

N° D'ordre : 02/2013-4/S.B

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENE

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire

Présentée pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : Sciences de la Nature

Option : Ecologie Microbienne de la Rhizosphère

Par Mme Yakoubi Lila

SUJET

Effets de deux herbicides (Norflurazon, Prométryne) sur la formation du biofilm et la production d'exopolysaccharides chez une souche de *Burkholderia fungorum*

Soutenu publiquement le : 24/11/2013 devant le jury composé de :

Mme F. Rahmania	Professeur FSB/USTHB	Présidente
Mr Y. Kaci	Professeur FSB/USTHB	Directeur de Mémoire
Mme S. ATHMANI	Maitre de conférences FSB/USTHB	Examinatrice
Mr R. Djebbar	Maitre de conférences FSB/USTHB	Examinateur

Remerciements

La présente étude a été réalisée au laboratoire de biologie des sols de la FSB/USTHB, sous la direction de Monsieur Y. Kaci.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à mon directeur de thèse Mr Y. Kaci professeur à la FSB/USTHB, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir accepté de diriger ce travail. Je le remercie vivement pour la confiance qu'il m'a accordée, pour ses conseils et ses orientations si précieuses, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Mes remerciements les plus profonds à mon enseignante Mme F. Rahmania, professeur à la FSB/USTHB pour l'honneur qu'elle m'accorde en acceptant d'évaluer ce travail et de présider ce jury mais également pour sa gentillesse et ses encouragements, qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Mr R. Djebbar qui a bien voulu participer à l'évaluation de ce travail, mais aussi pour sa gentillesse sa générosité et sa disponibilité.

Mes sincères remerciements vont également à Mme S. Guemouri d'avoir accepté d'examiner ce travail, pour ses conseils précieux et ses encouragements.

Je ne peux oublier Mme M. Djebbara pour son aide qui a insufflé une nouvelle âme à mon travail, je la remercie éternellement du fond du cœur.

Je remercie également toute l'équipe de biologie des sols particulièrement Mr Amrani S., Naziha, Nassima, Farida, Karima et Lynda.

J'exprime mon immense gratitude envers l'équipe du laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Dellys qui m'a aidée à retrouver les abc de la microbiologie c'est grâce à eux que j'ai démarré ma partie pratique, je pense particulièrement à Mr A. Benhamida pour les efforts qu'il a déployés pour me procurer cette autorisation de stage, à Mme S. Zahed médecin biologiste qui n'a épargné ni temps ni efforts pour m'apprendre tout ce dont j'avais besoin pour ma pratique, à Dhya et à toute l'équipe.

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'équipe du laboratoire de génie des procédés, je tiens à remercier Mme Saadaoui responsable du laboratoire, Mme Mokadam, Sabra et l'étudiant que je dérangeais tous les samedis pour m'ouvrir le laboratoire.

Je ne peux oublier de remercier Mme Aouichat et toute l'équipe de son laboratoire particulièrement Lila.

Mes plus forts remerciements à mon mari, qui a non seulement soutenu tant financièrement que moralement une éternelle étudiante, mais qui, en plus a été présent et patient depuis déjà 4 ans. J'adresse une tendresse toute particulière à mes enfants, mes parents et toute ma famille pour leurs encouragements tout au long de mes études et vis à vis de mes choix.

Enfin, mes sincères remerciements s'adressent à toutes les personnes qui m'ont aidées, encouragées et permis de persévérer dans mon travail, et qu'elles soient sûres que le fait de ne pas pouvoir les citer toutes, ne change en rien ma gratitude envers elles et elles sont toujours gardées en ma conscience.

Résumé

Le biofilm représente le mode de vie prépondérant des bactéries dans les écosystèmes naturels.

Les biofilms sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans les domaines de la santé publique et de l'industrie, générant des charges économiques importantes. Néanmoins de nombreux travaux permettent de valoriser leur rôle. Un exemple de ces effets dits bénéfiques, concerne l'implication des biofilms dans les phénomènes d'agrégation des sols qui représente un des aspects importants influençant positivement la croissance des plantes.

C'est dans ce contexte environnemental que s'inscrit le travail que nous proposons. En effet, l'une des contraintes majeures que subissent les sols est représentée par l'utilisation des herbicides, qui permettent certainement de lutter contre les adventices, mais qui occasionnent des effets néfastes au sol. Les plus importants de ces effets concernent la structure du sol et sa fertilité et sont perceptibles à plus ou moins long terme.

La présente étude se propose d'étudier l'effet de deux herbicides « le norflurazon » et la « prométryne » sur la formation de biofilm et la production d'exopolysaccharides chez une bactérie isolée du sol : *Burkholderia fungorum* souche Bf01.

B. fungorum souche B01 s'est montrée capable de former un biofilm sur la surface « verre » en présence comme en absence du norflurazon et de la prométryne. Si l'analyse des cinétiques de croissance a montré une baisse de production de biomasse en présence du norflurazon et de la prométryne, celle-ci est concomitante à une augmentation de leur biosynthèse d'exopolysaccharides. Il est à noter que *Burkholderia fungorum* souche Bf01, comme la plupart des rhizobactéries est une bactérie à croissance rapide.

Par ailleurs, *Burkholderia fungorum* souche Bf01 présente un potentiel PGPR, puisqu'elle permet l'amélioration de la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB en présence du norflurazon et de la prométryne, suggérant ainsi une forte réduction du stress oxydant dû au norflurazon, particulièrement pour les plantules traitées aux plus fortes concentrations.

Ainsi, la capacité de produire les biofilms, la tolérance au norflurazon et à la prométryne, la production d'EPS et son effet PGPR font de la bactérie *Burkholderia fungorum* souche Bf01 une candidate pour l'inoculation du blé dur.

Mots clés : Biofilm, Exopolysaccharides, Blé dur (*Triticum durum* L.), *Burkholderia*, Herbicides, PGPR.

Liste des abréviations

CLSM :	confocal laser scanning microscopy(microscopie confocale à balayage laser).
cm :	centimètre.
CV :	cristal violet
CMI :	concentration minimale inhibitrice
DO :	densité optique
°C :	degré Celsius.
EDS :	eau distillée stérile.
EPS :	exopolysaccharides
(g) :	gramme.
ITGC :	institut technique des grandes cultures.
KCl :	Chlorure de potassium.
M :	molaire
mL :	millilitre
mg :	milligramme
NFZ :	norflurazon
N ⁻⁴ , N ⁻⁵ , N ⁻⁶ :	concentrations en norflurazon 10 ⁻⁴ molaire, 10 ⁻⁵ molaire et 10 ⁻⁶ molaire.
PGPR :	plants growth promoting rhizobacteria
PM :	prométryne
P ⁻⁴ , P ⁻⁵ , P ⁻⁶ :	concentrations de prométryne 10 ⁻⁴ molaire, 10 ⁻⁵ molaire et 10 ⁻⁶ molaire.
SPE :	substances polymériques extracellulaires
T :	témoin
TSB :	Tryptic soya broth.
TY :	tryptone yeast.
Trs/min:	tours par minute.
Var MBB :	variété Mohamed Bel Bachir.
YE :	yeast extract.
YESB :	yeast extract saccharose broth.
µg :	microgramme

Sommaire

Introduction	1
Revue bibliographique	3
1. Les biofilms.....	3
1.1 Définition, ubiquité et intérêt.....	3
1.2 Méthodes d'étude des biofilms.....	3
1.2.1 Les biofilms néfastes.....	3
1.2.2 Les biofilms bénéfiques.....	4
1.3 Les biofilms dans de sol.....	4
1.3.1 Les biofilms dans la rhizosphère.....	5
1.4 Etapes de formation du biofilm.....	7
1.4.1 Transport vers la surface.....	8
1.4.2 Adhésion du biofilm.....	8
1.4.3 Croissance du biofilm.....	10
1.4.4 Dispersion du biofilm.....	10
1.5 Propriétés des bactéries au sein du biofilm.....	10
1.5.1 La coopérativité métabolique : Quorum Sensing.....	11
1.5.2 La résistance aux biocides.....	11
1.5.3 Le transfert horizontal des gènes ou HGT.....	11
1.5.4 La syntrophie.....	11
1.6 Composition du biofilm.....	12
2. Les polysaccharides bactériens.....	12
2.1 Définition.....	12
2.2 Facteurs influençant la biosynthèse des EPS.....	13
2.2.1 Effets des conditions de culture.....	13
2.3 Effets des herbicides sur la production d'EPS bactériens.....	13
2.4 Rôles physiologiques des EPS.....	13
2.4.1 Protection des bactéries.....	13
2.4.2 Rôle nutritionnel	14
2.4.3 Rôle dans l'adhésion	14
2.4.4 Le maintien de l'architecture du biofilm.....	14
2.4.5 Structuration du sol et rétention d'eau.....	15
3. Les herbicides.....	15
3.1 Définition.....	15
3.2 Classification des herbicides	16
3.3 Les triazines : définition et mode d'action	16
3.4 Les Pyridazinones: définition et mode d'action.....	17
3.5 Sélectivité des herbicides	18
3.6 Devenir des herbicides dans le sol.....	19
3.6.1 Dissipation par dispersion	19
3.6.2 Dissipation par transformation de la matière active.....	20
3.7 Rôle de la rhizosphère dans la dissipation biologique des polluants.....	22
4. Le genre <i>Burkholderia</i>	23

Matériel et méthodes	25
1. Présentation de la souche.....	25
2. Description morphologique.....	25
3. Effet des herbicides sur la cinétique de la croissance bactérienne, la production d'EPS et la production du biofilm de <i>B. fungorum</i> souche Bf01.....	25
3.1. Les herbicides.....	25
3.1.1 Préparation des différentes concentrations en herbicides.....	26
3.1.2 Stérilisation des herbicides.....	27
4. Les milieux de culture	27
5. Production de l'inoculum.....	27
6. Effets des herbicides sur la cinétique de croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01	
6.1. Dosage des protéines cellulaires	28
7. Effets des herbicides sur la cinétique de production des EPS.....	29
7.1. Dosage des sucres totaux à l'antrone sulfurique	29
8. Effets des herbicides sur la cinétique de formation du biofilm chez <i>B. fungorum</i>	30
8.1 Quantification du biofilm.....	31
9. Effets des herbicides sur la cinétique de production des cellules planctoniques...	31
10. Effets des herbicides sur les paramètres de croissance de <i>B. fungorum</i>	32
10.1 Evaluation du potentiel PGPR de <i>B. fungorum</i> souche B01.....	32
10.1.1 Le sol.....	33
10.1.2 Préparation du sol	33
10.1.3 La plante.....	33
10.1.4 Détermination de l'histogramme de fréquences des poids des graines	34
10.1.5 Stérilisation des graines.....	34
10.1.6 Production de l'inoculum	35
10.2 Culture en pots.....	35
10.3 Culture hydroponique en tubes.....	36
11. Traitements statistiques et analyse des données.....	37
Résultats et discussion	38
1. Caractéristiques de <i>B. fungorum</i> souche Bf01.....	38
1.1 Caractéristiques morphologiques.....	38
1.1.1 Etude macroscopique.....	39
1.1.2 Etude microscopique.....	39
1.2 Cinétique de croissance.....	40
1.3 Cinétique de production d'EPS.....	40
1.4 Cinétique de formation du biofilm.....	41
1.5 Cinétique de croissance des cellules planctoniques.....	42
2. Effets des herbicides sur la croissance, la production d'EPS la formation du biofilm et la production de cellules planctoniques.....	42
2.1 Effets des herbicides sur la cinétique de croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01.	43
2.2 Effets des herbicides sur la cinétique de production des EPS	45
2.3 Effets des herbicides sur la formation du biofilm chez <i>B. fungorum</i> souche Bf01.....	48
2.3.1 Effets de la nature du substrat sur la formation du biofilm chez <i>B.fungorum</i>	50
2.4 Effets des herbicides sur la cinétique de croissance des cellules planctoniques de <i>B. fungorum</i> souche Bf01	51
2.5 Effets du norflurazon et de la prométryne sur les paramètres de croissance	

(taux de croissance et temps de génération) de <i>B. fungorum</i> souche Bf 01.....	52
3. Effet du norflurazon et de la prométryne sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var MBB.....	53
3.1 Effet du norflurazon sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var MBB	
3.1.1 Taille de la partie racinaire.....	53
3.1.2 Taille de la partie aérienne.....	54
3.1.3 Biomasse sèche de la partie racinaire (PR).....	54
3.1.4 Biomasse sèche de la partie aérienne (PA).....	55
3.1.5 Rapport « PR/PA »	55
3.2 Effets de l'inoculation par <i>B. fungorum</i> souche Bf 01 sur la croissance des plantules de blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var MBB traitées aux différentes concentrations en norflurazon.....	57
3.2.1 Longueur de la partie racinaire.....	57
3.2.2 Longueur de la partie aérienne.....	57
3.2.3 Biomasse sèche de la partie racinaire (PR).....	57
3.2.4 Biomasse sèche de la partie aérienne (PA).....	58
3.2.5 Rapport « PR/PA »	58
3.2.6 Effets du norflurazon sur la morphologie du blé dur(<i>Triticum durum</i> L.).....	60
3.3 Effets de la prométryne sur la croissance des plantules de blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var MBB.....	61
3.3.1 Taille de la partie racinaire	61
3.3.2 Taille de la partie aérienne.....	61
3.3.3 Biomasse sèche de la partie racinaire (PR).....	62
3.3.4 Biomasse sèche de la partie aérienne (PA).....	62
3.3.5 Rapport « PR/PA ».....	62
3.4 Effets de l'inoculation par <i>B.fungorum</i> souche Bf01, sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var MBB, traité aux différentes concentrations de prométryne.....	64
3.4.1 Sur la longueur racinaire	65
3.4.2 Taille de la partie aérienne.....	65
3.4.3Biomasse sèche de la partie racinaire.....	65
3.4.4 Biomasse sèche de la partie aérienne.....	65
3.4.5 Rapport « PR/PA ».....	65
Discussion	67
Conclusion	78
Références bibliographiques	81
Annexe	

Index des figures	Pages
Figure 1	Sites de formation du biofilm sur les plantes. Photographie d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en croissance axénique.....5
Figure 2	Modèle hypothétique d'une racine et de la répartition spatiale des biofilms..... 6
Figure 3	Représentation schématique du processus de formation des biofilms.....7
Figure 4	Formule générale des S. triazines.....17
Figure 5	Structure de quelques herbicides de la famille des triazines.....17
Figure 6	Formule générale des pyridazinones.....18
Figure 7	Structure de quelques herbicides de la famille des pyridazinones.....18
Figure 8	Processus de dispersion et de dégradation des pesticides..... 20
Figure 9	Cellules de <i>Burkholderia</i> observées au microscope électronique à balayage.....23
Figure 10	Présentation des herbicides utilisés.....26
Figure 11	Stérilisation des herbicides par microfiltration (0.22µm) et préservation contre la photolyse.....26
Figure 12	Dispositif expérimental permettant l'évaluation du biofilm (méthode au cristal violet).....31
Figure 13	Histogramme de fréquences des poids des graines de blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) variété <i>Mohamed Belbachir</i> 34
Figure 14	Germination des graines de blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var. MBB sur gélose nutritive..... 35
Figure 15	Dispositif expérimental de culture de blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var.MBB en pots.....35
Figure 16	Dispositif expérimental de culture de blé dur (<i>Triticum durum</i> L.) var.MBB en conditions hydroponiques..... 37
Figure 17	Culture de <i>B.fungorum</i> sur gélose nutritive, après 48h d'incubation à 30°C.....38
Figure 18	Aspect des colonies de <i>B. fungorum</i> souche Bf01 après 96h d'incubation sur différents milieux de culture (M63 mannitol, TY mannitol et YE mannitol).....39
Figure 19	Culture de <i>B. fungorum</i> souche Bf01 observée au microscope photonique après coloration au bleu de méthylène.....39
Figure 20	Cinétique de croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01.....40
Figure 21	Cinétique de production d'EPS par <i>B.fungorum</i> souche Bf01.....41
Figure 22	Cinétiques de formation de biofilm par <i>B.fungorum</i> souche Bf 01sur surface « verre ».41
Figure 23	Cinétique de production de cellules planctoniques de <i>B.fungorum</i>42
Figure 24	Effets des différentes concentrations en norflurazon (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf01.....44

Figure 25	Effets des différentes concentrations de prométryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance de <i>B. fungorum</i> souche Bf 01.....	44
Figure 26	Effets des différentes concentrations en norflurazon (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la production d'EPS par <i>B. fungorum</i> souche Bf01.	46
Figure 27	Effets des différentes concentrations en prométryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la production d'EPS par <i>B. fungorum</i> souche Bf01.....	46
Figure 28	Effets des différentes concentrations en norflurazon sur la cinétique de formation du biofilm chez <i>B. fungorum</i> souche Bf01.....	49
Figure 29	Effets des différentes concentrations de prométryne sur la cinétique de formation du biofilm chez <i>B.fungorum</i> souche Bf01	50
Figure 30	Relation entre EPS et biofilm.....	50
Figure 31	Relation entre la production d'EPS (milieu solide) « A » et la production du biofilm « B » par la souche bactérienne <i>B. fungorum</i> Bf01 sur milieu TY mannitol.	51
Figure 32	Effets des différentes concentrations en norflurazon (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance des cellules planctoniques.....	51
Figure 33	Effets des différentes concentrations de la prométryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance des cellules planctoniques.....	52
Figure 34	Effets des différentes concentrations en norflurazon sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum</i>) var. MBB.....	56
Figure 35	Effets de l'inoculation sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum L.</i>) var. MBB traités aux différentes concentrations en norflurazon.....	58
Figure 36	Effets de l'inoculation sur la croissance racinaire des plantules de blé dur (<i>Triticum durum L.</i>) var MBB traitées aux différentes concentrations en norflurazon	
Figure 37	Effet du norflurazon sur la morphologie du blé dur (<i>Triticum durum L.</i>) var .MBB.....	59
Figure 38	Effets des différentes concentrations de prométryne sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum L.</i>) var. MBB.....	62
Figure 39	Effets de l'inoculation sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum L.</i>) var.MBB, traité par les différentes concentrations de prométryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M).	63
Figure 40	Effets de l'inoculation, sur la croissance du blé dur (<i>Triticum durum L.</i>) var MBB, traité aux différentes concentrations de prométryne.	64

Index des tableaux	Pages
Tableau I. Classification des herbicides.....	16
Tableau II Principales caractéristiques du norflurazon et de la prométryne.....	26
Tableau III Principales caractéristiques pédologiques du sol de la station agronomique de l'ITGC.....	33
Tableau IV Effets des herbicides (Norflurazon et prométryne) croisés avec deux concentrations en mannitol (10 et 30 g.L ⁻¹) sur la production de biomasse chez <i>B. fungorum</i> après 48h d'incubation.....	45
Tableau V Effet croisé de l'effet des herbicides (norflurazon et prométryne) et de la concentration en mannitol (10 et 30 g/l) sur le taux de production d'EPS.....	47
Tableau VI Effets du norflurazon et de la prométryne sur les Indices de productivité des EPS en milieu TY à 10g.l ⁻¹ et 30g.l ⁻¹	47
Tableau VII Effets du norflurazon et de la prométryne sur les durées des différentes phases du biofilm avec 30g/l de mannitol.....	49
Tableau VIII Effets du norflurazon et de la prométryne sur les paramètres de croissance (taux de croissance et temps de génération) de <i>B.fungorum</i> souche Bf 01.....	53

Introduction

Les communautés microbiennes vivant dans le sol, catalysent de nombreux processus importants pour la fertilité des sols et la croissance des plantes.

Dans la nature, ces communautés bactériennes jouent un rôle clé dans la production et la dégradation de la matière organique, la dégradation de nombreux polluants de l'environnement et le déroulement des cycles biogéochimiques qui maintiennent la biosphère. Les microbiologistes de l'environnement ont depuis longtemps reconnu que la plupart de ces processus naturels exigent un effort concerté de bactéries avec différentes capacités métaboliques (Makin *et al.*, 1996).

La plupart de ces communautés bactériennes se concentrent à l'interface de la racine et du sol, zone appelée rhizosphère et qui représente le site privilégié à la prolifération des microorganismes et de ce fait, lieu d'activité bactérienne intense.

Cette concentration de microorganismes est la conséquence de l'exsudation racinaire, rendant cet espace très riche en nutriments. Ce phénomène permet le transfert de 20 à 30% des photosynthétats vers les racines, dont une partie est libérée dans la rhizosphère, entretenant ainsi un cortège bactérien très important: c'est l'effet rhizosphère exercé par la plante (Bais *et al.*, 2006).

Dans cet environnement naturel, les microorganismes vivent en colonies attachées à des surfaces biotiques ou abiotiques (racines de plantes ou particules du sol) organisées en communautés structurées et souvent englobées dans une matrice d'exopolymères. Ce mode de développement appelé biofilm a pris une importance particulière, lorsqu'il a été établi qu'il était impliqué dans le renforcement de la résistance des plantes aux stress environnementaux (Danhorn et fuqua, 2004) et dans la bioremédiation des environnements pollués (Perumbakkam *et al.*, 2006).

La plupart des rhizobactéries associées aux plantes sont commensales; certaines influencent négativement la croissance et de façon générale la physiologie de la plante : ce sont les bactéries phytopathogènes. A l'encontre, il existe des bactéries rhizosphériques dites à effet PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), qui exercent un effet positif sur la croissance des plantes à travers des mécanismes directs tels que la solubilisation des éléments nutritifs, la fixation d'azote, la production de régulateurs de croissance (phytohormones) ou par des mécanismes indirects tels que la production d'exopolysaccharides, la stimulation du développement des mycorhizes, l'exclusion compétitive des agents pathogènes (Bashan et De-Bashan, 2010).

Parmi les rhizobactéries qui jouent un rôle dans la promotion de la croissance des plantes, certaines espèces appartenant au genre *Burkholderia* ont été signalées (Conye et Vandamme, 2003).

Toutefois ces communautés bactériennes sont fortement influencées par divers facteurs, notamment les produits agrochimiques, comme par exemple les herbicides (Ahemad et Khan, 2010a). Ces microorganismes peuvent être tolérants ou résistants à l'égard d'un herbicide particulier.

A travers cette étude, nous nous sommes proposés d'étudier le comportement d'une souche bactérienne isolée du sol, face à une situation de stress générée par deux herbicides le norflurazon et la prométryne.

Notre principal objectif est d'évaluer la capacité à former le biofilm par *Burkholderia fungorum* souche Bf01 en présence du norflurazon et de la prométryne.

Parallèlement à la formation du biofilm, la production d'EPS ainsi que la croissance de *B.fungorum* souche Bf01 ont été suivies.

Enfin, nous avons évalué le potentiel PGPR de *B. fungorum* souche Bf01 sur le blé dur (*Triticum durum* L.) variété Mohamed Belbachir traité par le norflurazon et la prométryne.

1. Les biofilms

1.1. Définition, ubiquité et intérêt.

Une définition communément admise, c'est celle de Donlan et Costerton qui définit le biofilm comme étant une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à un substrat, une interface ou tout simplement entre elles. Celles-ci sont enrobées d'une matrice extracellulaire de substances polymériques (en général polysaccharides) qu'elles ont elles-mêmes produites (Donlan et Costerton, 2002).

Les bactéries qui ne vivent pas en biofilm sont libres en suspension ; elles sont dites planctoniques en opposition à celles qui vivent en biofilm, dites sessiles.

Un biofilm peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de plusieurs espèces de bactéries, mais il peut aussi être composé de champignons, algues ou protozoaires.

Dans les écosystèmes naturels 99% des bactéries se développent en biofilms (Donlan et Costerton, 2002), sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants (tissus humains, feuilles et racines de végétaux), les surfaces minérales (pierres, bétons).

L'influence de l'environnement sur la bactérie est importante en raison de la petite taille de ce microorganisme, qui est en contact intime avec le vaste milieu qui l'entoure. La principale stratégie de défense des bactéries dans l'environnement est assurée par le biofilm, au sein duquel ces microorganismes se multiplient et se protègent contre toutes les agressions du milieu, leur permettant ainsi de survivre.

Le développement microbien sous forme de biofilm, constitue un moyen efficace pour les microorganismes de subsister dans un microenvironnement défavorable à leur croissance. Cette structure particulière leur confère également des propriétés spécifiques de résistance, entraînant de nombreux problèmes dans différents secteurs d'activités.

1.2. Méthodes d'étude des biofilms

L'application de la microscopie confocale à balayage laser (CSLM) a radicalement modifié la perception de la structure et de la fonction du biofilm. La CSLM qui permet la visualisation des échantillons complètement hydratés, a révélé la structure tridimensionnelle des biofilms (De Beer *et al.*, 1995).

1.2.1. Les biofilms néfastes

Dans le domaine de la santé, le problème le plus commun est la formation de la plaque dentaire à l'origine des caries. Les biofilms sont à l'origine d'infections plus sérieuses liées à leur formation sur le matériel médical (seringues..., cathéters ou implants : implants intraoculaires, valves cardiaques, prothèses...) (Kodjikian *et al.*, 2006) ainsi que sur les tissus corporels comme les yeux ou les poumons (Costerton *et al.*, 1999). L'éradication des biofilms pathogènes pose de réels problèmes car les antibiotiques classiques ne sont efficaces que sur les bactéries planctoniques et révèlent une efficacité quasiment nulle sur les biofilms.

En industrie agroalimentaire l'impact des biofilms n'est pas meilleur (Boulangé-Petermann, 1996) touchant tous les secteurs: laiteries, industries de transformation de viandes, sucreries etc...

L'ensemble des secteurs industriels est également confronté à la bio- détérioration des matériaux sur lesquels s'installent les biofilms notamment les métaux on parle de biocorrosion ou corrosion microbienne (Beech et Sunner, 2004).

1.2.2. Les biofilms bénéfiques

Un des meilleurs exemples pour illustrer les effets bénéfiques du biofilm est sa mise en application dans le domaine du traitement des effluents (Rittmann, 2007).

Les biofilms peuvent être utilisés comme indicateurs de pollution, afin de déterminer le degré de pollution des cours d'eau ou le risque représenté par les substances toxiques (Sabater *et al.*, 2007).

Dans l'industrie, les biofilms sont de plus en plus utilisés par les biotechnologies (Qureshi *et al.*, 2005). Ils interviennent dans de nombreux procédés tels que la production biotechnologique par des cellules fixées de biomolécules telles que les polysaccharides, alcools, acides... (Bonilla *et al.*, 2005 ; Villena et Gutiérrez-Correa, 2007).

1.3. Les biofilms dans de sol

Le fonctionnement global du sol fait intervenir de très nombreux paramètres d'ordres physiques, chimiques et biologiques. Dans cette problématique de qualité, les biofilms du sol tiennent une place très importante. Ces systèmes microbiens se sont avérés des éléments bénéfiques pour l'amélioration des capacités de production des sols (Calibrix, 2005).

Selon Hattori (1973), près de 80 à 90% des micro-organismes telluriques se trouvent sur des surfaces solides.

Dans le sol, il existe deux principales zones biologiquement actives:

- La rhizosphère (Morgan *et al.*, 2005).

- Les agrégats de sols, présentant des propriétés physico-chimiques différentes selon leur origine (Sexstone *et al.*, 1985) et riches en particules organiques.

1.3.1. Les biofilms dans la rhizosphère

La rhizosphère, définie par Hiltner (1904), comme étant le sol immédiatement influencé, physiquement et biologiquement par les racines des plantes est une zone d'intenses activités microbiennes. Comparée au sol nu, la rhizosphère est relativement riche en nutriments. C'est l'interface indispensable entre les racines des plantes et le sol et lieu d'interactions diverses.

- **Effet « rhizosphère »**

L'effet des substances chimiques sécrétées par les racines des plantes sur les populations microbiennes a été bien établi (Bais *et al.*, 2006).

En conséquence, un certain nombre d'interactions bénéfiques et nocives entre les plantes et les micro-organismes, localisées dans la rhizosphère ont été étudiées. (Ryu *et al.*, 2003 ; 2004 ; Timmusk *et al.*, 2005). Certaines de ces populations bactériennes sont particulièrement stimulées dans la rhizosphère, comme c'est le cas des *Burkholderia sp.* dans la rhizosphère du maïs (Hebbar *et al.*, 1992).

Les biofilms ont dévoilé de nouvelles capacités de dégradation pour la bioremédiation des sols contaminés par les xénobiotiques (Carvalho *et al.*, 2001) et les métaux lourds (Travieso *et al.*, 2002).

Les plantes servent de support pour une large variété de biofilms ; les racines, les vaisseaux conducteurs et les parties aériennes peuvent ainsi abriter ces biofilms (Fig 1.).

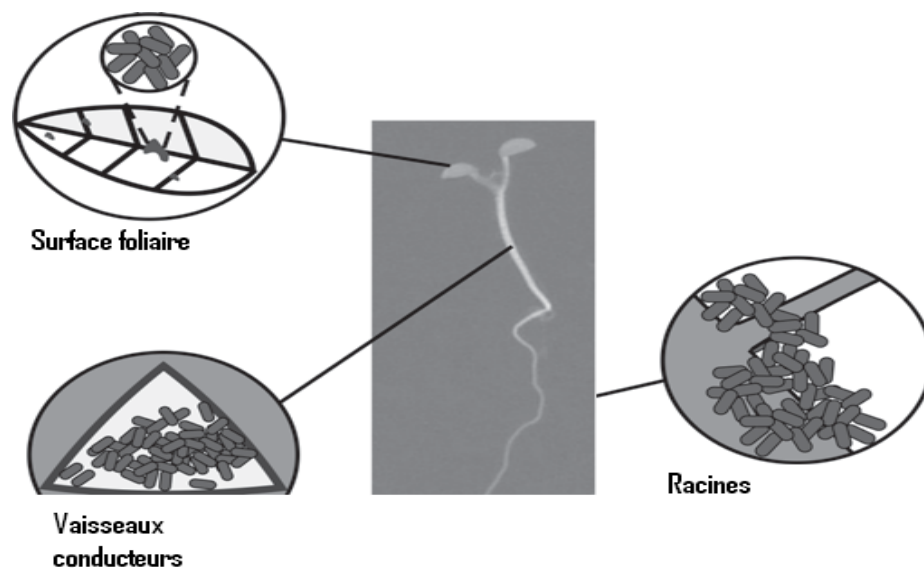


Figure 1. Sites de formation du biofilm sur les plantes. Photographie d'*Arabidopsis thaliana* en croissance axénique (Eberl *et al.*, 2007).

Les bactéries réagissant avec les plantes, peuvent avoir différents rôles: pathogènes, commensales et bénéfiques. Le rôle bénéfique peut se matérialiser par un effet PGPR par exemple, pour lesquelles la capacité à former un biofilm est essentielle pour la mise en place d'une telle relation (Danhorn et Fuqua, 2004).

- **Sites de formation de biofilms racinaires**

Les populations bactériennes prolifèrent à différents endroits de la racine, en réponse à la libération des nutriments par l'exsudation racinaire des plantes.

Chez le blé par exemple, une large variété de populations bactériennes colonise les différentes parties le long de la racine (Watt *et al.*, 2006).

La diversité de la localisation des espèces microbiennes adhérentes aux racines, leur densité ainsi que leurs activités métaboliques, reflètent une hétérogénéité au niveau des sites de colonisation traduite par, le type des cellules (la pointe racinaire, la zone d'élongation ainsi que la zone basale), la chimie de surface et le taux d'exsudation qui varie en fonction de l'âge de la plante et de son état physiologique (Gregory, 2006).(Fig 2.).

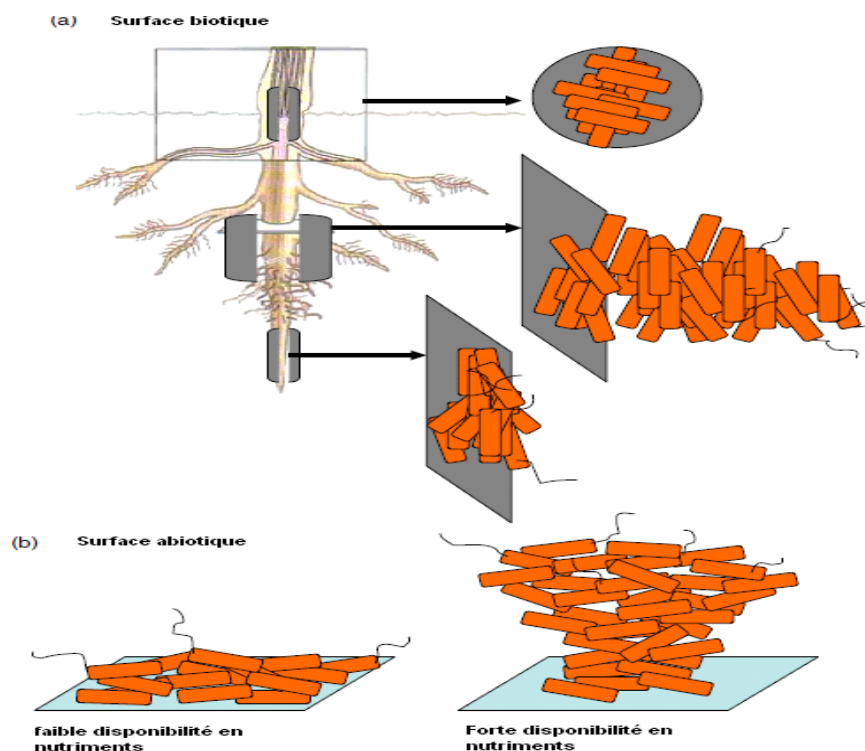


Figure 2. Modèle hypothétique d'une racine et de la répartition spatiale des biofilms (Rudrappa *et al.*, 2008).

1.4. Etapes de formation du biofilm

L'étude du biofilm est complexe et relève de l'interdisciplinarité : microbiologie, génétique, physico-chimie de surface. L'approche par la génétique et la biologie moléculaire a permis un progrès important dans la compréhension des mécanismes de formation et de développement des biofilms.

Le développement d'un biofilm est un processus dynamique qui se déroule en série d'étapes séquentielles.

Au moins quatre étapes distinctes ont été observées pour caractériser ce processus (O'Toole *et al.*, 2000 ; Sauer, 2003)(Fig 3.).

- La fixation réversible,
- la fixation irréversible,
- la maturation
- la dispersion.

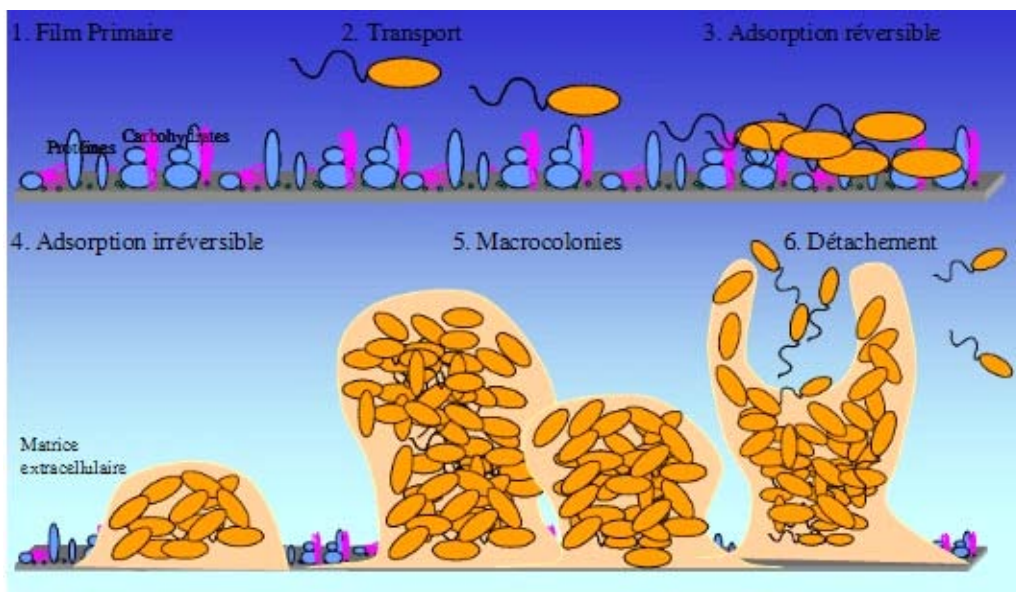


Figure 3. Représentation schématique du processus de formation des biofilms (Characklis, 1990).

1. Film primaire.
2. Transport vers la surface.
3. Adhésion réversible des bactéries.
4. Adhésion irréversible des bactéries.
5. Croissance du biofilm.
6. Détachement du biofilm

1.4.1. Transport vers la surface

La surface est le siège d'une adsorption irréversible de macromolécules telles que des acides humiques, des protéines ou des polysaccharides, conduisant à la formation d'un film conditionnant « conditioning film » (Little et Jacobus, 1984 ; Ichida et Griffiths, 1990).

Les exsudats libérés à la surface racinaire, simulent le film conditionnant des surfaces abiotiques. La mobilité des bactéries et le chimiotactisme offrent des avantages concurrentiels aux bactéries du sol pour coloniser la rhizosphère (Lugtenberg *et al.* 2002).

Le chimiotactisme est important pendant la colonisation et la formation d'un biofilm, à la fois dans l'hôte humain et dans l'environnement (Kirov *et al.*, 2004). C'est aussi l'un des réseaux, utilisés par les bactéries pour répondre aux signaux nutritionnels et de coloniser des niches qui offrent des conditions optimales pour leur croissance (Wadhams et Armitage, 2004).

1.4.2. Adhésion du biofilm

Cette adhésion peut être **réversible** et correspond à l'accumulation de microorganismes sur une surface solide et implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion. L'approche des bactéries de la surface, nécessite différents appendices bactériens, tels que les flagelles et les cils (Gavin *et al.*, 2003).

Dans un premier temps, l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de types Van der Waals). A ce stade, la bactérie peut se « désorber » de la surface et retrouver son état planctonique.

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient **irréversible** grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries, permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe. La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes de l'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm (Spiers *et al.*, 2003 ; Kuchma *et al.*, 2005).

L'adhésion bactérienne sur le support solide met en jeu différents types d'interactions, selon la nature du substrat à coloniser. Elle se différencie en **adhésion non spécifique**, si le support est abiotique la fixation sera médiée par des interactions non spécifiques de type hydrophobes ou encore en **adhésion spécifique**, lorsque l'adhésion se fait sur un tissu vivant, elle met en jeu des mécanismes moléculaires spécifiques type lectine ou adhesine (Dunne, 2002).

- **Facteurs influençant l'adhésion**

Les facteurs influençant l'adhésion bactérienne sont nombreux et de natures diverses. Ce sont les facteurs pouvant faire varier les composantes de l'adhésion (support- bactérie -milieu suspendant).

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une grande influence sur le taux et l'importance de l'attachement (*rugosité de la surface, hydrophobicité de la surface et présence ou non d'un film organique*)

Par ailleurs, les bactéries expriment à leurs surfaces certaines structures hydrophobes qui leurs sont indispensables pour adhérer aux surfaces (Lahaye, 2006). L'hydrophobicité de la surface cellulaire est importante dans l'adhésion parce qu'elles ont tendance à augmenter avec la nature non polaire de l'un ou les deux surfaces impliquées (la surface cellulaire et la surface du substrat).

La plupart des bactéries sont négativement chargées, mais contiennent encore des composants de surface de nature hydrophobe.

- **Le fimbriaie**

Se sont des appendices non flagellaires, autres que ceux impliqués dans le transfert d'acides nucléiques bactérien (nommés pili sexuels). Le fimbriaie (pili communs) joue un rôle dans l'hydrophobicité de la surface cellulaire et l'attachement, probablement pour vaincre la barrière de la répulsion électrostatique initiale qui existe entre la cellule et le substrat (Donlan, 2002).

- **Les flagelles**

Les flagelles sont des appendices extracellulaires constitués de flagelline ancrée sur un corps basal dont la structure dépend du type de paroi du microorganisme. Les flagelles permettent à la bactérie de se mouvoir dans son environnement et donc de se déplacer vers des milieux où les conditions sont plus favorables (Rubio, 2002). Ils jouent apparemment un rôle important dans les premières étapes d'attachement bactérien pour vaincre les forces répulsives associées avec le substrat (Donlan, 2002).

- **Les lipopolysaccharides**

Les lipopolysaccharides (LPS) forment le feuillet externe de l'enveloppe bactérienne des bactéries à Gram négatif et semblent également jouer un rôle particulier dans la formation du biofilm (Filloux et Vallet, 2003).

D'une manière générale, l'attachement des bactéries a lieu préférentiellement sur des surfaces rugueuses, hydrophobes et préalablement recouvertes d'un film protéique. Il est admis que les micro-organismes hydrophobes adhèrent fortement sur des matériaux hydrophobes, alors que les micro-organismes hydrophiles adhèrent plus fortement sur des matériaux hydrophiles (Briandet *et al.*, 2001).

La composition du milieu suspendant peut aussi avoir une influence sur l'adhésion bactérienne. Le pH et la force ionique, en modifiant les composantes électrostatiques de la surface du microorganisme, vont conduire à une adhésion différente des bactéries sur les supports solides (Pembrey *et al.*, 1999 ; Jana *et al.*, 2000).

1.4.3. Croissance du biofilm

Les bactéries ne sont pas dispersées de manière homogène, mais ont tendance à former des microcolonies, dont la différenciation permet l'élaboration du biofilm (O'Toole, 2005).

La phase de différenciation et de maturation du biofilm correspond à l'organisation du biofilm dont la structure est complexe: microcolonies de bactéries reliées entre elles par des canaux aqueux, permettant le transport de l'oxygène, des nutriments, mais aussi des déchets bactériens (Lahaye, 2002). Le biofilm mature se caractérise donc par une stratification des conditions physiologiques des bactéries (Donlan et Costerton, 2002) et l'état métabolique des bactéries dépend ainsi de leur localisation au sein du biofilm.

1.4.4. Dispersion du biofilm

La dernière étape de la formation du biofilm montre que certaines bactéries peuvent se détacher par endroit. Sauer et ses collaborateurs (2002) ont étudié le profil protéomique de différents stades de développement de biofilms de *P. aeruginosa*. Certaines cellules présentent un phénotype proche des cellules planctoniques, permettant de décrire l'évolution d'un biofilm, comme comprenant une phase de dispersion.

1.5. Propriétés des bactéries au sein du biofilm

Ce qui caractérise un biofilm, c'est son importante structuration spatiale qui repose sur des mécanismes de communication cellulaire complexes. Le comportement sessile est un comportement de population et non pas la somme de comportements individuels.

1.5.1. La coopérativité métabolique : Quorum Sensing

La dynamique du biofilm repose sur un comportement collectif. Les bactéries au sein du biofilm communiquent entre elles par de petites molécules signal. Ces échanges d'informations permettent aux individus d'évaluer la densité cellulaire locale, dans le but d'initier une réponse concertée de la population bactérienne. Cette régulation, population dépendante est appelée quorum sensing. Les molécules signal n'ont pas la même origine chimique : pour les bactéries Gram négatif les « Acyl HomoSerine Lactone » (AHL ou AHSL) sont les plus fréquemment rencontrés, tandis que pour les bactéries à Gram positif, ce sont plutôt de petits peptides (Eberl *et al.*, 1996).

1.5.2. La résistance aux biocides

Le mode biofilm favorise l'émergence d'une résistance accrue aux agents antimicrobiens et aux biocides. En effet, les bactéries ayant un mode de vie sessile présentent une résistance aux antibiotiques 100 fois plus importante que leurs homologues planctoniques. Les EPS retardent la pénétration des agents antimicrobiens et agissent comme une barrière contre la diffusion de ces molécules (Davey et O'Toole, 2000).

1.5.3. Le transfert horizontal des gènes ou HGT

Les biofilms constituent également un espace idéal pour l'échange de matériel génétique et le maintien d'un patrimoine génétique important et accessible. Le transfert horizontal de gènes est facilité, puisque les cellules sont maintenues à proximité les unes des autres et peuvent échanger des informations génétiques. En 1999, Hausner et Wuertz ont signalé des taux de conjugaison significativement plus élevés dans les biofilms bactériens que dans les populations planctoniques. La transformation naturelle permet d'améliorer les processus de bioremediation effectués par les biofilms (Perumbakkam, 2006).

Les transferts génétiques horizontaux (HGT) rencontrés au sein des populations microbiennes telluriques, représentent un facteur important de la diversité génétique (Trevors *et al.*, 1996 ; Pietramellara *et al.*, 2002).

1.5.4. La syntrophie

Le syntrophisme est un cas particulier de symbiose dans laquelle deux bactéries

métaboliquement distinctes dépendent l'une de l'autre pour l'utilisation de certains substrats (Kokare et Chakraborty, 2009).

Un biofilm est composé de plusieurs souches, les produits métaboliques d'une souche peuvent servir comme substrat pour une autre et la capacité de s'attacher d'une cellule peut procurer des sites d'attachement à d'autres (Dunne, 2002). Le biofilm fournit un environnement idéal pour la mise en place de relations syntrophiques.

1.6. Composition du biofilm

Le biofilm bactérien est composé de bactéries enrobées dans une matrice extracellulaire. La matrice est composée essentiellement d'eau (97%) et de substances polymériques extracellulaires (SPE) majoritairement constituées de polysaccharides extracellulaires (EPS), mais aussi de protéines, lipides, acides nucléiques et substances humiques (Wingender et *al.*, 1999).

2. Les polysaccharides bactériens

La production des EPS est une propriété générale de microorganismes eucaryotes (espèces fongiques) et procaryotes (bactéries). La plus part des bactéries aussi bien Gram-Négative que Gram- positive, synthétisent plusieurs types de polysaccharides, incluant:

- Les polysaccharides intracellulaires servent généralement de réserves métaboliques.
- Les polysaccharides structuraux, participent à l'architecture de la paroi cellulaire (lipopolysaccharides : LPS, peptidoglycanes, acides teichoïques).
- Les polysaccharides extracellulaires : EPS, offrent notamment un rôle protecteur à la bactérie vis à vis de l'environnement dans lequel elle évolue et contribuent à la virulence des espèces pathogènes.

2.1. Définition

Les polysaccharides extracellulaires sont constitués de la répétition de monomères saccharidiques. Ils peuvent être constitués d'un seul type **homopolysaccharides**, ou de plusieurs types **hétéropolysaccharides**. Des molécules non osidiques peuvent être fixées, comme des groupements acétate, pyruvate, succinate, ou phosphate pour former généralement des polymères anioniques fortement hydratés, de masse moléculaire très élevée, comprise généralement entre 10^5 Da et 10^6 Da.

Les hétéropolysaccharides représentent la très grande majorité des polysaccharides bactériens.

Ils sont composés d'unités répétitives de 2 à 10 sucres de complexité variable et peuvent être ramifiés (épine dorsale) ou linéaires.

Les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés sont le glucose, le galactose et le rhamnose pour les oses neutres, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique pour les oses acides.

2.2. Facteurs influençant la biosynthèse des EPS

2.2.1. Effets des conditions de culture

Lors des fermentations, les conditions optimales de température, de pH, de tension d'oxygène, de rapport C/N, de taux d'azote et de phosphore, de nature du substrat carboné, de vitesse d'agitation et le temps d'incubation représentent des éléments déterminant dans la production d'EPS (Staudt, 2005). C'est ainsi que chez *Burkholderia tropica* par exemple, la vitesse d'agitation (ou taux d'aération), influence grandement le rendement en EPS (Serrato *et al.*, 2006).

2.3. Effets des herbicides sur la production d'EPS bactériens

La sécrétion de polysaccharides a été constatée dans les systèmes fonctionnant sous stress (Avella-Vasquez, 2010). Cette augmentation de la biosynthèse des EPS a été attribuée au rôle protecteur que confèrent les EPS aux bactéries en milieux hostiles. Dudman (1964) a suggéré que la capacité de production d'EPS constitue une réponse directe aux pressions sélectives de l'environnement. Les herbicides étant naturellement non présents dans le sol, constituent un facteur de stress pour la microfaune tellurique. Ahemad (2010 a) a montré une augmentation de la production d'EPS d'une bactérie appartenant au genre *Enterobacter* en présence de quatre herbicides. De la même manière Fusconi et Godinho (2002) soulignent une stimulation de la production des EPS chez différentes espèces bactériennes en milieu contaminé par des polluants.

2.4. Rôles physiologiques des EPS

Plusieurs rôles sont attribués aux EPS bactériens :

2.4.1. Protection des bactéries

- **Contre la dessiccation :** Les EPS assurent à la bactérie une protection contre la dessiccation de par leur caractère fortement hydraté (Schnider-Keel *et al.*, 2001), ce qui augmente le taux de survie des cellules produisant des EPS par rapport aux souches non productrices .
- **Contre les biocides et les xénobiotiques:** La nature visqueuse de la couche d'EPS a un effet important sur les propriétés de diffusion des molécules entrant ou sortant de la cellule et peut permettre de bloquer l'entrée d'ions métalliques toxiques ou les antibiotiques, comme les peptides antimicrobiens cationiques (Campos *et al.*, 2004).
- **Protection des enzymes bactériennes contre le lessivage**

Plusieurs auteurs suggèrent l'implication des EPS dans la prévention du lessivage des enzymes, en les gardant près des cellules qui les produisent, permettant ainsi la dégradation effective du matériau polymère et de particules.

- La rétention des protéines extracellulaires comme la lipase par l'alginate (Flemming et Wingender, 2002).
- La complexation du chrome par les EPS favorise la réduction du chrome en composés moins toxiques et plus solubles en protégeant les réductases constitutives de *Pseudomonas sp* (Merican *et al.*, 2011).
- Lors d'un transfert horizontal des gènes, les acides nucléiques adsorbés à des particules d'argiles sont protégés par les EPS, contre la dégradation par les nucléases (Calvayrac, 2011).

2.4.2. Rôle nutritionnel

Le caractère anionique des EPS leur permet de fixer des cations à la surface des bactéries et de favoriser ainsi l'apport en minéraux essentiels et en nutriments nécessaires à la croissance bactérienne (Costerton *et al.*, 1981).

Dans la rhizosphère, les EPS proviennent essentiellement des bactéries productrices d'EPS ainsi que des exsudats racinaires des plantes. Ces polymères peuvent servir de nutriments pour les bactéries (**rôle trophique**), comme ils peuvent jouer un **rôle signalétique** dans l'établissement d'associations symbiotiques entre les rhizobiums (Gharzouli *et al.*, 2012) mais aussi certaines espèces du genre *Burkholderia* avec les légumineuses (Chen *et al.*, 2006).

2.4.3. Rôle dans l'adhésion

Vandevivere et Kirchman en 1993, ont montré que l'attachement des bactéries sur un support solide (tel que du sable) favorise la synthèse des EPS; celle-ci caractérise l'adhésion irréversible lors de la formation d'un biofilm.

2.4.4. Le maintien de l'architecture du biofilm

Les EPS jouent un rôle déterminant dans l'architecture du biofilm. La production de l'EPS poly- β -1,6-N-acétylglucosamine (PNAG) a été décrite dans les biofilms de *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia cepacia* et *Burkholderia cenocepacia*. Yakandawala (2011) attribue un rôle au PNAG dans le maintien de l'intégrité du biofilm des *Burkholderia*.

Le renforcement de la structure du biofilm est crucial pour la stabilité et la poursuite des interactions synergiques fondées sur la proximité spatiale des divers organismes du biofilm, comme la syntrophie (Flemming *et al.*, 2007).

2.4.5. Structuration du sol et rétention d'eau

Les biofilms se développant sur les particules d'argiles contribuent fortement à l'agrégation du sol en augmentant la porosité de celui-ci, offrant ainsi une meilleure circulation de l'eau et de l'air (Kaci *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'inoculation d'une bactérie productrice d'EPS dans la rhizosphère du blé dur entraînait une augmentation de la masse de racines ainsi que la masse de sol adhérent aux racines (Kaci *et al.*, 2005). De même que Blanchart et ses collaborateurs (2000) ont montré que la sécrétion d'EPS par *Burkholderia caribensis*, permet une cohésion parfaite entre les racines de certaines plantes (blé, tournesol) et le sol.

Les EPS, qu'ils soient d'origine végétale ou bactérienne contribuent à l'amélioration de la rétention d'eau des sols. L'amendement d'un sol argileux avec des EPS produits par une souche de *Rhizobium* (KYGT207), a permis une amélioration de la rétention d'eau, conséquence d'une augmentation du volume poral, suite à une réorganisation structurale du sol (Kaci et Heulin, 2008).

3. Les herbicides

Les herbicides sont pour la plus part des xénobiotiques. Ils ne se trouvent donc pas, de façon naturelle dans les écosystèmes. Largement utilisés en agriculture conventionnelle, les herbicides améliorent la productivité des cultures en contrôlant les mauvaises herbes.

En Algérie, l'usage des produits phytosanitaires se répand de plus en plus avec le développement de l'agriculture. Environ 400 produits phytosanitaires sont homologués dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (Bouziani, 2007).

3.1. Définition

Les herbicides sont des substances utilisées pour éliminer des plantes indésirables (Cork et Krueger, 1992). Ils sont appelés aussi désherbants.

L'application des herbicides est régie par deux impératifs :

- Leurs modes d'action vis-à-vis de la plante à éliminer.
- Leurs types de sélectivité à l'égard de la culture à protéger.

3.2. Classification des herbicides

La classification des herbicides ne repose généralement pas sur leur nature chimique, trop diversifiée, ni sur leur spécificité, qui dépend souvent de la dose d'emploi et du type d'application. Par contre, il est possible de se baser sur la voie de pénétration et leur mode d'action (Tableau I).

Tableau I. Classification des herbicides utilisés (<http://agroecologie.cirad.fr>).

	Herbicides à pénétration racinaire	Herbicides à pénétration foliaire
Actions sur la photosynthèse	- Triazines : amétryne, atrazine, prométryne, terbutylazine, etc... - Diazines – uraciles : bromacile - Triazinones : hécazinone, métribuzine - Urées substituées : diuron, chlortoluron, etc...	- Bipyridyles : paraquat, diquat, - Diazines : bentazone, pyridate, etc
Action sur la division cellulaire	- Toluidines : pendiméthaline, trifluraline, etc...	- Carbamates : asulame.
Action sur l'élongation cellulaire	- Chloroacétamides : Alachlore, métazachlore, métolachlor, etc...	- Aryloacides : 2,4-D, 2,4-MCPA, dichlorprop (2,4-DP), mécoprop (MCP) - Dérivés picoliniques : triclopyr, piclorame.
Inhibition de la synthèse des caroténoïdes	Pyridazinones : Norflurazon acides benzoïques : isoxaflutole, isoxazolidinones : Clomazone.	
Action sur la bio-synthèse		- Acides aminés : glufosinate-ammonium, glyphosate, sulfosate - Lipides : graminicides (fluazifop-P-butyl, haloxyfop-R, etc...).

3.3. Les triazines : définition et mode d'action

Ce groupe est constitué d'une quinzaine de composés répartis en quatre ensembles. Les dérivés de la triazine symétrique qui constituent trois ensembles:

- Les chloro-diamino-S-triazines dont la simazine, l'atrazine et la propazine.
- Les méthoxy-diamino-S-triazines dont le terbuméton, simétone, atratone et prometone.
- Les méthylthio-S-triazines dont la prométryne, la simétryne ou amétryne.
- Les dérivés de la triazine non symétrique représentés par la metribuzine (Tissut et Severin, 1984)

Les triazines sont essentiellement utilisées en pré-levée de la culture ou des « mauvaises herbes », mais elles sont aussi actives sur de très jeunes plantes.

Les herbicides inhibiteurs du PS II agissent en s'incorporant au système de transfert d'électrons situé dans la membrane des thylakoïdes. Ils se comportent comme de véritables barrages du courant d'électrons au niveau de la plastoquinone (Tissut et Severin, 1984). L'inhibition du PS II entraîne dans un premier temps l'arrêt du dégagement d'oxygène et de la fixation du CO₂. Les chlorophylles excitées permettent la production d'oxygène singulet, forme très réactive. L'oxygène singulet va rester actif et entraînera la destruction oxydative des constituants du thylakoïde, dont les pigments.

La prométryne, substance phytosanitaire de formule chimique C₁₀H₁₉SN₅, à usage d'herbicide de certaines graminées et de certaines dicotylédones et utilisable dans les cultures de tournesol, de céleri, de poireau, de pois, de blé, de carottes et de lentilles.

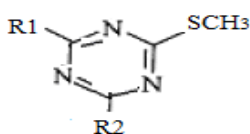


Figure 4. Formule générale des S. triazines.

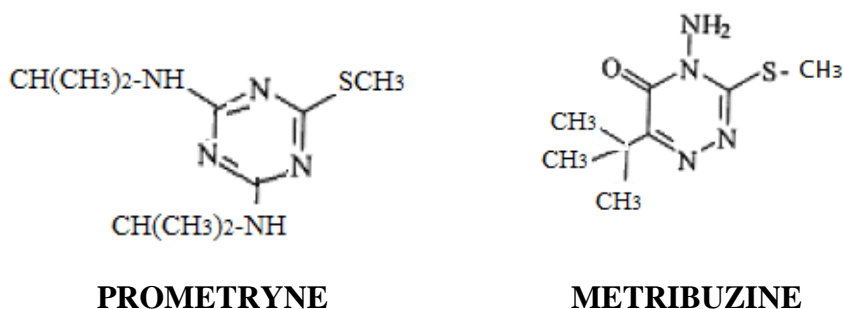


Figure 5. Structure de quelques herbicides de la famille des triazines.

3.4. Les Pyridazinones: définition et mode d'action

C'est une famille qui regroupe un nombre important d'herbicides qui affectent plusieurs fonctions du métabolisme cellulaire. Parmi ces herbicides nous citons : le norflurazon, le pyrazon, le SAN 9774 et le metflurazon.

Le norflurazon est un inhibiteur de la phytoène desaturase, enzyme clef dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Eder, 1979).

Le norflurazon exerce également un effet sur le contenu et la composition des lipides extra et intra-chloroplastiques, en particulier les glycolipides (Abrous *et al.*, 1998 ; Di Baccio *et al.*, 2002).

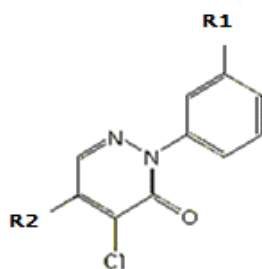


Figure 6. Formule générale des pyridazinones.

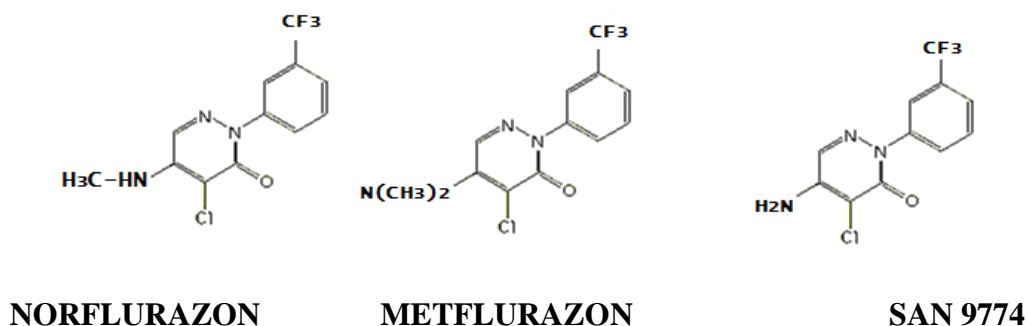


Figure 7. Structure de quelques herbicides de la famille des pyridazinones.

3.5. Sélectivité des herbicides

Un produit est dit sélectif pour une culture donnée, lorsqu'il n'exerce pas d'action dépressive sur cette culture à la dose normale d'utilisation. Certaines plantes supportent des doses

d'herbicides que d'autres ne supportent pas, même si leur état sanitaire est comparable. Il n'existe aucun herbicide qui soit totalement inoffensif pour une culture donnée, quelle qu'elle soit. La sélectivité est donc principalement une question de dose.

- **La sélectivité est dite physiologique** : la plante peut elle-même détoxifier le produit en le métabolisant en dérivés inoffensifs. Cette sélectivité est très fidèle.
- **La sélectivité physique** : due à une différence d'anatomie, entre les mauvaises herbes et la plante cultivée. Cette sélectivité est assez fidèle.
- **La sélectivité de position** : celle-ci ne concerne que les herbicides à pénétration racinaire. Cette sélectivité est très aléatoire car elle varie considérablement avec les facteurs extérieurs comme la nature du sol, le régime des précipitations, etc.

3.6. Devenir des herbicides dans le sol

Au moment de son application, deux processus fondamentaux vont contribuer à la disparition de la substance mère de l'herbicide, à partir du point d'application : La dispersion et la dégradation (Fig. 8).

3.6.1. Dissipation par dispersion

Lors du traitement, le produit qui parvient au contact du sol est susceptible d'être soumis à des mouvements dont la mise en œuvre et l'ampleur vont dépendre de l'état du produit (adsorbé, libre...), de ses propriétés physiques (tension de vapeur, solubilité dans l'eau ...) et des conditions climatiques (température, humidité du sol, mouvements de l'air, pluviosité...).

Ainsi, le produit peut:

- migrer dans la solution du sol par diffusion,
- passer dans l'air par volatilisation,
- être entraîné verticalement par lixiviation ou lessivage,
- être entraîné latéralement par ruissèlement sous l'action des excédants d'eau.

La volatilisation et le transfert vers les profondeurs du sol ont une action néfaste tant du point de vue agronomique (perte de produit hors de l'espace traité), qu'environnemental (contamination de l'air, de l'eau et de surfaces non soumises au traitement).

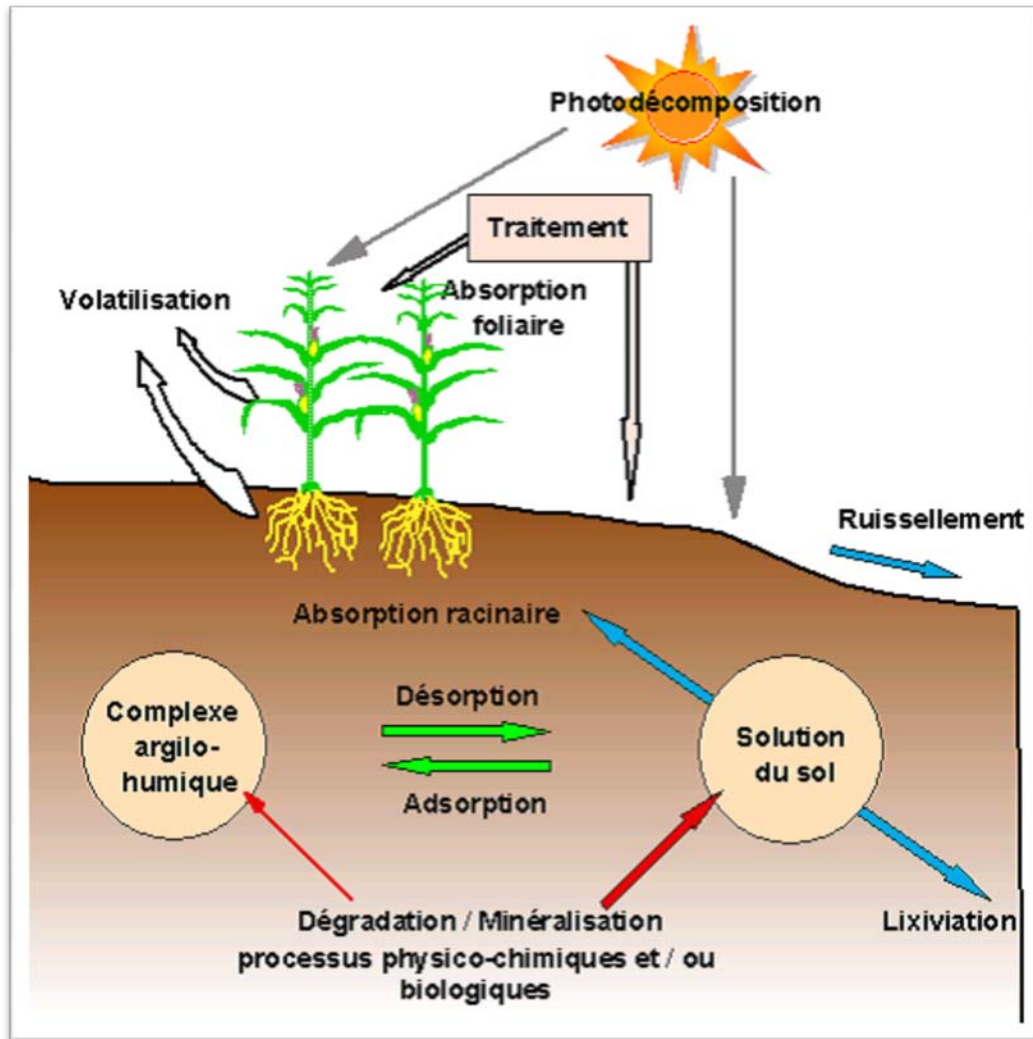


Figure 8. Processus de dispersion et de dégradation des pesticides (Kersante, 2003).

3.6.2. Dissipation par transformation de la matière active

Lors du traitement, une partie du produit entre en contact avec la surface des constituants du sol, tandis qu'une autre partie peut rester dans la solution du sol. En fonction de cette répartition, de la nature des surfaces mises en jeu, de l'activité biologique et des propriétés physico-chimiques, diverses réactions chimiques et/ou biochimiques peuvent intervenir et conduire à la transformation, voire à la minéralisation du pesticide.

- **Dégradation abiotique**

Ce type de dégradation, d'origine chimique et/ou photochimique est le plus souvent considéré comme mineur. Cependant nombreuses sont les revues bibliographiques soulignant l'importance de ces voies de dégradation (Fusi, 1991).

La photodécomposition est un processus de dégradation purement abiotique qui n'est possible que lorsque la molécule est capable d'absorber le rayonnement UV ($\lambda > 290\text{nm}$) (Scheunert, 1992).

La dégradation abiotique peut intervenir dans la solution du sol où l'hydrolyse acide ou basique est la réaction la plus fréquente.

- **Dégradation biotique ou biologique**

Les réactions biotiques correspondent aux transformations se produisant dans les organismes vivants du sol ou catalysées par des enzymes à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules (Scheunert, 1992). Ces transformations consistent en des réactions d'hydrolyse, d'oxydation, de réduction et de déshalogénéation, en aérobiose comme en anaérobiose.

Les altérations biotiques différencient deux situations :

- **la minéralisation** : le pesticide est totalement dégradé en produits inorganiques de faible poids moléculaire (CO_2 , H_2O , Cl^- ...). Ainsi le pesticide sert de source de carbone et d'énergie aux bactéries minéralisantes.
- Le **cométabolisme** : le pesticide est partiellement dégradé en métabolites intermédiaires. Cette dégradation est découplée du phénomène de croissance de ces espèces dégradantes, et leur maintien pré-suppose la présence d'une source d'énergie et de carbone dans le milieu (Holtz, 2008).

La biodégradation est la voie prépondérante de transformation et de dissipation des pesticides dans le sol (Bazot et Lebeau, 2009), et constitue un concept de base pour la bioremédiation (Soulas, 2004).

Les activités microbiennes responsables de la biodégradation dépendent de facteurs abiotiques comme le pH, l'humidité, la teneur en matière organique, les précipitations et les pratiques agricoles et sont le fait de microorganismes comme les actinomycètes, les bactéries ou encore les champignons (El-Sebaï *et al.*, 2010).

La dégradation du norflurazon est essentiellement biologique, réalisée par les bactéries et les champignons du sol. La production du métabolite desméthyl-norflurazon a été observée, dans un sol, expérimentalement au laboratoire, après une incubation de quatre mois à une température de 20 à 35 °C. Ce même sol incubé à une température de 5°C n'a montré aucune formation de desméthyl-norflurazon, même après une période d'incubation de 7 mois (Savin et Amador, 1998).

La minéralisation du norflurazon est plus importante à la surface du sol où prédomine la dégradation fongique. Par contre au niveau de l'horizon B, où la présence bactérienne est plus importante le taux de minéralisation et de formation de métabolites est moindre.

Les S-triazines subissent dans le sol une large biodégradation assurée par les genres : *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Chelatobacter*, *Agrobacterium*, *Rhodococcus*, *Sténotrophomonas*, *Pseudo-aminobacter* et *Nocardia* (Rousseaux *et al.*, 2001 ; Hernandez *et al.*, 2008).

La prométryne est métabolisée par certains bacilles Gram négatif qui s'en servent comme source de soufre pour leurs croissances (Alasdair *et al.*, 1982).

3.7. Rôle de la rhizosphère dans la dissipation biologique des polluants

Des études ont montré que la dissipation biologique des polluants organiques est plus rapide dans la rhizosphère que dans un sol nu (Buyanovsky *et al.*, 1995). De plus, ils ont établi la capacité des plantes à absorber et à métaboliser toute une gamme de polluants organiques néfastes pour l'environnement, c'est la phytoremédiation *in-planta*. Les plantes libèrent des exsudats racinaires qui accroissent la bioremédiation microbienne dite phytoremédiation *ex-planta* ou rhizoremédiation.

C'est ainsi que les réactions des bactéries aux herbicides sont très variables et dépendent des performances génétiques des bactéries, de la dose de l'herbicide, de la nature chimique de la molécule mère active du xénobiotique et du type de sols (Yentuni *et al.*, 1986 ; Pal *et al.*, 2006).

Cependant, la plupart des études ont montré que l'utilisation des herbicides à des taux recommandés n'affecte pas les communautés microbiennes du sol (Wardle et Parkinson, 1990 ; Busse *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Liphadzi *et al.*, 2005).

Les herbicides peuvent affecter les communautés bactériennes à 3 niveaux :

- **La biomasse bactérienne** : en fonction de leurs doses, les herbicides peuvent suivant l'espèce bactérienne éliminer les bactéries sensibles, diminuer la taille des communautés bactériennes tolérantes ou augmenter la biomasse des bactéries métabolisant l'herbicide (Ayansina *et al.*, 2010).
- **la diversité** : la diversité microbienne s'est avéré être un enjeu important en raison de l'importance des micro-organismes dans la production d'énergie et la transformation de la matière organique (Hunter-Cevera 1998). Les herbicides peuvent agir en

réduisant la diversité bactérienne (Torsvik *et al.*, 1996 ; El-Fantroussi *et al.*, 1999 Borneman, 2004).

- **Les activités bactériennes** : Les herbicides peuvent agir en altérant certaines activités bactériennes très importantes comme la nodulation. Le norflurazon et la prométryne agissent en inhibant la nodulation chez *Bradyrhizobium* (Karaali, 2012). Cet effet a été également signalé en présence de l'isoproturon et la metribuzine. L'intensification d'activités cataboliques a été signalée chez les bactéries en présence d'herbicides comme la respiration qui devient très accélérée (Ouattara, 2010), ou encore l'inhibition de certaines activités enzymatique comme l'activité phosphatase (Ismail *et al.*, 1995) .

4. Le genre *Burkholderia*

Burkholderia est un genre de bactéries de l'environnement. Il est omniprésent dans les écosystèmes naturels, comme la rhizosphère des plantes (Coenye et Vandamme, 2003) et dans l'eau (Vermis *et al.*, 2003). Un facteur important qui contribue à la grande polyvalence de ces bactéries est leur capacité à former des consortiums de surface associées ou biofilms, sur des surfaces diverses.

Parce que les espèces de *Burkholderia* partagent des caractéristiques en commun avec les membres du genre *Pseudomonas*, elles ont été initialement classées parmi les membres de ce genre. Alors que les deux genres sont distincts et séparés sur la base de leur séquence ARNr 16S et la composition en acides gras de leur membranes (Kerstens *et al.*, 1996).

Ce genre a été décrit pour la première fois par Burkholder en 1950, mais en 1992, il était reclassé dans le genre *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992 ; Tràn Van *et al.*, 2000).

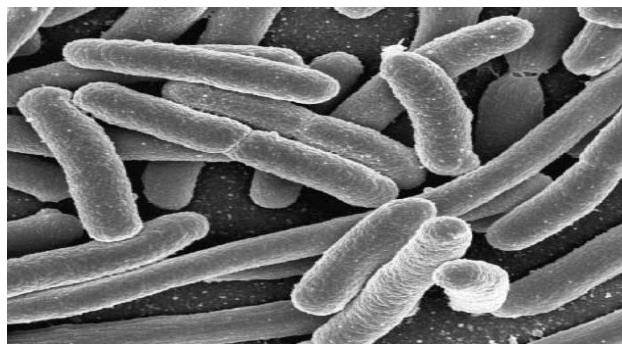


Figure 9. Cellules de *Burkholderia* observées au microscope électronique à balayage.

(http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_2000/Burkholderia.html) Gr X15 000.

De nos jours le genre *Burkholderia* suscite un intérêt croissant. Ce genre bactérien a été originellement connu pour ses espèces pathogènes de l'homme, des animaux ou des plantes.

A ce jour, il apparaît néanmoins que de nombreuses espèces de *Burkholderia* ne sont pas pathogènes et peuvent même être bénéfiques pour leur hôte végétal.

Les *Burkholderia* sont des espèces à génomes « plastiques » possédant de nombreuses fonctions accessoires à transmission horizontale, d'intérêts majeurs en terme d'application écologique notamment en bioremediation (Chen *et al.*, 2004). C'est ainsi qu'une bioaugmentation avec la souche *Burkholderia fungorum* souche LB 400 a fortement augmenté le taux de dégradation des PCB (poly-chloro diphényles) (Ponce *et al.*, 2011).

Actuellement, il existe plus de 30 espèces appartenant au genre *Burkholderia*.

Matériel et méthodes

1. Présentation de la souche

Nous avons utilisé dans le cadre de cette étude une souche de *Burkholderia fungorum* de la collection du laboratoire de biologie des sols. Cette bactérie a été isolée du sol rhizosphérique en 2008 par Djebbara, conservée dans du glycérol à 20% à une température de -70°C, et identifiée par caractérisation moléculaire comme appartenant à l'espèce *B.fungorum* souche Bf01.

Cette souche bactérienne appartient : (Yabuuchi *et al.*, 1992)

Domaine	<i>Bacteria</i> ou des <i>Eubacteria</i> .
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Betaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Burkholderiales</i>
Famille	<i>Burkholderiaceae</i>
Genre	<i>Burkholderia</i>
Espèce	<i>Bulkholderia fungorum</i>

2. Description morphologique

La description des colonies bactériennes est effectuée sur une culture de 48h sur gélose nutritive. L'ensemencement est réalisé à partir d'une culture de *B. fungorum* souche Bf 01 sur milieu liquide (TSB) et sous agitation pendant 24h à température ambiante.

La description des cellules bactériennes est effectuée au microscope photonique, sur une suspension de *B. fungorum* préparée à partir d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive. Les cellules bactériennes sont colorées au bleu de méthylène.

3. Effet des herbicides sur la cinétique de la croissance bactérienne, la production d'EPS et la production du biofilm de *B. fungorum* souche Bf01.

Pour l'étude de ces paramètres, nous avons réalisé des dispositifs expérimentaux qui comprennent : Les herbicides, les milieux de culture et l'inoculum.

3.1. Les herbicides

Les herbicides utilisés sont le norflurazon et la prométryne (Fig. 10), les principales caractéristiques de ces deux herbicides sont reportés sur le tableau II.

Tableau II. Principales caractéristiques du norflurazon et de la prométryne
(Origine :Syngenta).

Herbicide Caractéristiques	Norflurazon	Prométryne
Nom commercial	Zorial	Gesagard 480SC
Famille	Pyridazinone	Triazine
Formule chimique	$C_{12}H_9C_1F_3N_3O$	$C_{10}H_{19}N_5S$
Formulation	Poudre beige	Liquide blanc
Poids moléculaire	303.7g/mole	241.37g/mole
Demi-vie	environ 4 mois	de 1 à 3 mois

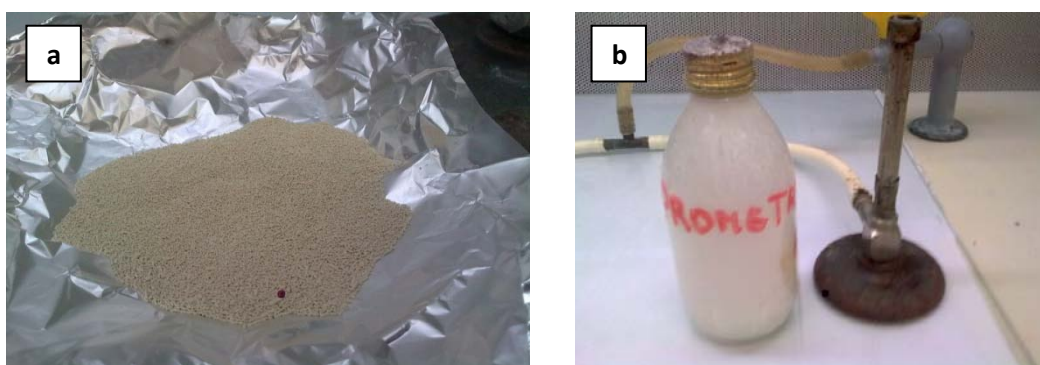


Figure 10. Présentation des herbicides utilisés.

- (a) le norflurazon ;
- (b) la prométryne.

3.1.1. Préparation des différentes concentrations en herbicides

Les concentrations en herbicides utilisées sont $10^{-4}M$, $10^{-5} M$ et $10^{-6}M$. Toutes les expérimentations impliquant les deux herbicides (norflurazon et prométryne) ont été réalisées avec ces 3 concentrations. Un témoin sans herbicide est préparé pour chacune des séries.

Ces concentrations sont préparées à partir d'une solution mère de chaque herbicide, puis des séries de dilutions avec de l'eau distillée stérile sont effectuées pour l'obtention des différentes doses ($10^{-4} M$, $10^{-5} M$ et $10^{-6} M$).

3.1.2. Stérilisation des herbicides

Les herbicides sont stérilisés à l'aide de filtres de 0.22 μ m de diamètre, sous hotte microbiologique. Les flacons contenant les herbicides sont recouverts par des caches noirs pour éviter l'altération des herbicides par photolyse (Fig. 11).



Figure 11. Stérilisation des herbicides par microfiltration (0.22 μ m) et préservation contre la photolyse.

3.2. Les milieux de culture

Au cours de notre expérimentation, nous avons utilisé le milieu TYmannitol à deux niveaux de concentrations en mannitol 10g/L et 30g/L (annexe II).

Le choix de ce milieu ressort d'un screening effectué avec 3 bases de milieux TY, YE et M63 (Annexes II) et 8 sucres d'une concentration de 30g/L, pour chaque base de milieu étudiée.

Pour tester l'effet des herbicides sur les paramètres de croissance nous avons utilisé un milieu de prolifération cellulaire : le TSB dilué au 1/10 (Annexe II).

3.3. Production de l'inoculum

Des colonies de *B. fungorum* souche Bf01 cultivées sur milieu TY mannitol agar à 30°C sont transférées après 24 h de culture dans un Erlenmayer de 250mL contenant 100mL de milieu TY mannitol liquide stérile, et incubées pendant 24h sous agitation (100 rpm). Les cellules sont recueillies par centrifugation (4000 trs/min, 30 min), puis lavées 3 fois avec de l'eau physiologique stérile. Elles sont remises en suspension, homogénéisées et calibrées au spectrophotomètre.

4. Effets des herbicides sur la cinétique de croissance de *B. fungorum* souche Bf01

La cinétique de croissance est réalisée parallèlement à la cinétique de production d'EPS, afin de calculer des rendements de production d'exopolysaccharides par la bactérie *B. fungorum* souche Bf01.

La croissance bactérienne est évaluée par 2 méthodes différentes :

- la mesure de la biomasse protéique cellulaire.
- spectrophotométrie.

4.3. Dosage des protéines cellulaires

La croissance qui peut être assimilée à l'accroissement de la biomasse protéique cellulaire est évaluée par la mesure de la teneur en protéines d'une culture bactérienne obtenue sur milieu TY mannitol incubée à 30°C, après centrifugation des cultures à 4000 trs/min pendant 30 minutes. La technique préconisée est celle de Bradford (1976).

La méthode de Bradford est basée sur l'utilisation du bleu de Coomassie G250 qui renferme les deux formes de ce colorant : la forme bleue et la forme rouge. Cette dernière est convertie en forme bleue lorsqu'elle se fixe aux protéines. Cette conversion s'accompagne par une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel dans le jaune (couleur complémentaire du bleu) à $\lambda=595$ nm.

Des aliquotes de cultures sont centrifugées à 4000 trs/min pendant 30 minutes. A 0,2mL d'échantillon (culot cellulaire), nous ajoutons un volume égal de NaOH 2N. Le culot est ensuite remis en suspension par agitation énergique (vortex). La suspension est ensuite portée au bain marie à 100°C, pendant 30 min.

A 0,1 mL d'échantillon, 1mL de réactif au bleu de Coomassie G250 est ajouté et le mélange réactionnel est ensuite homogénéisé (vortex), puis laissé reposer pendant 3 minutes.

La lecture de la DO est effectuée à 595nm

La teneur des culots cellulaires en protéines est déterminée à l'aide d'une droite de corrélation. Les résultats sont exprimés en milligrammes de protéines par millilitre de culture.

La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) à $1g.l^{-1}$. Une gamme de concentrations décroissantes est réalisée (0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5- 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 et $1mg.ml^{-1}$) (Annexe I).

5. Effets des herbicides sur la cinétique de production des EPS

Il s'agit de suivre l'évolution de la production des EPS par *B. fungorum* souche Bf01 dans un intervalle de temps qui s'étend de 24h à 120h. Nous avons réalisé cette cinétique avec le milieu TY mannitol, à deux niveaux de concentrations en mannitol 10g/L et 30g/L.

Dans des flacons de 250 mL, 50mL de milieu TY mannitol doublement concentré sont additionnés de 37,5mL d'eau distillée pour les échantillons et 50mL d'eau distillée pour les Témoins non traités aux herbicides. Ces dispositifs sont ensuite stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20min.

Après refroidissement des milieux, 12,5mL d'herbicides filtrés sont rajoutés dans leurs flacons correspondants sous hotte microbiologique. Les volumes de tous les flacons sont ainsi ramenés à 100mL.

Chaque Erlen Meyer est ensuite inoculé avec 1ml de la suspension bactérienne précédemment préparée et calibrée et qui correspond à une concentration de $2 \cdot 10^7$ bactéries par mL.

Ces dispositifs expérimentaux sont ensuite placés dans une étuve à 30°C sous agitation (90 rpm), pendant 05 jours.

Toutes les 24h, un dosage des EPS ainsi qu'une détermination de la biomasse cellulaire sont réalisés.

5.1 Dosage des sucres totaux à l'anthrone sulfurique

Pour l'évaluation de la production des EPS, nous avons utilisé la méthode de dosage à l'anthrone sulfurique (Hansen et Phillips, 1984).

Généralement, les EPS sont constitués essentiellement de pentoses et d'hexoses. Il suffit de doser les pentoses et les hexoses qu'ils libèrent après hydrolyse pour évaluer de manière fidèle leur abondance.

L'acide sulfurique présent dans le réactif à l'anthrone provoque à chaud l'hydrolyse des EPS en déshydratant les monosaccharides.

Les pentoses sont transformés en furfurals et les hexoses en hydroxy-méthyle furfurals. Ces derniers réagissent avec l'anthranol, forme tautomère de l'anthrone, en donnant une coloration verdâtre d'autant plus intense que le milieu est riche en sucres (pentoses et hexoses).

A des intervalles réguliers (24h, 48h, 72h, 96 h et 120h), des aliquotes de 5 mL sont prélevées, centrifugées à 4000 trs/min pendant 30 min. Ainsi les EPS totaux se séparent des cellules et se retrouvent dans le surnageant.

Dans des tubes à essai placés dans de la glace, le dosage est réalisé sur 1 ml de surnageant, auquel sont rajoutés 2 ml de réactif à l'antrone sulfurique. Les tubes sont agités, puis placés au bain marie bouillant (100°C) pendant 7 min. Après refroidissement, les densités optiques sont relevées à une longueur d'ondes $\lambda=630$ nm.

Le spectrophotomètre est préalablement étalonné grâce à un « blanc » préparé à partir de 1 ml d'eau distillée et 2 ml de réactif. La teneur des surnageants en sucres totaux est déterminée par comparaison avec une droite de corrélation (courbe étalon) DO à 630nm=f (glucose) (annexes I). Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme d'équivalent glucose par ml de milieu.

6. Effets des herbicides sur la cinétique de formation du biofilm chez *B. fungorum*

Les cinétiques de formation du biofilm de *B. fungorum* souche Bf01 ont été réalisées sur un support « verre », selon la méthode standard de coloration au cristal violet (Djordjevic *et al.*, 2002 ; Spiers *et al.*, 2003). Il s'agit d'une méthode indirecte permettant l'estimation de la production de biofilm sur différents types de substrats (Djordjevic *et al.*, 2002 ; Burton *et al.*, 2007). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci.

Des tubes à essai contenant 2,5mL de milieu doublement concentré sont stérilisés par autoclavage (120°C, pendant 20 min.). Après refroidissement, les échantillons sont traités aux différentes concentrations en herbicides, les tubes témoins et les échantillons sont ramenés à un volume final de 5ml avec de l'EDS.

En conditions d'asepsie strictes, les tubes sont inoculés avec la suspension bactérienne précédemment préparée, à raison de 0.5mL par tube, puis incubés à 30°C, en conditions statiques, pendant une période allant de 24 à 168h.

A l'issue de chaque période d'incubation, les tubes sont soigneusement vidés du bouillon de culture, et les parois sont soigneusement lavées à l'eau physiologique stérile par des rinçages successifs, pour les débarrasser des cellules planctoniques non adhérentes aux parois.

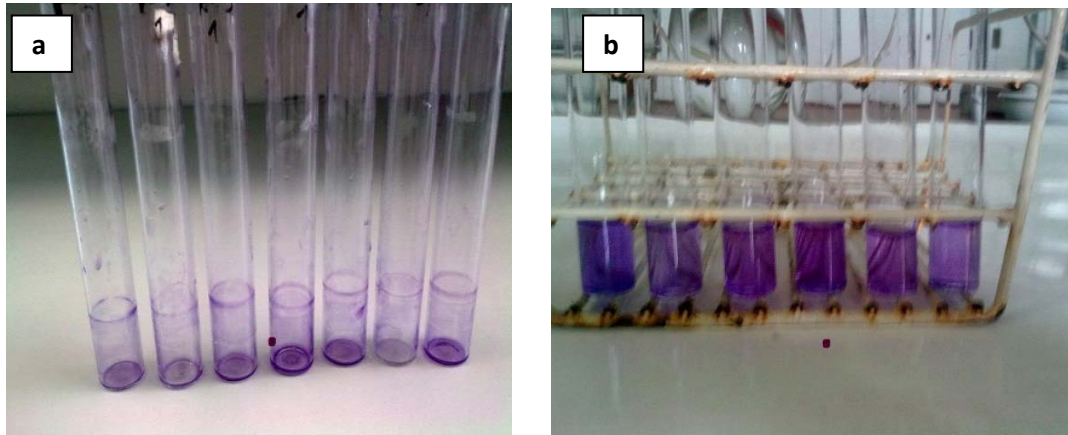


Figure 12. Dispositif expérimental permettant l'évaluation du biofilm (méthode au cristal violet)

a : Biofilm coloré au cristal violet.

b: Biofilm solubilisé par l'éthanol.

6.1. Quantification du biofilm

La biomasse fixée sur les parois, représente le biofilm formé (Fig.12 a). La quantification du biofilm est effectuée par coloration par le cristal violet à 1%, après un contact de 45min. L'excès de colorant est éliminé par un lavage abondant des parois du tube à l'eau distillée stérile. Les tubes sont ensuite égouttés et mis à sécher à l'air libre.

Le cristal violet fixé sur les parois du tube est solubilisé en utilisant une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25) (Fig. 12b), puis l'absorbance mesurée à 570 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans le but de chercher une corrélation entre la production d'EPS et la production du biofilm, nous avons testé la capacité de *B. fungorum* souche Bf01 à former le biofilm sur milieu YESA sur ce milieu, la bactérie présente une faible croissance traduite par de très petites colonies non mucoïde renseignant sur une très faible production d'EPS voire nulle.

7. Effets des herbicides sur la cinétique de production des cellules planctoniques

A l'issue de chaque période d'incubation, les cellules planctoniques récupérées des tubes ayant servi à l'étude des biofilms, sont centrifugées à 4000trs/min pendant 30 min, puis lavées à l'eau physiologique 3 fois. Elles sont ensuite remises en suspension pour une lecture des densités optique au spectrophotomètre, à une longueur d'onde $\lambda=600\text{nm}$.

8. Effets des herbicides sur les paramètres de croissance de *B. fungorum*

Nous avons utilisé un milieu favorisant la prolifération cellulaire qui est le TSB dilué au 1/10. 50ml de milieu TSB dilué au 1/5 sont placés dans des flacons d'une contenance de 250 ml. Après stérilisation par autoclavage, les échantillons sont traités par les différentes concentrations en herbicides testées (12.5 ml de chaque herbicide), les témoins non traités et les échantillons sont ramenés à un volume final de 100ml par ajout d'eau distillée stérile.

Chaque flacon est inoculé avec 2ml de l'inoculum précédemment préparé, puis mis sous agitation à 100rpm. Chaque heure, 1ml de chaque échantillon est prélevé, centrifugé 4000t/mn pendant 30 mn, lavé 3 fois au KCl (9‰), remis en suspension dans du KCl stérile. La DO est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600nm contre un blanc constitué uniquement d'eau physiologique stérile.

Les calculs des taux de croissance et des temps de génération sont effectués à partir des courbes semi logarithmiques $DO_{600nm}=f(t)$.

8.1. Evaluation du potentiel PGPR de *B. fungorum* souche B01 sur le blé dur (*Triticum durum* L.) var.MBB

Le norflurazon et la prométryne sont deux herbicides qui affectent la croissance des plantes par le biais des dommages qu'ils causent au niveau d'une fonction vitale pour la plante : la photosynthèse.

Afin d'évaluer l'impact de l'inoculation de la souche bactérienne sur la culture du blé dur (*Triticum durum* L.) var M BB, en particulier sur la croissance, nous avons mis en place des cultures de blé dur en pots et en conditions hydroponiques,

Les dispositifs expérimentaux comprennent : le sol, les graines du blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB, l'inoculum, les herbicides et un milieu minéral pour la culture hydroponique.

Dans un premier temps nous avons évalué l'effet du norflurazon et de la prométryne sur les paramètres de croissance : longueur racinaire, longueur aérienne, biomasse sèche racinaire, biomasse sèche aérienne, ratio biomasse sèche racinaire/ biomasse sèche aérienne ou rapport PR/PA .Dans un deuxième temps nous avons testé l'effet croisé de l'inoculation des plantules de blé dur (*Triticum durum* L.) variété Mohamed Belbachir traités aux différentes concentrations en norflurazon et de prométryne, définies précédemment.

8.1.1. Le sol

Le sol utilisé est un sol brun à texture argileuse provenant de l'ITGC de Oued Smar. Ses principales caractéristiques sont représentées dans le Tableau III.

Tableau III. Principales caractéristiques pédologiques du sol de la station agronomique de l'ITGC d'Oued de Smar (Karaali, 2012).

Analyse	Sol de l'ITGC
Texture	Argileuse
Structure	Massive polyédrique
pH (eau)	7.7
Carbone(%)	0.9
Matière organique (%)	1.5
Azote total (%)	0.05
Rapport C/N	18

8.1.2. Préparation du sol

Le sol est séché à l'air libre pendant une semaine, débarrassé de tous les débris et cailloux. Il est ensuite tamisé (2mm mailles rondes), puis placé à l'intérieur des pots.

8.1.3. La plante

La plante utilisée est le blé dur (*Triticum durum*) variété Mohamed Belbachir, dont les semences, ont été fournies par l'ITGC de Oued Smar.

Systématique du blé dur (*Triticum durum* L.) D'après la classification APG III (2009).

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous règne :	<i>Tracheobionte</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Liliopsida</i>
Sous classe :	<i>Commelinidae</i>
Ordre :	<i>Poales</i>
Famille :	<i>Poaceae</i>
Sous famille :	<i>Pooideae</i>
Tribu :	<i>Triticeae</i>

Genre : *Triticum*

Espèce : *Triticum durum* L.

L'espèce *Triticum durum* est un hybride obtenu après croisement entre *Triticum monococcum* et *Agilops speltoide*.

8.1.4. Détermination de l'histogramme de fréquences des poids des graines

Nous avons utilisé le poids des graines pour caractériser les graines de blé, par la suite, nous avons dressé un histogramme de fréquence des poids de graines. Les graines utilisées dans cette étude appartiennent à la classe modale 38-40mg (Fig. 13). Cette étape du travail est importante pour éviter la variabilité liée au poids des graines.

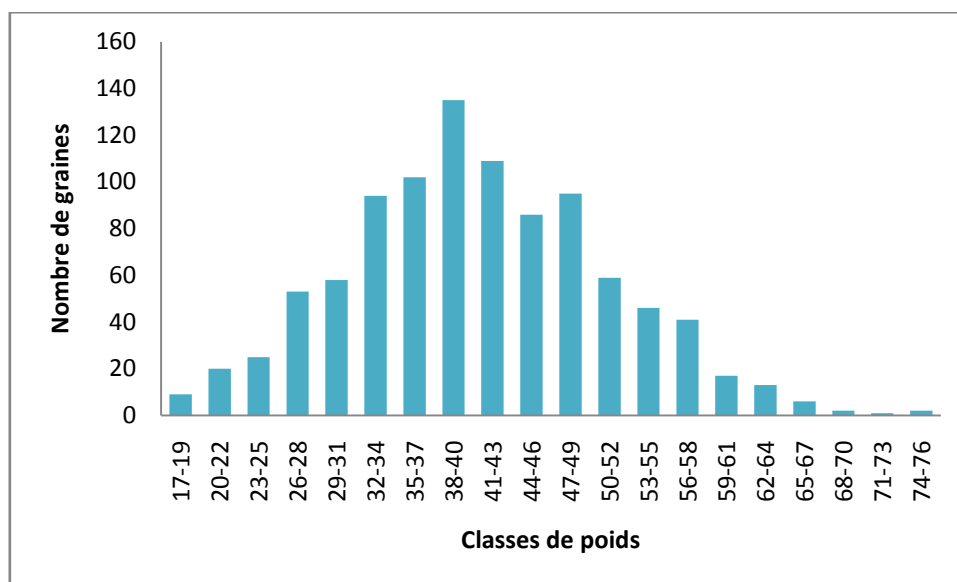


Figure 13. Histogramme de fréquences des poids des graines de blé dur (*Triticum durum* L.) variété Mohamed Belbachir .

8.1.5. Stérilisation des graines

Les graines de blé dur sont stérilisées par passage dans une solution d'hypochlorite de calcium (2%) additionnée de 1mL d'éthanol pendant 20mn avec agitation sous un vide partiel pour permettre une plus grande efficacité de la stérilisation. Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toutes traces d'agents stérilisant (Heulin *et al.*, 1994). Les graines sont ensuite mises à germer dans des boîtes de Petri contenant une gélose nutritive, pour mettre en évidence d'éventuels contaminants résiduels après cette étape de stérilisation (Fig.14).



Figure 14. Germination des graines de blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB sur gélose nutritive.

8.1.6. Production de l'inoculum

La concentration de l'inoculum est ajustée et calibrée à une DO de 0.9 à une longueur d'ondes $\lambda = 650\text{nm}$.

Cette solution bactérienne ainsi calibrée pour éviter des fluctuations liées à la taille de l'inoculum servira dans les expérimentations menées en pots et en cultures hydroponiques.

8.2. Culture en pots

Après germination, les graines de blé dur sont transférées dans des pots contenant chacun 140g de sol, nous avons utilisé trois lots de pots :

- Un lot témoin qui comprend des plantules non traitées aux herbicides ni inoculées avec *B. fungorum*, et des plantules non traitées aux herbicides mais inoculées avec *B. fungorum*.
- Un lot qui sera uniquement traité aux herbicides.
- Un lot qui sera traité aux herbicides puis inoculé par 1mL de la suspension de *B. fungorum* souche B01 précédemment préparée.

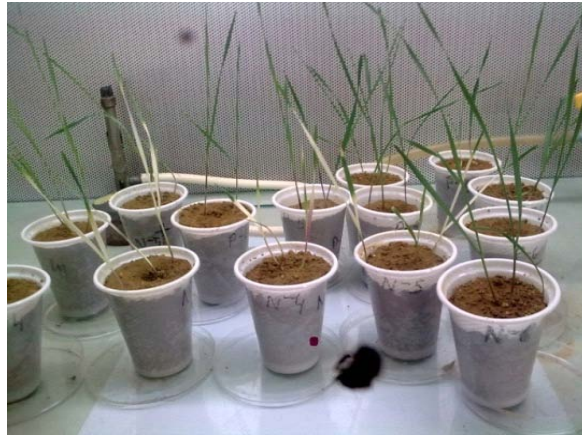


Figure 15. Dispositif expérimental de culture du blé dur (*Triticum durum* L.) var.MBB en pots.

Les pots sont traités aux herbicides par ajout de 20mL de chaque herbicide et aux différentes concentrations. Les pots témoins n'étant pas traités.

Les dispositifs de culture sont placés sous une rampe d'éclairage de 2000 Lux à température ambiante pendant 3 semaines (Fig.15).

Le sol est maintenu à une humidité constante par ajout d'une quantité d'eau distillée équivalente à la perte de poids quotidienne des pots.

La croissance des plantes est déterminée par des mesures répétées des longueurs moyennes des racines principales et de la tige ainsi que la détermination des poids secs des parties racinaires et des parties aériennes après séchage des différents échantillons à l'étuve à 60°C pendant 4 jours, jusqu'à poids constants.

8.3. Culture hydroponique en tubes

Après germination des graines du blé dur sur boîtes de Petri, les jeunes plantules sont transférées stérilement dans des tubes de culture de 20 mm de diamètre à raison d'une plantule par tube.

Les tubes contiennent des billes en verre et un volume de 12ml de milieu minéral de Knop (composition voir Annexes II). Les tubes sont stérilisés par autoclavage pendant 20 mn à 120°C.

Nous avons utilisé trois lots de tubes.

- Un lot témoin qui contient des germinations du blé dur non traités aux herbicides et non inoculées avec *B. fungorum* et des germinations du blé dur non traitées aux herbicides mais inoculées avec *B. fungorum*.

- Un lot qui contient les germinations du blé dur et traitées uniquement aux différentes concentrations du norflurazon et de la prométryne.
- Un lot qui contient les germinations du blé dur sera traitées aux différentes concentrations du norflurazon et de la prométryne puis inoculées avec 1ml de l'inoculum.



Figure 16. Dispositif expérimental de culture de blé dur (*Triticum durum* L.) var.MBB en conditions hydroponiques.

Les dispositifs de culture sont placés sous une rampe d'éclairage de 2000 Lux à température ambiante pendant 3 semaines (Fig. 16).

De la même manière que précédemment, la croissance des plantules de blé dur est déterminée par des mesures répétées des longueurs moyennes des racines principales et de la tige ainsi que la détermination des poids secs des parties racinaires et des parties aériennes après séchage des différents échantillons à l'étuve à 60°C pendant 4 jours, jusqu'à poids constants.

8. Traitements statistiques et analyse des données

Lors de ce travail plusieurs séries de valeurs sont traitées sur EXCEL par les tests d'analyses de variance (Anova à 1 ou 2 facteurs) et au test de Student.

Résultats et discussion

1. Caractéristiques de *B. fungorum* souche Bf01

1.1. Caractéristiques morphologiques

1.1.1. Etude macroscopique

Cultivées sur gélose nutritive, les colonies de *B. fungorum* souche Bf01, apparaissent après 24 heures d'incubation, très petites (punctiformes) et deviennent plus grandes (2 à 3 mm de diamètre) après 48h d'incubation. Elles présentent les caractéristiques morphologiques suivantes (Fig. 17):

Forme du relief :	bombé à semi bombé.
Couleur :	blanche.
Diamètre de la colonie:	2mm.
Aspect :	opaque à muqueux.
Allure des contours :	régulier.
Aspect de la surface :	brillant.
Type de colonies :	smooth (lisses).
Pigmentations :	Absente.



Figure 17. Culture de *B.fungorum* souche Bf01 sur gélose nutritive, après 48h d'incubation à 30°C.

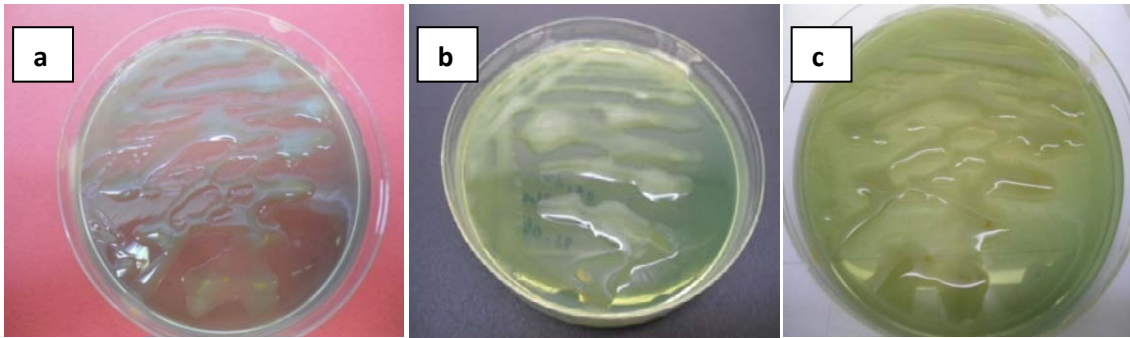


Figure 18. Aspect des colonies de *B. fungorum* souche Bf01 après 96h d'incubation sur milieux (de gauche à droite).

- (a) M63 mannitol
- (b) YE mannitol
- (c) TY mannitol.

B. fungorum souche Bf01 présente des colonies très mucoïde du fait de la sécrétion des EPS. Le mannitol s'est révélé, la source de carbone qui stimule le mieux la production d'EPS d'après une évaluation qualitative à l'œil nu basée sur l'aspect mucoïde des colonies.

1.1.2. Etude microscopique

L'examen à l'état frais de *B. fungorum* souche Bf01 en suspension à partir d'une culture sur TSB agée de 24h et sous agitation. Après coloration au bleu de méthylène, l'observation a montré des cellules isolées en forme de bâtonnets, plus ou moins allongés et mobiles (Fig.19 A).

Le test au KOH positif confirme le GRAM négatif de la souche.

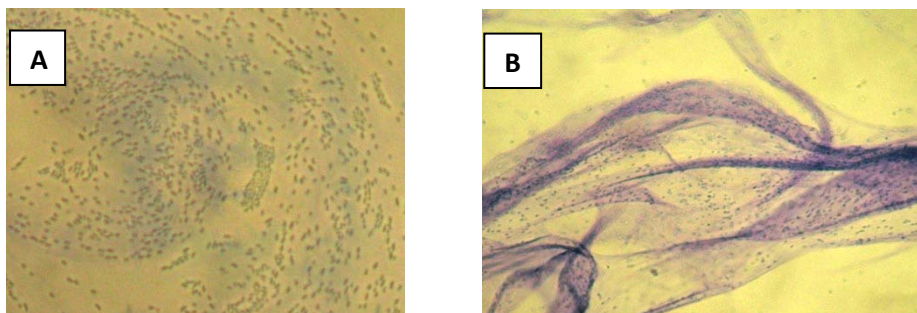


Figure 19. Culture de *B. fungorum* souche Bf01 observée au microscope photonique après coloration au bleu de méthylène.

A : *B.fungorum* souche Bf01 en suspension .GrX400.

B : *B.fungorum* souche Bf01 englobée dans la gangue muqueuse d'EPS .GrX200.

1.2. Cinétique de croissance

Les résultats montrent que la cinétique de croissance de cette souche présente une allure classique de courbes de croissance bactérienne et comporte deux phases (Fig. 20).

Une première phase qui se situe entre 24 h et 96 h et qui correspond à une phase active de production cellulaire ; c'est la phase exponentielle de croissance.

Une deuxième phase qui débute à partir de 96h et qui correspondrait à une phase de stabilisation de la production cellulaire ; c'est la phase stationnaire.

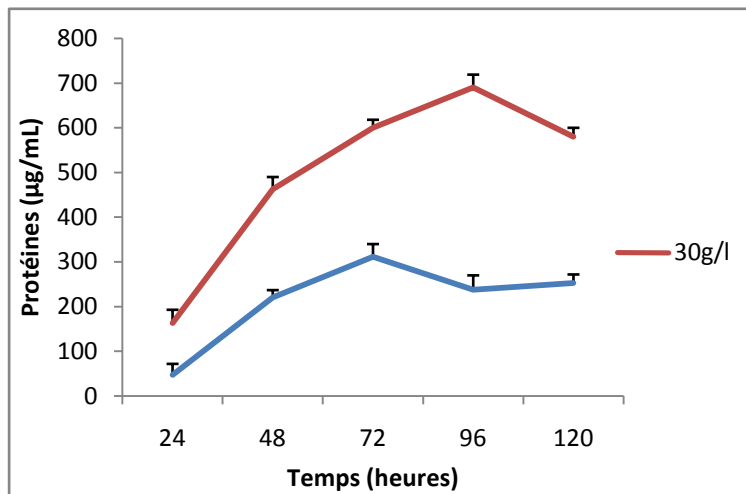


Figure 20. Cinétique de croissance de *B. fungorum* souche Bf01.

1.3. Cinétique de production d'EPS

La courbe montrant la cinétique de production d'EPS par la souche *B. fungorum* Bf01 (Fig. 21) révèle un bon niveau de production à une concentration de 30 g.l⁻¹ de mannitol. Cette production d'EPS débute après seulement 24h de culture, mais avec une faible progression, matérialisée par une faible pente entre 24h et 96h d'incubation. Au delà de 96h, nous notons une baisse de production d'EPS, qui serait probablement due à une dégradation et/ou réutilisation des EPS par la bactérie, probablement suite à une diminution du substrat après ce temps d'incubation.

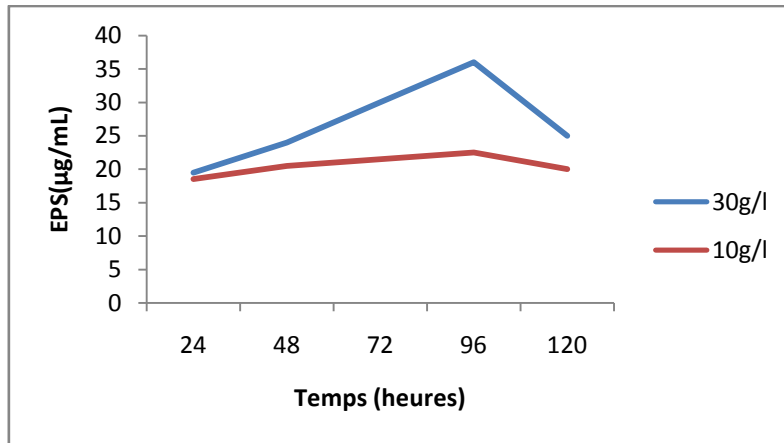


Figure 21. Cinétique de production d'EPS par *B.fungorum* souche Bf01

Il est à noter que la quantité maximale moyenne d'EPS produite avec 30g/l dépasse de 44% celle produite avec 10g/l de mannitol.

1.4. Cinétique de formation du biofilm

A une concentration de 30 g.l⁻¹ de mannitol, la formation du biofilm chez *B.fungorum* souche Bf01 présente une phase d'adhésion réversible qui s'étend entre 24h et 48h d'incubation. A partir de cette période, le biofilm évolue positivement avec la durée d'incubation, jusqu'à 144h, période correspondant à la croissance et la maturation du biofilm. Nous notons par la suite une baisse de la quantité de biofilm, correspondant probablement à sa dispersion (Fig. 22).

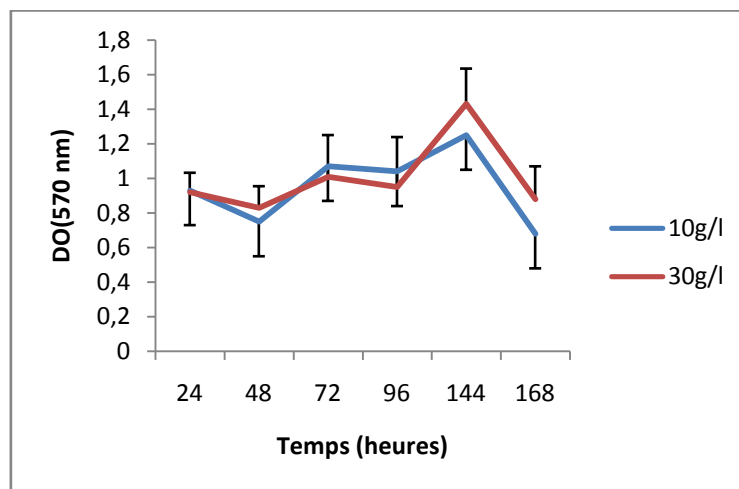


Figure 22. Cinétiques de formation de biofilm par *B.fungorum* souche Bf 01 sur surface « verre ».

Nous notons également que les biofilms présentent la même résistance au détachement, puisque la dispersion a lieu après 144h d'incubation avec les deux niveaux de concentrations en mannitol (10 et 30g/l).

1.5. Cinétique de croissance des cellules planctoniques

Le suivi de la production de cellules planctoniques, montre une augmentation de leur nombre, jusqu'à 48h d'incubation. Après ce temps, les cellules planctoniques commencent à diminuer jusqu'à 96h d'incubation. Enfin, nous notons une augmentation à nouveau très accentuée du nombre des cellules entre 96h et 168h d'incubation, traduite par une forte DO (1.27) (Fig. 23). Si nous comparons les graphiques des figures 22 et 23 représentant respectivement les cinétique de formation du biofilm et la cinétique de production de cellules planctoniques, il semblerait que l'augmentation de la production de cellules planctoniques entre 96h et 168h soit due à un « décrochage » du biofilm, puisqu'au même moment on observe une diminution de la quantité de biofilm produite (Fig. 23).

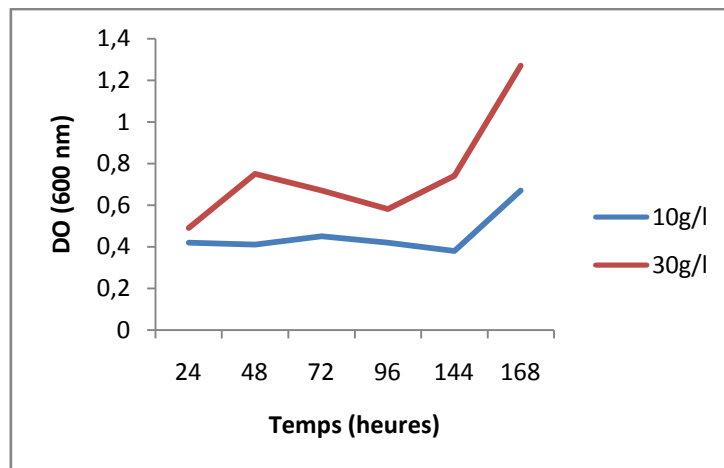


Figure 23. Cinétique de production de cellules planctoniques de *B. fungorum*.

2. Effets des herbicides sur la croissance, la production d'EPS la formation du biofilm et la production de cellules planctoniques.

Après avoir déterminé les caractéristiques liées à la croissance, la production d'EPS, de biofilm et de cellules planctoniques de la souche bactérienne étudiée *B. fungorum* Bf01, nous avons testé l'effet du norflurazon et de la prométryne à deux niveaux de concentrations en mannitol (10g.l⁻¹ et 30g.l⁻¹) du milieu TY sur ces mêmes paramètres.

Cette expérience représente un crible qui permet de mettre en évidence la capacité de la souche à proliférer et à produire le biofilm dans des conditions de contrainte liée à la présence des deux herbicides (norflurazon et prométryne). Nous avons retenu les résultats obtenus avec 30g/l de mannitol, en raison de la bonne production d'EPS dans ces conditions.

2.1. Effets des herbicides sur la cinétique de croissance de *B. fungorum* souche Bf01

En présence du norflurazon ou de la prométryne, les courbes représentant les cinétiques de croissance de *B. fungorum* souche Bf 01 à 30g.l⁻¹ de mannitol présentent les mêmes tendances qu'avec celles des échantillons traités avec 10g.l⁻¹ de mannitol (Fig. 24et Fig. 25).

Les courbes des échantillons traités aux différentes concentrations en norflurazon et de prométryne, montrent que la production de biomasse augmente dès le premier jour d'incubation jusqu'à atteindre des taux importants après seulement 48h d'incubation. Cette période correspond à la phase exponentielle de croissance, durant laquelle les bactéries utiliseraient une proportion importante du mannitol disponible dans le milieu.

Au-delà de 48h, une chute de biomasse est enregistrée chez tous les échantillons (excepté l'échantillon correspondant à une concentration de 10⁻⁵ M), renseignant probablement sur une détérioration des conditions physico chimiques, cette phase dure environ 24h.

Après 72h de fermentation, une reprise de croissance est notée (Fig 24. et Fig. 25). Cette allure de courbe est semblable à celles obtenues avec 10g/l de mannitol, cependant les niveaux de biomasses des échantillons traités aux herbicides obtenus à 30g.l⁻¹ significativement supérieurs à ceux enregistrés en présence de 10g.l⁻¹ de mannitol.

La production de biomasse est fortement inhibée avec les concentrations 10⁻⁴ M et 10⁻⁵ M des deux herbicides qu'avec la dose 10⁻⁶ M en norflurazon ou de prométryne. Avec la concentration de 10⁻⁶M de prométryne, la croissance semble légèrement stimulée par rapport au témoin non traité après seulement 48h d'incubation (Tableau IV).

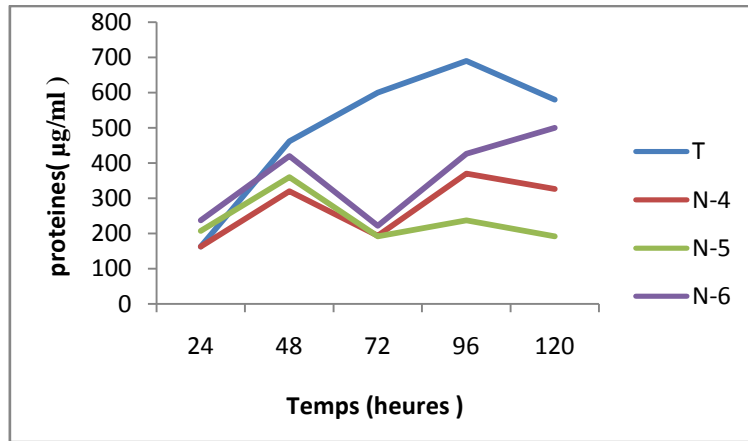


Figure 24. Effets des différentes concentrations en norflurazon (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance de *B. fungorum* souche Bf01

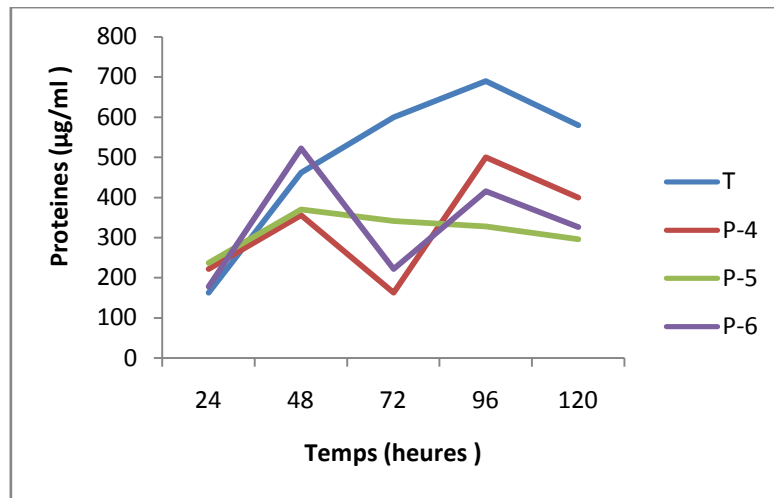


Figure 25. Effets des différentes concentrations de prometryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance de *B. fungorum* souche Bf 01.

Tableau IV. Effets des herbicides (Norflurazon et prométryne) croisés avec deux concentrations en mannitol (10 et 30 g.L⁻¹) sur la production de biomasse (en µg/ml) chez *B. fungorum* après 48h d'incubation.

Concentrations en mannitol herbicides	10g/l		30g/l	
	Norflurazon	Prométryne	Norflurazon	Prométryne
0M	220µg/ml +- 17	220µg/ml+- 17	426µg/ml+- 23	462µg/ml+- 23
10 ⁻⁴ M	220 µg/ml+- 19	220 µg/ml+- 20	320 µg/ml+- 16	356µg/ml+- 33
10 ⁻⁵ M	200 µg/ml +- 25	207µg/ml+- 16	360 µg/ml+- 21	370µg/ml+- 26
10 ⁻⁶ M	326 µg/ml +- 23	311µg/ml+- 25	420µg/ml+- 15	522µg/ml+- 22

Les courbes des figures 24 et 25, montrent une amélioration de la croissance bactérienne pendant la phase exponentielle (48h) en présence de la prométryne à une concentration de (10⁻⁶ M). En effet, celle-ci passe d'une valeur de 462 µg de prot.ml⁻¹ pour le témoin à 522 µg de prot.ml⁻¹ pour le traitement prométryne à la concentration de 10⁻⁶M. Contrairement, le norflurazon semble montrer un léger fléchissement pour la même concentration (10⁻⁶M), puisque la production de biomasse durant les 48 premières heures passe de 462 µg de protéines ml⁻¹ (pour le témoin) à 420 µg de protéines.ml⁻¹ (pour le traitement 10⁻⁶M).

Aux différentes concentrations utilisées, le norflurazon et la prométryne ne semblent pas affecter de manière significative la croissance de la souche bactérienne *B. fungorum* Bf01, puisque celle-ci observe une croissance même à des concentrations élevées (10⁻⁴M).

2.2. Effets des herbicides sur la cinétique de production des EPS

Les courbes représentant la cinétique de production des EPS (Fig 26. et 27.), montrent que cette dernière est stimulée par le norflurazon et la prométryne.

Avec le norflurazon, les maxima sont enregistrés au bout de 96h de culture (Fig. 26). Les valeurs atteintes après 96h d'incubation se situent autour de (34 et 44 μg d'EPS/ml). Nous notons donc un décalage des maxima de production de l'ordre de 48h, puisqu'à 30 g/L de mannitol le maximum de production d'EPS est obtenu à 96h. Nous notons une différence significative entre les maxima obtenus avec les concentrations de 10 et 30 g.l⁻¹ de mannitol (10g.l⁻¹ mannitol : 25.5 μg d'EPS/ml – 30g.l⁻¹ mannitol : 44 μg d'EPS/ml), soit une augmentation estimée à environ 72 %.

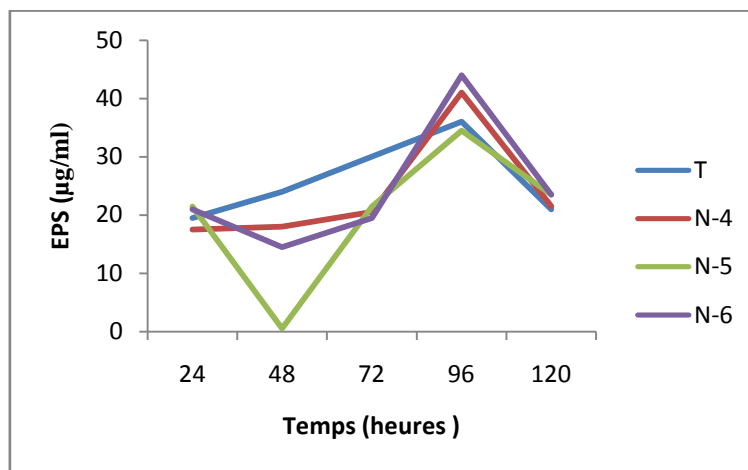


Figure 26. Effets des différentes concentrations en norflurazon (10^{-4}M , 10^{-5}M et 10^{-6}M) sur la production d'EPS par *B. fungorum* souche Bf01.

Avec la prométryne, comme le norflurazon (Fig. 26 et 27), pour une concentration en substrat carboné (mannitol) de 30g/l, les maxima sont enregistrés au bout de 96h d'incubation (Fig. 27). Les valeurs atteintes après ce temps d'incubation se situent autour de (38 μg d'EPS/ml) et ceci pour toutes les concentrations en prométryne 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}M .

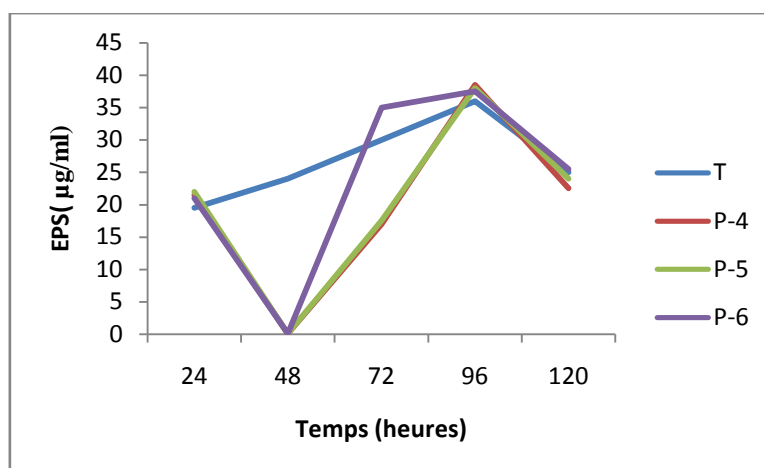


Figure 27. Effets des différentes concentrations en prométryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la production d'EPS par *B. fungorum* souche Bf01.

En comparant les cinétiques de production d'EPS avec différentes concentrations en norflurazon et en prométryne et la concentration en mannitol du milieu, deux différences majeures apparaissent : la chronologie de la production maximale et les quantités d'EPS produites (Tableau V).

Tableau V. Effet croisé de l'effet des herbicides (norflurazon et prométryne) et de la concentration en mannitol (10 et 30 g/l) sur le taux de production d'EPS (en $\mu\text{g/ml}$).

Concentrations en mannitol herbicides	10g/L		30g/L	
	Norflurazon	Prométryne	Norflurazon	Prométryne
0M	22.5 $\mu\text{g/ml}$	22.5 $\mu\text{g/ml}$	34.5 $\mu\text{g/ml}$	34.5 $\mu\text{g/ml}$
10^{-4} M	15.5 $\mu\text{g/ml}$	27 $\mu\text{g/ml}$	41 $\mu\text{g/ml}$	38 $\mu\text{g/ml}$
10^{-5} M	25.5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	34.5 $\mu\text{g/ml}$	38 $\mu\text{g/ml}$
10^{-6} M	22.5 $\mu\text{g/ml}$	33 $\mu\text{g/ml}$	44 $\mu\text{g/ml}$	37.5 $\mu\text{g/ml}$

Les quantités d'EPS produites à 30g.L^{-1} sont plus importantes que celles produites à 10g.L^{-1} . Néanmoins, le niveau de production en EPS d'une culture ne dépend pas seulement de la biomasse qu'elle renferme, mais aussi du potentiel de synthèse en EPS ou productivité des cellules qu'elle renferme. Ce potentiel de synthèse en tant qu'entité individuelle, peut être apprécié en rapportant le niveau de production de la culture en EPS à sa teneur en protéines cellulaires.

Le tableau VI, représente les indices de productivité d'EPS maximaux de *B. fungorum* souche Bf01 en absence et en présence du norflurazon et de la prométryne en milieu TY aux deux niveaux de concentrations en mannitol (10g.L^{-1} et 30g.L^{-1}).

Tableau VI. Effets du norflurazon et de la prométryne sur les Indices de productivité des EPS en milieu TY à 10g.l⁻¹ et 30g.l⁻¹.

	T (0M)	NFZ 10⁻⁴ M	NFZ 10⁻⁵M	NFZ 10⁻⁶M	P M 10⁻⁴M	PM 10⁻⁵M	P M 10⁻⁶M
10g.l⁻¹	0.094	0.10	0.11	0.20	0.24	0.32	0.62
30g.l⁻¹	0.052	0.082	0.10	0.11	0.10	0.16	0.088

En calculant les indices de productivité, il s'avère qu'en présence de 10g.l⁻¹ le potentiel de synthèse des EPS de *B. fungorum* souche Bf 01 est plus important qu'à 30g.l⁻¹ aussi bien pour les témoins que pour les échantillons traités. D'autre part, nous notons que les indices de productivité des échantillons traités aussi bien au norflurazon qu'à la prométryne et aux deux niveaux de concentrations en mannitol (10g.l⁻¹ et 30g.l⁻¹) sont supérieurs à ceux des témoins non traités.

2.3. Effets des herbicides sur la formation du biofilm chez *B. fungorum* souche Bf01

Les résultats obtenus ont révélé la capacité de *B. fungorum* souche Bf 01 à former un biofilm, en présence du norflurazon et de la prométryne. Les cinétiques de production de biofilm chez *B. fungorum* souche Bf 01, montrent que la mise en place et la structuration du biofilm suit les mêmes étapes générales, quelque soit le traitement et la dose appliqués.

Ces étapes sont au nombre de trois : l'adhésion, la maturation et la dispersion du biofilm. Les cinétiques de production du biofilm des échantillons traités aux herbicides ainsi que celles des témoins non traités, peuvent être divisées en trois étapes :

- 1- l'attachement réversible des cellules bactériennes qui représente une étape test pour les bactéries, durant laquelle elles évaluent les propriétés de la surface.
- 2- initiation et formation du biofilm mature pour le témoin et les échantillons traités par le norflurazon et la prométryne. Cette étape débute par la formation de microcolonies qui vont croître à travers la prolifération des bactéries pour aboutir à des macrocolonies et atteindre le biofilm mature, dont le maximum de croissance se traduit par une valeur maximale de la densité optique.
- 3- l'étape de dispersion du biofilm ou les cellules vieillissantes du biofilm réduisent leur adhésion et sont larguées dans la phase liquide.

Néanmoins nous notons une précocité dans la maturation du biofilm des échantillons stressés par rapport au témoin avec les deux concentrations en mannitol testées (10g/l et 30g/l).

Le norflurazon et la prométryne ont les mêmes effets concernant les durées des différentes phases constitutives du cycle de vie du biofilm , sauf pour la dose de $10^{-4}M$ où la dispersion apparaît plus rapidement avec la prométryne qu'avec le norflurazon. Le tableau **VII** montre l'effet des différentes concentrations en norflurazon et de prométryne sur les durées des différentes phases de l'établissement du biofilm.

Tableau VII. Effets du norflurazon et de la prométryne sur les durées des différentes phases du biofilm avec 30g/l de mannitol.

phases herbicides	Adhésion reversible	Maturation	Dispersion
0M (T)	0-48h	144h	144h-168h
$10^{-4}M$	0-48h	96h	96h-168h
$10^{-5}M$	0-48h	96h	96h-168h
$10^{-6}M$	0-48h	72h	144h-168h

Le norflurazon et la prométryne semblent avoir des effets similaires sur la production du biofilm.

Concernant les quantités de biofilm formées en présence de 30g/l de mannitol ,il parait qu'à une concentration de $10^{-4}M$ du norflurazon le biofilm formé est plus important que ceux formés avec les concentrations ($10^{-5} M$ et $10^{-6} M$) ainsi que le témoin.(Fig 28.)

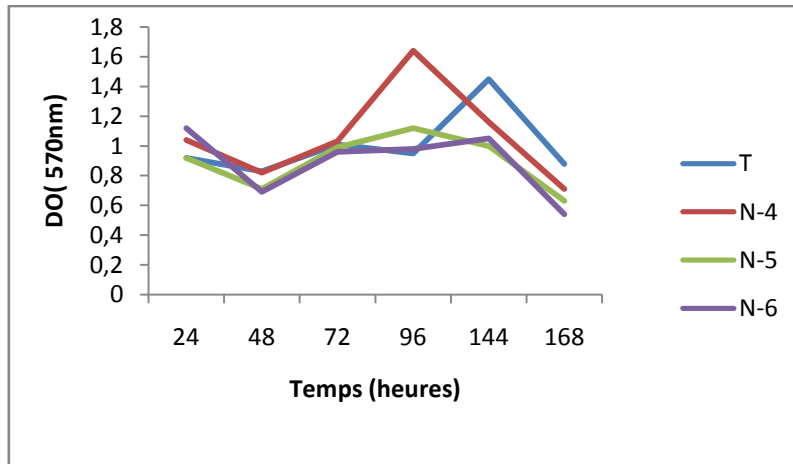


Figure 28. Effets des différentes concentrations en norflurazon ($10^{-4}M$, $10^{-5}M$ et $10^{-6}M$) sur la cinétique de formation du biofilm chez *B. fungorum* souche Bf01.

Avec la prométryne ,la quantité de biofilm la plus importante est enregistrée chez le témoin après 144 h de culture.(Fig 29.).

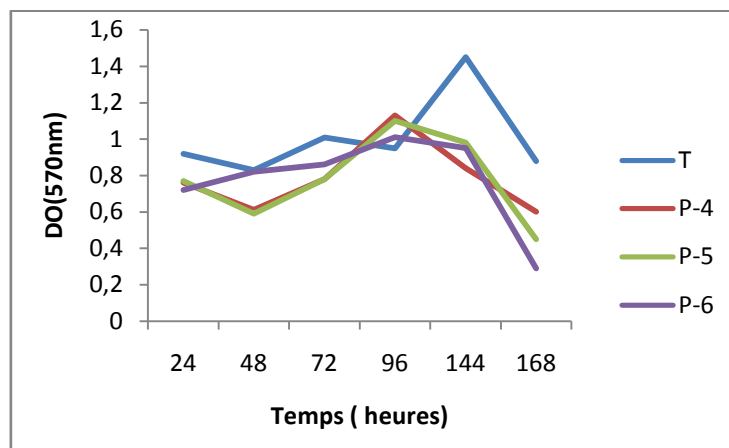


Figure 29. Effets des différentes concentrations de prométryne ($10^{-4}M$, $10^{-5}M$ et $10^{-6}M$) sur la cinétique de formation du biofilm chez *B.fungorum* souche Bf01

2.3.1 Effets de la nature du substrat sur la formation du biofilm chez *B.fungorum*

Sur milieu YESB liquide, *B. fungorum* souche Bf01s'est montrée incapable de former un biofilm, cette incapacité est traduite par l'absence de l'anneau ou biofilm qui se forme chez cette bacterie aérobie à l'interface air-liquide. Ce même milieu solide s'est avéré non stimulateur de la production d'EPS par cette souche (Fig.30) d'après une appréciation à l'oeil nu.

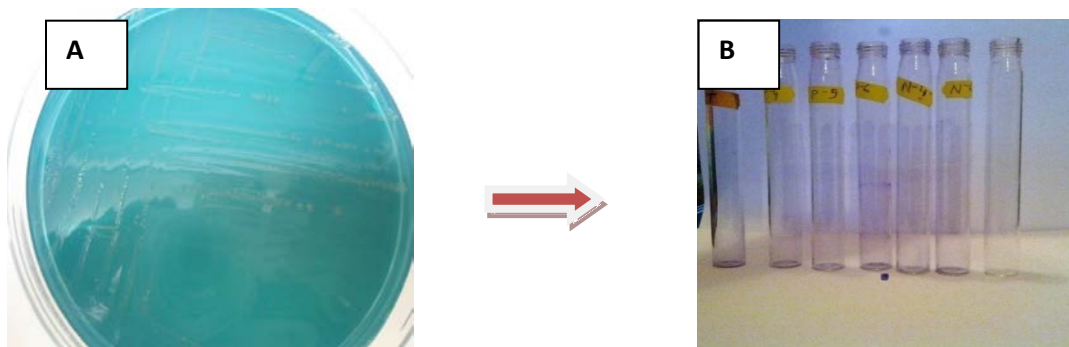


Figure 30. Relation entre EPS et biofilm.

- A. Colonies de *B. fungorum* sur milieu YESA solide (pas de production d'EPS)
- B. Absence d'anneaux du biofilm sur milieu YESB liquide

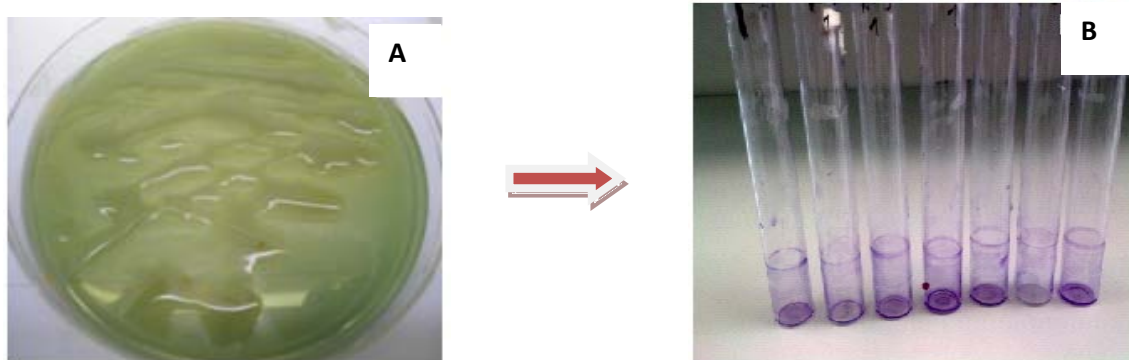


Figure 31. Relation entre la production d'EPS (milieu solide) « A » et la production du biofilm « B » par la souche bactérienne *B. fungorum* Bf01 sur milieu TY mannitol.

- A. Colonies de *B. fungorum* sur milieu TYMannitol Agar .
- B. Présence d'anneaux du biofilm sur milieu TYMannitol liquide.

2.4. Effets des herbicides sur la cinétique de croissance des cellules planctoniques de *B. fungorum* souche Bf01

La cinétique de croissance des cellules planctoniques sous l'influence du norflurazon et de la prométryne évolue dans le même sens que celui du témoin. Elle montre une légère augmentation à 72h de culture puis une réduction du nombre de bacteries jusqu'à 96h de culture. Au delà de 144h , nous notons une augmentation brusque des DO de tous les essais, traduisant une augmentation des cellules planctoniques dans le milieu suspendant.(Fig. 32 et Fig. 33).

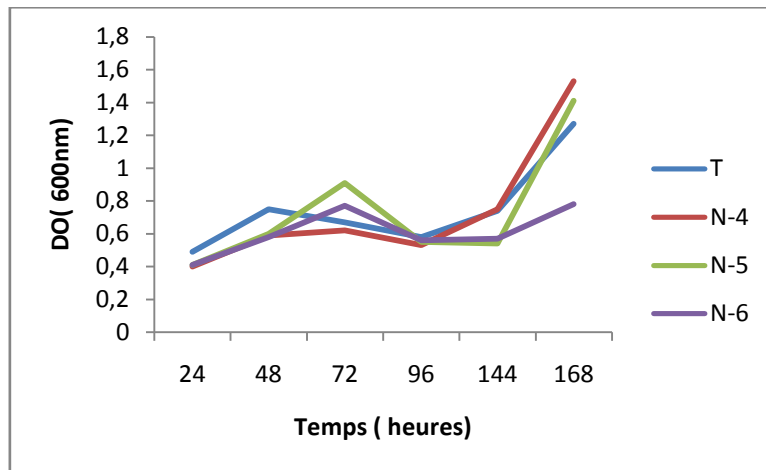


Figure 32. Effets des différentes concentrations en norflurazon (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance des cellules planctoniques.

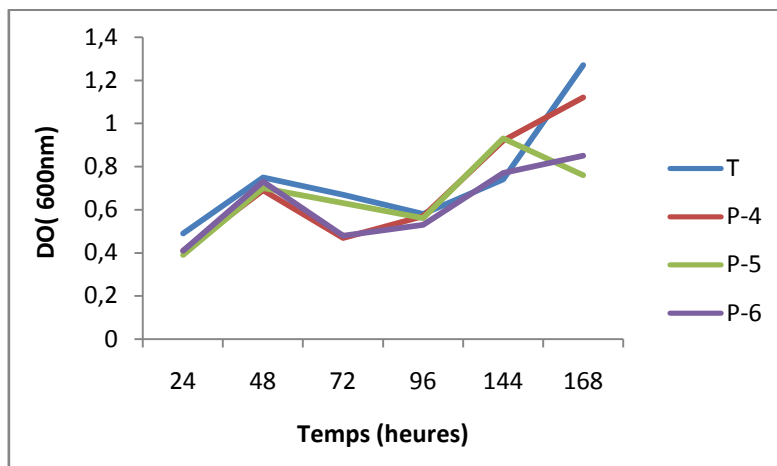


Figure 33. Effets des différentes concentrations de la prométryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M) sur la croissance des cellules planctoniques.

Il est à noter également que le norflurazon provoque le détachement d'un plus grand nombre de cellules du biofilm par rapport à la prométryne.

2.5.Effets du norflurazon et de la prométryne sur les paramètres de croissance (taux de croissance et temps de génération) de *B. fungorum* souche Bf 01

Les résultats du tableau VIII, montrent que le taux de croissance le plus élevé est en faveur du témoin non traité aux herbicides. Il est de $0.33h^{-1}$, correspondant à un temps de génération de 03heures.

Les échantillons traités aussi bien au norflurazon qu'à la prométryne affichent des taux de croissance inférieurs à celui obtenu avec le témoin notamment pour les plus fortes concentrations ($10^{-4}M$ et $10^{-5}M$) et sont respectivement 0.2 et 0.28 en présence du norflurazon ; 0.22 et 0.31 en présence de la prométryne. Ils correspondent respectivement à des temps de génération de 5h et 3.75h en présence du norflurazon : 4.5h et 3.22h en présence de la prométryne.

Pour les plus faibles concentrations ($10^{-6}M$), nous notons des taux de croissance similaires à ceux du témoin et par conséquent des temps de générations comparables : 3.12h pour le norflurazon et 2.94h pour la prométryne.

Cependant les taux de croissance enregistrés en présence de la prométryne s'avèrent légèrement plus importants que ceux enregistrés avec le norflurazon.

Tableau VIII. Effets du norflurazon et de la prométryne sur les paramètres de croissance (taux de croissance et temps de génération) de *B.fungorum* souche Bf 01.

Traitements	T 0 M	NFZ 10^{-4} M	NFZ 10^{-5} M	NFZ 10^{-6} M	PM 10^{-4} M	PM 10^{-5} M	PM 10^{-6} M
μ (h^{-1})	0.33	0.2	0.28	0.32	0.22	0.31	0.34
G (h)	3	5	3.57	3.12	4.5	3.22	2.94

3. Effet du norflurazon et de la prométryne sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB.

Dans le but de mettre en évidence un effet promoteur de croissance de *B. fungorum* souche Bf01, sur le blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB, nous avons dans un premier temps, évalué l'impact des herbicides seuls sur la croissance de (*Triticum durum* L.) var. MBB, puis nous avons procédé à l'inoculation de plantules de blé dur traitées aux différentes concentrations en

herbicides, par *B. fungorum* souche Bf01. Cette expérimentation est réalisée en pots sur une durée de 3 semaines.

Nous avons effectué les mesures biométriques des plantules de blé dur :

- longueurs des parties racinaires et des parties aériennes,
- la biomasse sèche des parties racinaires et aériennes,
- détermination des rapports biomasses sèches racinaires/biomasses sèches aériennes (PR/PA).

3.1 Effet du norflurazon sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var MBB.

3.1.1 Taille de la partie racinaire

Les plantules traitées par le norflurazon présentent une réduction de la taille des racines par rapport aux témoins qui montre une valeur moyenne de 21.83 cm contre des valeurs respectives de 8.83, 14.16 et 21 cm chez les plantules dosées à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M. (Fig. 34a). De plus les plantules stressées présentent des racines moins ramifiées que celles des témoins.

La taille racinaire des plantules traitées au norflurazon aux doses 10^{-4} M et 10^{-5} M diffère significativement du témoin, par contre aucune différence significative n'est décelée entre le témoin et les plantules traitées à 10^{-6} M.

3.1.2 Taille de la partie aérienne

Les plantules témoins présentent une bonne croissance de la partie aérienne avec une taille moyenne qui atteint 26.66 cm, alors que les plantules stressées sont moins développées, avec des valeurs moyennes qui varient entre 17.83 et 19.25 cm, respectivement pour les doses, 10^{-5} M et 10^{-4} M. Nous notons une différence significative entre ces valeurs et le témoin. À la dose 10^{-6} M en norflurazon, les plantules atteignent une longueur moyenne de 27.33 cm. Nous notons ici une légère stimulation de la longueur de la partie aérienne, mais qui est statistiquement non significative (Fig 34 b). L'allure des résultats tant au niveau foliaire que racinaire est la même. Il semble y avoir un effet significativement inhibiteur du Norflurazon sur l'élongation racinaire et aérienne pour les concentrations les plus élevées (10^{-5} M et 10^{-4} M).

3.1.3 Biomasse sèche de la partie racinaire (PR)

La détermination des poids secs racinaires montre des valeurs moyennes de 0.032-0.029-0.014g et 0.0073 g respectivement pour le témoin et les plantules traitées par le norflurazon à

10^{-6}M , 10^{-5}M et 10^{-4}M . Ces résultats montrent que la concentration 10^{-6}M en Norflurazon ne semble pas avoir d'effet sur la biomasse racinaire. Aux concentrations de 10^{-5}M et 10^{-4}M , nous notons une importante réduction de la biomasse racinaire (Fig.34c), qui atteint un maximum à la dose de 10^{-4}M . Cela signifie qu'en présence du norflurazon, la biomasse racinaire diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration, cette perte est maximale à 10^{-4}M et est estimée à plus de 80 %. Nous avons noté une différence hautement significative entre le témoin et les plantules stressées à 10^{-4}M et 10^{-5}M . (Fig 34c).

3.1.4 Biomasse sèche de la partie aérienne (PA).

Comme la biomasse de la matière végétale sèche de la partie racinaire, la détermination de la matière végétale sèche aérienne des plantules de blé a montré une valeur moyenne de 35 mg pour le témoin contre 0.037g – 0.030g et 0.0260g respectivement pour les concentrations 10^{-6}M , 10^{-5}M et 10^{-4}M . L'analyse de la variance a révélé une différence significative entre le témoin et la dose de 10^{-4}M , cependant aucune différence significative n'est notée entre le témoin et les traitements à 10^{-5}M et 10^{-6}M . Cela signifie qu'en présence du norflurazon, la biomasse aérienne diminue en fonction de l'augmentation de la concentration, cette perte est maximale à une concentration de 10^{-4}M en Norflurazon, elle est estimée à plus de 30% à la plus forte concentration (Fig. 34d).

3.1.5 Rapport « PR/PA »

Le rapport a montré des valeurs en faveur des témoins et les plantules les moins stressées où le PR/PA atteint 0.91 et 0.64 respectivement pour le témoin et la dose de 10^{-6}M , et des valeurs de 0.26 et 0.46 respectivement pour les concentrations en norflurazon, 10^{-4}M et 10^{-5}M (Fig 34e).

Ces résultats signifient que chez les plantules témoins et les moins stressées (10^{-6}M) la croissance de la partie racinaire est favorisée en accumulant de la matière sèche, au niveau des parties racinaires par contre les plantules stressées à 10^{-4}M , 10^{-5}M accumulent préférentiellement de la matière sèche au niveau des parties aériennes et les racines sont réduites au maximum.

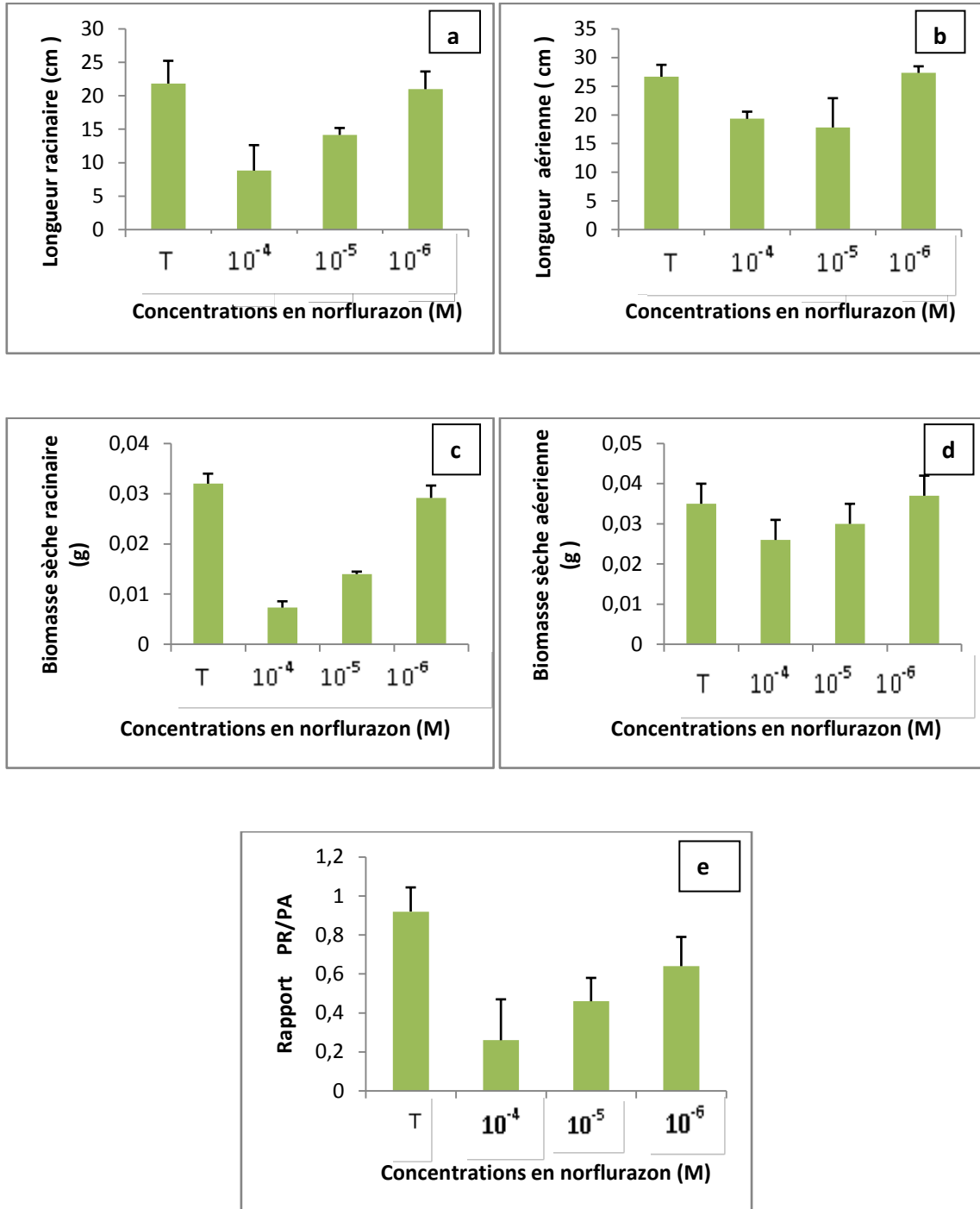


Figure 34. Effets des différentes concentrations en norflurazon sur la croissance du blé dur (*Triticum durum*) var. MBB. Mesures réalisées après 21 jours de culture en pots.

- (a) Longueur de la partie racinaire.
- (b) Longueur de la partie aérienne.

- (c) Biomasse sèche de la partie racinaire.
- (d) Biomasse sèche de la partie aérienne.
- (e) Ratio de matière sèche des racines Parties racinaires / Parties aériennes (PR/PA).

3.2 Effets de l'inoculation par *B. fungorum* souche Bf 01 sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB traité aux différentes concentrations en norflurazon

Après inoculation du blé dur par *B. fungorum* souche Bf 0, nous avons effectué les mesures biométriques des paramètres de croissance précédemment étudiés. Les résultats sont représentés dans la figure 35.

3.2.1. Longueur de la partie racinaire

L'inoculation par *B. fungorum* souche Bf 01 ne semble pas améliorer les longueurs des parties racinaires des plantules témoins de blé dur (*Triticum durum* L.) var MBB et celles traitées à la dose 10^{-6} M en norflurazon. Par contre en présence des plus fortes concentrations 10^{-4} M et 10^{-5} M, nous notons une augmentation de la longueur racinaire, qui est plus marquée pour la dose 10^{-4} M, où la plantule stressée inoculée présente une amélioration très significative par rapport à la plantule non inoculée à la même dose en norflurazon. L'inoculation semble ainsi atténuer l'effet inhibiteur du norflurazon au niveau racinaire, à la dose de 10^{-4} M. (Fig. 35 a).

3.2.2 Longueur de la partie aérienne

L'inoculation semble stimuler faiblement les parties aériennes des témoins et les échantillons traités aux doses 10^{-5} M et 10^{-6} M, cependant cet effet demeure non significatif au seuil 0.05%. L'inoculation par *B. fungorum* souche Bf01 semble restaurer la diminution de la taille des parties aériennes du blé dur à la concentration de 10^{-5} M, probablement en protégeant la plantule de l'effet du norflurazon au niveau racinaire. Pour une concentration plus élevée en norflurazon (10^{-4} M), nous notons une diminution de la longueur aérienne qui ne semble pas restaurée par l'inoculation de la souche Bf01 (Fig. 35b).

3.2.3 Biomasse sèche de la partie racinaire (PR)

De la même manière que pour la longueur racinaire (Fig. 35a), l'inoculation des plantules de blé dur par *B. fungorum* souche Bf01 permet d'améliorer la production de biomasse racinaire (Fig. 35 c). Cette inoculation a un effet positif en présence du norflurazon et ceci

aux différentes doses (10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M). Notons que l'effet inoculation est plus marqué pour la dose de 10^{-4} M.

3.2.4. Biomasse sèche de la partie aérienne (PA).

Comme pour la taille des parties aérienne, il ne semble pas y avoir un effet inoculation, puisque les différences entre les traitements ne sont pas significatives (Fig 35d).

3.2.5. Rapport « PR/PA »

L'inoculation améliore de façon hautement significative le rapport PR/PA des plantules les plus stressées (10^{-4} M). (Fig. 28 e). L'effet inoculation observé particulièrement pour la dose de 10^{-4} M traduit la protection de la plantule de blé dur par *B.fungorum* souche Bf01 vis-à-vis du norflurazon.

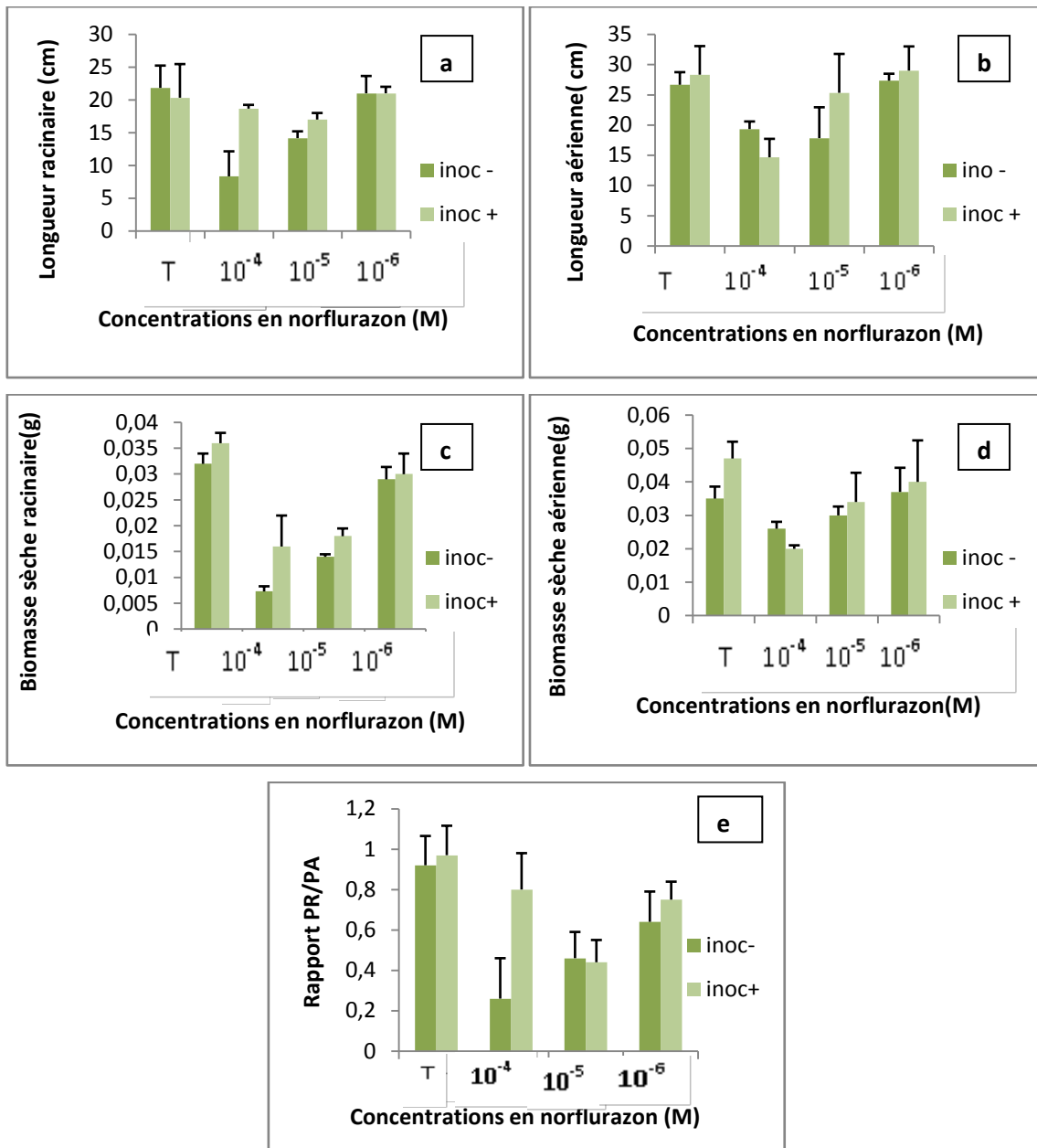


Figure 35. Effets de l'inoculation par *B.fungorum* sur la croissance du blé dur (*Tritium durum L.*) var. MBB traité aux différentes concentrations en norflurazon.

Mesures réalisées après 21 jours de culture en pots.

- (a) Longueur de la partie racinaire.
- (b) Longueur de la partie aérienne.
- (c) Biomasse sèche de la partie racinaire.
- (d) Biomasse sèche de la partie aérienne.
- (e) Ratio : PS des racines /PS des parties aériennes.



Figure 36. Effets de l'inoculation par *B.fungorum* sur la croissance racinaire des plantules de blé dur (*Triticum durum L.*) var. MBB traitées aux différentes concentrations en norflurazon

- (a) plantule témoin. A gauche non inoculée, à droite inoculée.
- (b) plantule traitée à la dose 10^{-4} M en NFZ. A gauche non inoculée, à droite inoculée.
- (c) plantule traitée à la dose 10^{-5} M en NFZ. A gauche non inoculée, à droite inoculée.
- (d) plantule traitée à la dose 10^{-6} M en NFZ. A gauche non inoculée, à droite inoculée

3.2.6 Effets du norflurazon sur la morphologie du blé dur (*Triticum durum L.*)var.MBB

L'effet le plus marqué est celui obtenu à 10^{-4} M avec un important blanchissement des plantules (feuilles). Cette dépigmentation débute par la base des feuilles et se propage vers l'extrémité, c'est le phénomène de « photobleaching » qui entraîne la formation des plantes albinos(Fig 37 b.).

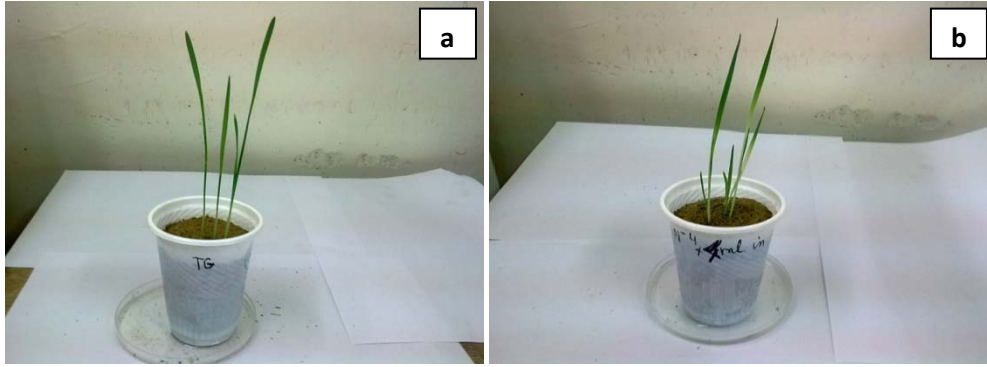


Figure 37. Effet du norflurazon sur la morphologie du blé dur (*Triticum durum L.*) var .MBB.

(a) : Plantules de blé dur non traitées au norflurazon.

(b) : Plantules de blé dur traitées au norflurazon à une concentration de 10^{-4} M.

Chez les plantules traitées à 10^{-5} M, la dépigmentation touche partiellement les feuilles alors que la tige est totalement verte.

A 10^{-6} M les feuilles du blé dur (*Triticum durum L.*) var .MBB, ne présentent aucune différence avec les plantules témoins.

3.3 Effets de la prométryne sur la croissance des plantules de blé dur (*Triticum durum L.*) var. MBB.

Sur une même période de végétation (3 semaines), les cultures de blé dur (*Triticum durum L.*) var. MBB, sont traitées par la prométryne aux concentrations (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M). L'effet de la prométryne sur les paramètres de croissance de (*Triticum durum L.*) est représenté dans la figure 38.

3.3.1. Taille de la partie racinaire

Nous avons mesuré l'incidence des traitements prométryne sur l'élongation racinaire. Contrairement au Norflurazon, les résultats obtenus avec différentes doses de prométryne montrent que la taille des parties racinaires ne semble pas très affectée par la présence de cet herbicide.

Nous avons enregistré une valeur de 21.83cm pour les plantules témoins et des valeurs de 19.33 ,20 et 18.66 cm respectivement pour les plantules traitées à 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M (Fig. 38 a). L'analyse de la variance ne décèle pas de différence significative entre les longueurs racinaires des plantules témoin et celles traitées par la prométryne à 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

3.3.2. Taille de la partie aérienne

La taille des parties aériennes est marquée par les doses croissantes en prométryne (10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M) qui affichent des tailles respectives de 24.66cm, 23.33cm et 19.33 cm. La plus grande taille étant observée chez le témoin (Fig 30b). Nous notons une différence significative entre la taille de la partie aérienne du témoin et celles des plantules traitées à la dose 10^{-4} M (Fig. 38b).

3.3.3. Biomasse sèche de la partie racinaire (PR)

La détermination des biomasses sèches racinaires a montré que les poids les plus élevés sont en faveur des plantules témoins et celles traitées à 10^{-6} M et 10^{-5} M avec les valeurs moyennes qui sont respectivement de 0.032 ,0.035 et 0.030 g. La valeur de la biomasse sèche racinaire atteint 0.020 g, pour la dose 10^{-4} M. (Fig. 38 c). Il semble y avoir un effet inhibiteur estimé à près de 37% pour la dose 10^{-4} M, aucune différence significative n'est décelée entre le témoin et les plantules traitées aux doses 10^{-5} et 10^{-6} M.

3.3.4. Biomasse sèche de la partie aérienne (PA)

L'allure des résultats tant au niveau foliaire que racinaire est la même, nous notons une légère augmentation des biomasses aériennes sèches des plantules de blé dur traitées à 10^{-6} M de prométryne par rapport au témoin. La plus faible biomasse sèche est attribuée à la dose 10^{-4} M, sans pour autant enregistrer une différence significative avec le témoin. (Fig. 38d).

3.3.5. Rapport « PR/PA »

Le rapport PR/PA le plus important est noté chez les témoins avec une valeur de 0.91 et les plantules traitées par la prométryne à 10^{-5} et 10^{-6} M avec des valeurs respectives de 0.83 et 0.77, le plus faible rapport est noté chez les plantules traitées à 10^{-4} M et est de 0.66 (Fig. 38e).

L'analyse de la variance a révélé une différence significative entre le rapport du témoin et celui des plantules traitées à 10^{-4} M de prométryne.

Ces résultats signifient que les plantules témoins et celles traitées aux doses 10^{-5} et 10^{-6} M, favorisent la croissance de la partie racinaire en accumulant de la matière sèche au niveau de ce compartiment, par contre les plantules traitées à 10^{-4} M, accumulent préférentiellement de la matière sèche au niveau de la partie aérienne.

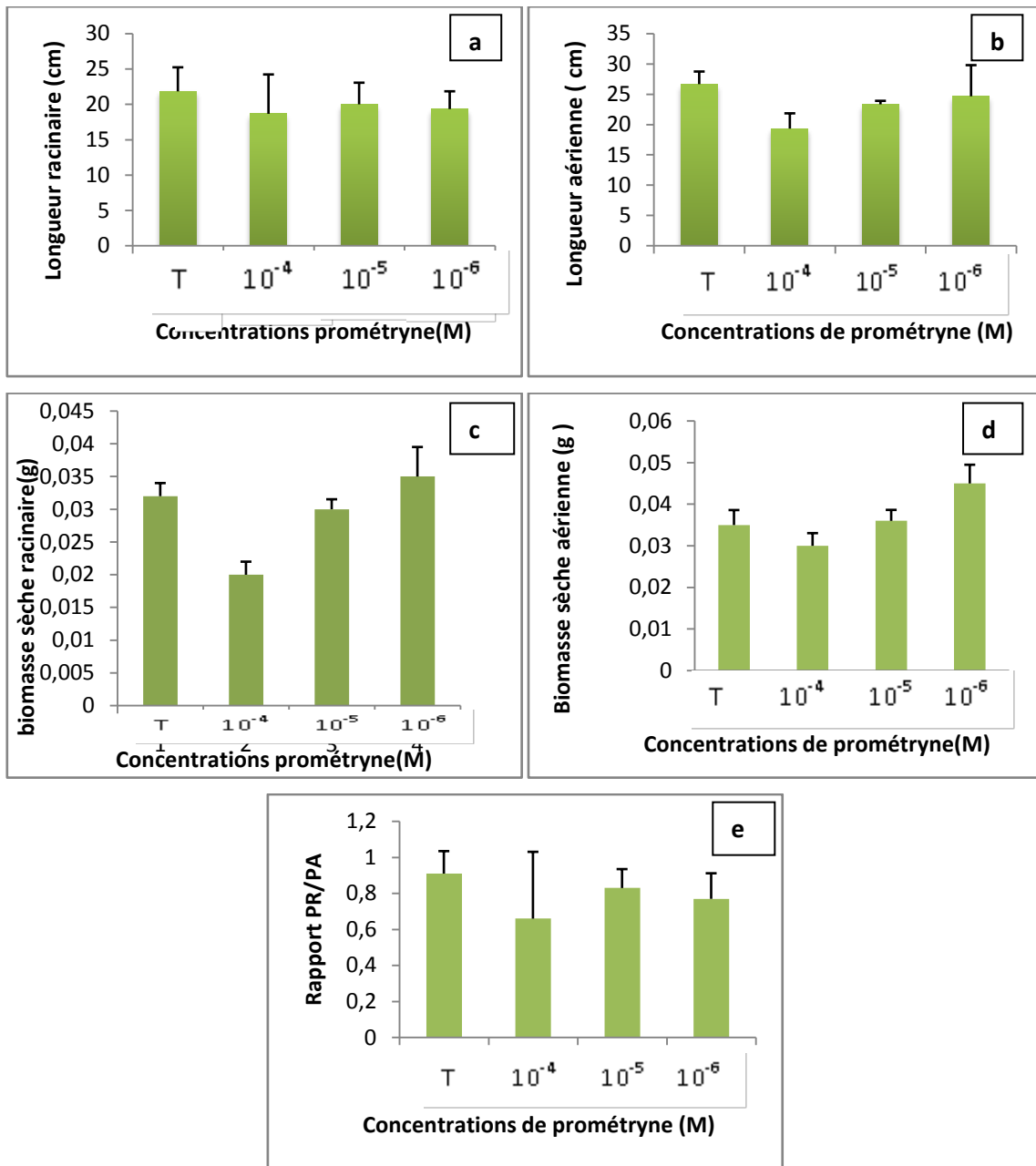


Figure 38. Effets des différentes concentrations de prométryne sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB. Mesures réalisées après 22jours de culture en pots.

- (a) Longueur de la partie racinaire.
- (b) Longueur de la partie aérienne.
- (c) Biomasse sèche de la partie racinaire.
- (d) Biomasse sèche de la partie aérienne.
- (e) Rapport de matière sèche racinaire (PR)/ (PA) matière sèche aérienne

3.4 Effets de l'inoculation par *B.fungorum* souche Bf01, sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB, traité aux différentes concentrations de prométryne

Dans le but d'évaluer l'effet PGPR de *B. fungorum*, nous avons effectué les mesures des paramètres de croissance, après inoculation du blé dur par *B. fungorum* souche Bf 01, précédemment étudiés. Les résultats sont représentés dans la figure 40.

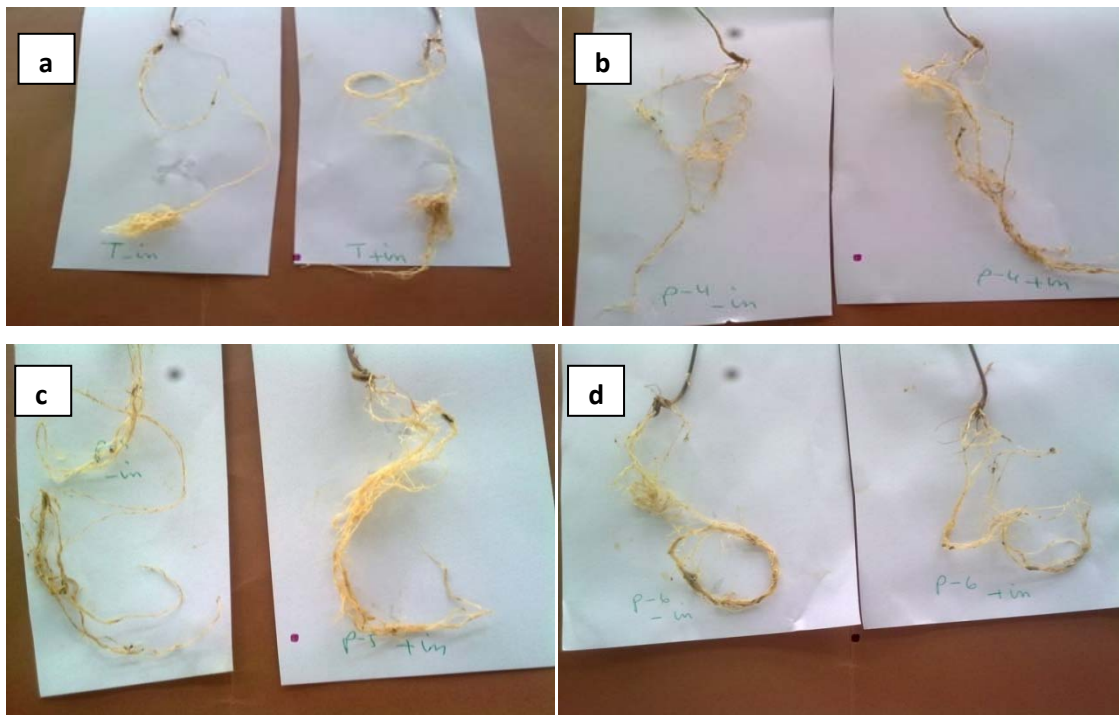


Figure 39. Effets de l'inoculation par *B.fungorum* sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var.MBB, traité par les différentes concentrations de prométryne (10^{-4} M, 10^{-5} M et 10^{-6} M).

- (a) : plantule témoin non inoculée à gauche, plantule témoin inoculée à droite.
- (b) : plantule traitée à la dose 10^{-4} M de PM. A gauche non inoculée, à droite inoculée.
- (c): plantule traitée à la dose 10^{-5} M de PM. A gauche non inoculée, à droite inoculée.
- (d) : plantule traitée à la dose 10^{-6} M de PM. A gauche non inoculée, à droite inoculée.

3.4.1. Longueur de la partie racinaire

Pour chacune des doses en prométryne (10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M) nous ne notons aucun effet « prométryne » sur la longueur des racines, mais également aucun effet « inoculation », puisque les différences ne sont pas significatives (Fig. 40a). Notons par ailleurs que la longueur des racines ne peut constituer à elle seule une appréciation de la croissance racinaire. En effet, celle-ci doit être combinée avec la biomasse racinaire qui, elle peut représenter un meilleur caractère appréciant la croissance.

3.4.2 . Longueur de la partie aérienne

Nous notons un effet PGPR de *B. fungorum* souche B01, traduit par une augmentation de la taille de la partie aérienne après l'inoculation, et ce pour le témoin comme pour les échantillons traités par les différentes doses de prométryne. Cependant cet effet demeure non significatif au seuil de probabilité 0.05% (Fig. 40b).

3.4.3. Biomasse sèche de la partie racinaire

Contrairement à la taille des racines, l'inoculation augmente de façon significative la biomasse racinaire sèche du témoin et d'une manière très significative celle les plantules dosées à 10^{-4} M de prométryne (Fig. 40c).

Aux doses 10^{-5} et 10^{-6} M, l'amélioration de la biomasse sèche racinaire comparées au témoin n'est pas significative.

3.4.4. Biomasse sèche de la partie aérienne

Nous notons un effet PGPR de *B. fungorum* souche B01 significatif pour le témoin non traité, et peu significatif pour les plantules traitées à 10^{-4} M et 10^{-5} M, par contre aucun effet n'est signalé avec la dose 10^{-6} M (Fig. 40d).

3.4.5. Rapport PR/PA

Nous notons un effet significatif « inoculation » sur les rapports PR/PA des plantules traitées aux plus fortes concentrations de prométryne (10^{-4} et 10^{-5} M). (Fig. 40 e)

Le rapport PR/PA correspondant à la dose 10^{-6} M, demeure inchangé après inoculation.

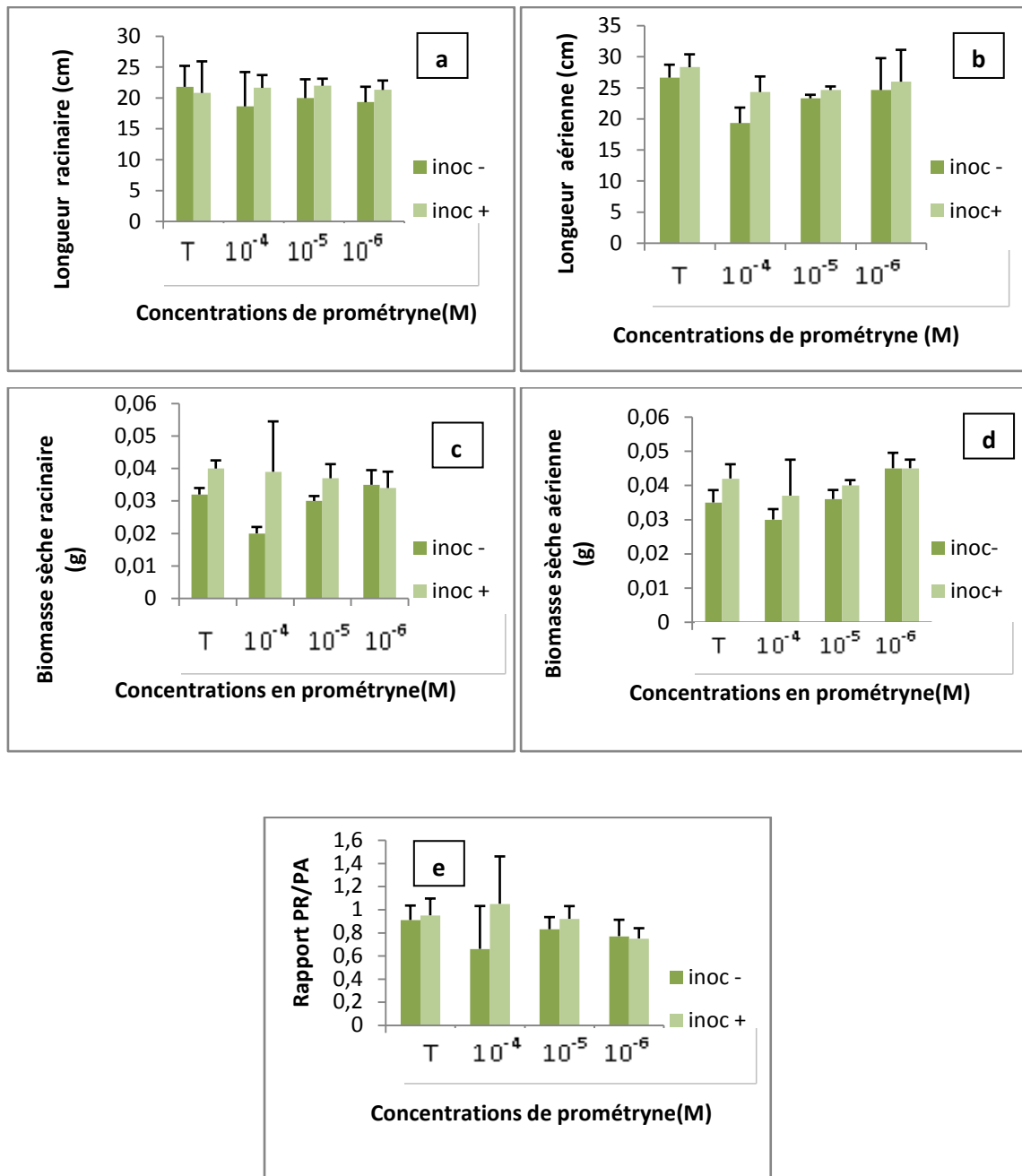


Figure 40. Effets de l'inoculation, sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) var MBB, traité aux différentes concentrations de prométryne.

- (a) Longueur de la partie racinaire.
- (b) Longueur de la partie aérienne.
- (c) Biomasse sèche de la partie racinaire.
- (d) Biomasse sèche de la partie aérienne.
- (e) Rapport de matière sèche racinaire (PR)/ (PA) matière sèche aérienne

Discussion

En absence d'herbicides, la cinétique de formation du biofilm, montre que la quantité du biofilm évolue positivement avec la durée d'incubation telle que le rapportent Adetunji *et al.* en (2005). La formation du biofilm mature en fin de période d'incubation, pourrait renseigner sur une installation progressive de conditions défavorables dans le milieu de culture, qui deviennent de plus en plus stressantes pour la bactérie. Ces conditions seraient conséquentes à une carence en nutriments ; ces derniers n'étant pas été renouvelés durant cette étude (culture discontinue). Par ailleurs, une anoxie induite par les conditions statiques de l'étude qui constituerait une contrainte pour une bactérie aérobie comme *B. fungorum* souche Bf01. Il est largement établi qu'un biofilm bactérien se développe en réponse à des conditions environnementales défavorables pour les bactéries planctoniques (Jefferson, 2004).

Les biofilms formés avec une concentration de 30g.L^{-1} sont légèrement plus importants que ceux formés avec une concentration de 10g.L^{-1} ; cette différence ne dépasse cependant pas 13.8%.

Rinaudi *et al* (2006) suggèrent que la croissance du biofilm augmente avec l'augmentation en saccharose, jusqu'à une concentration de 100g.L^{-1} , au-delà de cette concentration la croissance du biofilm est négativement affectée. Il a été indiqué que les concentrations de nutriment influent sur la morphologie du biofilm au niveau de la biomasse, la structure et l'épaisseur (Molobela et Ilunga, 2012).

Rice *et al* (2005) indiquent que le biofilm formé par *Serratia marcescens* est plus épais en présence de plus fortes concentrations en nutriments, alors qu'en milieu pauvre en nutriments, le biofilm est plus mince. Cependant Oh et ses collaborateurs (2007) montrent que le biofilm d'*E.coli* résulte d'une plus grande adhésion des bactéries à la surface « verre », aux plus faibles concentrations en nutriment, plutôt qu'en milieu riche en substrat.

Les biofilms (à 30g.L^{-1} ou à 10g.L^{-1}) de mannitol présentent la même résistance au détachement, puisque la dispersion du biofilms aux deux concentrations, intervient à 144h. Ce détachement traduit un état d'équilibre et représente une partie du cycle du biofilm. Nos résultats sont confrontés à ceux obtenus par Sauer et Camper (2001) et Rochex et Lebault en 2007, qui suggèrent que les biofilms formés par *P. putida* et *P. aeruginosa* se détachent plus rapidement aux fortes concentrations en substrats qu'en milieu pauvre en nutriments, d'autres auteurs montrent que la persistance du biofilm est attribuée à la matrice essentiellement

composée d'EPS (Stoodley *et al.*, 2002). D'autres études ont montré que les proportions en EPS et cellules composant le biofilm influent sur sa persistance (Simos, 2008).

En présence du norflurazon ou de prométryne, nous notons une précocité dans la maturation de biofilm par rapport aux témoins ; ceci qui pourrait constituer une réponse immédiate au stress causé par la présence des herbicides.

La maturation précoce du biofilm pourrait être corrélée avec l'installation du stress au début d'incubation. Il a été établi que les pesticides induisent dans certains cas un stress chimique pour les microorganismes (Beauregard, 2010).

Cette précocité dans la maturation du biofilm en présence d'un stress montre que le mode « biofilm » augmente la résistance des microorganismes aux stress environnementaux en leur offrant de meilleures conditions de vie (Danhorn et Fuqua, 2006 ; Dunne, 2002).

Ce changement de comportement de *B. fungorum* souche Bf01 en présence du norflurazon ou de la prométryne pourrait être attribué à des changements dans le processus de l'adhésion bactérienne causés par les herbicides. L'adhésion peut être influencée par 3 facteurs : (i) les caractéristiques ioniques du milieu, (ii) les caractéristiques physicochimiques de la surface « verre » et (iii) les caractéristiques de la surface bactérienne. Sheng et ses collaborateurs en 2005 suggèrent que les substances toxiques changent de manière significative les caractéristiques de surface des bactéries celles-ci influent grandement l'adhésion et l'initiation du biofilm.

La formation du biofilm débute lorsque les bactéries planctoniques optent pour un style de vie sessile. Cette « décision » est régie par la perception par les bactéries planctoniques, d'un milieu offrant des conditions de vie plus « sécurisantes » tant sur le plan nutritionnel que sur le plan toxicologique. Filloux et Ventre (2006), ont mis en évidence l'existence de deux biosenseurs qui régulent le choix du style de vie par les bactéries (planctoniques ou sessiles).

La cinétique de formation du biofilm chez *B. fungorum* souche Bf01, comporte 3 grandes étapes et montrent que le développement d'un biofilm est déterminé par un équilibre entre 3 processus : l'attachement, la croissance et de détachement des microorganismes (Dellil, 2007).

Durant la maturation du biofilm nous notons une diminution de la biomasse des cellules planctoniques dans le milieu suspendant, qui est opposée à un accroissement du biofilm lui-même.

Ces fluctuations sont dues au fait que la croissance du biofilm est basée sur la multiplication des cellules constitutives du biofilm, et le recrutement des cellules planctoniques venant se greffer à sa surface (Rinaudi *et al.*, 2006.)

Au delà de 144h, nous enregistrons une augmentation des bactéries planctoniques dans le milieu suspendant, ce qui signifie que des bactéries se sont décrochées du biofilm. Ces cellules vieillissantes du biofilm réduisent leur adhésion et sont relarguées dans la phase liquide telle que le rapportent Gjermansen *et al.* (2005).

Ces résultats suggèrent que si le norflurazon et la prométryne, réduisent la croissance des bactéries planctoniques, ils permettent en outre un développement plus important du biofilm et qu'après adhésion, l'énergie est orientée vers la production de métabolites secondaires (éléments structurant le biofilm) au détriment de la croissance bactérienne.

Ces résultats révèlent aussi que, *B. fungorum* souche Bf01 est incapable de former un biofilm en milieu YESA. En effet, sur ce milieu, *B. fungorum* souche Bf01 a montré une croissance faible ainsi qu'une absence de production d'EPS. Ce résultat relève d'une appréciation qualitative basée sur l'aspect mucoïde des colonies. Ceci est à notre avis en faveur de l'implication directe des EPS dans la formation du biofilm sur la surface « verre ».

Bien que le rôle des EPS dans l'adhésion bactérienne soit incontournable, certains auteurs, ont attribué un rôle controversé aux EPS. En utilisant des mutants EPS⁻, Santaella et ses collaborateurs (2008) ont pu montrer que l'EPS de *Rhizobium sp.* YAS34, n'est pas nécessaire à la formation de biofilm sur *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus*, mais contribue tout de même à la colonisation des racines.

La biosynthèse des EPS intervient en fin de phase exponentielle de croissance. Cette chronologie représente le modèle de production le plus largement admis. En effet, durant la phase stationnaire de croissance, caractérisée par un équilibre entre le taux de mortalité et le taux de croissance, l'azote devient un facteur limitant favorisant ainsi une intense production d'EPS (Duguid et Wilkinson, 1953). Nos résultats sont en accord avec ceux émis par Ferreira et ses collaborateurs (2010) qui montrent que différentes espèces appartenant au genre *Burkholderia* produisent des EPS en fin de phase exponentielle de croissance.

Les courbes représentant la cinétique de production des EPS présentent la même allure à 10 et 30g.l⁻¹. Cependant, le niveau de production à 30g.l⁻¹ est plus élevé. Czaczyk et Myszka (2007) rapportent que la production des EPS augmente avec l'augmentation de la concentration en source de carbone dans le milieu. L'augmentation de la concentration en substrat carboné comme dans notre cas le mannitol à 30 g.l⁻¹ engendre un stress hydrique et, l'augmentation de synthèse d'EPS pourrait aussi survenir en réponse à ce stress.

En présence du norflurazon et de la prométryne, les résultats indiquent que la synthèse des EPS par *B. fungorum* souche Bf01 est dépendante de la présence d'un facteur de stress dans le

milieu, puisque les quantités moyennes d'EPS synthétisées en présence des herbicides sont plus importantes que celles produites en leur absence (témoins).

C'est ainsi que le stress occasionné par la présence de la prométryne ou de norflurazon à différentes concentrations (10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M) semble provoquer chez *B. fungorum* souche Bf01 une réaction de protection, en produisant des quantités importantes d'EPS. Ce polymère servirait ainsi de zone tampon entre le milieu de culture, devenant de plus en plus agressif, en raison de la présence de concentrations élevées en herbicides (prométryne ou norflurazon).

Des résultats similaires ont été rapportés par Ahemad et Khan (2010b) en présence d'herbicides et Sheng *et al.* (2005) avec un stress aux métaux lourds.

En effet, les EPS sont également impliqués dans la tolérance des bactéries aux xénobiotiques, c'est ainsi que la production d'EPS a conféré à une souche de *Lactococcus lactis* une tolérance augmentée envers le cuivre, la nisine et le lysozyme (Looijesteijn *et al.* 2001).

Plusieurs auteurs ont conclu que les conditions de stress induisent donc la production d'EPS (**Champagne et al., 2007 ; Avella-Vasquez, 2010**). L'importance des EPS pour la cellule ne semble pas être très grande si on considère les bactéries *in vitro*. Sous des conditions naturelles, ce qui signifie des conditions fortement concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage compétitif et leur permettre de se maintenir (Cerning, 1994).

La concentration 30g.l^{-1} de mannitol, n'engendre pas seulement une amélioration de la synthèse d'EPS, mais augmente aussi la biomasse cellulaire. Certains auteurs ont signalé des résultats similaires en utilisant de fortes concentrations en source de carbone comme le fructose, le lactose, le glucose et du saccharose à 20g.l^{-1} , (Zhang *et al.*, 2011), le glucose à 30g.l^{-1} (Yuksekdag et Aslim, 2008) ou le lactose à 40g.l^{-1} (Bergmaier, 2001).

Ainsi cette importante prolifération a induit une diminution du potentiel de synthèse des EPS (productivité), par rapport à 10g.l^{-1} . La croissance est positivement corrélée avec l'abondance en substrat (30g.l^{-1} de mannitol), alors que le potentiel de synthèse cellulaire des EPS l'est négativement.

Les indices de productivité d'EPS (productivité) à 30g.l^{-1} et/ou à 10g.l^{-1} , des échantillons traités aux différentes concentrations en norflurazon et de la prométryne, sont tous supérieurs aux indices de productivité d'EPS des témoins. Ce qui montre que le potentiel de synthèse d'EPS de *B.fungorum* souche Bf01, augmente face à un stress, exprimant la nécessité d'une protection contre les agressions du milieu, ce rôle est d'ailleurs, largement attribué aux EPS.

En situant la synthèse des EPS au cours de la croissance de *B. fungorum* souche Bf01, nous avons observé que chez les témoins non traité, la synthèse des EPS a lieu en fin de phase

exponentielle de croissance. Cette synthèse intervient quand le taux d'azote diminue (en fin de phase exponentielle) d'où un rapport C/N plus important. L'excédant en carbone est destiné à la production des EPS après ralentissement de la croissance, qui devient limitée par un faible taux d'azote.

En présence des herbicides, et à 10g.l^{-1} , la production d'EPS a lieu pendant le premier cycle cellulaire, alors qu'à 30g/l de mannitol la synthèse d'EPS a lieu durant le deuxième cycle cellulaire.

L'augmentation de la concentration en substrat a engendré un décalage de production d'EPS. L'abondance en substrat aurait atténué la concurrence pour la source de carbone entre la croissance et la production d'EPS. Dans tous les cas, le profil de production des EPS à 10g/l est différent de celui obtenu à 30g/l . ces résultats suggèrent que la concentration en substrat serait, au moins, un facteur impliqué dans ce décalage de production.

L'étude des paramètres de croissance de *B. fungorum* souche Bf01, a révélé que cette souche est à croissance rapide. En effet les colonies de *B. fungorum* souche Bf01 cultivées sur gélose nutritive apparaissent après seulement 48h d'incubation. La vitesse de croissance des bactéries telluriques représente un élément important en écologie microbienne. En effet, dans le cas des relations « plantes-bactéries », elle détermine l'aptitude qu'ont certaines bactéries dites à croissance rapide à proliférer rapidement et ainsi coloniser la rhizosphère quand les conditions leurs sont favorables. Ces populations bactériennes sont les premières à s'installer dans la rhizosphère, mais leur maintien dépend de leur pouvoir de compétition et d'adaptation aux différents facteurs abiotiques (Kaci, 2006).

Le temps de génération affiché par *B. fungorum* souche Bf01 sur milieu TSB, est de 3 heures. Le temps de génération (G), correspond au temps nécessaire à la bactérie pour se diviser et est l'inverse du taux de croissance (μ).

Le taux de croissance varie avec l'espèce bactérienne, la nature et la composition du milieu (Perrier *et al*, 1997).

Des souches de *P. fluorescens*, appartenant à un genre apparenté au genre *Burkholderia*, le genre *Pseudomonas*, cultivées sur milieu TSB, accusent un taux de croissance de 0.32 h^{-1} (Delaquis *et al.*, 1989).

En présence du norflurazon et de la prométryne, nous notons une extension du temps de génération, proportionnelle à l'importance de la dose en herbicide testée. L'imposition d'un stress s'accompagne systématiquement d'une réduction du taux de croissance (Dressaire, 2009) et par conséquent une augmentation du temps de génération.

En conditions de stress, l'extension du temps de génération pourrait s'expliquer par le fait que l'adaptation au stress entraîne une vaste réorganisation de la physiologie cellulaire. Cette réponse concerne les niveaux d'ARN messagers et de protéines mais aussi les processus cellulaires majeurs que sont la transcription, la traduction et la dégradation des protéines. (Dressaire, 2009).

Ces observations se référant aux temps de génération sous contrainte du norflurazon et de la prométryne, sont en accord avec les temps de génération prolongés des bactéries du sol cultivées dans des conditions de laboratoire avec le chlorpyrifos (Munazza et al, 2005) et sous stress phénol (Munazza et al., 2004) .

En présence du norflurazon et de la prométryne, la production de biomasse est ralentie. Toutefois, la croissance n'est pas complètement inhibée et les bactéries sont capables de compléter leur cycle de vie.

Que se soit à 10 g.l⁻¹ ou bien à 30 g.l⁻¹ de mannitol , le norflurazon et la prométryne exercent donc un effet inhibiteur sur la croissance de *B. fungorum*. Cette inhibition traduit, une réponse adaptative de *B. fungorum* souche Bf01, qui aboutit à un état de tolérance, et par conséquent à une survie dans un environnement en présence d'une perturbation chimique. Cette inhibition est d'autant plus marquée que les concentrations en herbicides sont plus fortes. Plusieurs travaux ont signalé des résultats similaires en présence d'autres herbicides comme l'atrazine le métolachor, le métobromuron (Cork et Krueger ,1992 ; Taiwo et Oso, 1997 ; Ayansina *et al.*, 2005).

Cette capacité à croître en présence de fortes concentrations en norflurazon et de prométryne, peut être temporaire ou permanente. Le développement de la tolérance aux pesticides est un processus complexe qui se produit tant au niveau physiologique que génétique et les microorganismes ayant développé une résistance aux pesticides sont souvent capables de les dégrader (Kumar *et al.*, 1996).

La résistance temporaire aux herbicides est en grande partie due à des changements physiologiques qui orientent le métabolisme bactérien vers une nouvelle voie métabolique afin de contourner une réaction biochimique inhibée par une substance toxique (Herman *et al.*, 2005).

La résistance permanente par contre, s'établit en raison de modifications génétiques, hérités par les générations bactériennes suivantes (Bellinaso *et al.*, 2003 ; Johnsen *et al.*, 2001). Aux plus faibles concentrations (10⁻⁶ M), la prométryne, stimule la croissance de *B. fungorum* souche Bf01 jusqu'à dépasser légèrement les niveaux de croissance des témoins après 48 h de

culture, ce phénomène a été observé chez *Escherichia coli* en présence d'antibiotiques comme l'amoxicilline, l'acide nalidixique, la netilmicine et la dibécacine (Lobry, 1991).

Deux explications non exclusives de cet effet ,apparemment paradoxal ,ont été avancées :

- les faibles concentrations d'antibiotiques inhibent préférentiellement la croissance des individus ayant un mauvais rendement ce qui améliore le rendement global de la population.
- on apporte avec l'antibiotique un ou plusieurs micro-élément qui augmente le rendement de la croissance, car les cellules peuvent alors faire l'économie des voies de synthèse correspondantes (Lobry,1991).

Nous notons une meilleure prolifération bactérienne à 30g.l⁻¹ qu'avec 10g.l⁻¹. Une plus forte concentration en substrat (30g.l⁻¹) semble atténuer l'inhibition de la croissance causée par les herbicides. Une plus forte concentration en substrat représente une source supplémentaire d'énergie pour les bactéries en situation d'un besoin grandissant pour l'ATP afin d'assurer les réparations nécessaires à la tolérance de ces deux herbicides.

L'utilisation du mannitol après 48h d'incubation en présence du norflurazon et de la prométryne montre que la bacterie consomme plus rapidement le mannitol. Cependant, l'énergie tirée de cette consommation n'est pas totalement dédiée à la croissance, puisque celle-ci enregistre des niveaux bas par rapport aux témoins qui consomment les mêmes quantités en substrat après 72h et 96h respectivement avec 10g.l⁻¹ et 30g.l⁻¹ de mannitol.

L'énergie serait partagée entre :

- La maintenance qui englobe :
 - les mécanismes de tolérance et de détoxification (Chu et Papoutsaki ,1979).
 - la mobilité des cellules.
 - le maintien des gradients transmembranaires des solutés (Huetting, 1979).
 - Le maintien du pH intracellulaire.
 - la production d'EPS qui s'avère compétitive avec la croissance pour le substrat (Looijesteijn et Hugenholtz, 1999). Il est largement admis que la synthèse d'EPS survient en réponse à un stress et que ce dernier agit en inhibant la croissance bactérienne.
- La chute de biomasse au bout de 48h d'incubation, en présence du norflurazon et de la prométryne, pourrait révéler une détérioration des conditions physico-chimiques du milieu, suite à l'apparition dans le milieu de culture, de métabolites toxiques générés par la dégradation des herbicides par *B. fungorum* souche Bf 01.

Les courbes de croissance de *B. fungorum* souche Bf 01 en présence du norflurazon et de la prométryne, évoquent le co-métabolisme. L'allure des courbes de croissance des échantillons traités évoque celle des courbes de croissance observées en cas de dégradation des pesticides par cométabolisme chez *Bacillus circulans* et *Bacillus macerans*, deux souches tolérantes au stress induit par un pesticide, le chlorpyrifos (Savithal et Saraswathi, 2012).

- La deuxième phase de croissance serait due :
 - à l'utilisation des produits de lyse par les bactéries qui ont survécu,
 - à la réutilisation des EPS.
 - à la dégradation des PHB (poly-hydroxy-butyrate) qui est la forme de réserve de substrat carboné majeure chez les *Burkholderia*, que la souche aurait accumulée pendant la phase exponentielle de croissance, sur milieu riche en carbone.

Le norflurazon et la prométryne sont des herbicides qui affectent la plante par le biais d'une fonction physiologique vitale qui est la photosynthèse. Cette étude nous a permis de faire un premier constat sur l'influence de ces deux molécules d'herbicides et leur impact sur la croissance du blé dur : (*Triticum durum* L.) Variété Mohamed Bel Bachir en culture en pots et en hydroponie.

Nous avons noté un effet dépressif des herbicides sur la croissance des plantules du blé dur cultivées en pots et en culture hydroponique, entraînant une réduction de la taille et de la biomasse de la partie aérienne et racinaire. De plus, les racines des plantules stressées sont nettement moins ramifiées que celles des témoins. Ceci peut être lié au déficit de photosynthèse causé par l'application du norflurazon et consécutif à la disparition partielle ou totale des pigments associés à la chlorophylle, ce qui diminue l'accumulation de pool de carbone nécessaire pour la synthèse des protéines.

L'application du norflurazon aux plantules du blé dur entraîne l'apparition des symptômes du « bleaching » ou dépigmentation à partir d'une concentration de 10^{-5} M. Ce sont les concentrations excédant et incluant (10^{-5} M) qui sont suffisantes pour atteindre la cible biochimique du norflurazon : la phytoène desaturase, qui induit le blocage de la synthèse des caroténoïdes. Ceci engendre des espèces radicalaires responsables d'une dégradation membranaire à laquelle s'opposeraient les caroténoïdes, si leur synthèse n'avait pas été bloquée par les fortes doses en norflurazon (10^{-5} M et 10^{-4} M). Des résultats similaires ont été rapportés par Killing en 2010 en testant l'effet du norflurazon sur le blé dur et a rapporté que la dose minimale déclenchant le bleaching est de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Pour la concentration la plus faible utilisée [10^{-6} M], nous n'avons observé aucun symptôme de phytotoxicité chez le blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB. Nous avons même noté un léger effet favorisant la croissance des feuilles et des racines par rapport au témoin. Alors que des doses élevées en norflurazon et de prométryne engendrent un stress oxydatif, les plus faibles concentrations en prométryne augmentent les taux d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la peroxydase (POD), la catalase (CAT), et l'ascorbate peroxydase (APX) chez le blé (Xiao *et al.*, 2008).

Un effet similaire de l'herbicide « aclonifen » sur les plants de blé dur, a été noté par Kiling en 2010. La dose 10^{-6} M représenterait une dose « d'alarme » pour la plantule de blé dur.

En culture hydroponique, la réduction de la croissance pour les doses 10^{-4} et 10^{-5} M est plus marquée qu'en culture en pots, cela pourrait être lié à une plus forte « concentration réelle » en norflurazon parvenant à la plante. En effet, dans le sol, une quantité non négligeable des herbicides apportés reste adsorbée aux particules de sol. Ces herbicides ne se retrouvant pas dans la solution de sol, échapperaient ainsi aux interactions avec la plante.

Dans le cas de la prométryne et contrairement au norflurazon les symptômes morphologiques ne sont pas très visibles, sauf qu'à 10^{-4} M la réduction de la taille aérienne à forte concentration d'herbicide, serait probablement due à une accumulation des formes actives d' O_2 (O_2 singulet) due à une réduction de la capacité photosynthétique. Cette accumulation d' O_2 singulet aurait pour conséquence une destruction des thylakoïdes, et par conséquent l'inhibition de la synthèse des pigments photosynthétiques.

Avec la prométryne les taux d'inhibition significatifs de la croissance s'opèrent à partir d'une dose de 10^{-4} M. De ce fait le norflurazon s'avère plus toxique pour la plante que la prométryne. La tolérance peut être estimée à partir de la concentration minimale inhibitrice « CMI », plus la CMI est grande, meilleure est la tolérance. Jiang et Yang en 2009, ont indiqué que la CMI de la prométryne pour le blé dur (*Triticum aestivum*) est de $0.84 \cdot 10^{-4}$ M.

L'inoculation des plantules de blé dur traitées aux différentes doses en norflurazon et en prométryne, a révélé un effet positif sur la croissance du blé dur. Cet effet s'est fortement manifesté aux doses phytotoxiques (10^{-4} et 10^{-5} M) notamment, l'amélioration de la croissance de la partie racinaire, ce qui a engendré un rapport PR/PA très significativement élevé. Ceci permettrait une meilleure absorption des éléments nutritifs par le blé, avec pour conséquence une amélioration de la croissance.

Cet effet promoteur de la croissance serait directement lié à la présence de la bactérie ou indirectement par le biais de la plante.

Chez les plantules témoin et les plantules traitées avec la concentration de 10^{-6} M, l'état physiologique du blé dur est relativement bon. Cela veut dire que ces conditions permettent une bonne photosynthèse qui engendre un pool de carbone important vers la rhizosphère « rhizodéposition » qui mène à une prolifération de l'inoculum et par conséquent à une colonisation des racines de blé. Ceci nous conduit à conclure que les phénomènes de compétition entre populations microbiennes autochtones et allochtones ne constituent pas un obstacle à l'installation et au maintien de *B. fungorum* dans la rhizosphère du blé dur. De plus, il a été établi que les bactéries PGPR augmentent le flux d'exsudation de la plante avec laquelle elles interagissent.

Plusieurs espèces du genre *Burkholderia* ont été signalées comme promotrices de la croissance végétale (Conye et Vandamme, 2003). Ces traits PGPR sont essentiellement attribués à la capacité de ces bactéries à solubiliser le phosphate, à fixer l'azote atmosphérique par certaines *Burkholderia* diazotrophes dans la rhizosphère du blé dur (Ben Mahmud, 2008) ou symbiotique (Chen *et al.*, 2004), à l'activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylase (ACC)-désaminase (Shaharoon *et al.*, 2007), à la synthèse d'hormones de croissance (auxines et cytokinines) ainsi qu'au biocontrôle (Ait Barka, 2002).

En présence d'herbicides aux concentrations de 10^{-4} M et 10^{-5} M, l'inoculation conduit à une augmentation très significative du rapport PR/PA, notamment aux doses phytotoxiques (10^{-4} M et 10^{-5} M). L'interaction « plantes stressées – *B. fungorum* » a fortement atténué l'effet dépressif du norflurazon et de la prométryne sur la croissance du blé dur. Ceci pourrait s'expliquer par plusieurs voies :

- Partant du fait que les herbicides stimulent la biosynthèse des EPS chez *B. fungorum*, cette bactérie aurait produit des EPS qui auraient adsorbés les herbicides ainsi cette gangue muqueuse réduirait les quantités du norflurazon et de la prométryne disponibles dans la rhizosphère. Par conséquent les concentrations en herbicides « actives » seraient inférieures à celles déclenchant les symptômes de phytotoxicité, atténuant ainsi le stress oxydatif causé par les herbicides.
- L'interaction « *B. fungorum* – blé dur (*Triticum durum* L.) var. M.B.B » pourrait contribuer à l'amélioration de l'état physiologique de la plante. Il a été montré que l'inoculation du blé dur soumis au stress salin par *Pseudomonas sp.* réduit considérablement les effets du stress à travers la stimulation de l'activité de deux enzymes antioxydantes du blé la Glutathion réductase GR et acrobate peroxydase l'APX (Hasnain et Sabrai, 1996).

- L'interaction « *B.fungorum* –blé dur (*Triticum durum* L.) var. MBB », aurait agit en améliorant l'absorption des éléments minéraux. Il a été montré que les bactéries PGPR améliorent de façon très significative l'absorption minérale (N, P, K, Ca et Na) de la laitue sous conditions de stress, comparée au témoin non stressé (Vivas *et al.*, 2003).

Le norflurazon et la prométryne auraient subi une biodégradation qui serait attribuée à un consortium bactérien, puisque dans la nature les biofilms hétérogènes sont très majoritaires, favorisant les phénomènes de synergie et de syntrophie et les échanges génétiques qui augmenteraient les performances des différentes bactéries au sein du biofilm.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier l'effet de deux herbicides le norflurazon et la prométryne sur la formation de biofilm et la production d'exopolysaccharides par *B. fungorum* souche Bf01 dans le but de mettre en évidence et d'évaluer un éventuel effet PGPR de cette bactérie sur la croissance du blé dur (*Triticum durum*) variété Mohamed Belbachir. Cette étude nous a permis de mieux connaître le comportement de *B. fungorum* souche Bf01 face à une situation de stress générée par deux herbicides le norflurazon et la prométryne.

Les résultats obtenus ont montré la capacité de *B. fungorum* souche Bf01 à former un biofilm sur la surface « verre ». Cette bactérie n'en fait pas une exception, puisque le genre *Burkholderia* renferme de nombreuses espèces ayant cette stratégie d'adaptation aux contraintes du milieu.

Le stress chimique provoqué par le norflurazon et la prométryne stimule la formation de biofilm en tant que mécanisme de protection des bactéries contre les agressions du milieu, traduite par une précocité de production de biofilm mature par rapport au témoin non traité. La production d'EPS a également été favorisée en présence des deux herbicides étudiés.

Les résultats ont également montré que *Burkholderia fungorum* souche Bf01 est tolérante au norflurazon et à la prométryne. Cette tolérance s'est traduite par persistance de cette souche, même si une baisse de production de biomasse a été observée.

L'effet de la concentration en substrat indique une stimulation de la croissance et de la production d'EPS, atténuant ainsi l'effet inhibiteur du norflurazon et de la prométryne sur la croissance.

Les biofilms formés en présence de 10g.l^{-1} sont quantitativement comparables à ceux formés avec 30g.l^{-1} de mannitol, contrairement aux EPS, où la quantité produite en présence de 30g.l^{-1} de mannitol est beaucoup plus importante que celle produite en présence de 10g.l^{-1} .

Comme pour la production d'EPS, celle des cellules planctoniques ayant participé à la formation du biofilm est également plus importante à 30g.l^{-1} de mannitol qu'à 10g.l^{-1} de mannitol.

Burkholderia fungorum souche Bf01 a montré un effet PGPR sur la croissance du blé dur (*Triticum durum*) variété Mohamed Belbachir. Cet effet promoteur de la croissance du blé serait le résultat de multiples facteurs agissant simultanément notamment ceux liés à la capacité de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 à former le biofilm, à produire des EPS, à tolérer le norflurazon et la prométryne, mais aussi à sa vitesse de prolifération lui attribuant un pouvoir compétitif avec les bactéries indigènes pour la colonisation des racines du blé dur.

Par sa capacité à produire des EPS, à former des biofilms et à tolérer le norflurazon et la prométryne, *Burkholderia fungorum* souche Bf01 représenterait un agent potentiel dans l'entretien du capital sol. L'utilisation de cette souche en bioremédiation pourrait s'inscrire dans le sens du développement durable.

Perspectives :

La rhizosphère du blé dur étant réputée pour héberger des espèces bactériennes bénéfiques pour la croissance du blé dur, il serait intéressant de :

- évaluer la part de la contribution du biofilm à l'effet PGPR.
- Exploitation du potentiel de bioremédiation de *Burkholderia fungorum* souche Bf01 dans la dépollution des sols contaminés, notamment par le norflurazon et la prométryne.

Bibliographie

- **Abrous O., Benhassaine-Kesri G., Tremolieres A., and Mazliak P. (1998)** - Effect of norflurazon on lipid metabolism in soya seedlings. *Phytochemistry*. **49**: 979–985.
- **Adetunji V.O. and Adegoke G.O. (2008)** - Formation of biofilm by strains of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese 'wara' and its processing environment. *African Journal of Biotechnology*. **7 (16)**: 2893– 2897.
- **Ahemad, M. and M.S. Khan (2010 a)** - Phosphate-solubilizing and plant-growth-*Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves greengram performance in quizalafop-p-ethyl and clodinafop amended soil. *Arch. Environ. Contam. Toxic.* **58**: 361-372.
- **Ahemad M. and Khan M.S. (2010 b)** - Toxicological effects of selective herbicides on plant growth promoting bacteria: *Enterobacter* PS souche asburiae. *Res.J. Microbiol.* **5**: 849-857.
- **Ait Barka E., Belarbi A., Hachet C., Nowak J. and Audran J.C. (2000)** - Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **186**: 91-95.
- **Ait Barka E., Gognies S., Nowak J., Audran J.C. and Belarbi A. (2002)** - Inhibitory effect of bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*. **24**: 135-142.
- **Alasdair M.C and Ralf H. (1982)** -Ametryne and Prometryne as Sulfur Sources for Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **43(4)**: 781-786.
- **Avella-Vasquez A.C. (2010)** -Substances polymériques extracellulaires dans les procédés de traitement des eaux usées. Université de Lorraine. Thèse doctorat. **233pages**.
- **Ayansina A.D.V. and Oso B.A. (2006)** - Effect of two commonly used herbicides on soil microflora at two different concentrations. *African Journal of Biotechnology*. **5 (2)**: 129-132.

- **Bais H.P., WEIR T.L., Perry L.G., Gilroy S. and Vivanco J.M. (2006)** -The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev. Plant Biol.* **57**: 233-266.
- **Bartels P. G., Watson C. W. (1978)** - Inhibition of carotenoid synthesis by fluridone and norflurazon. *Weed Sci.* **26**: 198-203.
- **Bartholdson J.S., Brown A.A.R., Mewburn B.R., Clark D.J., Fry S., Campopiano D.J, and Govan J.R.W. (2008)** - Plant host and sugar alcohol induced exopolysaccharide biosynthesis in the *Burkholderia cepacia* complex. *Microbiology.* **154(8)**: 2513-21.
- **Bashan Y. and de-Bashan L.E. (2010)** - How the Plant Growth-Promoting *Bacterium Azospirillum* Promotes Plant Growth- A Critical Assessment. **Advances in Agronomy.** **108**: 77-136.
- **Bazot S. and Lebeau T. (2009)** - Effect of immobilisation of a bacterial consortium on diuron dissipation and community dynamics. *Bioresource Technology.* **100**: 4257-4261.
- **Beauregard M.S. (2010)** - Impacts de la fertilisation phosphatée sur la biodiversité microbienne de sols agricoles. Université de Montréal. Thèse doctorat .188 pages.
- **Ben Mahmud M. T. (2008)** - The effect of *Burkholderia* as biofertiliser on cereal productivity. (Al-Fateh University) Tripoli, Libya. Thèse doctorat. 208 pages.
- **Beech I.B., Sunner J. (2004)** - Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15** : 81-186.
- **Bellaniso M.D., Greer C.W., Peralba M.C., Henriques J.A.P et Gaylarde C.C. (2003)** -Biodégradation de l'herbicide trifluraline par des bactéries isolées à partir du sol. *FEMS Microbiol.Ecol.* **43**: 191-194.
- **Bergmaier D. (2002)**- Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus. rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum . Thèse doctorat. Université Laval(Canada).171pages.
- **Blanchart E., Achouak W., Albrecht A., Barakat M., Bellier G., Cabidoche Y.M., Hartmann C., Heulin T., Larré-Larrouy C., Laurent J-Y., Mahieu M., Thomas F., Villemin G. et Watteau F. (2000)** - Determinants biologiques de l'agrégation dans les vertisols des petites Antilles. Conséquences sur l'érodibilité. *Etudes et gestion des sols.* **7(4)**: 309-328.

- **Bonilla M., Olivaro C., Corona M., Vazquez A., Soubes M. (2005)** - Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 456-463.
- **Borneman J. (2004)** - What is the evidence for the loss of microbial diversity? In: *Microbial diversity and bioprospecting.* (A. T. Bull, ed.), ASM Press, Washington, DC: 421-423.
- **Boulangé -Petermann L. (1996)** - Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. *Biofouling.* **10** : 275-300.
- **Bouziani M. (2007)** - Le guide de la médecine et de la santé en Algérie. L'usage immodéré des pesticides : De graves conséquences sanitaires. *Faculté de Médecine d'Oran* .
- **Bradford M.M. (1976)** - A rapid and sensitive method for the quantitation of the micrograms quantities of proteines utilising, the principal of protein-dye bilding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- **Briandet R., Herry J. and Bellon-Fontaine M. (2001)** - Determiation of the van der waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static gram positive microbial biofilms. *Colloids and Surface B. Biointerface.* **21**: 299-310.
- **Burton E., Yakandawala N., Lo-Vetri K. and Madhyastha M.S. (2007)** - A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 1-4.
- **Busse, M. D., Ratcliff, A. W., Shestak, C. J., and Powers, R. F. (2001)** - Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry.* **33**: 1777-1789.
- **Buyanovsky G.A., Kremer R.J. , Gajda A.M ,Kazemi H.V. (1995)** - Effects of corn plants and rhizosphere populations on pesticide degradation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **55**: 689-696.
- **Calibrix R. (2005)** - Impact des intrants organiques et des conduites culturales sur la biomasse microbienne et la diversité des bactéries telluriques.Université de Rouen. Thèse doctorat .168 pages.
- **Calvayrac C. (2011)** -Dégradation biologique de la sulcotrione dans un sol agricole : Recherche d'une éventuelle biodégradation accélérée et caractérisation de souches bactériennes potentiellement dégradantes. Université de Perpignan. Thèse de doctorat. 269pages.

- **Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Liompart C.M., Alberti S. and Bengoechea J.A. (2004)** - Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* . **72**: 7107-7114.
- **Carvalho MF., Vasconcelos I., Bull AT. and Castro PM. (2001)** - A GAC biofilm reactor for the continuous degradation of 4-chlorophenol: treatment efficiency and microbial analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 419–426.
- **Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M. and Topisirovic L. (1994)** - Carbon source requirement for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and spatial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3914-3919.
- **Champagne C., Gardner N.J., Lacroix C. (2007)** - Fermentation technologies for the production of exopolysaccharides synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures. *Electronic Journal of Biotechnology.* **10 (2)**: 211-220.
- **Characklis W.G. (1990)** - Microbial fouling. Dans "Biofilms". Characklis W.G., Marshall K.C. Ed. Wiley, New York. 523-584.
- **Chen W.M., James E.K., Coenye T., Chou J. H., Barrios E., de Faria S.M., Elliott G.N., Sheu S.Y., Sprent J.I. and Vandamme P. (2006)** - *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **56**: 1847-1851.
- **Chu I.M. and Papoutsakis E.T. (1987)** - Growth dynamics of a methylotroph (*Methylomonas* L3) in continuous culture. II. Growth inhibition and comparison against an unstructured model. *Biotechnology & Bioengineering.* **29**: 65-71.
- **Conye T. and Vandamme P. (2003)** - Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* **5(9)**: 719-29.
- **Cork D.J and Kruger J.P. (1992)** - Pesticide biodegradation .In *Encyclopedia of Microbiology.* (Ledenberg, j-ed). **3**: 357-361.
- **Costerton J.W., Irvin R.T., and Cheng K.J. (1981)** - The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.
- **Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999)**- Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**: 1318-1322.
- **Czacyk K. and Myszka K. (2007)** - Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. *Polish J. of Environ. Stud.* **16(6)**: 799-806.

- **Davey M.E. and O'toole G.A. (2000)** - Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(4)**: 847–867.
- **Danhorn T. and Fuqua C. (2006)** - Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 401-22.
- **De Beer D., Stoodley P. and Lewandowski Z. (1995)** - Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 1131–1138.
- **Delaquis P.J., Caldwell D.E., Lawrence J.R. and McCurdy A.R. (1989)** - Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress. *Microbial Ecology.* **18**: 199-210.
- **Dellil A. (2007)** - Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution. Université de Lille. Thèse doctorat. 240 Pages.
- **Di Baccio D., Quartacci M.F., Dalla Vecchia F., La Rocca N., Rascio N. and Navari-Izzo F. (2002)** - Bleaching herbicide effects on plastids of dark-grown plants: lipid composition of etioplast in amitrole and norflurazon-treated barley leaves. *J. Exp. Bot.* **53(376)**: 1857-1865.
- **Djordjevic D., Wiedmann M. and McLandsborough L.A. (2002)** - Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology.* **68**: 2950–2958.
- **Donlan R.M. (2002)** - Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8(9)**: 881-90.
- **Donlan R.M. and Costerton J.W. (2002)** - Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 167-193.
- **Dressaire C. (2009)** - Comprendre l'adaptation de *Lactococcus lactis* par une approche de biologie intégrative à l'échelle du génome. Toulouse. Thèse doctorat. 284 pages.
- **Dudman W.F. (1964)**-Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. *Journal of Bacteriology.* **88**: 640-645.
- **Duguid J.P. et Wilkinson J.F. (1953)**-The influence of cultural conditions on polysaccharides production by *Aerobacter aerogenes*. *J. of Gen. Microbiol.* **(9)**: 174-189.

- **Dunne WM.JR (2002)**-Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15(2)**: 155-66.
- **Eberl L., Christiansen G., Molin S., and Givskov M. (1996)** - Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *J. Bacteriol.* **178**: 554-559.
- **Eder F.A. (1979)**-Pyridazinones: their influence on the biosynthesis of carotenoids and metabolism of lipids in plants. *Z. Naturforsch.* **34C**: 1052-1054.
- **El Fantroussi S., Verschuere L., Verstraete W. and Top E.M. (1999)** - Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**: 982-988.
- **El-Sebai T., Devers M.,Lagacherie B.,Rouard N.,Soulas G.,Martin Laurent F. (2010)**-Diuron moneralisation in a mediterranean vineyard soil :impact of moisture content and temperature *.Pest Management Science.* **66(9)**: 988-995.
- **Ferreira A.S., Leitao J.H., Sousa S.A., Cosme A.M., and Moreira M. (2007)** - Functional Analysis of *Burkholderia cepacia* Genes *bceD* and *bceF*, Encoding a Phosphotyrosine Phosphatase and a Tyrosine Autokinase, Respectively: Role in Exopolysaccharide Biosynthesis and Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73(2)**: 524–534.
- **Ferreira A.S, Leitao J.H., Silva I.N., Pinheiro P.F., Sousa S.A., Ramos C., and Moreira L.M. (2010)**- Distribution of Cepacian Biosynthesis Genes among Environmental and Clinical *Burkholderia* Strains and Role of Cepacian Exopolysaccharide in Resistance to Stress Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **76(2)**: 441–450.
- **Filloux A. et Vallet I. (2003)** - Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine / Sciences.* **19**: 77– 83.
- **Filloux A. et Ventre I. (2006)** - Two sensors to control bacterial life style: The choice between chronic or acute infection.*Medecine sciences.* **22 (10)**: 811-814.
- **Flemming H.C. and Wingender J. (2002)** - Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology.* **3**: 1223-1231.Wiley, New York, NY.
- **Flemming H.C., Neu T.R.and Wozniak D.J. (2007)** - The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells. *Journal of Bacteriology.* **189(22)**: 7945-7947.

- **Fusconi R, Godinho M.J.L. (2002)** - Screening for exopolysaccharide –producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Braz. J. Biol.* **62(2)**: 363-369.
- **Fusi P. (1991)** - Adsorption et décomposition catalytique des pesticides sur les minéraux argileux. XXI Congrès du Groupe Français des Pesticides, Nancy 22- 23 mai 1991. 31-44.
- **Gavin P R., Merino S., Altarriba M., Canals R., Shaw J.G., Tomás J.M. (2003)** - Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas spp.* *FEMS. Microbiol. Lett.* **224**: 77-83.
- **Gharzouli R., Benahmed A., Benhizia Y. and Benguedouar A. (2012)** - Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sullae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. *African Journal of Microbiology Research.* **6(30)**: 5940-5946.
- **Gjermansen M., Ragas P. and Stenberg C. (2005)** - Characterisation of starvation-induced dispersion on *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**: 894-904.
- **Gregory, P. (2006)**-Plant Roots: Growth, Activity and Interaction with Soils (Oxford, Blackwell Publishing). *Ann Bot.* **100(1)**: 151–152.
- **Hansen R.S et Phillips J.A. (1984)** - Chemical composition dans « Manuel of methods for general bacteriology ».Gerhard.P.(Ed.).*American Society for Microbiology.*Washington DC: 264-328.
- **Hasnain S. and Sabri A.N. (1996)** - Growth stimulation of Triticum aestvum seedlings under Cr-stress non-rhizospheric *Pseudomonas* strains. In: Abstract Book of 7th Int. Symp. On Nitrogen Fixation with Non- legumes. *Faisalabad*, Pakistan, pp. 36.
- **Hattori T. (1973)** - Microbial Life in Soil. Marcel Dekker, New York.
- **Hausner M. and Wuertz S. (1999)** - High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(8)**: 3710-3713.
- **Hebbar P., Davey A.G., Merrin J., McLoughlin T.J. and Dart P.J. (1992)** - *Pseudomonas cepacia*, a potential suppressor of maize soil borne diseases: seed inoculation and maize root colonization. *Soil .Biol. Biochem.* **24**: 999–1007 .
- **Heulin T., Berge O,Gouzou L.,Hebbar P., and Balandreau J. (1994)**-*Bacillus Polymyxa* and *Rahnella aqualilis* ,the dominant N₂-fixing bacteria associated with wheat roots in french soils.*Eur.J.Soil.Biol.* **30**: 35-42.
- **Herman P.L,Behrens M.,Chakraborty S.,Chrastil B.M., Barycki J., Weeks D.P.(2005)** - A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas*

- maltophilia*, strain DI-6:gene isolation, characterization, and heterologous expression. *J.Biol.Chem.* **280**: 24759-24767.
- **Hernández M., Villalobos P., Morgante, V., González M., Reiff C., Moore E. and Seeger, M. (2008)** - Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from agricultural soil of central Chile, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**: 184-190.
 - **Hess F. D. (2000)** - Light-dependent herbicides. *Weed Science.* **48(2)**: 160-170.
 - **Hiltner L. (1904)** - Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arb. Deut. Landw. Gesell.* **98**:59-78.
 - **Holtze M., Sorensen S., Sorensen J. and Aamand J. (2008)** - Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments--insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. *Environmental Pollution.* **154**: 155-168.
 - **Huetting S., Delange T. and Tempest D.W. (1979)** - Energy requirement for maintenance of the transmembrane potassium gradient in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 : a continuous culture study. *Archives of Microbiology.* **123**: 183-188.
 - **Hunter-Cevera J.C. (1998)**-The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology.* **1**: 278-285.
 - **Ismail B.S. and Jokhay O. (1995)** - Effect of glufosinate ammonium on microbial population and enzyme activities in soils. *Microbios.* ISSN 0026-2633.Coden MC Bial : **83(336)** : 185-190.
 - **Ishida K.T. and Griffiths P.R. (1990)** - Adsorption of proteins and polysaccharides at aqueous solid interfaces by infrared internal reflection spectrometry. *Acs. Symp. Ser.* **447**: 208-224.
 - **Jana T.K., Srivastava A.K., Csery K. and Arora D.K. (2000)**- Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Canadian Journal of Microbiology.* **46**: 28-37.
 - **Jefferson K.K. (2004)** - What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters.* **236**: 163-173.
 - **Jiang L. and Yang H. (2009)** - Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. *Ecotoxicol. Environ Saf.* **72(6)**: 1687-93.

- **Johnsen K., Jacobsen C., Torsvik V. and Sørensen J. (2001)** - Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. *Biology and Fertility of Soils*. **33** : 443-453.
- **Karaali K. (2012)**-Effet de deux herbicides (Norflurazon, prométryne) sur la croissance et la nodulation de l'arachide (*Arachis hypogea* L.).USTHB (FSB) .Thèse de Magister.
- **Kaci Y.,Heyraud A.,Barakat M. and Heulin T. (2005)** - Isolation and identification of an EPS-producing Rhizobium strain from arid soil (Algeria) :characterisation of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure.*Research in Microbiology*. **156**: 522-531.
- **Kaci Y. (2006)** - Les bactéries productrices de polysaccharides dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*) : effet sur l'agrégation du sol. USTHB.FSB.Thèse doctorat.201pages.
- **Kaci Y. et Heulin T. (2008)** - Les polysaccharides bactériens : un moyen d'améliorer la capacité de rétention d'eau des sols. *Revue des régions arides*. **21**: 1159-1166.
- **Kersante A. (2003)** - Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré. Université de Rennes .Thèse doctorat. 201pages.
- **Kerstens K., Ludwig W., Vancanneyt M., Vos P. D., Gillis, M. and Schleifer, K. H. (1996)** - Recent changes in the classification of the *Pseudomonads*: an overview. *System. Appl. Microbiol.* **19**: 465-477.
- **Killing O. (2010)**- Etude du mode d'action et du devenir d'un herbicide : l'aclonifen. Université de Grenoble. Thèse doctorat. 240 pages.
- **Kirov S.M., Castrision M. and Shaw J.G. (2004)** - *Infect. Immun.* **72**: 1939-1945. In thèse Tremaroli.
- **Kodjikian L., Roques C., Pellon G., Renaud F., Hartmann D., Freney J. and Burillon C. (2006)** - Bacterial adhesion to intraocular lenses and endophthalmitis prevention: review of the literature. *J. Fr. Ophtalmol.* **29**: 74-81.
- **Kokare C.R. and Chakraborty S. (2009)** - Biofilm: Importance and applications.*Indian Journal of Biotechnology*. **8**: 159-168.
- **Kuchma S.L, Connolly J.P. and O'Toole G.A. (2005)** - A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 1441-1454.

- **Kumar S., Mukerji K.G. et Lal R. (1996)** - Aspects moléculaires de la dégradation des pesticides par les microorganismes. *Crit.Rev.Microbiol.* **22**: 1-26.
- **Kwang K .Y, Frank J. F. (1995)** - Effect of Nutrients on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel. *International Journal of food Microbiology.* **26**: 147–164.
- **Lahaye E. (2006)** - Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. Université de Bretagne. thèse doctorat. 152Pages.
- **Li Q., Lee A.H. and Wollum A.G. (2004)** - Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. *Soil Biology and Biochemistry.* **36**: 571-579.
- **Liphadzi K.B., Al-Khatib K., Bensch C.N., Stahlman P.W., Dille S.J., Todd T., Rice C.W., Horak M.J. and Head G. (2005)** - Soil microbial and nematode communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. *Weed Science.* **53**: 536-545.
- **Little B. and Jacobus J. (1984)** - A comparison of two techniques for the isolation of adsorbed dissolved organic material from seawater. *Org. Geochem.* **5**: 1-6.
- **Lobry J.R. (1991)** - Re-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Université de Lyon I. Thèse de doctorat 177pages.
- **Looijesteijn P.J. and Hugenholtz J. (1999)** - Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *J. Biosci. Bioengin.* **88**: 178-182.
- **Looijesteijn P.J., Trapet L., de Vries E., Abee T. and Hugenholtz J. (2001)** - Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food. Microbiol.* **64**: 71-80.
- **Lugtenberg B.J.J, Kravchenko L. Vand Simons M. (1999)** - Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* **1**: 439–446.
- **Lugtenberg B.J.J., Chin-A-Woeng T.F. and Bloemberg G.V. (2002)** - Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**: 373–383.
- **Mercan N.D., Kantar C., Gulcan S., Dodge J.C. ,Yilmaz C.B. and Mehmet A.M. (2011)** - Chromium(VI) Bioremoval by *Pseudomonas* Bacteria: Role of Microbial

- Exudates for Natural Attenuation and Biotreatment of Cr(VI) Contamination. *Environ. Sci. Technol.* **45(6)**: 2278-2285
- **Molobela I.P. and Ilunga F.M. (2012)** - Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. *Ann. Microbiol.* Published on line 10septembere 2011.
 - **Morgan J.A.W., Bending G.D. and White P.J. (2005)** - Biological costs and benefits to plant– microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany.* **56** : 1729 -1739.
 - **Munazza A., Noor N., Rasool S.A. and Khan S.A. (2004)** - Phenol resistant bacteria from soil: identification-characterization and genetical studies. *Pak.J.Bot.* **36(2)**: 415-424.
 - **Munnaza A., Nusrat J., Shahida A. and Rasool S.A. (2005)** - Chlorpiryphos resistant bacteria from PPakistani soils: Isolation, identification, resistance profile and growth kinetics. *Pak. J. Bot.* **37(2)**: 381-388.
 - **Oh Y.J., Jo W. (2007)** - Biofilm formation and local electrostatic force characteristics of *Escherichia coli* 0157:H7 observed by electrostatic microscopy. *Appl. Phys. Letters.* **90**: 143901.
 - **O'Toole G.A., Kaplan H., and Kolter R. (2000)** - Biofilm formation as microbial development. *Annu .Rev. Microbiol.* **54**: 49–79.
 - **O'Toole G.A. and Stewart P.S. (2005)**- Biofilms strike back. *Nature Biotech.* **23**: 1378–1379.
 - **Ouattara B., Savadago P. W., Traore O., Koulibaly B., Sedogo M.P. et Traore A. (2010)** - Effet des pesticides sur l'activité microbienne d'un sol ferrugineux tropical du Burkina Faso. *Cameroon Journal of Experimental Biology.* **6(1)** :11.
 - **Qureshi N.B.A., Annous T.C.E., Karcher P., Maddox I.S. (2005)**- Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microb. Cell. Fac.* **4**: 1-21.
 - **Pal R., Chakraborty S. and Chowdhury A. (2006)** - Degradation and effects of pesticides on soil microbiological parameters-A review. *Int. J. Agric. Res.* **1**: 240-258.
 - **Pembrey R.S., Marshall K.C. and Schneider R.P. (1999.)**- Cell surface analysis techniques:what do cell preparation protocols do to cell surface properties? *App. Env. Microbiol.* **65(7)**: 2877-2894.

- **Perrier R., Auffret vanderkemp T. et Zonszain F. (1997)** - Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques .d'après Google Books htm: croissance bactérienne par spectrophotométrie.
- **Perumbakkam S., Hess T.F. Ronald L. and Crawford R.L . (2006)** - A bioremediation approach using natural transformation in pure-culture and mixed-population biofilms. *Biodegradation* . **17**: 545.
- **Pietramellara J., Ascher M. T., Ceccherini G. et Renella G. (2002)** - Soil as a biological system. *Annals of Microbiology*. **52**: 119-131.
- **Ponce B.L., Latorre V.K., Gonzalez M. , Seeger M. (2011)** - Antioxidant compounds improved PCB degradation by *Burkholderia fungorum* souche LB400. *Enzyme and Microbial Technology*. **49**: 509-516.
- **Rice S.A., Koh K.S., Queck S.Y., Labbate M., Lam K.W., Kjelleberg S. (2005)** - Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol* .**187**(10): 3477-85.
- **Rinaudi L., Fujishige N.A. ,Hirsch M.A. ,Banchio E. ,Zorreguieta A. and Giordano W. (2006)** - Effect of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research on Microbiology*. **157**: 867-875.
- **Rittmann B.E. (2007)** - The role of biotechnology in water and wastewater technology. *Water Sci. Technol.* in press.
- **Rochex A., and Lebeault J.M. (2007)** - Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. *Water. Res* **41**: 2885-2892.
- **Rousseaux S., Hartmann A. and Soulas G. (2001)** - Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **36**: 211-222.
- **Rubio C. (2002)** . Compréhension des mécanismes d'adhésion des Biofilms en milieu marin en vue de la Conception de nouveaux moyens de prévention. Université paris 6. Thèse doctorat. 216 pages.
- **Rudrappa T., Quinn W.J., Stanley-Wall N.R. and Bais H.P. (2008)** – A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*. **226**: 283-297

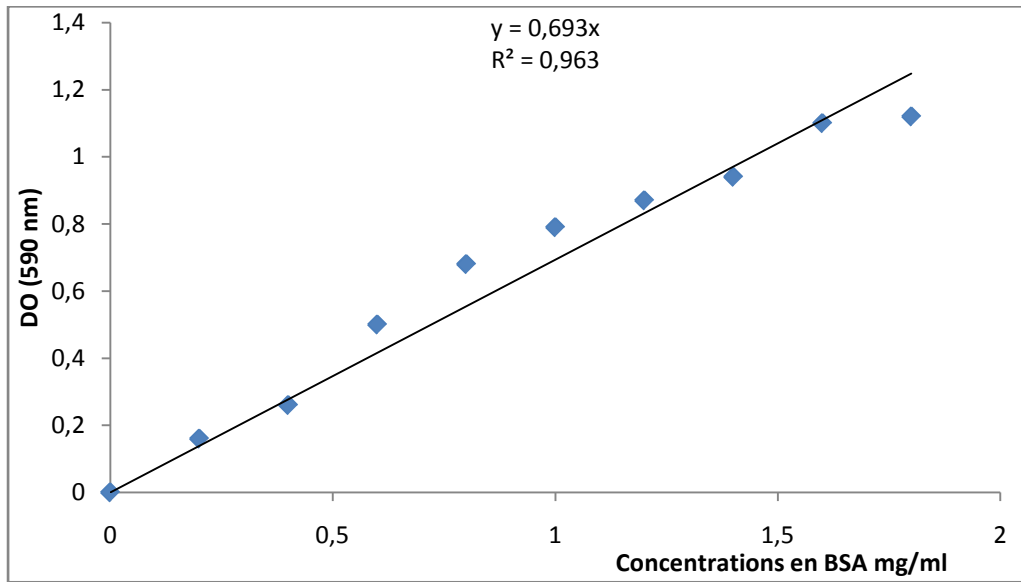
- **Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Par´e PW and Kloepper J.W. (2003)** - Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 4927–4932.
- **Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W. and Par´e PW. (2004)** - Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* **134**: 1017–1026.
- **Sabater S., Guasch H., Ricart M., Romaní A., Vidal G., Klünder C. and Schmitt-Jansen M. (2007)** - Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**: 1425-1434.
- **Santaella C., Schue M., Berge O., Heulin T. and Achouak W. (2008)** - The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environ. Microbiol.* **10(8)**: 2150-2163.
- **Sauer K. and Camper AK. (2001)** - Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* **183**: 6579-6589.
- **Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. (2002)** - *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology.* **184**: 1140-1154.
- **Sauer K. (2003)** - The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* **4**: 219.
- **Savin M.C and Amador J.A. (1998)** - Biodegradation of norflurazon on a bog soil. *Soil Biol. Biochem.* **30(3)**: 275-284.
- **Savitha K. and Saraswathi R.D.N. (2012)** - Isolation, Identification, Resistance profile and Growth kinetics of Chlorpyrifos resistant Bacteria from Agricultural soil of Bangalore. *Research in Biotechnology.* **3(2)**: 08-13.
- **Serrato R.V., Sasaki G.L., Cruz L.M., Pedrosa F.O., Gorin P.A.J. and Laconini M. (2006)** - Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Canadian Journal of Microbiology.* **52**: 489-493.

- **Sexstone A.J., Revsbech N.P., Parkin T.B. and Tiedje J.M. (1985)** - rates in soil aggregates. Direct measurement of oxygen profiles and denitrification. *Soil Science Society of America Journal*. **49**: 645–651.
- **Scheunert I. (1992)** - Transformation and degradation of pesticides in soil. In : Terrestrial behavior of pesticides. *Chemistry of Plant Protection*. Springer-Verlag, Berlin. **8**: 77-103.
- **Schnider-Keel U., Lejbolle K.B., Baehler E., Haas D. and Keel C. (2001)** - The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5683-5693.
- **Shaharoon B., Jamro G. M., Zahir Z. A., Arshad, M. and Memon, K. S. (2007)** - Effectiveness of various *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia caryophylli* containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiology and Biotechnology*. **17**: 1300-1307.
- **Sheng G.P., Han-Qing Y., Zheng-Bo Y. (2005)** - Production of extracellular polymeric substances from *Rhodopseudomonas acidophila* in the presence of toxic substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **69** (2): 216-222.
- **Simos M., Cleto S., Pereira M.O. and Viera M.J. (2007)** - Influence of biofilm composition on the resistance to detachment. *Water. Sci. Technol.* **55(8-9)**:473-80.
- **Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B. (2003)** - Biofilm formation at the air liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* **50**: 15-27.
- **Stanley N.R. and Lazazzera B.A. (2004)** - Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Microbiol.* **52**: 917–924.
- **Staudt A. (2009)**-Identification of environmental factors critical to the production of exopolysaccharides by *Rhizobium tropici*. These Master . University of Notre Dame.
- **Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002)** - Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187–209.
- **Soulas G. (2004)** - Soulas Guy Copyright Académie d’Agriculture de France. Séance du 24 novembre 2004.
- **Taiwo L.B. and Oso B.A. (1997)** - The Influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P-release under laboratory conditions. *Agric. Ecosystem and Environ.* **65**: 59-68.

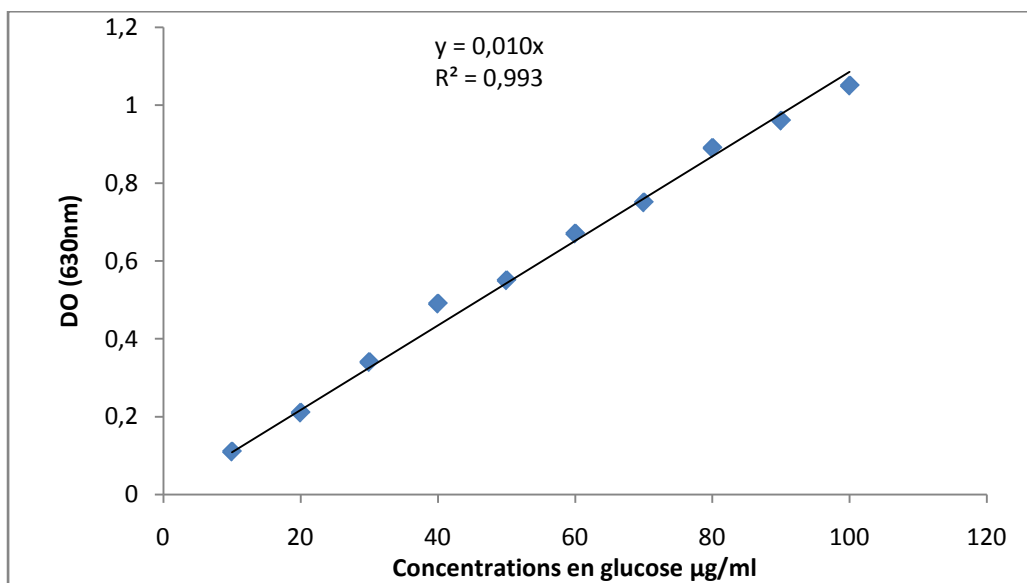
- **Timmusk S., Grantcharova N. and Wagner E.G.H. (2005)** - *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7292-7300.
- **Tissut M. et Severin F. (1984)** - Plantes, herbicides et désherbage. Association de coordination technique agricole ACTA. 252 p.
- **Torsvik V., Sørheim R. and Goksøyr J. (1996)** - Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* **17**: 170-178.
- **Trân Van V., Berge O., Ngo Ke S., Balandreau J., and Heulin T. (2000)** - Reproducible beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil.* **218**: 273-284.
- **Travieso L., Benítez F., Sánchez E., Borja R., Martín A. and Colmenarejo M.F. (2006)** - Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecological Engineering.* **18(2)**: 158–162.
- **Tremaroli V. (2006)** - Physiological characterization of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, biofilm and environmental stress response. Thèse doctorat. 147pages.
- **Trevors J.T. (1996)** - DNA in soil: adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip. *Antonie van Leeuwenhoek.* **70**: 1-10.
- **Vandevivere, P. and Kirchman D. L. (1993)** - Attachment Stimulates Exopolysaccharide Synthesis by a Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3280-3286.
- **Vermis K., Brachkova M., Vandamme P. and Nelis H. (2003)**- Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 595-600.
- **Villena G.K., Gutiérrez-Correa M. (2007)** - Production of lignocellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* biofilms at variable water activities. *Electron. J. Biotechn.* **10** : 124-140.
- **Vivas A., Marulanda A., Ruiz-Lozano J.M., Barea J.M. and Azcon R. (2003)** - Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular - and on plant responses to PEG induced drought stress. **13**: 249-256.
- **Wadhams G.H. and Armitage J.P. (2004)** - Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature. Rev.* **5**: 1024-1037.

- **Walker T.S., Bais H.P., Deziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R. and Vivanco J.M. (2004)** - *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant. Physiol.* **134**: 320–331.
- **Wardle D. and Parkinson D. (1990)** - Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. *Plant and Soil.* **122**: 29-37.
- **Watt M., Hugenholtz P., White R. and Vinall K. (2006)** - Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environ. Microbiol.* **8**: 871–884.
- **Wingender J., Neu T.R. and Flemming H.C. (1999)** - What are bacterial extracellular polymeric substances? Dans "*Microbial extracellular polymeric substances*". Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. Ed. Springer, Berlin. 1-19.
- **Xiao L.Y., Jiang L., Song N.H., Yang H. (2008)** - Toxic reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. *Chemosphere.* **70 (11)**: 2127-34 .
- **Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T. and Arakawa M. (1992)** - Proposal of *Burkholderia* gen. nov; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) Ccomb. Nov. *Microbiol. Immunol.* **36**: 1251- 1275.
- **Yakandawala N., Gawande P.V., Lovetri K., Cardona S.T., Romeo T.; Nitz M. and Madhyastha S. (2011)** - Characterization of the Poly- β -1,6-*N*-Acetylglucosamine Polysaccharide Component of *Burkholderia* Biofilms. *American Society for Microbiology. Apply. Environ. Microbiol.* **77(23)**: 8303-8309.
- **Yentuni D.S. and Johnson D.B. (1986)**- Changes in soil microflora in response to repeated application of some pesticides. *Soil. Biochem.* **18**: 629-635.
- **Yuksekdag Z.N. and Aslim B. (2008)** - Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. bulgaricus (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian Archives of Biology and Technology.* **51(3)**: 581-585.
- **Zhang T., Zhang C., Li S.Z. and Yanchun Z.Y. (2011)** - Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Braz. J. Microbiol.* **42** no.4 .

Annexe I



Courbe de corrélation, absorbance en fonction de la concentration en Sérums albumine bovine (BSA), utilisée pour la détermination des protéines cellulaires par la méthode de Bradford.



Courbe de corrélation, absorbance 630nm en fonction de la concentration en glucose, utilisée pour le dosage des pentoses et des hexoses obtenus dans les EPS par la méthode à l'anthrone sulfurique.

Annexe II

Milieux de culture

- Milieu Knop (Knop, 1865)

- Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	4.23mg
- KNO ₃	0.25mg
- KPO ₄	0.25mg
- MgSO ₄	0.25mg
- FeSO ₄ 7H ₂ O	1mg
- Eau distillée	100ml

Ajuster le pH du milieu à 7.
Stériliser à 120°C pendant 20min.

- Milieu TSB dilué au 1/10

- Tryptic Soy Broth	3g
- Eau distillée	1000ml

- Milieu TY mannitol (Tryptone yeast extract mannitol)

- Tryptone	6g
- Yeast extract	3g
- Eau distillée	100ml.

Ajuster le pH du milieu à 7 (avec KOH ou HCl) .
Stériliser à 120°C pendant 20min.
Avant utilisation, rajouter 6ml/l de CaCl₂ (1M) stérile.

- Milieu YESA (Yeast extract saccharose agar)
 - Saccharose 10g
 - Extrait de levure 0.4g
 - K_2HPO_4 0.5g
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g
 - NaCl 0.1g
 - Agar agar 15g
 - Eau distillée (qsp) 1000ml

Ajuster le pH du milieu à 7 (avec KOH ou HCl) .

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Annexe III

Les révélateurs utilisés pour le dosage des sucres réducteurs et des protéines

- Réactif à l'anthrone (Dosage des sucres réducteurs)
 - Anthrone : 0.2g.
 - Acide sulfurique à 91% : 100ml.

- Réactif au bleu de coomassie (Dosage des protéines)
 - Bleu de Coomassie : 100mg
 - Ethanol à 95% : 50ml
 - Acide ortho phosphorique à 85% : 100ml
 - Eau distillée : qsp 1000ml.

ملخص

الأغشية الحيوية أو ما يعرف بالبيوفيلم هو النمط المعيشي السائد للبكتيريا التي تعيش في النظم الإيكولوجية الطبيعية . اشتهرت الأغشية الحيوية خاصة بآثارها السلبية في مجالات الصحة العامة والصناعة حيث يتولد عنها عبء اقتصادي ضخماً. ومع ذلك فإن العديد من الدراسات سمحت بتعزيز دورها. مثال على هذه الفوائد ما يعرف بلشراك الأغشية الحيوية في ظواهر تجميع التربة التي تعد من الجوانب الهامة التي تؤثر بشكل إيجابي على نمو النبات. إن العمل البيئي الذي نقدمه يندرج في هذا السياق.

إذ إن واحدة من العقبات الرئيسية التي تواجه التربة تتمثل في استخدام مبيدات الأعشاب، والتي بالتأكيد تمكن من مكافحة الأعشاب الضارة، ولكن تسبب آثاراً ضارة على التربة، مرئية في المدى الطويل (خصوبة التربة وخصائصها). في هذا العمل نقترح دراسة تأثير اثنين من مبيدات الأعشاب "norflurazon" و "prometryne" على تشكيل بيوفيلم وإنتاج متعددات السكريد من بيريكولديريا فنغروم سلالة ب 01. في هذه الدراسة وقد تبين أن بيريكولديريا فنغروم سلالة ب 01 قدرتها على تشكيل بيوفيلم على السطح "زجاج"، في حضور كما هو الحال في غياب prometryne و norflurazon. أظهر تحليل حركية النمو انخفاضاً في الكتلة الحيوية في وجود norflurazon و prometryne، فيما يصاحب ذلك زيادة في الإنتاج الحيوي لمتعددات السكريد أو EPS مقارنة مع العينات غير المعالجة.

وقد أظهرت النتائج أن بيريكولديريا فنغروم سلالة ب 01 ، مثل معظم بكتيريا الجذور هي نوع من البكتيريا التي تنمو بسرعة. وقد درس احتمال تأثير بيريكولديريا فنغروم سلالة ب 01 على نمو القمح القاسي (الحنطة القاسي) صنف محمد بلبشير لغرض البحث عن خصائص محتملة لبيريكولديريا فنغروم سلالة ب 01 في تحسين نمو القمح القاسي (الحنطة القاسي) صنف محمد بلبشير في حضور norflurazon و prometryne لغرض ادماجه في صنف ال PGPR.

وقد أظهرت النتائج أن بيريكولديريا فنغروم سلالة ب 01 أنها تتيح تحسين نمو القمح القاسي (قمح القاسي L.) صنف محمد بلبشي في حضور norflurazon و prometryne، مما يشير إلى انخفاض كبير في التأثير السلبي للإجهاد التأكسدي norflurazon، وخاصة بالنسبة للشبكات التي تعاملت مع تركيزات عالية. وهكذا، فإن القدرة على إنتاج الأغشية الحيوية، والتسامح ل norflurazon و prometryne، وإنتاج EPS وتأثير PGPR جعل بكتيريا بيريكولديريا فنغروم سلالة B01 مرشح لتلقيح القمح القاسي. كلمات البحث: بيوفيلم، Exopolysaccharides قمح (الحنطة القاسي L.)، بيريكولديريا، مبيدات عشبية، PGPR.

Abstract

Biofilm is the predominant mode of living bacteria in natural ecosystems. Biofilms are particularly known for their adverse effects in the fields of public health and industry generating substantial economic burden. Nevertheless many studies allow to enhance their role. An example of these so-called benefits for the involvement of biofilms in the phenomena of soil aggregation which is an important aspect that positively affect plant growth. It is in this context that environmental work that we offer. Indeed, one of the major constraints facing the soil is represented by the use of herbicides, which certainly can fight against weeds, but cause adverse effects on the ground, visible in the longer term (soil fertility, structure). This study aims to investigate the effect of two herbicides " norflurazon " and " prometryn " on biofilm formation and exopolysaccharide production in a soil isolate bacterium *Burkholderia fungorum* strain B01 . *B. fungorum* strain B01 has been shown to form a biofilm on the surface "glass" in the presence as in the absence of norflurazon and prometryn . If the analysis of growth kinetics showed a decrease of biomass in the presence of norflurazon , and prometryn , it is concomitant with an increase in biosynthesis of exopolysaccharides . It should be noted that *B. fungorum* strain B01, like most rhizobacteria is a fast-growing bacteria. In addition, *B. fungorum* this potential PGPR , it allows improving the growth of durum wheat (*Triticum durum* L.) var. MBB in the presence of norflurazon , and prometryn , suggesting a significant reduction of oxidative stress in norflurazon , especially for seedlings treated with higher concentrations. Thus, the ability to produce biofilms , tolerance norflurazon and prometryn , EPS production and PGPR effect make the bacterium *B. fungorum* strain B01 a candidate for inoculation of durum wheat. **Keywords :** Biofilm , Exopolysaccharides ,Wheat (*Triticum durum* L.) , *Burkholderia* , Herbicides , PGPR .