



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



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme
de Master académique en

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présentée par : GLIZ Mohammed El-Amin

MAHLOUL Ilham

Thème

**Approche microbiologique pour l'amélioration des
plantes médicinales, cas de Lin (*Linum usitatissimum*)**

Soutenu le, Juin 2022

Devant le Jury :

BEKADA A	Président	Prof.	Univ-Tissemsilt
LAABAS S	Encadrante	M.C.B.	Univ-Tissemsilt
BOUKIRATE D	Co-encadrante	M.C.B.	Univ-Tissemsilt
ZEMOUR K	Examineur	M.C.B.	Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2021-2022

Remerciement

Au terme de ce travail, nous voudrions tout d'abord à remercier « ALLAH » très clément et sa sainte miséricorde qui nous a donné la force et la patience et de nous a aidé à réaliser et à accomplir ce travail.

Nous vifs remerciements sont adressés à notre encadreur, **M^{elle} Laabas saadia** de nous avoir accordé toute sa confiance en acceptant de diriger ce travail. sa disponibilité de tous les instants, Sa grande expérience, sa gentillesse et ses grandes qualités scientifiques et ses qualités humaines nous lui devons une immense reconnaissance et un grand respect.

Nous remerciements vont également à tous les membres du jury, pour avoir accepté d'en faire partie et pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce mémoire :

M Bekada A, d'avoir accepté de présider le Jury.

M Zémour, d'avoir examiné ce travail.

Nous adressons nos remerciements **le groupe du laboratoire d'université de tissemilt et EPSP Mahdia** pour leur accueil et la confiance qu'ils nous ont accordé au cours de la réalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

Mes très chers Parents sans leurs amours, leurs sacrifices et leurs Encouragements je ne serais jamais arrivée à réussir dans mes études Je sais bien quelque soit les remerciements que je leurs adresse c'est peu, que Dieu les protège Et leur donne la santé et une longue vie.

Mes très chères sœurs : **Amina – Nada**

Mon très cher frère : **Kamal**

Mais amies :**Manel – Fadoua – Karima –sara – naima–
Salsabil – Imane**

A toutes mes collègues de **la promotion master II microbiologie appliquée** qui j'ai passé mes meilleurs moments qui resteront un bon souvenir pour toujours.

Jelham

Dédicace

Avec l'aide d'allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie:

- A **mes très chers parent** pour toutes les privations et sacrifices

consentis

-A mes sœurs : **AMINA ET BOUTHAINA**

- A mon frère : **HAMZA**

- A mes amis, **ZAKI, HAMADA, YUCEF et ABDALLAH ,SIDALI ,**

AMINA, CHAIMA , RADJA ,HANANE

- A **mes collègues** et toutes qui ma accompagnée tout le long de la réalisation de

ce travail.

Sans oublier à tous ceux qui j'aime.

Amin

Liste des abréviations

(ACC) désaminase : Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase

°C : degré Celsius

AIA : l'acide indole-3 acétique

ALA : Acide alpha-linolénique

Ans : année

BSP : Bactéries Solubilisatrices les Phosphates

Cm : centimètre

g : gramme

GN : Gèlose Nutritive

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HCN : l'acide cyanhydrique

HCN : le cyanure d'hydrogène

JC : Jésus-Christ

Kd : Kilo Daltons

Kg : kilogramme

l'ARN : Acide ribonucléique

l'UE : l'Union Européenne

mm : millimètre

NaCl : Chlorure de sodium

OMS : organisation mondiale de la santé

P : Le phosphore

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

UFC : unité formant colonie

Kd : la constante d'affinité

SOMMAIRE

Introduction.....	01
-------------------	----

CHAPITRE I : Etude bibliographique

1. Les plantes médicinales.....	02
1. 1. Lin (<i>Linum usitatissimum</i> L).....	02
1. 1. 1. Répartition géographique et production de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	03
1. 1. 2. Classification botanique de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>).....	03
1. 1. 3. Description botanique	03
1. 1. 4. Le développement de la plante	05
1. 1. 5. Utilisation thérapeutique	06
1. 1. 6. Les composants de grain de lin.....	06
1. 1. 7. Huile de Lin	07
2. La rhizosphère	07
2. 1. Les micro-organismes de la rhizosphère.....	08
2. 2. Les PGPR les plus répondus	08
2. 2. 1. Les bactéries du genre <i>Azospirillum</i>	08
2. 2. 2. Les bactéries du genre <i>Bacillus</i>	09
2. 2. 3. Les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>	09
2. 3. Mécanismes d'action des PGPR	10
2. 3. 1. Effets directs	10
2. 3. 1. 1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique.....	10
2. 3. 1. 2. Solubilisation du Phosphate	10
2. 3. 1. 3. Production de phytohormones	11
2.3.1.4. Rôle de l'éthylène	12
2. 3. 1. 5. Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase	13
2. 3. 2. Effets indirects	13
2. 3. 2. 1. Compétition pour l'espace et les nutriments	13
2. 3. 2. 2. Compétition pour le fer et la production de sidérophores	14
2. 3. 2. 3. Antibiose et parasitisme	14
2. 3. 2. 4. Composés volatiles	15
3. Effet de l'inoculation des PGPR sur le développement des plantes médicinales	16

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

1. Sol rhizosphérique	17
2. Isolement des bactéries rhizosphérique	17
2.1. Identification des isolats.....	18
2.1.1 La coloration de gram	18
2.1.2. Etude des enzymes respiratoires.....	19
2.1.2.1. Test de la catalase	19
2.1.2.2. Test d'oxydase	19
2.1.3. Galerie API 20 NE	19
2.1.4. Conservation des souches	20
3. Culture et inoculation des plantules " <i>in vitro</i> "	20
3.1. Germination aseptique des graines	21
3.2. Inoculation des plantules de Lin.....	21
3.3. Etude statistique.....	22

CHAPITRE III : Résultats et discussion

1. Isolement des bactéries rhizosphérique	23
1.1. Caractéristiques morphologiques des isolats.....	23
1.2. Caractéristiques microscopiques des isolats	24
1.3. Etude des enzymes respiratoires	25
1.3.1. Test d'oxydase	25
1.3.2. Test catalase	25
2. Identification des isolats par les galeries API 20 NE	26
3. Culture et inoculation des plantules " <i>in vitro</i> "	27
3.1. Estimation de la croissance	27
3.1.1. Poids frais et sec des plantes de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>).....	27
3.1.2. Longueur de la partie aérienne et racinaire	28
Conclusion	31

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 01: Plante de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	02
Figure 02 : Morphologie d'une plante de lin	04
Figure 03: Graines de Lin	04
Figure 04 : Les stades de développement du Lin.....	05
Figure 05: Structure de la rhizosphère.....	08
Figure 06: Les principaux mécanismes d'action des rhizobactéries du groupe PGPR.....	15
Figure 07: Site d'échantillonnage dans la région de Lardjem (Tissemsilt)	17
Figure 08: Technique d'isolement des souches à effet PGPR	18
Figure 09: Ensemencement de la galerie API 20 NE	20
Figure 10: Les graines de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>) utilisées dans l'essai.....	20
Figure 11: Germination de graines de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	21
Figure 12: Test d'inoculation des plantules de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>) "in vitro"	22
Figure 13: Aspect macroscopique de la souche S8 sur Gélose nutritive après 24h d'incubation à 30°C.	23
Figure 14: Aspect microscopique de la souche S06 après coloration de Gram (Grossissement × 1000).....	24
Figure 15: Test Oxydase.....	25
Figure 16: Test de catalase positive (souche 02)	25
Figure 17: Galerie API 20NE ensemencée par la souche S1 après 24h d'incubation.....	26
Figure 18: Test d'inoculation des plantes de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>) par les souches isolées	27
Figure 19: Effet de souches a effet PGPR sur le poids frais et sec de plantes de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>)	28
Figure 20: Plantes de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>) après 45 jours d'inoculation par les PGPR	30
Figure 21: Effet de souches a effet PGPR sur la longueur de la partie aérienne et racinaire de plantes de Lin (<i>Linum usitatissimum</i>).....	30

Liste des tableaux

Tableau 01: Les PGPR associées aux plantes médicinales	16
Tableau 02: Caractéristiques morphologique des colonies après 24h d'incubation à 30°C	24
Tableau 03: Caractères des souches identifiées	26

Introduction

Introduction

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80 % de ces personnes dépendent exclusivement de la médecine traditionnelle. en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (ANG-LEE et al, 2006).Cependant, la culture des plantes médicinales est gravement menacée par les stress abiotiques et l'application des engrais chimiques qui sont à la fois très onéreux, et polluants. A cet égard, les bactéries rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes (PGPR) peuvent fournir des solutions aux problèmes liés à l'utilisation massive d'intrants chimiques qui sont préjudiciable à la santé de consommateur.

Le Lin (*Linum usitatissimum*) est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en médecine traditionnelle; ses graines ont un potentiel important dans le traitement de plusieurs maladies telles que les troubles cardiovasculaires, le diabète, les troubles urinaires, l'ostéoporose, le cancer, l'arthrite, les maladies auto-immunes et maladies neurologiques (Arslanoglu et Aytac, 2020).

L'utilisation des techniques adéquates pour cultiver ce type de plante permettant d'une part d'évaluer la qualité, et l'efficacité des métabolites secondaires et d'autre part ; le rôle potentiel des médicaments élaborés à partir de ces métabolites dans les soins de santé (Ouedraogo et al., 2021). C'est pourquoi l'utilisation des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) comme alternatives efficaces, respectueuses de la santé humaine, et de l'environnement (sans produits chimiques) doit être mise en lumière.

L'action de PGPR se manifeste par la promotion de la croissance et le renforcement de la tolérance des végétaux aux facteurs biotiques et abiotiques, via la production des phytohormones (Spaepen et al., 2007), et l'élimination des agents pathogènes par la production de métabolites secondaires tels que le cyanure d'hydrogène (HCN) et les sidérophores (Idris et al., 2008).

Cette étude a été effectuée dans l'objectif d'isoler et d'évaluer l'effet d'un apport d'inoculum de chaque souche testée sur la croissance de lin (*Linum usitatissimum*); leur identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques en utilisant les galeries API (API 20NE).

Introduction

Chapitre I

Etude bibliographique

1. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont utilisées depuis près de 7 000 ans, environ 35000 espèces de plantes sont utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques dans le monde (Hordé, 2014). Différentes parties peuvent être utilisées (racine, feuille, fleur) de différentes manières, décoction, macération et infusion (Dutertre, 2011) ; ces parties peuvent impliquer à l'état brut ou sous formes d'huiles, extraits, solutions aqueuses ou organiques (Attiyet, 1995). Il est à signaler que leur action thérapeutique provient de leurs principes actifs (métabolites primaires ou secondaires) (Farnsworth *et al.*, 1986).

1. 1. Lin (*Linum usitatissimum* L)

Lin ou flax, est une des plus anciennes plantes cultivées (figure 01). La nomenclature botanique (*Linum usitatissimum*) a été donnée par Linnaeus en 1753 dans son livre "*Species Plantarum*" (Jhalla et Hall, 2010) signifie « lin de tous les usages » (Haggerty, 1999), son usage est attesté depuis plus de 30 000 ans par l'homme.

Le Lin est originaire d'Asie de l'Ouest et de la Méditerranée (Millam *et al.*, 2005), cultivé comme source de fibre depuis au moins 5000 ans avant JC.

C'est une plante rare à l'état spontané, elle est cultivée en qualité de plante textile ou oléagineuse en fonction de la variété considérée (Diederichsen *et al.*, 2003 ; Vaisey-Genser *et al.*, 2003).



Figure 01: Plante de Lin (*Linum usitatissimum*) (Heli *et al.*, 2007)

1. 1. 1. Répartition géographique et production de Lin (*Linum usitatissimum*)

La famille du lin est géographiquement répandue avec environ 300 espèces dans le monde (**Hickey, 1988**), environ 180 variétés cultivées dans l'UE dont une soixantaine en France, inscrits dans les catalogues officiels français et européens. Plusieurs espèces sont des arbustes et se rencontrent dans les zones tropicales, tandis que des espèces vivaces et annuelles se trouvent dans les zones tempérées du monde. (**Hickey, 1988**). La production annuelle de lin est de 3,06 millions de tonnes ; Canada est le plus grand producteur de lin, environ 38% de la production mondiale, suivie par la Chine, les Etats-Unis, l'Inde (**Jhalla et Hall, 2010 ; Rubilar et al, 2010 ; Ganorkar et Jain, 2013**).

1. 1. 2. Classification botanique de Lin (*Linum usitatissimum*)

Selon **Winkler, (1931)**, la classification de Lin (*Linum usitatissimum*) (lin cultivé) est la suivante :

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Linales
Famille	<i>Linaceae</i>
Genre	<i>Linum</i>
Espèce	<i>Linum usitatissimum</i> L.

1. 1. 3. Description botanique

Le Lin est une plante annuelle dressée atteignant 1,2 m de haut, avec des tiges élancées (figure 02). Les feuilles sont vert glauque, minces lancéolées, longues de 20 à 40 mm et larges de 3 mm. Les fleurs sont d'un bleu pâle pur, de 15 à 25 mm de diamètre, à cinq pétales; elles peuvent aussi être rouge vif. Le fruit est une capsule ronde et sèche de 5 à 9 mm de diamètre, contenant plusieurs graines brunes brillantes en forme de pépin de pomme, de 4 à 7 mm de long (**Singh et al., 2011**) (figure 03).

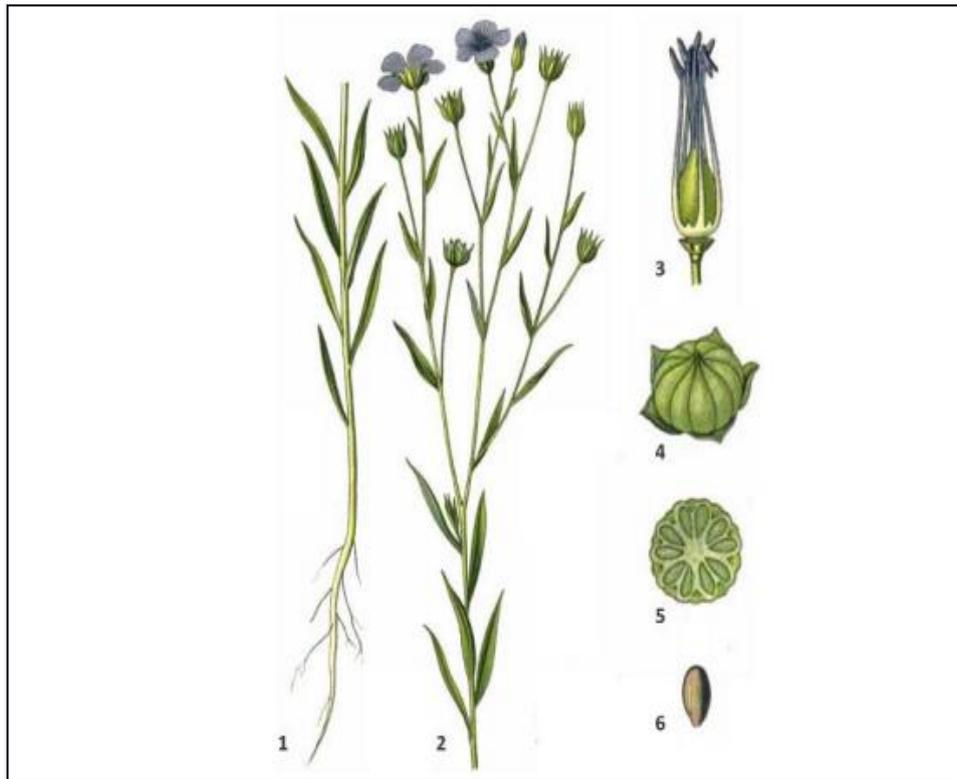


Figure 02 : Morphologie d'une plante de lin. (Masclef, 1891).

Le lin présente une racine principale pivotante (1) surmontée d'une tige sur laquelle les feuilles sont disposées en spirale (2). L'inflorescence en forme de cyme porte des fleurs de type 5 (3). Après fécondation, l'ovaire donne naissance à une capsule (4) dont une coupe transversale montre la présence de 5 loges (5) contenant dix graines de forme ovale (6).



Figure 03: Graines de Lin (Singh *et al.*, 2011).

1. 1. 4. Le développement de la plante

D'après **Morvan *et al.*, (1989)** le Lin est semé en Mars-Avril, la durée de la floraison ne dépasse pas une semaine. Les fleurs de lin sont autogames, et les fécondations croisées sont très rares et généralement dues à l'intervention d'insectes. Il est possible de discerner cinq étapes de développement dans les cultures de lin en relation avec le développement des fibres périphloémiennes (**figure 04**).

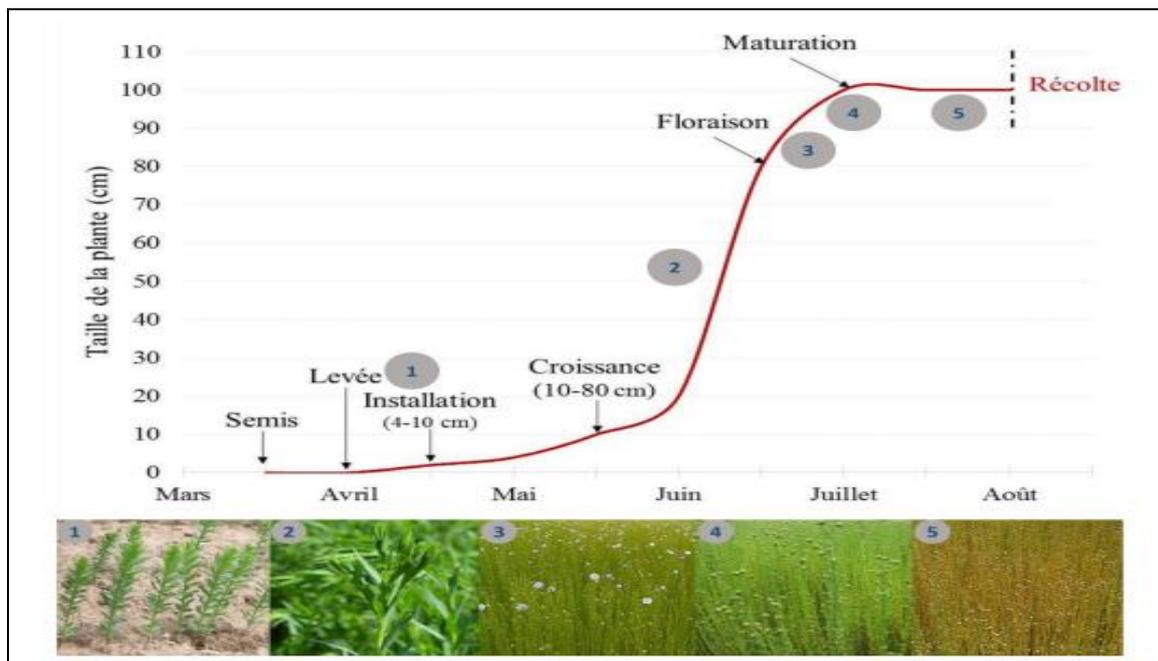


Figure 04 : Les stades de développement du Lin. (Adapté de Arvalis, 2016).

De la levée à la fin du stade d'installation, les plantes de lin sont frêles et sensibles au gel (1). Le lin subit ensuite une phase de croissance végétative intense qui se termine par la différenciation des méristèmes apicaux en méristèmes floraux (2). Les plantes fleurissent sur une courte période (3) avant de passer au stade capsules vertes (4) puis au stade capsules brunes (5) où les plantes de lin sont matures et prêtes à être arrachées. (Adapté de Arvalis, 2016)

1. 1. 5. Utilisation thérapeutique

La graine de Lin est efficace pour les troubles respiratoires et urinaires et (**Iserin, 2001**). Elle calme les douleurs pulmonaires et à un moindre degré l'irritation de l'appareil urinaire. Elle s'avère efficace contre la toux chronique ou aigue, la bronchite, l'emphysème et la cystite chronique, également comme une prévention utile contre l'angine de poitrine, le rhume et l'artériosclérose. Ainsi pour réduire les taux de glycémie postprandiale et du cholestérol (**Kim et Choi, 2005; Vijaimohan et al., 2006 ; Halligudi, 2012**).

Le Lin est sélectionné également pour l'utilisation de ses fibres ; les fibres solubles peuvent abaisser le taux de cholestérol sanguin et aider à régulariser le taux de glycémie, tandis que les fibres insolubles facilitent le passage plus rapide des selles à travers le côlon en aidant les mouvements de l'intestin et en améliorant la fonction intestinale (**Adolphe et al., 2010**).

Les lignanes sont des phytoestrogènes - composés qui ont été identifiés dans les études sur les animaux et les débuts des essais cliniques humains, lesquels aident à protéger contre certains types de cancer, notamment les cancers du sein et du côlon, en bloquant la formation de tumeurs (**adolphe et al., 2010**). La graine de lin contient environ 20% de protéines et présente un profil d'acides aminés similaire à celui de la protéine de soya, qui est considérée comme l'une des protéines végétales les plus nutritives (**Morris, 2003**).

1. 1. 6. Les composants de grain de lin (**Singh et al., 2011**).

- ✓ Acide alpha-linolénique (ALA)
- ✓ Glycosides cyanogéniques
- ✓ Acides gras insaturés
- ✓ Mucilage soluble des fibres de lin
- ✓ Lignanes monoglycérides,
- ✓ Triglycérides
- ✓ Stérols libres
- ✓ Esters de stérols
- ✓ Hydrocarbures (protéines)
- ✓ Ballast
- ✓ Dérivés de phénylpropane.

1. 1. 7. Huile de Lin

L'huile de Lin ou huile de graines de Lin est conseillée chez les personnes souffrant de Sclérose en plaque ou de diabète. Elle a aussi un effet sur les systèmes hormonal et immunitaire. L'utilisation quotidienne d'huile de Lin protège la membrane gastrique et urinaire. L'huile de Lin convient aussi pour le visage, le corps (massages et soins corporels). En usage externe l'huile obtenue à partir des graines est reconnue pour ses propriétés adoucissantes et émoullientes, elle protège et adoucit la peau irritée (**Halligudi, 2012**).

L'huile de graine de lin est également utilisée dans les régimes alimentaires pour animaux de compagnie, y compris les chiens, les chats et les chevaux. Les acides gras essentiels (ALA et LA) présents dans les graines de lin aident à prévenir la peau sèche et les pellicules et aussi aident à réduire les problèmes digestifs et de peau chez les animaux (**Jhalla et Hall, 2010**).

2. La rhizosphère

La notion *rhizosphère* a été développée par le microbiologiste **Hiltner (1904)**, signifié la zone entourant la racine (**figure 05**), où les interactions entre le sol, les micro-organismes et les plantes ont lieu. L'activité des micro-organismes au niveau de *la* rhizosphère est intense, cette activité dépend généralement des exsudats racinaires libérées par la plante, telles que les substances organiques hydrosolubles (sucres, acides organiques, acides aminés) et les substances organiques insolubles (les parois cellulaires et certains résidus métaboliques) (**Hawes, 1998**).

Ces exsudats sont considérés comme une source importante de nutriments pour les micro-organismes rhizosphériques (**Cheng et al., 1994**), et peuvent affecter les multiples interactions entre les micro-organismes bénéfiques, les micro-organismes phytopathogènes et les plantes en tant qu'entités distinctes (**Picard et al., 2000 ; Hirsch et al., 2003**).

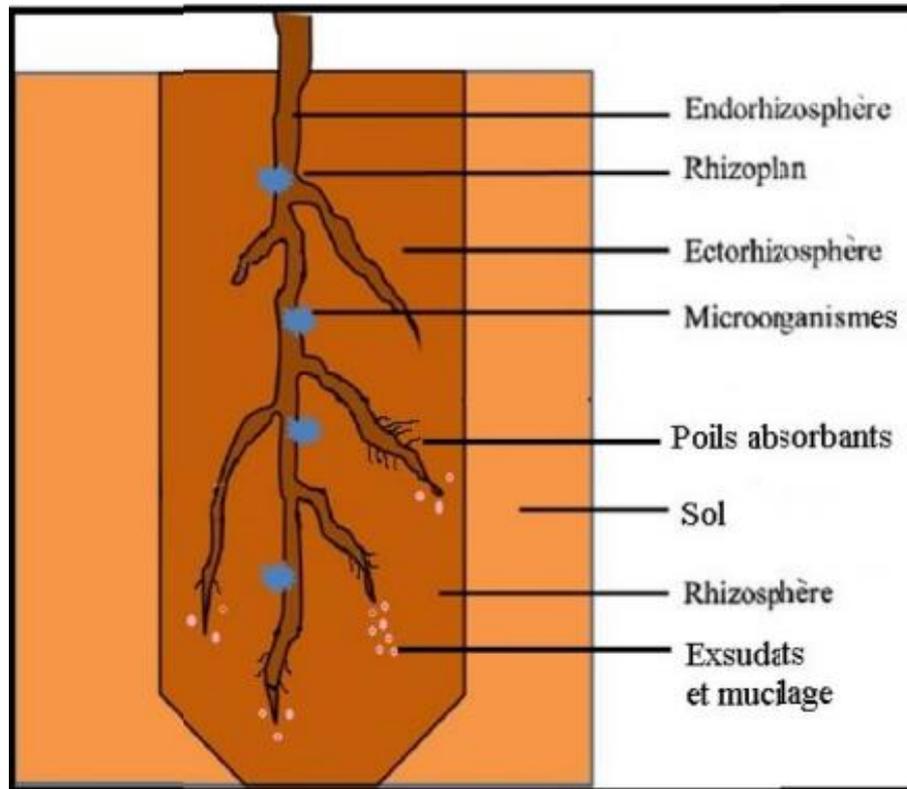


Figure 05 : Structure de la rhizosphère (Seshadri *et al.*, 2015)

2. 1. Les micro-organismes de la rhizosphère

Les rhizobactéries, également appelées PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), représentent une grande variété de bactéries du sol. Ce sont des bactéries telluriques qui appartiennent à différents genres : *Bacillus*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter* ; bactéries des genres *Allorhizobia*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* (Podile et Kishore, 2007 ; Hayat *et al.*, 2010).

2. 2. Les PGPR les plus répandus

2. 2. 1. Les bactéries du genre *Azospirillum*

Les espèces d'*Azospirillum* sont des bactéries aérobies et hétérotrophes, appartenant à la famille *Spirillaceae*, colonisent généralement la rhizosphère des graminées et les céréales (Kennedy *et al.*, 2004 ; Kennedy et Tchan, 1992) ; et sont largement utilisées en agriculture dans plusieurs pays depuis plus de 25 ans. Ce sont des bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques (Hayat *et al.*, 2010) qui peuvent fixer 20 à 40 kg d'azote par hectare de champ (Mahdi *et al.*, 2010).

Le genre *Azospirillum* a la capacité de pénétrer le système racinaire et de se développer comme endophyte dans les crevasses intercellulaires (Sumner, 1990). Ce genre a la capacité également de produire des composés antifongiques et antibactériens, des régulateurs de croissance et des sidérophores (Pandey et Kumar, 1989) qui stimulent la croissance des plantes, en particulier des racines, par divers mécanismes, notamment la production d'hormones végétales telles que l'auxine et l'acide abscisique et des gibbérellines, l'acide indole-3 acétique (AIA) (Cohen et al., 2009).

2. 2. 2. Les bactéries du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène, saprophyte et ubiquitaire. Ce genre bactérien appartient à la famille *Bacillaceae* de l'ordre *Bacillales* dans l'embranchement des *Firmicutes* ; ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, en forme bâtonnets, Gram positif. Les *Bacillus* produisent les antibiotiques, et possèdent une activité antagoniste vis à vis les champignons et certaines bactéries pathogènes et peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique (Cherif, 2014).

Les *Bacillus* ont la capacité de solubiliser phosphate inorganique, de produire de l'AIA, et les sidérophores (Cherif, 2014) ; et se trouvent souvent près des racines des plantes et certaines de ces espèces jouent un rôle dans la fixation de l'azote.

Certaines espèces de ce groupe sont des bactéries fixatrices d'azote, dont *Bacillus subtilis*, isolées de la rhizosphère de diverses plantes à des concentrations supérieures à 10^7 bactéries par gramme de sol de rhizosphère (Aitbelkacem et Belgrade, 2017).

2. 2. 3. Les bactéries du genre *Pseudomonas*

Les *pseudomonas* sont des bactéries strictement aérobies, en forme de bâtonnet, gram négatives, non sporulées avec un ou plusieurs flagelles polaires (Haas et Defago, 2005) ; appartenant à la sous-classe γ des protéobactéries, et peuvent être existes dans différentes niches écologiques (Compeau et al., 1988) tels que le sol, les racines des plantes, l'eau douce et l'eau de mer. La plupart des espèces de *Pseudomonas* colonisent la rhizosphère, et sont considérés comme des excellents PGPR utilisées avec succès en tant que bio-intrant pour améliorer la croissance des végétaux (Mercado-Blanco et Bakker, 2007). En outre, ils produisent également une large gamme de métabolites bioactifs (Weller, 2007), certains métabolites comprennent des sidérophores tels que la pyoverdine et la pyocheline jouent un rôle important dans la lutte contre les champignons pathogènes des racines (Weller, 2007).

2. 3. Mécanismes d'action des PGPR

L'action des PGPR sur la croissance des plantes peut être directe ou indirecte (**figure 06**)

2. 3. 1. Effets directs

2. 3. 1. 1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique

Il est bien connu que l'azote est un élément essentiel pour la croissance et le développement des végétaux, pour cette raison, le caractère de la fixation l'azote par les rhizobactéries est considéré comme l'un des principaux mécanismes par lesquels les plantes exploitent l'interaction microbienne. L'utilisation des bactéries fixatrices d'azote peut augmenter la productivité et améliorer la croissance des plantes, raison pour laquelle pourrait remplacer efficacement les engrais azotés chimiques à la fois très onéreux et polluants, et ce type de microorganismes prennent de plus en plus d'importance pour améliorer les cultures en facilitant le recyclage des nutriments (**Sahin et al., 2004 ; Orhan et al., 2006**).

Le caractère de la fixation d'azote par les bactéries rhizosphériques, consiste à fournir l'azote aux plantes en échange du carbone libéré sous forme d'exsudats racinaires, et cela nécessite que ce type de bactéries, vivent près de la rhizosphère, du plan racinaire, ou des plantes en tant qu'endophytes. Ce type d'association produit 80 % de l'azote, le reste provenant de systèmes libres ou apparentés (**Graham, 1988**).

2. 3. 1. 2. Solubilisation du Phosphate

Le phosphore (P) est un élément limitant et crucial à la croissance et au développement des plantes. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologique 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. Selon **Vessey (2003)**, l'utilisation de bactéries solubilisatrices des phosphates (PSB) pourrait résoudre efficacement ce problème.

Différents mécanismes sont utilisés pour la solubilisation du phosphate inorganique par les BSP, le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. Le gluconate et le 2-cétogluconate sont les plus courants, L'acide glycolique, l'acide oxalique, l'acide malonique et l'acide succinique ont également été identifiés.

Certaines souches sont également capables de produire un mélange d'acides lactique, isovalérique, isobutyrique et acétique. Ces acides de phospho-transfert sont libérés par des interactions ioniques avec des cations phosphate ; la libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduit à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique. L'action des phosphatases assure la libération des groupements phosphate liés aux matières organiques (**Kumar et Narula 1999 ; Whitelaw, 2000 ; Gyaneshwar et al., 2002**).

2. 3. 1. 3. Production de phytohormones

L'action des PGPR sur la croissance des plantes peut être effectuée via la production de phytohormones, telles que l'auxine et les cytokinines, les acides gibbérelliques et la réduction des niveaux d'éthylène dans les plantes. (**Costacurta et Vanderleyden 1995 ; Glick, 1995 ; Lucy et al., 2004**). Ces derniers stimulent l'allongement et la division cellulaire, la différenciation des tissus et la dominance apicale. Les phytohormones sont des messagers chimiques qui affectent la capacité des plantes à répondre vis-à-vis les stress biotiques et abiotiques, et sont également des molécules de signalisation impliquées dans la communication entre les bactéries et les autres micro-organismes (**Spaepen et al., 2007**).

Acide Indole Acétique (AIA)

De nombreuses bactéries rhizosphériques ont la capacité de produire l'Acide Indole Acétique (AIA), une principale auxine active (**Ashrafuzzaman et al., 2009**). C'est une molécule de signalisation importante intervient dans plusieurs processus tels que la régulation du développement des plantes, l'organogenèse, les réponses nutritionnelles, les réponses cellulaires, la division, la différenciation et la régulation des gènes (**Ryu et Patten, 2008**).

La biosynthèse de l'AIA est affectée par une plusieurs facteurs environnementaux, en particulier, sa production augmente dans des conditions de pH élevé et en présence d de *tryptophane* comme principal *précurseur* (**Spaepen et al., 2009**). Selon **Khalid et al., (2004)** la capacité de biosynthèse de l'auxine peut être utilisée comme un outil de criblage des PGPR les plus efficaces.

Cytokinines

Les cytokinines sont des aminopurines N6-substituées, classées parmi les phytohormones clés, et jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus physiologiques tels que la division cellulaire, l'interruption de la quiescence des bourgeons dormants, l'accélération de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de chlorophylle, l'expansion des feuilles et le retardement de la sénescence (**Salisbury et Ross, 1992**).

L'inoculation des plantes par des bactéries rhizosphériques productrices des cytokinines entraîne généralement une augmentation des niveaux de ce dernier dans les plantes, affectant par conséquent leur développement et leur croissance (**Arkhipova et al., 2005**). *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* spp. sont parmi les PGPR productrices de cytokinines d'après **Nieto et Frankenberger, (1989)** et **Timmusk et al., (1999)**.

Les gibbérellines

Plusieurs travaux ont rapporté que le PGPR producteur de gibbérellines favorise la croissance des plantes, et cet effet positif sur la biomasse végétale est souvent associé à une teneur accrue en gibbérellines dans les tissus végétaux. (**Atzhorn et al., 1988; Gutierrez-Manero et al., 2001 ; Joo et al., 2009**).

Les gibbérellines sont des phytohormones impliquées dans divers processus de développement de plantes, notamment la germination des graines, la floraison, la fructification et la sénescence retardée dans de nombreux organes de diverses espèces végétales (**MacMillan, 2002**), ainsi la régulation de l'abondance des poils absorbants (**Bottini et al., 2004**).

2.3.1.4. Rôle de l'éthylène

Le gaz éthylène produit de manière endogène par les plantes a de multiples effets sur leur développement et agit comme une molécule de signalisation secondaire qui induit les défenses des plantes (**Ecker, 1995**) A des concentrations élevées, l'éthylène peut affecter négativement de nombreux stades physiologiques des plantes. L'augmentation de la production d'éthylène, une hormone sensorielle, stimule la maturation des fruits et le

vieillesse des fleurs. Ces symptômes sont associés à la perte de chlorophylle des feuilles, à la dégradation des protéines et de l'ARN et à la perte d'anthocyanes (**Oldroyd et al., 2001; VanLoon et al., 2006**). De plus, des concentrations élevées d'éthylène ont empêché le développement de nodules dans la luzerne (**Glick et al., 2007**) et affaiblissent les défenses de la plante contre les agents pathogènes. (**Wang et al., 2000**).

2. 3. 1. 5. Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

Ces dernières années, un nouveau mécanisme favorisant la croissance des plantes impliquant l'éthylène a été proposé. (**Burdman et al., 2000**). Certains PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui clive l'ACC, le précurseur direct de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène des plantes. La production d'éthylène et favoriser l'allongement des racines. Les PGPR qui produisent cette enzyme vont donc atténuer de nombreux stress végétaux causés par l'infection, l'absorption de métaux lourds, une salinité élevée et même la sécheresse (**Glick et al., 1998**).

2. 3. 2. Effets indirects

Certaines bactéries à effet PGPR sont capables d'avoir un effet protecteur en protégeant les plantes, via le développement un système de défense vis-à-vis les agents phytopathogènes. (**Haas et Defago, 2005**). Il est a signalé que les *Bacillus* et les *Pseudomonas* sont des rhizobactéries les plus perfermentes, et peuvent contribuer efficacement dans le contrôle biologique des maladies via la synthèse de nombreuses antibiotiques (**Raaijmakers et al., 2002**).

2. 3. 2. 1. Compétition pour l'espace et les nutriments

La colonisation racinaire par les bactéries bénéfiques peut réduire l'existence des microorganismes pathogènes, et par conséquent, la réduction des maladies. Ainsi leur existence à des concentrations suffisante au niveau de la rhizosphère permettra de rentrer en compétition pour l'espace et les nutriments vis-à-vis des microorganismes pathogènes (**Haas et Defago, 2005**). Il à noter que la mobilité, le chimiotactisme et la capacité d'utiliser des composés sécrétés par les racines comme sources de carbone et d'azote, sont des propriétés qui améliorent le potentiel de colonisation des souches (**Berggren et al., 2001 ; Gupta, 2003**).

Les mécanismes indirects des PGPR sont leur pouvoir compétitif à l'égard des autres communautés microbiennes, la production des sidérophores, l'antibiose.

2. 3. 2. 2. Compétition pour le fer et la production de sidérophores

Il est bien connu que le fer est l'un des minéraux les plus abondants sur terre, dans le sol, il ne peut pas être directement assimilé par les micro-organismes car la principale forme de fer (Fe^{+3}) dans la nature est peu soluble (Neilands *et al.*, 1987). À cet effet les microorganismes du sol développent une stratégie qui permet de surmonter l'obstacle lié à l'utilisation de cette molécule, cette stratégie se manifeste par la sécrétion des molécules de faible poids moléculaire appelées sidérophores (environ 400-1000 Daltons) qui ont une très forte affinité au Fe^{+3} ($K_d = 10^{-20}$ à 10^{-50}) (Castignetti et Smarrelli, 1986).

Bien que les champignons phytopathogènes synthétisent également des sidérophores, ils ont généralement une plus faible affinité pour le fer que ceux produits par les PGPR (Schippers *et al.*, 1987). De plus, de nombreuses plantes ont des mécanismes pour lier les complexes sidérophores bactériens, les transporter à travers la plante, puis les libérer sous leur forme réduite disponible (Bar-Ness *et al.*, 1992 ; Wang *et al.*, 1993). La capacité des sidérophores à agir en tant qu'agents efficaces dépend de la plante cultivée, du phytopathogène spécifique à contrôler, de la composition du sol, des bactéries productrices et de l'affinité du sidérophore spécifique pour le fer.

Plusieurs études ont montré l'effet suppresseur des PGPR à l'égard des pathogènes dans des conditions contrôlées, mais cet effet est difficile à prévoir dans les conditions naturelles (El Halaoui *et al.*, 1986). Néanmoins, cette mise en garde postule que la capacité des bactéries productrices de sidérophores à inhiber les phytopathogènes est une caractéristique importante qui pourrait avoir des implications autant qu'un bio-intrant efficace. Selon Ahmad *et al.*, (2008) les PGPR les plus qualifiées productrices de sidérophores sont les *Bacillus*, les *Pseudomonas*, et les *Azotobacter*.

2. 3. 2. 3. Antibiose et parasitisme

L'antibiose exercée par les PGPR a été montrée par plusieurs chercheurs, cette activité consiste à inhiber directement le développement des pathogènes, via la production des métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. D'après Dong *et al.*, (2002), cette lutte biologique est influencée par des facteurs biotiques, abiotiques, et physiologiques. L'action des PGPR peut également se manifester par la production des enzymes qui

peuvent lyser les cellules fongiques, telles que la chitinase, la glucanase, la protéase et la lipase (Chet et Inbar, 1994).

2. 3. 2. 4. Composés volatiles

Un autre métabolite secondaire produit par certaines bactéries de la rhizosphère est l'acide cyanhydrique (HCN). Bien que le cyanure soit un inhibiteur général du métabolisme, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes, y compris les bactéries, en utilisant la glycine, l'acide glutamique ou la méthionine comme précurseurs par une voie de décarboxylation oxydative (Castric, 1977 ; Curl *et al.* Truelove, 1986). Son rôle est d'éviter la prédation ou la concurrence. Le HCN joue un rôle dans le contrôle biologique des mauvaises herbes (Heydari *et al.*, 2008). La production de HCN est une activité courante de *Bacillus* (50%) dans le sol de la rhizosphère (Ahmad *et al.*, 2008).

D'autres composés volatils libérés par le PGPR, le 2,3-butanediol et l'acétoïne, améliorent significativement la croissance des plantes en induisant une résistance des plantes aux maladies (Ryu *et al.*, 2003).

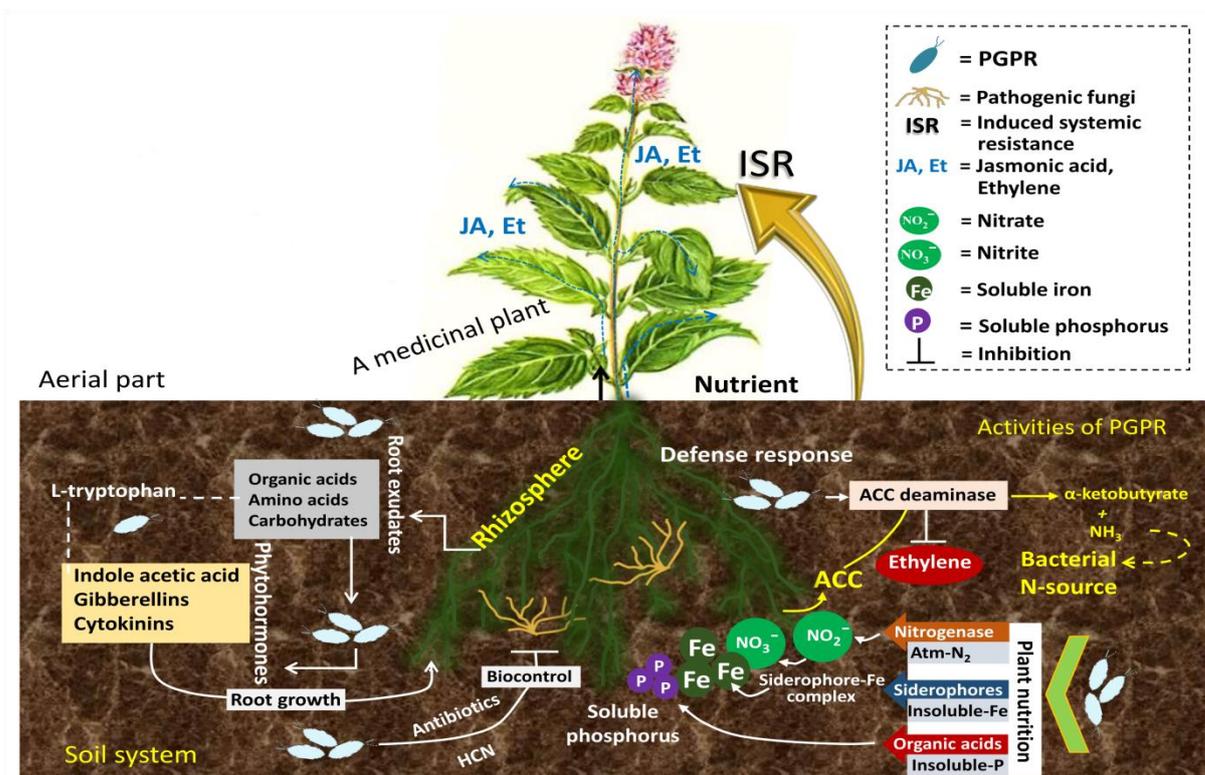


Figure 06: Les principaux mécanismes d'action des PGPR (Rizvi *et al.*, 2022).

3. Effet de l'inoculation des PGPR sur le développement des plantes médicinales

L'étude de PGPR et leur association avec des plantes médicinales est devenue cruciale (Bafana et Lohiya 2013). Selon Koeberl *et al.* (2013) de nombreuses bactéries rhizosphériques ont la capacité d'améliorer la croissance et le développement de ce type de plantes (tableau 01), et de promouvoir la production des composés phytothérapeutiques. De plus, certaines souches indigènes telles que les *Bacillus* ont la capacité de promouvoir la production de flavonoïde (Koeberl *et al.*, 2013).

Les plantes médicinales peuvent interagir avec divers microorganismes, et peuvent les exploiter comme outils de lutte biologique vis-à-vis des agents phytopathogènes. À cet effet l'identification et la caractérisation de ces microorganismes sont primordiales pour la culture de ce type de plantes d'intérêts (Vasudh *et al.* 2013).

Tableau 01 : Les PGPR associées aux plantes médicinales

Espèces végétales	Micro-organismes	Références
<i>Matricaria chamomilla</i> <i>calendula officinal</i>	<i>Bacillus sp</i>	Koeberl <i>et al.</i> , (2013)
<i>Rumex patientia</i>	<i>Proteobacterium</i> <i>Firmicutes</i> <i>Acintobacter</i>	Qi <i>et al.</i> , (2013)
<i>Ajuga bracteosa</i>	<i>Pseudomonas</i>	Kumar <i>et al.</i> , (2012)
<i>plectranthus tenuiflorus</i>	<i>Bacillus sp</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Acintobacter calcoaceticus</i>	El-deeb <i>et al.</i> , (2013)

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Tissemsilt. Un ensemble d'analyses microbiologiques et biochimiques a été effectué sur les différentes souches étudiées.

1. Sol rhizosphérique

Bien que la rhizosphère est une zone d'une intense activité microbienne, et dans le but d'obtention des souches à effet PGPR efficaces, des échantillons de sols attachés aux racines de la fève (*Vicia faba* L) cultivées dans la région de Lardjem (Tissemsilt) ont été prélevés (**figure 07**).



Figure 07: Site d'échantillonnage dans la région de Lardjem (Tissemsilt)

2. Isolement des bactéries rhizosphérique

L'isolement des bactéries rhizosphériques a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions (**Halvorson et al., 1933**). 1 g du sol adhérent aux racines est suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

A partir de cette suspension mère, une série de dilutions (10^{-1} à 10^{-5}) a été effectuée (**figure 08**), en suite 0.1 ml de chaque dilution est étalée sur milieu solide (Gélose Nutritive) (**annexe 01**), puis les boites sont incubées à 30°C pendant 24 à 72h.

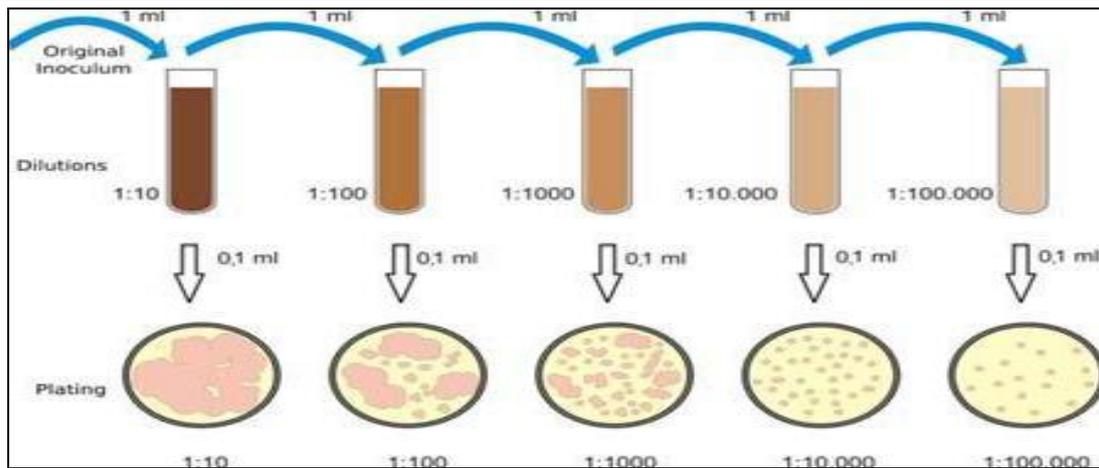


Figure 08: Technique d'isolement des souches à effet PGPR

2.1. Identification des isolats

L'identification des bactéries est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques (**Lamouliatte *et al.*, 1992**). Lors de cette étude les critères morphologiques de colonies ont été étudiés (viscosité, la couleur, la taille, la forme, le contour, et la surface), la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de l'oxydase, ensuite la caractérisation biochimique des isolats a été complétée et vérifiée en utilisant les galeries API (API 20NE, BioMérieux, France).

2.1.1 La coloration de gram

Selon **Larpen et Lairpent, (1990)**, la coloration de gram est une technique classique en microbiologie, permet de distinguer deux types de bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif) sur la base de la structure de leur paroi. La technique permet également de déterminer la morphologie, ainsi que leur mode d'association des cellules.

La coloration de gram est réalisée selon la méthode classique en préparant un frottis fixé à la flamme. Les bactéries se colorent en violet de gentiane pendant 1 minute, puis en lugol pendant 1 minute. Une décoloration avec l'alcool est ensuite réalisée pendant 30 secondes jusqu'à la disparition du violet. La lame est recouverte ensuite de fuchsine pendant 1 minute puis rincée à l'eau distillé et séchée. Les lames par la suite, sont observées sous microscope pour déterminer le type de paroi bactérienne; si les cellules sont colorées en violet (Gram positives) ou bien en rose (Gram négative). Pour l'observation microscopique à un grossissement (X 1000), une goutte d'huile d'immersion est ajoutée au-dessus de la lame.

2.1.2. Etude des enzymes respiratoires

2.1.2.1. Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en eau H_2O et oxygène O_2 . La présence de la catalase a été révélée en déposant sur une lame, une colonie bactérienne et de H_2O_2 . Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (**Marchal *et al.*, 1991**).

2.1.2.2. Test d'oxydase

L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. Une colonie est étalée sur un disque imprégné de réactif oxydase préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile. L'apparition d'une couleur violacée au bout de 10 secondes indique que la réaction est positive (**Kovács, 1956**).

2.1.3. Galerie API 20 NE

L'utilisation de galerie API est une méthode simple, rapide et cohérente pour une l'identification des espèces bactérienne (**Atzél *et al.*, 2008**). La galerie API 20NE est un système standardisé permettant l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, contient 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation (**figure 09**).

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline (**annexe 02**), d'opacité égale à 0,5 de McFarland (**annexe 03**). Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum. Les réactions produites durant la période de l'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'identification selon la notice (BioMérieux SA) est réalisée à partir de la base de données (V7) en utilisant un logiciel d'identification, ou bien un catalogue analytique.



Figure 09 : Ensemencement de la galerie API 20 NE

2.1.4. Conservation des souches

Les colonies pures dont les cellules sont des bacilles Gram négatif, sont repiquées stérilement sur milieu gélose nutritive incliné puis incubées à 30°C pendant 48 à 72 h. Les tubes sont ensuite conservés à 4°C, ce type de conservation et de courte durée (**Botton *et al.*, 1990**). Les isolats ont été également mis en conservation à -20°C dans des épendorfs contenant la préculture fraîche de chaque isolat additionnée de glycérol stérile à 60% (la période de conservation à 12 mois -18 mois).

3. Culture et inoculation des plantules "*in vitro*"

L'action des PGPR sur la croissance des plantes a été prouvée par plusieurs chercheurs (**Macking, 2007**). Cette expérience nous permet d'évaluer l'effet des bactéries isolées sur le développement et la croissance de Lin (*Linum usitatissimum*). Les graines de Lin utilisées sont des graines commercialisées, leur origine n'a pas pu être établie (**figure 10**)



Figure 10: Les graines de Lin (*Linum usitatissimum*) utilisées dans l'essai

3.1. Germination aseptique des graines

Les graines de Lin (*Linum usitatissimum*) sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 15 min, puis rincées 6 à 10 fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces du désinfectant. Les graines ont été transférées dans des boîtes de pétri (**figure 11**) contenant de l'eau gélosée à 0.8% (**Annexe 04**).



Figure11: Germination de graines de Lin (*Linum usitatissimum*)

3.2. Inoculation des plantules de Lin

Les graines bien germées ont été transférées dans des pots (**figure 12**) contenant 100 g de la tourbe stérilisée (deux autoclavages de 30 minutes à 120°C et à 24 heures d'intervalle). L'inoculation consiste en neuf traitements répétés trois fois, y compris: les souches isolées (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8), et un témoin sans inoculation. Chaque pot est inoculé par 1ml d'une suspension liquide de chaque souche à une concentration de 10^8 (UFC) ml^{-1} (**Valverde et al., 2006**), en comparant la turbidité du milieuensemencé avec celle de MacFarland 0,5. L'arrosage des plantes a été effectué une fois par jours avec l'eau distillée stérile.

Les plantes doivent être déterrées quand des différences très nettes sont visibles entre les plantes, puis l'efficience des souches est estimée par la comparaison de la longueur racinaire et aérienne, ainsi le poids frais et sec des plantes inoculée avec les témoins non inoculés. Le poids sec est mesuré après séchage des plantes 24 h à 70°C.



Figure 12: Test d'inoculation des plantules de Lin (*Linum usitatissimum*) "in vitro"

3.3. Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 8). Analyse de la variance à un facteur (effet souche sur la croissance – poids frais et sec des plantes, longueur racinaire et aérienne), le seuil de la probabilité utilisé pour déterminer la significativité est $P \leq 0.05$.

Chapitre III

Résultats et discussion

1. Isolement des bactéries rhizosphérique

Il a été démontré que les bactéries qui favorisent la croissance des plantes sont localisées au niveau de la rhizosphère, une zone très riche en éléments nutritifs (Curl et Truelove, 1986). Cette étape consiste à isoler des bactéries à effet PGPR afin et d'évaluer par la suite leur effet sur le développement et la croissance de Lin (*Linum usitatissimum*) *in vitro*. L'isolement des bactéries à partir de sol rhizosphérique de la fève nous a permis d'obtenir une collection de 08 isolats (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8).

1.1. Caractéristiques morphologiques des isolats

Après une incubation pendant 24-48h à 30°C, les isolats obtenus ont formé sur Gélose Nutritive des colonies homogènes le long des stries, elles sont circulaires de 1 à 3 mm de diamètre, de couleur crème et jaune pour la plupart des isolats (tableau 02) compactes, opaques, de surface lisse, visqueuse, et à contour régulier (figure 13). D'autre aspect a été également constaté lors de la purification, marqué par un contour irrégulier, et une faibles viscosité due à la faible production des exopolysaccharides (Zahran *et al.*, 1994).

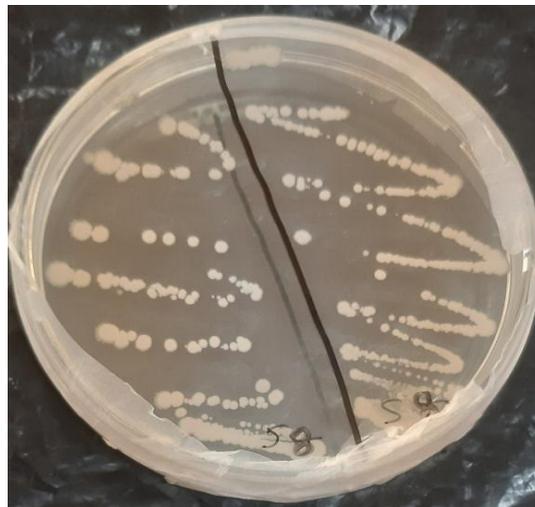


Figure 13: Aspect macroscopique de la souche S8 sur Gélose nutritive après 24h d'incubation à 30°C.

Tableau 02 : Caractéristiques morphologique des colonies après 24h d'incubation à 30°C.

Caractères Souches	Contour	Relief	Couleur	Aspect	Forme
S 01	Régulier	Plate	Jaune	Lisse et visqueuse	Circulaire
S 02	Régulier	Demi-bombée	Crème	Lisse et visqueuse	Circulaire
S 03	Régulier	Plate	Jaune	Lisse et visqueuse	Circulaire
S 04	Régulier	Demi-bombée	Blanche	Lisse	Circulaire
S 05	Régulier	Plate	Jaune	Lisse et visqueuse	Circulaire
S 06	Irrégulier	Plate	Blanchâtre	Sèche	Circulaire
S 07	Régulier	Demi-bombée	Crème	Lisse et visqueuse	Circulaire
S 08	Régulier	Demi-bombée	Crème	Lisse et visqueuse	Circulaire

1.2. Caractéristiques microscopiques des isolats

L'examen microscopique est basé essentiellement sur la coloration de Gram, cette technique, permet de révéler l'affiliation positive ou négative des cellules bactériennes selon la structure de leur paroi, et de déterminer la morphologie des cellules, ainsi que leur mode d'association. L'observation microscopique des isolats sélectionnés montre qu'ils présentent une forme bacille et de couleur rose (Gram négatif) (**figure 14**).

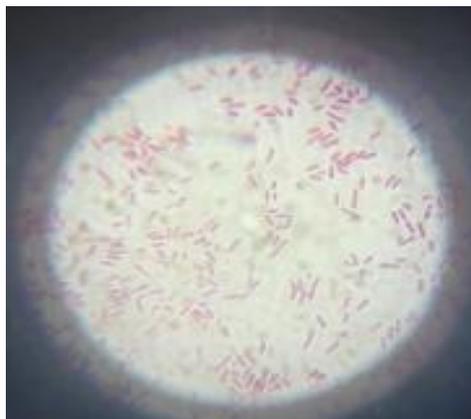


Figure 14: Aspect microscopique de la souche S06 après coloration de Gram (Grossissement $\times 1000$).

1.3. Etude des enzymes respiratoires

1.3.1. Test d'oxydase

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après. Les résultats obtenus montrent que les isolats testés sont oxydase positif, sauf pour la souche S1 s'est révélé oxydase négatif, ce qui explique que cette souche est dépourvue d'enzyme recherché (**figure 15**).

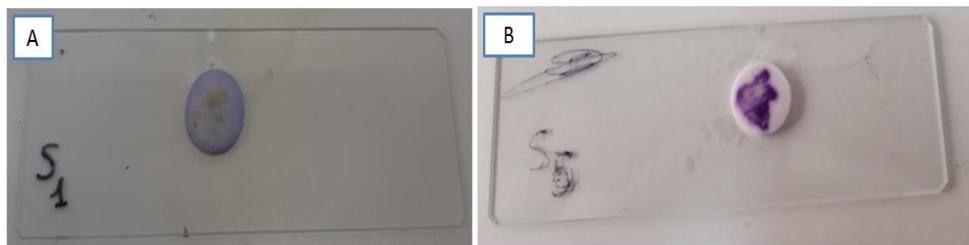


Figure 15: Test Oxydase

A : Oxydase négatif, B : Oxydase positif

1.3.2. Test catalase

Le test catalase a été effectué afin de déterminer la capacité des isolats sélectionnés à synthétiser l'enzyme « **la catalase** » qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau H_2O et oxygène O_2 , tous les isolats testés sont des catalases positives, dont la présence de la catalase se matérialise par la production de bulles (**figure 16**), sauf pour la souche S1 s'est révélé catalase négative (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985**).



Figure 16: Test de catalase positive (souche 02)

2. Identification des isolats par les galeries API 20 NE (Joffin, 2005)

Une caractérisation biochimique des isolats a été effectuée par la méthode microbiologique standardisée (galerie biochimique API 20 NE) (**figure 17**) et l'identification est réalisée à l'aide du catalogue analytique permet de rechercher le profil numérique dans la liste des profils, ou bien à l'aide du logiciel d'identification. Les isolats testés ont été identifiés comme: Deux souches (*Rhizobium Radiobacter*), deux souches (*Pseudomonas luteola*), une souche de (*Sphingomonas paucimobilis*), une souche (*Pseudomonas fluorescens*), une souche (*Comomonas testosteroni*), et une souche de (*Pseudomonas stutzeri*) (tableau 03).



Figure 17: Galerie API 20NE ensemencée par la souche S1 après 24h d'incubation.

Tableau 03: Caractères des souches identifiées

	Souches	Gram	Test catalase	Test Oxydase
S1	<i>Pseudomonas luteola</i>	-	-	-
S2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+	+
S3	<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	+	+
S4	<i>Comamonas testosteroni</i>	-	+	+
S5	<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	+	+
S6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+
S7	<i>Pseudomonas luteola</i>	-	+	+
S8	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	+	+

3. Culture et inoculation des plantules "in vitro"

Une inoculation en pots a été réalisée sous des conditions semi-contrôlées afin d'évaluer l'effet d'un apport d'inoculum de chaque souche testée sur la croissance de Lin (*Linum usitatissimum*) (figure 18). Ce test nous permet de sélectionner l'inoculum le plus performant, et de prouver l'appartenance des isolats obtenus groupe de rhizobactéries stimulatrices de la croissance de plantes.

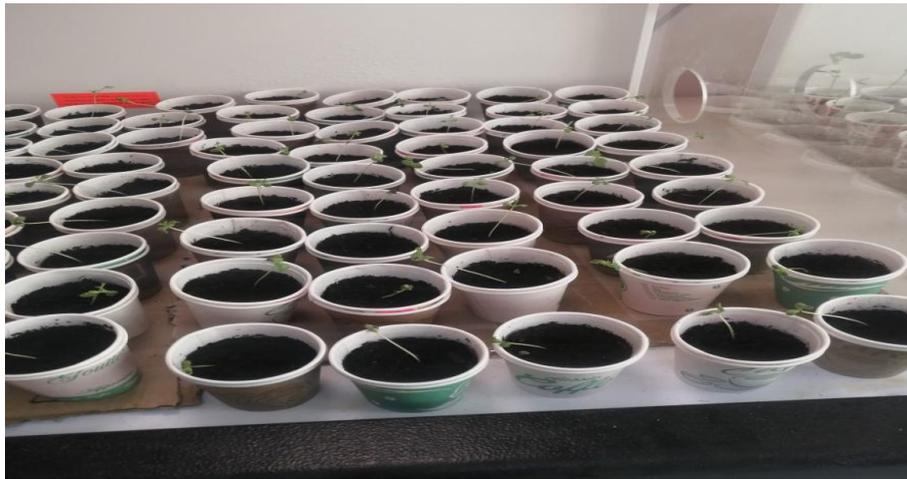


Figure 18 : Test d'inoculation des plantes de Lin (*Linum usitatissimum*) par les souches isolées

3.1. Estimation de la croissance

3.1.1. Poids frais et sec des plantes de Lin (*Linum usitatissimum*)

Les résultats obtenus ont révélé que 04/08 souches (*Rhizobium radiobacter* S5, *Pseudomonas fluorescens* S6, *Pseudomonas luteola* S7, *Sphingomonas paucimobilis* S8) ont la capacité d'améliorer nettement le poids frais et sec des plantes de Lin (*Linum usitatissimum*) par rapport aux témoins non inoculés (figure 19), et l'effet le plus remarquable est celui d'une amélioration nette de la croissance de plantes inoculées par la souche *Rhizobium radiobacter* S5 et *Sphingomonas paucimobilis* S8. Statistiquement cette réponse montre que l'effet des souches sur le poids frais et sec des plantes est très hautement significatif ($P < 0.001$) (annexe 05). L'effet positif des souches à effet PGPR a été rapporté par plusieurs chercheurs.

D'après l'étude de **Yang et al., (2014)**, l'inoculation par *Sphingomonas paucimobilis* a un effet hautement significatif sur la croissance de *Dendrobium officinale* (plante médicinale chinoise traditionnelle). **Sharghi et al., (2018)** ont également montré que l'inoculation par *Rhizobium* sp et *P. fluorescens* augmente considérablement de la biomasse fraîche et sèche des pousses et des racines de fenugrec cultivée dans des conditions extrêmes.

D'un autre coté, l'inoculation avec (*Pseudomonas luteola* S1, *Pseudomonas stutzeri* S2, *Rhizobium radiobacter* S3, *Comamonas testosteroni* S4) n'a pas améliorée le développement de plantes de Lin et leur croissance était presque égale et inférieure à celle enregistrée dans les témoins non inoculés (**figure 19**), ces résultats ne concordent pas avec les résultats obtenus par **Rizvi et al., (2022)** qui ont prouvé que l'application des PGPR en particulier *Pseudomonas* spp montre des effets bénéfiques sur la performance globale des plantes médicinales.

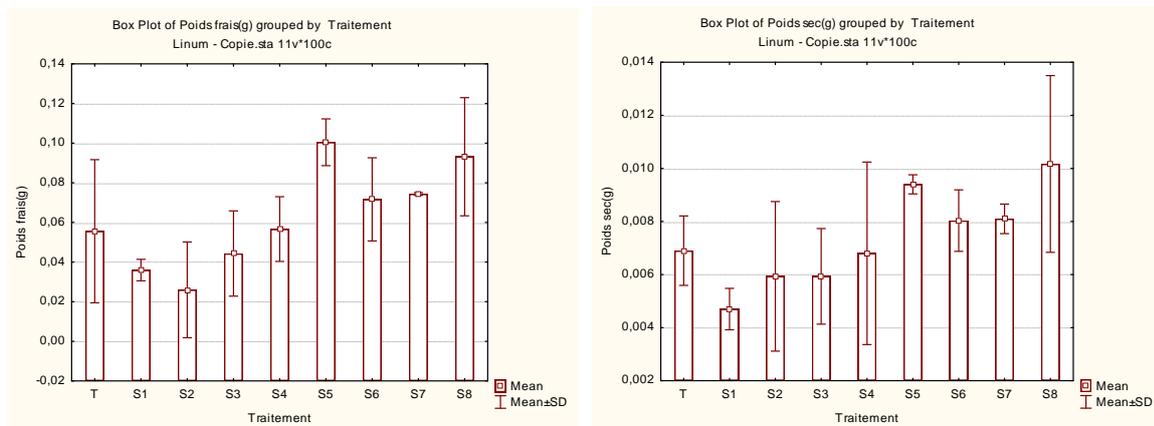


Figure 19: Effet de souches a effet PGPR sur le poids frais et sec de plantes de Lin (*Linum usitatissimum*)

3.1.2. Longueur de la partie aérienne et racinaire

L'effet de l'inoculation sur le développement des plantes varie en fonction des souches testées. Les résultats obtenus ont révélé que dans la majorité des cas, l'inoculation a amélioré favorablement la longueur de la partie aérienne et racinaire des plantes de Lin (*Linum usitatissimum*) par rapport aux témoins (**figure 20 et 21**), et l'étude statistique confirme ce résultat, où l'effet est très hautement significatif ($p < 0,001$) (**Annexe 06**).

Ces résultats sont en accord avec **Salisbury (1994) et Hagen (1990)**, qui ont montré que les PGPR influent sur la croissance des plantes, et affectent principalement les racines des plantes via la stimulation des subdivisions racinaires et l'augmentation de leur taille. Une étude menée sur les plantes médicinales montre que l'inoculation par les PGPR (*Pseudomonas fluorescens* et *Rhizobium meliloti*) augmente d'une façon significative la surface foliaire, les racines de plante (**Sharghi et al., 2018**).

L'effet le plus remarquable est celui d'une amélioration nette de la longueur racinaire et aérienne de plantes de Lin inoculées par les souches *Rhizobium radiobacter* S5, *Pseudomonas fluorescens* S6, *Pseudomonas luteola* S7 par rapport aux témoins non inoculés (**figure 21**).

La performance de ces souches a été rapportée par plusieurs chercheurs. D'après **Jha et Saraf, (2015)** la souche *Rhizobium radiobacter* favorise de manière significative la croissance de plantes via la production de différentes phytohormones comme l'AIA, l'acide gibbérellique et les cytokinines ; et selon l'étude de **Suryadevara et Ponmurugan, (2012)** l'inoculation de la plante médicinale curcuma (*Curcuma longa* L) avec *Pseudomonas* sp a significativement augmenté le rendement des rhizomes, et la hauteur des plantes par rapport aux témoins non inoculés. Le mécanisme de promotion de la croissance de la plante par la souche *Pseudomonas* sp a été déterminé par la production de phytohormones et la solubilisation de Phosphate (**Lyu, 2022**).

La longueur racinaire des plantes inoculées par *Pseudomonas stutzeri* S2 et *Rhizobium radiobacter* S3 semble assez faible, ainsi que pour la partie aérienne des plantes inoculées par *Pseudomonas luteola* S1 et *Pseudomonas stutzeri* S2 (**figure 21**), ce qui suggère que ces souches ne sont pas efficaces, ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de **Sharghi et al., (2018)** et **Rizvi et al., (2022)** qui ont prouvé la performance de l'application des PGPR des plantes médicinales.

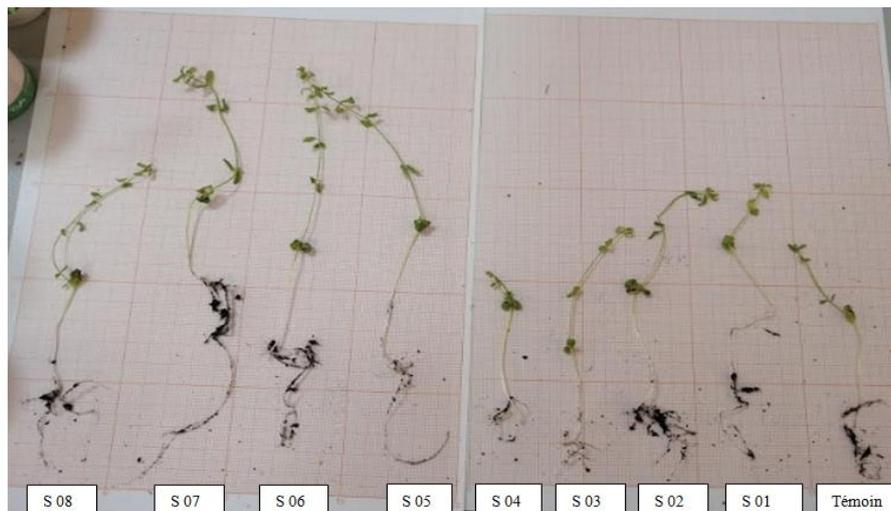


Figure 20: Plantes de Lin (*Linum usitatissimum*) après 45 jours d'inoculation par les PGPR

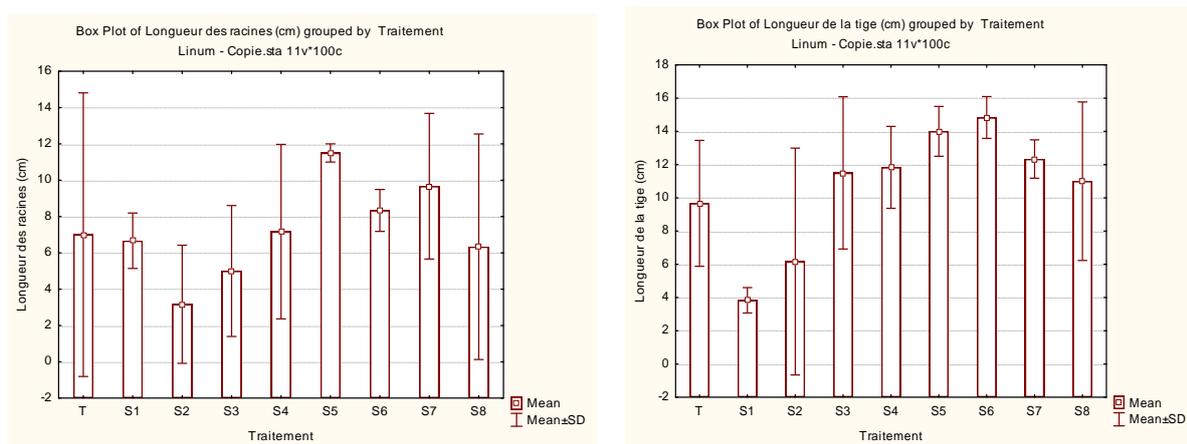


Figure 21 : Effet de souches a effet PGPR sur la longueur de la partie aérienne et racinaire de plantes de Lin (*Linum usitatissimum*)

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt. Malgré les grandes avancées de la science, environ de 80 % de la population à travers le monde recourt à la médecine traditionnelle (OMS, 2003). Cependant, les plantes médicinales sont très menacées en raison de l'utilisation d'engrais et de produits chimiques. À cet égard, les bactéries rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes (PGPR) peuvent apporter des solutions aux problèmes liés à l'utilisation excessive d'engrais nocifs pour l'homme et l'environnement.

Un essai préliminaire a été réalisé sous des conditions semi contrôlées sur le Lin (*Linum usitatissimum*) inoculé par des souches à effet PGPR isolées à partir de la rhizosphère de la fève (*Vicia faba* L). Ce test offre la possibilité d'obtenir et de sélectionner des souches indigènes performantes capable de stimuler la croissance de Lin.

L'isolement des bactéries à partir de sol rhizosphérique nous a permis d'obtenir une collection de huit isolats, leur effet sur la croissance des plantes est vérifié ainsi que leur caractérisation phénotypique, et biochimique par les galeries API 20NE. Les isolats sont répartis comme suit : Deux souches (*Rhizobium Radiobacter*), deux souches (*Pseudomonas luteola*), une souche de (*Sphingomonas paucimobilis*), une souche (*Pseudomonas fluorescens*), une souche (*Comomonas testosteroni*), et une souche de (*Pseudomonas stutzeri*).

Les résultats obtenus ont révélé que l'inoculation a amélioré favorablement la longueur de la partie aérienne, racinaire, et le poids frais et sec des plantes par rapport aux témoins non inoculés. Statistiquement cette réponse montre que l'effet des souches est très hautement significatif ($P < 0,001$) dans les quatre paramètres mesurés, et l'effet le plus remarquable a été enregistré chez les plantes inoculées par les souches *Rhizobium radiobacter* S5, *Pseudomonas flueorescens* S6, *Pseudomonas luteola* S7, *Sphingomonas paucimobilis* S8.

Il serait donc souhaitable d'approfondir cette étude en complétant ce travail par :

- Tests d'activités PGPR (solubilisation du phosphate, production de phytohormones, sidérophores ...etc).
- Dosages des molécules bioactives de Lin avant et après l'inoculation par les PGPR.
- Analyse de l'efficacité et la compétitivité des souches obtenues vis-à-vis la population native présente dans le sol indigène.

Références bibliographiques

- **Ahmad, F., I. Ahmad et M.S. Khan.** 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research*, 163 : 173-81.
- **Aitbelkacem C ., Belgrade AN.** 2017.Extraction et caractérisation de quelques molécules bioactives à partir des souches de *Pseudomonas fluorescents* et *Bacillus* sp. (Master dissertation, Université M'hamed bougara de boumerdes).85p
- **ANG-LEE M. K., MOSS J., YUAN C. S.** 2006 - Herbal medicines and perioperative care. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* 286 :208–216
- **Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R.** 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272(1), 201-209.
- **ARSLANOĞLU, F., & Aytac, S.** 2020. The important in terms of health of flax (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 3(1), 95-107
- **Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, A., Islam, M. Z., Shahidullah, S. M., & Meon, S.** 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7).
- **ATTIYET A.** 1995. Plantes médicinales et aromatiques dans le monde Arabe. Ed. Institution arabe pour les études et publication, Beyrouth, 296 P.
- **Atzél, B., Szoboszlay, S., Mikuska, Z., & Kriszt, B.** 2008. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of hygiene and environmental health*, 211(1-2), 143-155.
- **Bafana, A.** 2013. Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 63-74.
- **Bar-Ness, E., Y. Hadar, Y. Chen, V. Romheld et H. Marschner.** 1992. Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. *Plant Physiol.* 100: 451-456

- **Bottini, R., F. Cassan et P. Piccoli .2004.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**:497–503.
- **Berggren, I., J. W. L. van Vuurde et A. M. Martensson.** 2001. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Appl. Soil Ecol.* **17**: 97-105.
- **Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Raymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P.**1990. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- **Burdman, S. A. U. L., Jurkevitch, E. D. O. U. A. R. D., & Okon, Y. A. A. C. O. V.** 2000. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *Microbial interactions in agriculture and forestry (Volume II)*, 229-250.
- **Castignetti, D. et J.Jr. Smarrelli.** 1986. Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS Lett.* **209**:147-151.
- **Castric, PA.** 1977. Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **130** : 826-831.
- **Cheng, W., Coleman, D.C., Carroll, C.R., Hoffman, C.A.**1994. Investigating short term carbon flows in the rhizospheres of different plant species, using isotopic trapping. *Agronomy Journal* **86**, 782-788
- **Cherif H.** 2014. Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif 1)
- **Chet, I., & Inbar, J.** 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, **48**(1), 37-43.
- **Cohen, A.c., Travaglia, C.N., Bottini, R., et Piccoli, P.N.** 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany.* **87**(5): 455-462
- **Compeau G. Al-Achi B J. Platsouka E et Lively S B.** 1988. Survival of rifampicin resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Applied and Environmental Microbiology.* **54**: 2432-2438.
- **Costacurta, A., et J. Vanderleyden (1995).** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**:1–18.
- **Curl E A., Truelove B.** 1986. The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.

- **Diederichsen A., Richards K.** 2003. cultivated flax and the genus *linum* L.: taxonomy and germplasm conservation, in Munir A.D and Westcott, N.D (eds). *Flax, the genus linum*, p.22-54. London: Taylor Francis.
- **Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., & Zhang, L. H.** 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1754-1759.
- **Dutrtre J.M.**, 2011 - Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse doctorat d'état, Univ. Bordeaux 2-Victor Segalen U.F.R des sciences médicales, France, 33 p.
- **Ecker, J.R.** 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268:667-675.
- **El-Deeb B, Fayez K, Gherbawy Y.** 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *J Plant Interact* 8:56–64
- **Ezawa, T., SE. Smith et FA. Smith.** 2002. P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, 244: 221–230.
- **Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z.** 1986. Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin of the World Health Organization*, 64(2), 159.
- Flax Council of Canada. Downloaded from <http://www.jitinc.com/flax/brochure02.pdf>. Consulté le 4/6/12
- **Ganorkar PM et Jain RK.** 2013. Flaxseed –a nutritional punch: *International Food Research Journal* 20(2): 519-525
- **Glick, B.R., Z. Cheng, J. Czarny, et J. Duan.** 2007. Promotion of plant growth by ACC-deaminase producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:329–339.
- **Glick., B.R., D.M. Penrose et L. Jiping.** 1998. A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63–68.
- **Glick, B.R., C.L. Patten., G. Holguin, et D.M. Penrose (1995).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College Press*, London.

- **Graham, P. H.** 1988. Principles and Application of Soil Microbiology, pp: 322–345.
- **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 et Defago G.** 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology.* 3: 307-319.
- **Hagen G.** 1990. The control of gene expression by auxin. In: Davies P J. (Eds) *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 149–163.
- **Haggerty, W. J.** 1999. Flax: ancient herb and modern medicine. *Herbalgram,* 45, 51-57.
- **Halligudi N.**2012, Pharmacological properties of flax seed: Review *Hygeia: journal for drugs and medicines* vol 4(2): 70-77
- **Halvorson, H. O., & Ziegler, N. R.** 1933. Application of statistics to problems in bacteriology: I. A means of determining bacterial population by the dilution method. *Journal of Bacteriology,* 25(2), 101-121.
- **Hawes, M. C., Brigham, L. A., Wen, F., Woo, H. H., & Zhu, Y.** 1998. Function of root border cells in plant health: pioneers in the rhizosphere. *Annual review of phytopathology,* 36, 311.
- **Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, L.** .2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol* 60: 579-598
- **Hiltner, L.** 1904. Über neuer Erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer nerücksichtigung der gründung und brache. *Arbeiten aus dem Deutschen Landwirtschafts Gesellschaft* 98: 59-78.
- **Hickey, M.** 1988. *100 Families of Flowering Plants,* 2nd ed. University Press. Cambridge.
- **HORDÉ .P.** 2014. - Plantes médicinales – Définition. Consulté le 8 juillet 2015. <http://santemedecine.journaldesfemmes.com/faq/32986-plante-medicinale>
- **Idris H A. Labuschagne N. Korsten L.** 2008. Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. *Biological control.* 45: 72-84.

- **Jha, C. K., & Saraf, M.** 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Agriculture Research and Development*, 5(2), 0108-0119.
- **Jhala, A. J., & Hall, L. M.** 2010. Flax (*Linum usitatissimum* L.): current uses and future applications. *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 4(9), 4304-4312.
- **Joffin J N.**, 2005. Feuilles de calcul pour l'identification microbienne. 8p
- **Kennedy, I.R., Choudhury, A.I.M.A, KecSkcs, M.L.**2004. Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*. 36(8): 1229-1244.
- **Kennedy, I.R., Tchan, Y.** 1992. Biological nitrogen fixation in noleguminous field crops: recent advances. *Plant Soil*. 141: 93-118.
- **Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z. A.** 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473-480..
- **Kim H et Choi H.**2005, Stimulation of acyl-coA oxidase by α -linolenic acid rich parilla oil lowers plasma tricylglycerol level in rats, *Life Sci* 77: 1293-1306.
- **Koeberl M, Schmidt R, Ramadan EM, Bauer R, Berg G.**2013. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality, and health. *Front Microbiol* 4:400.
- **Kovács, N.** 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London)* 178:703.
- **Kumar G, Kanaujia N, Bafana A** .2012. Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of *Ajuga bracteosa* in Kangra valley. *Microbiol Res* 167:220–225
- **Kumar, V. et N. Narula.** 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils*, 28(3):301-305
- **Lamouliatte, H., Mégrand F., et Cayla R.** 1992. *Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Editions techniques. EMC.
- **LARPENT J. P. ET LAIRPENT M.G.** 1990. Memento technique de microbiologie. Second Ed Technique et Documentaire Lavoisier. 417.
- **Larpent J.P., Larpent-Gourgaud M.** 1985. Manuel pratique de microbiologie. Ed Hatmann, France, 230p.

- **Lucy M, E. Reed ,. BR. Glick.** 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 86:1–25.
- **Lyu, D., Backer, R., & Smith, D. L.** 2022. Three plant growth-promoting rhizobacteria alter morphological development, physiology, and flower yield of *Cannabis sativa* L. *Industrial Crops and Products*, 178, 114583.
- **Macking H.** 2007. Phytoremediation of contaminated soil on plant efficiency, rhizosphere
- **MacMillan, J.**2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fung
- **Morvan C, Abdul Hafez A, Morvan O, Jauneau A, Demarty M .**1989. Etude physicochimique et biochimique de polysaccharides extraits de lin sous-roui. *Plant Physiol Biochem* 27:451–459
- **Neilands, JB., K. Konopka, B. Schwyn, M. Coy, , RT. Francis, BH. Paw .**1987. Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. In: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals.* Winkelmann, G., van der Helm, D., and Neilands, J.B. (eds). Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, pp. 3-33.
- i, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 20, 387-442.
- **Mahdi, S.S., Hassan, G.I., Samoon, S.A., Rather, H.A., Dar, Showkat, A. et Zehra, B.** 2010. Bio-fertilizer in organic agriculture. *Journal of Phytology*, 2(10): 42-54.
- **Marchal N., Bourdon J.L.ET RICHAD C.L.**1991.Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique de bacteries Ed. doin .65
- **Masclef A.**1891. Atlas des plantes de France
- **Mercado-Blanco J et Bakker P A M.** 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* 92: 67-389
- **Millam, S., Obert, B., & Pret'ová, A.** 2005. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum*—a review. *Plant cell, tissue and organ culture*, 82(1), 93-103.
- **Morris, D.H.** 2003. Flax: A health and nutrition primer. 3rd ed, p.11 Winnipeg: Flax Council of Canada. Downloaded from <http://www.jitinc.com/flax/ brochure02.pdf> verified on 4/6/12.
- **Nieto KF. et WT. Frankenberger .**1989. Biosynthesis of Cytokinins in Soil. *Sci. Soc. Am. J.* 53 (3): 735-740.

- **Oldroyd, G.E., E.M. Engstrom, et S.R. Long .2001.** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell*. **13**:1835–1849.
- **Orhan, E, A. Esitken, S. Ercisli, M. Turan et F. Sahin.** 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hort* 111:38–43.
- **Ouedraogo, S., Yoda, J., Traore, T. K., Nitiema, M., Sombie, B. C., Diawara, H. Z., & Semde, R. 2021.** Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(2), 750-772.
- **Pandey, A., et Kumar, S.**1989. Potential of *Azotobacters* and *Azospirilla* as biofertilizers for upland agriculture: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 48: 134-144.
- **Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R., Guckert, A.** 2000.Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 948-955.
- **Podile,A.R., & Kishore, G. K.** 2007. Plant growth-promoting rhizobacteria. In *Plant-Associated Bacteria* (pp. 195-230). Springer, Dordrecht.
- **Qi XJ, Wang ES, Chen X .2013.** Molecular characterization of bacterial population in the *Rumex patientia* rhizosphere soil of Jilin, China. *Res J Biotechnol* 8:64–71
- **Roy, H. J., Lundy, S., & Eriksen, C.** 2007. Healthier lives through education in nutrition and preventive medicine. Flaxseed a review of health benefits. *Pennington Nutrition Series*, (5), 1-4.
- **Raaijmakers, J.M., M.Vlami et J.T. de Souza.** 2002.Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 537-547.
- **Rizvi, A., Ahmed, B., Khan, M. S., El-Beltagi, H. S., Umar, S., & Lee, J.** 2022. Bioprospecting Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Enhancing the Biological Properties and Phytochemical Composition of Medicinally Important Crops. *Molecules*, 27(4), 1407.
- **Rubilar, M., Gutiérrez, C., Verdugo, M., Shene, C., & Sineiro, J.** 2010. Flaxseed as a source of functional ingredients. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 373-377.

- **Ryu, CM., MA. Farag, CH. Hu, MS. Reddy, HX. Wei, PW. Paré et JW. Kloepper.** 2003. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 4927-4932.
- **Şahin, F., Çakmakçı, R., & Kantar, F.** 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and soil*, 265(1), 123-129.
- **Salisbury F B.** 1994. The role of plant hormones. In: Wilkinson R E. (Eds) *Plant Environment Interaction*. Marcel Dekker. New York. USA. pp. 39–81.
- **Salisbury, F. B., & Ross, C. W.** 1992. *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth.
- **Schippers ,B., AW. Bakker et PAHM. Bakker.** 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:339-358.
- **Seshadri,B., Bolan, N.S. & Naidu, R.** 2015. Rhizosphere-induced heavy metal (loid) transformation in relation to bioavailability and remediation, Centre for Environmental Risk Assessment and Remediation, University of South Australia, M *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(2): 524-548
- **Sharghi, A.; Badi, H.N.; Bolandnazar, S.; Mehrafarin, A.; Sarikhani, M.R.** 2018. Morphophysiological and Phytochemical Responses of Fenugreek to Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) under Different Soil Water Levels. *Folia Hortic.*, 30, 215-228.
- **Singh, A., Kumar, D., Jatin Sharma, D., Lamba, Dr. H. S.** 2011. A Review Article on *Linum Usitatissimum* a Life Saving Drug Now a Days. *PHARMATUTOR-ART-1129*.
- **Spaepen S. Vanderleyden J. Remans R.** 2007. Indole-3-acetic in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews.* 31: 425-448.
- **Spaepen, S., J. Vanderleyden et Y. Okon.** 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. In: van Loon LC (ed) *Advances in botanical research*, vol 51. Academic, Burlington, pp 283–320
- **Sumner, M.E.** 1990. Crop response to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Sciences.* 12: 53-123

- **Suryadevara, N., & Ponnuragan, P.** 2012. Response of turmeric to plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) inoculation under different levels of nitrogen. *Int J Biol Technol*, 3(1), 39-44.
- **Timmusk SNS., B. Nicander, U. Granhallet E. Tillberg.** 1999. Cytokinin production by *Paenibacilluspolymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 31:1847–1852.
- **Vaisey-Genser M et Morris DH.**2003. Introduction: history of the cultivation and uses of flaxseed, In Muir, A. D. and Westcott, N. D. (Eds). *Flax: The genus Linum*. p. 1-2. London: Taylor & Francis
- **Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Velazquez, E., Rodríguez-Barrueco, C., ... & Igual, J. M.** 2006. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization* (pp. 43-50). Springer, Dordrecht.
- **Van Loon, L C., PBJ. Geraatset HJM. Linthorst.** 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 11:184–190.
- **Vasudha S, Shivesh S, Prasad SK .**2013. Harnessing PGPR from rhizosphere of prevalent medicinal plants in tribal areas of Central India. *Res J Biotechnol* 8:76–85.
- **Vessey, J.K.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255 : 571–586
- **Vijaimohan KM, Jainu KE, Sabitha S, Subramaniyam C, Aandhan CS et Wang, C., E. Knill, B.R. Glick et G. Défago .**2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane- 1carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(10), 898-907.
- **Wang, C., E. Knill, B.R. Glick et G. Défago. 2000.** Effect of transferring 1-aminocyclopropane- 1carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* 46:898–907.
- **Wang Y, HN. Brown, DE. Crowley et PJ. Szaniszlo .**1993. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferroxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell. Environ.* 16(5): 579–585.

- **Weller D M.**2007. Pseudomonas biological control agents of soil borne pathogens: Looking back over 30 year. *Phytopathology*. 97: 250-256.
- **Whitelaw, MA.** 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69:99–151
- **Winkler, H.** 1931. Linaceae, Trib. I. 3. Linoideae-Eulineae. *Die Nature-Li-chen Pflanzenfamilien Nebst Ihren Gattungen Und Wichtigeren Arten, Insbesondere Den Nutzpflanzen.* W. Engelmann, Leipzig, 111-120.
- **Yang, S., Zhang, X., Cao, Z., Zhao, K., Wang, S., Chen, M., & Hu, X.** (2014). Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH 1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation. *Microbial biotechnology*, 7(6), 611-620.
- **Zahran, H. H., Räsänen, L. A., Karsisto, M., & Lindström, K.** 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(1), 100-105.

Annexes

ANNEXES

Annexe 01

Gélose Nutritive

Tryptone	05g
Extrait de viande.....	01g
Extrait de levure	02g
NaCl	05g
Agar	12g
Eau distillée	01L
PH	7.5

Annexe 02

Solution saline de 85 %

NaCl	0.85g
L'eau distillé.....	100ml.

Annexe 03

Composition des standards de turbidité de Mc Farland.

Solution ajoutée:

BaCl ₂ (1,175%)	0,5 ml
H ₂ SO ₄	9,5 ml

Standard Mc Farland	0.5	1	2	3	4
Chlorure de baryum à 1%(ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Acide sulfurique à 1%(ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Densité cellulaire approximative (1×10.8 UFC/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
Transmittance %	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
absorbance	0.08à 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669

ANNEXES

Annexe 4

Eau gélosée (0.8%)

Agar- agar0.8g

Eau distillée100ml

La solution est autoclavé pendent 20 min à 120°C

Annexe 5 : Analyse statistique

Effet des PGPR sur le poids frais de Lin (*Linum usitatissimum*)

Univariate Tests of Significance for Poids frais(g) (Linum - Copie.sta) Over-parameterized model Type III decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Traitement	0,118955	9	0,013217	28,88430	0,000000
Error	0,008237	18	0,000458		

Effet des PGPR sur le poids sec de Lin (*Linum usitatissimum*)

Univariate Tests of Significance for Poids sec(g) (Linum - Copie.sta) Over-parameterized model Type III decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Traitement	0,005926	9	0,000658	1,690598	0,0000
Error	0,007010	18	0,000389		

Annexe 06 : Analyse statistique

Effet des PGPR sur la Longueur racinaire de Lin (*Linum usitatissimum*)

Univariate Tests of Significance for Partie racinaire (cm) (Linum - Copie.sta) Over-parameterized model Type III decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Traitement	1545,250	9	171,6944	9,294737	0,000038
Error	332,500	18	18,4722		

Effet des PGPR sur la Longueur de la partie aérienne de Lin (*Linum usitatissimum*)

Univariate Tests of Significance for Partie aérienne(cm) (Linum - Copie.sta) Over-parameterized model Type III decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Traitement	3322,750	9	369,1944	28,52146	0,000000
Error	233,000	18	12,9444		

Résumé

Il est bien connu qu'un produit à base de plantes médicinales devrait être entièrement exempt de matières étrangères toxiques et nocives et de résidus chimiques. Cependant, les pratiques culturales de ces plantes sont basées essentiellement sur l'utilisation des engrais chimiques qui sont coûteux, polluants, et préjudiciable à la santé. L'utilisation des PGPR est considérée comme une des approches microbiologiques alternatives des plus efficaces pour améliorer la croissance de plantes médicinales. A ce propos, un essai comparatif a été réalisé sur le Lin (*Linum usitatissimum*) inoculé par des souches à effet PGPR isolées à partir de sol rhizosphérique. L'isolement des bactéries nous a permis d'obtenir une collection de 08 isolats, leur effet sur la croissance des plantes est vérifié ainsi que leur caractérisation phénotypique, et biochimique par les galeries API 20NE. Les résultats obtenus ont révélé que l'inoculation a amélioré favorablement la longueur de la partie aérienne, racinaire, et le poids frais et sec des plantes par rapport aux témoins non inoculés. Statistiquement cette réponse montre que l'effet des souches est très hautement significatif. A travers ces résultats, il est à noter que les souches *Rhizobium radiobacter* S5, *Pseudomonas fluorescens* S6, *Pseudomonas luteola* S7, *Sphingomonas paucimobilis* S8 sont considérées comme les rhizobactéries les plus efficaces.

Mots clés : PGPR, Lin (*Linum usitatissimum*), Rhizosphère, Inoculation.

Abstract

It is well known that a herbal product should be completely free of toxic and harmful foreign materials and chemical residues. However, the cultivation practices of these plants are mainly based on the use of chemical fertilizers which are costly, polluting, and detrimental to health. The use of PGPRs is considered to be one of the most effective alternative microbiological approaches to improve the growth of medicinal plants. In this regard, a comparative trial was conducted on flax (*Linum usitatissimum*) inoculated with PGPR strains isolated from rhizosphere soil. The isolation of the bacteria allowed us to obtain a collection of 08 isolates, their effect on plant growth was verified as well as their phenotypic and biochemical characterisation by Galerie API 20 NE. The results obtained revealed that inoculation favourably improved the length of the aerial part, root, and the fresh and dry weight of the plants compared to the non-inoculated controls. Statistically this response shows that the effect of the strains is very highly significant. Through these results, it is noted that *Rhizobium radiobacter* S5, *Pseudomonas fluorescens* S6, *Pseudomonas luteola* S7, *Sphingomonas paucimobilis* S8 are considered the most efficient rhizobacteria.

Key words: PGPR, Flax (*Linum usitatissimum*), Rhizosphere, Inoculation

ملخص

من المعروف أن المنتج العشبي الطبي يجب أن يكون خاليا تماما من المواد الغريبة السامة والضارة والمخلفات الكيميائية. ومع ذلك ، فإن ممارسات زراعة هذه النباتات تعتمد بشكل أساسي على استخدام الأسمدة الكيماوية باهظة الثمن والملوثة والضارة بالصحة. ويعتبر استخدام PGPR واحدة من النهج الميكروبيولوجية البديلة الأكثر فعالية لتحسين نمو النباتات الطبية. في هذا الصدد ، تم إجراء اختبار مقارنة على الكتان (*linum usitatissimum*) تلقيح مع سلالات معزولة عن التربة ريزوسفيريك. سمح لنا عزل البكتيريا بالحصول على مجموعة من 08 عزلا ، ويتم التحقق من تأثيرها على نمو النبات بالإضافة إلى توصيفها المظهري والكيميائي الحيوي من خلال Galerie API 20NE. كشفت النتائج التي تم الحصول عليها أن التلقيح حسن بشكل إيجابي طول الجزء الجوي والجذر والوزن الطازج والجاف للنباتات مقارنة بالشواهد الغير الملقحة. إحصائيا، تظهر هذه الإجابة أن تأثير السلالات مهم للغاية. من خلال هذه النتائج ، تجدر الإشارة إلى أن سلالات *Rhizobium radiobacter* S5, *Pseudomonas fluorescens* S6, *Pseudomonas luteola* S7, *Sphingomonas paucimobilis* S8 البكتيريا الجذرية كفاءة.

الكلمات المفتاحية : الكتان (*linum usitatissimum*) , PGPR , ريزوسفير , التلقيح