



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



Université Amar Telidji- Laghouat

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : KAMRI Dehiba

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

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : PROTECTION DES VEGETAUX ET L'ENVIRONNEMENT

Thème

Effet de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la
bioremédiation d'un sol pollué par le cuivre

Soutenue le 26 Septembre 2017

Jury :

HOUYOU Zohra (MCB)

Président

MOUKHTAR Rahmani M (MAA)

Examineur

AMEUR Djamila (MAA)

Rapporteuse



الجمهورية الديمقراطية الشعبية الجزائرية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عمار ثليجي

كلية العلوم

قسم : العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

من اعداد: قمرى ذهيبه

الميدان : علوم الطبيعة و الحياة

قسم : العلوم الفلاحية

التخصص : حماية النباتات و البيئة

الموضوع

تأثير البسودوموناس *spp.fluorescents* في المعالجة البيولوجية للتربة
الملوثة بالنحاس

أعضاء لجنة المناقشة:

حويو زهيرة	أستاذ محاضر 'ب'	رئيس
مختار رحمانى	أستاذ مساعد 'أ'	مناقش
عامر جميلة	أستاذ مساعد 'أ'	مقرر

دفعة 26 سبتمبر 2017

Dédicaces

Avant tout je remercie mon DIEU le tout puissant qui m'a donné la tenacité pour achever ce travail.

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, mon père (الله براهيمه), et ma mère qui m'a encouragé, et toujours soutenu ; en m'inculquant le sens de la responsabilité.

Mes frères et mes sœurs

Et les petits :

Malak, Djouri, Rime et Ahmed

Mon fiancée Elkihal Bachir

Mes très chères amies : Naziha, Rahma, Hanane

Et tous mes amies de la spécialité de protection des végétaux et d'environnement

A tous mes enseignants et surtout Mlle. Ameer Djamila qui m'a toujours aidée.

Enfin, je dédie ce travail à ma famille et à tous ceux qui me connaissent de près ou de loin

Dehiba
Dehiba

Remerciements

*Tout d'abord, grâce à **AL WAHID** qui m'a créée, m'a protégée, qui est toujours avec moi et qui ne me laisse jamais seule. Louanges à **ALLAH**.*

Je remercie, en particulière ma promotrice Mlle ; Ameer Djamila, je la remercie pour les conseils, et l'encadrement.

Je remercie tous les enseignants qui ont contribué à notre formation

Je les remercie, toutes les personnes qui, à un moment ou un autre, se sont intéressées à notre travail universitaire.

Un grand merci à toute l'équipe de laboratoire de biologie, et agronomie et surtout : Zahra, Fatima et Halima.

Enfin, je remercie ma famille pour leur présence et leurs encouragements et surtout ma très chère mère qui est toujours été là pour moi et m'est toujours soutenu, je vous aime fort.

Kamri dehiba

Effet de *Pseudomonas spp.* fluorescents dans la bioremédiation d'un sol pollué par le cuivre

Résumé

L'objectif de notre travail était d'étudier la technique de la bioremédiation des sols cultivées qui pollués par les métaux lourds (cas du cuivre) ont été effectuées par des bactéries *Pseudomonas spp.* fluorescents. Nous avons utilisé deux souches bactériennes appartenant aux *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophyte utilisés dans ce travail ont été isolées à partir des plantes spontanées (Wilaya de Laghouat). Ces souches ont subi une régénération et une conformation de la pureté sur milieu King B

Nous avons recherché les mécanismes d'action de *Pseudomonas spp.* fluorescents (production des sidérophores et l'acide indole- 3- acétique, solubilisation des phosphates, fixation d'azote). Après nous avons réalisé des essais de la bioremédiation du sol et la biostimulation des plants de blé dans un sol contaminée par le cuivre avec une dose de **200ppm** par deux souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents (**P01** et **AZ4**). Nos résultats par ces dernières ont une tolérance au cuivre de **200** et **400 mg/l** respectivement, et sont viables dans les substrats utilisés, et selon les divers mécanismes d'action phytostimulation (production de l'AIA), de biofertilisation (solubilisation des phosphates) et production de sidérophores de *Pseudomonas spp.* fluorescents, nous avons résulté que nos souches testés (**P01** et **AZ4**) ont la capacité de produire l'AIA à un taux de 27.43 µg/ml dans la souche (**AZ4**) et un taux de 19.78 µg/ml dans la souche (**P01**), et capable de solubiliser le phosphate $Ca_3(P_04)_2$ et ont la capacité de produire les sidérophores, fixé l'azote de l'air. D'après l'analyse de la variance aucun effet significatif n'a été enregistré pour l'ensemble des paramètres de croissance (longueur des racines et des tiges, poids frais et sec des racines et des tiges) et les paramètres physiologiques (la teneur en chlorophylle, la teneur en proline et la teneur en sucre).

Pour faire suite à cette étude : refaire l'essai *in vivo* pour la tolérance au cuivre avec plusieurs doses, il peut faire des essais pour quantifier la mobilisation de cuivre et des essais pour confirmer la colonisation des racines par la bactérie *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Mots clés : *Pseudomonas spp. fluorescents*, cuivre, bioremédiation, mécanismes d'action, chlorophylle, proline, sucre.

تأثير البسودوموناس *spp. fluorescents* في المعالجة البيولوجية للتربة الملوثة بالنحاس

الملخص

الهدف من عملنا دراسة تقنية المعالجة الحيوية للتربة المزروعة الملوثة بالمعادن الثقيلة (حالة النحاس) بواسطة بكتيريا بسودوموناس *spp. fluorescent*. استخدمنا سلالتين بكتيليتين تعودان إلى بسودوموناس *spp. fluorescent* المستخدمة في هذا العمل تم عزلهما من النباتات العفوية (ولاية الأغواط). تم تحديد هذه السلالات وتشكل من النقاء في الوسط King B قمنا بالتحقيق في آليات عمل بسودوموناس *spp. fluorescents* (إنتاج سيديروفوريس وحمض الإندول 3-أسيتيك، سولوليزاتيون من الفوسفات، تثبيت النيتروجين). بعد ذلك، أجرينا اختبارات معالجة بيولوجية للتربة و محاكاة بيولوجية لنباتات القمح في التربة الملوثة بالنحاس بجرعة 200 جزء في المليون من سلالتين من بسودوموناس (P01 و AZ4). نتائجننا من قبل هذه الأخيرة لديها تسامح مع النحاس من 200 و 400 ملغم / لتر على التوالي، وقابلة للحياة في الركائز المستخدمة، وفقا لمختلف آليات العمل التنشيط الحيوي (إنتاج I'AI)

التسميد الحيوي (إذابة الفوسفات) وإنتاج سيديروفوريس من بسودوموناس *spp. fluorescents*، قد أثبتت على أن سلالاتنا المختبرة (P01 و AZ4) لديها القدرة على إنتاج I'AIA بمعدل 27.43 ميكروغرام / مل في سلالة (AZ4) ونسبة 19.78 ميكروغرام / مل في سلالة (P01)، وقادرة على ذوبان الفوسفات 2 (P04) Ca3 ولديها القدرة على إنتاج سيديروفوريس والهواء النيتروجين الثابتة. واستنادا إلى تحليل التباين، لم تسجل أي آثار لجميع معاملات النمو (الجذر وطول الجذع، الوزن الطري والجفاف للجذور والسيقان) والمعاملات الفسيولوجية (كمية الكلوروفيل، ومحتوى البرولين ومحتوى السكر).

من اجل متابعة هذه الدراسة: كررنا التجارب مخبريا من اجل اختبار التسامح مع النحاس مع عدة جرعات، فإنه يمكن إجراء اختبارات لقياس التعبئة الحركية لنحاس والاختبارات لتأكيد استعمار الجذر من قبل البكتيريا بسودوموناس *spp. fluorescent*

الكلمات المفتاحية:

بسودوموناس *spp. fluorescents*، النحاس، المعالجة الحيوية، آليات العمل، الكلوروفيل، البرولين، السكر.

Kamri dehiba

Effect of *Pseudomonas spp. fluorescents* in the bioremediation of a soil polluted by copper

Abstract

The objective of our work is to study the bioremediation technique of cultivated soils polluted with heavy metals (copper case) that was performed by *Pseudomonas* bacteria *spp. fluorescent*. We used two bacterial strains belong to *Pseudomonas spp.* saprophyte fluorescent that is used, in this work we are isolated from spontaneous plants (Laghoutat Province). These strains are regeneration and conformation of the purity on King B environment.

We've researched for the mechanisms action of *Pseudomonas spp. fluorescent* (producing siderophores and indole acid -3- acetic, phosphate solubilizing, nitrogen fixation). After we did bioremediation tests of soil and biostimulation of wheat plants in contaminated soil with copper (a dose of **200ppm**) by two strains of *Pseudomonas spp fluorescent* (**P01** and **AZ4**). We got from the last that copper tolerance of **200** and **400 mg / l** respectively, and they are viable in the used substrates, and according to the various action mechanisms phytostimulation (production of AA), biofertilization (solubilization phosphates) and production of *Pseudomonas* siderophores *spp. f* luorescents we are concluded that our tested strains (**P01** and **AZ4**) have the ability to produce the AIA at a rate of 27.43µg / ml in the strain (**AZ4**) and a rate of 19.78µg / ml in the strain (**P01**), and capable of solubilized phosphate Ca₃ (P04) 2 and have the ability to produce siderophores, fixed nitrogen of the air. According to the variance analysis there is no significant effect recorded for all growth parameters (length of roots and stems, fresh and dry weight of roots and stems) and physiological parameters (the content in chlorophyll, the proline content and the sugar content).

To accomplish this study: Repeat the *in vivo* test for tolerance to copper with several doses, it may make tests to quantify mobilization of copper and tests to confirm the root colonization with the bacterium *Pseudomonas spp. fluorescent*.

Keywords : *Pseudomonas spp. fluorescent*, copper, bioremédiation, mediation mechanisms of action, chlorophyll, proline, sugar

Liste De tableaux

Liste des tableaux

N°	Titre Tableau	Page
Tableau 01	Teneurs des sols et des plantes en certains éléments. (En mg/kg de poids sec) (Pierre, 2010)	17
Tableau 02	Origine des souches bactériennes	24
Tableau 03	Résultats de production d'acide indole acétique en µg/ml.	37
Tableau 04	Résultats de solubilisation de phosphate en mm.	38
Tableau 05	Résultat du teste de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)	40

Liste Des figures

Listes des figures		
N°	Titre figures	page
Figure 01	Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau <i>et al.</i> 2006).	12
Figure 02	Origine des métaux lourds dans le sol (D'après Robert et Juste, 1999)	18
Figure 03	Schéma représentant la méthode de la tolérance au cuivre (CMI).	26
Figure 04	Dispositif expérimental en BAC de l'essai de phytostimulation de la croissance végétale.	28
Figure 05	Détermination de la teneur en chlorophylle	31
Figure 06	Détermination de la teneur en proline	32
Figure 07	Schéma représentant l'extraction et de dosages des sucres solubles.	33
Figure 08	Régénération des souches chez la souche (AZ4).	34
Figure 09	Fixation d'azote chez la souche (P01)	35
Figure 10	Production des sidérophores dans le milieu KB avec Fe ⁺³ et sans Fe ⁺³ chez la souche (AZ4).	36
Figure 11	Production de l'AIA chez les souches(P01) et(AZ4).	38
Figure 12	Solubilisation des phosphates chez les souches (P01) et(AZ4).	39
Figure 13	La Concentration minimale inhibitrice (CMI) chez la Bactérie (AZ4).	40
Figure 14	Effets de facteur substrat sur la longueur racinaire (mm).	42
Figure 15	Effets de facteur bactérie sur la longueur racinaire (mm).	43
Figure 16	Effets de facteur substrat sur la hauteur des tiges (mm).	43
Figure 17	Effets de facteur bactérie sur la hauteur des tiges (mm).	44
Figure 18	Effets de facteur substrat sur le poids frais et sec des racines (g).	44
Figure 19	Effets de facteur bactérie sur le poids frais et sec des racines (g).	45
Figure 20	Effets de facteur substrat sur le poids frais et sec des tiges (g).	45
Figure 21	Effets de facteur bactérie sur le poids frais et sec des tiges (g).	46
Figure 22	Effets de facteur substrat sur le dosage de la chlorophylle en mg/ l.	47
Figure 23	Effets du facteur bactérie sur le dosage de la chlorophylle en mg/ l.	47
Figure 24	Effets de facteur substrat sur le teneur du proline en µg/g.	48
Figure 25	Effets de facteur souche sur le teneur de la proline en µg/g.	48
Figure 26	Effets de facteur substrat sur la teneur du sucre dans les feuilles µg/g.	49
Figure 27	Effets de facteur souche sur la teneur du sucre dans les feuilles µg/g	49

Liste des abréviations

Liste des abréviations

µg	Micro gramme
ACC	1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate.
AIA	acide indole-3-acétique
ANOVA	analyse of variance.
BAC	blocs aléatoires complets
Ca ₃ (P ₀₄) ₂	carbonate de Calcium
Chlo a	Chlorophylle a.
Chlo b	Chlorophylle b.
Chlo(a+b)	Chlorophylle totale.
CMI	concentration minimale inhibitrice
DO	Densité Optique.
ED	eau distillée
EDTA	Acide Éthylène Diamine Tétra Acétique
Fe ³⁺	d'oxydes de fer.
FPGN	fond pédo-géochimique naturel
KB	milieu B de King.
Kg ha ⁻¹	Kilogramme/hictar-1
MS	Matière sèche
N	Normalité
N ₂	Azote
NBRIP	Milieu de National Botannical Research Instituts phosphate

Nm	nanomètre.
PGPR	Plant <i>growth promoting rhi zobacteria</i>
Ppm	parties par million (équivalent à du mg/L).
PVD	Pyoverdine
PVDs	Pyoverdines
PVK	Milieu de Pikovskaya
RSI	Résistance systémique induite.
Spp	plusieurs espèces.
UFC /ml	Unité Formant Colonie / ml.

Table

Des matières

Table des matières

Résumé.....	I.
ملخص.....	II.
Abstract.....	III.
Dédicace.....	IV.
Remerciements.....	V.
Liste des tableaux.....	VI.
Liste des figures.....	VII.
Liste des abréviations.....	VIII.
Introduction générale.....	01
Synthèse bibliographique	
I. Généralité sur blé dur.....	03
I.1. Importance de la culture de blé dur.....	03
I.2. Origine.....	04
I.2. 1. Origine géographique.....	04
I.2. 2. Origine génétique.....	04
I.3. Classification botanique.....	04
I.4. Description morphologique de la plante.....	05
I.4. 1. Le système racinaire.....	05
I.4.2. Le système aérien.....	05
I.6. Cycle végétatif de blé dur.....	05
I.6. 1. Les stades et phases repérés.....	06
I.6 .1 . 1. germination-levée.....	06
I.6 .1 .2 . Tallage.....	06
I.6 .1 . 3. Montaison-gonflement.....	07
I.6 .1 . 4. Épiaison-floraison.....	07
II. Généralité sur le substrat	08
II.1. Le sol	08
II.2. La rhizosphère	08
II. 3. Les micro-organismes de la rhizosphère	08
II.3.1. Les champignons	09
II.3.2. Les bactéries	10
II.3.2.1. Généralité sur <i>Pseudomonas</i>	10

III. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes	10
III.1. Effets directs	12
III.1.1. Fixation d'azote	12
III.1.2. Solubilisation des phosphates.....	12
III.1.3. Production des sidérophores	13
III.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale	13
III.1.4.1. Production d'acide indole -3-acétique (AIA).....	13
III.1.4.2. Production d'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique	14
désaminase (ACC- désaminase)	14
III.2. Effet indirect	15
III.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments	15
III.2.2. Antibiose	15
III.2.3. La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic	16
Resistance)	16
III. 2.4. La bioremédiation	16
IV. Généralité sur métaux lourds	17
IV.1. Définition des métaux lourds	17
IV.2. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds	18
IV.3. Pollution par le cuivre	18
IV.4. Effets du cuivre sur la plante	18
IV.5. Dépollution des sols pollués par le cuivre	20
5 .5.1. Les différentes techniques de dépollution des sols	21
a. Les techniques physico-chimiques	21
b. Utilisation des organismes vivants pour la remédiation	22
Matériel et méthodes	
I. Les souches bactériennes	24
II. Mécanismes d'action des Pseudomonas spp. fluorescents	24
II.1. Fixation de l'azote.....	24
II.2. Production de sidérophores	24
II.3. Production d'acide indole acétique (AIA).....	25
II.4. Test de solubilisation des phosphates.....	25
III. Test de tolérance au cuivre.....	25
IV. Essais de bioremédiation du sol et biostimulation de la croissance des plantes	27

IV.1. Préparation du substrat	27
IV.2. L'inoculum bactérien	27
IV.3. Matériel végétal	27
IV.4. Dispositif expérimental	27
V. Test de viabilité	28
VI. Paramètres étudiés	29
VI.1. Paramètre de croissance	30
VI.1.1. Mensuration sur les racines	30
VI.1.2. Mensuration sur les tiges	30
VI.2. Paramètres physiologiques	30
VI.2.1. Extraction et dosage de La chlorophylle	30
VI.2.2. Extraction et dosage de la proline	31
VI.2.3. Extraction et dosage des sucres solubles	32
VII. Analyse statistique.....	33

Résultats et discussion

I. Régénération des souches	34
II. Mécanismes d'action des Pseudomonas spp.fluorescents.....	34
II. 1.Fixation d'azote.....	34
II.2. Production des sidérophores	35
II.3. Production d'acide indole acétique.....	36
II.4. Solubilisation des phosphates.....	38
III. La tolérance au cuivre.....	40
IV. Essai de bioremédiation de sol et biostimulation de la croissance végétale.....	41
IV.1. Test de viabilité	41
IV.2. Paramètre de croissance	42
IV.2.1. Longueur racinaire.....	42
IV.2.2. Hauteur des tiges.....	43
IV.2.3. Poids frais et sec des racines	44
IV.2.4. Poids frais et sec des tiges	45
IV.3. Paramètre physiologique	46
IV.2.1. La teneur de la chlorophylle	46
IV.2.2. La teneur en proline des feuilles et des racines des plantes de blé.....	48

IV.2. La teneur des sucres solubles dans les feuilles.....	49
IV.3. Discussion.....	50
Conclusion	53
Références bibliographiques	54
Annexes	72

Introduction

Introduction

La culture des céréales a permis l'essor des grandes civilisations, car elle a constitué l'une des premières activités agricoles. En effet, Il ya plus de trois millions d'années, l'homme préhistorique était nomade, pratiquait la chasse et la cueillette des fruits pour assurer sa nourriture. Le nomadisme a progressivement laissé la place à la sédentarité qui permit la culture des céréales. Le blé est l'une de ces céréales connue depuis l'antiquité (Ruel, 2006). Sa culture remontée au mésolithique vers 7000 avant Jésus-Christ (Anonyme1, 1981; Ruel, 2006). Le blé dur provient des territoires de la Turquie, de la Syrie, de l'Iraq et de l'Iran (Feldman 2001).

En Algérie, la superficie réservée à la céréaliculture est de 3,3 millions d'hectares qui représentent 90% des terres cultivées. Si on se réfère aux chiffres de 1929, on constate que cette superficie n'a pas évolué. 40% de cette surface sont destinés à la production du blé dur. Ces rendements, restent très bas puisqu'ils ne tournent qu'autour de 10 à 15Qx/ha, malgré les efforts fournis pour répondre aux besoins alimentaires de la population qui est toujours croissante. Cette faible production est souvent expliquée par l'influence des mauvaises conditions pédoclimatiques associées, notamment à : la désertification, l'érosion, la pollution, les mauvaises pratiques agricoles et la salinisation des sols (Selmi, 2000).

Le problème des sols contaminés est aujourd'hui très préoccupant pour les pays émergents. Les métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc, et le mercure ne peuvent pas être biodégradés et donc persistent dans l'environnement pendant de longues périodes. De plus ils sont continuellement rajoutés dans les sols par diverses activités : en agriculture par l'application de boues d'épuration ou dans l'industrie métallurgique.

L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement peut se répercuter sur la santé des êtres humains et des animaux (Wang *et al.*, 2003).Et aussi des effets néfastes sur les populations bactériennes, ce qui n'est pas sans conséquence sur le fonctionnement de l'écosystème. Le développement de techniques efficaces pour décontaminer les sites pollués est devenu indispensable (Rufus *et al.*, 1997, Salt *et al.*, 1998, Prabha *et al.*, 2007).

Les sols peuvent être soumis à des traitements chimiques, physiques ou biologiques. Ces derniers utilisent l'action de microorganismes ou de végétaux pour dépolluer les sols. Il s'agit donc de la bioremédiation. Jugée rentable et efficace contre l'élimination de composés

pétroliers et notamment des hydrocarbures, la bioremédiation est de plus en plus utilisée (Tarayre 2012 ; Mi Jin et al., 2013).

En effet, les travaux de l'équipe « Dépollution Biologique des Sols » de Colmar ont montré que l'addition de bactéries productrices de sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas fluorescens*, augmentait l'extraction de chrome par des plants de maïs (Braud et al., 2009).

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes.

Certaines espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet promoteur sur la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les MHB et les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes (Dubuis *et al.*, 2007).

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour objectif les effets bénéfiques des *Pseudomonas spp.* fluorescents sur la croissance du blé dur (*Triticum durum*) et la bioremédiation du sol pollué par le cuivre.

Notre travail a été réalisé en deux principales parties, le premier consiste à l'étude des mécanismes d'action des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents testés.

Pour la deuxième partie, nous avons réalisé un essai de biostimulation de la croissance du blé dans un sol pollué par le cuivre à une dose de 200ppm.

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur blé dur

I.1. Importance de la culture de blé dur

Quoique le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), le maïs (*Zea mays* L) et le riz (*Oryza sativa* L.) soient les céréales les plus produites à travers le monde, il n'en demeure pas moins que le blé dur (*Triticum durum* Desf.) occupe une place importante dans certaines régions du monde, notamment les zones semi-arides dont le climat est de type méditerranéen (Pena et Pfeiffer., 2005). Le blé dur occupe 8 à 10% du total des terres réservées aux blés durs et tendres, dans le monde. La superficie moyenne consacrée annuellement à la culture du blé dur est estimée à 8 millions d'hectares, pour une production annuelle moyenne de 37.9 millions de tonnes, moyennes de la période 2006- 2010 (Ice., 2011). La culture du blé dur est concentrée au Moyen-Orient, en Afrique du Nord, en Russie, aux Dakotas, au Canada, l'Inde et l'Europe méditerranéenne. Avec une production de 9.00 millions de tonnes par an, moyenne de la période 2006-2010, l'Union européenne est le plus grand producteur de blé dur. Le Canada arrive au deuxième rang avec 4.8 millions de tonnes par an, suivi de la Turquie et des États-Unis, avec 1.99 et 2.67 millions de tonnes métriques respectivement. Ces quatre pays fournissent à eux seuls les deux tiers de la production mondiale (Ice., 2011).

En Algérie la céréaliculture constitue la principale activité, notamment dans les zones arides et semi-arides. Les terres annuellement emblavées représentent 3,6 millions d'hectares. Le blé dur est une ancienne culture dont l'origine remonte à la venue des Arabes (Ducellier, 1931). La superficie occupée par le blé dur est, en moyenne, de 1.3 millions d'hectares, durant la période 2000-2010 (Madr., 2011). L'importance des superficies occupées par cette espèce, comparativement à la superficie occupée par l'orge, est influencée par le prix à la production garanti par l'état. Ces prix sont de 4500 ; 3500 et 2500 DA respectivement pour le blé dur, le blé tendre et l'orge. Selon Hakimi (1993), l'orge et le blé dur assuraient le gros des besoins alimentaires des habitants et de leur cheptel, au cours de la période coloniale et bien avant cette dernière. Depuis l'indépendance, une forte demande alimentaire se faisait sentir sur le blé dur et le blé tendre, alors que l'orge prenait une destination fourragère (Hakimi., 1993).

La production du blé dur, comme celle du blé tendre, est très fluctuante. Pour la période 2000 -2010, la production de blé dur a varié de 9 à 23 millions de quintaux (Madr, 2011).

I.2. Origine

I.2. 1. Origine géographique

Le croissant fertile du Moyen-Orient abrite le centre d'origine, notamment des blés, orges, seigles, lentilles, fèves, poischiches (De la perrière 2014).

Le blé (*Triticum* sp) est originaire de montagne de Syrie, de Jordanie, de Turquie, et de sud de Russie. (Bacon et al, 2013). Toutefois, l'Algérie a été considérée comme centre de diversification secondaire de blé dur (Errox, 1974). L'espèce durum se subdivise en trois sous espèces qui sont Europeum, syriacum et méditerranéum (Grigniac, 1977).

I.2. 2. Origine génétique

Le blé dur est un hybride naturel de deux espèces de graminées (Nabors, 2009). Si l'on en croit les cytogénéticiens, il admet trois espèces ancêtres : *T. monococcum*, *T. searsii* et *T. tauschii*. Le premier a dû être cultivé dans l'antiquité ; les deux autres sont seulement spontanés. Tous trois ont sept chromosomes haploïdes ($2n=14$) et tous les trois forment facilement des hybrides entre eux, toutefois, ces hybrides ; qui ont bien 14 chromosomes ; sont stériles car les chromosomes ne s'apparient pas à la méiose, ce qui a fait désigner chacun des trois groupes de sept chromosomes par des lettres différentes ; A, B et D. (Pesson et Louveaux, 1984).

I.3. Classification botanique

Le blé est une monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des Graminées. Selon Odenbach et al, (1985) ; in Kellou, (2003), le blé appartient à la tribu des Triticeae qui se compose de 18 genres qui sont subdivisés en deux sous-groupes, Triticinae et Hordeinae. Les principaux genres dans le sous-groupe Triticinae sont *Triticum*, *Aegilops*, *Secale*, *Agropyron* et *Hynaldia*. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) (Feillet, 2000). Selon Naville, (2005) ; Cook et al, (1991) ; Le Clech, (2000) et Feillet, (2000), la taxonomie de blé dur est établie comme suit :

- Classe : Angiospermes
- Ordre : Monocotylédones

- Famille : Poacées (Gramineae)
- Tribu : Hordées
- Genre : *Triticum*
- Espèce : *Triticum durum* Desf
- Nom commun : Blé dur

I.4. Description morphologique de la plante

I.4.1. Le système racinaire

Le blé dur est une plante annuelle et autogame, constitué d'un appareil végétatif herbacé qui comprend un système racinaire formé de racines séminales produites par la plantule durant la levée et des racines adventives qui se forment plus tard à partir des nœuds à la base de la plante constituant ainsi le système racinaire permanent (Acia, 2006).

I.4.2. Le système aérien

Le blé dur possède une tige cylindrique, dressée, habituellement creuse et subdivisée en entrenœuds. Certaines variétés possèdent toutefois des tiges pleines (Clark et Coll., 2002).

La tige principale appelée le maître brin et des tiges secondaires appelées tallent qui naissent à la base de la plante (Gate, 1995). La pousse principale produit environ sept feuilles et un peu moins de talles (Nabors, 2009). Lorsque le développement de la tige est terminé, l'épi apparaît enveloppé dans la dernière feuille (c'est l'épiaison).

Les feuilles sont à nervures parallèles et formées en deux parties : la partie inférieure entourant la jeune pousse ou la tige (la gaine) et la partie supérieure en forme de lame (le limbe) (Belaid, 1996). Les feuilles portent à leur jonction avec la gaine des oreillettes vêtues et une ligule (Moule, 1971).

L'inflorescence est un épi composé d'un rachis sur lequel sont insérés les épillets. Chaque épillet est une petite grappe d'une à cinq fleurs dont trois à quatre sont fertiles enveloppées chacune par deux glumelles (supérieure et inférieure) et comportant typiquement trois étamines et un ovaire à un seul carpelle (Boulal et al, 2007).

Le fruit est un caryopse nu ou fruit sec indéhiscents dont les parois sont soudées à celles de la graine (Kent et Evers, 1994 ; Soltner, 2005).

I.6. Cycle végétatif de blé dur

Selon Mazouz, (2006), plusieurs auteurs ont décrit le cycle de développement du blé, en le décomposant en deux périodes : une période reproductrice. D'autres considèrent que la maturation constitue une troisième période. Les modifications morphologiques résultent à la fois de processus de croissance et de processus de développement.

Ces deux processus sont complémentaires. Ils aboutissent à la production de matière sèche, résultant de la transformation de ressources du milieu par l'intermédiaire de capteurs aériens (feuilles : surfaces photo-synthétisantes) et capteurs souterrains (racines : capteurs et d'éléments minéraux).

La croissance consiste en une augmentation irréversible des dimensions et du poids des différents organes constitutifs de la plante. C'est une notion quantitative. Le développement consiste en l'apparition d'organes ou le franchissement par la plante d'une étape différente mais complémentaire de la précédente. C'est une notion qualitative (Papadakis, 1938). Croissance et développement sont mesurés selon plusieurs échelles dont celle de feekes (Large et *al*, 1954). Une échelle permet la caractérisation des stades repères, elle repose sur la description de la morphologie du brin-maitre.

I.6. 1. Les stades et phases repérés

I.6 .1 . 1. germination-levée

Cette phase correspond à la mise en place du nombre de pieds/m². Le sol est percé par la coléoptile qui est un étui protecteur de la première feuille. La levée est notée quand 50 % des plantes sont sorties de la terre pendant cette phase, les jeunes plantes sont sensibles au manque d'eau qui provoque une perte des plantes et au froid qui provoque le déchaussage (Karou et *al*.1998).

I.6 .1 .2 . Tallage

Cette phase s'amorce à partir de la quatrième feuille. Le début du tallage est marqué par l'apparition de l'extrémité de la première feuille de la talle latérale primaire puis d'autres

talles naissent successivement à l'aisselle des deuxièmes et troisièmes feuilles de la tige centrale, l'ensemble restent court noué, formant un plateau de tallage situé juste au niveau du sol. Ces talles primaires peuvent ensuite émettre des talles secondaires, lesquels à leur tour émettent des talles tertiaires (Belaid, 1986 ; Gates, 1995). Le fin tallage est celle de la fin de la période végétative, elle marque le début de la phase reproductive, conditionnée par la photopériode et la vernalisation qui autorisent l'élongation des entrenœuds (Gate, 1995).

I.6 .1 . 3. Montaison-gonflement

Elle se manifeste, à partir du stade épi à 1cm, par l'élongation du premier entre-nœud.

Ce stade est repérable une fois l'ébauche de l'épi du brin-maitre atteint 1cm de hauteur à partir de la couronne ou plateau de tallage (Gate, 1995). Ce stade est sensible aux basses températures (variant entre +4 et 0°C). Selon Baldy (1984), la montaison constitue la phase la plus critique du développement du blé. Tout stress hydrique ou cours de cette phase réduit du nombre d'épis montants par unité de surface. Cette phase s'achève une fois l'épi prend sa forme définitive à l'intérieur de la gaine de la feuille étendard qui gonfle (stade gonflement).

I.6 .1 . 4. Épiaison-floraison

L'épiaison se détermine par l'apparition de l'épi hors de la gaine de la dernière feuille. Les épis dégainés fleurissent généralement entre 4 à 8 jours après l'épiaison (Bahlouli et *al.* 2005). Les basses températures au cours de ce stade réduisent fortement la fertilité des épis (Abbassenne et *al.* 1998).

Après la fécondation, l'évolution du grain se fait en trois étapes. La première est une phase de multiplication des cellules du jeune grain encore vert, dont la teneur en eau est élevée. Suit la phase de remplissage actif du grain avec les assimilats provenant de la photosynthèse d'étendard et du transfert des hydrates de carbones non structuraux stockés dans le col de l'épi. La quantité d'eau contenue dans le grain tend à se stabiliser : c'est le palier hydrique.

Les fortes températures au cours de cette période provoquent l'arrêt de la migration des réserves des feuilles et de la tige vers le grain : c'est l'échaudage du grain. Puis suit la phase de dessèchement du grain, qui perd de son humidité pour atteindre son poids sec final (Wardlaw, 2002).

II. Généralité sur l'habitat des microorganismes

II.1. Le sol

Le sol peut être défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes.

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou de sa fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci).

Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (Ould rabeih, 2012).

II.2. La rhizosphère

Le concept de « rhizosphère » a été introduit pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner (Hiltner, 1904), et ceci pour décrire la zone sous l'influence biologique et biochimique des racines (Curl & Truelove, 1986). Le terme « rhizo » vient du grec signifiant « racine » tandis que le terme « sphère » dérive du grec ancien « sphaira » décrivant une balle, un globe. En 1986, Curl et Truelove (Curl & Truelove, 1986) décrivent la rhizosphère comme « une étroite zone du sol sujette à l'influence des racines, ce qui se manifeste par la perte ou l'exsudation de substances affectant l'activité microbienne ». Si d'un point de vue morphologique, les racines et le sol, ou les micro-organismes et le sol devraient être clairement séparés, il n'en va de même d'un point de vue fonctionnel (Ulrich, 1987).

Selon Lawton et Jones (Lawton & Jones, 1995), les racines des végétaux peuvent être considérées comme les « ingénieurs biologiques du sol ». En effet, ces dernières créent et maintiennent leur propre milieu, et ceci, non seulement par leur présence physique mais aussi par leur activité. Par des processus tels que l'exsudation d'acides organiques et d'enzyme dans la rhizosphère, les racines vont pouvoir, par exemple, permettre le maintien de communautés microbiennes (Curl & Truelove, 1986) ou l'accroissement de l'érosion des minéraux (Hinsinger et al, 1992; Richards, 1987). Ainsi, en dépit du faible volume de la

rhizosphère dans les sols, celle-ci joue un rôle central dans le maintien du système sol-plante (Gobran et al., 1998).

II. 3. Les micro-organismes de la rhizosphère

La rhizosphère est considérée comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et un réservoir majeur de la diversité microbienne.

La richesse de la rhizosphère en sucre, aminoacide, acide organique, iso flavonoïdes, régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante (Pierson et al., 2010), rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries. Ces êtres vivants, les microorganismes en particulier, sont requis dans le processus des décompositions et recyclage des nutriments dans la rhizosphère des plants (Germida et al., 1998). Ils jouent aussi un rôle significatif dans l'état de la santé des plantes, certains sont nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certains ne semblent avoir aucun effet. Ces micro-organismes peuvent être classés en deux catégories :

- les **ectosymbiontes** qui constituent les micro-organismes colonisant l'extérieur de la racine, c'est-à-dire, la rhizosphère ou le rhizoplan (surface des racines). Parmi ces organismes, sont retrouvés des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* (Gray & Smith, 2005) et des champignons (*Trichoderma*). Les bactéries de ce type sont alors définies comme des rhizobactéries ;

- les **endosymbiontes** qui regroupent les micro-organismes vivant à l'intérieur des cellules de la plante hôte. Cette catégorie est constituée majoritairement de champignons dits endomycorrhiziens.

II.3.1. Les champignons

Les champignons sont des organismes chimio-hétérotrophes. De par leur forme filamenteuse et leur production fréquente d'exopolymère, ils possèdent un rôle important dans le maintien de la structure et de l'organisation des sols (Gadd, 2007).

La majorité des grands groupes taxonomiques de champignons sont tous hébergés dans le sol. Elles présentent une grande diversité, des études récentes estiment le nombre d'espèces à

1,5 millions approximativement. Les champignons sont souvent dominants dans les sols naturels en termes de biomasse. Dans certains sols, leur biomasse qui constitue une portion importante du pool de nutriment, peut-être plus importante que celle de tous les autres microorganismes, plantes et animaux réunis (Eyi Ndong, 2009).

II.3.2. Les bactéries

Dans la rhizosphère, les bactéries constituent les microorganismes le plus nombreux (leur densité est de l'ordre de 10/g et de sol) et les plus variés. Elles sont fortement stimulées par l'effet rhizosphérique que les actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires (Dommergues et Mangenot, 1970).

II.3.2.1. Généralité sur *Pseudomonas*

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont ubiquitaires et ont été isolées de nombreux habitats tels que les sols, les sédiments, les végétaux ainsi que les eaux douces et marines (O'Sullivan & Ogara, 1992). Il apparaît comme l'un des taxons bactériens les plus importants du sol (Garbeva et al., 2004), où les populations indigènes de *Pseudomonas* fluorescents sont très fréquentes (Latour et al., 1999).

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts. Ces bactéries, mobiles grâce à un flagelle polaire, peuvent être retrouvées sous forme planctonique ou sessile. Les *Pseudomonas* des sols produisent généralement un pigment jaune-vert, fluorescent, appelé pyoverdine et correspondant à une famille importante de sidérophores (O'Sullivan & Ogara, 1992). Ainsi, le genre *Pseudomonas* peut être divisé en deux groupes, les *Pseudomonas* non fluorescents et ceux fluorescents, produisant la pyoverdine. Parmi ces derniers sont retrouvés *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas syringae* (Meyer, 2000.). Ce genre joue des rôles clés dans les sols en tant qu'agent de biocontrôle (O'Sullivan & Ogara, 1992) mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale ainsi que dans la bioremédiation (Garbeva et al., 2004).

III. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes

Les bactéries capable d'augmenter le rendement des cultures sont été appelées «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» (PGPR) par Kloepper et Schroth (1978).

L'augmentation de rendement d'une culture bactérisée résulte de deux effets bénéfiques principaux : la stimulation de croissance des plantes et la protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique. D'autres effets bénéfiques ont également été décrits. Ainsi certaines souches de *Pseudomonas* stimulent la germination des graines. D'autres influencent positivement les interactions entre les microorganismes symbiotiques (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*; champignons mycorhiziens) et la plante hôte.

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents sont connus pour leurs aptitude d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplan, mais sont aussi mobiles et phototrophes (de Weger *et al.*, 1994), produisent des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch *et al.*, 1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim *et al.*, 1991; Neilsen *et al.*, 1998; Neilsen et Sorensen, 1999).

Ces capacités antagonistes et PGPR, sont dues à des mécanismes directs et indirects (Figure01). Les mécanismes indirects utilisés par ces *Pseudomonas spp.* fluorescents, comprennent la production d'antibiotiques contre des bactéries pathogènes (Thomashow *et al.*, 1990), la réduction de fer disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982), la synthèse d'enzymes dégradant les paroi cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante.

Les mécanismes directs concernent, la séquestration du fer pour les plantes par les sidérophores. La production de phytohormones ou encore par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rendant ainsi le phosphore bio disponible (Salisbury, 1994), et diminuer les taux d'éthylène produits par la plante (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999). Ces bactéries sont capable d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et porte le nom d'ISR (van Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2001).

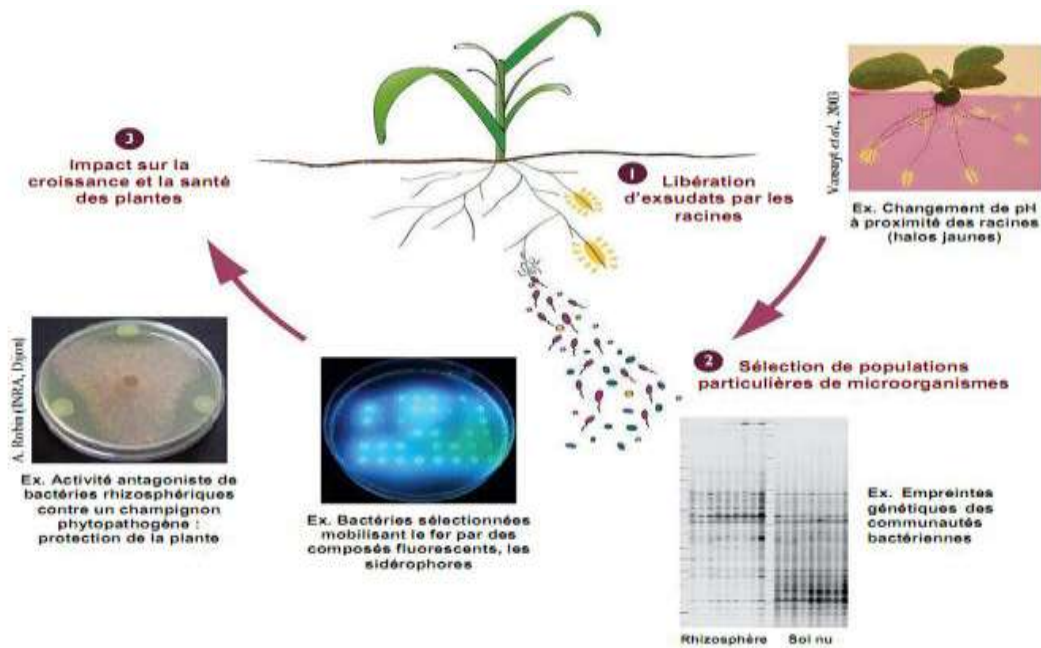


Figure 01 : Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau *et al.*, 2006).

III.1. Effets directs

III.1.1. Fixation d'azote

La fixation de l'azote atmosphérique est un mécanisme par lequel les microorganismes fixateurs dits 'libres', peuvent améliorer la croissance de la plante. Ces bactéries appartiennent à différents genres, tels qu'*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter* et *Azoarcus* (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000). Chaque année, elles fixent l'azote à des taux relativement faibles mais à des quantités néanmoins significatives (< 3 kg ha⁻¹ ; Cleveland *et al.*, 1999). Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols (Bloemberg et Lugtenberg, 2001) en fixant l'azote atmosphérique qui pourra être par la suite utilisé par les plantes, améliorant leur croissance lorsque l'azote du sol est limitant.

III.1.2. Solubilisation des phosphates

Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère, cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilite la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Kim *et al.*, 1998;

Richardson, 2001). Les espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents comme *P. chlororaphis*, *P. putida* et *P. aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Cattelan et al., 1999; Bano et Musarat, 2003).

III.1.3. Production des sidérophores

La majorité des espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents produisent des sidérophores. Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes Fe³⁺-sidérophore bactériens (Becker et Cook, 1988; Loper, 1988; Bitter *et al.*, 1991). Les sidérophores jaunes-verts sont nommés pyoverdines (PVDs) ou pseudobactines (Budzikiewicz, 1993, 1997). A côté de la PVD, *P. aeruginosa* produit un autre sidérophore nommé pyocheline avec une affinité plus faible pour le Fe³⁺ (Cox *et al.*, 1981). Les espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents produisent aussi la pseudomonine (isoxazolidone) comme *P. fluorescens*, *P. stutzeri* et *P. putida* (Lewis *et al.*, 2000; Mossialos *et al.*, 2000; Mercado-Blanco *et al.*, 2001).

III.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale

La production de phytohormones par des bactéries associées aux plantes, telles que l'auxine (acide indole-3-acétique, AIA), les cytokinines et les gibbérellines, conduit fréquemment à une stimulation de la germination, de la croissance et de la reproduction tout en protégeant la plante des stress à la fois biotiques et abiotiques (Taghavi et al., 2009).

Certaines bactéries de la rhizosphère synthétisent de l'auxine, *via* la voie de biosynthèse de l'indole-3-pyruvate, alors que les bactéries pathogènes utilisent principalement la voie de l'indole-3-acétamine (Hardoim et al., 2008). Ainsi, la quantité d'auxine relarguée aurait un rôle très important dans la modulation des interactions bactéries-plantes (Ma et al., 2011).

III.1.4.1. Production d'acide indole -3-acétique (AIA)

L'acide indole acétique AIA est une auxine primaire active dans la majorité des plantes. Il fonctionne comme une molécule - signal importante dans la régulation du développement des plantes. L'AIA intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse. Il contrôle aussi bien l'organisation du méristème apical (phyllotaxie), la ramification des parties aériennes de la plante (dominance apicale), la formation de la racine principale, l'initiation des racines latérales et adventives (rhizogénèse) et intervient également dans les tropismes en réponse à la

gravité (gravitropisme) ou à la lumière (phototropisme). Ces multiples effets sur les différents stades de la croissance de la plante résultent du contrôle que cette phytohormone exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation. Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Celle-ci peut être utilisée comme outil de dépistage des souches PGPR performantes (Khalid *et al.*, 2004). Les PGPR libèrent ces auxines dans la rhizosphère comme des métabolites secondaires (Khan *et al.*, 2009). Les PGPR synthétisent et sécrètent l'AIA qui sera absorbé par la graine ou la racine à partir du tryptophane et d'autres petites molécules présentes dans les semences ou les exsudats racinaires (Whipps, 1990 ; Fallik *et al.*, 1994).

III.1.4.2. Production d'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC- désaminase)

L'éthylène est une phytohormone au rôle central dans la modulation de la croissance et du métabolisme cellulaire des végétaux (Ping & Boland, 2004). Elle serait impliquée dans la résistance aux maladies et aux stress. Parmi ses rôles clés dans l'induction de changements physiologiques, la surproduction d'éthylène peut être à l'origine de l'inhibition de l'élongation racinaire et de la croissance des racines latérales (Mayak *et al.*, 2004). Cependant, certaines bactéries de la rhizosphère sont capables d'atténuer son impact par la production d'une enzyme, l'ACC désaminase. L'hydrolyse enzymatique de la 1- Aminocyclopropane-1- carboxylate (ACC), précurseur de l'éthylène, produit par la plante en cas de stress, génère de l'ammoniac et de l'_cétobutyrate (Glick *et al.*, 2007). Les bactéries utilisent l'ammoniaque provenant de cette dégradation comme une source d'azote et ainsi réduisent l'ACC au sein de la plante (Ma *et al.*, 2011).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs d'ACC-désaminase (Glick *et al.*, 1994). La transformation des *Pseudomonas* spp. Par des gènes codant cette enzyme, permet à celles-ci de croître sur un milieu dont la seule source de carbone et d'azote est l'ACC, et de stimuler l'élongation des racines (Shah *et al.*, 1998). Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations (Grichko *et al.*, 2001), ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Burd *et al.*, 1998; Belimov *et al.*, 2001).

III.2. Effet indirect

III.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 2004). Cependant, cette corrélation entre l'importance de la population de PGPR sur les racines et la protection observée n'est dans certains cas pas vérifiée et ne peut donc pas être considérée comme une règle générale.

Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (Jofre *et al.*, 2004), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Berggren *et al.*, 2001; Gupta 2003; Grover 2004).

III.2.2. Antibiose

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *B. subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple : la zwittermycine-A, la kanosamine (Peypoux *et al.*, 1999), des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine (Peypoux *et al.*, 1999; Bonmatin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2007) et encore des enzymes hydrolytiques (β -1,3-gluconase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Leelasuphakul *et al.*, 2006). D'autre part chez *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle (Raaijmakers *et al.*, 1995; Haas et Keel 2003; Haas et Defago 2005). Plusieurs facteurs abiotiques (l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote, et des micro-éléments), biotiques (la plante hôte, le

pathogène, la microflore indigène, et la densité de cellules de la souche productrice) et physiologiques tels que le quorum sensing ont été identifiés pour influencer la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle.

III.2.3. La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

Cette résistance est stimulée par certaines rhizobactéries non-pathogènes (PGPR).

Comme il est mentionné plus haut, ces rhizobactéries sont capables de réduire une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante (Van Loon *et al.*, 1998). L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induisant l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Bent 2005). La preuve du rôle d'une souche de PGPR en tant qu'inducteur de l'ISR dans la réduction d'une maladie est donc obtenue en garantissant une séparation spatiale de l'agent pathogène et de l'agent inducteur de la résistance, afin d'exclure toute interaction antagoniste directe.

C'est le cas si l'on inocule les bactéries sur les racines et le pathogène sur la surface foliaire de la plante ou en utilisant des systèmes séparant les racines en deux groupes séparés (Van Peer *et al.*, 1991; Zhou et Paulitz 1994; Bakker *et al.*, 2007).

III.2.4. La bioremédiation

Les techniques de bioremédiation utilisent les propriétés dépolluantes de microorganismes (essentiellement des bactéries, mais aussi des champignons) endogènes ou exogènes au site contaminé. La biodégradation d'un composé est souvent le résultat de l'action de multiples organismes (Vidali, 2001). Majoritairement, la bioremédiation peut être appliquée *in-situ*. Ces techniques, relativement peu coûteuses, sont appréciées du grand public (Mcgrath *et al.*, 2002).

Le procédé de la bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, la plupart des temps microscopiques (bactéries, micro algues, champignons), à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou

exogènes (ajoutées au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol (bio augmentation). La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie. Cependant, l'application de systèmes de bioremédiation en condition d'anaérobie permet la dégradation d'un certain nombre de molécules récalcitrantes (Abdelly, 2007).

IV. Généralité sur métaux lourds

IV.1. Définition des métaux lourds

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux. D'un point de vue physique, le terme métaux lourds désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g.cm⁻³ (Adriano, 2001) sont cités comme toxiques pour l'homme et son environnement. D'un autre point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques

Le terme métaux lourds, implique aussi une notion de toxicité. Le terme éléments traces métalliques est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (Tableau01) (Baker et Walker, 1990).

Tableau 01: teneurs des sols et des plantes en certains éléments. (En mg/kg de poids sec) (Pierre, 2010).

Eléments	maximum "normal" dans les sols	Moyenne des sols	maximum "normal" dans les plantes
Cadmium	0.7	0,5	1
Chrome	150	100	0,1
Cuivre	100	20	15
Mercure	0,3	0,03	0,1
Nickel	80	40	8
Plomb	100	30	8
Sélénium	10	–	–
Zinc	300	50	150

IV.2. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds

La pollution métallique des sols due à des activités humaines (agricoles, domestiques et industrielles) est souvent citée dans les médias et la bibliographie scientifique. Cependant, les métaux existent naturellement dans les sols car ils sont présents dans la roche mère qui subit notamment des phénomènes d'érosion et d'altération (Figure02). Les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure ne peuvent pas être biodégradés et donc persistent pendant de longues périodes dans le sol ; ce qui constitue un sérieux problème.

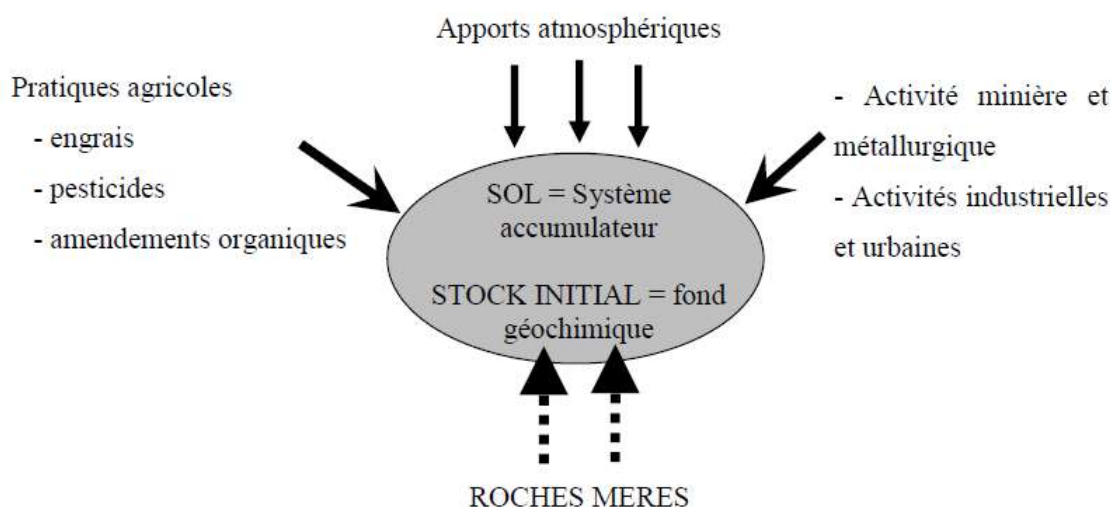


Figure 02: Origine des métaux lourds dans le sol (D'après Robert et Juste, 1999).

IV.3. Pollution par le cuivre

Le cuivre, est un élément du groupe IB du tableau périodique, de masse atomique 63,546 g/mol. Les oligo-éléments comme Cu, sont des éléments indispensables à la vie mais qui se trouvent présents en proportion très faibles dans les tissus biologiques (Loué, 1993). En 1930, le Cu a été reconnu élément trace essentiel pour les plantes (Alloway, 1995).

IV.4. Effets du cuivre sur la plante

Le cuivre est un des constituants de protéines impliquées dans la photosynthèse comme les plastocyanines des chloroplastes. Son rôle de cofacteur dans le transport d'électrons du photosystème, il est également primordial (Marschner, 1995). Il intervient dans la constitution de protéines engagées dans le processus de la respiration mitochondriale (cytochrome oxydase), des réactions d'oxydation de l'acide ascorbique (ascorbate oxydase) et de la détoxification de radicaux superoxydes (superoxyde dismutase) mais aussi de la synthèse de lignine de la paroi cellulaire (peroxydases et phénols oxydases), (Loué, 1993, Marschner,

1995, Clemens, 2001). Le cuivre intervient dans le métabolisme et la distribution des hydrates de carbone, des lipides, de la réduction et de la fixation de l'azote (Marschner, 1995). Il intervient dans le contrôle hydrique en influençant la perméabilité à l'eau des vaisseaux xylèmes (Kabata Pendias, 2010). Il est intéressant de noter que le cuivre joue également un

rôle dans le processus de coloration en jaune des fleurs (Nakayama et al., 2000) et la production de graines.

Les symptômes visuels de déficience en cuivre sont difficiles à détecter car ils ne sont pas typiques et peuvent être confondus avec d'autres (Loué, 1993). Les jeunes organes aériens plus sensibles, sont les premiers à développer des symptômes de déficience en cuivre (Kabata

Pendias, 2010). Les principaux symptômes macroscopiques sont une altération du développement des pollens (Jewell, 1988), des troubles de l'épiaison sur céréales, une décoloration blanches du bout des jeunes feuilles (Loué, 1993), un défaut de turgescence des feuilles lorsque les vaisseaux du xylème sont insuffisamment lignifiés (Kabata Pendias, 2010). En outre, en cas de carence en cuivre, on observe une augmentation de l'absorption de manganèse pouvant entraîner une toxicité à ce métal. Enfin dans les cas de déficiences en cuivre les plus graves, la mort des jeunes pousses survient tandis que les arbres se rabougrissent (Loué, 1993). Le diagnostic d'une déficience en cuivre est confirmé lorsque la teneur en cuivre de jeunes feuilles est inférieure à 4 mg/kg (Loué, 1993). Lorsque la teneur en Cu augmente dans le sol, la teneur en Cu observée dans la plante peut atteindre une concentration critique, variable selon l'espèce végétale, à partir de laquelle apparaissent des symptômes de phytotoxicité (Marschner 1995). Donc un excès de cuivre dans le sol provoque d'abord une rhizotoxicité qui s'exprime par une coloration brune des racines, une diminution de la formation des poils absorbants, une diminution de l'élongation racinaire (Kopittke et Menzies, 2006), un épaississement des racines (Marschner, 1995, Panou-Filotheou et Bosabalidis, 2004) et la diminution de la biomasse racinaire (Bravin, 2008) avant d'affecter la croissance des parties aériennes (Marschner, 1995).

Au niveau des parties aériennes, les symptômes observés sont des atteintes du feuillage telles que des déformations, des décolorations jaunes internervaires caractéristiques des chloroses

ferriques (Michaud et al., 2007, Davis et Beckett, 1978) induite par un excès de cuivre, des nécroses et une altération de développement de la vigne (Coïc et Coppenet, 1989, Brun et al.,

1998). Dans les cas les plus graves cela peut conduire au nanisme (Marcellin, 1974) ou à la mort des souches. Reuter et Robinson (1997) indique que le seuil de toxicité en Cu est atteint à partir d'une concentration en Cu de 15 à 30 mg/kg MS dans les feuilles de plantes cultivées. Or, dans les mêmes conditions, ces plantes accumulent dans leurs racines des concentrations allant jusqu'à 500 mg/kg MS de Cu (Marschner, 1995). Les principales sources de contamination en Cu sont les épandages agricoles.

IV.5. Dépollution des sols pollués par le cuivre

L'accumulation de substances toxiques variées dans les écosystèmes, couplée au caractère non renouvelable de la ressource sol, oblige la société humaine à mettre en place des moyens pour dépolluer les sols (remédiation). Face à la demande croissante de surfaces cultivables, la question de la reconversion des sites pollués est en effet de plus en plus fréquente. La pollution par les métaux est particulièrement problématique à cause de leur persistance dans l'environnement, alors que les pollutions organiques sont dégradables. La sélection de la méthode de remédiation la plus appropriée dépend ainsi du type de pollution, mais aussi des caractéristiques du site, des concentrations en contaminants, et surtout du devenir du site. Les méthodes les plus employées actuellement sont des techniques physicochimiques, souvent onéreuses, lourdes à mettre en place et peu respectueuses de l'environnement ; des méthodes émergentes exploitant des processus biologiques (bioremédiation) ont vu le jour mais celles-ci méritent encore d'être optimisées et sont encore peu utilisées (Mulligan et al., 2001). Le but de la remédiation étant de réduire au maximum le risque d'exposition aux contaminants, la meilleure solution est de retirer les polluants du milieu (extraction), mais cela n'est pas toujours possible et l'immobilisation ou l'isolement des polluants peut permettre d'assurer l'innocuité de la pollution. La décontamination et la réhabilitation des sols pollués doit donc passer par une définition des objectifs, de la faisabilité et des risques du ou des traitements. Les objectifs peuvent viser, soit à retrouver les propriétés originelles du sol, soit à se limiter à une diminution des risques en fonction des usages envisagés (plantations forestières, terres agricoles, terrains de jeux, lotissements...) (Bourrelier et Berthelin, 1998).

5.5.1. Les différentes techniques de dépollution des sols

a. Les techniques physico-chimiques (Mulligan et al., 2001)

- L'isolement/immobilisation de la pollution

La technique la moins coûteuse consiste à installer des barrières physiques (acier, ciment, bentonite...) pour confiner la pollution métallique et empêcher sa diffusion dans les milieux adjacents (confinement). Sans isoler complètement la zone polluée, des systèmes de barrières sélectives drainantes ont aussi été développées pour piéger les polluants. Autrement, les contaminants peuvent être immobilisés par encapsulation (solidification) dans une matrice solide après injection d'agents solidifiant (monomères liquides qui polymérisent, pouzzolane, bitumes ou autres ciments). Ce traitement peut être réalisé *in situ* ou après excavation (*ex situ*), les processus de remédiation *ex situ* étant plus courants car les mélanges sont plus faciles à réaliser. Enfin, on peut réaliser une vitrification du milieu pollué en y insérant des électrodes pour le porter à très haute température (1600-1800°C) et le faire fondre. Le substrat se solidifie alors en refroidissant, immobilisant les polluants.

- Les techniques de séparation physique ou chimique

Les différents traitements *ex situ* qui peuvent être réalisés sont des procédés de séparation mécanique des particules du sol (hydro cyclone, gravimétrie et flottation) en fonction de leurs tailles (les grosses particules étant généralement moins polluées que les particules fines), de séparation magnétique, basée sur les propriétés magnétiques des métaux, ou de séparation pyrométallurgique qui consiste à cuire le substrat pollué entre 200 et 700°C pour évaporer les contaminants. Les sols excavés peuvent aussi être « lavés » par lixiviation chimique (« soil washing ») grâce à l'ajout d'acides inorganiques (H₂SO₄, HCl) ou organiques (acide acétique, acide citrique) ou d'agents complexant (EDTA) pour solubiliser les polluants. Le lavage des sols implique l'utilisation d'une unité de traitement sur le site pour décontaminer la solution de lixiviation chargée en polluants. Parmi les procédés de remédiation *in situ*, il faut citer la méthode électrocinétique (électro migration) et le « soil flushing ». L'électro migration utilise deux électrodes plantées dans le sol pour y faire passer un faible courant électrique, les ions et particules chargés présents dans la solution de sol sont alors transportés entre les électrodes. Les anions viennent s'accumuler au niveau de la cathode et les cations au niveau de l'anode et peuvent ensuite être extraits. Le « soil flushing » consiste à nettoyer le sol à l'aide d'un

courant d'eau (contenant des agents chimiques ou non) afin de chasser les contaminants qui se solubilisent dans l'eau vers un lieu de captage et d'extraction, cette technique est évidemment fortement dépendante de la perméabilité du milieu. Les sols peuvent enfin être traités chimiquement par oxydation (ajout de permanganate de potassium, peroxyde d'hydrogène, hypochlorite ou gaz chlorés) ou réduction (ajout de métaux alcalins : Na, SO₂, FeSO₄, sulfites) ou neutralisation (ajustement du pH des sols acides ou basiques) dans le but de détoxifier, précipiter ou solubiliser les métaux.

b. Utilisation des organismes vivants pour la remédiation

Alors que certaines techniques de remédiation physico-chimiques sont régulièrement utilisées, la bioremédiation et surtout la phytoremédiation méritent d'être plus développées.

La bioremédiation emploie des méthodes naturelles qui n'ont donc pas un impact négatif sur l'écosystème et dont le coût peut être moins élevé que celui d'autres techniques. Par contre, la limitation principale de ce type de remédiation est la lenteur du procédé et la difficulté à bien maîtriser les mécanismes biologiques.

- La remédiation microbiologique

Il s'agit d'utiliser des microorganismes (majoritairement des bactéries) pour modifier la forme chimique des polluants afin de les extraire du sol ou les immobiliser.

Les microorganismes sont impliqués dans les cycles biogéochimiques des métaux par une variété de processus biochimiques qui influencent la spéciation et la mobilité des métaux.

Ainsi, selon les conditions et selon les microorganismes, l'action microbienne peut soit mobiliser soit immobiliser les métaux, ces différents processus pouvant être exploités en bioremédiation (Gadd, 2004 ; Hazen et Tabak, 2005). La mobilisation des métaux permet de les extraire de la matrice solide du sol, dans ce cas les propriétés microbiennes qui peuvent être exploitées sont la lixiviation, la dissolution des composés métalliques insolubles, la chélation par des métabolites, dont les sidérophores, et la biométhylation. La lixiviation autotrophe par des bactéries acidophiles (du genre *Thiobacillus*) qui permet de solubiliser le fer et d'autres métaux en produisant H₂SO₄ a déjà des applications industrielles, non pas en bioremédiation mais en « biomining » qui vise à extraire certains métaux précieux des sols.

Quoiqu'il en soit, l'utilisation des microorganismes en bioremédiation est plutôt prometteuse pour des traitements *ex situ*, en bioréacteurs ou en biopiles, où les conditions de croissance de la biomasse microbienne peuvent être contrôlées précisément. En conditions *insitu*, à cause des risques de transfert des polluants, les techniques d'immobilisation sont préférables aux techniques de mobilisation. Toutefois, les traitements *in situ* ont l'avantage d'être moins coûteux que les traitements *ex situ* et d'être applicables à des contaminations diffuses, diluées ou inaccessibles. Les techniques de bioremédiation *in situ* peuvent être de trois types selon l'action qui est réalisée : on parle de bioaugmentation lorsque l'on ajoute dans l'environnement pollué des microorganismes sélectionnés pour leurs propriétés ; de biostimulation lorsque l'on ajoute des donneurs/accepteurs d'électrons ou des nutriments pour stimuler les microorganismes indigènes ; et d'atténuation naturelle lorsque la capacité de bioremédiation intrinsèque du milieu est utilisée. Or, rares sont les cas où la bioaugmentation a montré de meilleurs résultats que la biostimulation (Hazen et Tabak, 2005). Avec les outils moléculaires et génétiques actuels qui permettent une meilleure compréhension du métabolisme des microorganismes et qui offrent la possibilité de sélections et de modifications génétiques, la bioingénierie peut constituer une approche intéressante pour l'amélioration de la bioremédiation *in situ* par les microorganismes.

Matériel et Méthodes

Ce travail a comme objectif la mise en évidence de l'effet des bactéries *Pseudomonas spp.* fluorescents sur la croissance des plantes dans un sol pollué en cuivre.

I. Les souches bactériennes

Deux souches bactériennes appartenant aux *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophyte utilisés dans ce travail ont été isolées à partir des plantes spontanées (Wilaya de Laghouat) (Tableau02). Ces souches ont subi une régénération et une conformation de la pureté sur milieu King B (Annexe 01).

Après la purification nous avons repiqué les souches purs dans des tubes contenant le milieu KB. Ces tubes ont été mis au réfrigérateur à une température de 4 ± 2 °C, pour les utiliser ultérieurement.

Tableau 02 : Origine des souches bactériennes

Souches	Origine rhizosphériques	Région géographiques	Année d'isolement
P01	<i>Astragalus armatus</i>	ElAissafia	2014
AZ4	<i>Pistacia atlantica</i>	Elhouita	2016

II. Mécanismes d'action des *Pseudomonas Spp.* fluorescents

II.1. Fixation de l'azote

Pour la fixation d'azote nous avons utilisé la méthode suivante, les souches ont été ensemencées sur milieu Winogradsky solide exempté d'azote(Annexe01). La lecture se fait après l'incubation des boîtes à 28 °C pendant 48heurs, une croissance sur le milieu Winogradsky solide exempté d'azote.

II.2. Production de sidérophores

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Angayarkanni., *et al.*, 2012, qui consistait à ensemencer les souches bactériennes sur milieu KB solide auquel est ajouté 50mg/l Fe^{3+} . Par ailleurs, les souches ont été ensemencées sur milieu KB solide. La lecture a été faite après incubation à 28 °C pendant 24 à 72 h, l'apparition des pigments jaunes-verts sur milieu KB solide, et absence des pigments jaunes-verts sur le milieu KB solide avec Fe^{3+} .

II.3. Production d'acide indole acétique(AIA)

Le test de la production de l'AIA a été réalisé selon la méthode de Khalid et al., (2004). Les souches bactériennes testés ont été ensemencées dans des erlenmeyers contenant 100 ml du milieu KB liquide, auquel est ajouté 30mg /l de tryptophane, puis incubés à 28 °C en agitation permanente à 180 tr/min. Après 4 jours d'incubation les cultures bactériennes ont été centrifugées à 4500 tours pendant 15 mn. Le surnageant est récupéré pour la détection de la production de l'AIA et ceci par un volume de 1 ml du surnageant auquel est ajouté 2 ml du réactif Salkowski (Annexe 01). L'apparition de la couleur rose-rouge indique la présence de l'AIA. Pour doser la quantité de l'AIA produite nous avons fait une lecture par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm et à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

II.4. Test de solubilisation des phosphates

Ce test permet d'évaluer la capacité de *Pseudomonas Spp.* fluorescents à solubiliser les phosphates sur milieu phosphate de Pikovskaya (PVK) et milieu NBRIP (Annexe01) selon la méthode décrite par (Nautyal., 1999). Nous avons déposé chaque culture bactérienne (AZ4, P01) en spot à la surface des deux milieux. Après incubation à 28°C/7 jours, un halo de transparence apparait autour des colonies ayant la capacité de solubiliser les précipités de **phosphates**. Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre de la zone transparente autour de la colonie.

III. Test de tolérance au cuivre

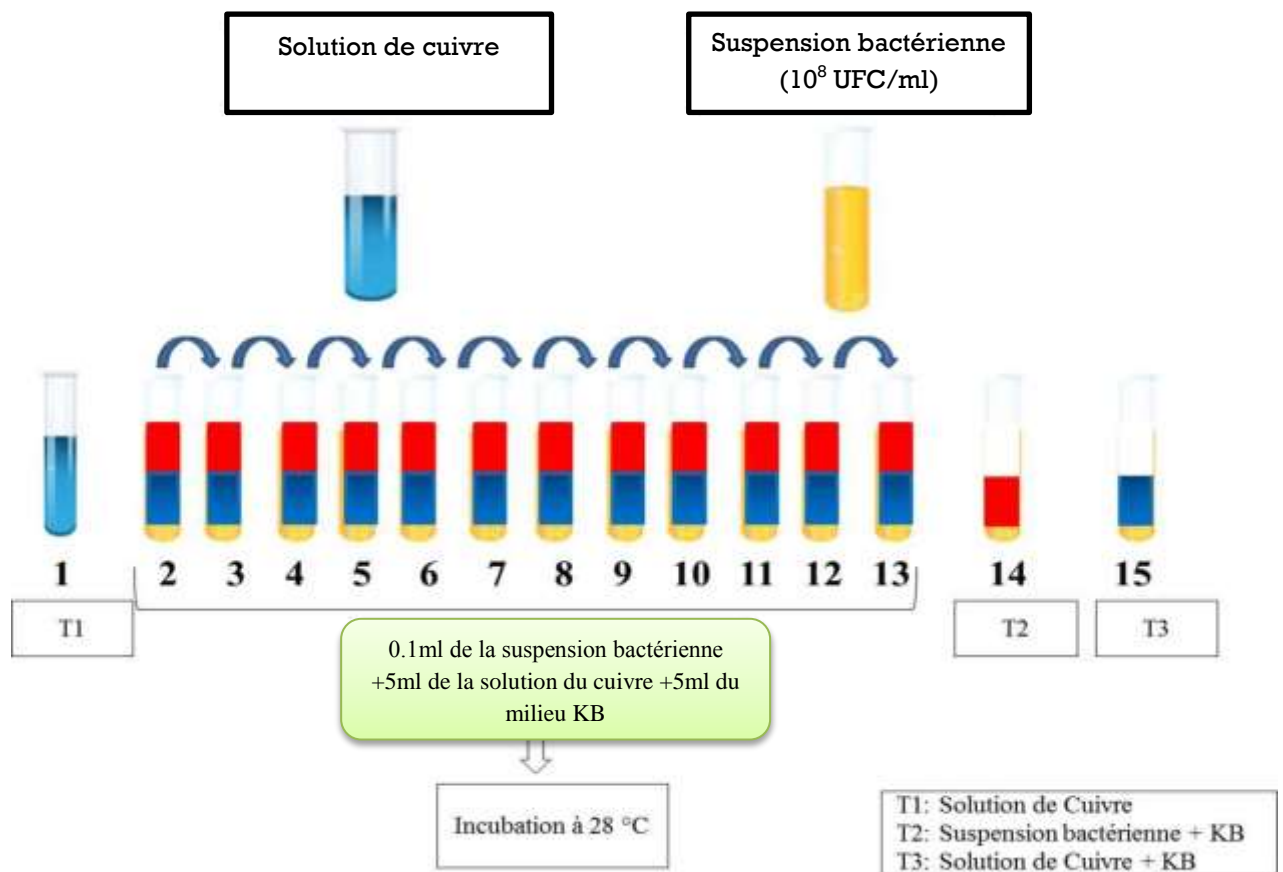
Cet essai consiste à la détermination du spectre de l'action de l'agent chimique le cuivre (Cu), en fonction de la résistance des *Pseudomonas Spp.* fluorescents étudiés (P01, AZ4). Il a été réalisé grâce à la méthode (Mazzolaet *et al.* , 2002).

A partir des cultures bactériennes jeunes âgées de 24h, nous avons préparé deux inocula bactériens à une concentration approximative de 10^8 UFC/ml, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique (**DO**) égale à 620 nm. Pour faire ce test nous avons préparé une solution mère de cuivre à base sulfate de cuivre à une concentration de 800ppm.

Dans quatorze tubes à essai numérotés, contenant 5 ml de milieu de culture KB liquide. Par la suite (5 ml) de la solution mère du cuivre a été ajouté dans les tous tubes à essai sauf le dernier tube laissé comme témoin positif contenant le milieu KB et l'inoculum, à partir du premier tube une série de dilution a été réalisée jusqu' au tube (N° 13). Nous avons prélevé 5 ml du premier tube, cette quantité a été versée dans le deuxième tube, l'opération a été répétée

jusqu'au dernier tube de la série, en suite (0,1 ml) de l'inoculum bactérien a été ajouté dans tous les tubes sauf le témoin négatif contenant le milieu KB et la solution de cuivre. Les tubes ont été incubés pendant 24 heures à une température de $28 \pm 2C^0$ (Figure 03).

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 24 h. Sa détermination a été faite par l'observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube.



(Source : originale,

2017).

Figure03 : Schéma représentant la méthode de la tolérance au cuivre (CMI).

IV. Essais de bioremédiation du sol et biostimulation de la croissance des plantes

IV.1. Préparation du substrat

Le sol utilisé dans cet essai est un sol obtenu de la région de Slisla-El Aissafia Wilaya de Laghouat. Le sol a été autoclavé trois fois avant son utilisation. En suite, il a été conditionné dans des pots de couleur sombre à raison de 1Kg/pot.

La démarche expérimentale retenue a consisté à standardiser au maximum les conditions expérimentales (sol, conditions climatiques, forme chimique du polluant). Le métal polluant utilisé dans cette étude est le cuivre, apporté sous forme de solution de sulfate de cuivre à une concentration de 200 ppm.

IV.2. L'inoculum bactérien

À partir des cultures bactériennes jeunes âgées de 24h, nous avons préparé des inocula bactériens avec une concentration d'environ 10^6 UFC/ ml, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique (DO) égale à 600nm. L'inoculation du substrat a été réalisée par irrigation à raison de 40 ml/Pot.

IV.3. Matériel végétal

Nous avons utilisé des semences du blé dur (*Triticum durum*) appartenant à la variété vitron, récolté en 2015 à raison de cinq grain /pot.

IV.4. Dispositif expérimental :

Dans cet essai nous avons opté pour un dispositif en blocs aléatoires complets avec deux répétitions (Figure04), dont deux facteurs ont été étudiés :

_ **Facteurs 1** : correspond au substrat, sol sans cuivre et sol avec cuivre.

_ **Facteurs 2** : représenté par les différentes souches bactériennes (P01 et AZ4) et le témoin non bactérisé.

Nous avons réalisé six (06) traitements avec trois (03) répétitions par bloc.

✓ **Les traitements sont :**

T1 : Témoin Négatif : sol sans suspension bactérienne et sans cuivre.

T2 : Témoin Positif : sol sans suspension bactérienne et avec cuivre.

T3 : Sol traité par la suspension bactérienne(P01) avec cuivre.

T4 : Sol traité par la suspension bactérienne(P01) sans cuivre.

T5 : Sol traité par la suspension bactérienne(AZ4) avec cuivre.

T6 : Sol traité par la suspension bactérienne(AZ4) sans cuivre.

Le semis a été réalisé le 26 Février 2017 dans des pots à raison de cinq graines par pot, ces derniers ont été placés à l'air libre.

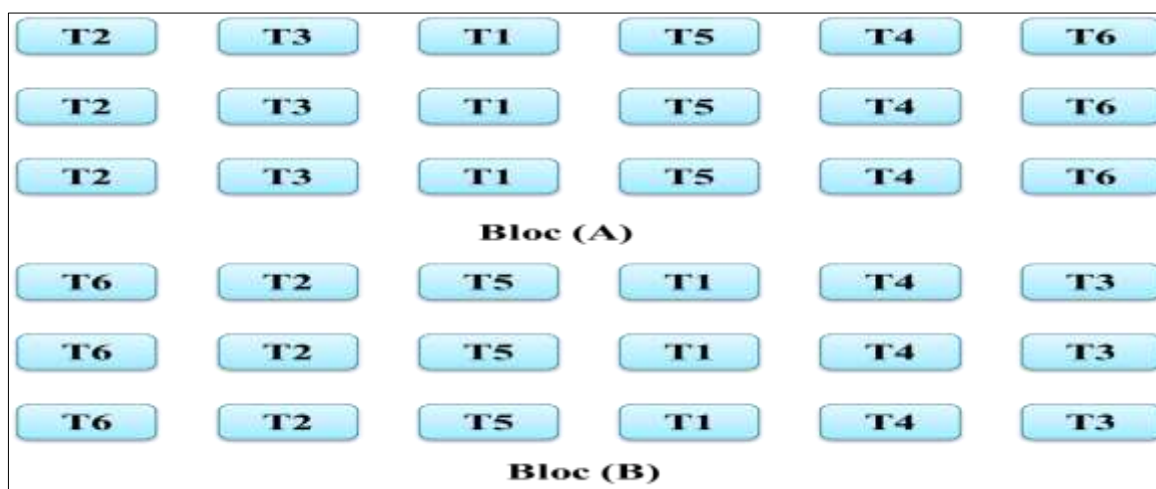


Figure 04 : Dispositif expérimental en BAC de l'essai de phytostimulation de la croissance végétale.

T1 : Substrat témoin non bactérisé et sans cuivre.

T2 : Substrat témoin non bactérisé + cuivre.

T3 : Substrat traité par la suspension bactérienne (P01) et (cuivre).

T4 : Substrat sans cuivre traité par la suspension bactérienne (P01)

T5 : Substrat traité par la suspension bactérienne (AZ4) et le (cuivre).

T6 : Substrat sans cuivre traité par la suspension bactérienne (AZ4).

V. Test de viabilité

Cet essai consiste à la détermination de la viabilité des populations bactériennes dans un sol traité par ces bactéries, en fonction de leur concentration.

Le test de viabilité a été réalisé après 21 jours de l'inoculation du sol. Nous avons prélevé, à une profondeur de 7 cm, des échantillons de sol pour chaque traitement, ces échantillons ont été par la suite mis dans des sacs en plastique stérile et transportés au laboratoire.

Ce test a été effectué sur le milieu KB par la méthode des suspensions-dilutions (Klement, 1990).

Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillé stérile, nous avons ajouté une quantité représentative d'un (1) g du sol pour préparer la suspension mère. Par la suite, 1 ml de cette suspension est versé dans un autre tube à essai contenant 9 ml de l'eau distillée stérile pour avoir une concentration de 10^{-1} , cette opération a été réalisée pour préparer une série de dilutions de 10^{-1} et 10^{-5} , les tubes sont toujours agiter à l'aide d'un vortex. Les dilutions retenues pour l'isolement sont 10^{-1} et 10^{-3} .

Nous avons étalé à l'aide d'une pipette Pasteur (0,1) ml de chaque dilution sur la surface d'un milieu de culture King B (King *et al.*, 1954), en réalisant deux répétitions pour chaque dilution. L'ensemble des boites ont été incubé à une température de 28 ± 2 °C pendant 24h à 48h.

Pour estimer le nombre des bactéries viables, nous avons utilisé la formule de Klement (1990), pour calculer le nombre de bactéries en Unité Formant Colonie (UFC), après avoir effectué le comptage des colonies bactériennes à l'aide d'un compteur colonies.

$$\text{Nombre de bactérie} = N \times 10^n \times 10 \text{ (cellule/ml)}.$$

N= la moyenne entre le nombre des colonies dans les boites de la même dilution.

n= le nombre de dilution.

VI. Paramètres étudiés

L'évaluation de l'effet de la bactérisation a été effectuée 30 jours après le semi, par la mesure des paramètres de croissance et des paramètres physiologiques. Pour les paramètres de croissance les mensurations ont été réalisées sur deux plants /pot, choisis aléatoirement de chaque traitement par bloc, les trois plantes qui restent ont été utilisé pour étudier les paramètres physiologiques.

VI.1. Paramètre de croissance

L'évaluation de la croissance du blé a été effectuée par des mensurations sur des paramètres de croissance ci-dessous.

VI.1.1. Mensuration sur les racines

Après dépotage, chaque plant est débarrassé du sol adhérent à la racine, nous avons procédé immédiatement à la mesure de leur longueur racinaire, et la pesée pour déterminer le poids frais. Le poids sec a été déterminé pour chaque plant, après séchage à l'étuve pendant 48 heures à une température de 105 °C.

VI.1.2. Mensuration sur les tiges

Après dépotage, nous avons procédé à la mesure de la hauteur des tiges. La partie aérienne (tige + feuille), fraîchement coupée au niveau du collet, a été immédiatement pesée pour déterminer le poids frais. Le poids sec a été déterminé, après séchage dans l'étuve à 105°C/48 heures.

VI.2. Paramètres physiologiques

Rappelant que les paramètres physiologiques étudiés ont été réalisés sur trois plants de chaque traitement par bloc. Sont dosés la chlorophylle, la proline, le sucre.

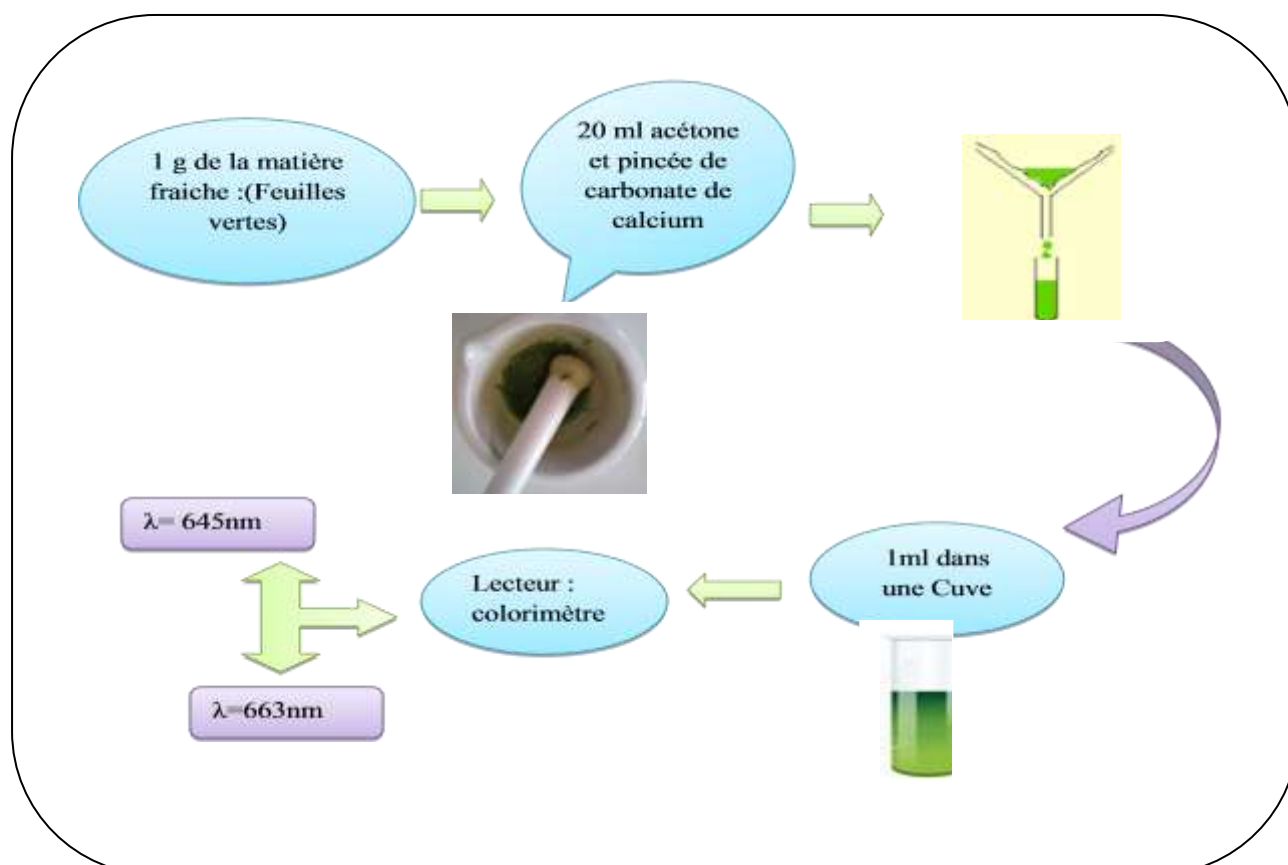
VI.2.1. Extraction et dosage de La chlorophylle

La chlorophylle est extraite selon la méthode décrite par Ferus et Arkosiova (2001) qui consiste à peser 1g du limbe foliaire qui est découpé en petits morceaux puis broyé dans un mortier avec 20 ml d'acétone à 80%, avec une pincée de carbonate de calcium (CaCO₃). Après broyage total, la solution est filtrée et mise dans des tubes couverts du papier aluminium pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière. Par la suite, 1 ml de la solution est mis dans la cuve du spectrophotomètre, et la lecture se fait à deux longueurs d'ondes ou densités optiques (DO) 645 et 663 nm, après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin de l'acétone à 80% (Figure 05). Les valeurs de la chlorophylle sont déduites selon les formules attribuées à Arnon (1949) par Ferus et Arkosiova (2001):

$$\text{Chl a (mg/l}^{-1}\text{)} = 12.7(\text{DO}663) - 2.69(\text{DO}645)$$

$$\text{Chl b (mg/l}^{-1}\text{)} = 22.9(\text{DO}645) - 4.68(\text{DO}663)$$

$$\text{Chl a+b (mg/l}^{-1}\text{)} = 8.02(\text{DO}663) + 20.20(\text{DO}645)$$



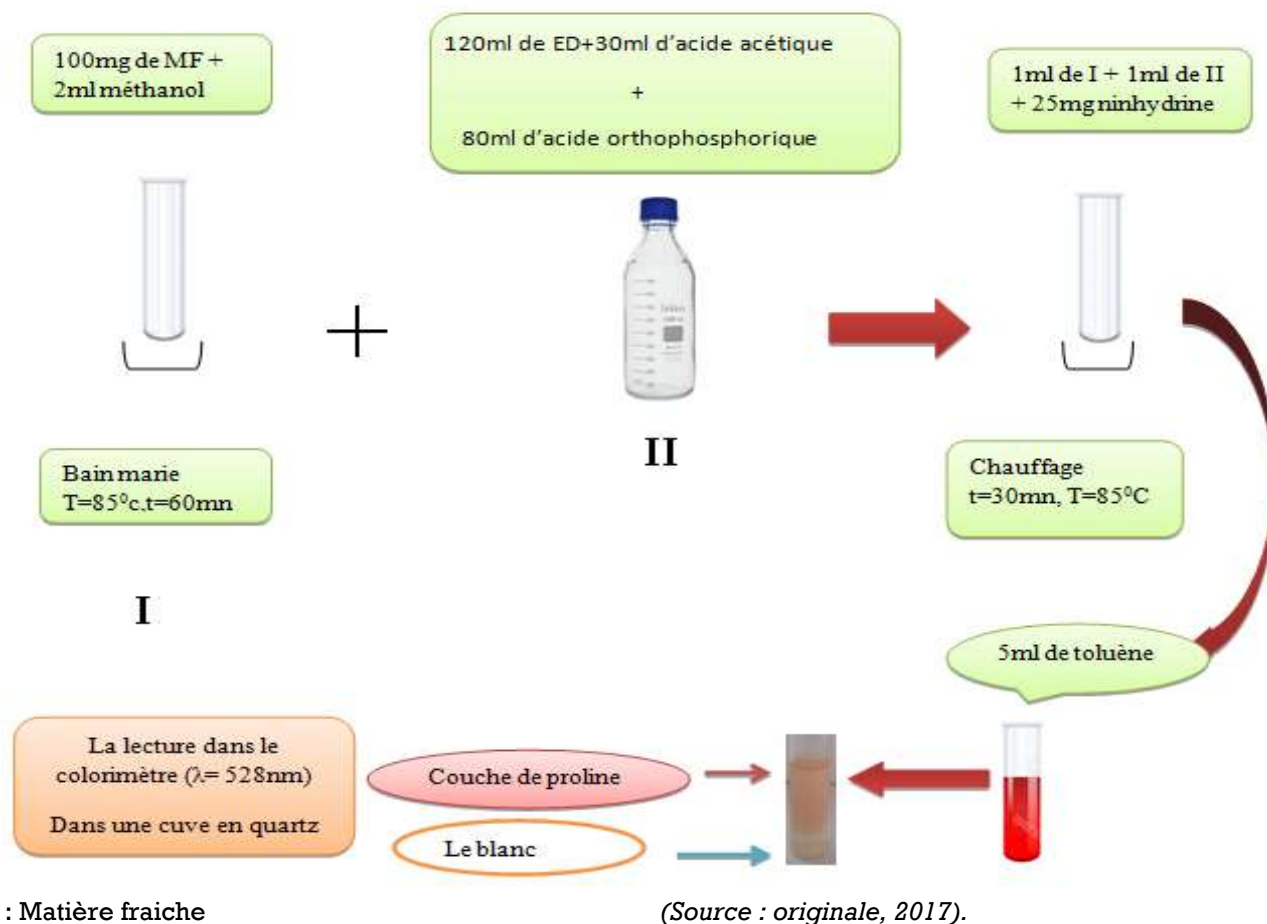
(Source: originale, 2017)

Figure05: Détermination de la teneur en chlorophylle.

VI.2.2. Extraction et dosage de la proline

La proline est quantifiée selon la technique de Troll et Lindsley (1955), le dosage de la proline a été déterminé sur un échantillon de 100 mg de matière fraîche (feuilles et racines) qui a été prélevés sur le tiers médian foliaire, et placés dans un tube à essai auquel nous avons ajouté 2 ml de méthanol à 40%. L'échantillon est chauffé, pendant 60 mn dans un bain-marie à 85°C. Après refroidissement, 1 ml de la solution d'extraction est ajouté à 1 ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1 ml du mélange contenant 120mlde l'eau distillée, 30ml d'acide acétique et 80 ml d'acide orthophosphorique. L'ensemble est porté à ébullition pendant 30 mn au bain marie. Après refroidissement, nous avons additionne 5 ml de toluène après agitation au vortex et nous avons procédé à la lecture à une longueur d'onde de 528nm(Figure 06). La proline est exprimée en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche en utilisant le coefficient à Troll et Lindsley(1955) :

$$\text{Pro } (\mu\text{g/g}^{-1}) = 0,62 \times (\text{DO528}).$$



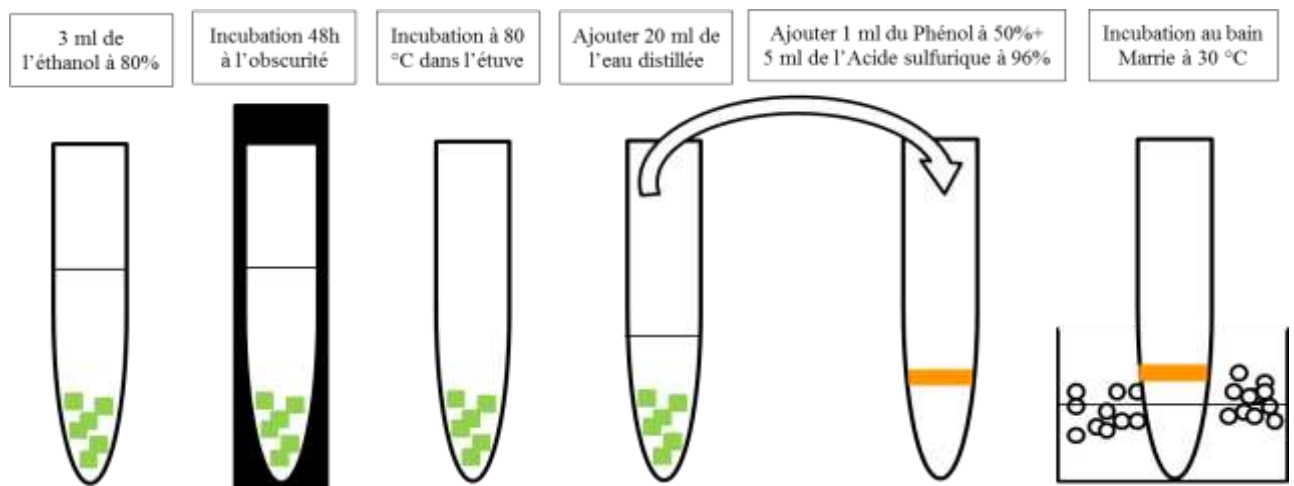
MF : Matière fraîche

ED : Eau distillé

Figure06: Détermination de la teneur en proline.

VI.2.3. Extraction et dosage des sucres solubles

Le dosage des sucres solubles a été réalisé selon la méthode (Dubois et *al.*, 1956) sur les 1/3 médianes de la feuille du blé. Nous avons ajouté 3 ml de l'éthanol à 80% puis le mélange est laissé pendant 48 h à l'obscurité, puis incubé à 80 °C jusqu'à l'évaporation de l'éthanol. Par la suite un volume de 20 ml de l'eau distillée est additionné au mélange. De ce dernier nous avons prélevé un volume de 2 ml qui est mélangé avec 5 ml d'acide sulfurique à 96 % et 1 ml de phénol à 5 % (dilué par l'eau distillé). Le mélange permet d'obtenir une solution jaune orange à la surface, cette solution est par la suite est agitée par le vortex puis incubée au bain Marrie à 30 °C pendant 10-15 mn jusqu'à l'obtention d'une couleur stable (Figure07). Pour doser la quantité des sucres solubles nous avons fait la lecture par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 485 nm.



(Source : originale, 2017).

Figure07 : Schéma représentant l'extraction et de dosages des sucres solubles.

VII. Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée à l'aide du logiciel Stat Box Végétal, en considérant l'essai factoriel ($\alpha = 5\%$). La mise en évidence de différences significatives concerne l'effet de chaque facteur contrôlé (f1 : les bactéries, f2 : le substrat) et de leur interaction (f1xf2). L'effet de bloc est considéré comme aléatoire.

Résultats Et Discussions

Notre travail consiste à la mise en évidence des mécanismes d'action du *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophyte et leur effet bénéfique sur des plantes de blé cultivées dans un sol polluée par le cuivre.

I. Régénération des souches

Après régénérations et purification des souches bactériennes, nous avons obtenu des colonies bactériennes fluorescent présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques de *Pseudomonas spp.* fluorescents. C'est à dire l'apparition des pigments jaune vert fluorescents visible à l'œil nu (petite taille, rondes brillants, bombes et lisse de leur surface) sur le milieu King B (King *et al.*, 1954) (figure08).

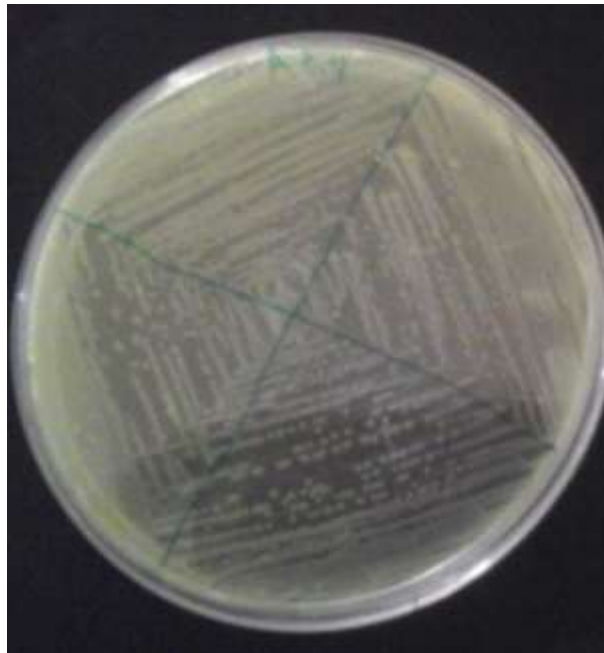


Figure 08 : Régénération des souches chez la souche (AZ4).

II. Mécanismes d'action des *Pseudomonas Spp.* fluorescents

II. 1. Fixation d'azote

Pour le test de fixation d'azote, nous avons observé une croissance sur le milieu Winogradsky solide exempt d'azote. C'est à dire que la bactérie *Pseudomonas spp.* fluorescent sont fixé l'azote de l'air (Figure09).

Sachant que l'azote gazeux de l'atmosphère ne peut être utilisé directement par les plantes mais celui-ci peut parvenir aux plantes que par des voies indirectes. La plus importante de ces voies est la fixation biologique par les bactéries libres ou associées (symbiotiques) (Soltner, 2007).

Les fixateurs libres présentent une diversité de genre, (*Acetobacter*, *Azobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Synechococcus*).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique se fait grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote (N₂) en ammoniacque (NH₃), forme de l'azote assimilable par les végétaux. Le microorganisme produit alors de l'ammoniacque pour le partenaire végétal en échange de molécules carbonées issues de la photosynthèse(Soltner, 2007).



Figure09 : Fixation d'azote chez la souche (P01).

II.2. Production des sidérophores

Dans ce test, après incubation à 28⁰C pendant 24- 72h, nous avons remarqué sur le milieu KB solide l'apparition des pigments jaunes-verts, par contre sur le milieu KB solide avec Fe⁺³ absence des pigments jaunes-verts. C'est à dire la bactérie *Pseudomonas spp.* fluorescents secrétée les sidérophores dans un milieu pauvre en fer(Figure10). Les sidérophores sont synthétisés par des bactéries telles *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*. Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer (Ahmad *et al.*, 2008).

Les pyoverdines forment une famille importante de sidérophores produit par tous les *Pseudomonads* fluorescents, environ 60 pyoverdines différentes ont été identifiées (Meyer et al., 2008). Elles sont caractérisées par un chromophore dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline qui est responsable de la fluorescence de la molécule (Meyer, 2000). En position C3 du chromophore est fixée une chaîne latérale (acide dicarboxylique ou son amide correspondant) et sur la fonction carboxyle en position C1 est fixée une chaîne peptidique (Budzikiewicz, 1997).

Bien que les sidérophores soient principalement spécifiques du fer, ils peuvent aussi complexer d'autres métaux lourds toxiques en augmentant leur solubilité. En outre, ils contribuent à la production des biopesticides et des agents de biocontrôle et favorisent la solubilisation des phosphates. Enfin, ils ont d'autres fonctions biologiques telles que l'amélioration de la fixation d'azote (Khan *et al.*, 2009).

Les *Pseudomonas* peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser les sidérophores qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres micro-organismes rhizosphériques (Ongena *et al.*, 2002).

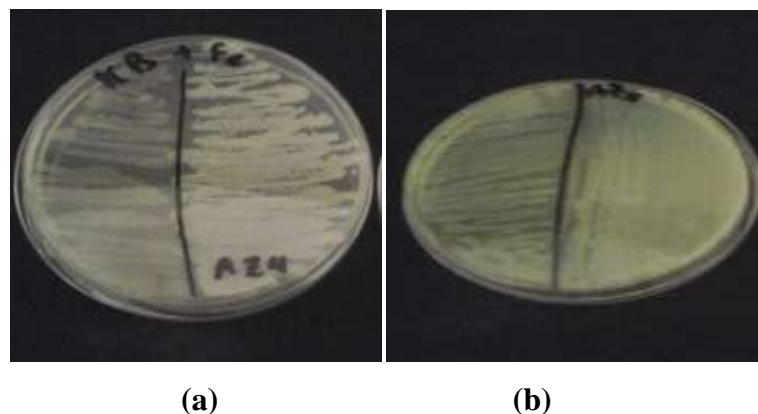


Figure10 : Production des sidérophores dans le milieu KB avec Fe^{+3} (a) et sans Fe^{+3} (b) chez la souche (AZ4).

II.3. Production d'acide indole acétique

D'après ce test nous avons obtenu une couleur rose-rouge qu'indique la présence de l'AIA (Figure11). Après la lecture par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm, et l'utilisation de la courbe d'étalonnage, nous avons obtenu les quantités de l'AIA

produite en $\mu\text{g/ml}$, la souche (AZ4) a enregistré une moyenne de $27.43\mu\text{g/ml}$, suivie d'une moyenne de $19.78\mu\text{g/ml}$ pour la souche (P01) (Tableau 03).

Tableau 03 : Résultats de la production d'acide indole acétique en $\mu\text{g/ml}$.

Souches	couleur	quantité de l'AIA en $\mu\text{g/ml}$
AZ4	Rose-rouge	27.43
P01	Rose-rouge	19.78

Au sein de la rhizosphère, presque 80% des bactéries sont capables de produire les hormones de croissance des plantes, dont l'AIA est le plus reconnu. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Spaenpen *et al.*, 2007 ; Dastager *et al.*, 2010). Une partie de l'AIA est reprise par la plante qui s'ajoute à l'AIA endogène de la plante pour stimuler la prolifération cellulaire des plantes et l'allongement racinaire. L'analyse du rôle de l'AIA montre que les bactéries utilisent cette phytohormone pour établir des interactions avec les plantes dans le cadre de leur stratégie de colonisation notamment la phytostimulation et l'intervention dans les mécanismes de base de défense des plantes (Ryan *et al.*, 2008). Certains PGPR dont *Pseudomonas putida* synthétisent et sécrètent des régulateurs de croissance telle que l'AIA qui infiltre les cellules végétales et stimule la croissance racinaire en augmentant la longueur de 35-50% (Patten et Glick, 2002).

En effet, Naik et Sakthivel (2006), ont suggéré que l'induction de la production d'AIA est probablement due à l'induction d'enzymes clé impliquées dans la biosynthèse d'AIA (Oberhansli *et al.*, 1991; Garcia de Salmone *et al.*, 2001). Ainsi, Selon la production de cette hormone est influencée par les conditions de culture, le stade de croissance et par la disponibilité du substrat dans le milieu. L'absence de production chez certaines souches serait liée à la perte de l'information génétique et du mécanisme physiologique de la biosynthèse de l'AIA (Mirza *et al.*, 2001 ; Mishra *et al.*, 2010).



Figure11 : Production de l'AIA chez les souches(P01) et(AZ4).

II.4. Solubilisation des phosphates

Après incubation à 28°C/7 jours, un halo de transparence apparaît autour des colonies ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates. Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre de la zone transparente autour de la colonie permettant ainsi d'évaluer l'intensité de la solubilisation $\text{Ca}_3(\text{P}_04)_2$ (Figure12).

La zone d'inhibition du phosphate solubilisé varie entre les deux milieux par la souche(P01) et la souche(AZ4), nous avons remarqué que la souche (AZ4) a enregistré une moyenne de 10.48 mm sur le milieu PVK et une moyenne de 10.22 mm sur le milieu NBRIP, et pour la souche (P01) enregistré une moyenne de 11.96 mm sur le milieu PVK et une moyenne de 10.11 mm sur le milieu NBRIP (Tableau 04).

Tableau04 : Résultats de solubilisation de phosphore en mm.

Souches	Milieu PVK	Milieu NBRIP
AZ4	10.48	10.22
P01	11.96	10.11

La solubilisation des phosphates est le résultat de l'acidification, de la chélation, des réactions d'échange d'ions et de production d'acides organiques de faible poids moléculaire. Le principal mécanisme de solubilisation est souvent la production d'acides gluconique et 2-cétogluconique les plus fréquemment rencontrés. D'autres acides organiques - glycolique, oxalique, malonique et succinique - sont également identifiés. Ils sont produits par la voie d'oxydation directe au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries conduisant à l'acidification des cellules et leur environnement et par conséquent à la libération du phosphate sous forme ionique. Par contre, la libération des groupements phosphates liés aux composés organique est assurée par l'action des phosphatases (Nautiyal, 1999).

L'isolement des microorganismes à partir de niches microbiennes pertinentes est indispensable afin d'augmenter les chances en vue de leur utilisation comme moyen d'amélioration de la solubilisation des phosphates. Le principe général d'adaptation bactérienne au stress peut être provoqué par l'exposition prolongée à une intensité sublétales du même stress ou dans certains cas à un autre stress. En effet, les souches isolées à partir de sols acides ont le potentiel de solubiliser les phosphates dans des conditions stressantes (concentration en sel et pH élevés) (Thakuria *et al.* 2004). L'inoculation de plantes par les bactéries solubilisant les phosphates, *Herbaspirillum seropedicae* et *Burkholderia* spp. Augmentent le rendement de la récolte de 1,5 à 21% par rapport aux témoins non inoculés dans des conditions salines (Baldini *et al.*,2000). La solubilisation du phosphate par des souches de *Pseudomonas* isolées à partir des zones froides de l'Himalaya indique que ces souches ont développé la capacité de solubiliser le phosphate sous milieu stressant (alcalinité, salinité et dessiccation).

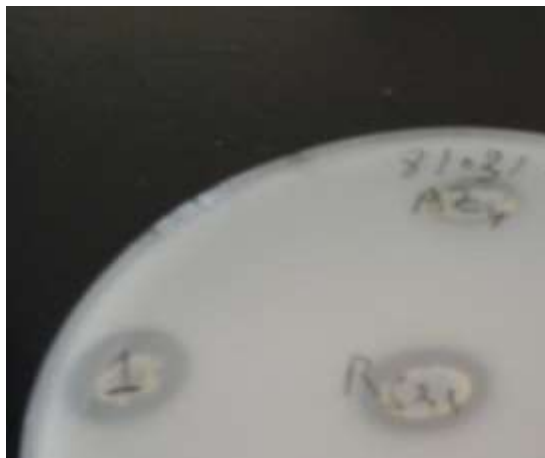


Figure12 : Solubilisation des phosphates chez les souches (P01) et(AZ4).

III. La tolérance au cuivre

Après 24 heures d'incubation, la CMI est indiquée par le tube contient la plus faible concentration bactérienne ou aucune croissance n'est visible. Notre résultats montrent que la souche AZ4 est la plus résistante au cuivre à une concentration de 400 mg\ l par apport la souche P01 qui résiste au cuivre à une concentration de 200 mg\l (Tableau 05) (Figure 13)

Tableau 05: résultat du teste de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Concentration de cuivre mg\l	0.078	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5	25	50	100	200	400	800
AZ4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
P01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(+) : croissance bactérie (-) : pas de croissance bactérie

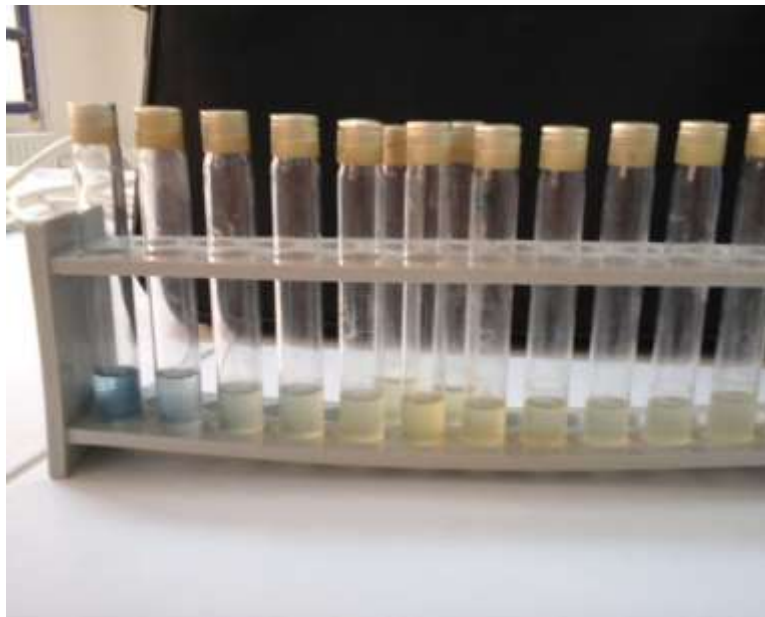


Figure 13: La Concentration minimale inhibitrice (CMI) chez la Bactérie (AZ4).

Ces bactéries produisent une substance appelée sidérophores pour inhibe l'effet de cuivre (Figure 09). Bien que les sidérophores soient définis comme des chélateurs spécifiques du fer, la formation de complexes stables entre ces molécules et des cations métalliques autres que le fer est connue pour quelques sidérophores (Hernlem et al., 1996).

En effet, les constantes d'affinité de la pyoverdine pour Cu^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} sont comprises entre 10^{17} et 10^{22}M^{-1} (Chen et al, 1994) tandis que celle pour le fer est de 10^{32}M^{-1} (Albrecht-Gary et al., 1994). La complexation de certains métaux, autres que le fer. La sécrétion des sidérophores par les micro-organismes est ainsi un paramètre important à prendre en compte dans les processus de migration des métaux toxiques dans l'environnement.

IV. Essai de bioremédiation de sol et biostimulation de la croissance végétale

Dans notre essai nous avons vérifié la viabilité de nos souches dans le substrat, étudié six paramètres de croissance (longueur des tiges et des racines, poids frais des tiges et de racine, poids sec des tiges et des racines), et trois paramètres physiologiques (la chlorophylle, la proline, et le sucre). Dans cette partie nous avons réalisé une seule discussion pour l'ensemble des paramètres étudiés.

Les analyses statistiques des résultats obtenus ont montré aucune différence significative pour l'ensemble des paramètres étudiés (paramètres de croissance et physiologiques) que soit pour facteur substrat, ou le facteur bactérie, ou leur interaction.

IV.1. Test de viabilité

Selon le test de viabilité, nous avons constaté nos bactéries de *Pseudomonas spp.* fluorescents (P01) et (AZ4) inoculés ont été viables à une concentration qui varie entre 10^5 à 10^6 CFU/ml. Sachant que, les souches de *Pseudomonas* doivent rencontrer un environnement favorable à l'expression de leur survie pour mettre en évidence les effets bénéfiques (Lemanceau, 1992), ils ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. La colonisation bactérienne est également influencée par la texture du sol (Bahme et Schroth, 1987). Ainsi que l'importance de l'origine géographique peut également influencer les degrés de colonisation et l'adaptation aux rhizosphères diversifiées (Digat, 1992).

Par leur importante diversité phylogénétique et métabolique, leur capacité à s'adapter et à coloniser des environnements extrêmes, ainsi qu'à développer des biofilms, ces bactéries apparaissent comme des organismes remarquables dans le règne du vivant (Gorbushina, 2007). La fixation des bactéries sur les surfaces minérales crée des micro-environnements les protégeant des stress environnementaux. Dans ces environnements, les bactéries vont extraire

des nutriments inorganiques et de l'énergie directement de la matrice minérale et/ou des micro-organismes les entourant (Uroz et al, 2009). Les mécanismes d'altération connus comprennent notamment des réactions d'oxydo-réduction ainsi que la production de composés altérants tels que les acides organiques et les molécules chélatrices de type sidérophores (Uroz et al, 2009). Les biofilms bactériens auraient également un rôle dans la dissolution des roches et minéraux (Gorbushina, 2007).

IV.2. Paramètre de croissance

IV.2.1. Longueur racinaire

Dans notre analyse de la variance, nous trouvons que l'expérience pratiquée sur la longueur des racines a montré que l'effet du cuivre est non significatif. Avec une longueur de substrat (sol + Cu) 50,21 mm, et dans le substrat (sol - cuivre) une longueur de 48,16mm (Figure 14).

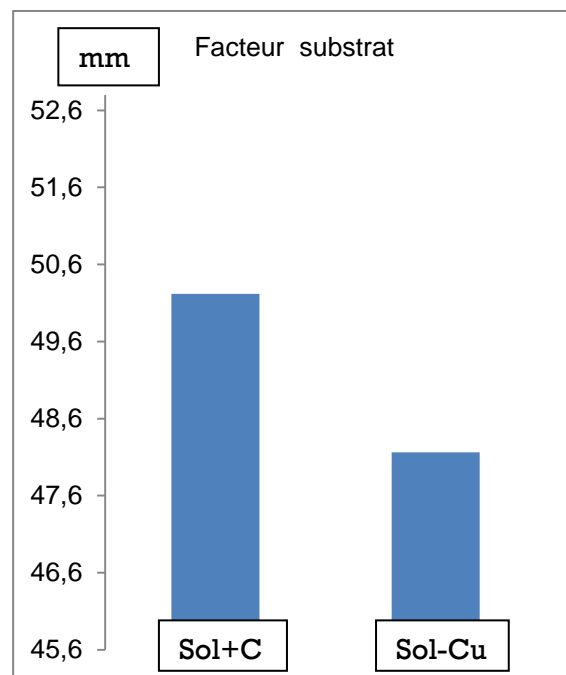


Figure 14 : Effets de facteur substrat sur la longueur racinaire (mm).

Nous avons trouvé que le facteur des souches bactériennes n'a pas effet sur la longueur des racines, avec une moyenne de 51mm pour la souche (AZ4) et pour une moyenne de 49,9 mm de la souche bactérienne (P01), suivie par le témoin avec une moyenne de 46,66mm(Figure15).

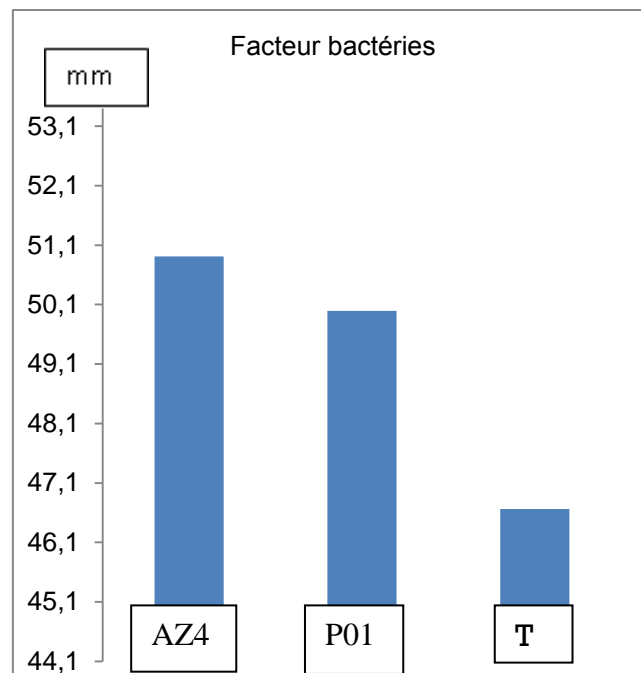


Figure15: Effets de facteur bactérie sur la longueur racinaire (mm).

IV.1.2. Hauteur des tiges

D'après l'analyse de la variance, dans la hauteur des tiges a révélée un effet non significatif pour le facteur substrat, le substrat (sol + cuivre) a atteint une moyenne de 191 .99 mm, et le substrat (sol - Cu) une moyenne de 158 .77 mm (Figure 16).

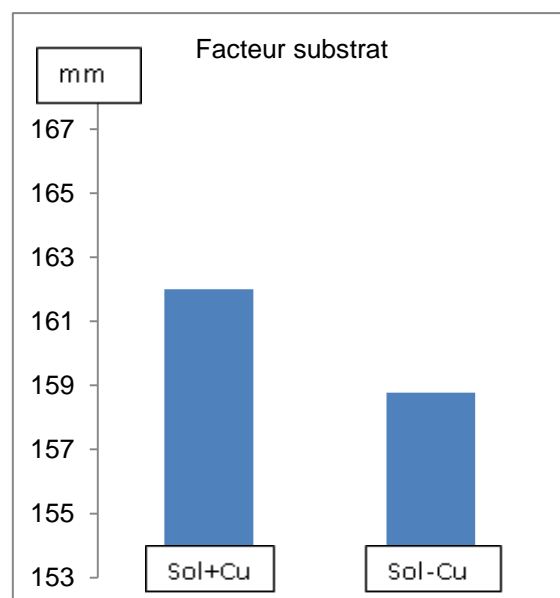


Figure 16 : Effets de facteur substrat sur la hauteur des tiges (mm).

La même situation pour le facteur bactérie, les résultats sont non significatifs pour la hauteur enregistrée, la souche bactérienne(AZ4) est d'une moyenne de 168. 16mm, et de

166.66mm pour la souche (P01), suivi par le Témoin avec une moyenne de 146.33mm (Figure17).

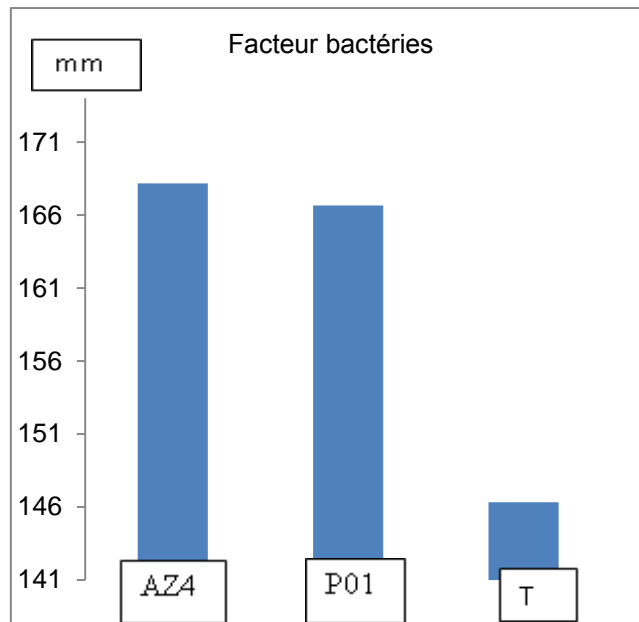


Figure17: Effets de facteur bactérie sur la hauteur des tiges (mm).

IV.1.3. Poids frais et sec des racines

L'analyse de la variance pour Le facteur substrat n'a montré aucune différence significatif dans le poids frais et sec des racines, avec un poids frais de 0.70g et un poids sec de 0.52g pour le facteur substrat (sol + Cu) et avec un poids frais de 0.68 g et un poids sec de 0.38g pour le facteur substrat (Sol - Cu) (Figure 18).

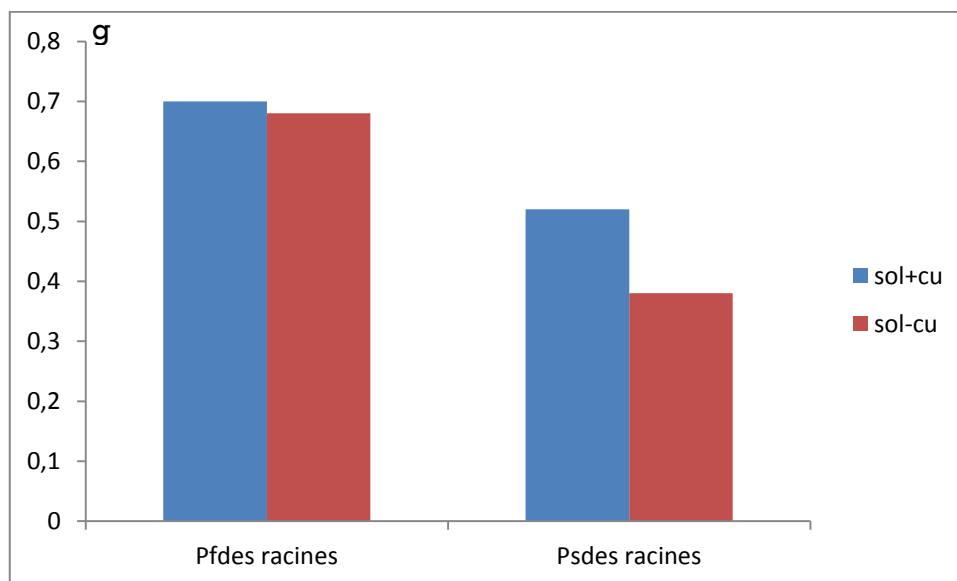


Figure 18 : Effets de facteur substrat sur le poids frais et sec des racines (g).

Il n'y a pas une différence significative à l'effet des bactéries sur le poids frais ou sec des racines, les souches bactériennes (AZ4) et (P01) ont données des moyennes respectivement en poids frais et sec de 0.81g, 0.49g, et de 0.70g, 0.44g, suivie par le témoin non bactérisé avec des moyennes respectivement en poids frais et sec de 0.56g et 0.42g (Figure 19).

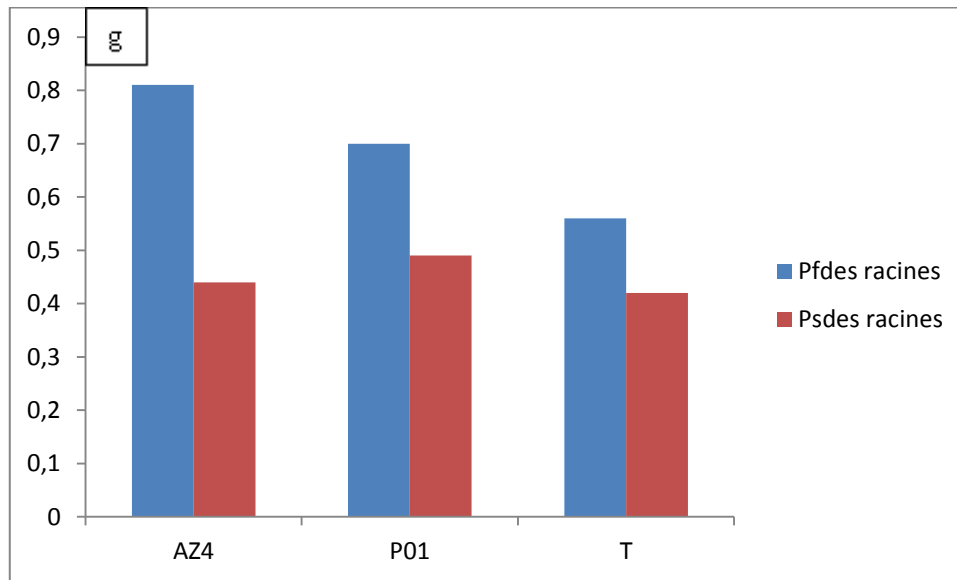


Figure 19: Effets de facteur bactérie sur le poids frais et sec des racines (g).

IV.1.4. Poids frais et sec des tiges

L'analyse de la variance, le poids frais de la tige a révélé aucune différence significative pour le facteur substrat, le poids frais et sec des tiges dans le substrat (sol + Cu) ont atteint successivement des moyennes de 0.57g et de 0.090g, et dans le substrat (sol-Cu) a donné des moyennes successivement de 0.42g et de 0.097g (Figure 20).

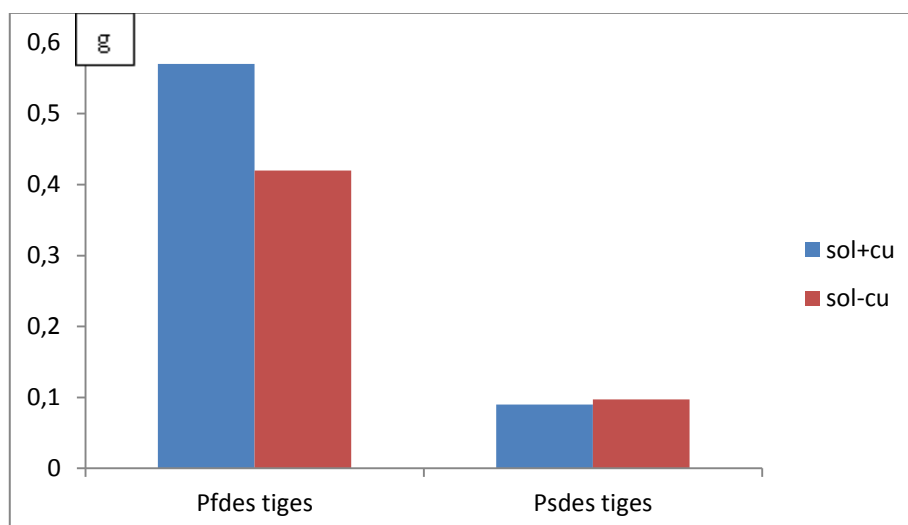


Figure 20: Effets de facteur substrat sur le poids frais et sec des tiges (g).

Il n'y a pas une différence significatif pour le facteur bactéries sur le poids frais et sec des tiges, les souches bactériennes (P01) et (AZ4) ont données des moyennes respectivement en poids frais et sec de 0.57g et de 0.53g, et de 0.095g et de 0.098g, et après le témoin non bactérisé a donné des moyennes de 0.38g dans le poids frais et de 0.088g dans le poids sec (Figure 21).

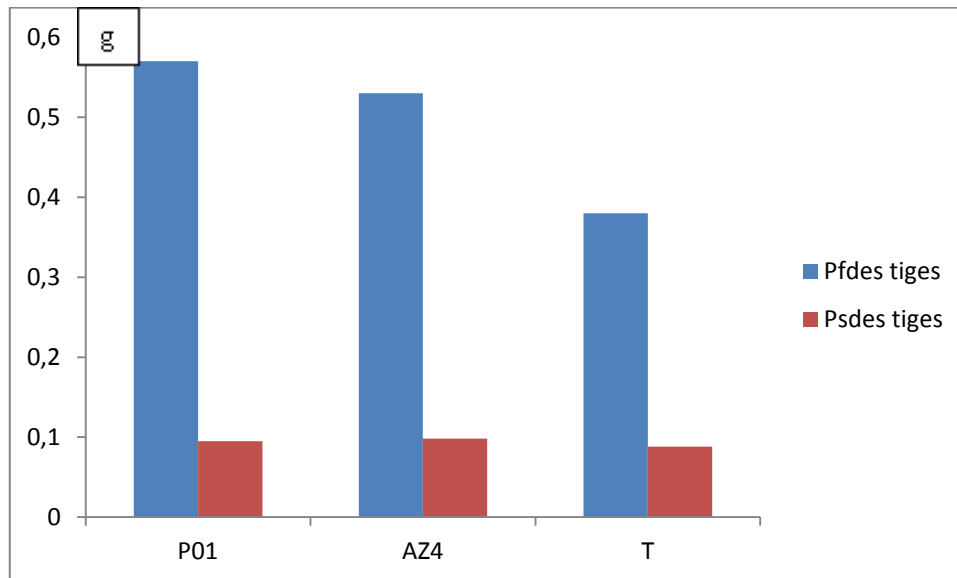


Figure 21: Effets de facteur bactérie sur le poids frais et sec des tiges (g).

IV.2. Paramètre physiologique

IV.2.1. La teneur de La chlorophylle

L'effet du cuivre sur la teneur en chlorophylles est étudié en des teneurs en chlorophylle (a), chlorophylle (b) et en chlorophylle totale (a+b), où les résultats de l'analyse de la variance ont été non significatifs pour tous les facteurs étudiés.

Selon L'analyse de la variance, Le facteur substrat n'a montré aucune différence significative avec un totale de 45.22mg/let de 35.36mg/l en chlo(b) et un teneur de 10.04 mg/l en chlo(a) pour les plantes dans le substrat (sol + Cu), et un totale de 40.31 mg/l et de 31.57 mg/l en chlo(b) et un teneur de 9.88 mg/l en chlo(a) pour les plantes dans le substrat (Sol - Cu)(figure22).

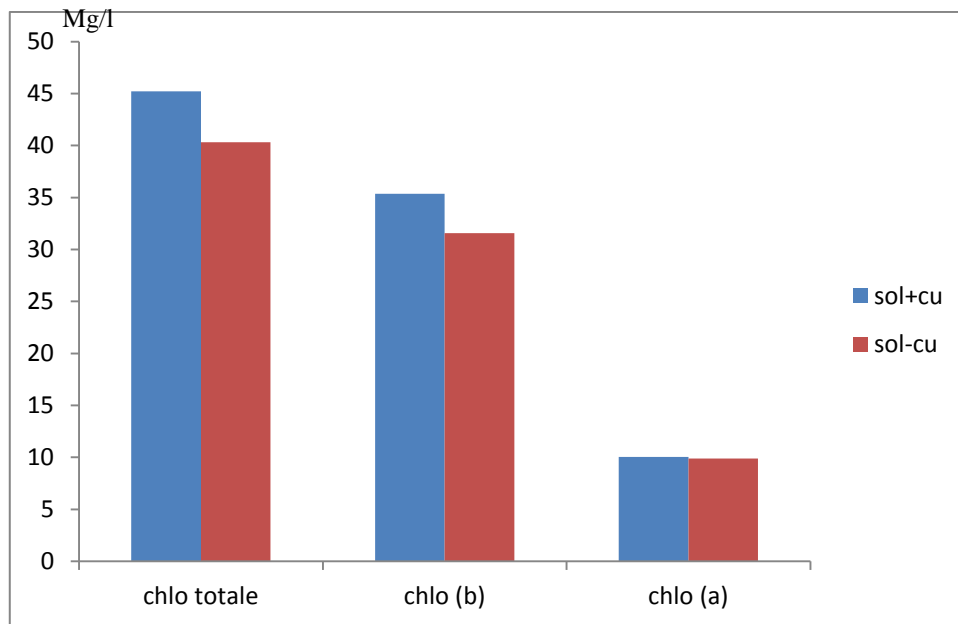


Figure 22 : Effets de facteur substrat sur le dosage de la chlorophylle en mg/ l.

Les résultats soulignés, selon l'analyse de la variance, a révélé une différence non significatif pour le facteur bactérie, pour la souche (P01) les moyennes de un teneur totale de chlo de 46.74 mg/let de 35.18 mg/l en chlo(b), en chlo(a) est de 11.57mg/l, et pour la souche (AZ4),un totale de 39.21mg/l, et de 30.79mg/l en chlo(b) et de 10.43mg/l, le témoin a enregistré successivement des moyennes de 42.35, 34.42 et 7,87mg/lpar le chlo totale et par chlo(b) et par chlo(a)(figure23).

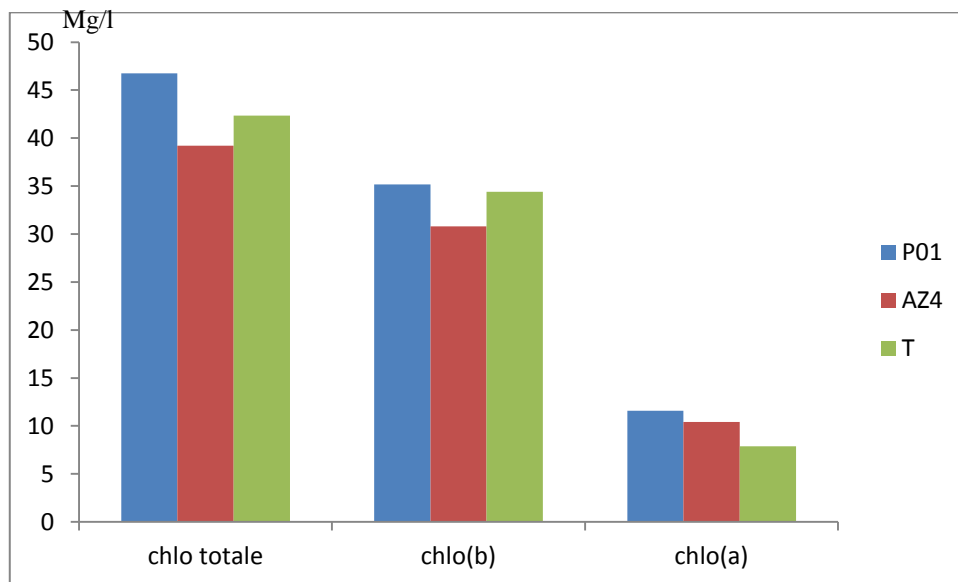


Figure 23 : Effets du facteur bactérie sur le dosage de la chlorophylle en mg/ l.

IV.2.2. la teneur en proline des feuilles et des racines des plantes de blé

D'après L'analyse de la variance, nous n'avons pas observé un effet significatif pour le facteur substrat, le substrat (Sol + Cu) a donné un teneur de $13.17\mu\text{g/g}$ dans les racines et de $9.89\mu\text{g}$ dans les feuilles, et pour le substrat (sol - Cu) a donné un teneur de $10.43\mu\text{g/g}$ dans les racines et de $8,55\mu\text{g/g}$ dans les feuilles (figure24).

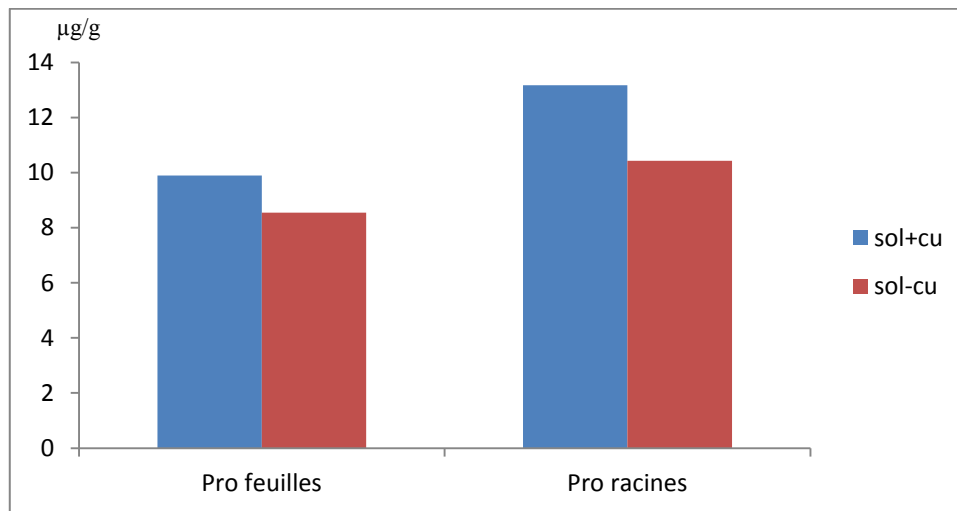


Figure 24: Effets de facteur substrat sur le teneurduproline en µg/g.

Le facteur des souches bactériennes n'a pas d'effet sur la teneur en proline dans les feuilles et les racines où le témoin a donné une moyenne de $14,31\mu\text{g/g}$ dans les racines et de $10.27\mu\text{g/g}$ dans les feuilles, alors que la souche bactérienne (AZ4) a donné une moyenne de $11,23\mu\text{g/g}$ dans les racines et de $6.90\mu\text{g/g}$ dans les feuilles, et la souche (P01) a enregistré un teneur dans les feuilles de $10.50\mu\text{g/g}$ et un teneur de $9,86\mu\text{g/g}$ dans les racines (figure25).

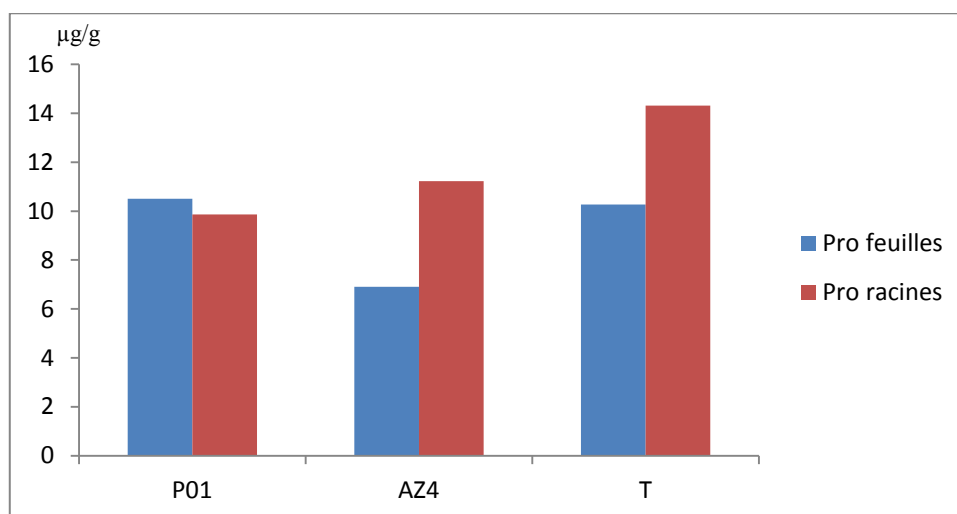


Figure25 : Effets de facteur souche sur le teneur de la proline en µg/g.

IV.2.3. La teneur des sucres solubles dans les feuilles

Selon l'analyse de la variance, Il n'y a pas d'effet significatif pour le facteur substrat, le substrat (sol + Cu) a donné une moyenne de 25,58 $\mu\text{g/g}$, pour (sol - Cu) a donné une moyenne de 17,64 $\mu\text{g/g}$ (figure26).

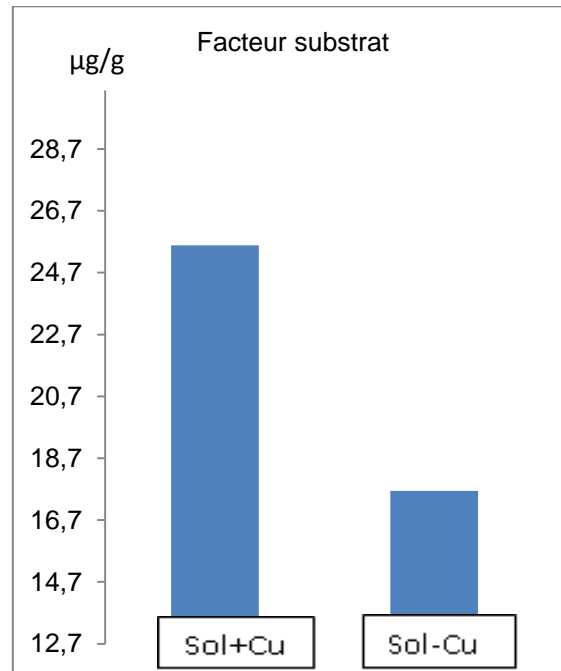


Figure 26: Effets de facteur substrat sur la teneur du sucre dans les feuilles $\mu\text{g/g}$.

Nous avons noté que le facteur bactérie est un effet non significatif, la souche (P01) a donné une moyenne de 24,61 $\mu\text{g/g}$, suivie par le Témoin non bactérie avec une moyenne de 20,17 $\mu\text{g/g}$, la souche (AZ4) avec une moyenne de 20,05 $\mu\text{g/g}$ (figure27).

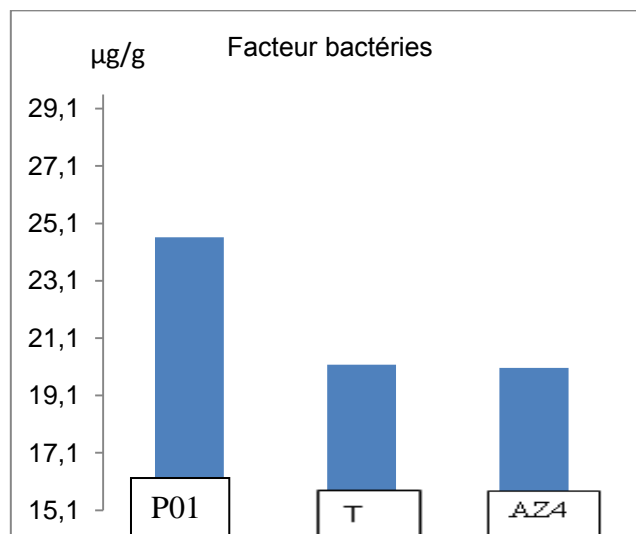


Figure 27: Effets de facteur souche sur la teneur du sucre dans les feuilles $\mu\text{g/g}$.

IV.3. Discussion

Notre travail consiste à la mise en évidence de l'effet bénéfique de *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophyte sur la croissance des plantes de blé dans un sol pollué par le cuivre et sa Bioremédiation.

Selon les diverses activités de phytostimulation (production de l'AIA), de biofertilisation (solubilisation des phosphates) et production de sidérophores de *Pseudomonas spp.* fluorescents, nous avons obtenu que nos souches (P01) et (AZ4) ont la capacité de produire les sidérophores qui responsable de la dépollution et aussi ont la capacité de produire l'AIA et solubilisé le phosphate, fixée l'azote de l'air, et sa capacité de tolérée des concentrations élevées du cuivre.

Nos résultants de l'essai de biostimulation des plantes de blé et la bioremédiation de sol n'ont aucun différence significatifs pour l'ensemble des paramètres étudiés que ce soit les paramètres de croissance ou les paramètres physiologiques.

Les souches bactériennes n'ont révélée aucun effet significatif sur la croissance végétale.

D'après les résultats obtenus, la présence du cuivre dans le substrat n'aucun effet néfaste sur le végétal, pas de symptômes observée sur la plante que ce soit excès ou déficience du cuivre (décoloration, rhizotoxicité, diminution de l'élongation racinaire,... etc.).

Selon le test de viabilité nous avons réalisé que la bactérie *Pseudomonas spp.* fluorescents est viable dans nos substrats.

La chlorophylle est un pigment vert, responsable de la capture de l'énergie lumineuse utilisée dans la photosynthèse (Hopkins, 2003), assure la croissance des plantes en combinant l'eau et le gaz carbonique nécessaire à l'élaboration de sucres et d'amidon, source d'énergie indispensable au métabolisme de la plante (Vallée et *al.*, 1999).

La chlorophylle est existé à deux principaux types chez les plantes : la chlorophylle **a** et la chlorophylle **b**. Chez les plantes, seule la chlorophylle **a** est directement impliquée dans les réactions lumineuses, elle absorbe la lumière des régions bleu violet et rouge du spectre et apparait vert foncé, car elle réfléchit principalement la lumière verte (Brack et Mathis, 2000).

La chlorophylle **b** n'est pas directement impliquée dans les réactions lumineuses, mais transmet l'énergie absorbée à la chlorophylle **a**. La chlorophylle **b** est donc appelé pigment accessoire, la teneur en pigments chlorophylliens est souvent utilisée pour évaluer l'impact de nombreux stress environnementaux (Brack et Mathis, 2000).

La proline est une molécule organique dominante qui agit comme un médiateur de l'ajustement osmotique sous le stress, un stabilisateur de structures subcellulaires, un puits d'énergie, et même une contrainte connexe de signal. Elle participe aussi dans l'osmorégulation de la cellule et de la protection des protéines au cours de la déshydratation, et il peut agir comme un régulateur enzymatique en conditions de stress (Rontain *et al.*, 2002)

Outre son rôle dans le métabolisme primaire en tant que constituant des protéines, la proline est l'un des solutés compatibles le plus fréquemment accumulé en réponse à des contraintes environnementales variées et joue un rôle important dans la tolérance des plantes. La proline a été proposée comme stabilisateur de protéines et de complexes macromoléculaires, piègeur de radicaux libres et régulateur du potentiel redox cellulaire (Kilani *et al.*, 2012). La concentration intracellulaire de la proline dépend d'une régulation fine entre biosynthèse et sa dégradation (Kilani *et al.*, 2012).

D'une manière générale, l'accumulation de la proline se manifeste dans les feuilles et les racines, ce qui présume que cet acide aminé est synthétisé dans les feuilles et migre vers les racines. En revanche, pour d'autres espèces, la proline se localiserait dans les racines chez le *Retam* (Ighil, 1990) et le maïs (Rodriguez *et al.*, 1997).

La synthèse de la proline est une mesure adaptative prise par les plantes, qui peut être une réponse aux stress abiotiques (Csonka, 1996) ou biotiques (Slama *et al.*, 2006).

Si les sucres sont les éléments carbonés primaires synthétisés et exportés dans toute la plante lors de la photosynthèse, ils ont également un rôle non énergétique d'osmorégulateur et d'osmoprotecteur (Yancey, 1982). L'augmentation de la teneur en sucres ou dérivés et leur rôle dans la réponse aux stress ont été établis depuis longtemps chez de nombreuses espèces (Gorham *et al.*, 1981).

L'accumulation des sucres solubles observés au niveau foliaire est parmi les phénomènes les plus observés dans la réponse au stress Costa et Spitz (1997) puis Dubey et Singh (1999) suggèrent que cette accumulation de glucides solubles a été rapportée en réponse à différents stress environnementaux et particulièrement des métaux, stratégie adoptée par les plantes afin de résister aux contraintes du milieu (Bajji *et al.*, 1998 ; El Midaoui *et al.*, 2007). Selon Clifford *et al.* (1998), l'accumulation des sucres solubles peut résulter d'une augmentation de l'hydrolyse de l'amidon puisqu'ils ont enregistré, simultanément, une diminution de l'amidon et une accumulation de sucres solubles dans les tissus stressés. La teneur élevée des hexoses, essentiellement au niveau des feuilles âgées, pourrait témoigner soit d'une limitation de leur utilisation suite à l'arrêt de croissance (Lawlor., 2002), soit d'une force d'appel importante et

leur hydrolyse par des enzymes présentes dans ces organes (Mouri et *al.*, 2014). Cette accumulation pourrait avoir un rôle osmotique empêchant la déshydratation des cellules et le maintien de la balance de la force osmotique pour garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevés que possible (Bouzoubaa et *al.*, 2001).

D'après les résultats obtenus, pas d'effet du cuivre sur la croissance des plants de blé (absence des symptômes de phytotoxicités) qui nous pousse à dire que dans cet essai le blé a résisté une dose élevée du cuivre **200ppm** (deux fois la dose tolérée dans les sols), ce qui a été confirmé par les résultats des paramètres de croissance et surtout les paramètres physiologiques.

Conclusion

Conclusion

Notre objectif était étudié l'effet bénéfique de la bactérie *Pseudomonas spp.* fluorescents dans le cas sol polluée par le cuivre.

Le Cu est un des éléments les plus essentiels pour les plantes et les animaux mais il représente un danger quand il est présent en concentration élevée dans l'environnement. Par son action sur les racines des plantes.

Selon les diverses mécanismes d'action phytostimulation (production de l'AIA), de biofertilisation (solubilisation des phosphates) et production de sidérophores de *Pseudomonas spp.* fluorescents, nous avons conclu que nos souches testés (**P01 et AZ4**) ont la capacité de produire l'AIA à un taux de 27.43µg/ml dans la souche (**AZ4**) et un taux de 19.78µg/ml dans la souche (**P01**), et capable de solubilisé le phosphate $Ca_3(P_04)_2$ et ont la capacité de produire les sidérophores, et aussi ont la capacité de tolérée des doses élevées du cuivre (test de CMI), qui nos résultants que la souche (**AZ4**) est la plus résistante avec une concentration de **400mg/l** par apport la souche (**P01**) avec une concentration de **200mg/l**.

D'après les résultats de notre essai *in vivo*, l'étude de la biostimulation de la croissance de blé dans des conditions de stress à savoir un sol pollué par le cuivre, les paramètres de croissance (mensuration sur les racines et les tiges, les poids frais et sec des racines et tiges) et les paramètres physiologiques (la détermination de la teneur en chlorophylle, la teneur en proline et la teneur de sucre soluble) qui n'ont montré aucune d'effet significatif pour l'ensemble des paramètres de croissance et physiologiques. En plus de l'absence de symptômes de phytotoxicité, sachant aussi que nos bactéries ont été viables dans les substrats, nous pouvons conclure que le blé variété vitron peut tolérer une dose de cuivre dans le sol de **200ppm**.

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées nous suggérons:

- Pour les mécanismes d'action de *Pseudomonas spp.* fluorescents faire des essais supplémentaires en présence de cuivre et d'autres métaux lourds.
- Refaire l'essai *in vivo* pour la tolérance au cuivre avec plusieurs doses.
- Extraction et dosage de cuivre dans les végétaux par la spectroscopie d'absorption atomique.
- Il peut faire des essais pour quantifie la mobilisation de cuivre par la bactérie *Pseudomonas spp.* fluorescents.
- Refaire des essais pour confirmer la colonisation des racines par *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Abdelly C., 2007. Bioremédiation / Phytoremédiation. Institut supérieur de l'éducation et de la formation contenant. Universités de TUNIS.

Abbassenne F., Bouzerzour H., Hachemi L., 1998. Phénologie et production du blé dur (*Triticum durum* Desf) en zone semi-aride d'altitude. Annales Agronomique INA, 18 : p24-36.

Acia, 2006. La biologie de *triticum turgidum* ssp *Durum*. Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 12 p. (En ligne) [http:// www. Inspection. gc.ca/français/ paveg/bio/dir/dir0607f. Shtml.](http://www.inspection.gc.ca/français/paveg/bio/dir/dir0607f.shtml)

Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. 223 - 232.

Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S.R., Ocaktan, A.Z. and Abdallah, M.A. 1994. Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem*, **33**, 6391-6402.

Alloway B.J. 1995. In "Heavy Metals in Soils", seconde édition, Ed. Alloway B.J., Blackie Academic and Professional, Londres (Royaume-Uni).

Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* **163**: 173-181.

Bacon J ; Clifton C ; Connor D ; Felder A ; Foster S ; Graue J ; Loyer J ; Moorachian M ; Rabb C ; Sandall P ; Santich S ; Stybe K ; Stybe R, 2013. 500 Plantes comestibles. Histoire Botanique Alimentation. Delachaux et Nistlé, Paris.

Bahlouli F., H. Bouzerzour, A. Benmahamed, K.L. Hassous, 2005. Selection of high yielding and risk efficient durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars under semi arid conditions. *Pak.J. Agron.* 4: p360-365.

Bahme, J. B. et Schroth, M. N. 1987. *Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato.* *Phytopathology* 77 : 1093-1100.

- Baize, D. 1997.** Teneurs totales en éléments trace métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris.
- Baldy C, 1984.** Utilisation efficace de l'eau par la végétation en climats méditerranéens. Bull.soc. Botan. Fr 131 (2, 3,4) (Actuel. Botan) 491-499.
- Baker, A.J.M. ET Walker, P.L. 1990.** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. Shaw, A. (Eds). CRC Press, 155 -177.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C.2007.** Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. **97**(2):239-243.
- Baldini, M., R. Giovanardi, S. Tahmasebi-Enferadi et G.P.Vannozzi 2000.** Effects of water regime on fatty acid accumulation and final fatty acid composition in the oil of standard and high oleic sunflower hybrids. *Ital. J. Agron.*, **6**(2): 119-126.
- Bano N. and Musarrat J., 2003.** Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Cur. Microbiol.* **46**: 324-328.
- Bajji M., Kinet J M et Lutts Stanley., 1998 -** Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science*. **137**: 131- 142.
- Bedrani S, 2004.** L'alimentation de rue en Algérie : quelques réflexions sur la base d'une enquête visuelle rapide. Alger : Food and Agriculture Organisation (FAO) 2004.
- Belaid D, 1986.** Aspect de la céréaliculture Algérienne. Edition OPU, Alger, 207 pages.
- Belaid D, 1996.** Aspects de la céréaliculture Algérienne. Ed. Office des publications.
- Becker, J.O. and Cook, R.J., 1988.** Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* **78**:778–782.
- Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva, V.A., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz, K. J. and Stepanok, V.V., 2001.** Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can. J. Microbiol.* **47**: 642–652.

Bent, E. 2005. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR) and fungi (PGPF). In *Multigenic and induced systemic Resistance in Plants*, edited by S.Tuzun and E. Bent: Springer, NY.

Berggren, I., van Vuurde, J.W.L. and Martensson, A.M. (2001). Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* pv. *viceae*. *Appl. Soil Ecol.* **17**(2):97-106.

Bitter, W., Marugg, J.D., de Weger, L.A., Tommassen, J. and Weisbeek, M. P. J., 1991. The ferric-pseudobactin receptor PUPA of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to TonB-dependent *Escherichia coli* receptors and specificity of the protein. *Mol. Microbiol.* **5**: 647-655.

Boulal H., Zaghouane O., El mourid M et Rezgui S, 2007. Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orges) dans le Maghreb (Algérie, Maroc et Tunisie). Coédition ITGC/INRA/CARDA. 176 pages.

Bonmatin, J.M., Laprevote, O. and Peypoux, F. 2003. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **6**(6):541-556.

Bourelle P-H, Berthelin J, 1998. Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. Rapport de l'Académie des sciences n°42.

Bloemberg, G.V. et B.J.J. Lugtenberg 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**:343-350.

Bouzoubaa Z., El Mourid M., Karrou M et El Gharous M., 2001 - Manuel d'analyse chimique et biochimique des plantes. Eds INRA Maroc.

Brack A. et Mathis P. 2000- *La Chimie du vivant : de la protéine à la photosynthèse*, Editions Le Pommier-Fayard, ISBN 2 746 50077 9. Une introduction simple à la compréhension des phénomènes photochimiques.

Braud, A. Hannauer, M. Mislin, G.L.A. Schalk, I.J. 2009. *The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. Journal of Bacteriology.*

Bravin M., 2008. Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole. Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier SupAgro, 203p.

Brun L.A., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy J.C., 1998. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution*, 102, 151-161.

Budzikiewicz, H., 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* 104.

Budzikiewicz, H., 1997. Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z. Naturforsch* 52 (C): 713-720.

Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R., 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3663-3668.

Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J., 1999. Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**:1670-1680.

Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E. and Hadar, Y. 1994. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, **58**, 390-396.

Clemens S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475-486.

Cleveland, C.C., A.R. Townsend, D.S. Schimel, H. Fisher, R.W. Howarth, L.O. Hedin, S.S Perakis, E.F. Latty, J.C. Von Fischer, A. Elseroad, et M.F. Wasson 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 13: 623-645.

Clifford SC., Arndt SK., Corlett JE., Joshi S., Sankhla N., Popp M et Jones HG., 1998 - The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J Exp Bot* 49: 967-977.

Coïc Y., Coppenet M., 1989. Les Oligoéléments en Agriculture et Elevage. Incidences sur la Nutrition Humaine. INRA, Paris.

Cook J., Johnson A., Allan R E, 1991. Le Blé. Méthodes traditionnelles de sélection des plantes : un aperçu historique destiné à servir de référence pour l'évaluation du rôle de la biotechnologie moderne. Organisation de coopération et de développement économiques, Belgique, pp 27-38.

Costa G et Spitz E., 1997 - Influence of cadmium on soluble carbohydrate, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. Plant Sci. 128: 131-140.

Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L. and Cook, J.C., 1981.Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter from *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78: 302-308.

Csonka, L.N. et W. Epstein 1996. Osmoregulation. pp: 1210–1223. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Neidhard FC et al. (eds). ASM Press, Washington, DC.

Curl E. A. et B. Truelove 1986. The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.

Dastager, S.G., C.K. Deepa et A. Pandey 2010. *Potential plant growth promoting activity of Serratia nematophila NII-0.928 on black papper (Piper nigrum L.). World J.Microbiol. Biotechnol., 27: 259-265.*

Davis R.D., Beckett P.H.T., 1978. Upper critical levels of toxic elements in plants. II.Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass. New Phytologist, 80, 23-32.

De la perrière R A B, 2014. Semences paysannes, plante de demain. Edition : Charles Léopold Mayer. 226 pages.

De Weger, L.A., Dekkers, L.C., van der Bij, A.J. and Lugtenberg, B.L.L., 1994. Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. Mol. Plant-Microbe Interact. 7: 32-38.

Digat, 1992. *Contrôle biologique et stimulation de germination par la bacterisation.* Phytoma-Défense des végétaux 441 : 34-38.

Dommergues, Y. Mangenot, F. 1970 .Ecologie microbienne du sol. Paris : Masson.

- Dubey R S et Singh A K., 1999** - Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants. *Biol. Plant.* 42: 233-239.
- Dubuis, C., Keel, C. et Haas, D. 2007.** Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. Dans "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research", Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas, p 311-328.
- Ducellier L, 1931.** Espèces et variétés de céréales cultivées en Algérie. Direction de l'agriculture et de la colonisation. 130pages.
- Duhoux E, Franche C 2003.** Actinorhizal nodules of Casuarina. *Biofutur*: 45.
- El Midaoui M., Benbella M., Aït Houssa A., Ibriz M et Talouizte A., 2007** -Contribution à l'étude de quelques mécanismes d'adaptation a la salinité chez le tournesolcultivé (*Helianthus annuus* L.). *Revue Hommes Terre et Eaux* n°136. P 29 – 34.
- Erroxx J, 1974.** Agronomie méditerranéenne. Tome 1. le milieu méditerranéen et ses problèmes. Les cultures vivrières en Algérie. 387p.
- Eyi Ndong, H. 2009.** Etude des champignons de la forêt dense humide consommée par les populations du nord du Gabon. Thèse de doctorat :Université d'Ouagadougou.
- Fallik, E., S. Sarig et Y. Okon 1994.** Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. pp: 77–85. In: *Azospirillum–Plant Associations*. Okon Y. (ed.). CRC Press, Boca Raton.
- Feillet P, 2000.** Le grain de blé (composition et utilisation), Ed IARA, P57-281.
- Ferus, P. Arkosiova, M. 2001.** *Variability of chlorophyll content under fluctuating environment, Actafytotechnicaetzootechnica*, Vol, 4, Special number proceedings of the international scientific.
- Gadd GM, 2004.** Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation.*Geoderma* 122: 109-119.
- Gadd, 2007.** Geomycology: biogeochemical transformation of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res*,111.

- Gate P, 1995.** Ecophysiologie du blé, de la plante à la culture. Lavoisier Tec and Doc. Paris, 430 p.
- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD 2004.** Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *Fems Microbiology Ecology* **47**: 51-64.
- Garbaye, J. 1994.** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley review, 76). *New Phytologist*, 128: 197-210.
- Garcia de Salmone, I. E., Hynes, R. K. and Nelson, L., 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* **47**: 404-411.
- Germida, J.J. ET De Freitas, J.R., M.R. 1998.** Phosphate-solubilising rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertiliz. Soils*, 24.
- Glick, B.R., 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117 190: 63-68.
- Glick, B.R., Patten, C.L, Holguin, G. and Penrose, D.M., 1999.** Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK.
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng ZY, Duan J, McConkey B 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**: 227-242.
- Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M.K. and Pasternak, J.J., 1994.** 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* **40**: 911-915.
- Gobran GR, Clegg S, Courchesne F 1998.** Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems. *Biogeochemistry*.
- Gorbushina, AA. 2007.** Life on the rocks. *Environmental Microbiology* **9** : 1613-1631.
- Gorham, J., L.Y. Hughes et R.G. Wynjones 1981.** Low molecular weight carbohydrates in some salt stressed plants. *Physiol. Plant*, **53**: 27-33.

- Gray EJ, Smith DL 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*.
- Grichko, V.P. and Glick, B.R., 2001.** Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 11-17.
- Grover, J.P. 2004.** Predation, competition, and nutrient recycling: a stoichiometric approach with multiple nutrients. *J. Theor. Biol.* **229**(1) :31-43.
- Grignac P, 1977.** Le Blé dur: monographie succincte. Annals de l'INA 1978. 15p.
- Grosch W, 1986.** Redox system in dough. Chemistry and physics of baking J.M.V. Blanshard, P.J. Frazier and T. Galliard. Ed Royal Society of Chemistry, London.
- Gupta, S.S. 2003.** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**(3):219-227.
- Haas, D. and Keel, C. 2003.** Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:117-153.
- Haas, D. and Defago, G. 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(4) :307-319.
- Hakimi M, 1993.** L'évolution de la culture de l'orge : le calendrier climatique traditionnel et les données agro météorologiques modernes. In the agrometeorology of rainfed barley-based farming systems. Proceeding of an International symposium .Ed. Jones M., Marthys G., Rijks D. 157 -166.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD 2008.** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* **16**: 463-471.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004.** *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:43-56.
- Hazen TC, Tabak HH, 2005.** Developments in bioremediation of soils and sediments Polluted with metals and radionuclides: 2. Field research on bioremediation of metals and radionuclides. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **4**: 157-183.

Hernlem, B.J., Vane, L.M. and Sayles, G.D. 1996. Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. *Inorganica Chimica Acta*, **244**, 179-184.

Hiltner L 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf Gebiete der Bodenbakteriologie.

Hopkins W.G. , 2003. Physiologie végétale. De Boeck Université (2^{ème} édition), Bruxelles, pp 467-479.

Hinsinger P, Jaillard B, Dufey JE 1992. Rapid weathering of a trioctahedral mica by te roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal*.

Ighil Hariz Z., 1990. Etude du comportement physiologique, biochimique et structural du *Retama retam* (R'tam) vis à vis du chlorure de sodium. Mémoire Magister, Université Es-Senia, Oran, 120.

Ice.2011. https://www.theice.com/publicdocs/futures_Canada_/ICE_Durum_Wheat_white_paper.pdf

Jewell A.W., Murray B.G., Alloway J., 1988. Light and electron microscope studies on pollen development in barley (*Hodeum vulgare* L.) grown under copper-sufficient and deficient conditions. *Plant cell & Environment*, 11, 4, 273-281.

Jofre, E., Lagares, A. and Mori, G. 2004. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**(2) :267-275.

Kabata Pendias A., 2010. Trace elements in soils and plants. 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida

Karou M., Haffid R., Smith DN., Samir K, 1998. Roots and shoot growth water use and water use efficiency of spring durum wheat under early-season drought. *Agronomie* 18, p181-186.

Kellou Rym, 2008. Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréaliers français dans le cadre du pôle de compétitivité Quali-Méditerranée. (Master of Science, IAMM 2008, Série Thèses & Masters n°93).

Kent, N. L., Evers, A. D, 1994. Technology of cereals: an introduction for students of food science and agriculture. Wood Head Publishing, 334 p.

- Khalid, A., M. Arshad et Z.A. Zahir 2004.** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 473-480.
- Khan, M. S ., A. Zaidi., et M. Javed 2009.** Microbial Strategies for Crop Improvement. pp: 1-371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kilani B.R., Chedly A. et Arnould S. 2012-** La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biologie Aujourd'hui*. Volume 206, Numéro 4.
- Kim, K.Y. and McDonald, G.A., 1998.** Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscularmycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Fert. Soils* 26: 79-87.
- King et al., 1954 King E.O., Ward M.K. and Raney D.E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med.*, 44, 301-307.
- Klement, z. 1990.** *Methods in phytobacteriology*. Ed printed : Hungary. 568p.
- Kloepper, J. W., ET M. N. Schroth 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. pp. 879-882. In: Proceedings of the fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 2. Station de Pathologie Végétale ET de Phytobactériologie, INRA, Angers, France.
- Kopittke P.M., Menzies N.W., 2006.** Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil*, 279, 287-296.
- Lamanceau P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie*, 12, pp 413-437.
- Lawton JH, Jones CG 1995.** Linking species and ecosystems. Organisms as ecosystems engineers. In *Jones CG and Lawton JH (Eds) Linking Species and Ecosystems Chapman and Hall Inc.*
- Lawlor D W., 2002 -** Limitations to Photosynthesis in water-stressed leaves: stomatal vs metabolism and the role of TP. *Annals of Botany* 89: 871 – 885.
- Latour, X., Philippot, L., Corberand, T. and Lemanceau, P. 1999.** The establishment of an introduced community of fluorescent *Pseudomonads* in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 163-170.
- Large EC, 1954.** Growth stages in cereals. Illustration of the feekes scale. *Plant pathology* 3, p128-129.

- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S. 2006.** Purification, Characterization and synergistic activity of [beta]-1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* **38**(7) :990-997.
- Le Clech B, 2000.** Production végétale. 2ème édition. Imprimerie La plante, France. 412p.
- Lemanceau, P., P. Offre, C. Mougel, E. Gamalero, Y. Dessaux, Y. Moenne-Loccoz et G. Berta 2006.** Microbial ecology of the rhizosphere. pp: 228-230. In: Microbiological methods for assessing soil quality. Bloem, J., Hopkins, D.W. ET Benedetti, A. (Eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, USA.
- Lewis, T.A., Cortese, M., Sebat, J., Green, T., Lee, C.H. and Crawford R.L., 2000.** A *Pseudomonas stutzeri* gene cluster encoding the biosynthesis of the CCl₄-dechlorination agent pyridine-2, 6-bis (thiocarboxylic acid). *Environ. Microbiol.* **2**: 407–416.
- Lim, H.S., Kim, Y.S. and Kim, S.D., 1991.** *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 510-516.
- Lin, T.P., Chen, C.L., Fu, H.C., Wu, C.Y., Lin, G.H., Huang, S.H., Chang, L.K. and Liu, S.T. 2005.** Functional analysis of fengycinsynthetase *FenD*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene Structure and Expression.* **1730**(2):159-164.
- Loper, J.E., 1988.** Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathol.* **78** :166–172.
- Loué, A. 1993.** Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177.
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR 2004.** Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 565-572.
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* **29**:248-258.
- Madr. 2011.** Bulletin statistiques de la campagne 2009-2010. Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural. 23 pages.
- Mazouz L. 2006.** Etude de la contribution des paramètres phéno-morphologiques dans l’adaptation du blé dur (*Triticum durum* Desf.) dans l’étage bioclimatique semi-aride. Thèse de magister. Institut d’Agronomie, Université Colonel El Hadj Lakhdar, Batna, 65 pages

- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press, 889p.
- Marcellin H., 1974.** La vigne dans les sols acides du Roussillon. Progrès agricole et viticole, 17, 548-555.
- Mazzolaet, M., 2002.** Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**: 557–564.
- Moule C, 1971.** Fourrages tome 1. Phytotechnie spéciale (FRA). 189 pages.
- Murray Nabors, 2009.** Biologie végétale. Structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies. Ed Nouveaux Horizons, Pearson Education France, Paris. 614 pages.
- Mcgrath SP., Zhao F J., Lombi E., 2002.** Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*, Pp 1-56.
- Mercado-Blanco, J., van der Drift, K. M.G.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M., 2001.** Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* **183**:1909–1920.
- Meyer, J.M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M. and Budzikiewicz, H. 2008.** Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals*, **21**, 259-271.
- Meyer, J.M. 2000.** Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, **174**, 135-142.
- Mi Jin H, Choi E.J, Jeon C.O. Isolation of a BTEX-degrading bacterium, Janibacter sp. 2013.** SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. *Bioresour Technol* 145. 2013. 57–64.
- Michaud A.M., Bravin M.N., Galleguillos M., Hinsinger P., 2007.** Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil*, 298, 99-111.

Mirza, M.S, W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, K.A. Malik 2001. Isolation, partial characterization and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil*, **237**: 47-54.

Mishra R.K, Prakash O., Alam M. and Ikshit A.D, 2010. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. Herit. Recent Research in Science and Technology, 2,(5) pp 53-57.

Mouri Ch., Benhassaini H., Bendimered F Z et Belkhodja M., 2014 – Variation saisonnière de la teneur en proline et en sucres solubles chez l'oyat (*Ammophila arenaria* (L.) Link) provenant du milieu naturel de la côte ouest de l'Algérie. *Acta Botanica Gallica:Botany Letters*. Vol. 159, No 1, 127 – 135.

Mossialos, D., Meyer, J.M., Budzikiewicz, H., Wolff, U., Koedam, N. and Baysse, C., 2000. Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 487–492.

Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF, 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60: 193-207.

Naik, P. R. and Sakthivel, N., 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* **157**: 538–546.

Nautiyal C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**: 260-270.

Nakayama T., Yonekura-Sakakibara K., Kikuchi S., Fukui Y., Fukuchi-Mizutani M., Ueda T., Nakao M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T., 2000. Aureusidin Synthase : Apolyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science*, 290, 1163-1166.

Natsch, A., Keel, C., Pfirter, H.A., Haas, D. and Défago, G., 1994. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2553-2560.

Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T. and Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* **33**(4-5):603-612.

Naville M, 2005. La biodiversité des espèces cultivées : Analyse dans le cas du blé, Paris, Université Paris XI. 20p.

Nielsen, M.N., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H.C., 1998. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563–3569.

Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* 87: 80-90.

Oberhansli, T., Défago, G. and Hass, D., 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: Role of tryptophan side chain oxidase, *J. Gen. Microbiol.* 137: 2273–2279.

Ongena M., Giger A., Jacques P., Dommes J. and Thonart P., 2002. Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, pp 187-196.

O’Sullivan DJ, Ogara F 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp involved in suppression of plant-root pathogens. *Microbiological Reviews* 56: 662-676.

Panou-Filothéou, Bosabalidis A.M., 2004. Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*). *Plant science*, 166, 1497-1504.

Patten, C.L. et B. R. Glick 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 3795-3801.

Pawlowski K, Bisseling T 1996. Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell* 8: 1899-1913.

Papadakis J.S, 1938. *Ecologie agricole*. Ed Jules Duculot. Gembloux, 303 pages.

Pena R.J., Pfeiffer W.H., 2005. Breeding methodologies and strategies for durum wheat quality improvement. In Conxita, R., Nachit, M., di Fonzo, N., Araus, J.L., Pfeiffer, W.H., & Slafer, G.A. (Eds.). *Durum wheat breeding: current approaches and future strategies*. Food product press. 663-686. Periquet A, 2002 - *Les Plantes*

Pesson P et Louveaux J, 1984. *Pollinisation et productions végétales*, INRA. Paris 663 pages.

- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. and Wallach, J. 1999.** Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Environ Microbiol.* **51(5):**553-563.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q. and Gullino, M.L. 1997.** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* **11(3):**131-140.
- Pierson, L.S.III. Et Pierson, E. A., 2010.** Metabolism and function of phznazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86.**
- Pieterse, C.M.J., Ton, J. and Van Loon, L.C., 2001.** Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *Ag. Biotech. Net.* **3: ABN 068.**
- Ping LY, Boland W 2004.** Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sciences* **9:** 263-266.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M. 1995.** Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* **85(10):**1075-1081.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. and Samiyappan, R. 2001.** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect.* **20(1):**1-11.
- Rahman, M.S., Ano, T. and Shoda, M. 2007.** Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* **127(3):**503-507.
- Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G. and Paull, R.E. 2004.** Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **33(2):**193-203.
- Reuter D. J. and Robinson J. B., 1997.** -Plant analysis: an interpretation manual.-CSIRO publishing, Australia, 572 p.
- Richardson, A.E., 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants *Aus. J. Plant Physiol.* **28(9):** 897-906.
- Robert, M. et Juste, C. 1999.** Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN. 105 p

- Rodriguez HG., Roberts JKM., Jordan WR., Drew MC.1997-** Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiol.*, 113(3): 881- 893.
- Rontain D., basset G. et hanson A.D. 2002** – Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.*, 4, 49-56.
- Ryan, R.P., K. Germaine, A. Franks, D.J. Ryaneet D.N. Dowling 2008.** Bacterial endophytes: recentdevelopments and applications. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **278**: 19.
- Salisbury, F.B. 1994.** The role of plant hormones. Marcel Dekker, (ed.). New York, USA.
- Salt, D.E., Smith, R.D. and Raskin, I. 1998.** Phytoremediation. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 643–68.
- Scher FM, Baker R 1982.** Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of suppressiveness to *Fusarium-wilt* pathogens. *Phytopathology* 72, 1567-1573.
- Selmi R. 2000.** Fin du mythe de l'autosuffisance alimentaire et place aux avantagescomparatifs. *Revue Afrique Agriculture*. N° 280.Pp.30-23.
- Shah, S., Li, J., Moffatt, B.A. and Glick, B.R., 1998.** Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* **44**: 833-843.
- Slama I., Messedi D., Ghnaya T., Savoure A.and Abdelly C., 2006.** Effects of waterdeficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. *Environmental and Experimental Bot.*, 56, pp 231-238.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., and Jain, R.K. 2003.** Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405-412.
- Soltner D, 2005.** Les grandes productions végétales, Phytotechnie spéciale. 20ème édition. Collection sciences et technique agricoles. Paris, France, 472 pages.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden et R. Remans 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31** (4): 425-448.

Steenhoudt, O. et J. Vanderleyden 2000. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects, *FEMS Microb.Rev.*,24: 487-506.

Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 748-757.

Tarayre. C. Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes. 2012. 116p.

Thakuria, D., N.C Talukdar, C. Goswami, S. Hazarika, S. Boro et M.R. Khan 2004. Characterization and screening of bacteria from the rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr. Sci.*, **86**: 978-985.

Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. and Pierson, L.S., 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.* **56**: 908-912.

Troll, W. Lindsley, J. 1955. A photometric method for determination of proline. *J. Biol. Chem.* N° 215, p655-660.

Ulrich B 1987. Stability, elasticity, and resilience of terrestrial ecosystems with respect to matter balance. In *Shultze ED & Zölfer H (Eds) Ecological Studies 61 Springer-Verlag, BerlinHeidelberg.*

Uroz, S. Calvaruso, C. Turpault, MP. Frey-Klett, P. 2009. Mineral weathering by bacteria : ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology* **17** : 378-387.

Vallée C., Bilodeau G., Joliette-De L.C., 1999. *Les techniques de culture en multicellules.* Presses Université Laval, Canada, 394 p.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453–483.

Van Peer, R., Niemann, G.J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology.* **81**(9):728-734.

- Vanrhijn P, Vanderleyden J 1995** .The rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*59: 124-142.
- Vessey JK 2003**. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586.
- Vidali M., 2001**. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* ,Pp 1163-1172.
- Wardlaw IF, 2002**. Interaction between drought and chronic high temperature during kernel filling in wheat in a controlled environment. *Annals of Botany*, 90, p 469-476.
- Weller, D.M. 1988**. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.
- Whipps J.M. 1990**. Carbon utilization. pp: 59-97. *In: The Rhizosphere*. Lynch J.M. (ed.). WileyInterscience, Chichester, UK.
- Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus et G.N. Somero 1982**. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**:1212-1222.
- Zhou, T. and Paulitz, T. C. 1994**. Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on cucumber. *J. Phytopathol.* **142**(1):51-63.

Annexe

Annexe 01 : Milieu de cultures

Milieu de King B

- Peptone 20g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g
- K_2HPO_4 1,5 g
- Agar agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml

Milieu de Winogradsky

Solution mère:

- KH_2PO_4 : 25g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 12.5g
- NaCl: 12.5g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.5g
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.5g
- L'eau distillée: 500ml

- Solution mère: 2.5ml
- D-Glucose: 0.5g
- CaCO_3 : 0.1g
- Agar agar: 7.5g
- Eau distiller: 500ml

Milieu de Pikovskaya

- D –Glucose: 10g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.5g
- NaCl: 0.2g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.1g
- KCl: 0.2g
- Extrait de levure : 0,5g
- $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.002g

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.002g
- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 5g
- Eau distillée : 500ml

Réactif Salkowski

- 50ml d'acide perchlorique 35% et 1ml de FeCl_3 à 0.5 M

Milieu de NBRIP

- Glucose : 10g
- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 5g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 5g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.25g
- KCl : 0.2g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.1g
- Agar : 15g
- Eau : 1l