



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi -Tébessa



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Etres vivants

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: biotechnologie végétale

Option: Biotechnologie Végétale et amélioration des plantes

Thème:

**Isolement et caractérisation des bactéries
endophytes et associées à la Rhizosphère de
*peganum harmala***

Présenté par:

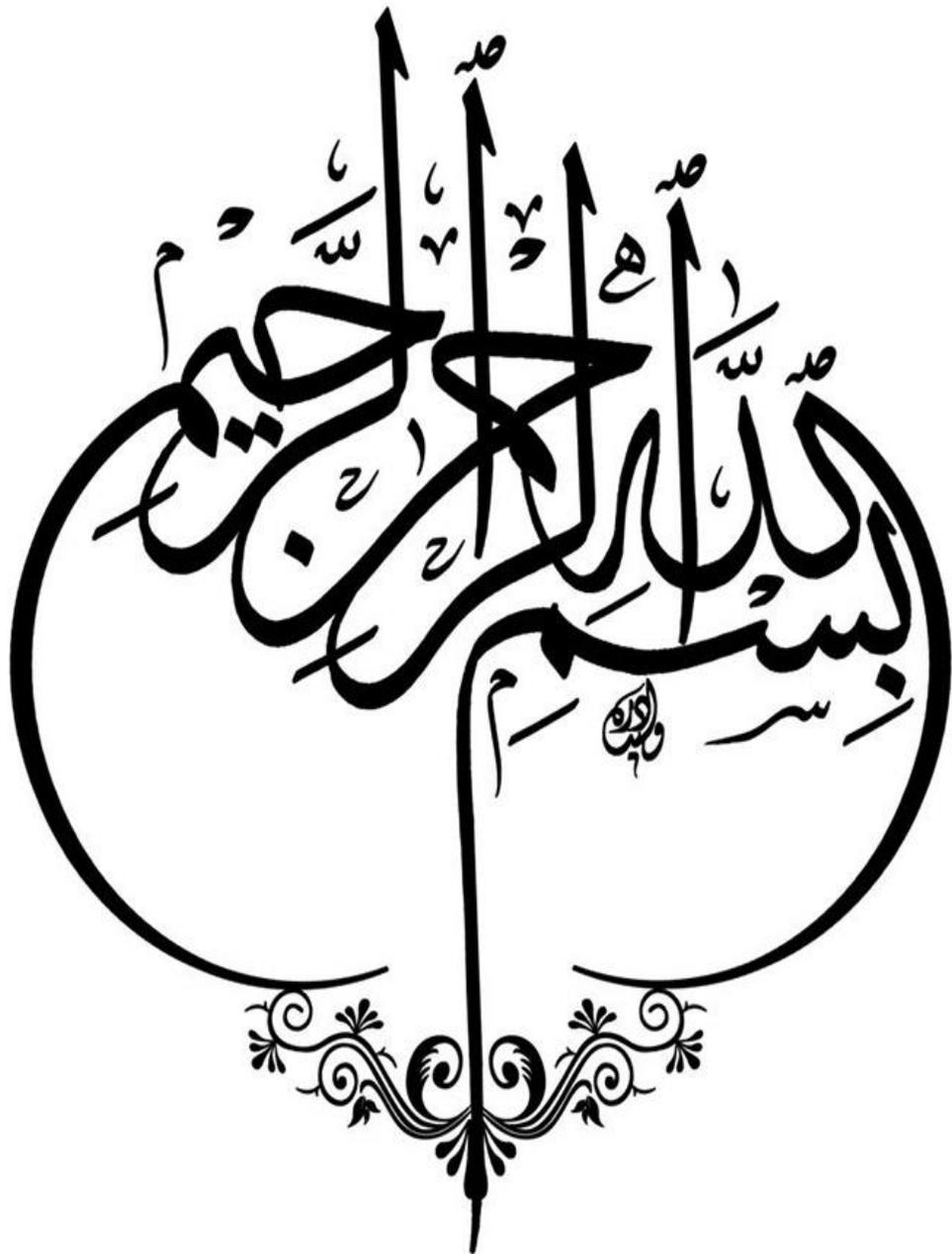
Ben Messai Hiba

Devant le jury composé de :

M. Maalem Souhil	Professeur	Université de Tébessa	président
Mme. SOUAHI Hana	MCA	Université de Tébessa	Examinatrice
M. DEKAK Ahmed	MCA	Université de Tébessa	Promoteur

Date de soutenance : **09 / 06 / 2022**

Note :..... Mention :



Remerciements

Tous nos remerciements à **«Allah»** tout puissant, qui m'a aidé et m'a donné la capacité et l'énergie et m'a permis de terminer ce chemin pour atteindre ce que je suis maintenant.

J'adresse mes sincères remerciements, appréciation et respect à l'encadreur **«DEKAK AHMED»** pour avoir accepté mon encadrement sur le sujet de graduation. Je lui suis très reconnaissant pour son soutien à mon égard. Pour ses conseils et sa présence constante, pour son suivi quotidien et suivi les travaux.

Nous remercions également les membres du jury :

Pr **«SOUHAIL MAALEM»** d'avoir ménagé son temps pour présider ce jury. Mme **«Souhi Hana»** pour avoir bien voulu siéger dans ce jury afin d'examiner et critiquer ce mémoire et nous éclairer par ces précieuses conseils.

Nous témoignons aussi, notre profonde gratitude à l'égard des enseignants et des laborantins de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à notre formation et tous les efforts qu'ils ont déployés pour nous permettre de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

A mes parents Pour leurs encouragements. Pour leurs soutiens et leurs aides. Avec tout notre amour.

A tous ceux et celles qui nous ont aidés, de près ou de loin, nous disons Merci du fond du cœur.

Dédicace

Je dédie ce travail aux êtres les plus chers à mon cœur :

- ✓ Le chemin de vie de mon père bien-aimé est illuminé.
- ✓ La lumière de ma vie ma mère que Dieu me la garde.
- ✓ A mon frère « Ayoub » que j'aime énormément.
- ✓ A mes sœurs « Israa et Asma » votre présence à mes côtés m'a toujours donné l'impression d'être proche de toute le monde. Sans vous ma vie ne serait que simple.
- ✓ Ma meilleure amie: Najla lahcen *Je voudrais t'exprimer à travers ces quelques lignes tout l'amour et toute l'affection que j'ai pour toi. Je t'aime soeur !*
- ✓ A tous mes oncles, tantes, cousines, cousins, a toute ma famille Ben Messai et Messabhia Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond
- ✓ A tous mes amis : Achwak, Ouafa, Souhir, Rahma, Samra et Imen
- ✓ A tous mes collègues spécialement Haythem et Oussama pour leur soutien constant et leur aide en cas de besoin.
- ✓ *Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

Ben Messai Hiba

العنوان عزل و دراسة البكتيريا الداخلية و الملاصقة لجذور الحرمل , *Peganum harmala*

ملخص

تتركز هذه الدراسة على عزل البكتيريا الملاصقة لجذور نبتة الحرمل و دراستها, تم عزل 22 عزلة بكتيرية من 6 عينات من المنطقة الملاصقة لجذور الحرمل و جذوره الذي ينمو في منطقة شبه جافة و في تربة غنية بالمعادن الثقيلة من منطقة وادي مسلولة (العوينات - تيسه). من اجل انتقاء و تحديد بكتيريا أل PGPR و تقييم كفاءتها في اداية المعادن (فوسفات, بوتاسيوم, كالسيوم و الحديد) وإنتاج الهرمون النباتي AIA. و هذا ما يساعد على آليات عملها و اختيار سلالات فعالة.

سمحت لنا هذه الدراسة بتسجيل تنوع بيولوجي في الكائنات الحية الدقيقة و المعزولة و التي أكدتها نتائج الاختبارات المختلفة خاصة إنتاج الهرمون النباتي, 17 سلالة قادرة على اداية الفوسفات, و 3 قادرة على اداية البوتاسيوم, 11 قادرة على اداية الكالسيوم و 13 على الحديد. و أخيرا تم حصر سلالات فعالة و من المرجح أن تستخدم في تحسين الإنتاج الزراعي.

Peganum harmala **كلمات مفتاحية** التربة الملاصقة, الجذور, البكتيريا الداخلية, أداية المعادن,

TITRE : Isolement et caractérisation des bactéries endophytes et associées a la Rhizosphère d'El Harmel (*Peganum harmala*).

RESUME

L'utilisation des bactéries endophytes et associées a la rhizosphère de *Peganum harmala* peut orienter les pratiques agricoles vers une perspective durable et plus respectueuse de l'environnement. 22 isolats issus de 6 échantillons de la Rhizosphère et les racines de la plante *Peganum harmala* qui pousse dans des conditions d'aridité et sol riche aux métaux lourd au niveau de régions de Tébessa (commune el-aouinet exactement oued masloul), ont été utilisés pour isolés et identifier des bactéries a traits PGPR en évaluant leur efficience a produire de l'AIA et a solubiliser le phosphate, le potassium, Calcium et le Fer ce qui permettra de comprendre leurs mécanismes d'action de sélectionner des souches d'interet.

Ce travail nous a permis de constater une diversité de microorganismes traduite par les résultats des différents tests étudiés, notamment, la production d'AIA qui est un trait commun à ces PGPR, 17 souches capables de solubiliser le P, 3 souches capables de solubiliser le K, 11 souches capables de solubiliser le Ca, et 13 solubilisent le Fe et enfin le détection des souches d'intérêt qui ont présenté un important potentiel PGPR et qui sont susceptibles d'être utilisés dans des programmes d'amélioration de la productivité agricole et la bioremédiassions des sol pollués par les métaux lourds .

MOTS CLES : Endophytes, Rhizosphère, *Peganum harmala*, Phytohormones, solubilisation des minéraux.

TITLE: Isolation and characterisation of endophytic bacteria associated with the rhizosphere of EL Harmel (*Peganum harmala*)

ABSTRACT

The use of endophytic bacteria associated with the rhizosphere of *Peganum harmala* can orientate agricultural practices towards a sustainable and environment friendly perspective. 22 isolates collected from 6 samples from the Rhizosphere and root of *peganum harmala plant* growing under server aridity conditions and soil rich in heavy metals in Tebessa (el Aouinet - Massloulou) , were used to isolate and identify these PGPR trait bacteria evaluating their efficiency in producing IAA phytohormone and to solubilizing soil minerals (P, Ca, K, Fe) which will help to understand there mechanisms of action and in order to select strains of interest.

This work allowed us to note a diversity of microorganisms, translated by the results of various tests studied, in particular, the production of IAA which is a common feature of these PGPR, 17 strains able to solubilize P, 3 strains able to solubilize K, 11 strains able to solubilize Ca, 13 strains able to solubilize Fe and finally strains of interest that showed significant PGPR, which are likely to be involved in programs of agricultural productivity improvement and to bring out there heavy metals bioremediation capability.

KEY WORDS *Peganum harmala*, rhizosphere, Endophytic Bacteria, minerals solubilization, Phytohormons.

Liste d'abréviations

°C : degré Celsius

μL : microlitre

μs : microsimeuse

P : phosphate

K : potassium

Ca : calcium

Fe : Fer

IAA : Indol Acid Acetic

ISP : indice de Solubilatrice du P (Posphate)

ISK : indice de Solubilatrice du k (Potassium)

ISFe : indice de Solubilatrice du Fe (Fer)

ISCa : indice de Solubilatrice du calsium

ml : millilitre

mm : millimètre

g : gramme

mg : milligramme

NBRIP : National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium

nm : nanomètre

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

pH : Potentiel d'Hydrogène

ppm : particule par million

T/MIN : tour par minute

Kg : kilogramme

% : pourcentage

Cm : centimètre

GN : gélose solide

H : heure

min : minute

Pb : plombe

Cd : Cadmium

μg : microgramme

PSB : phosphate solubilising Bacteria

KSB : potassium solubilising Bacteria

Table de matières

Table de matières	
titre	page
Introduction	
Chapitre 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1-Généralité sur les endophytes ²	2
1.1-Les champignons	2
1.2-Les bactéries.	3
1.2.1- les rhizobactérie promotrices de la croissance des plantes PGPR.	3
a) définition.	3
b) Diversité taxonomie de la PGPR	3
c) Effet directe de la PGPR sur la plante	4
1- fixation d'azote.	4
2-solubilisation de phosphate	4
3-production d'hormone de croissance.	5
3.1- Acide indole acétique (AIA).	5
1.3- La relation plante-endophytes.	6
2- Généralité sur le <i>Peganum harmala</i> .	2
2.1-définition	2
2.2- caractérisation botanique	2
2.2.1-Les tiges	8
2.2.2-Les feuilles	8
2.2.3-Les fleurs.	9
2.2.4-Les fruits.	9
2.2.5-Les grains.	9
2.2.6-Les racines	9
2.3-Répartition géographique	10
2.4-utilisation traditionnelle	10
2.5-utilisation pharmaceutique	10
2.5.1- Effets cardiovasculaires	10
2.5.2- Effets sur le système nerveux	11
2.5.3- Effets anticancéreux et antioxydants.	11
2.5.4- Effets sur le système immunitaire	11
2.5.5- Effets antidiabétiques	11
Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES	12

Table de matières

1-présentation du matériel végétal .	12
2- Présentation de la zone de prelevement	12
3- Prélèvement des échantillons du sol .	13
4- Analyse chimique du sol .	14
5- Préparation des milieux et mise en culture	14
5.1- Isolement à partir des échantillons de la rhizosphere	14
5.2- Isolement à partir des échantillons des racines	15
6- Isolement et purification des isolats.	15
7- Préparation des souches.	15
7.1-teste de toxicité .	15
7.2-teste de solubilisation de phosphate	16
7.3- teste de solubilisation de potassium	16
7.4- teste de solubilisation de Calcium	17
7.5- teste de solubilisation de Fer	18
8-Test de production d'IAA.	18
9-Analyse statistique.	18

Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

1- Analyse du sol	19
2- isolement des souches pures .	19
3- Test de solubilisation du phosphate	20
4- Test de solubilisation de potassium .	21
5- Test de solubilisation de calcium	23
6- teste de solubilisation de Fer.	24
7- Test de production d'IAA .	26
8-Biodiversité des isolats	28
9- Les traits PGPR des isolats testés	30
Conclusion	32
Références	33

bibliographiques

Annexes

- Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau01 : Repartition géographique de <i>Peganum harmala</i> (Hammiche et al, 2013).	10
Tableau02 : composition du milieu nutritif (GN).	15
Tableau 03 : composition de milieu NBRIB.	16
Tableau 04 : Composition de milieu d Aleksandrov	17
Tableau05 : composition de milieu Pikovskaya	17
Tableau06 : composition d milieu de salkowski	18
Tableu07 : Analyse de la variance ISP	21
Tableu08 : Analyse de la variance ISK	23
Tableu09 : Analyse de la variance ISCa	24
Tableu10 : Analyse de la variance ISFe	26
Tableau11 : Analyse statistique de la production d'IAA	28
Tableau12 : Répartition des isolats en groupe	30

Liste des figures

Titre	Page
Figure 1: Observation Microscopique de la colonisation des racines par des endophytes fongiques (Macia Vicente et al, 2008a).	2
Figure 2 : les différents mécanismes d'action de PGPR.	5
Figure. 3 : Représentation schématique de l'association endophytes fongique avec son hôte (Kusari et Spiteller, 2012).	7
Figure 4 : Représentation schématique d'un «marché écologique» « ecological market place » à l'interface plante-microorganisme (Kusari et al., 2014).	8
Figure 5 : Les fleurs et feuilles de la plante <i>Peganum harmala</i> (Weckesser, 2013).	9
Figure 6 : Les fruits et les graines de la plante <i>Peganum harmala</i> (Weckesser, 20113)	9
Figure 07 : la plante de <i>Peganum harmal</i> (Weckesser, 2013).	12
Figure 08 carte géographique de la zone d'étude	
Figure 09 : Histogramme montrant les caractéristiques physico-chimiques du sol la zone de prélèvement. A : pH des échantillons, B : Conductivité des échantillons.	19
Figure 10 : Différentes formes des isolats bactériennes.	20
Figure 11 : Solubilisation du phosphate par les isolats testés	20
Figure 12 : histogramme des indices de solubilisation du phosphate par l'isolat testent.	21
Figure 13 : Solubilisation du Potassium par les isolats testés.	22
Figure 14 : histogramme des indices de solubilisation du potassium par l'isolat testes.	22
Figure 15: Solubilisation du Calcium par les isolats testés	23
Figure 16 : histogramme des indices de solubilisation du calcium par l'isolat testes.	24
Figure 17: Solubilisation du Fer par les isolats testés	25
Figure 18 : Histogramme des indices de solubilisation du fer par les isolats testes.	25
Figure 19 : le virage de la couleur du milieu de culture après l'ajout du réactif de Salkowski.	27
Figure 21 : Schémas représentant les traits PGPR chez les isolats testés	29
Figure 22 : Dendrogramme montrant les différentes classes des isolats testés à un seuil	30

Liste des figures

de similarité égale à 40 %.

Figure26 : venn diagramme des isolats teste

31

Introduction

Introduction

Introduction

La productivité agricole doit augmenter de manière significative faire face à la croissance démographique mondiale croissante et dégât environnementale. Pour résoudre ce problème et obtenir les rendements augmentent, les agriculteurs deviennent dépendants des ressources les engrais ne sont pas seulement chers, il consomme également d'énergie non renouvelable et cause un risque pour L'homme et l'environnement **(FAO, 2015)**.

Il est clairement avantageux d'utiliser des moyens biologique efficaces fournit les minéraux nécessaires à la croissance et aux guides des plantes les pratiques agricoles évoluent vers une approche plus durable et respectueuse de l'environnement. Cela inclut l'utilisation de bactérie qui favorise la croissance des plantes. **(Glick, 1995)**.

On s'attend à ce que dans un proche avenir, les bactéries favorisent la croissance des plantes (PGPR) va commencer l'utilisation de produit alternatif produit chimiques dans les stratégies de durabilité agricole production de bio fertilisantes contenant des souches bactériennes isolées de végétaux, la rhizosphère des plante est d'une importance considérable car elles sont plus tolérantes aux conditions abiotiques extrêmes telle que la température, la salinité et la sécheresse et augmentation de la productivité en favorisant l'absorption des nutriments, les bactéries ne présentent aucun danger pour l'environnement et l'homme.**(visey, 2003)**.

Notre travail consiste donc à isoler des bactéries à partir de la rhizosphère de la plante *Peganum harmala*, communément appelée El Harmel, connue pour ses vertus médicinales et sa haute résistance aux conditions extrêmes de l'environnement, en effet, elle pousse dans les régions arides en arrivant même à produire une biomasse impressionnante.

Dans le but d'isoler et d'identifier ces PGPR, 3 échantillons de la rhizosphère et des racines de cette plante localisée au niveau de la région de EL-AOUINET- MESLOULA ont été utilisés afin d'évaluer la capacité de ces souches à promouvoir la croissance des plantes par le biais de mécanismes de production d'AIA et de solubilisation de phosphate, de potassium, de Calciums et de Fer.

Partie bibliographique

Partie bibliographique

1. Généralité sur les endophytes

Le terme «endophytes», initialement introduit par De Barry en **1866**, concerne tous les organismes qui se reproduisent dans les tissus végétaux, distincts des épiphytes qui vivent à la surface des plantes, («endo-» signifie à l'intérieur; «phyte» est dérivé du mot grec phyto, qui signifie plante) (**Rodrigues, 1996**).

Depuis la découverte des champignons endophytes en 1904, l'ivraie de basse-cour allemande (*Iolium temulentum*), plusieurs chercheurs ont défini endophytes de différentes manières (**Tan et Zou, 2001**).

Carroll (1986) a défini les endophytes comme suit «les endophytes mutualistes, sont des champignons qui colonisent les parties aériennes des tissus végétaux vivants et ne provoquent pas de symptômes de maladie».

1.1. Les champignons

Les champignons endophytes sont extrêmement communs, ce qui conduit à la conclusion que la plupart, sinon la totalité, des espèces végétales des écosystèmes naturels abritent champignons endophytes (Rodriguez et al. 2009). Le meilleur hôte pour la recherche est plantes cultivées, arbres et arbustes forestiers et membre de la famille des rhododendrons. De plus, certaines familles de plantes sont étroitement liées à leurs parents. Endophytes apparentes, comme les orchidées (**Brayman et Otero, 2006**).

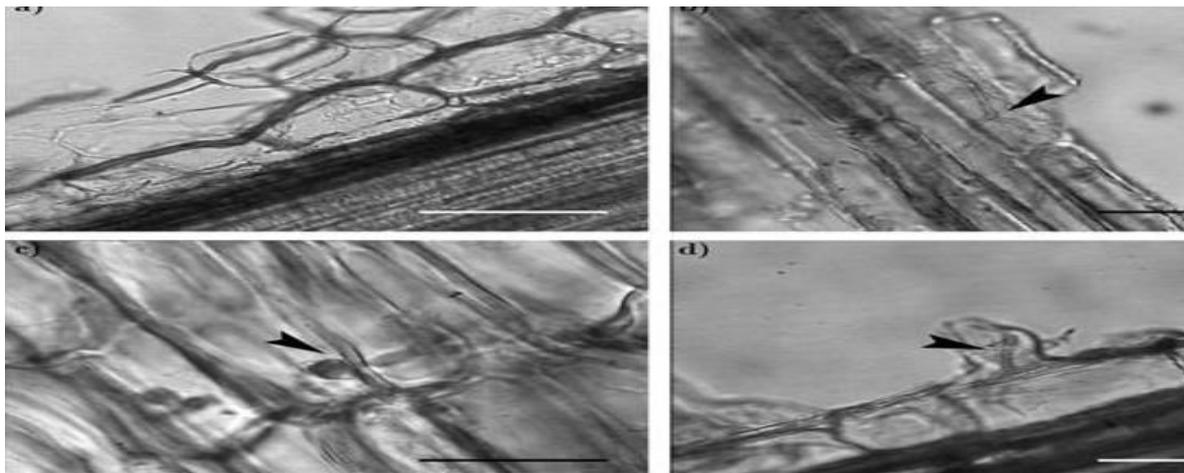


Figure 1: Observation Microscopique de la colonisation des racines par des endophytes fongiques (**Macia Vicente et al, 2008a**).

1.2. Les bactéries

Les bactéries sont les organismes les plus abondants, avec une moyenne de $6.108 \times 10000 \text{ kg/ha}$ de cellules et poids par gramme de sol, équivalent à 5% du poids sec du sol composés organiques du sol. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes par exemple, les rhizobactéries, généralement des souches très compétitives peuvent coloniser les racines riches en nutriments, tout au long du cycle de croissance développement des plantes (Kloepper, 1993). Les rhizobactéries sont généralement hétérotrophes, elles ont donc besoin de composés la matière organique comme énergie. Leur besoin sont entièrement satisfaits en interne même de la rhizosphère. Ces bactéries utilisent plantes : cortex racinaire isolées et cellules épidermique, polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et les acides organiques...etc. (Campbell et Greaves, 1990 ; Glick, 1995 ; Konate, 2007).

1-2-1 les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes PGPR

a) Définition :

Les bactéries de la rhizosphère appelées PGPR traversent mécanismes multiples tels que la fixation de l'azote, le phosphate dissous, les essaims sensing (Bhattacharya et Jha, 2012). Ces micro-organismes augmentent l'absorption des nutriments du sol par induction et production des régulateurs de croissance de la plante. Ils stimulent indirectement la croissance des plantes par leurs effets antagonistes sur les plantes microflores nocives, en transformant les métabolites toxiques et stimulant la nodulation des haricots rhizobium par la création de l'association plante-PGPR est essentiellement utilisée pour exprimer des effets bénéfiques (Normande et Prosser, 2000).

Actuellement, les PGPR comprennent plusieurs taxons bactériens (Ashraf et al ; 2008) : *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter* qui ont montré une capacité d'améliorer la croissance des plantes (Kloepper et Beauchamp, 1992).

b) Diversité taxonomique de la PGPR

Le nombre de PGPR identifiées a considérablement augmenté ces dernières années. Important, principalement parce que le rôle de la rhizosphère en tant que

Partie bibliographique

écosystème pour fonctionnement de la biosphère et le mécanisme d'action de la biosphère, le PGPR a été bien étudié. Ces micro-organismes cultivables ; présentent la diversité des genres et des espèces ; appartient principalement aux quatre phylums suivants : proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bactériidies (Hugenholtz, 2002).

c) **Effet directe de la PGPR sur la plante**

Les bactéries PGPR favorisent directement la croissance des plantes en aidant à obtenir ressources naturelles (azote, phosphore, fer et les minéraux essentiels) ou en régulant les niveaux d hormones.

1- Fixation d'azote

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

L'utilisation de bio-engrais tels que les bactéries fixatrices d'azote peut accroître la productivité et constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production.

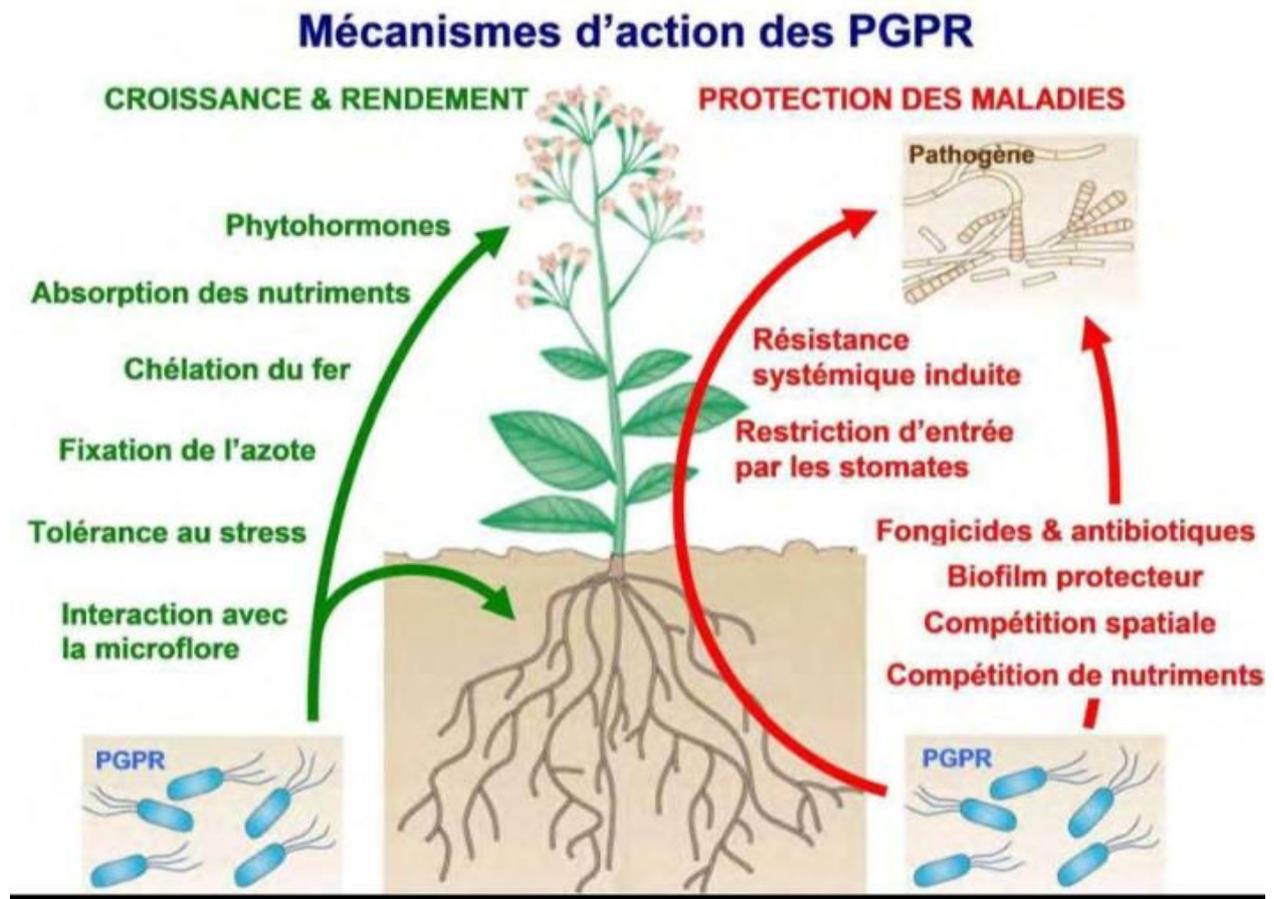
Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (**Graham, 1988**). La fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique (**Saxena et Tilak, 1998**).

2- Solubilisation du phosphate

Le phosphate est également importante. Le phosphore (P) est un macro nutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologiquement disponible (**Ezawa et al., 2002**).

Même dans les sols riches la plupart du phosphore n'est pas disponible pour les plantes, une grande quantité se trouve sous forme insoluble. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB

(**Phosphate Solubilizing Bacteria**) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées Pour résoudre ce problème (**Vessey, 2003**)



Figuer2 : les différents mécanismes d'action de PGPR.

3- Production les hormones de croissance

Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la Division cellulaires, la differentiation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones.

De nombreuses phytohormones sont produites par les PGPR. Bien que le rôle de la biosyntheses de ces phytohormones par ces micro-organismes ne soit pas entièrement appliqué, il est à noter que les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérélliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden 1995; Glick, 1995; Lucy et al., 2004).

3.1- Acide indole acétique (AIA)

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman et al., 2009) Quantitativement le plus produit par les PGPR. IL fonctionne comme une molecule signal

Partie bibliographique

Importante dans la régulation du développement des plantes, agissant sur l'organogenèse, les Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la Division cellulaires, la différentiation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones.

Le rôle de l'AIA dans la stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les Racine. Il favorise la survie des bactéries dans la rhizosphère. Les poids des tiges et des Racine des plantes de blé sont influencés positivement par l'ajout de l'AIA (**Narula et al., 2006**).

1.3. La relation plante-endophytes

Dans les écosystèmes naturels et artificiels, diverse interaction s'établissent entre plante-microorganisme, cette relation a été toujours d'un grand intérêt. Au début, l'homme utilisait interaction entre les plantes et les microbes pour améliorer leur performance et approfondissement de leur performance et approfondissement de leurs connaissances (**compant, 2007**). Depuis des études récentes ont montre que dans les populations bactériennes, les cellules communiquer entre eux afin de coordonner certaines activités, cette communication est la clé de leur survie, car la performance des micro-organisme dépend de la capacité de sentir les échanges environnementaux et réagir rapidement, tout en les bactérie ont développé un mécanisme de communication complexe pour contrôler l'expression de certaines fonctions à travers un appareil dépendant de la densité cellulaire connue sous le nom de détection de quorum (**Ahmed et al. 2008**).

Des études récentes rapportent l'importance des mécanismes qui régulent les bactéries végétales bénéfiques, telles que la promotion de la croissance, la protection contre les bactéries pathogènes et le stress salin, la libération de certaines molécules, telle que AHL, qui sont des composés qui sont responsables de certaines molécules bactériennes. Des études antérieures ont rapporté ces capacités de stimulation moléculaire de la défense et de blocage des bactéries pathogènes (**Ahmed et al., 2008**).

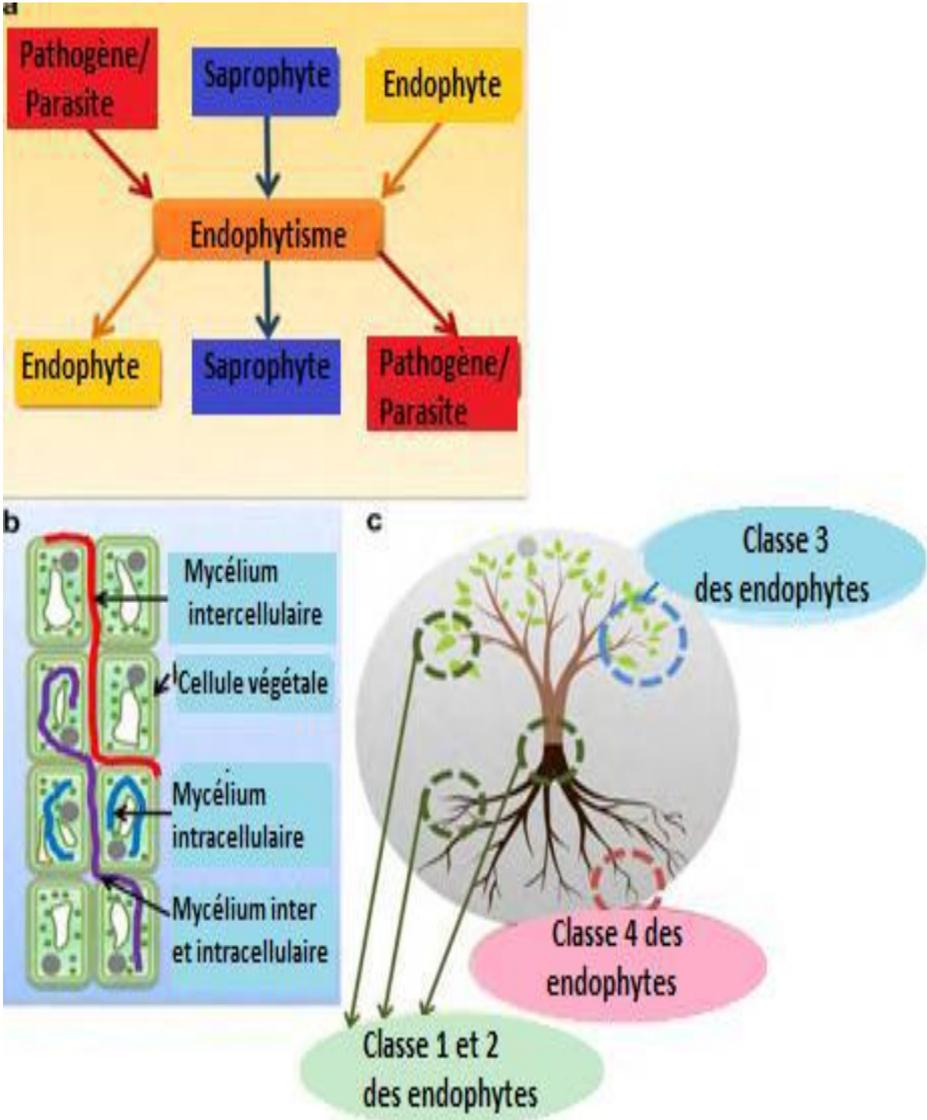


Figure. 3 : Représentation schématique de l'association endophytes fongique avec son hôte (Kusari et Spiteller, 2012).

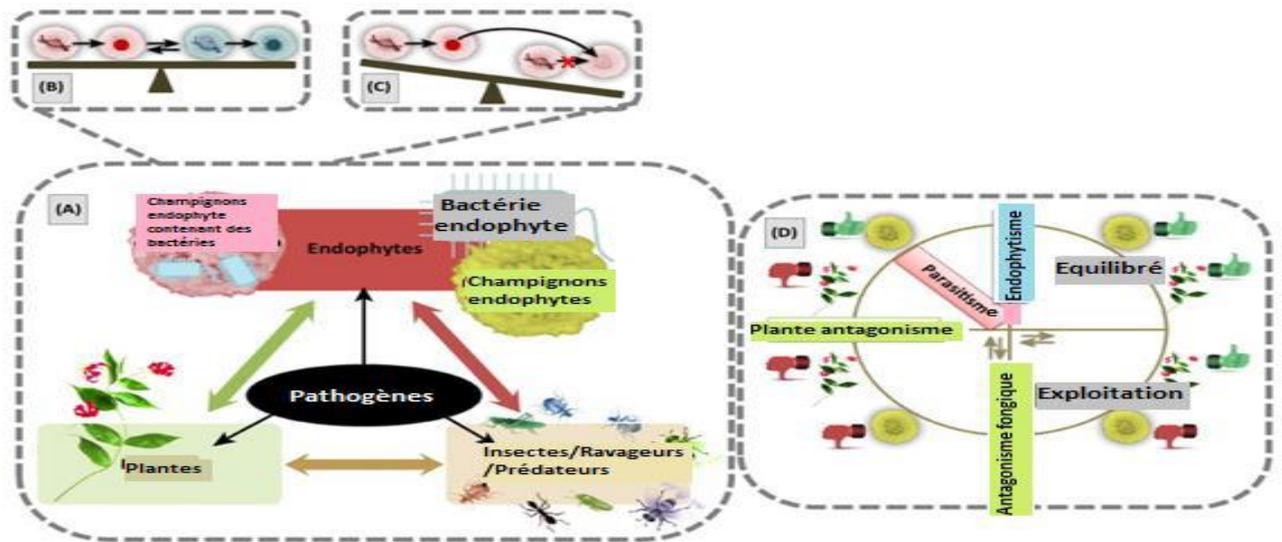


Figure 4 : Représentation schématique d'un «marché écologique» « ecological market place » à l'interface plante-microorganisme (Kusari et al., 2014).

2- Généralité sur le *Peganum harmala*

2.1- Définition

Peganum harmala L, tribulus terrestres, plantes appartenant à ce genre, très facilement reconnaissable à l'aspect de son herbe. De ses arbustes ou de ses arbres. A l'intérieur de la taxonomie de Sheahan et Chase (1996) constitue une famille d'environ 285 espèces, il est divisé en 5 sous-familles et 27 genres. Ils sont largement distribués dans les pâturages arides, semi arides, salins et désertiques (Tahrouch et al, 1998 ; Asgarpanah et Ramezanloo, 2012). Le nom de genre *Peganum* vient du grec et est attribué à l'espèce de la rue, tandis que le nom de l'espèce, *harmala*, est dérivé du nom de la ville Hummel, (Liban, mars 2009).

2.2- Caractérisation botanique

Plante herbacée vivace, à tige ordinairement peu rameuse, de 30 à 90 cm de hauteur, à entrenœuds assez courts, densément feuillés.

2.2.1- Les tiges : dressée, très rameuse, qui disparaissent à l'hiver, porte les feuilles alternes, découpées en lanières étroites, à leur extrémité, s'épanouissent les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm).

2.2.2- Les feuilles : sont allongées et irrégulièrement divisées en multiples lanières très fines pouvant atteindre 5*5 cm. Les feuilles supérieures ne dépassent pas 1.5 mm de largeur.

Partie bibliographique

2.2.3- les fleurs : la plante présente des fleurs assez grandes (25 a 30 mm), d'un blanc-jaunâtre veinées de vert avec cinq sépales inégaux persistances qui dépassent la corolle et des pétales crème lave de rose-orangé a nervutire jaune, oblongs et subsymétriques.

2.2.4-les fruits : sont des petites capsules sphériques avec 3 chambres de 6 a10 mm qui se tient droit sur la tige est déprimées au sommet. (Yousefi et al., 2009).

2.2.5- les graines : nombreuses, petites, anguleuses, subtraingulaires, de couleur marron fonce, dont le tégument externe est réticulé, ont une saveur amère. (Chopra et al., 1960).

2.2.6- les racines : est oblongue, dure estranger fibres. Elle peut atteindre plus de 3m de profondeur (Quézel et santa, 1963).



Figure 5 : Les fleurs et feuilles de la plante *Peganum harmala* (Weckesser, 2013).



Figure 6 : Les fruits et les graines de la plante *Peganum harmala* (Weckesser, 20113)

2.3- Répartition géographique

Cette plante est largement distribuée à travers le monde. Elle est particulièrement répandue dans les zones arides et sèches méditerranéennes dans les sols sableux et légèrement nitrés (Iserin, 2001).

Tableau01 : Répartition géographique de *Peganum harmala* (Hammiche et al, 2013).

Continents	Répartition géographique
En Europe	les zones sèches, de l'Espagne à la Hongrie jusqu'aux steppes de la Russie méridionale
En Afrique	les zones arides méditerranéennes du Moyen-Orient au Nord de l'Afrique (Tunisie, Sahara septentrional et central en altitude, Hauts-Plateaux algériens et Oriane, Maroc oriental)
En Asie	Les steppes de l'Iran et du Turkestan jusqu'au Libé

2.4- Utilisation traditionnelle :

Peganum harmala est traditionnellement utilisés comme emménagogues, antihelminthiques, soporifiques, narcotiques, aphrodisiaques, lactagogues, abortifs et dans le traitement de la fièvre, des rhumatismes et de l'asthme ainsi que des yeux troubles. Les extraits de la plante sont également utilisés pour les loisirs et comme stimulant du central système nerveux. De plus, les propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antiparasitaires sont attribuées à *Peganum harmala* en Inde et en Afrique du Nord. (Apostolico et al., 2016).

2.5- utilisation pharmaceutique :

2.5.1- Effets cardiovasculaires

Peganum harmala est l'une des plantes médicinales les plus utilisées pour traiter l'hypertension et les maladies cardiaques dans le monde entier. Des expériences *in vivo* ont montré que différents extraits de *Peganum harmala* où ses principaux alcaloïdes actifs, harmine, harmaline et harmalol, ont des effets cardiovasculaires différents, tels que la

Partie bibliographique

bradycardie, la diminution de la pression artérielle, le débit aortique de pointe et la force contractile cardiaque et vasodilatatrice (Aarons *et al.* 1977) et des effets inhibiteurs antigéniques (Hamsa et Kuttan ,2010).

2.5.2- Effets sur le système nerveux

Diverses études *in vitro* et *in vivo* ont indiqué une large gamme d'effets produits par des alcaloïdes de *Peganum harmala* à la fois sur le système nerveux central et périphérique y compris, l'analgésie, l'hallucination, excitation et l'effet antidépresseur (Moloudizargari *et al.*, 2013). En outre, il a été prouvé que les β carbolines de *Peganum harmala* interagissent avec la dopamine, GABA, 5-hydrox tryptamine, benzodiazépine, et imidazoline au niveau de leurs récepteurs présents dans le système nerveux et de cette façon induisant leurs nombreux effets pharmacologiques (Moloudizargari *et al.*, 2013).

2.5.3- Effets anticancéreux et antioxydants

La Peganum harmala été utilisées dans le traitement de cancers et des tumeurs. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence la diminution de viabilité cellulaire de cellules cancéreuses provenant de divers tissus incluant le cerveau, le colon, le sein, le poumon, le foie, l'œsophage et les tissus gastriques, après un traitement par l'harmine. (Chen *et al.* ,2005).

2.5.4- Effets sur le système immunitaire

Des extraits de cette plante ont un effet anti-inflammatoire significatif via l'inhibition de certains médiateurs de l'inflammation prostaglandine. (Farzin et Mansouri, 2006).

2.5.5- Effets antidiabétiques

Harmine est le principal alcaloïde de *Peganum harmala* qui est impliqué dans l'effet antidiabétique. Une étude a montré que ce composé régule l'expression du récepteur Peroxysomes Gamma Proliferator-Activated (PPAR γ), le principal régulateur de l'adipogénèse et la cible moléculaire des médicaments antidiabétiques, par inhibition de la voie de signalisation (Waki *et al.* 2007). Des études récentes ont indiqué clairement que l'extrait éthanolique des graines de Harmel, réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des rats normaux et diabétiques à des doses variables (150 et 250 mg/kg). Cependant, il a été rapporté que l'extrait de Harmel n'a aucune activité sur la sécrétion d'insuline, puisque cette activité hypoglycémique est liée au pancréas.

Matériel et méthode

1- Présentation du matériel végétal

El Harmel est une plante vivace et glabre qui pousse spontanément dans des conditions semi-arides, des zones steppique et des sols sablonneux, originaire de la région méditerranée orientale. (Lavergne, 2013).

Règne : plantae

Sous-règne : Tracheoobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Sapindales

Famille : Zygophyllacées

Genre : Peganum

Espèce : *Peganum harmala* (Cronquist1981).



Figure 07 : la plante de *Peganum harmal* (Weckesser, 2013).

2- Présentation de la zone du prélèvement

Messloulou, située à 5 km de chef lieu de la commune d'el Aouinet (située sur la route nationale 16), possède une ancienne mine de plombe et de zinc, à l'arrêt depuis 1962, le climat d'Messloulou est un climat méditerranéen avec été chaud (classification de Koppen. Csa).

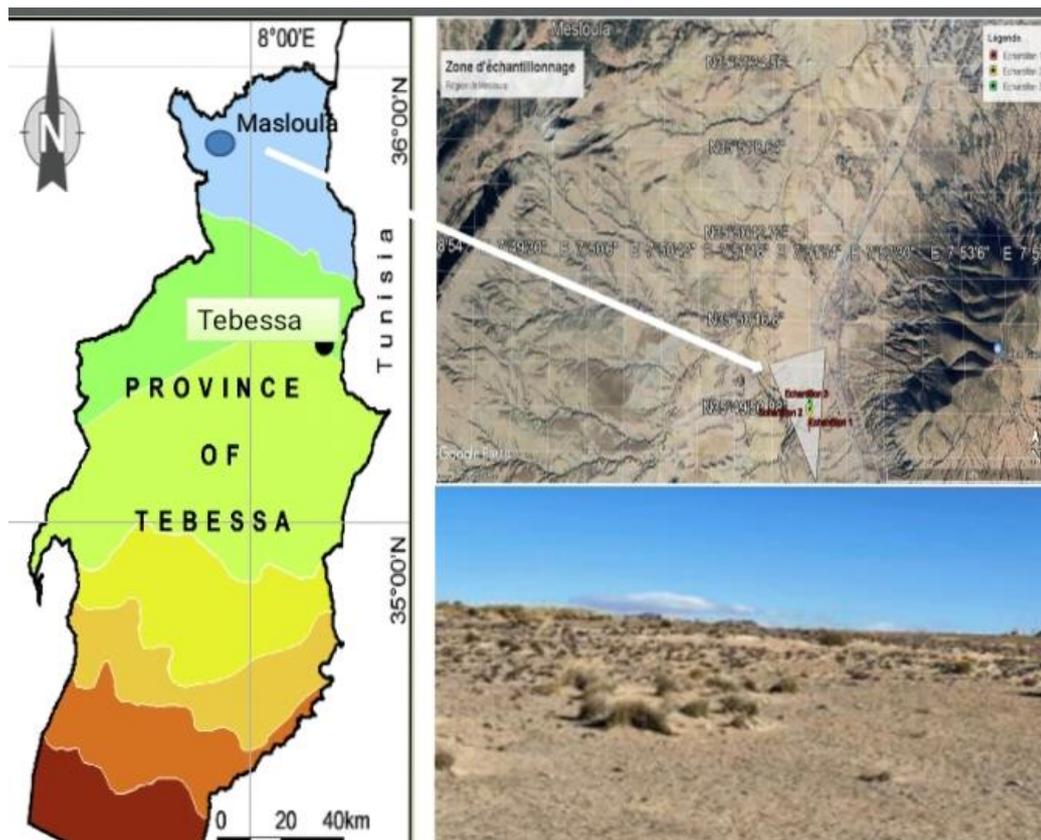


Figure08 : carte géographique de la zone d'étude

3- Prélèvement des échantillons du sol

La technique d'échantillonnage consiste à enfoncer une spatule stérile dans le sol à une profondeur de 10 à 20 cm près de la racine et placer l'échantillon dans flacon stériles étiquète. Spécifique au sol, puis couper les racines avec un ciseau stériles puis les placées dans des flacons stériles étiquetées contient une petite quantité d'eau distillée stérile, trois répétitions sont effectués par échantillons.

Matériel et méthode



4- Analyse chimique du sol

Pour mesurer le pH et la conductivité dans les sols à étudiés, trois échantillon de 10g de chaque sol a été prélevé, dans 100 ml d'eau distillées puis agiter pendant 5 min, après la filtration sur papier filtre, le filtrat de chaque échantillon a été récupère pour mesurer la conductivité et pH a l'aide d'un pH-mètre.



Matériel et méthode

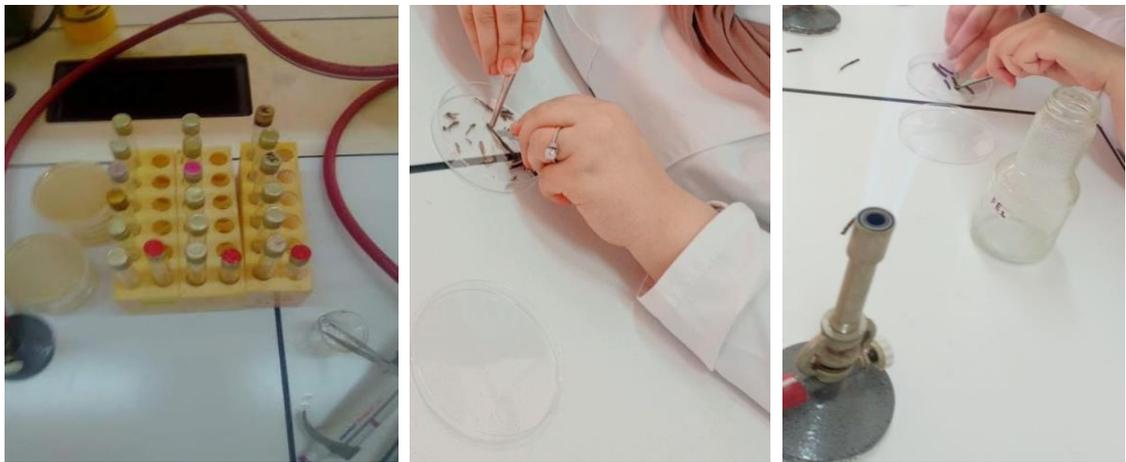
5- Préparation des milieux et mise en culture

1- Isolement à partir des échantillons de la rhizosphère

A l'aide d'une micropipette de 100µl ; une série de dilutions prêt pour chaque échantillon, prélever 1g du sol et le placer dans 9ml d'eau distillée stérile dans un tube stérile pour dilution 10^{-1} , puis répète le même procédure en ajoutant 9ml d'eau distillée a 1ml de chaque dilution jusqu'a l'obtention d'une dilution 10^{-4} .

2- Isolement à partir des échantillons des racines

Les racines ont été stérilisées avec le $HgCl_2$ puis lavées dix fois avec de l'eau distillée stériles pour éliminer les bactéries de la rhizosphère. On procède par une coupe longitudinale qui va être placée sur le milieu de culture (GN).



6- Isolement et purification des isolats

Après l'observation au binoculaire, 22 isolats ont été sélectionnés ; dont 14 a partir de culture des coupes racinaires et 8 a partir des dilutions de la rhizosphère, ces souches ont été ensemencées sur un milieu nutritif et incubées à 30°C pendant trois jours.

Tableau02 : composition du milieu nutritif (GN).

Ingrédient du milieu nutritif.....	g/l
Peptone.....	20
Potassium sulfate.....	10
Magnésium chloride.....	1.4
Agar-agar.....	15
pH 7.2±0.2	

Matériel et méthode

7- Préparation des souches

7.1- Teste de toxicité

Nous divisons la boîte de pétri en 8 parties, chaque partie nous mettons un écouvillon sur sa surface, en utilisant une once de platine, chaque boîte de pétri contient du cadmium, soit du plomb, les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 72 heures.

Le pouvoir des bactéries qui résistent à la toxicité est déterminé par la présence de la croissance des bactéries (colonie bactérienne).

7.2- Teste de solubilisation de phosphate.

Le teste a été réalisé dans des boîtes de pétri contenant le milieu gélosé NBRIP, ont utilisé des dépôts directs des cultures bactériennes en 4 répétitions par boîte de pétri par des peures à la surface de la gélose en utilisant des curdons stériles, les boîtes encimées ont été incubées avec 28°C pendant 72 heures.

Le pouvoir solubilisant est déterminé par la présence d'un halo transparent correspondant à la zone de lyse autour de la colonie bactérienne, un indice de solubilisation (ISP = Diamètre de solubilisation / Diamètre de croissance bactérienne) a été estimé (Gonzalez et al., 2018 ; Abiala et al., 2015).

Tableau 03 : composition de milieu NBRIB

Milieu de NBRIB liquide	g/l
Ingrédients	
- Glucose	10,0
- Tricalcium phosphate	5,0
- Magnésium chlorure hexahydrate	5,0
- Magnésium sulfate heptahydrate	0,25
- Potassium chloride	0,2
- Ammonium sulfate	0,1
- Eau distillée	1L

Matériel et méthode

7.3- Teste de solubilisation de potassium

Même procédure qui été utilise dans la solubilisation du phosphate avec un changement du milieu révélateur de la solubilisation de potassium (Aleksandrov) la formation de la zone claire autour de la colonie témoigne de la solubilisation de potassium, un indice de solubilisation est calculé ($ISK = \text{Diamètre de lyse} / \text{Diamètre de colonie}$) (Meena et al. 2013).

Tableau 04 : Composition de milieu d Aleksandrov

Milieu Aleksandrov	
Ingrédients	g/l
- Mg SO 4 7.H 2 0	0,005
-Mica (source de K)	2,0
- Ca HPO 4	2,0
- Ca CO 3	2,0
- Fe Cl 3	0,1
- Glucose	5,0
- Eau distillée	1l
pH 7,2+0,2	

7.4- Teste de solubilisation de calciums

La même technique de l'ensemencement par pecures a été utilise pour évaluée la capacité des isolats a solubilise de calcium sur le milieu de culture Aleksandrov modifie.

Tableau005 : composition de milieu Pikovskaya

Milieu Pikovskaya	g/l
Ingrédients g/l	
MgSO ₄ H ₂	0.005
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05
NaCl	0.1
KCl	0.1
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.125
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1
Agar	7.5
Glucose	5.0
Eau distillée	1l

Matériel et méthode

7.5- Teste de solubilisation de fer

De la même manière que nous avons entre pris dans les autres test seulement le milie de culture utilise est le NBRIB modifie.

8- Test de production d'IAA

Les souches ont été inoculées dans un bouillon nutritif contenant $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ de tryptophane, les cultures ont été agitées en continu a 150t/min pendant 90 heurs a 30C, centrifugez-les a 13400t/min pendant 10 min et mélanger les surnageant tout est incube dans l'obscurité totale en utilisant le réactif de Salkowski dans un rapport de 2:1 incube a température ambiante pendant 75 min et lire a 525 nm dans un spectrophotomètre.

Tableau06 : composition d milieu de salkowski

Le Bouillon nutritif		Réactif de Salkowski	
Ingrédients	g/l	Ingrédients	ml
- Peptone	5,0	-Fe Cl 3 (0,5 M)	5
- Beef extract	3,0	- H 2 SO 4	150
- Eau distillée	1	- Eau distillée stérile	250
- pH 7,4+0,2			

9- Analyse statistique

L'analyse statistique a commencé par une analyse de la variance a un seule critère pour maitre une évidence le comportement phénotypique des isolats vise a vis les paramètres étudiées suivi d'un teste Tukey de comparaison multiple pour maitre en lumière les déférences qui existe entre les moyennes enregistrées a un niveau de signification $\alpha=5\%$. Une classification hiérarchique a été utilisée pour étudier la diversité des isolats ainsi l'utilisation d'un double regroupement (duble clostring) sous forme d'un Heatmaps afin de faire ressortir l'effet simultané des paramètres étudiées sur la diversité des isolats suivi d'un VENN diagramme pour détecter les isolats qui présentent des traits PGPR d'intérêt.

Résultat et discussions

Résultat et discussion

1- Analyse chimique du sol

Histogramme de pH de Rhizosphère par plante. Nous notons une convergence entre les valeurs de pH pour les trois échantillons prélevés, ou elle atteint comme valeur la plus élevée environ 6,6 et la valeur le plus basse 5.9. Nous avons également remarqués que le pH du deuxième échantillon était plus élevé que dans les autres.

Histogramme de la conductivité des Rhizosphère par plante. montre que la conductivité était très élevée dans la première zone par rapport aux autres échantillons, atteignant 653,6 $\mu\text{s}/\text{cm}$, et le deuxième échantillon, présente la plus faible conductivité atteignant 218.

Le pH du site est légèrement acide tandis que la conductivité change d'un échantillon a un autre variant de non salin E2 a légèrement salin E1 vers salin dans l'échantillon 3 un selon le tableau d'appréciation du pH et la salinité des sols mentionné par (Bocoum, 2004)

Bocoum M. 2004. Méthodes d'analyses des sols. Doc de travail. Institut National de Pédologie, Dakar - Sénégal, 55 pp.

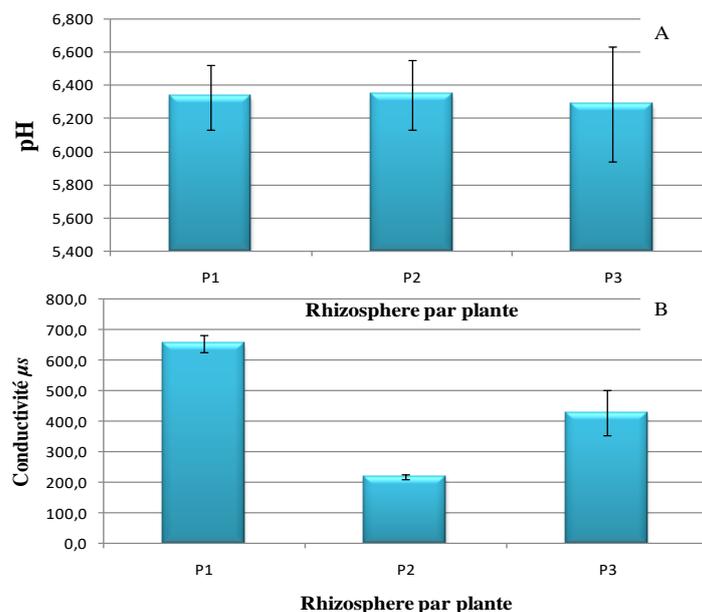


Figure 09 : Histogramme montrant les caractéristiques physico-chimiques du sol de la zone de prélèvement. A : pH des échantillons, B : Conductivité des échantillons

2- Isolement des souches pures

L'isolement des souches pures à amener a isolé 22 isolats (14 dans les racines, et 8 dans le sol) selon leur aspect macroscopique : couleur, forme, aspect. Nous avons constaté une grande

Résultat et discussion

diversité de colonies dans le milieu utilisé (GN solide) réputés pour permettre de distinguer la différence les différentes formes bactérienne (Tableau..., Annexe....)

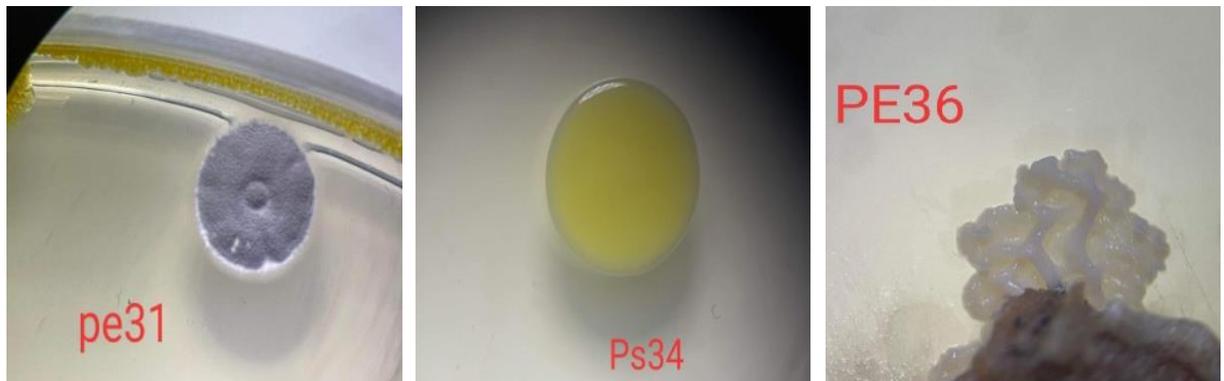


Figure10 : Différentes formes des isolats bactériennes.

3- Teste de solubilisation de phosphate

La **figure11** montre la zone de lyse autour des colonies bactériennes qui démontre le pouvoir des isolats à solubiliser le phosphate.

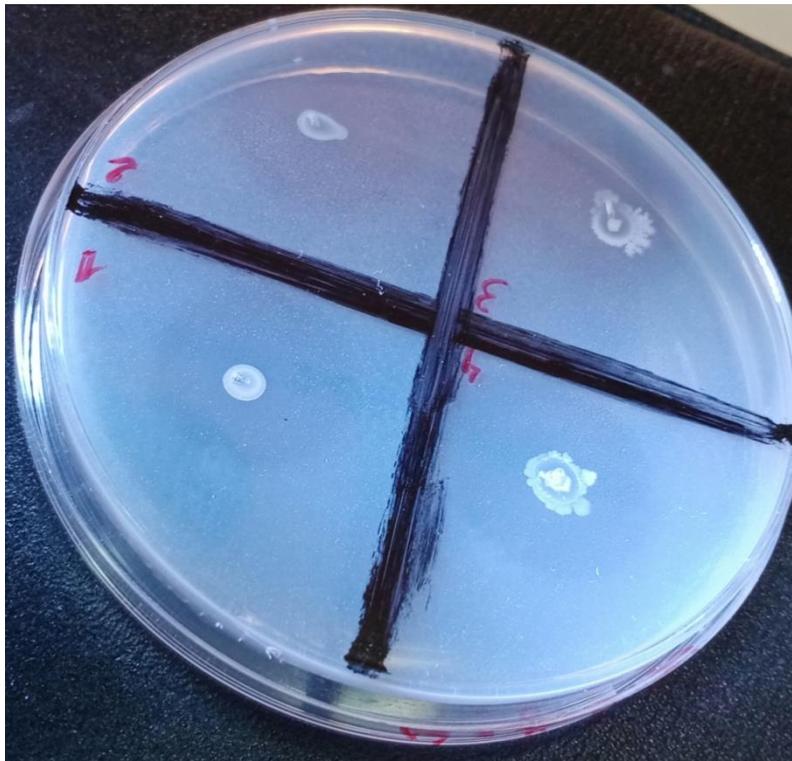


Figure11 : Solubilisation du phosphate par les isolats testés

Histogramme des indices de solubilisation des phosphates par l'isolat testés.
Révèle une différence entre les indices de SP enregistrés par les 17 isolats parmi les 22

Résultat et discussion

testés ou elle atteint 7,54 comme valeur la plus élevée isolat PS32 et de 3.54 comme valeur le plus bas isolat PE31.

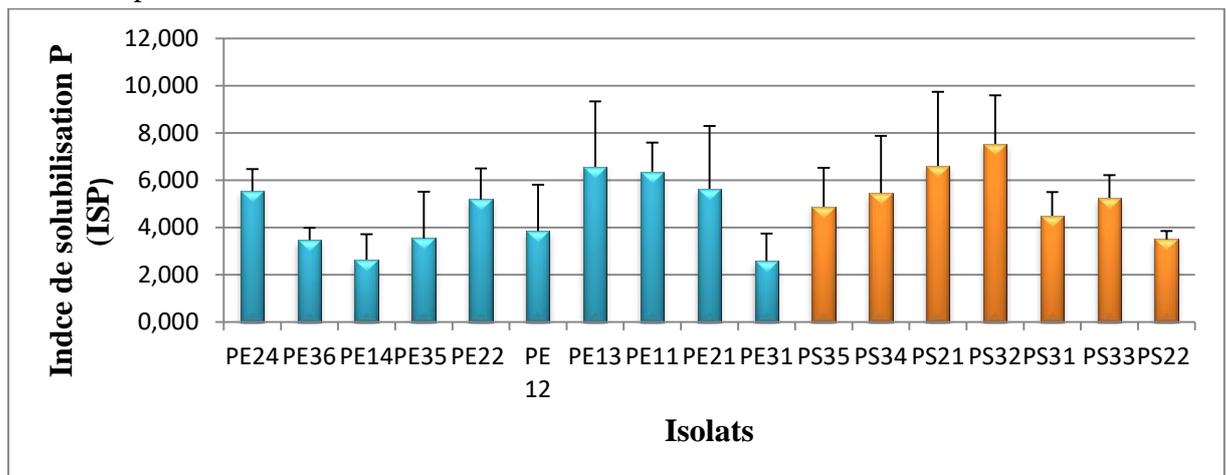


Figure12: histogramme des indices de solubilisation du phosphate par l'isolat testent.

L'analyse statistique à révélé une déférence hautement significatives ($p < 0,01$) entre les indices de SP enregistrés par les 17 isolats (tableau07), qui ont montre un pouvoir de solubilisation. Regroupée en 3 groupes déférents par le test Tukey.

Tableu07 : Analyse de la variance ISP

Source	DL	Som Car ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Isolats Isp	16	135,6	8,473	2,67	0,004**
Erreur	51	162,1	3,178		
Total	67	297,6			

Ceci est conforme aux études précédentes qui estimaient que 20 à 40% de la population microbienne solubles le phosphate et peuvent être isolée de la rhizosphère. (Chabot et al, 1993).

Les bactéries PRPR qui solubilise le phosphate jouent un rôle important dans la fertilité du sol et favorisent la croissance des plantes (Limame Hamdi, 2018). *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* et *Burkholderia cepacia* seraient des producteurs efficaces de gluconique acide qui est l'agent efficace le plus fréquent dans la solubilisation du phosphate minéral (Rodríguez et Fraga, 1999).

4- Test de solubilisation de Potassium

La zone claire autour des colonies bactériennes indique la solubilisation du potassium Figure13.

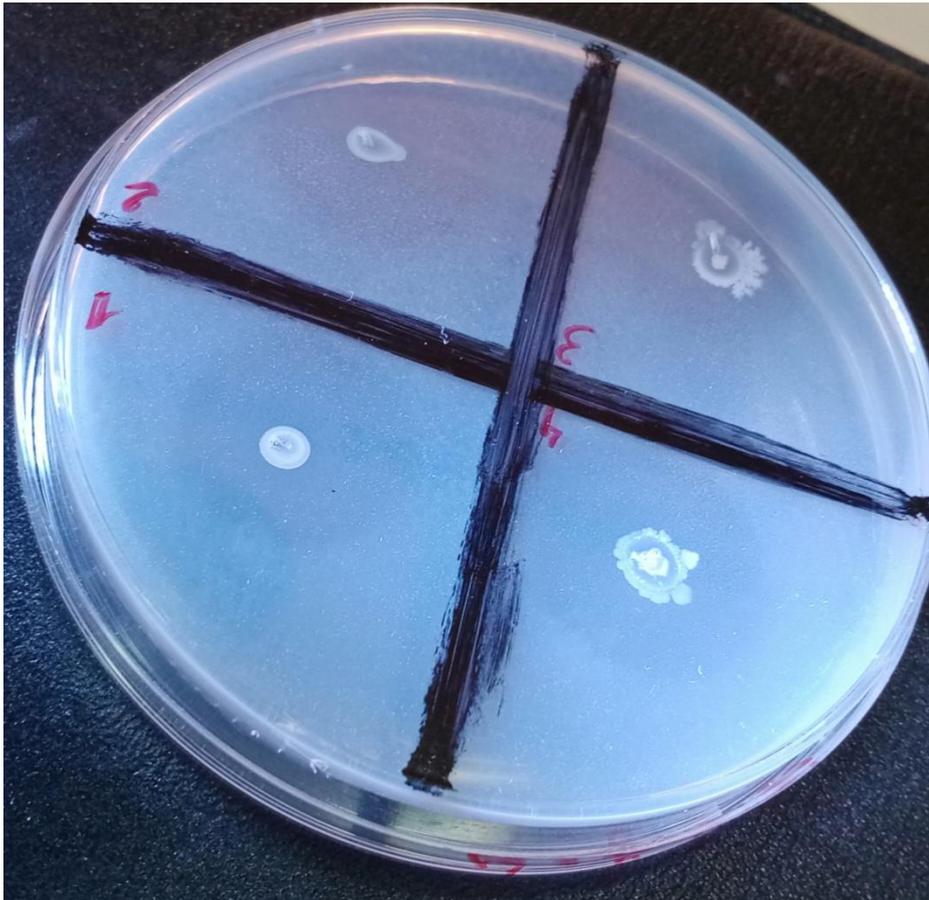


Figure13 : Solubilisation du Potassium par les isolats testés

La figure 14, montre les 3 isolats qui ont pu solubiliser le k à partir du milieu conventionnel Aleksandrov l'isolat PE14 a montré le plus important taux de solubilisation.

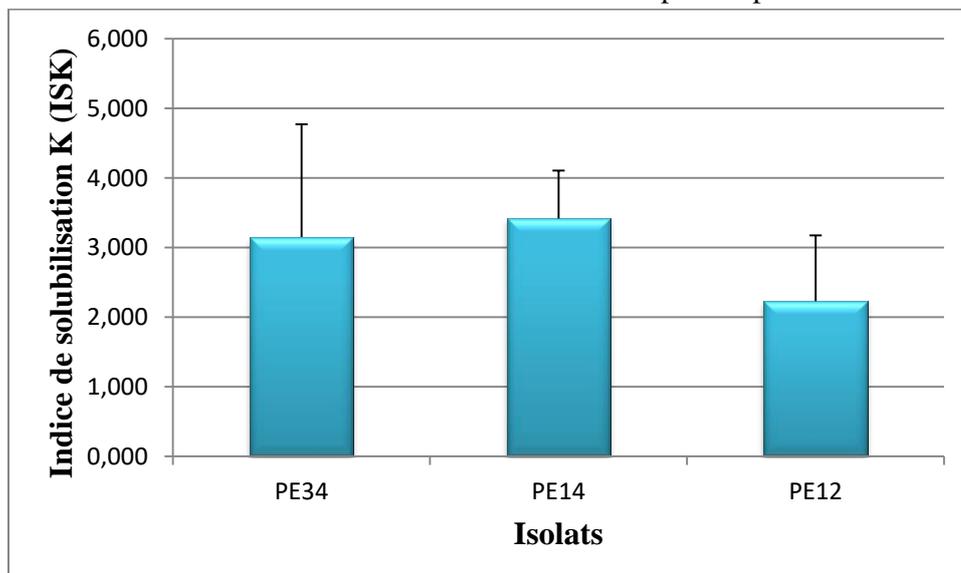


Figure14 : histogramme des indices de solubilisation du potassium par l'isolat testes.

Tableau 08 : Analyse de la variance ISK

Source	DL	ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Isolats	2	3,106	1,553	1,17	0,354 NS
Erreur	9	11,972	1,330		
Total	11	15,078			

L'analyse statistique a révélé une différence non significative entre les isolats ($p=0,354$) pour la solubilisation du potassium sur milieu Aleksandrov.

La solubilisation du K par les micro-organismes est alors une alternative faible pour rendre disponible cet élément aux plante (**Velázquez et al, 2016**). Ces résultats ont été confirmés par les recherches antérieures qui ont montré l'efficacité du PGPR isolé localement avec de multiples caractéristiques bénéfique telles que la solubilisation du K, par conséquent, ils peuvent être utilisé comme bio fertilisants pour améliorer la disponibilité du potassium dans les sols et pour améliorer la croissance et le rendement des plantes (**M.Yaghoubi et al, 2018**). La présence d'une variété des bactéries dans le sol capable de dissoudre différentes forme insolubles de potassium en produisant des acides organique et inorganiques assimilable par les végétaux. (**Meena et al, 2013**).

5- Teste de solubilisation de calcium

La **figure** montre la zone de lyse autour des colonies bactériennes qui ont pu solubiliser le calcium

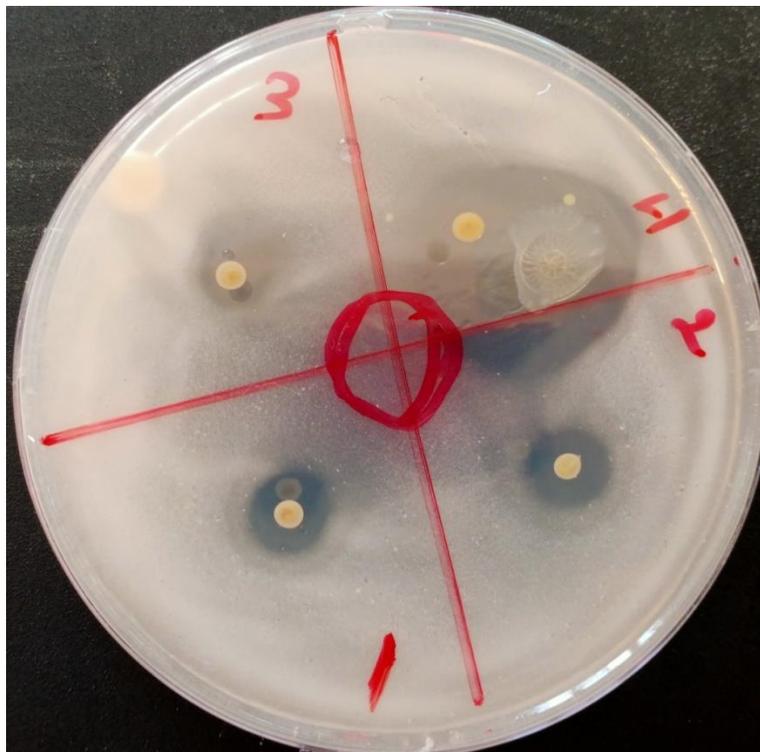


Figure 15: Solubilisation du Calcium par les isolats testés

Résultat et discussion

Histogramme des indices de solubilisation de calcium par les isolats testés révèle une différence entre les indices de Solubilisation du Ca enregistrés par les 11 isolats parmi les 22 testés ou elle atteint 6,25 comme valeur la plus élevée isolat PE11 et de 0,97 comme valeur le plus basse isolat PS11.

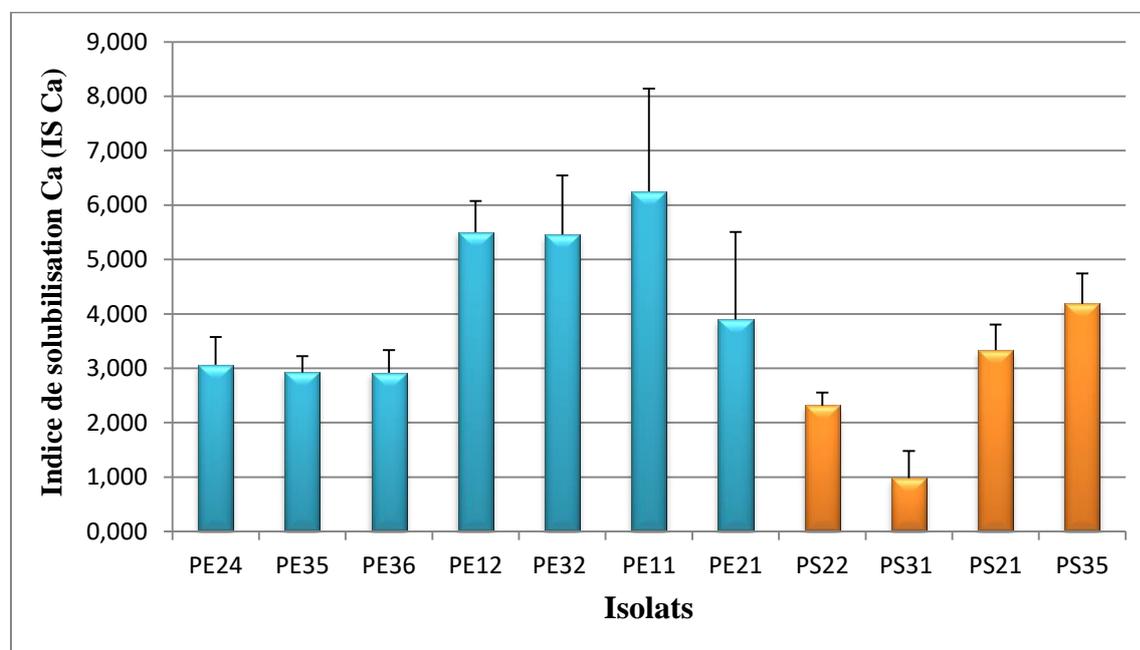


Figure16 : histogramme des indices de solubilisation du calcium par l'isolat testes

L'analyse statistique à révélé une déférence très hautement significatives ($p < 0,001$) entre les IS Ca enregistrés par les 11 isolats (tableau09). Regroupée en 5 groupes déferents par le test Tukey

Tbaleu09 : analyse statistique d'ISCa

Source	DL	ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Isolats	14	102,38	7,313	3,97	0,000***
Erreur	45	82,80	1,840		
Total	59	185,18			

Pendant la majeure partie de ce siècle, les microbiologistes agricoles et les écologistes microbiens se sont intéressés à la capacité de certain bacteries à résoudre efficacement les phosphates de calcium (Ahmed et all., 2021).

6- Test de solubilisation de fer

La zone claire autour des colonies bactériennes est un signe de solubilisation du fer.

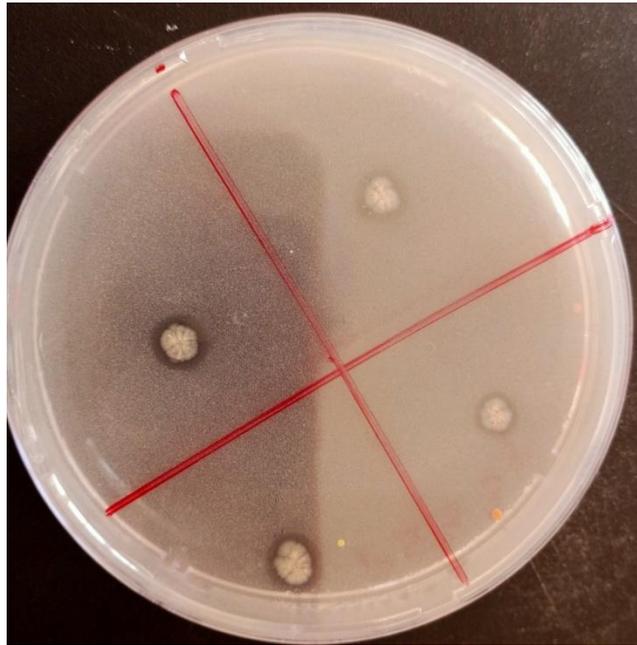


Figure 17: Solubilisation du Fer par les isolats testés

La figure 18, montre les 12 isolats qui ont pu solubiliser le Fe, l'isolat PE21 a montré le plus important taux de solubilisation.

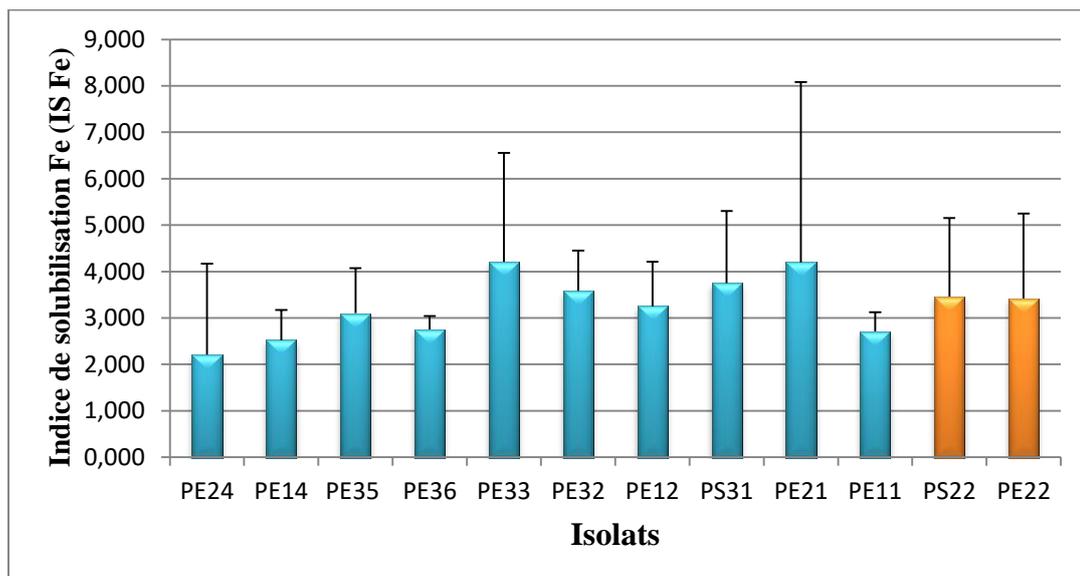


Fig 18 : Histogramme des indices de solubilisation du fer par les isolats testes.

Tableau10 : Analyse de la variance ISFe

Source	DL	ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Isolats	11	17,74	1,612	0,53	0,868
Erreur	36	109,06	3,029		
Total	47	126,80			

L'analyse statistique a révélé une différence non significative entre les isolats ($p= 0,868 > 0,05$) pour la solubilisation du Fer.

Le fer est un oligo-élément essentiel pour la plupart des micro-organismes. (**J. Kramer et al., 2020**). L'application de micro-organismes producteurs de sidérophores, en tant qu'approche respectueuse de l'environnement, facilite la croissance et la survie des plantes sous la toxicité des métaux lourds. (**M. Sepehri et al, 2021**). D'autre part des études récente sur la combinaison des bactéries PGPR productrice des siderophore avec la culture de luzerne dans des sols contaminés par les métaux lourd en montré une approche efficace et respectueuse de l'environnement pour surmonter les effets néfastes de la toxicité (**Sepehri et khatabi, 2021**). Cependant **Ferreira et al, 2019**. En avance que les effets combiné de limitation du Fe et de la salinisation des sols en tant que d'efis pour l agriculture moderne et vis a résume certain preuve indirecte qui plaide en faveur des PGPR producteur de siderophore en tant qu'agent de bio fertilisation dans les sols salinisés.

7- Production de l'IAA

le test qualitatif marqué par le virage de la couleur du milieu de la culture après l'ajout du réactif de Salkowski du rosâtre au marron indique une nette production d'IAA par 22 isolats parmi les 22 testés, en signalant que tous les isolats peuvent transaminer le tryptophane en IAA avec des différentes concentrations (**figure19**).



Figure19 : le virage de la couleur du milieu de culture après l'ajout du réactif de Salkowski

L'histogramme représentant la concentration de production d'IAA par les isolats testés, avec une nette importante production à signaler par les trois isolats PS22, PS31 et PE336 (figure20)

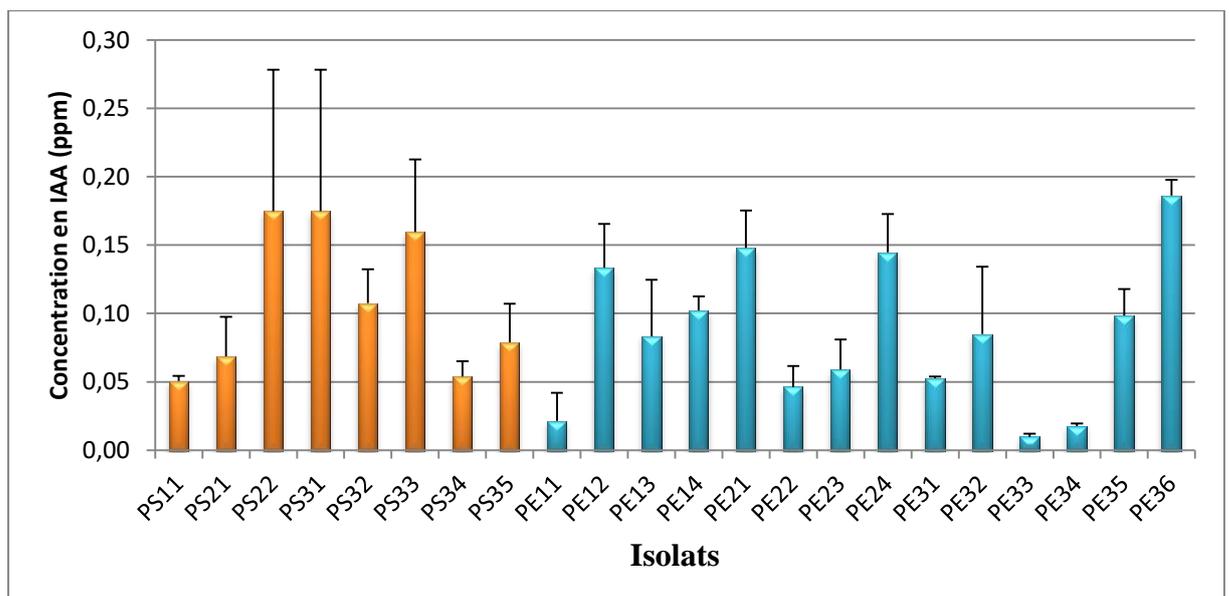


Figure20 : Histogramme de la production d'IAA d'isolats testés

L'analyse statistique a révélé une différence très hautement significative entre les isolats pour la production d'IAA regroupés par le test de Tukey en 9 groupes différents.

Résultat et discussion

Tableau11 : Analyse statistique de la production d'IAA

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Isolats	21	0,2444	0,011638	7,31	0,000***
Erreur	66	0,1050	0,001591		
Total	87	0,3494			

la production d'IAA est l'un de mécanismes le plus importants utilisés par PGPR pour améliorer la croissance, la santé et la productivité des plantes. (Sylia et al, 2022), en notant qu'environ 80% de la flore de la rhizosphère produit d'IAA ; par conséquent, l'application de tels micro-organismes dans le champ augmente les niveaux d'IAA endogène dans les plantes, de sorte que ces dernières ont un effet significatif. L'impact sur la croissance de ce dernier (Aron et al, 2011).

Le large éventail de taux de production d'IAA qui varie considérablement d'un isolat à un autre pourrait s'expliquer par le fait que les effets de concentrations variables en IAA varient selon les espèces de plantes : une concentration optimale d'IAA bactérienne a un effet stimulant, alors qu'une concentration élevée (supra-optimale) de celles-ci inhibe la croissance de ces racines primaires et stimulent la formation des racines latérales. (Spaepen et al. 2007 ; Glick 2012).

8- Biodiversité des isolats

La figure 21, montrant un schéma de double regroupement des isolats sur un Heatmaps, l'analyse des résultats obtenus, répartit l'ensemble de bactéries testées en quatre groupes distincts :

- le 1er groupe caractérisé par la production de l'IAA, solubilisation de Ca, et P, la résistance aux Pb (PS21, PS32, PS33, PS35, PS34), le 2ème groupe relié à la solubilisation du potassium et le Fer, production d'AIA, et résiste aux cd, Pb (PE14, PE22, PE33), Le 3ème groupe caractérisé par la solubilisation du P, Fe, production d' AIA et résistance aux cd et Pb et se composant des isolats (PE13, PE23, PE31, PE34, PS11).

En dernier lieu, il est très important de noter que le 4ème groupe caractérisé par tous les traits PGPR étudiés est constitué des isolats (PE21, PE11, PE32, PE35, PE36).

Résultat et discussion

D'autre part le Heatmaps met en lumière l'étroite relation qui existe entre la solubilisation de phosphate et la production de l'IAA avec la résistance aux deux métaux lourds testés (Cd, Pb).

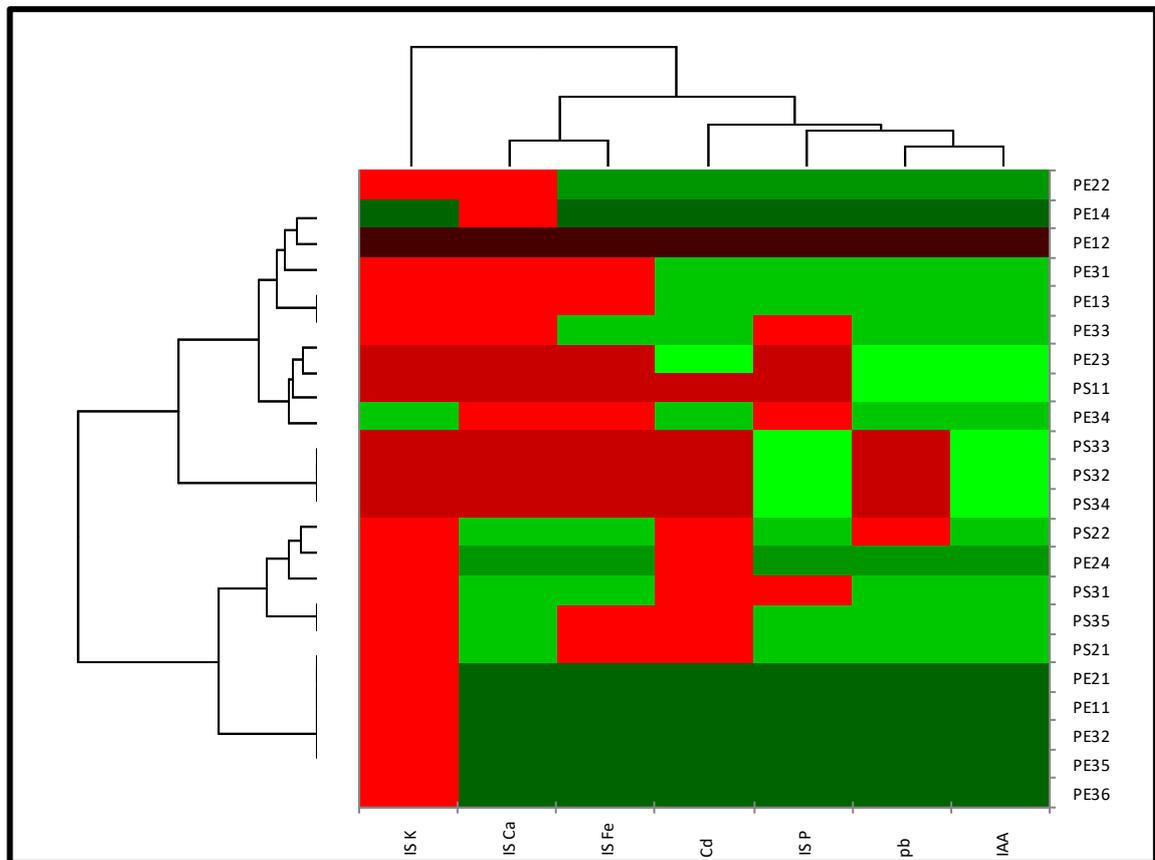


Figure21 : Schémas représentant les traits PGPR chez les isolats testés

Les phyla impliquant les principaux groupes de PGPR comprennent les *Actinobacteria*, les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes* et les *Proteobacteria* appartenant à différents genres *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Staphylococcus* (Kour, D et al, 2019).

Tandis que la diversité des isolats a été testée en utilisant une classification hiérarchique ascendante (figure 22), (annexe) a fait répartir les bactéries de la rhizosphère de *Peganum harmala* en 4 groupes différentes comme mentionné dans le tableau n12.

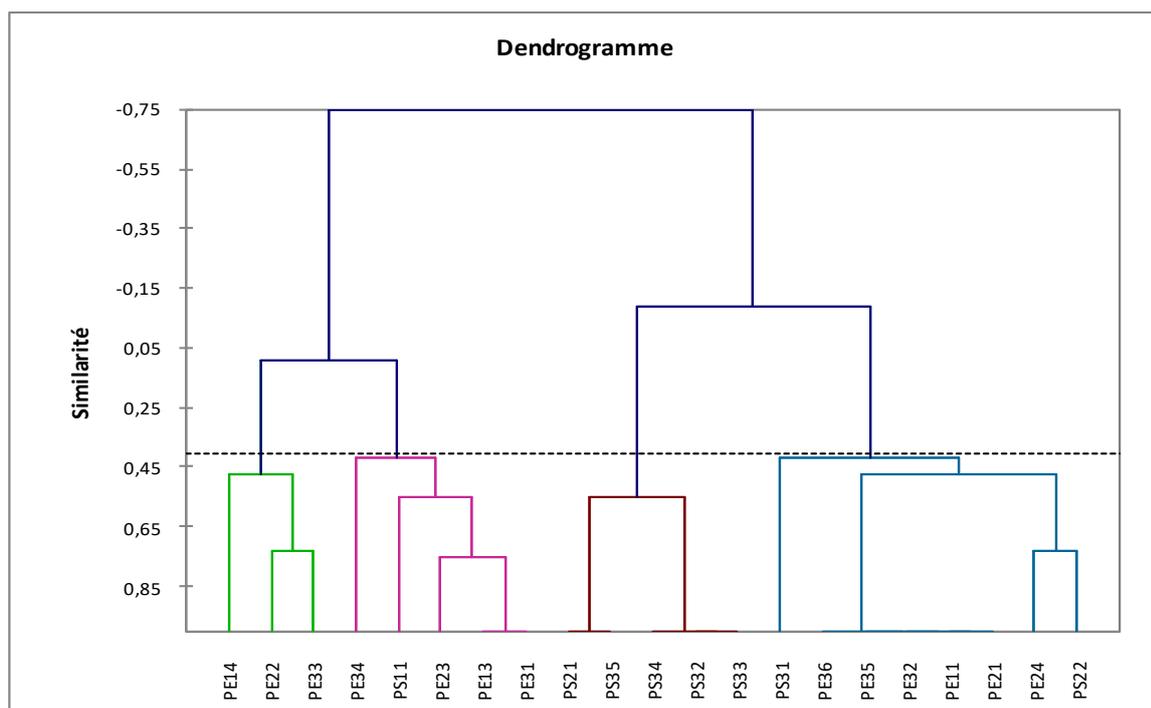


Figure 22 : Dendrogramme montrant les différentes classes des isolats testés à un seuil de similarité égale à 40 %.

Tableau n° 12: Répartition des isolats en groupe

groupes	Isolat
1	PE11, PE21, PE24, PE32, PE35, PE36, PS22, PS31
2	PE13, PE23, PE31, PE34, PS11
3	PE14, PE22, PE33
4	PS21, PS32, PS33, PS34, PS35

9- Les traits PGPR des isolats testés

La figure 23 montre la capacité des isolats testés à présenter des traits PGPR intéressants. D'autres part, le Venn diagramme des isolats selon les traits PGPR étudiés, nous permet de déceler la présence de six isolats solubilisent le P, Ca, Fe, produisent l'IAA, et résistante aux Cd et Pb (PE11, PE12, PE21, PE32, PE35, PE36) deux isolats solubilisent le P, Fe, produisent l'IAA, et résiste aux métaux lourd, un seule isolat produisent l'IAA et solubilisent le Fe résiste le Cd et Pb.

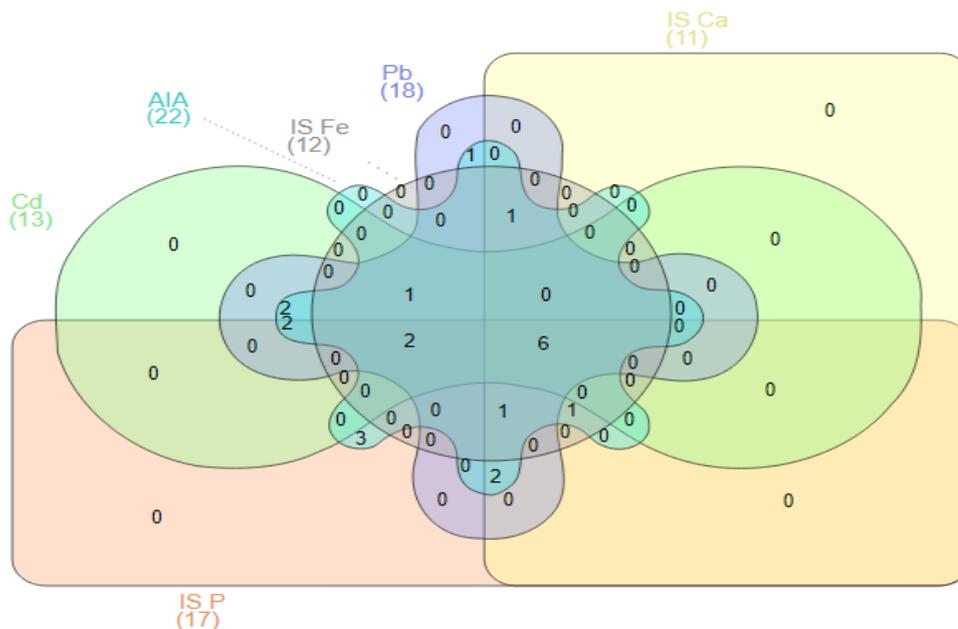


Figure 23 : venn diagramme des isolats teste

Les bactéries endophytes réservent une importance biologique pour le développement de l'environnement et de l'agriculture, ces bactéries PGPR sont capable de solubiliser les minéraux a partir de leur composition et caractérisation dans le sol pour être absorbé par les racines des plantes comme la solubilisation du P, K, Ca et Fe et la production les phytohormones telle que AIA ainsi comme protecteur des culture contre les stress (**Fakroun kawther, 2021**). Les PGPR sont considérés comme une alternative écologique aux engrais chimiques dangereux, ils favorisent la croissance des plantes en facilitant la tolérance aux stress biotique et abiotique et soutiennent la nutrition des plantes hôtes. (**Teg B et all, 2020**) l'utilisation des PGPR comme bio fertilisants est une approches biologique pour l'intensification durable de l'agriculture (**Louise M, 2004**).

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Cette contribution à isoler des PGPR à partir de la rhizosphère de *Peganum harmala* nous a permis d'identifier certaines bactéries caractérisées par des traits PGPR intéressants. Toutes les bactéries isolées sont productrices d'IAA, même si le taux de production varie considérablement d'un isolat à l'autre. 17 isolats ont montré un pouvoir de solubilisation du phosphate alors que 3 isolats ont pu solubiliser le potassium, 11 isolats ont pu solubiliser le Calcium et 12 isolats ont montré le pouvoir de solubilisation du fer. Ce qui confirme la biodiversité des bactéries isolées de la même rhizosphère et des racines.

Il est très judicieux de signaler que ce travail doit être approfondi par des tests sous serre en inoculant d'autres espèces végétales par nos isolats à 7 traits PGPR afin de tester leur potentiel à promouvoir la croissance des plantes, à induire la tolérance aux différents stress biotiques et abiotiques ainsi que la phytoremédiation des sols pollués et dégradés.

En perspective et suite à ce travail il est judicieux d'identifier la position taxonomique des isolats par des tests génomiques entre autres 16S rRNA, évaluer le pouvoir de PGPR des isolats *in situ*, et encore tester le pouvoir de bioremédiation dans des sols pollués par des métaux lourds.

Référence

Reference

Reference

A

1. **Aarons DH, Rossi GV, Orzechowski RF.** 1977. Cardiovascular actions of three harmala alkaloids: Harmine, harmaline, and harmalol. *J. Pharm. Sci* 66:1244–8.
2. Abiala, M. A., C. Odebode, S. F. Hsu, C. B. Blackwood, (2015), Phytobeneficial Properties of Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Maize in Southwestern Nigerian Soils, *Applied and Environmental Microbiology* July 2015 Volume 81 Number 14.
3. Abiala, M. A., C. Odebode, S. F. Hsu, C. B. Blackwood, (2015), Phytobeneficial Properties of Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Maize in Southwestern Nigerian Soils, *Applied and Environmental Microbiology* July 2015 Volume 81 Number 14.
4. Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2011). Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiolgy. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems* (pp. 1–36). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-18357-7_1
5. Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2011). Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiolgy. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems* (pp. 1–36). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-18357-7_1.
6. Ahmad, M.; Zahir, Z.A.; Khalid, M. (2013) Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiol. Biochem.* 2013, 63, 170–176.
7. **Asgarpanah J, Ramezanloo F.** 2012. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 6:1573-1580.
8. **Asgarpanah J, Ramezanloo F.** 2012. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 6:1573-1580.
9. Ashrafuzzaman M., Hossen F. A., Ismail M. R., Hoque M. A., Islam M. Z., Shahidullah S. M., Meon S. (2009). Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol*, 8:1247-1252
- Nautiyal C. S. (1999). Narula N., Deubel A., Gans W., Behl R. K., Merbach W. (2006). Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ*, 52: 119-12

Reference

B

10. **Bayman P. et Otero J. T., 2006.** Microbial endophytes of Orchid roots. In: Schulz B., Boyle C., Sieber T. N. (eds.), *Microbial root endophytes, Soil microbiology*, Vol. 9., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 107-153.
11. Bhattacharya P. N, Jha D.K. (2012). Plante growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : emergence in argiculture J.h microbiol, biotechnol 28-1327-1350.

C

12. Campbell R ; Greaves M.P. (1990). Anatomy and community structure of the rhizosphere in the Rhizosphere (Ed j.m Lynch) 11-34.
13. Chabot, R., Antoun, H., & Cescas, M. P. (1993). Stimulation in the growth of corn and romaine lettuce by microorganisms dissolving inorganic phosphorus. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 941–947. doi:10.1139/m93-142
14. **Chen Q, Chao R, Chen H, Hou X, Yan H, Zhou S, et al.** 2005 Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *Int. J. Cancer* 114:675–82.
15. **Chopra C, Abrol BK, Handa KL.** 1960.Les plantes médicinales des régions arides.
16. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005
17. Costacurta A., Vanderleyden J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1-18.

E

18. Ezawa T., Smith S. E., Smith F. A. (2002). P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, 244: 221-230.

F

19. FAO, (2015), *World fertilizer trends and outlook to 2018*.
20. **Farzin D, Mansouri N.** 2006. Antidepressant-like effect of harmine and other betacarbolines in the mouse forced swim test. *Eur. Neuro. Psycho. pharmacol* 16:324–8.

Reference

21. Ferreira, M. J., Silva, H., & Cunha, A. (2019). Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: A review. *Pedosphere*, 29(4), 409-420.

G

22. Glick B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41:109-117.
23. Glick B. R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica Volume 2012, Article ID 963401, 15 pages.
24. Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109–117. doi:10.1139/m95-015
25. Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30–39. doi:/10.1016/j.micres.2013.09.009
26. Gonzalez A.H., D. Morales Londono, E. Pille da Silva, F.X.I. Nascimento , L.F. de Souza, B.G. da Silva, A.D. Canei, R.D. de Armas, A.J. Giachini and C.R.F.S. Soares, (2018), *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* strains obtained from coal-mining areas nodulate and promote the growth of *Calopogonium muconoides* plants used in the reclamation of degraded areas , *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072, doi:10.1111/jam.14117.
27. Graham P.H (1998) *Principals and application of soil microbiology* : 322-345.

H

28. **Hamsa TP, Kuttan G.** 2010. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol* 649: 64–73.

<http://www.universalis.fr/encyclopedie/zygophyllacees>.

I

29. **Iserin P.** 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales*. 2ème Ed. Larousse. Londres, 143, 225, 226 p.

K

30. Kloepper J.W ; Beauchamp C.J (1992). A review of issues related to measuring colonisation of plant roots by bacteria. *Can J Microbiol* 38, 1219-1232.
31. Kloppe j.w (1993) ; plant-growth promoting rhizobacteria as biological control agents in : *Soil microbial ecology* (ED) F.B Jr ; Metting. N.Y 255-273.

Reference

32. Konat I (2007) ; diversité phénotypique et moléculaire du Caroubier, et des bactéries endophytes qui lui sont associées. Université Mohamed V-agdal, faculté des sciences Rabat.
33. Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, A., Meena, V. S., ... & Saxena, A. K. (2019). Rhizospheric microbiomes: biodiversity, mechanisms of plant growth promotion, and biotechnological applications for sustainable agriculture. In *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability* (pp. 19-65). Springer, Singapore.

L

34. **Lavergne. (2013)** Zygothylacées. Disponible en format (URL) sur le site:
35. Lucy M., Reed E., Glick B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 86:1-25

M

36. Meena O.P., Maurya B.R., Meena V.S., (2013), Influence of K solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica, *Agriculture for sustainable Development* 1(1):53-56, 2013/article
37. Meena V.S., B.R. Maurya, Jay Prakash Verma (2014) Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research* 169 (2014) 337–347 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>.
38. Meena V.S., B.R. Maurya, Jay Prakash Verma (2014) Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research* 169 (2014) 337–347 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.00>.
39. **Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Hossein A M, Shayegh J.** 2013.

N

40. Normander B ; Prosser J. I (2000) ; Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing condition 66 : 4372-4377.
Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. *Pharmacogn. Rev* 7(14): 199–212.

Q

41. **Quezel P, Santa S.** 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 Vol, CNRS, Paris, 1170p.
Recherche sur les zones arides. Ed UNESCO, Rome ,97p.

Reference

R

42. Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319–339. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2.

S

43. Sepehri, M., & Khatabi, B. (2021). Combination of siderophore-producing bacteria and *Piriformospora indica* provides an efficient approach to improve cadmium tolerance in alfalfa. *Microbial Ecology*, 81(3), 717-730.
44. Sexana A.K. et Tilak K.V.R (1998) free-living neetrogen fixer : it role in corps production. In : *Microbes of health, wealth an sustainable environment* 25-64.

T

45. **Tahrouch S, Rapier S, Belahsen Y, Bessiere JM, Andary C.** 1998.Volatile constituents of *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*). *Acta. Bot. Gallica* 145 (2): 121-124.
46. **Tan R. X. et Zou W. Z., 2001.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 448-459.

V

47. Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 2003, 255, 571–586.
48. Vessy J. K (2002). Plante growth-promoting rhizobacteria as biofelrilize. *Plante soil* 255 : 571-586.

W

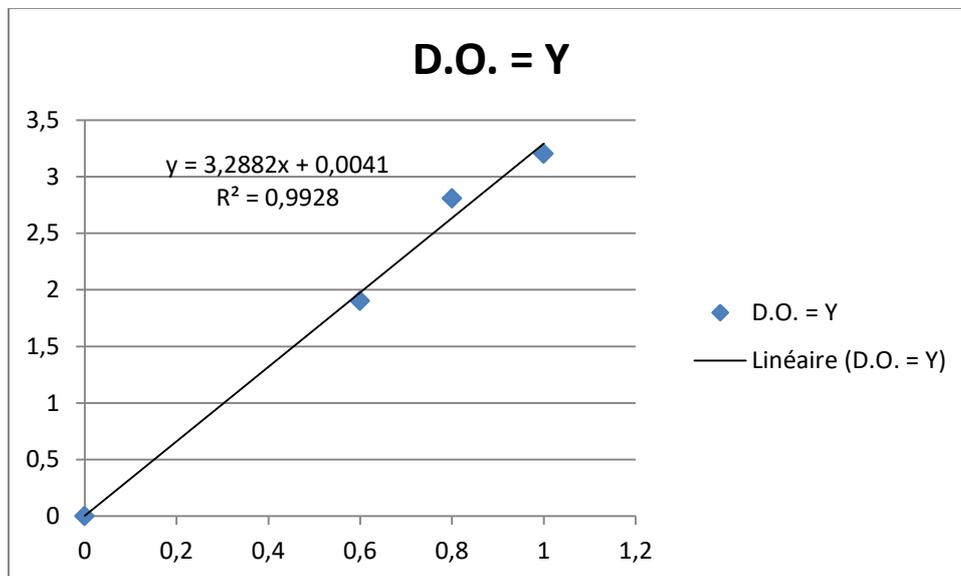
49. **Waki H, Park KW, Mitro N, Pei L, Damoiseaux R, Wilpitz DC.** 2007. The small molecule harmine is an antidiabetic cell-type-specific regulator of PPAR ssssgamma expression. *Cell.Metab* 5:357–70.

Y

50. **Yousefi R, Ghaffarifar F, Dalimi A.** 2009.The effect of *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) *in vitro*. *Iran. J. Parasitol* 4: 40-47.

Les Annexes

1- Les courbes d'étalonnage :



2- Analyse statistique

ANOVA à un facteur contrôlé : IAA en fonction d'Isolats

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Isolats	N	Moyenne	Groupement
22	4	0,18621	A
4	4	0,1749	A B
3	4	0,1749	A B
6	4	0,1595	A B C
13	4	0,1479	A B C D
16	4	0,1448	A B C D
10	4	0,1334	A B C D
5	4	0,1076	A B C D E
12	4	0,10219	A B C D E
21	4	0,09846	A B C D E
18	4	0,0850	A B C D E
11	4	0,0833	A B C D E
8	4	0,0788	B C D E
2	4	0,0685	C D E
15	4	0,0590	C D E
7	4	0,05398	C D E
17	4	0,052692	D E
1	4	0,05064	D E
14	4	0,04630	D E
9	4	0,0214	E
20	4	0,017792	E
19	4	0,00988	E

ANOVA à un facteur contrôlé : ISP en fonction de Isolats IsP

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Isolats			
IsP	N	Moyenne	Groupement
14	4	7,54	A
13	4	6,60	A B
7	4	6,56	A B
8	4	6,358	A B
17	4	5,63	A B
1	4	5,542	A B
12	4	5,45	A B
10	4	5,250	A B
5	4	5,188	A B
11	4	4,875	A B
15	4	4,500	A B
6	4	3,850	A B
4	4	3,538	A B
9	4	3,500	A B
2	4	3,463	A B
3	4	2,638	A B
16	4	2,571	A B

ANOVA à un facteur contrôlé : IS Ca en fonction de Isolats ISCa

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Isolats				
ISCa	N	Moyenne	Groupement	
6	4	6,250	A	
4	4	5,500	A	B
5	4	5,458	A	B
14	4	4,20	A	B C
11	4	4,188	A	B C
7	4	3,900	A	B C
13	4	3,750	A	B C
10	4	3,333	A	B C
12	4	3,250	A	B C
1	4	3,063	A	B C
2	4	2,925	A	B C
3	4	2,917	A	B C
15	4	2,708	A	B C
8	4	2,313	A	B C
9	4	0,979		C

ANOVA à un facteur contrôlé : IS Fe en fonction de Isolats Fe

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Isolats			
Fe	N	Moyenne	Groupement
6	4	4,21	A

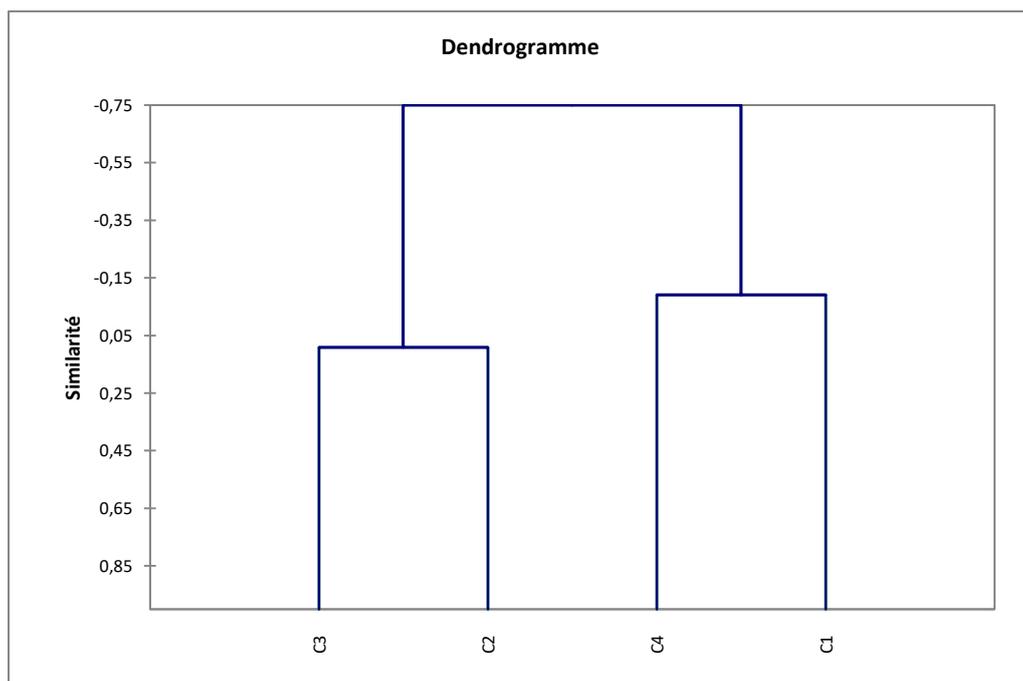
11	4	4,20 A
10	4	3,750 A
7	4	3,583 A
4	4	3,458 A
8	4	3,417 A
9	4	3,250 A
3	4	3,100 A
5	4	2,750 A
12	4	2,708 A
2	4	2,521 A
1	4	2,208 A

ANOVA à un facteur contrôlé : IS K en fonction de Isolats K

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Isolats K	N	Moyenne	Groupement
2	4	3,417	A
1	4	3,150	A
3	4	2,229	A

3- Classification hiérarchique



Classe	1	2	3	4
Objets	8	5	3	5
Somme des poids	8	5	3	5
Variance intra-classe	0,5179	0,7000	0,6667	0,6000
Distance minimale au barycentre	0,4146	0,4899	0,4714	0,5657

Les Annexes

Distance moyenne au barycentre	0,6109	0,7299	0,6540	0,6788
Distance maximale au barycentre	1,0825	0,9165	0,7454	0,8485
PE11	PE13	PE14	PS21	
PE21	PE23	PE22	PS32	
PE24	PE31	PE33	PS33	
PE32	PE34		PS34	
PE35	PS11		PS35	
PE36				
PS22				
PS31				
