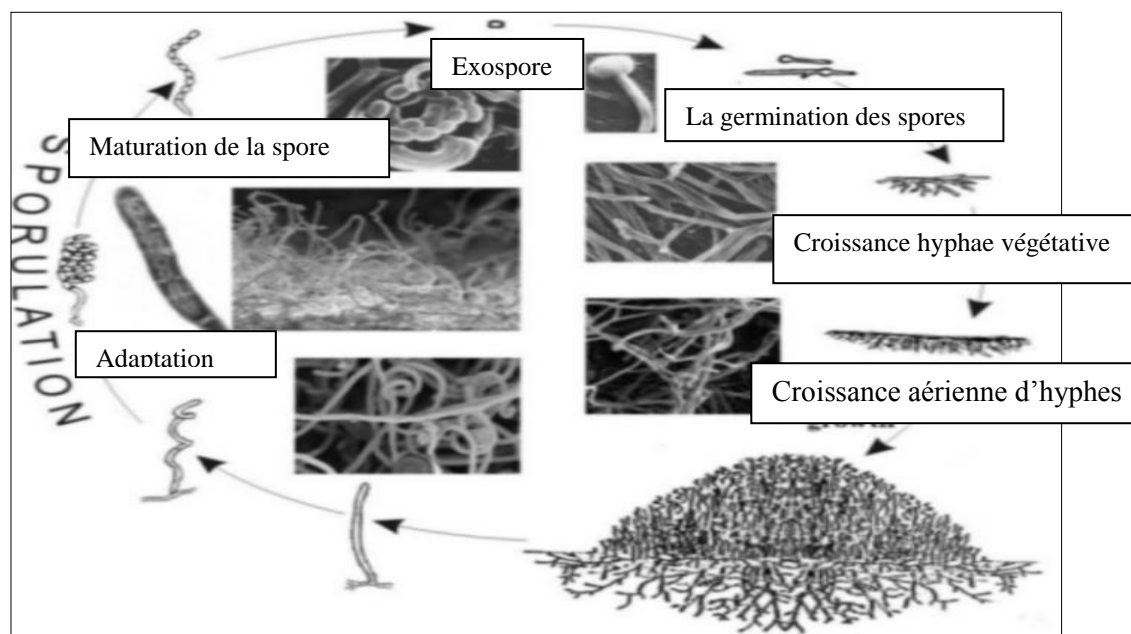


(Source : Stanier, 1966).

**Figure 01.** Principaux groupes d'actinobactéries.

#### I.4. Cycle de développement

Les actinobactéries possèdent une structure de procaryotes, mais un cycle biologique semblable à certains champignons (Sanglier et Trujillo, 1997). Selon Hopwood *et al.*, (1985), le cycle de vie des *Streptomyces* débute par la germination des spores, il comprend quatre étapes (Figure 02). L'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*, puis le tube de germination croît et donne des hyphes non-septés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide appelés le mycélium primaire, de substrat ou végétatif. Le mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphes dressés, se développera ensuite sur le mycélium du substrat, les extrémités des hyphes se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores de différents types selon l'espèce (Hopwood *et al.*, 1985).



(Source : Jakimowicz, 2007).

**Figure 02** : Cycle de développement des Streptomycètes sur milieu solide.

## I.5. Relation plante-actinobactéries

### I.5.1. Actinobactéries endophytes

Le terme « endophyte » sous-entend un microorganisme capable d'entrer à l'intérieur d'une plante et d'y survivre au moins une partie de sa vie sans provoquer de symptômes apparents à son hôte végétal. Cette définition correspond à la définition de Hallmann (2001), pour les bactéries endophytes et inclut également les microorganismes de nature fongique.

Certains endophytes peuvent former des symbioses remarquables avec les plantes comme c'est le cas avec les genres *Rhizobium* (Sessitsch *et al.*, 2002), et *Burkholderia* dans les nodules des Fabacées (Moulin *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2006). Plusieurs actinobactéries endophytes ont été détectées dans de nombreuses plantes herbacées et ligneuses (El-Shatoury *et al.*, 2013). Nous pouvons citer *Solanum tuberosum* (Manter *et al.*, 2010), *Oryza sativa* (Sessitsch *et al.*, 2012) et *Arabidopsis thaliana* (Bulgarelli *et al.*, 2012). Okazaki (2003), a observé *Microbispora* sur la surface et à l'intérieur des cellules épidermiques du blé.

Les actinobactéries libèrent les cytokinines (Kraigher *et al.*, 1991), des gibbérellines (Gogala *et al.*, 1971) et/ou de l'éthylène (De Vries *et al.*, 1987). D'autres travaux ont montré également leur rôle dans l'induction de la résistance chez les plantes à divers stress abiotiques et biotiques (Sessitsch *et al.*, 2002).

### **I.5.2. Actinobactéries rhizosphériques**

La rhizosphère est définie comme étant la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines. Elle se limite aux premiers millimètres de sol situés autour des racines (Campbell et Greaves 1990 ; Westover *et al.*, 1997). La quantité de microorganismes dans la rhizosphère est au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^9$  par gramme de sol (Davet, 1996).

Les actinobactéries représentent la fraction dominante de la microflore avec des cellules viables de l'ordre de  $10^6/g$  dans les sols relativement sec, humique et calcaireux (Goodfellow et Williams, 1983). Cependant dans les sols submergés, anaérobiques ou acides, le nombre est relativement faible ( $10^2/g$  sol séché). Williams et Wellington (1982), ont rapporté que parmi les actinobactéries, la fréquence d'isolement des *Streptomyces* est de 95,3%, des *Nocardia* de 1,98%, des *Micromonospora* de 1,4%, des *Actinoplanes* de 0,20%, des *Microbispora* de 0,18%, des *Actinomadura*, des *Streptosporangium* de 0,10%, *Thermoactinomyces* 0,14%, *Thermomonospora* 0,22% et des *Pseudonocardia* de 0,06%.

### **I.6. Intérêt des actinobactéries dans le domaine agronomique**

Les actinobactéries jouent un rôle important dans l'amélioration de la qualité du sol agricole (fertilisation des sols) (Aouar, 2012). Le genre *Frankia* est capable de fixer l'azote atmosphérique chez plusieurs plantes dicotylédones autres que les légumineuses (Goodfellow et Williams, 1983) et jouent un rôle dans la fertilisation de sol (Sarma *et al.*, 2003 ; Prescott *et al.*, 2007). Les actinobactéries sont capables de produire des substances insecticides, herbicides (Zhang *et al.*, 1998) et antiprotozoaires très puissants telles que les avermectines et les milbémycines (Nolan et Cross, 1998).

Les actinobactéries sont connues aussi pour leur pouvoir PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Elles solubilisent quelques minéraux insolubles présents dans la rhizosphère tel que le phosphore et ils sont capables de produire certaines phytohormones et des sidérophores (Khmna *et al.*, 2009 ; Solans *et al.*, 2011).

Le pouvoir antagonisme des actinobactéries peut être exploité dans le domaine agronomique pour remédier à certaines maladies de plantes. Elles sont efficaces pour le biocontrôle des agents phytopathogènes d'origine tellurique ou foliaire (Crawford *et al.*, 1993 ; Toumatia, 2015) et leurs antibiotiques sont intéressants pour la lutte contre les maladies des

plantes d'origine microbienne (Merrouche, 2004 ; El-Tarabily et Sivasithampar, 2006). Ces caractéristiques des actinobactéries en font des candidats de choix pour une éventuelle utilisation en lutte biologique sous forme de biopesticides (Toumatia, 2015).

## **I.7. Mécanismes impliqués dans le biocontrôle et dans l'effet *PGPB***

### **I.7.1. Mécanismes impliqués dans le biocontrôle**

#### **➤ Production des enzymes lytiques**

La lyse des parois cellulaires par les enzymes dégradatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue du mycoparasitisme. Les protéases et les cellulases sont d'importantes enzymes produites par les actinobactéries et spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives de composés des parois cellulaires (Schroth et Hancock, 1981 ; Chet, 1987 ; Lorito *et al.*, 1996).

#### **➤ Production de l'acide cyanhydrique (HCN)**

Certains gaz volatiles comme l'HCN (antibiotique), sont connus par leur action efficace contre les champignons phytopathogènes, en bloquant leurs respirations. La production de l'HCN est une activité très commune chez les espèces appartenant au genre *Streptomyces* (Schippers *et al.*, 1990).

Dafago *et al.*, 1990, suggèrent que la production de l'acide cyanhydrique provoquerait sur la plante un stress auquel elle réagirait par une augmentation de son système racinaire et de sa résistance naturelle.

### **I.7.2. Mécanismes impliqués dans l'effet *PGPB* (*Plant Growth Promoting Bacteria*)**

#### **➤ Solubilisation des phosphates inorganiques**

Les phosphates ont de fortes réactivités avec le Calcium, le Fer et l'Aluminium dans les sols, ce qui les rendent insolubles. Par conséquent, une très faible quantité de phosphate sera assimilable par les plantes (Gyanshwar *et al.*, 2002 ; Hamdali *et al.*, 2008). En vue de combler ce déficit, des amendements d'engrais phosphatés sont effectués dans les sols, le plus souvent, riches en phosphates insolubles. Une grande partie des phosphates ajoutés sera rapidement immobilisée dans le sol et deviendra par conséquent inaccessible pour les plantes (Rodriguez et Fraga, 1999).

Il a été démontré que certaines actinobactéries sont capables de solubiliser les complexes phosphatés insolubles et rendre ainsi le phosphate accessible à la plante (Hamdali *et al.*, 2008). La transformation de ces complexes insolubles par des actinobactéries bénéfiques en remédier à l'utilisation intensive des engrais chimiques et à l'accumulation des phosphates insolubles dans le sol (Rodriguez *et al.*, 2006).

#### ➤ **Libération de l'ammoniaque**

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

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

Les microorganismes prennent de l'importance dans l'agriculture en favorisant la circulation des éléments nutritifs (Sahin *et al.*, 2004 ; Orhan *et al.*, 2006). L'un des avantages des actinobactéries diazotrophes est de fournir aux plantes l'azote en échange du carbone libéré comme exsudats racinaires. Toutefois, la disponibilité du carbone comme source d'énergie est requise pour la fixation intensive de l'azote. Ceci impose à ces diazotrophes de vivre près des plantes soit dans la rhizosphère, le rhizoplan ou endophytes. Les microorganismes, à association symbiotiques, produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (Graham, 1998)

#### ➤ **Production des phytohormones**

Plusieurs études ont montré le rôle des actinobactéries rhizosphérique ou endophytes dans la promotion de la croissance des plantes, notamment par la synthèse d'acide indole-3-acétique (AIA) (El-Tarabily, 2008 ; El Tarabily *et al.*, 2009 ; Solans *et al.*, 2011 ; Goudjal *et al.*, 2013), d'acide gibbérellique (AG3) (Bottini *et al.*, 2004) et de cytokinines (Timmusk *et al.*, Ting *et al.*, 2008).

Durant ces dernières années, plusieurs espèces d'actinobactéries endophytes, notamment ceux appartenant aux genres *Streptomyces*, ont été étudiées pour leur faculté à produire des phytohormones et pour leur rôle dans la promotion de la croissance des plantes cultivées. Certaines espèces ont été formulées et commercialisées en tant que biopesticides à effet PGPB (Cao *et al.*, 2005 ; Shi *et al.*, 2009 ; Ruanpanun *et al.*, 2010).

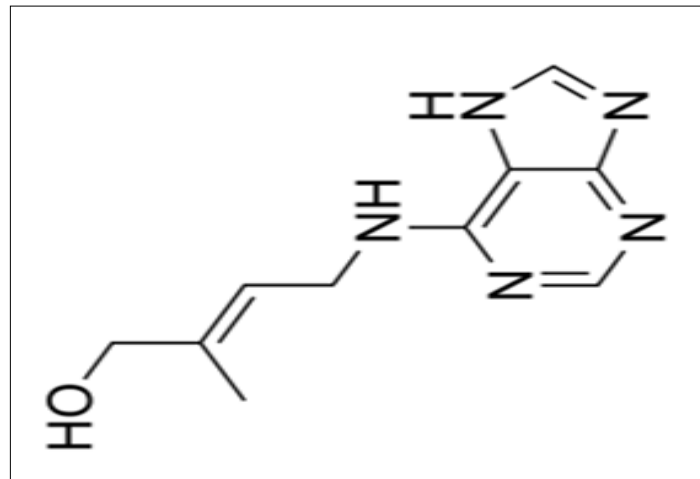
## **I.2. HORMONES DE CROISSANCE VÉGÉTALES**

Les hormones végétales participent à la régulation de la croissance et du développement des plantes, en réponse notamment aux facteurs environnementaux, le terme "hormone" se réfère à des substances organiques actives à très faible concentration et qui, produites dans un tissu, sont le plus souvent transportées vers un autre tissu où elles déclenchent une réponse physiologique donnée. Les familles d'hormones végétales les plus connues sont les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique et les auxines, éthylène,...etc. (Chafika *et al.*, 1997).

### **I.2.1. Gibbérellines**

Des études récentes chez le riz ont montré que les gibbérellines synthétisées par les anthères et dans les embryons en développement sont transportées pour contrôler la croissance d'autres organes floraux et des fruits (Kaneko *et al.*, 2003). De façon similaire, les gibbérellines produites dans l'embryon pendant la germination doivent être transmises aux cellules de l'aleurone pour induire l'expression des enzymes hydrolytiques. D'après Ogawa *et al.*, (2003), les gibbérellines sont des antagonistes de la fonction de l'ABA dans les graines. Cependant, des analyses du transcriptome de la germination *d'Arabidopsis* suggèrent que les gibbérellines diminuent l'expression des ABA et par conséquent, induisent la germination.

Les gibbérellines synthétisée par des actinobactéries endophytes sont également impliquées dans l'induction de la germination en provoquant la sortie de la radicule à travers la graine et induisent l'expression des gènes impliqués dans la modification de la paroi cellulaire (Peng et Harberd, 2002 ;Ogawa *et al.*, 2003 ; Goudjal *et al.*, 2013).



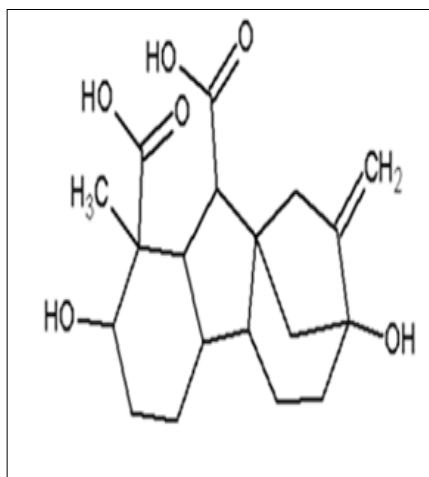
(Source : Antonio *et al.*, 1996).

**Figure 03:** Structure chimique des gibbérellines.

### I.2.2. Cytokinines

Les cytokinines sont des composés phényl-urée dérivés de la N-adénine. La zéatine et la cytokinine sont la plus commune chez les plantes. Le site de synthèse des cytokinines serait principalement localisé dans la pointe des racines, par la suite elles sont transportées par le xylème depuis les racines jusqu'aux tiges et les feuilles (Mok et Mok, 2001).

Les cytokinines sont des composés phényl-urée dérivés de la N-adénine synthétisées par de nombreuses actinobactéries rhizosphériques ou endophytes (Ting *et al.*, 2008) Elles jouent un rôle très important dans différent processus physiologiques et de développement des plantes comme la division cellulaire, la régulation de la croissance des racines, la sénescence et la réponse aux stress et aux agent pathogènes (Mok et Mok, 2001). Elles sont impliquées dans la division cellulaire, elles retardent la sénescence des feuilles et l'application de cytokinines peut libérer les bourgeons latéraux de la dormance apicale (Raven, 1992).



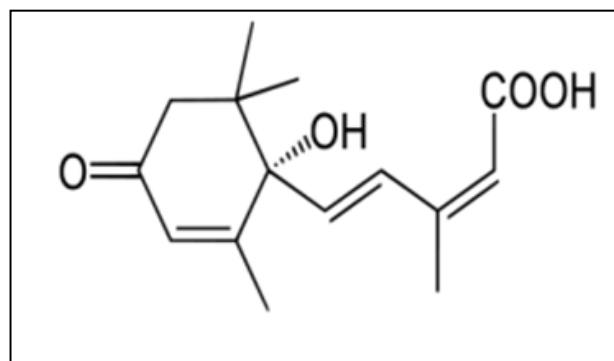
Source : (Antonio et al, 1996).

**Figure04:** Structure chimique des cytokinines.

### I.2.3. Acide abscissique

L'acide abscissique (ABA), appartient à la grande famille des isoprénoïdes. Ces molécules ont pour origine commune la polymérisation de deux précurseurs à cinq atomes de carbone : l'isopentényl phosphate (IPP) et son isomère, le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Ainsi l'IPP est une molécule centrale du métabolisme. Elle est le précurseur de nombreux composés comme les caroténoïdes, les quinones, les chaînes de chlorophylles, les stérols ou les cytokinines (Cunningham *et al.* 1998).

Les effets de l'ABA sont divers : fermeture des stomates; induction du transport des produits de la photosynthèse des feuilles vers les graines en développement; induction de la synthèse des protéines de réserve dans les graines; embryogenèse. Elle peut affecter l'induction et le maintien de la dormance dans les grains et des bourgeons de certaines espèces (Raven *et al.*, 1992).



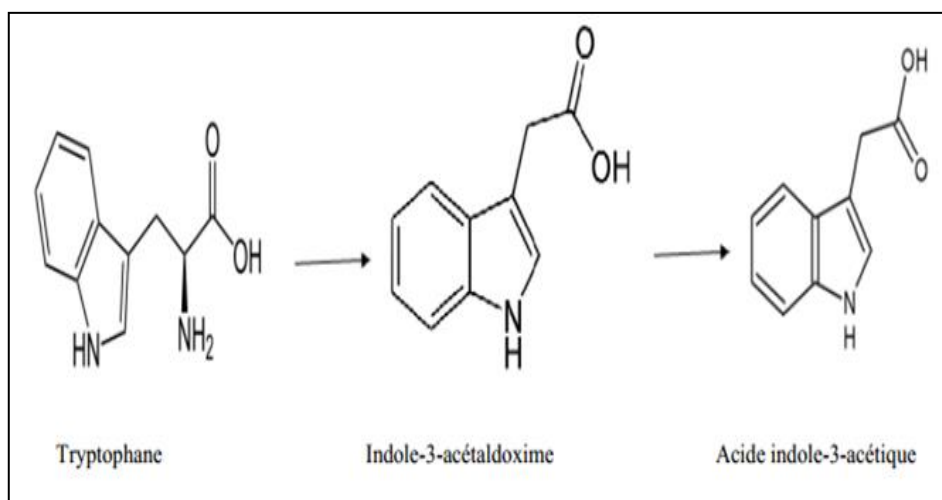
(Source : Antonio et al. 1996).

**Figure05 :** Structure chimique de l'acide abscissique (ABA).

## I.2.4. Auxines

### I.2.4.1. Biosynthèse

Des études ont montré que cette molécule est synthétisée par la plante principalement à partir du tryptophane. Il a été envisagé une voie secondaire de biosynthèse à partir d'indole (Cohen *et al.* 2003). Le tryptophane est tout d'abord transformé en indole-3-acétaldoxime (Figure 09) sous l'action d'enzymes à cytochromes P 450. L'acide indole-3-acétique est alors obtenu via des réactions d'oxydation de l'indole-3-acétaldoxime (Cohen *et al.* 2003).



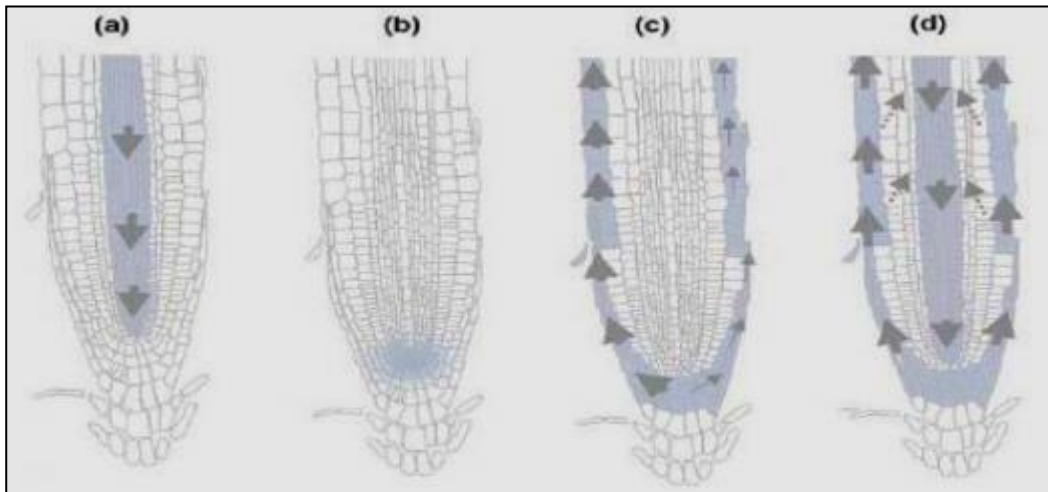
(Source : Antonio *et al.*, 1996).

**Figure 06** : Étapes de biosynthèse de l'acide indole-3-acétique (AIA).

### I.2.4.2. Transport et stockage

La forme majeure de l'auxine dans les plantes est l'AIA. Les méristèmes, les tissus vasculaires et les organes reproducteurs sont capables de produire l'AIA (Cheng *et al.*, 2006).

L'AIA peut agir sur toutes les parties de la plante et doit donc être transportée des feuilles jusqu'aux racines. Deux mécanismes de transport de l'auxine ont été mis en évidence : le transport par voie apolaire et le transport par voie polaire (Benjamins *et al.* 200).



(Source : Cheng *et al.*, 2006)

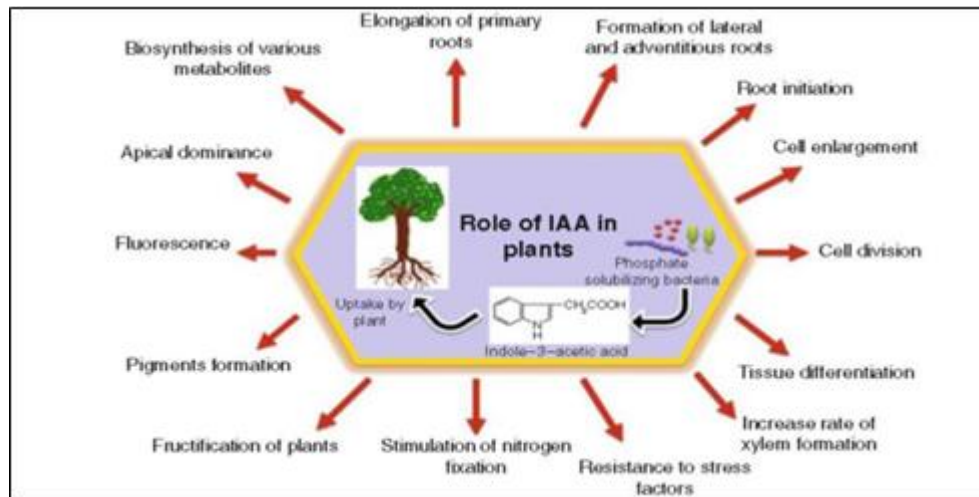
**Figure 08:** Transport d'auxine dans le système racinaire, **a)** Le transport polaire amène l'auxine en bas de la racine, **b)** L'auxine se concentre en bas de la racine et diffuse dans les cellules adjacentes, **c)** Le transport apolaire ramène l'auxine dans la partie supérieure de la plante, **d)** Schéma général du transport de l'auxine.

### I.2.4.3. Rôle de l'AIA

L'auxine (AIA) est une phytohormone le plus souvent produite par les actinobactéries à effet PGPB (Patten et Glick, 2002). Les actinobactéries synthétisent l'AIA à partir de son précurseur, l'acide indole-3-butyrique (AIB). Dans cette voie de synthèse, le L-tryptophane est d'abord transformé par une désamination oxydative en AIB pour subir ensuite une décarboxylation oxydative et donner l'acide indole-3-acétaldéhyde. Ce dernier composé est ensuite oxydé en AIA (Patten et Glik, 2002).

L'AIA, stimule la germination des graines de blé, l'élongation racinaire, les formations des racines latérales et la croissance des plantes par son effet sur la division cellulaire (Duca *et al.*, 2014).

Cette hormone participe également au contrôle de la croissance des fruits, de la dormance apicale, de l'élongation des tiges et de nombreux processus mettant en jeu la division et la différenciation cellulaires (Figure 09). Ainsi, l'AIA est bien connu pour déclencher les divisions du cambium et favoriser l'apparition de racines adventives sur les boutures tout en inhibant leur élongation (Chafika *et al.*, 1997).



(Source : Khan et al., 2009).

**Figure 09.** Rôle de l'acide indole-3-acétique dans l'amélioration de la croissance végétale.

## PARTIE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### II.1. Matériel biologique

Les isolats d'actinobactéries utilisés pour la réalisation de notre travail sont issus des travaux précédents dans le cadre des projets de fin d'étude réalisés au département d'Agronomie de l'université de Laghouat. Les souches ont été préalablement isolées, purifiées sur milieu de culture ISP2 (*International Streptomyces Project*), et identifiées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université de Laghouat. Un total de 10 isolats d'actinobactéries présentées par les souches *Streptomyces* sp. SN6, *Streptosporangium* sp. SG20, *Nocardia* sp. MB22, *Saccharothrix* sp. MB15, *Streptomyces* sp. ML2, *Streptomyces* sp. AP4, *Saccharothrix* sp. MB29, *Streptomyces* sp. ZL2, *Nocardia* sp. MB23, et *Streptomyces* sp. ZP1 ont été retenus pour réaliser ce travail.

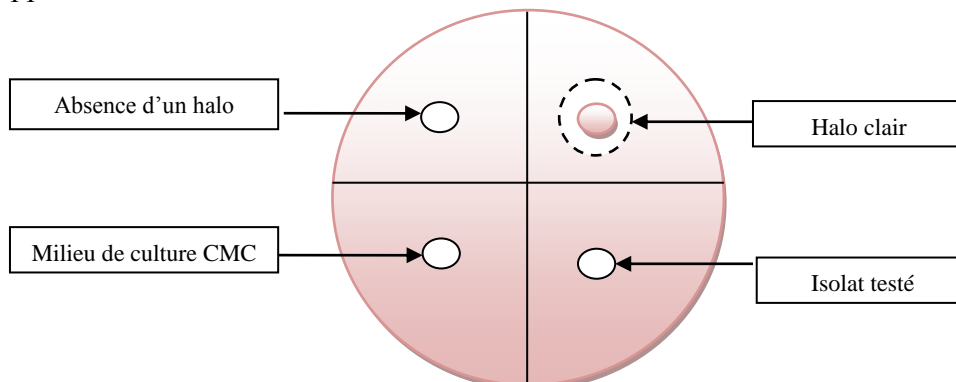
### II.2. Méthodes d'étude

#### II.2.1. Test de production des protéases

Les 10 isolats d'actinobactéries ont été testés pour leur capacité à produire des protéases sur le milieu SMA (*Skim Milk Agar*), en suivant la méthode décrite par Hariprasad et Niranjana (2009). Le test consiste à déposer un disque ( $\text{Ø} = 6 \text{ mm}$ ) d'une culture active, de chacune des isolats étudiés, à la surface du milieu. Après incubation à  $30^\circ\text{C}$  pendant 7 jours, la présence d'un halo clair autour des colonies indique la production des protéases.

#### II.2.2. Test de production des cellulases

La méthode modifiée de Nirjala et Sindhu (2011), a été utilisée pour déterminer la production des cellulases par les isolats d'actinobactéries qui ont étéensemencées sur milieu ISP9 additionné de la Carboxy méthyl cellulose (CMC) comme seule source de carbone. Les boîtes sont ensuite incubées à  $30^\circ\text{C}$  pendant 7 jours. La production de cellulases est indiquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.



**Figure 09.** Schéma représentatif de la méthode de la production des cellulases.

### II.2.3. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

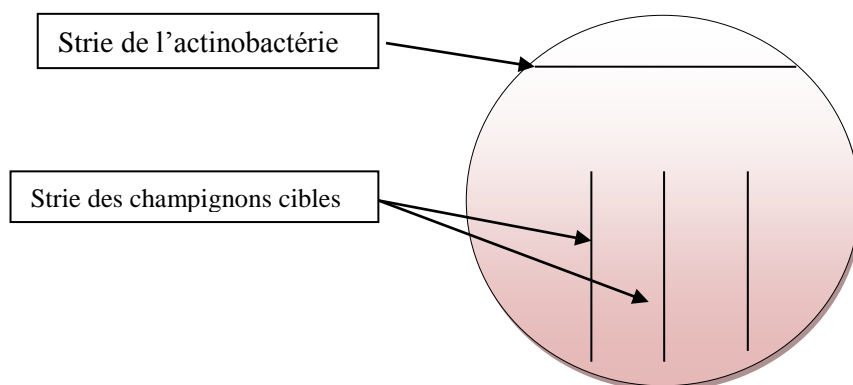
L'étude de la capacité des souches d'actinobactéries à produire l'acide cyanhydrique est effectuée selon la méthode de Lork (1948). Les isolats ont été ensemencés sur milieu Bennett additionné de 4 g de la glycine. Du papier Whattman stérile, imprégné d'une solution de picrate de sodium, est déposé au centre du couvercle d'une boîte de pétri de 60 mm de diamètre (Figure 02). Celle-ci est scellée avec du papier parafilm et incubée dans une étuve à 30°C pendant 4 jours. Le développement d'une couleur orange à rouge indique la production d'HCN.



**Figure10** : Photographie montrant le test de la production d'HCN (Originale, 2018).

### II.3. Activité d'antibiose *in vitro*

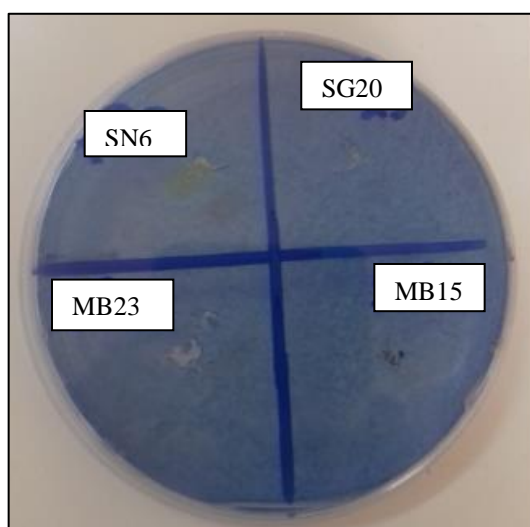
Afin de mettre en évidence l'activité antifongique des souche d'actinobactéries, la méthode des stries croisés décrite par (Zitouni *et al.*, 2005) a été utilisée. Elle consiste à ensemencer l'actinobactérie dans une boîte de Pétri contenant le milieu ISP2 sur une seule ligne horizontale. Après une incubation à 30°C pendant 7 jours, les champignons phytopathogènes testés sont ensemencés par stries perpendiculaires à celle de l'actinobactérie (Figure 11). Les boîtes ont été ensuite ré-incubées à 30°C pendant 5 jours. Les zones d'inhibition, exprimées en millimètre (mm), ont été mesurées entre la limite de la croissance mycélienne de l'actinobactérie et celle du champignon.



**Figure 11** : Schéma représentant du test d'antibiose selon la méthode des stries croisées (Originale, 2018).

#### II.4. Production des sidérophores

La technique décrite par Schwyn et Neilands (1997) a été adoptée pour tester la capacité des souches d'actinobactéries à produire des sidérophores. Deux milieux de culture ont été utilisés : AIM sans Fer et le milieu CAS-bleu agar (ChormeAzurool S). Cette technique consiste à déposer des disques (6 mm de diamètre) d'une culture active de chacune des souches étudiées à la surface du milieu de culture. Après incubation des boîtes dans l'étuve à 30°C pendant 7 jours, on note la croissance sur milieu AIM sans Fer et la présence ou l'absence d'un halo clair autour des colonies sur milieu CAS-bleu agar, qui indique la production ou non des sidérophores.



**Figure 12.** Photographies montrant l'ensemencement des souches d'actinobactéries sur le milieu CAS-bleu agar (Originale, 2018).

#### II.5. Solubilisation des phosphates inorganiques en milieu solide

La méthode décrite par Gaur (1990), permet d'évaluer la capacité de nos souches à solubiliser des phosphates sur milieu Pikovskaya contenant du  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{AlPO}_4$  ou  $\text{FePO}_4$  comme trois sources différentes de phosphate inorganique (Pikovskaya, 1948).

Un explant de 6 mm de diamètre d'une culture active de l'actinobactérie testé est déposé à la surface du milieu solide puis incubé à 30°C pendant 7 jours. Le diamètre du halo autour de la colonie indique la solubilisation de la source de phosphate inorganique, présente dans le milieu, par la souche d'actinobactérie.

#### II.6. Libération de l'ammoniaque

Les souches d'actinobactérie testées ont été inoculées dans des fioles Erlenmeyers contenant 50 ml de l'eau peptonée, puis incubées en agitation permanente (200 rpm, à 30°C) pendant 7

jours. Les cultures sont centrifugées à 4000 tour pendant 15 min. 1 ml du réactif de Nessler est ajouté à 1 ml du surnageant et le mélange est complété à 10 ml par l'eau distillée. Après incubation pendant 2 h à l'obscurité, le développement d'une couleur jaune brunâtre ou orange indique la libération de l'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ).

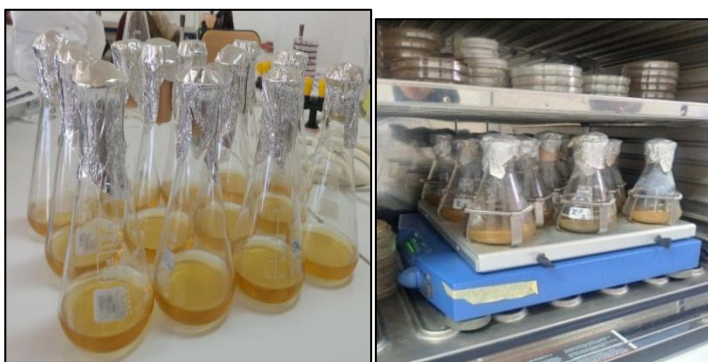
## II.7. Production des gibbérellines (AG3)

La méthode décrite par Tien *et al.* (1979) a été adoptée pour tester la production de l'AG3 par les isolats d'actinobactéries. Un millilitre de la suspension de spores a été introduite dans des fioles Erlenmeyer contenant 50 ml du milieu ISP2 liquide. Après incubation à 30°C pendant 5 jours sous agitation permanente (200 rpm), les cultures sont centrifugées à 4000 tour durant 30 min et le surnageant obtenu est acidifié à pH 2,5 puis centrifugé à nouveau de la même manière.

L'extraction de l'AG3 du surnageant des cultures est effectuée par un volume égal d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter. Après décantation, la phase organique est récupérée et l'AG3 est extrait à nouveau par un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase organique est récupérée pour la mesure de la densité optique à 250 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

## II.8. Production de l'acide indole-3-acétique(AIA)

La production de l'acide indole-3-acétique est testée sur le bouillon *YT* (*Yeast-extract Tryptone*) auquel est ajouté du L-tryptophane (1g/l) pour la production de l'AIA (Penrose et Glick, 2003). Le milieu estensemencé par 1 ml de la suspension de spores des actinobactéries, et incubé dans un shaker (200 rpm à 30°C) pendant 5 jours (figure 05).



**Figure13.** Photographies montrant des étapes expérimentales du test de production d'AIA (Originale, 2018).

Les cultures sont centrifugées à 4000 tour /15 min, un ml du surnageant est mélangé ensuite avec 2 ml du réactif de Salkowski. L'apparition de la couleur rouge indique la production du

groupement indole par la souche. Le dosage colorimétrique est réalisé selon la méthode de Loper et Scroth (1986). La Densité Optique (DO) est mesurée à 530 nm à l'aide d'un Spectrophotomètre (biochrom Libra S6). Quelques étapes expérimentales sont représentées par les photographies de la figure 14.



**Figure 14.** Photographies montrant de dosage de l'AIA (Originale, 2018).

### ➤ Chromatographie sur couche mince (CCM)

En vue de confirmer la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) par les isolats d'actinobactéries, une chromatographie sur couche mince a été effectuée. L'AIA produit par les souches testées a été récupéré dans l'acétate d'éthyle et déposé sur la ligne de base d'une plaque chromatographique (Salica Gel GF254, thickness 0.25 mm, Merck, Germany) puis développé en présence d'un témoin (AIA pure) dans un système de solvant composé d'acétate d'éthyle / chloroforme/ acide formique (50/35/10, v/v/v). Les  $R_f$  ont été calculés pour ces taches par la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Hauteur de la tâche}}{\text{Hauteur du front du solvant}}$$

Les tâches de même  $R_f$  avec l'AIA pur qui apparaissent sous lumière UV (254 nm) ont été considérées comme AIA.

Après confirmation de la production d'AIA par CCM, la quantité d'AIA produite par les souches d'actinobactéries, exprimée en  $\mu\text{g/ml}$  de surnageant de culture, a été déterminée par extrapolation des densités optiques obtenues dans une courbe d'étalonnage tracée par différentes concentrations d'AIA pur.

## II.9.Optimisation des conditions de production d'AIA

Les actinobactéries sont connues par la production des auxines pour cela le meilleur isolat producteur d'AIA est sélectionné pour une optimisation des conditions culturales en vue d'avoir une production maximale d'AIA.

Le plan d'expérience utilisé est celui de Plackett-Burman, et cela afin d'étudier et de déterminer l'effet de 6 facteurs sur la concentration d'AIA dans les surnageant de culture liquide de l'isolat d'actinobactéries. Dans les différents essais réalisés, nous avons varié les 6 facteurs choisis selon 2 niveaux (maximum et minimum). Chaque essai a été répété trois fois.

### II.9.1. Préparation de l'expérimentation

#### ✓ Choix de la réponse

La réponse choisie dans notre expérimentation est la concentration d'AIA exprimée en  $\mu\text{g/ml}$  dans le surnageant de culture de la souche.

#### ✓ Choix des facteurs

L'examen attentif du procédé de la production d'AIA par l'isolat d'actinobactéries testées montre qu'il faut retenir les 6 facteurs suivants :

- **Facteur 1** : Température d'incubation ( $X_1$ ).
- **Facteur 2** : La durée d'incubation ( $X_2$ ).
- **Facteur 3** : Volume de l'inoculum ( $X_3$ ).
- **Facteur 4** : La quantité du L-tryptophane ( $X_4$ ).
- **Facteur 5** : Le pH du milieu de culture ( $X_5$ ).
- **Facteur 6** : Le milieu de culture ( $X_6$ ).

#### ✓ Domaine d'étude

Selon l'analyse du procédé de la production d'AIA, les niveaux hauts (maximum) et bas (minimum) de chaque facteur sont définis comme l'indique le tableau suivant :

**Tableau 01.** Domaine d'étude de l'expérimentation.

Facteurs	Niveau minimum (-1)	Niveau maximum (+1)	Unité
<b>X1</b>	25	35	°C
<b>X2</b>	4	6	Jours
<b>X3</b>	0,5	1,5	ml
<b>X4</b>	0,5	1,5	g/l
<b>X5</b>	6,5	7,5	/
<b>X6</b>	YT modifié	Extrait de plantules du blé	/

### II.9.2. Planification de l'expérimentation

Le logiciel Minitab 2017 a été utilisé pour établir le plan d'expérience de Plackett-Burman. Le tableau 02 rassemble les données concernant chaque essai réalisé au cours de l'expérimentation.

**Tableau 02.** Matrice d'expériences du plan de Plackett-Burman.

N° d'essai	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	-1	-1	+1
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	-1	+1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1

### II.9.3. Préparation des milieux de culture

Pour préparer l'extrait de plantules du blé, ces dernières ont été lavées à l'eau de robinet, séchées à l'air libre puis broyées à l'aide d'un broyeur pour obtenir une poudre fine. Par la suite, une décoction a été préparée à raison de 40 g de la poudre de plantules par litre d'eau distillée. Le mélange a été filtré pour obtenir une suspension utilisée comme milieu de culture pour tester la production d'AIA par l'isolat sélectionné.

Le bouillon *YT* (*Yeast-extract Tryptone*) a été préparé, selon la même méthode décrite précédemment, pour étudier la production d'AIA par l'isolat d'actinobactérie sélectionné.

Cependant, les modifications apportées aux milieux de culture utilisés ont été faites suivant la matrice d'expériences du plan Plackett-Burman présentée dans le tableau 02.

## **II.10. Traitement de données**

Après la réalisation des expériences, la détermination des facteurs ayant un effet significatif sur la production d'AIA par l'isolat d'actinobactéries, nous avons réalisé l'Analyse de la Variance (ANOVA) à l'aide du logiciel Minitab 2017. Les histogrammes ont été réalisés par Microsoft Office Excel 2010.

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

Notre travail porte sur l'étude de l'effet de PGPB de 10 isolats d'actinobactéries endophytes et rhizosphérique appartenant à différents genres.

La caractérisation des isolats porte sur l'étude de leur capacité à produire des enzymes lytiques, l'HCN, l'ammoniaque, des sidérophores, l'AG3, l'AIA, et à solubiliser les phosphates inorganiques.

#### **III.1. Production d'enzymes lytiques**

Les isolats d'actinobactéries ont été étudiés pour leur capacité à produire les enzymes lytiques. La présence d'un halo clair autour des colonies d'actinobactéries indique la production d'enzymes lytiques (Figure15).



**Figure15.** Photographie représente la présence d'un halo clair autour des colonies d'actinobactéries.

Les résultats de la production d'enzymes lytiques sont mentionnés dans le tableau 03.

**Tableau 03.** Résultats du test de production de protéases et des cellulases.

Isolats	Enzymes lytiques			
	Cellulases		Protéases	
	Croissance	Ø halo (mm)	Croissance	Ø halo (mm)
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	-	00	-/+	09
<i>Saccharothrix</i> sp. MB15	+	09	-	00
<i>Nocardia</i> sp. MB22	-	00	+	29
<i>Nocardia</i> sp. MB23	-	00	+	19
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	-	00	-	00
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	+	11	-	00
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	-	00	-	00
<i>Streptomyces</i> sp. SN6	+	12	+	18
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	+	08	-	00
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	+	16	+++	27

(-) pas de croissance ; (+) croissance moyenne ; (++) croissance importante ; (+++) croissance très importante.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que 50 % des isolats testés ont une activité protéolytique positive, et également 50% des isolats présentent une activité cellulolytique positive. Cependant, certains isolats ayant une activité protéolytique positive ne présentent pas une activité cellulolytique. La meilleure activité protéolytique a été observée chez la souche *Nocardia* sp. MB22 et *Streptomyces* sp. ZP1, où nous avons enregistré un diamètre du halo clair autour des colonies de 29 mm et de 27 mm respectivement.

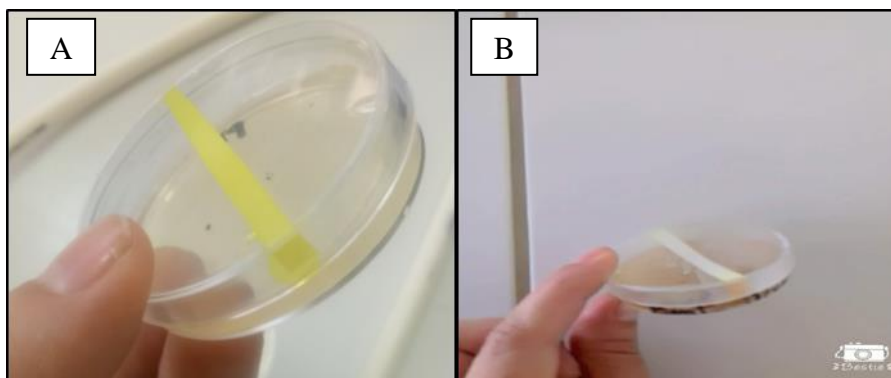
Les actinobactéries sont connues par leur production d'enzymes lytiques pour dégrader les protéines et la cellulose. Plusieurs travaux ont montré que différentes espèces du genre *Streptomyces* sont capables de produire des protéases et des cellulases (Toumatia *et al.*, 2014).

D'après nos résultats, les souches d'actinobactéries testées sont capables de produire des enzymes lytiques (cellulase, protéase). Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Nia et Chouyeb (2012).

Nous pouvons conclure que les isolats productrices des enzymes lytiques sont capables d'une part, de dégrader la matière organique ce qui donnent une meilleure fertilité au sol et d'autre part, elles ont une activité antifongique vis-à-vis de champignons phytopathogènes en dégradant les protéines de leurs parois (Dierckx et Dewettink, 2002 ; Ralet *et al.*, 2002).

### III.2. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

Les 10 isolats d'actinobactéries testés ont été étudiés pour leur capacité à produire l'acide cyanhydrique. L'apparition de la couleur rouge à orange sur le papier Whattman (Figure 16), indique la production de composés volatiles par les isolats d'actinobactéries testés, plus précisément la production de l'HCN.



**Figure 16.** Couleur jaune du papier avant l'incubation (A), après incubation couleur rouge (B).

Les résultats de ce test sont mentionnés dans le tableau 02.

**Tableau 04.** Production de l'HCN par les isolats d'actinobactéries.

Isolats d'actinobactéries	Production d'HCN
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	-
<i>Saccharothrix</i> sp. MB15	+
<i>Nocardia</i> sp. MB22	+
<i>Nocardia</i> sp. MB23	+
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	+
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	-
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	+
<i>Streptomyces</i> sp. SN6	-
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	+
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	-

(-) pas de production; (+) production moyenne

D'après les résultats du tableau précédent, les isolats *Saccharothrix* sp. MB15, *Nocardia* sp. MB22, *Nocardia* sp. MB23, *Saccharothrix* sp. MB29, *Streptosporangium* sp. SG20, et

*Streptomyces* sp. ZL2 sont capables de produire l'acide cyanhydrique. Cependant, pour les isolats ZP1, SN6, ML2, AP4, aucun changement de couleur n'a été constaté.

La production de l'HCN est parmi les mécanismes les plus efficaces dans le biocontrôle des champignons phytopathogènes telluriques. Ces composés interviennent au niveau de la chaîne respiratoire de l'agent phytopathogène, en inhibant l'activité du cytochrome oxydase (Toumatia, 2015). De plus, plusieurs travaux ont montré l'efficacité de *Streptomyces* productrices de l'HCN dans le biocontrôle de certains champignons phytopathogènes des sols (*Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp.) où le contact direct entre les deux microorganismes n'est pas nécessaire (Ahmad *et al.* 2008).

### III.3 Activité d'antibiose *in vitro*

L'activité d'antagonisme *in vitro* des souches d'actinobactéries testées ont été étudiées, selon la méthode de stries croisées, vis-à-vis de trois champignons phytopathogènes.

Les résultats liés aux zones d'inhibition exprimées en mm sont représentés dans le tableau 05.

**Tableau 05.** Activité antifongique des souches d'actinobactéries selon la méthode des stries croisées.

Isolats	Zone d'inhibition (mm)		
	<i>F.graminearum</i>	<i>F.culmorum</i>	<i>B.sorokiniana</i>
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	00	00	00
<i>Saccharothrix</i> sp. MB15	22.3	12	14
<i>Nocardia</i> sp. MB22	10.2	17.9	29.0
<i>Nocardia</i> sp. MB23	10	11	19
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	16	15	07
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	19.0	15.0	26
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	20	22	19
<i>Streptomyces</i> sp. SN6	00	00	00
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	16	15	16
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	13	10	10

Les souches MB15, ML2, SG20, ZL2, ont une très bonne activité antifongique qui est enregistrée contre les trois souches fongiques ciblées par ce test. Les résultats des mesures de la longueur des zones d'inhibition de la croissance de *B.sorokiniana* confronté aux souches d'actinobactéries testées, indiquent que les souches MB15 et ML2 ont significativement un

bon potentiel d'inhiber la croissance de ce champignon, avec un avantage marqué pour la souche MB22 : 29.0, MB22 : 29.0 mm).

Les actinobactéries sont bien connus pour leur capacité a produire des produits naturels de structures complexes et avec diverses activités biologiques.

Les actinobactéries endophytes du genre *Streptomyces* ont inhibé la croissance de trois champignon. Les résultats de la présente étude corroborent avec plusieurs travaux qui ont indiqué l'inhibition de champignon par *Streptomyces*.

#### III.4. Production des sidérophores

Les isolats d'actinobactéries ont été testés pour la production de sidérophores. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 06.

Tableau 06. Résultats de la production des sidérophores

Isolats d'actinobactéries	CAS- Belau agar		AIM sans fer
	Croissance	Ø halo (mm)	Croissance
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	+	8	+
<i>Saccharothrix</i> sp. MB15	-	0	-
<i>Nocardia</i> sp. MB22	-	0	-
<i>Nocardia</i> sp. MB23	-	0	-
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	+	7	+
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	-	0	-
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	+	0	-
<i>Streptomyces</i> sp. SN6	++	16	+
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	+	8	-
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	-	0	-

(-) pas de croissance ; (+) croissance moyenne ; (++) croissance importante.

Nos résultats montrent que 06 isolats (*Streptomyces* sp. AP4, *Saccharothrix* sp. MB29, *Streptosporangium* sp. SG20, *Streptomyces* sp. SN6, *Streptomyces* sp. ZL2, *Streptomyces* sp. ZP1) produisent les sidérophores sur le milieu CAS-bleu agar. La dépendance des actinobactéries en fer a été étudiée sur le milieu AIM sans fer. Les résultats montrent que 70 % des isolats ne peuvent pas croître sur le milieu AIM sans fer.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par plusieurs chercheurs qui montrent le rôle de plusieurs isolats de *Streptomyces*, producteurs des sidérophores, dans le biocontrôle de nombreux microorganismes phytopathogènes (Jang *et al.* 2005 ; Hamdali *et al.* 2008 ;

Hamdali *et al.*, 2010). D'après Getha *et al.* (2005), la production de sidérophores par *Streptomyces* est très efficace dans la lutte biologique.

La croissance des isolats testés sur le milieu CAS-bleu agar indiquent leur capacité à chélater le fer. L'absence de croissance des isolats d'actinobactéries sur le milieu AIM sans fer indique leur dépendance au fer.

Le fer est un élément essentiel pour la croissance et la survie de la plupart des champignons phytopathogènes (Eisemdle *et al.*, 2004). Plusieurs chercheurs ont constatés que certains actinobactéries ont la capacité de produire des composés de faibles poids moléculaires (sidérophores). Ces molécules permettent à ces microorganismes de chélater le fer du milieu et ainsi d'inhiber la croissance des agents phytopathogènes (Chet et Inbar, 1994; Bouitez *et al.*, 2004).

### III.5. Solubilisation des phosphates inorganiques

Les résultats de la solubilisation des phosphates inorganiques par les 10 isolats d'actinobactéries sont mentionnés dans le tableau 07.

**Tableau 07.** Résultat de la solubilisation des différentes sources de phosphates inorganiques par les isolats d'actinobactéries.

Isolats d'actinobactéries	Solubilisation des phosphates inorganiques				
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		Al(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		Fe(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
	Croissance	Øhalo	Croissance	Øhalo	Croissance
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	+	12	+/-	7,2	-
<i>Saccharothrix</i> sp. MB15	+	14,2	-	00	-
<i>Nocardia</i> sp. MB22	+	11	-	00	-
<i>Nocardia</i> sp. MB23	+	11	-	00	-
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	-	00	-	00	-
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	+	11	+	8,3	-
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	++	19,4	++	10	-
<i>Streptomyces</i> sp. SN6	+	12	-	00	-
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	+	16,7	++	9,1	-
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	+	14	-	00	-

(-) pas de croissance ; (+) croissance moyenne ; (++) croissance importante.

L'analyse des résultats obtenus dans le tableau 07, montre que 90% des isolats sont capables de se développer sur le milieu Pikovskaya contenant le phosphate tricalcique comme

source de phosphate inorganique. Tous les isolats présentent une très bonne croissance, par le développement de colonie sur milieu de culture et la formation d'un halo tout autour des colonies sauf l'isolat *Saccharothrix* sp. MB29. Cette solubilisation est caractérisée aussi par la disparition de l'opacité du milieu. Par contre, l'utilisation des autres sources de phosphate par les isolats d'actinobactéries est variable d'une souche à une autre où on a pu remarquer que les isolats qui utilisent plus le phosphate d'aluminium présent dans le milieu sont *Streptomyces* sp. ZL2, *Streptosporangium* sp. SG20, *Saccharothrix* sp. MB15, et pour la troisième source de phosphate qui est le phosphate ferrique, on a remarqué que tous les isolats ne peuvent pas solubiliser cette forme.

Plusieurs travaux ont montré le rôle des espèces d'actinobactéries dans la solubilisation des sels de phosphate insolubles en phosphate assimilable par les plantes (Rudresh *et al.*, 2005 ; Hamdali *et al.*, 2008 ; Xiao *et al.*, 2008). En outre, une large gamme d'espèces du genre *Streptomyces* a été rapportée pour leur faculté d'améliorer l'absorption racinaire du phosphate et dans la promotion de la croissance des plantes (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Rodriguez *et al.*, 2006 ; Franco-Correa *et al.*, 2010). Les actinobactéries actives dans la solubilisation des phosphates inorganiques peuvent être une excellente solution pour la remédiation de l'utilisation intensive d'engrais chimiques et à l'accumulation des phosphates insolubles dans le sol qui entraîne par la suite une eutrophisation de l'écosystème (Rodriguez *et al.*, 2006 ; Hamdali *et al.*, 2008).

### **III.6. Libération d'ammoniaque**

Les 10 isolats d'actinobactéries sont testés pour leur pouvoir de libérer l'ammoniaque. L'addition du réactif de Nessler aux surnageant de culture permet de révéler la production de l'ammoniaque. Toutefois, l'apparition d'une couleur jaune brunâtre indique la présence de l'ammoniaque libérée à partir des peptones du milieu de culture (Figure17).



**Figure17.** libération de l'ammoniaque indiquée par l'apparition de la couleur jaune brunâtre. Les résultats de ce test sont indiqués dans le (Tableau 08).

**Tableau 08.** Résultats des tests de libération de l'ammoniaque par les souches d'actinobactéries.

<b>Isolats d'actinobactéries</b>	<b>Libération de l'ammoniaque</b>
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	-
<i>Saccharothrix</i> sp. MB15	+
<i>Nocardia</i> sp. MB22	+
<i>Nocardia</i> sp. MB23	+
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	+
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	+
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	+
<i>Streptomyces</i> sp. SN6	+
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	-
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	-

(-) pas de production ; (+) production moyenne.

D'après les résultats obtenus, nous ne constatons que les isolats *Streptomyces* sp. ZP2, *Streptomyces* sp. ZP1, *Streptomyces* sp. AP4, n'arrivent pas à libérer l'ammoniaque. Par contre, les autres isolats testés sont capables de libérer l'ammoniaque dans le milieu de culture.

De nombreux travaux ont soulevés des associations symbiotiques de bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique (*Rhizobium*, *Frankia*, *Azobacter*) (Tilak *et al.*, 2005 ; Gray et Smith,

2005). Benmati *et al.*, (2012), Taibaoui (2016) et Hmadouche (2016), ont signalés que de nombreuses espèces appartenant au genre *Streptomyces* ont un rôle très important dans la libération de l'ammoniaque à partir de la matière organique dans le sol. Ce processus peut contribuer efficacement dans la biofertilisation et la promotion de la croissance des plantes cultivées.

### III.7. Production des gibbérellines AG3

La production des gibbérellines (AG3), par les isolats d'actinobactéries testés, a été testée dans le milieu ISP2 liquide. La concentrations des gibbérellines (AG3), produit dans le surnageant des cultures liquides des isolats d'actinobactéries testés, a été obtenue par extrapolation des densités optiques dans une courbe d'étalonnage réalisée par différentes concentrations de l'AG3 pur. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 08.

**Tableau 09.** Concentrations de l'AG3 dans le surnageant des cultures d'actinobactéries

Isolats d'actinobactéries	Production d'AG3	Densité optique	Concentration d'AG3 (µg/ml)
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	-	00	00
<i>Saccharothrix</i> sp.MB15	+	0,85	425
<i>Nocardia</i> sp. MB22	-	00	00
<i>Nocardia</i> sp. MB23	+	0,41	205
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	+	0,69	345
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	+	0,44	220
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	+	0,32	160
<i>Streptomyces</i> sp.SN6	+	0,18	90
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	+	0,17	85
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	-	00	00

(-) pas de production ; (+) production moyenne.

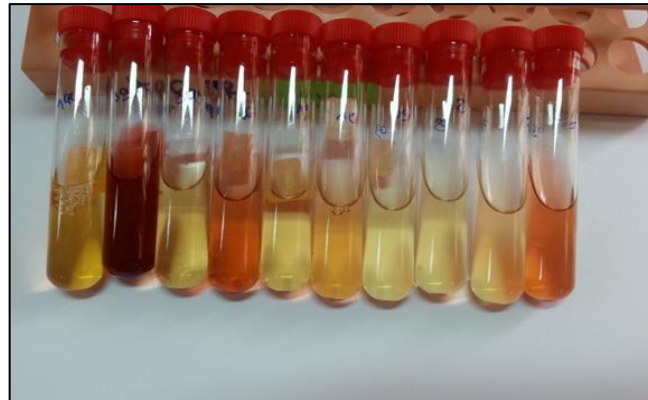
L'observation des résultats du tableau ci-dessus montrent que la concentration d'AG3 varie entre 85 à 425 µg/ml. La meilleure valeur a été obtenue par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15 avec 425 µg/ml, suivi par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB29 avec 345 µg/ml. Ceci confirme que les différentes souches étudiées réagissent différemment malgré que les conditions culturales étaient les mêmes. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Ahmed *et al.* (2005).

La production des phytohormones par les microorganismes est considérée parmi les principaux mécanismes de la promotion de croissance de plantes observée chez les actinobactéries, l'AG3 synthétisées par des actinobactéries sont transportées pour contrôler la croissance des organes floraux et des fruits (Kaneko *et al.*, 2003).

Elles affectent la division et l'allongement cellulaires et sont impliquées dans plusieurs processus de développement tels que la germination des graines, la floraison, la fructification et le retard de la sénescence dans de nombreux organes d'une large gamme d'espèces végétales (MacMillan, 2002). Les gibbérellines sont également impliquées dans la promotion de la croissance de la racine car elles régulent l'abondance des poils racinaires (Bottini *et al.*, 2004).

### III.8. Production de l'Acide Indole-3-Acétique (AIA)

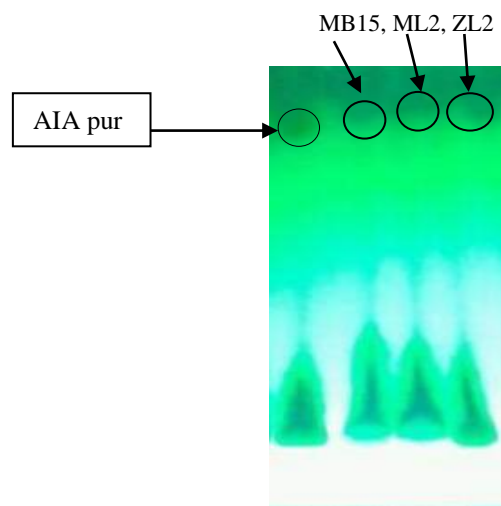
La production des composés à noyau indole a été faite avec les souches d'actinobactéries dans le milieu YT. Les souches productrices des métabolites avec un noyau indole développent une coloration rose vive à rouge à la suite de l'addition du réactif de Salkowski après 20 à 60 min d'incubation à l'obscurité (Figure18).



**Figure18** : Photographie représentant la réaction des isolats d'actinobactéries en contact avec le réactif de Salkowski (Originale, 2018).

#### ❖ Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse chromatographique sur couche mince montre que les composés à fonction indole ont la même distance de migration que l'AIA pur. De ce fait ils peuvent être considérés comme auxines (AIA) (Figure19).



**Figure19.** Photographié représentant la chromatographie sur couche mince (CCM) (Originale 2018).

La quantité de l'AIA, produite dans le surnageant des cultures liquides des isolats d'actinobactéries, a été obtenue par extrapolation des densités optiques dans une courbe d'étalonnage réalisé par différentes concentration d'AIA pur. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 09.

**Tableau 10.** Concentration de l'AIA dans le surnageant des cultures d'actinobactéries.

Isolat d'actinobactéries	Production d'AIA	Densité Optique	Concentration d'AIA (µg/ml)
<i>Streptomyces</i> sp. AP4	-	00	00
<i>Saccharothrix</i> sp. MB15	+	1,311	93,64
<i>Nocardia</i> sp. MB22	+	0,265	18,92
<i>Nocardia</i> sp. MB23	+	0,814	58,14
<i>Saccharothrix</i> sp. MB29	+	0,80	57,14
<i>Streptomyces</i> sp. ML2	+	0,511	36,5
<i>Streptosporangium</i> sp. SG20	+	0,161	11,5
<i>Streptomyces</i> sp. SN6	-	00	00
<i>Streptomyces</i> sp. ZL2	+	0,427	30,5
<i>Streptomyces</i> sp. ZP1	+	0,376	26,85

(-) pas de production ; (+) production moyenne.

Les résultats obtenus dans le tableau (10) montrent que 80% des isolats étaient capables de produire de l'Acide Indole-3-Acétique (l'AIA), en quantités différentes. La production maximale était observée chez l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15 avec 93,64µg/ml. La production de cette hormone végétale par les autres isolats varie de 26,85 à 58,14 µg/ml. Ceci

confirme que les différentes souches étudiées réagissent différemment malgré que les conditions culturales étaient les mêmes. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs (Ahmed *et al.*, 2005 ; Nia et Choyeb, 2012 ; Goudjal *et al.*, 2013 ; Toumatia *et al.*, 2014 ; Zamoum *et al.*, 2015).

Plusieurs travaux ont mentionnées la capacité des actinobacteries à produire l'AIA qui fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les réponses trophiques, les réponses cellulaires telles que l'expansion des cellules, la division, la différenciation et la régulation des gènes (Ryu et Patten, 2008). Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en limitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. Les poids des tiges et des racines des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (Narula *et al.*, 2006).

### III.9. Optimisation des conditions de production d'AIA (acide indole-3-acétique)

L'effet de la température, de la durée d'incubation, de la concentration en L-tryptophane, de la concentration de l'inoculum, du pH et du milieu de culture utilisé, a été étudié dans l'objectif d'optimiser les conditions culturales de production d'AIA par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15. Le tableau 10 représente la matrice d'expériences réalisé selon le plan de Plackett-Burman. Cette matrice montre les différentes conditions de cultures de l'isolat MB15.

**Tableau 11.** Matrice d'expériences du plan de Plackett-Burman

Numéro d'essai	pH	Concentration en L-tryptophane (g/l)	Volume d'inoculum (ml)	Durée d'incubation (Jours)	Milieu de culture	Température d'incubation (°C)
1	6,5	0,5	0,5	6	YT	35
2	6,5	1,5	0,5	4	Extrait de plantules	35
3	6,5	1,5	1,5	4	YT	25
4	7,5	1,5	1,5	4	YT	35
5	7,5	0,5	0,5	4	YT	35
6	7,5	0,5	1,5	4	Extrait de plantules	25
7	6,5	0,5	0,5	4	Extrait de racine	25
8	7,5	1,5	0,5	6	Extrait de plantules	25
9	7,5	1,5	0,5	6	YT	25
10	6,5	1,5	1,5	6	Extrait de plantules	35
11	6,5	0,5	1,5	6	YT	25
12	7,5	0,5	1,5	6	Extrait de plantules	35

Le tableau 11 représente les concentrations d'AIA, produit dans le surnageant des cultures liquides, obtenues dans chaque essai réalisé selon le plan d'expérience de Plackett-Burman.

**Tableau 12.** Concentrations d'AIA produit par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15 dans les différentes conditions culturelles étudiées.

Numéro d'essai	Densité Optique	Concentration d'AIA ( $\mu\text{g/ml}$ )
01	0,438	31,29
02	1,205	86,07
03	0,921	65,79
04	0,199	14,21
05	1,181	84,36
06	1,923	137,36
07	0,632	45,14
08	1,193	85,21
09	1,511	107,93
10	0,98	70
11	0,405	28,93
12	0,22	15,71

D'après le tableau ci-dessus, nous constatons que la concentration d'AIA produit varie entre 14,21 et 137,36  $\mu\text{g/ml}$  et ceci en fonction des facteurs étudiés. Cependant, les valeurs maximale sont été obtenues dans l'essai N° 06 suivi par l'essai N°09, alors les valeurs minimales ont été obtenues dans l'essai °04 et N°12.

Selon la matrice d'expériences, dans l'essai N°06 le niveau maximal (+1) a été donné pour tous les facteurs sauf la concentration en L-tryptophane (niveau -1 correspondant à 0,5 mg/ml). Dans l'essai N°09 le niveau maximal a été donné uniquement pour deux facteurs qui sont le pH (7,5) et le milieu de culture (bouillon *YT*).

Par contre, dans l'essai N°04, le niveau maximal (+1) a été donné pour trois facteurs qui sont la durée d'incubation (6 jours), la concentration en L-tryptophane (1,5 mg/ml) et le pH (7,5) du milieu de culture, alors que le niveau minimal a été donné pour les trois autres facteurs à savoir la température d'incubation (25°C), la concentration d'inoculum (0,5 ml) et le milieu de culture (extrait de plantules). Dans l'essai N°12 le niveau minimal a été donné pour tous les facteurs.

L'analyse de la variance réalisée montre que le facteur milieu de culture est le plus déterminant ( $p\text{-value} = 0,028 < 0,05$ ). Selon ce résultat nous pouvons conclure que les différents facteurs étudiés n'ont aucun effet significatif sur la production d'AIA par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15 et que le milieu de culture influence significativement la production de cette molécule.

Excepté le milieu de culture, nos résultats montrent que les différents facteurs étudiés (la température d'incubation, le pH, la concentration en L-Tryptophane, la durée d'incubation et le volume d'inoculum) n'ont aucun effet significatif sur la production d'AIA par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15. Cependant, la production maximale (137  $\mu\text{g/ml}$ ) a été obtenue après 6 jours d'incubation à 35°C, dans l'extrait de plantules de blé, à un pH = 7,5 et additionné de 0,5 mg/ml de L-Tryptophane. Alors que la production maximale (86,07  $\mu\text{g/ml}$ ) d'AIA, sur le bouillon YT, a été obtenue après 6 jours d'incubation, à 35 °C, à un pH = 6,5 et à une concentration de L-Tryptophane de 0,5 mg/ml.

Les résultats obtenus par Nia et Choyeb (2012), montrent que la production maximale d'AIA par la souche *Streptomyces* sp. AP4 était obtenue après 7 jours d'incubation à une température de 30 °C, sur le bouillon YT à pH = 7 et additionné de 5 mg/ml de L-Tryptophane.

En revanche, Goudjal *et al.* (2014) ont noté que la souche *Streptomyces* sp. PT2 peut atteindre un optimum de production d'AIA après 5 jours d'incubation à 30 °C, sur le bouillon YT à pH = 7 et additionné de 5 mg/ml de L-Tryptophane.

D'après nos résultats, l'isolat MB15 a pu donner un optimum de production de la phytohormone AIA à une température de 35 °C. Ces résultats sont contradictoires avec ceux trouvés par Khamna *et al.* (2010) qui précisent un optimum de 25 à 30°C pour la croissance et la production d'AIA par des *Streptomyces* spp.

L'isolat *Saccharothrix* sp. MB15 a donné une production maximale à une concentration en L-Tryptophane de 0,5 mg/ml. En effet, certains auteurs ont constaté que des souches d'actinobactéries du genre *Streptomyces* sont capables de produire l'AIA même en absence de L-Tryptophane (Ahmed *et al.*, 2004 ; Nia et Choyeb, 2012, Goudjal *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que l'isolat MB15 peut atteindre la production maximale d'AIA après 6 jours d'incubation. Cependant, les résultats de Nia et Choyeb (2012) montrent que la production d'AIA commence à partir du premier jour, et que

la concentration maximale a été obtenue après 7 jours d'incubation. En revanche, Goudjal *et al.*, (2014) ont constaté que la souche *Streptomyces* sp. PT2 peut atteindre l'optimum de production après 5 jours d'incubation.

Selon Ahmed *et al.*, (2004), le pH = 7 favorise la croissance de la majorité de *Streptomyces* et par conséquent la production d'AIA. Selon nos résultats, l'isolat MB15 a atteint le maximum de production d'AIA à un pH = 7,5. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Nia et Choyeb (2012), Khamna *et al.* (2010), et par Goudjal *et al.* (2013) qui indiquent que les pH acides ou fortement alcalins sont défavorables pour la synthèse d'AIA. Par contre, un pH neutre à légèrement alcalin est le plus favorable pour la production d'AIA par les souches de *Streptomyces* étudiées.

## Conclusion

L'utilisation des microorganismes bénéfiques présentent un intérêt scientifique et agronomique très important (Aouar, 2012). Ces microorganismes jouent un rôle dans le fonctionnement biologique de la rhizosphère, puisqu'ils sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencer de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (Goodfellow et Williams, 1983).

Les principaux objectifs de notre travail ont porté sur l'étude de quelques mécanismes impliqués dans le biocontrôle et dans l'effet *PGPB* de 10 isolats d'actinobactéries.

La majorité des isolats d'actinobactéries étudiées présentent une activité antifongique et produisent des enzymes lytiques, de l'HCN, des sidérophores, de l'ammoniaque et solubilisent des phosphates inorganiques, et ils sont capables de produire l'AG3 et l'AIA.

Parmi les isolats d'actinobactéries testés, *Saccharothrix* sp. MB15, s'est caractérisé par des résultats très prometteurs pour l'ensemble des tests effectués. La concentration d'AIA produit par ces isolats varie entre 26,85 à 93,64  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , la meilleure production a été enregistrée par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15 (93,64  $\mu\text{g}$  d'AIA / ml). Cet isolat a été alors sélectionné pour un essai d'optimisation de la production d'AIA dans différentes conditions culturales. Ainsi, les résultats montrent une grande variabilité des concentrations d'AIA produits par l'isolat *Saccharothrix* sp. MB15. Cette variabilité a été attribuée au milieu de culture utilisé (extrait de plantules). Cependant les autres facteurs : la température ( $^{\circ}\text{C}$ ), la durée d'incubation (Jours), le pH, la concentration en L-Tryptophane (g/l), le volume d'inoculum (ml). N'ont pas d'effet sur la production d'AIA.

A la lumière des résultats obtenus dans ce modeste travail, nous recommandons fortement la réalisation des essais complémentaires qui sont nécessaires pour obtenir des résultats plus fins et plus précis. Nous suggérons la continuité des expérimentations pour étudier d'autres facteurs pouvant influencer la production d'AIA par l'isolat MB15 qui mérite d'être exploité dans le domaine agronomique comme agent de stimulation de la croissance des plantes.

## Références Bibliographiques

**Abd-Allah, E-F., (2001).** *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. *Folia Microbiologica*, 46: 309-314.

**Ahmed, O-H., Aminuddin H. et Husni M-H-A. (2008).** Ammonia volatilization et ammonium accumulation formurea mixed withzelite and triple superphosphate. *Acta Agric.* 58 : 182-186.

**Antonio, G et Juan, C. (1996).** Les hormones végétales. Pour la science. N° 228. p. 42 – 50.

**Aouar L. (2012).** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Th. Doc. Université de Sétif, --- p.

**Baldacci E. 1962.** Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 4 :633-646.

**Barakate M., Ouhdouch Y.,Oufdou K.H. and Beaulieu C. (2002).** Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and the iranti microbial activities. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, 17, 49–54

**Barriuso J. M. T., Pereya J. A., Lucas Garcia M., Megias F. J., Gutierrez M. et Ramos B. (2005).** Screeninig for putative PGPR to improve establishment of the sympios is La ctarius de liciosus Pinus sp. *Microb. Ecol.*, 50 :82-89.

**Benjamins, R., Malenica, N et Luschnig, C. (2005).** *Bio Essays*. 27, p. 12-46

**Berdy, J., (2005).** Bioactive microbialmetabolites. *Journal of Antibiotics* 58, 1–26

**Bottini, R., Cassan, F., et Piccoli P. (2004).** Gibberellin production by bacteria and yieldincrease. *Appl. Microbiol. Biotecol.*, 65 :497-503.

**Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., and Zhou, S., (2005).** Isolation and characterization of endophytic streptomycetes antagonists of Fusariumpathogenfrom surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.*, 247: 147-152.

**Chafika, K., Sotta, B et Gay, G. (1997).** Hormones fongiques, ectomycorhizes et rhizogénése. *For.fr.xlix.* p. 99 -109.

**Cheng, Y; Dai, X; Y. Zhao (2006).** Auxin biosynthesis is by the YUCCA flavinmonooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis, *GenesDev.* 20, p. 1790–1799.

**Chet, I., 1987.** Trechoderma – application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In : *Innovative Approches to Plante Disease Control*, 31, p.30-36.

**Cohen, J.D., Slovin, J.P et Hendrickson, A.M., (2003).** *TRENDS in Plant Science.* 8, 197 p.

**Compant, S., Clément, C., and Sessitsch, A., (2010).** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants. Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669-678.

**Cunningham, FX et Gantt, E., (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 49, p. 83-557.

**Dobereiner, J., (1997).** Biological nitrogen fixation in the tropics : and economic contributions. *Soil Biochem.* 29 :771-774.

**Donadio, S., Sosio, M., Lancini, G., (2002).** Impact of the first Streptomyces genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl Microbiol biocontrol*, 60(4) :377-80.

**Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose D. et Glick B.R. (2014).** Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 85-125.

**El-Tarabily K. A., Nassar A. H., Hardy G. E. S. J. and Sivasithamparam K. (2009).** Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum* a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J.*

**El-Tarabily, K.A., (2008).** Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *J. Appl. Microbiol.*, 106 :13-26.

**El-Tarabily, K.A., and Sivasithamparam, K., (2006).** Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1–16.

**El-Tarabily, K.A., Soliman ,M.H., Nassar A.H., Al-Hassani H.A.,Sivasithamparam K., McKenna F. and Hardy G.E (2000).**Biological control of Sclerotinia minor using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*, 49, 573–583.

**Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., and Barakate, M. (2007).**Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1503-1509.

**Figueiredo, V.B., Burty, H.A., Martinez C.R. et Chanway C.P. (2008).** Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* 40 :182-188.

**Floyd, M.H., Piper, R.L., and Mertz F.P. (1987).** Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* 2, 235-24

**Getha, K., Vikineswary, S., Wong W. H., Seki T., Ward A. and Goodfellow M. (2005).** Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 24-32

**Goodfellow, M., et Williams S.T.(1983).**Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*, 37 :189-216.

**Goodfellow, M., Simpson, KE . (1987).**Ecology of Streptomycetes. *Front Appl Microbiol* . 2. p. 97–125

**Goudjal, Y., Toumatia, O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F. and Zitouni A. (2013).**Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J. Microb. Biot.*, 29, 1821-1829.

**Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour A., Sabaou N., Mathieu F. and Zitouni A. (2014).**Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol. Res.*, 169, 59-65

**Gray, E.J., et D. L. Smith D. L. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol.biochem.* 37 :395-412.

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

**Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., et Ouhdouch Y. (2008).** Rock phosphate-solubilizing actinomycetes : screening for plant growth-promoting activities. *World J. Microbiol. Biocontrol.*, 24, 2565-2575.

**Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T., and Kunoh, H., (2006).** Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica*, 20, 72–81.

**Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., and Loria, R., (2000).** The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 38, 794–804.

**Hopwood, D.A., (1973).** Genetics of the Actinomycetales. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 2 : 131-53.

**Hopwood, D.A., (2003).** *Streptomyces* genres : from Waksman to Sanger. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30(8) :468-471.

**Hopwood, D.A., Lydiate, D.J., Malpartida F. and Wright H.M. (1985).** Conjugative sex plasmids of *Streptomyces*. 30, 615-634

**Hyang, B.L., Hack, S.J., Lee, H.B., Kim, Y., Choi, G.J., Park, S.H., Kim, C.J. and Jung, H.S. (2005).** Activity of some aminoglycoside antibiotics against *Trichoderma reesei*, *Phytophthora* and *Pythium* species. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 836–843.

**Joo, G. J., (2005).** Purification and characterization of an extra cellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol. Lett.*, 27, 1483-1486.

**Kaneko, M., Itho H., Inukai Y., Sakamoto T., Ueguchi T. M., Ashikari M. et Matsuka M. (2003).** Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants. *Plant J.*, 35, 104-115.

**Kennedy, A. C., (1999).** Bacterial diversity in agroecosystems agriculture. *Ecosyst. Environ.*, 74, 65-76.

**Khamna, S., Yokota, A. et Peberdy, J-F., (2010).** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* spp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsia J. Bio Sci.* p. 23-32.

**Khan, M. A., Shirazi, M. U., Dali Khan, M., Mujtaba, S. M., Islam, E., Mumtaz, S., Shereen, A., Ansari R. U. et Yasin Ashraf M. 2009.** Role of proline, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot.* 41 (2): p. 633-638.

**King, R.R., Lawrence, C.H., and Clark, M.C., (1991).** Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *American Potato Journal*, 68, 675-680

**Kramer, E.M., et Bennett, M.J. (2006).** *TRENDS in Plant Science.* 11, p. 382.

**Le Minor, L. et Veron, M., 1989.** *Bactériologie médicale.* 2<sup>ème</sup> édition. Médecine. Sciences Flammarion.

**Lechevalier, M.P., et Lechevalier, H., (1985).** Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In : *Biology of industrial microorganisms.* The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. p. 315-316.

**Lehman, L.J., Randy, J.M., Caiyao, Y., Denise, M.C., Orjala, J.C., Marrone, P.G., and Santamaria, J.L.J., (2005).** Metabolites from *Streptomyces* strain NRRL accession no. B30145 and mutants thereof for controlling plant diseases. US Patent 6,852,317

**Lemanceau, P., (1991).** Beneficial effects of rhizobacteria on plants : example of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 12 : 413-437.

**Lewis, J.A., (1991).** Formulation and delivery systems of biological control agents with emphasis on fungi. In: Keister, D.L. and Cregan, P.B. eds., *the rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 279–287.

**Loria, R., Kers J. and Joshi M., (2006).** Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 469-487.

**Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. et Kubicek, C.P., (1996).** Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178 : 6382-6385.

**Lumsden, R.D., Lewis, J.A., and Fravel, D.R., (1995).** Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In: Hall, F.R. and Barry, J.W. eds., *Biorational pest control agents*. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 166–182.

**Mahadevan, B., and Crawford, D. L., (1997).** Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microb. Techn.*, 20, 489-493.

**Mariat, F. et Sebald, M., (1990).** Les actinomycètes. Dans : *Bactériologie médicale*. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.

**Mazzola, M., (2002).** Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 557–564.

**McKenna, F., El-Tarabily, K.A., Petrie, S., Chen, C. and Dell, B. (2002).** Application of actinomycetes to soil to meliorate water repellency. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 107–112.

**Mok, D.W et Mok, M.C., (2001).** Cytokinin metabolism and action. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* vol. 52, p. 89-118.

**Nia, M., et Chouyeb, S., (2012).** Actinomycètes endophytes et hormone de croissance végétale acide indol-3-acétique : production, partielle purification et promotion de la croissance des plantules de tomate. *Mém. Mas. Dépt. Agron. Faculté des sciences, Univ. Amar Thlidji, Laghouat*. 70p.

**Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y Kuwahara, A., Kamiya, Y et Yamaguchi, S. (2003).**Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell*.15. p. 1591-604.

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

**Patten, C.L., et Glick, B.R., (2002).** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3795-3801.

**Peng, J., et Harberd, N. P., (2002).** The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 376-381.

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

**Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg C., Alabouvette, C., and Moënne-Loccoz Y., (2009).**The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321, 341-361.

**Raven, P.H., Evert, R.F et Eichhorn, S.E., (1992).** *Biology of Plants*, 6ème éd. DeBoeck. Reponen, T. A., Gazonko, S. V., Grinshpun, S. A., Willeke, K. et Cole, E. C. (1998). Characteristics of Airborne Actinomycete Spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p.3807-3812.

**Rodriguez, H., et Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv.*, 17, 319-339.

**Ruanpanun, P., Tangchitsomkid, N., Hyde, K.D., et Lumyong, S., (2010).** Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils : screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 1569-1578.

**Sabaratham, S., and Traquair, J.A., (2002).** Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23, 245-253

**Sahin, F., Cakmakci, R., et Kantar, F., (2004).** Sugarbeet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plan Soil*, 265 :123-129.

**Sanglier, J.J., and Trujiollo, M., (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 12(13), 269-276.

**Schroth, M. N., et Hancock, J.G., (1981).** A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J GenMicrobiol*, 127(2) :237-259.

**Shi, Y., Lou, K., et Li, C., (2009).** Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugarbeet. *BiolFert.Soils*, 45,645-653.

**Siddiqui, Z. A., et Mohamed I. (1999).** *Bioresource. Technology*, 69 :167-179.

**Solans, M., Vobis, G., Cassan, F., Luna, V., et Wall, L.G., (2011).** Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycete isolates from the actinorhizal plant *Ochtophilatrinervis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 2195-2202.

**Timmusk, S., et Wagener, E.G.H., (1999).** The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression : a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant. Microbe In.* 12, 951-959.

**Ting, A.S.Y., Meon S., Kadir, J., Radu, S., et Singh, G., (2008).** Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *Biocontrol*, 53,541-553.

**Toumatia, O., (2015).** Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé

**Vetura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., et Van Sinderen, D., (2007).** Genomics of Actinobacteria : tracing the evolutionary history of ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(3): 495-548.

**Yekkour, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Errakhi, R., Mathieu, F., and Lebrihi, A., (2012).** Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 55, 427-435.

**Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2005).** *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology.*, 156: 984-993.

**عنوان المذكرة : : دراسة قدرة الاكتينوباكتريريا الضمنية على إنتاج بعض الهرمونات النباتية.**  
المؤطر: زعموم ميادة الاسم: كعبوش اللقب: أحلام

**ملخص:**

يهدف هذا العمل إلى دراسة الآليات التي ينطوي عليها تأثير المكافحة الحيوية لبعض سلالات بكتيريا البكتيريا العصبية وريزوسفيرية. وأظهرت معظم سلالات الأكتين البكتيريا نتائج إيجابية لهذه الآليات ، وعرضت نشاطاً مضاداً ضد الفطريات الممرضة ، والقدرة على إنتاج الإنزيمات الليفية ، و HCN ، و siderophores ، والأمونيا المطلقة ، والفوسفات غير العضوي غير المذاب ، وإنتاج حمض الجيرليليك وحمض الأندول 3-أسيتيك (IAA).

. تم اختيار العزلة MB15 *Saccharothrix sp* الأكثر فعالية ، لتسليط الضوء على الظروف الزراعية لتحسين إنتاج IAA. تم اختيار ستة عوامل مثل درجة الحرارة ، فترة الحضانة ، درجة الحموضة ، تركيز L-tryptophan ، حجم اللقاح و وسط الاستزراع (YT أو مستخلص الشتلات). كان أعلى مستوى لإنتاج IAA 137.36 ميكروغرام dIAA / مل ، وعامل المزارع هو الوحيد الذي يؤثر على إنتاج AIA بواسطة سلالة MB15. تم تأكيد IAA المنتجة بواسطة تحليل كروماتوغرافي طبقة رقيقة (TLC).

النتائج التي تم الحصول عليها في دراستنا تفتح لنا آفاقاً واعدة للتطبيق المحتمل لـ MB15 *Saccharothrix sp* Strain الأسمدة. الكلمات المفتاحية: أكتينوبكتيريا. تأثير PGPB ، Saccharothrix sp. MB15 ، وحمض الأندول 3-أسيتيك

**Memory title: Study of the potential of actinobacteria to produce some plant hormones**

**Name: Ahllem**

**First name: KAABOUCHE**

**Directed by: Zaaoum Miyada**

**Abstract:** This work aimed to investigate the mechanisms involved in the biocontrol of some endophytic and rhizospheric actinobacteria strains. Most of actinobacterial strains showed positive results for these mechanisms, they exhibited antifungal activity against phytopathogenic fungi, ability to produce lytic enzymes, HCN, siderophores, released ammonia, solubilized inorganic phosphates and produce gibberellic acid and indol-3-acetic acid (IAA).

The most efficient isolate, *Saccharothrix sp*. MB15 has been selected to highlighting the cultural conditions for optimisation IAA production. Six factors were chosen such as temperature, incubation period, pH, L-tryptophan concentration, the volume of inoculum and culture medium (YT or seedling extract). The highest level of IAA production was 137.36 µg d'IAA /ml and the culture medium factor is the only one that impacts AIA production by MB15 strain. The IAA produced was confirmed by thin layer chromatography (TLC) analysis.

Results obtained in our study open up promising perspectives for the possible application of Strain *Saccharothrix sp*. MB15 us biofertilizers.

**Keywords:** Actinobacteria, *Saccharothrix sp*. MB15, PGPB effect, Indol-3-acetic, Optimization.

**Titre du mémoire : Mise en évidence de la production des phytohormones par des actinobactéries endophytes.**

**Nom: Ahllem**

**Prénom: KAABOUCHE**

**Encadreur: Zaaoum Miyada**

**Résumé**

Le présent travail a pour objectif d'étudier les mécanismes impliqués dans le biocontrôle de certains isolats d'actinobactéries endophytes et rhizosphérique. La majorité des isolats testés ont montré des résultats positifs, ils présentent une activité antifongique vis-à-vis des champignons phytopathogènes, ils sont capables de produire des enzymes lytiques, de l'HCN, des sidérophores, de libérer l'ammoniaque, de solubiliser les phosphates inorganiques et de produire les gibbérellines (AG3) et l'acide indole-3-acétique (AIA).

L'isolat le plus performant, *Saccharothrix sp*. MB15, a été sélectionné pour étudier les conditions culturelles permettant d'optimiser la production d'AIA. Six facteurs ont été choisis à savoir la température (°C), la durée d'incubation (Jours), le pH, la concentration en L-Tryptophane (g/l), le volume d'inoculum (ml) et le milieu de culture (YT ou extrait de plantules). L'analyse des résultats a montré que l'isolat MB15 a atteint une production maximale de 137,36 µg d'AIA / ml et que le facteur milieu de culture est le seul qui influence la production d'AIA par l'isolat MB15. L'identification des groupements indole produits par l'isolat MB15 a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM), les résultats montrent que l'AIA est le seul indole présent dans le milieu.

À l'issue des résultats obtenus dans ce travail, l'isolat *Saccharothrix sp*. MB15 s'est caractérisé par une prometteuse possibilité d'utilisation comme biofertilisant.

**Mots clé :** Actinobactéries, *Saccharothrix sp*. MB15, effet PGPB, acide indole-3-acétique, optimisation.

