



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie

UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire
Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE
Spécialité : Microbiologie appliquée

Par
MAKHLouF Lilia
&
MAMOUNI Hafça

Thème :

Optimisation de la production d'AIA par une rhizobactérie

Soutenue le 21/06/2026 devant le jury composé de :

Président	MEKHALDI Abdelkader	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	NAIMI Mehdi	MCA	Université de Mostaganem
Examinateur	BOUZNAD Ahcene	MCB	Université de Mostaganem
Co encadreur	HAMOUM Hakim	MCB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2025/2026

Remerciement

Avant tout, nous rendons grâce à *ALLAH*, Le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la force, la patience, la persévérance ainsi que la détermination nécessaire pour mener ce travail à son accomplissement.

Nous exprimons notre immense gratitude à notre encadrant, *Mr. NAIMI Mehdi* pour avoir accepté de diriger ce mémoire avec bienveillance et professionnalisme, pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse durant la réalisation de cette étude.

Nous tenons à remercier *Mr. HAMOUM Hakim*, pour sa disponibilité, Ses orientations précieuses, ses remarques pertinentes, sa disponibilité ainsi que ses conseils éclairés ont constitué une aide inestimable dans l'élaboration de ce travail.

Nos sincères remerciements s'adressent également à *Mr. MEKHALDI Abdelkader* pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de cette soutenance.

Nous tenons aussi à remercier chaleureusement *Mr. BOUZNAD Ahcene* d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et d'y apporter son regard scientifique et critique.

Nos remerciements les plus respectueux vont également à la technicienne du laboratoire de recherche *Ms. TAHLATI Amina*, pour leur accueil, leur patience, leur accompagnement et leurs précieux conseils qui ont grandement facilité notre travail expérimental.

Nous adressons également notre profonde gratitude à l'ensemble de nos enseignants qui, durant ces cinq années d'études, nous ont transmis leurs connaissances, leur savoir-faire et leur passion pour la science.

Enfin, nous remercions toutes les personnes ayant participé, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce mémoire.

Dédicace

À la mémoire de mon cher père,

Ton souvenir demeure à jamais gravé dans mon cœur. Tes sacrifices, ton amour et les valeurs que tu m'as transmises continueront d'éclairer mon chemin pour toujours. Que Dieu t'accorde Son infinie miséricorde.

À ma chère mère,

Pour ton amour inconditionnel, ta patience et ton soutien sans limite. Aucun mot ne pourra exprimer toute ma gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi.

À ma sœur Rania,

Pour ton affection, tes encouragements et tous les merveilleux moments partagés ensemble. Ta présence a toujours été une source de bonheur et de force.

À ma chère copine Boudani Hafsa,

Pour ton soutien précieux, ta bienveillance et les encouragements que tu m'as offerts tout au long de ce parcours. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Aux membres de ma famille qui m'ont soutenue,

« Akila, Ammar, Daikha, Farouk, Salim, Ouarda, Faiza, Toufik, Riad »

Je dédie ce travail avec une profonde reconnaissance à chacun d'entre vous. Merci pour votre aide, vos encouragements, votre affection et votre confiance. Votre présence à mes côtés a été une force précieuse qui m'a permis d'avancer et d'atteindre cet objectif.

Ce mémoire est dédié à toutes les mains tendues durant ce parcours.

Makhlouf Lilia

Dédicace

C'est avec un immense plaisir et une profonde gratitude que je dédie ce modeste travail :

À mes parents

Pour leur soutien constant, leur confiance et tout ce qu'ils m'ont donné. Merci d'avoir toujours cru en moi.

À ma sœur Aïcha

Pour sa gentillesse, sa présence et tous ces moments où elle a su me redonner le sourire.

À mon frère Amine

Pour sa force, son aide précieuse et sa façon unique de me donner la force d'avancer.

À mes amis

Pour leur simplicité, leur franchise et tous ces petits riens qui font tout.

Ce travail n'aurait pas été le même sans vous. Merci du cœur.

MAMOUNI HAFÇA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Résumé

Abstract

الملخص

INTRODUCTION 1

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1. RHIZOSPHERE 4

I.2. LES BACTERIES PROMOTRICE DE LA CROISSANCE DES PLANTES (PGPR)..... 4

I.2.1. MODE D’ACTION DES PGPR 5

I.3. PHYTOHORMONES..... 5

I.3.1 L’ACIDE INDOLE ACETIQUE 5

I.3.1.1 LA STRUCTURE CHIMIQUE 6

I.3.1.2 LES VOIES DE BIOSYNTHESES D’ACIDE INDOLE ACETIQUE : 6

I.3.1.2.1 Les voies dépendantes du tryptophane 6

I.3.1.2.1.1 La voie de l’acide indole-3-pyruvique (IPA) 6

I.3.1.2.1.2 La voie de la tryptamine (TRA) 7

I.3.1.2.1.3 La voie de l’acide indole-3-acétamide (IAM) 7

I.3.1.2.1.4 La voie de l’acide indole-3-acétylaldoxime 7

I.3.1.2.2 La voie indépendante du tryptophane 7

I.3.1.3. FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION D’ACIDE INDOLE ACETIQUE : 8

I.3.1.4 LE ROLE DE L’AIA..... 8

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 ÉCHANTILLONNAGE 10

II.1.2 LOCALISATION DES SITES DE PRELEVEMENT..... 10

II.2 ISOLEMENT DES PGPR..... 11

II.3 PURIFICATION ET CONSERVATION DES ISOLATS 12

II.4. REACTIVATION DES ISOLATS..... 12

II.5. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION D’ACIDE INDOLE ACETIQUE PAR LES ISOLATS..... 13

II.6 IDENTIFICATION DES ISOLATS 14

II.6.1. CARACTERISATIONS PHENOTYPIQUES 14

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 ISOLEMENT DES PGPR..... 16

III.2 ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE L’AIA..... 16

CONCLUSION..... 21

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 23

ANNEXES..... 28

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole Acétique

DO: Densité optique

GN: Gélose nutritive

PGPR: Plant growth promoting rhizobacteria

PVK: Pikovskaya

RPM: Rotation par minute

TCP : Tricalcique Phosphate

YMB: Yeast Mannitol Broth

Liste des figures

Figure 1	Structure racinaire au niveau de la rhizosphère	4
Figure 2	Structure chimique d'auxine naturelle (AIA)	6
Figure 3	Biosynthèse d'AIA	7
Figure 4	Localisation des régions de prélèvement des échantillons	10
Figure 5	Prélèvement des échantillons de sol	11
Figure 6	Isolement des PGPR	12
Figure 7	Réactivation des isolats	12
Figure 8	Evaluation de la production d'AIA	13
Figure 9	Isolement des bactéries sur gélose PVK.	16
Figure 10	Production de l'acide indole acétique par les isolats	16
Figure 11	Box-plot comparatif de la production d'AIA (ug/mL) par groupe	17
Figure 12	Observation macroscopique de l'isolat F3 et HM13	18
Figure 13	Les tests biochimiques pour les isolats	18

Résumé

L'acide indole-3-acétique (AIA) est une phytohormone appartenant à la famille des auxines et jouant un rôle essentiel dans la croissance et le développement des plantes. Cette étude visait à isoler et sélectionner des bactéries rhizosphériques capables de produire l'AIA. Au total, 157 isolats bactériens ont été obtenus à partir de 12 échantillons de sol rhizosphérique, dont 90 se sont révélés producteurs d'AIA. Après une évaluation de leur capacité de production, l'isolat HM13 a été retenu comme le plus performant. Les résultats obtenus mettent en évidence le potentiel des bactéries rhizosphériques productrices d'AIA comme agents de promotion de la croissance des plantes et soulignent leur intérêt pour le développement de biofertilisants destinés à une agriculture plus durable.

Mots-clés : Acide indole-3-acétique (AIA), PGPR, biofertilisants, agriculture durable.

Abstract

Indole-3-acetic acid (IAA) is a phytohormone belonging to the auxin family and plays a crucial role in plant growth and development. This study aimed to isolate and select rhizosphere bacteria capable of producing IAA. A total of 157 bacterial isolates were obtained from 12 rhizospheric soil samples, of which 90 were identified as IAA producers. Following the evaluation of their IAA-producing capacity, isolate HM13 was selected as the most efficient. The results highlight the potential of IAA-producing rhizosphere bacteria as plant growth-promoting agents and emphasize their promising application in the development of biofertilizers for sustainable agriculture.

Keywords: Indole-3-acetic acid (IAA), PGPR, biofertilizers, sustainable agriculture.

المخلص

يُعدُّ حمض الإندول-3-خليك (IAA) هرمونًا نباتيًا يندرج ضمن عائلة الأوكسينات، وله دورٌ محوريٌّ في نمو النباتات وتطورها. استهدفت هذه الدراسة عزلَ بكتيريا المنطقة الجذرية وانتقاءها، على أن تكون قادرةً على إنتاج حمض الإندول-3-اسيتيك. وقد تم الحصول على 157 عزلةً بكتيريةً من 12 عينةً من تربة المنطقة الجذرية، تبين أن 90 عزلةً منها مُنتجةٌ لهذا الحمض. وبعد تقييم قدراتها الإنتاجية، وقع اختيار العزلة HM13 بوصفها الأكثر أداءً. وتُبرز النتائج المتحصّل عليها الإمكانيات الواعدة التي تتحلّى بها بكتيريا المنطقة الجذرية المُنتجة لحمض الإندول-3-اسيتيك، بوصفها عواملَ مُحفّزةً لنمو النباتات، وتؤكد على أهميتها في تطوير أسمدة حيوية تُسهم في تحقيق زراعةٍ أكثر استدامةً.

الكلمات المفتاحية: حمض الإندول-3-اسيتيك، بكتيريا تعزيز نمو النباتات، أسمدة حيوية، زراعة مستدامة.

Introduction

Introduction

Au sein de la rhizosphère, l'environnement écologique proche des racines, se trouvent de nombreux microorganismes. Ces derniers interagissent avec les racines selon deux grands types de relations : symbiotique (caractérisée par la formation de nodules) et non symbiotique **(Martinez-Viveros *et al.*, 2010)**.

Le terme PGPR ou « Rhizobactéries Favorisant la Croissance des Plantes » regroupe toutes les bactéries qui colonisent à la fois la rhizosphère et les racines des plantes, et qui stimulent leur croissance, quel que soit le mécanisme d'action impliqué **(Lynch et Whipps, 1990)**. Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont très importants. En fait, les bactéries qui s'installent sur les racines des plantes agissent de plusieurs façons différentes pour favoriser leur croissance **(Glick, 2001)**. Ces mécanismes sont variés. On trouve par exemple la fixation de l'azote, la libération de substances qui aident à lutter contre les maladies (comme les antibiotiques ou les sidérophores), ainsi que la production de composés bénéfiques pour la plante, tels que les phytohormones **(Pandey et Maheshwari, 2007)**.

Les phytohormones jouent un rôle clé dans la régulation de la croissance et du développement des plantes, en particulier en réponse aux facteurs environnementaux. Les bactéries capables de produire ces phytohormones trouvent pleinement leur intérêt à l'échelle mondiale grâce à l'exploitation de la synergie entre bactéries et plantes, ce qui favorise le développement d'une agriculture durable **(Narula *et al.*, 2006)**.

L'acide indole-3-acétique (AIA) représente l'une des phytohormones les plus importantes produites par les PGPR. Appartenant à la famille des auxines, cette molécule intervient dans de nombreux processus physiologiques, notamment la division et l'élongation cellulaires, la différenciation des tissus végétaux, et le développement et l'architecture du système racinaire **(Nutaratat *et al.*, 2016)**. La production d'AIA par les bactéries rhizosphériques contribue ainsi à améliorer l'absorption de l'eau et des nutriments par les plantes, favorisant leur croissance et leur productivité **(Duca *et al.*, 2014)**.

L'objectif principal de cette étude est d'isoler des rhizobactéries et d'évaluer leur capacité à produire l'acide indole acétique.

Le présent travail s'articule autour de trois grandes parties :

La première partie fait état des connaissances existantes sur les rhizobactéries et de leurs capacités à produire l'acide indole-3-acétique.

La deuxième partie expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la sélection des bactéries promotrice de la croissance des plantes (PGPR).

La troisième partie retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1. Rhizosphère

La rhizosphère ne se réduit pas à une simple interface entre la racine et le sol : c'est un milieu d'une fertilité microbienne exceptionnelle, elle est colonisée par une grande diversité de microorganismes, notamment des virus, des bactéries, des champignons et des protozoaires. Au sein de cet environnement, les interactions y sont d'une richesse remarquable, entre les microorganismes eux-mêmes et avec les particules du sol. Ce qui attire l'attention est l'abondance spectaculaire de cette vie microbienne, pouvant dépasser le million d'individus par gramme de sol sous l'effet des substances organique continuellement exsudées par les racines telle que : les sucres, les acides aminés, les acide organiques et hormones, des ressources essentielles au métabolisme des microorganismes (**kloepper et al., 1991**).

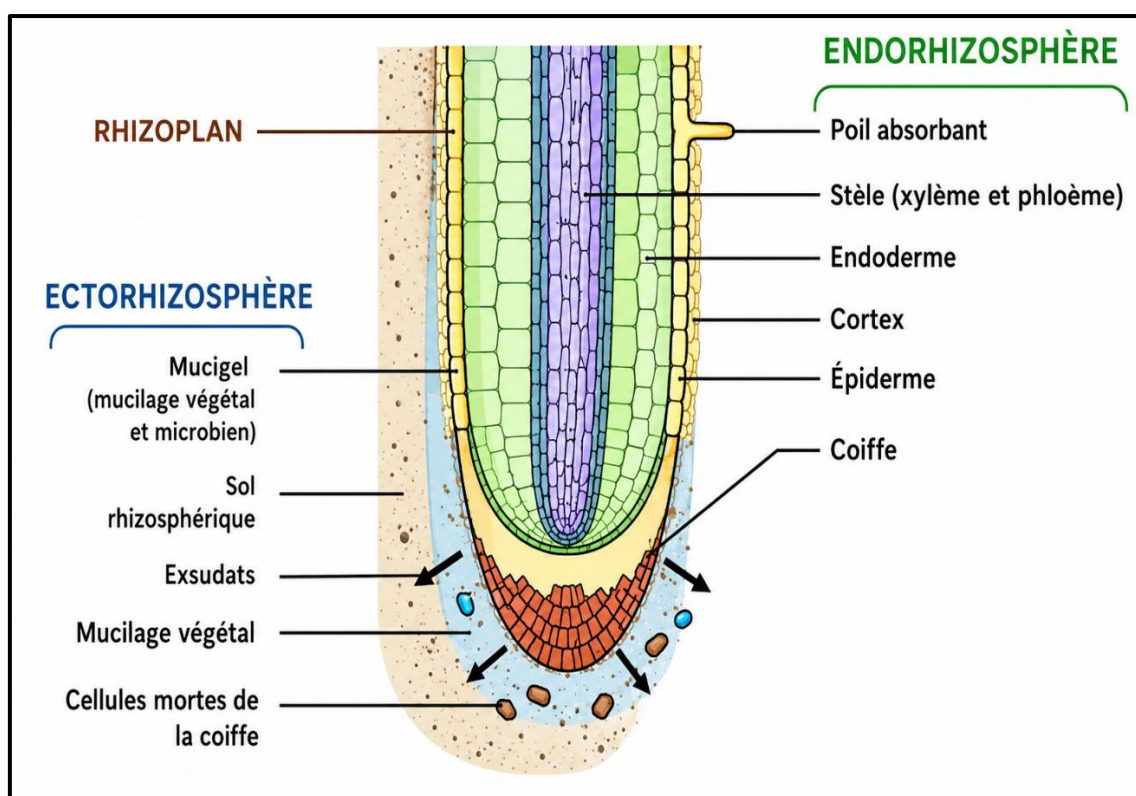


Figure 1 : Structure racinaire au niveau de la rhizosphère (**Lynch, 1983**).

I.2. Les bactéries promotrice de la croissance des plantes (PGPR)

Connues sous l'acronyme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), une dénomination proposée par **kloepper et Schroth (1980)**, ces bactéries sont présentes dans la rhizosphère et étroitement liées au système racinaire. Elle se distinguent par leur pouvoir à favoriser le développement des plantes, à renforcer leur condition physiologique et à accroître leur tolérance face aux agressions biologiques. Elles représentent ainsi des acteurs clés des

interactions bénéfiques entre le sol et la plante (**Bakthavatchalu et al., 2012 ; Sivasakthi et al., 2014 ; Alabouvette et cordier, 2018**).

Dans la rhizosphère, les PGPR jouent un rôle essentiel dans la protection des plantes contre les champignons et les bactéries nuisibles (**Benduzi et al., 2012**). Leur action repose sur divers processus biologiques tels que la sécrétion de substances antifongique, la synthèse des phytohormones, la fixation de l'azote atmosphérique et la modulation de la production d'éthylène chez les plantes. Elles interviennent aussi dans l'optimisation de l'alimentation en éléments minéraux en rendant le phosphore bio disponible et en produisant des sidérophores capable de chélater le fer (**Prasad et al., 2015**).

I.2.1. Mode d'action des PGPR

Les PGPR utilisent des mécanismes directs et indirects pour améliorer la croissance et la protection des plantes. Les mécanismes directs incluent la production d'hormones de croissance, la solubilisation du phosphore, la fixation de l'azote atmosphérique et l'acquisition du fer. Les mécanismes indirects comprennent la réduction des effets délétères des stress biotiques grâce à la production de composés de faible poids moléculaire tels que les alcools, l'ammoniac, les aldéhydes, les cyanogènes, les cétones, les sulfures, les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, ainsi que des métabolites secondaires à propriétés antagonistes et la compétition pour les nutriments (**Glick, 2012 ; Dey et al., 2004**).

I.3. Phytohormones

Les phytohormones, ou hormones végétales, sont des substances organiques qui influencent les caractéristiques physiologiques, biochimiques et morphologiques des plantes, notamment la croissance, la différenciation et le développement des cellules, des tissus et des organes (**Damam et al., 2016**).

Le terme "auxine" a été inventé par les biochimistes **Charles Darwin** et son fils **Francis**. Ce terme est dérivé du mot grec "*auxin*", qui signifie "augmenter" ou "croître" (**Fu et al., 2015**). Elle est la première hormone végétale à avoir été découverte (**Aoi et al., 2020**). Il existe d'autres molécules d'auxines naturelles actives mais l'auxine la plus importante est l'acide indole-3-acétique, et sa production est très répandue parmi les bactéries qui colonisent la rhizosphère des plantes (**Lin et al., 2018 ; Casanova-Sáez et al., 2021**).

I.3.1 L'Acide indole acétique

L'acide indole-3-acétique (AIA) constitue la phytohormone principale de la famille des auxines, biologiquement active dans la croissance végétative (**Nutaratat et al., 2016**). L'AIA est généralement synthétisée en tant que métabolite secondaire par les rhizobactéries

promotrices de la croissance des plantes (PGPR), notamment *Pseudomonas fluorescens* (Rajkumar *et al.*, 2008). Ces micro-organismes exploitent les composés nutritifs présents dans les exsudats racinaires pour synthétiser et libérer l'AIA dans la rhizosphère, où cette substance hormonale participe à favoriser le développement et la croissance des plantes (Spaepen *et al.*, 2007).

I.3.1.1 La Structure chimique

L'acide indole-3-acétique est un acide organique faible de formule chimique $C_{10}H_9NO_2$ (Laird *et al.*, 2020), et dont la structure se compose d'un noyau indole ainsi que d'une chaîne latérale carbonée portant le groupement carboxyle. Sa structure cristalline montre que les molécules s'associent par deux en dimères connectés par des liaisons hydrogène (Paque et Weijers, 2016).

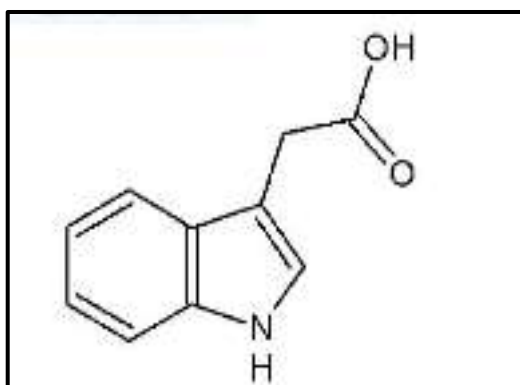


Figure 2 : Structure chimique d'auxine naturelle (AIA) (Pons, 2020).

I.3.1.2 Les Voies de biosynthèses d'acide indole acétique :

Les mécanismes de biosynthèse de l'AIA chez les bactéries et chez les plantes présentent une grande similarité, bien que certains composés intermédiaires puissent varier. Chez ces deux groupes d'organismes, il existe à la fois des voies dépendantes du tryptophane (Trp) et des voies indépendantes du Trp pour la production de l'AIA.

I.3.1.2.1 Les voies dépendantes du tryptophane

I.3.1.2.1.1 La voie de l'acide indole-3-pyruvique (IPA)

Dans cette voie, La première voie est la formation d'acide indole acétique par l'intermédiaire de l'acide indole-3-pyruvique et l'acide-3-indol-acétaldéhyde.

La conversion du L-tryptophane en indole-3-pyruvate (IPyA) est assurée par une aminotransférase (transamination). L'IPyA est ensuite décarboxylé et converti en indole-3-acétaldéhyde (IAAld) sous l'action de l'enzyme indole-3-pyruvate décarboxylase (IPDC). L'IAAld formé est ensuite oxydé en AIA. Il convient de souligner que la synthèse de l'AIA dans

cette voie, ainsi que l'expression du gène *ipdC*, ont lieu pendant la phase stationnaire de la croissance bactérienne, induites par la présence de l'acide aminé L-tryptophane et potentialisées par sa supplémentation exogène. Ainsi, les niveaux d'AIA synthétisé par les bactéries sont en corrélation directe avec le temps et la phase de croissance bactérienne (Costacurta *et al.*, 1994 ; Vande Broek *et al.*, 1999 ; Jasim *et al.*, 2014).

I.3.1.2.1.2 La voie de la tryptamine (TRA)

La deuxième voie est la conversion du tryptophane en acide-3-acide indole acétaldéhyde peut constituer une voie alternative dans laquelle la tryptamine est formée (Khan *et al.*, 2014).

I.3.1.2.1.3 La voie de l'acide indole-3-acétamide (IAM)

La troisième voie est la biosynthèse de l'AIA par la formation de l'indol-3- acétamide, signalée chez diverses espèces de *Streptomyces* (Manulis *et al.*, 1994). Dans cette voie, l'AIA est synthétisé à partir du tryptophane en deux étapes : le tryptophane est d'abord converti en IAM par la tryptophane-2-monooxygénase, puis l'IAM est hydrolysé en AIA par une IAM-hydrolase (amidase).

I.3.1.2.1.4 La voie de l'acide indole-3-acétylaldoxime

Le tryptophane est tout d'abord transformé en indole-3-acétaldoxime sous l'action d'enzymes à cytochromes P 450. L'acide indole-3-acétique est alors obtenu via des réactions d'oxydation de l'indole-3-acétaldoxime (Cohen *et al.*, 2003).

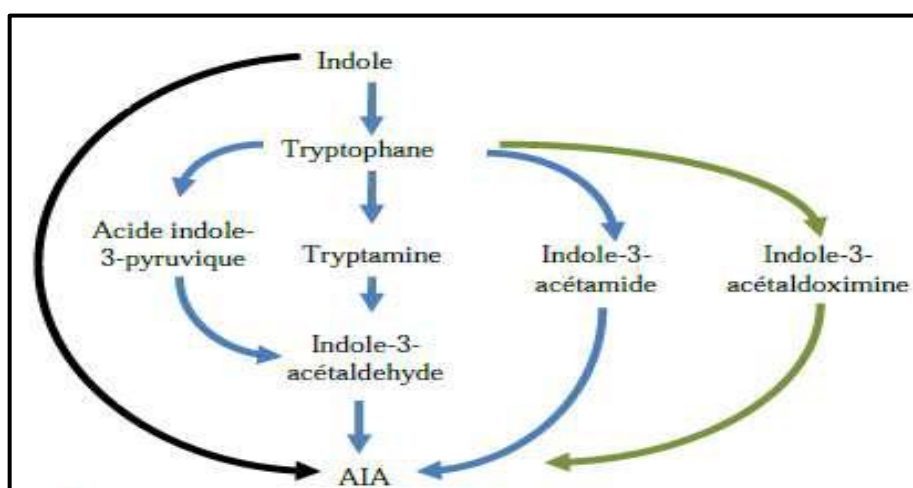


Figure 3 : Biosynthèse d'AIA (Quittenden, 2009).

I.3.1.2.2 La voie indépendante du tryptophane

Il existe une voie indépendante du tryptophane qui a besoin de la présence d'indole-3-glycérol phosphate comme précurseurs (Spaepen *et al.*, 2007).

I.3.1.3. Facteurs influençant la production d'acide indole acétique :

Les facteurs influençant la biosynthèse de l'AIA chez différentes bactéries sont notamment associés aux conditions de stress environnemental, telles que le pH acide, le stress osmotique, le stress matriciel ainsi que la carence en carbone. Il est intéressant de noter que la limitation en carbone et la réduction du taux de croissance sont toutes deux associées à l'entrée en phase stationnaire, ce qui soulève la question de l'importance de l'état de croissance de la population bactérienne dans la biosynthèse de l'AIA, et inversement, du rôle de l'AIA dans le comportement des populations cellulaires (**Spaepen et al., 2007**).

Un autre facteur important capable de modifier le niveau de synthèse de l'AIA est l'acide aminé tryptophane. L'application de tryptophane exogène a montré une augmentation significative de la production d'AIA chez diverses bactéries, telles que *Azospirillum*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida* et *Rhizobium* (**Prinsen et al., 1993 ; Patten & Glick, 2002**).

I.3.1.4 Le Rôle de l'AIA

L'hormone végétale acide indole-3-acétique (AIA) est l'un des signaux majeurs impliqués dans la communication entre l'hôte et les endophytes (**Lebrazi et al., 2020**).

L'acide indole-3-acétique (AIA) constitue l'auxine naturelle la plus répandue chez les plantes. Cette hormone intervient dans de nombreux processus physiologiques végétaux, en stimulant la croissance et en contribuant à la régulation de l'équilibre hormonal (**Nutaratat et al., 2016**). Elle joue également un rôle dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes, la stimulation de la division cellulaire, l'assouplissement des parois cellulaires racinaires, et l'absorption des minéraux et des nutriments du sol par la plante (**Duca et al., 2014**).

L'effet des auxines chez les plantes dépend principalement de leur concentration et du type de tissu cible. Une concentration élevée d'auxine peut inhiber l'élongation des racines, tandis qu'une concentration plus faible tend à stimuler leur croissance (**Ahemad et al., 2014**).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II.1 Échantillonnage

Cette étude a été menée au sein du laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie Végétale (LMBV), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Université de Abd Elhamid Ibn Badis -Mostaganem.

II.1.2 Localisation des sites de prélèvement

Les échantillons de sol ont été collectés à partir de la rhizosphère de différentes espèces végétales, à savoir : la fève, l'oignon, la laitue, la menthe, la pomme de terre et le petit pois (**Annexe IV**). Ces prélèvements ont été réalisés à partir de plusieurs régions de la wilaya de Mostaganem (**Figure 4**). Les prélèvements ont été effectués entre les mois de février et mars.

Les coordonnées cartographiques des sites d'échantillonnage sont présentées en Annexe IV.

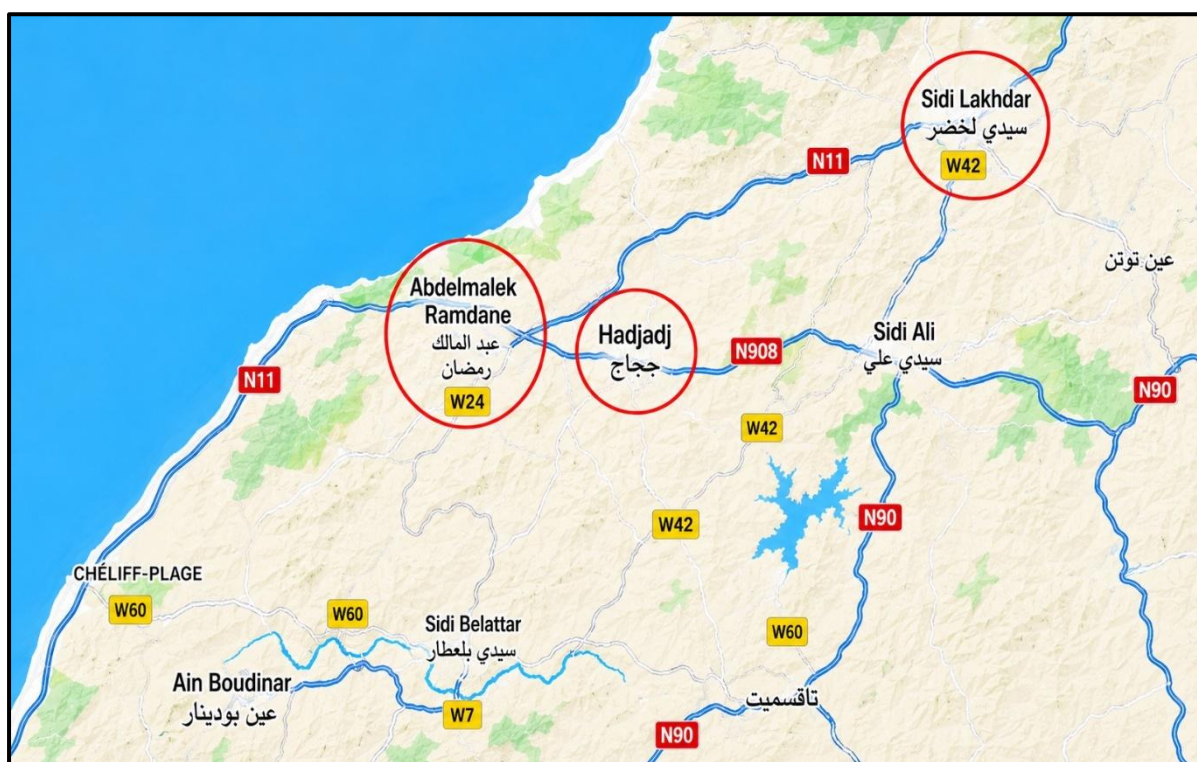


Figure 4 : Localisation des régions de prélèvement des échantillons (Google maps)

Douze échantillons rhizosphériques de sol ont été prélevés, à des profondeurs comprises entre 10 et 15 cm. les échantillons ont été déposés dans des sachets fermés, puis acheminés directement au laboratoire à une température de 4 °C (**Homthong et al., 2022**).



Figure 5 : Prélèvement des échantillons de sol.

II.2 Isolement des PGPR

Dans le but d'obtenir des isolats bactériens potentiellement promoteurs de la croissance des plantes (PGPR) destinés à l'évaluation de leur capacité de production d'acide indole-3-acétique (AIA), les racines ont d'abord été vigoureusement secouées pour détacher la terre qui y adhérait. Pour chaque échantillon, 10 g de sol rhizosphérique ont été prélevés et homogénéisés dans 90 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une solution mère. À partir de cette dernière, une série de dilutions décimales a été réalisée jusqu'au 10^{-6} .

Par la suite, 0,1 mL des trois dernières dilutions a été étalé sur le milieu de Pikovskaya (PVK), un milieu spécifique contenant 0,5 % de phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) comme unique source de phosphore (**Pikovskaya, 1948**) (**Annexe I**). Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées pendant sept jours à 30 °C. Les isolats sont ensuite sélectionnés sur la base de l'apparition d'un halo clair distinct autour des colonies (**Gupta et al., 2022**). Les isolats présentant ce caractère ont ensuite été purifiés et conservés pour l'évaluation de leur potentiel de production d'acide indole-3-acétique (AIA).

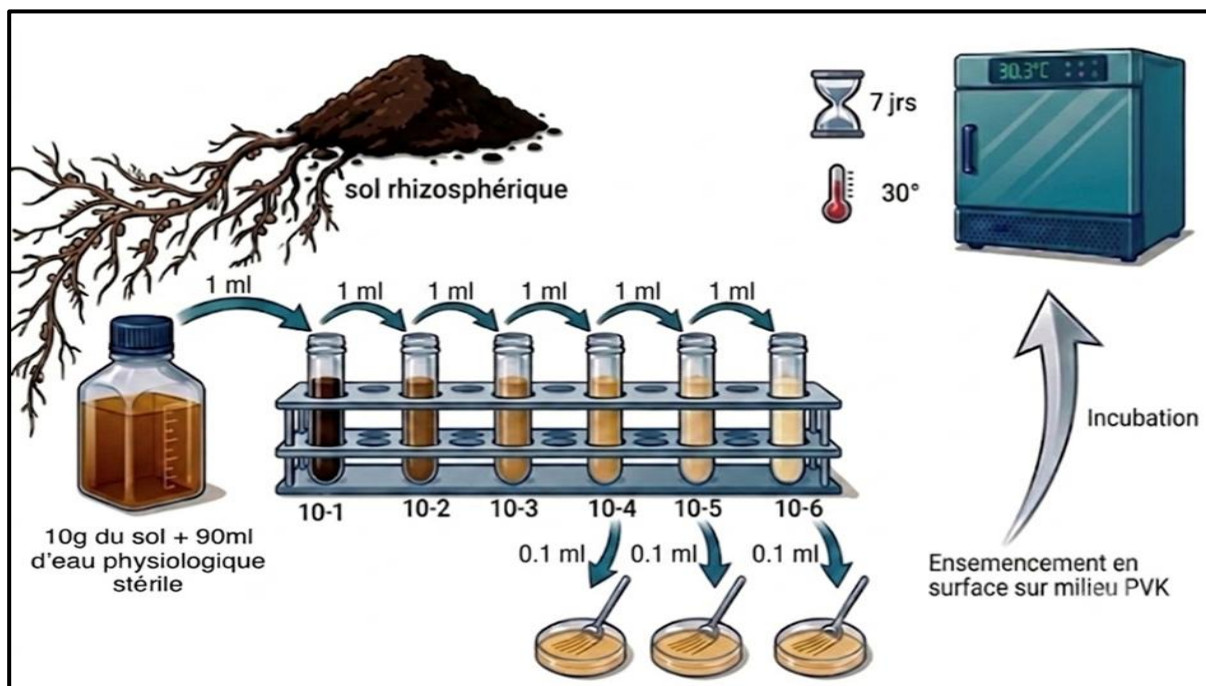


Figure 6 : Isolement des PGPR.

II.3 Purification et conservation des isolats

Les colonies ayant montré une activité de solubilisation ont ensuite été purifiées. Pour ce faire, la technique des stries d'épuisement a été appliquée sur un milieu gélosé nutritif (GN) (**Annexe I**). Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures, le temps nécessaire à l'obtention de colonies bien isolées. Une fois la pureté des isolats vérifiée, les isolats ont été repiqués sur des tubes de gélose nutritive inclinée. Après une incubation de 18-24 heures à 30 °C, les cultures ont été conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

II.4. Réactivation des isolats

Pour chaque manipulation, les isolats bactériens conservés ont été réactivés par ensemencement sur gélose nutritif. Les cultures ont ensuite été incubées à 30 °C pendant 24 heures afin d'obtenir des colonies jeune.

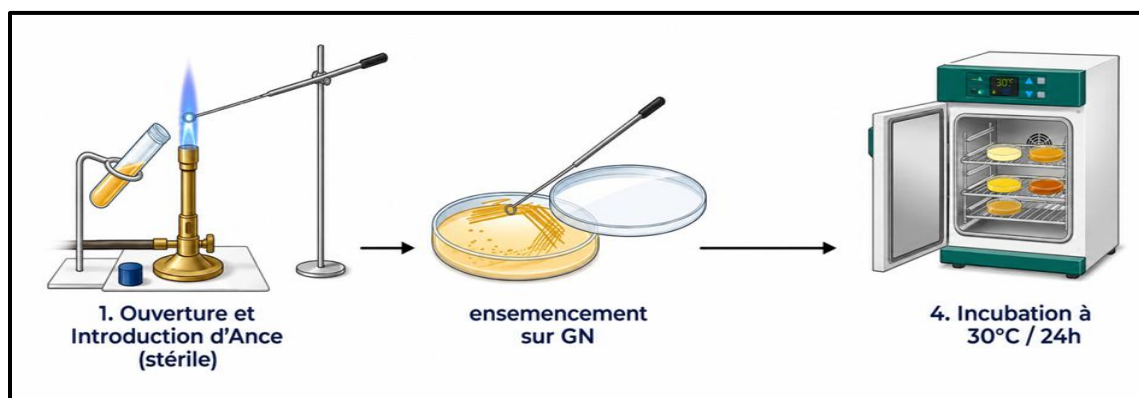


Figure 7 : Réactivation des isolats.

II.5. Évaluation de la production d'acide indole acétique par les isolats

Le dosage colorimétrique de l'acide indole-3-acétique a été réalisé selon la méthode décrite par **Gordon et Weber (1951)**. 50 mL de milieu de culture YMB supplémenté avec 100 mg/L de tryptophane, a été ensemencé avec 1 mL d'inoculum bactérien ($DO_{620} = 0,08$) de chaque isolat.

Après une incubation de 96 heures à 30 °C, à l'obscurité, sous agitation à 160 tr/min, 5 mL de chaque culture a été centrifugés à 6000 rpm pendant 20 minutes. Ensuite, 1 mL du surnageant a été additionné de 2 gouttes d'acide ortho-phosphorique et de 2 mL de réactif de **Salkowski** (50 mL d'acide perchlorique à 35 % et 1 mL de $FeCl_3$ à 0,5 M).

Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'apparition d'une coloration rose indique la production d'AIA. La densité optique a été mesurée à 530 nm à l'aide d'un Spectrophotomètre (*JENWAY 6715*), Les concentrations en AIA ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (**Annexe III**).

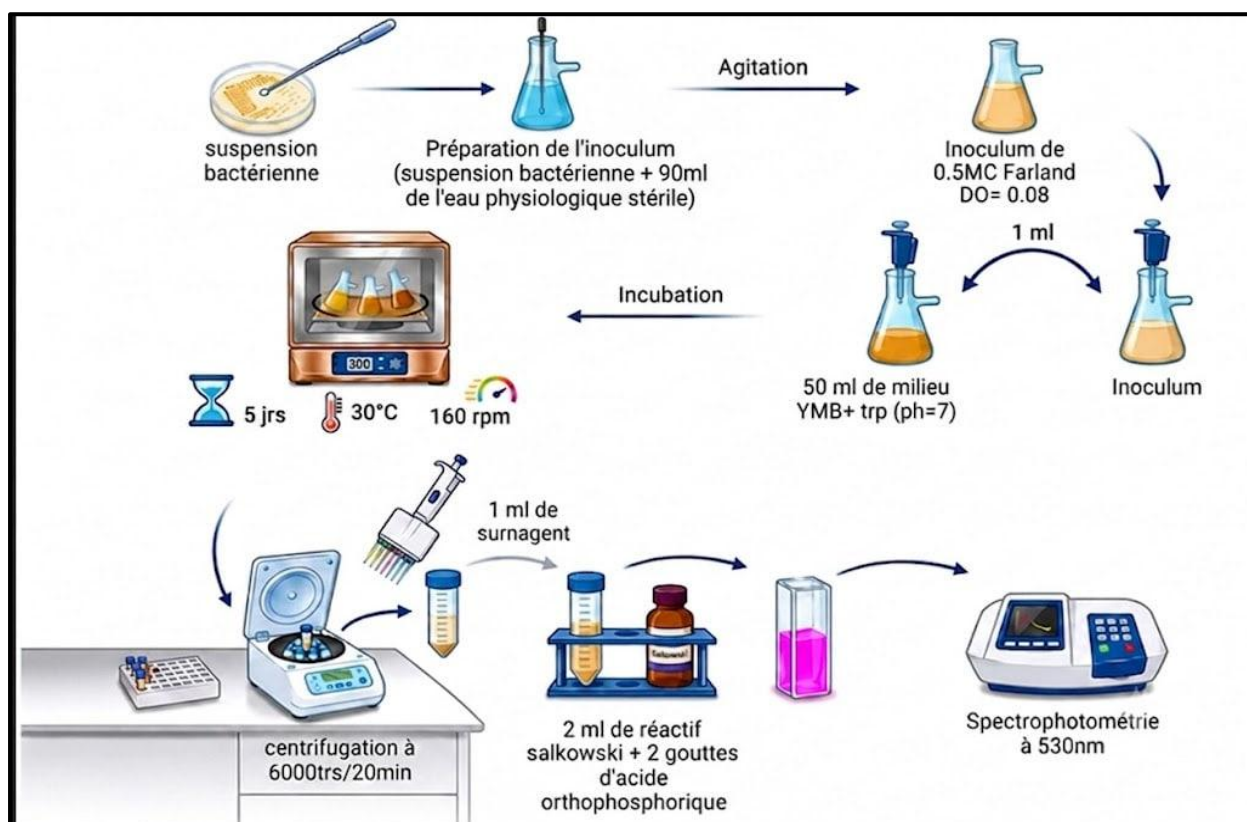


Figure 8 : Evaluation de la production d'AIA.

II.6 Identification des isolats**II.6.1. Caractérisations phénotypiques**

Une caractérisation phénotypique des isolats bactériens a été réalisée sur la base de critères macroscopiques et quelque tests biochimiques. L'étude macroscopique des colonies cultivées sur milieu gélosé constitue une première étape de caractérisation.

Par ailleurs, des tests biochimiques préliminaires ont été effectués, notamment les tests de la catalase et de l'oxydase, afin de compléter la caractérisation phénotypique des isolats.

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1 Isolement des PGPR

L'isolement des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) à partir des échantillons de sol rhizosphérique a été réalisé sur milieu solide PVK (**Pikovskaya**) contenant du phosphate tricalcique comme unique source de phosphore. Après incubation, un total de 157 isolats bactériens distincts a été obtenu. Ces isolats ont été sélectionnés sur la base de la présence éventuelle de halo claire autour des colonies (**Figure 9**).

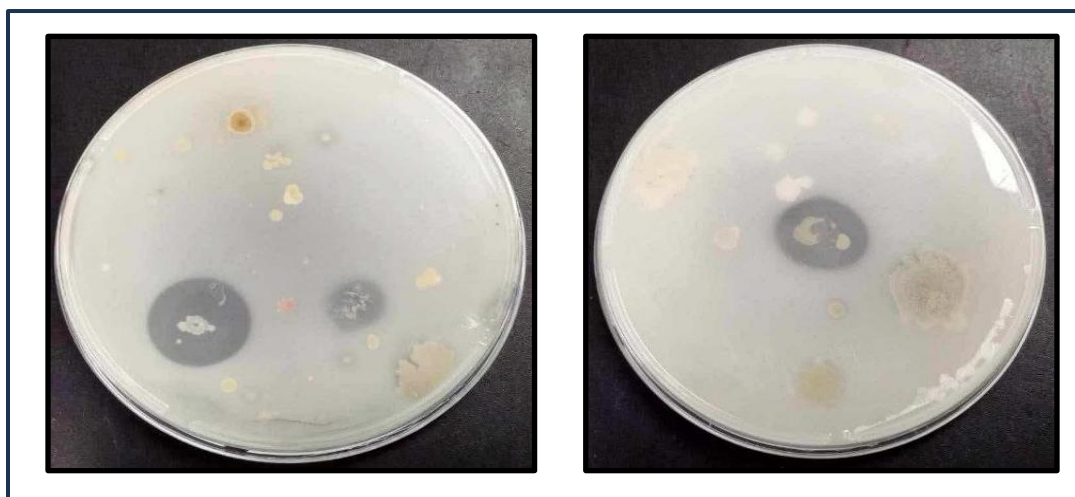


Figure 9 : Isolement des bactéries sur gélose PVK

III.2 Évaluation de la production de l'AIA

L'évaluation de la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) a été effectuée pour tous les isolats après les avoir cultivés dans un bouillon YMB (**Annex I**) enrichi en tryptophane (100 mg/L). L'apparition d'une coloration rose suite à l'ajout du réactif de Salkowski indique la présence d'AIA (**Figure 10**).

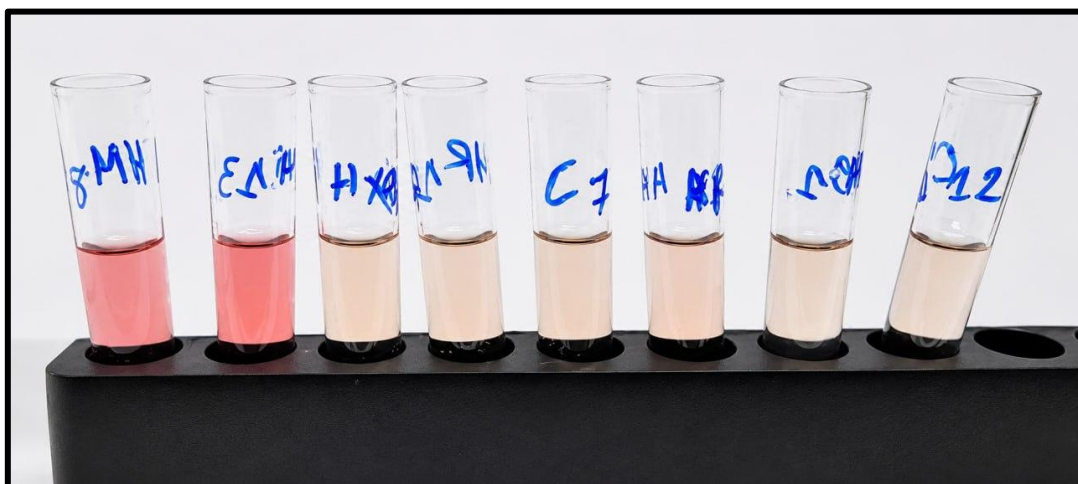


Figure 10 : production de l'acide indole acétique par les isolats.

Les résultats de l'évaluation de production d'AIA ont montré que parmi 157 isolats, 90 isolats (57,3%) ont montré un résultat positif sur la production d'AIA tandis que 67 isolats (42,7%) ont montré un résultat négatif.

La distribution des valeurs de production d'AIA selon les groupes issus du clustering hiérarchique (méthode de Ward) est illustrée par un box-plot (**Figure 11**).

On observe que le groupe 1 (faible production), qui regroupe la majorité des isolats, présente des niveaux relativement faibles d'AIA. En ce qui concerne le groupe 2 (production moyenne), les valeurs sont beaucoup plus élevées. Sa boîte se situe nettement au-dessus de celle du groupe 1, montrant une séparation claire entre les deux catégories. Enfin, le groupe 3 (haute production) est représenté par cinq isolats, avec des valeurs de production d'AIA plus élevée.

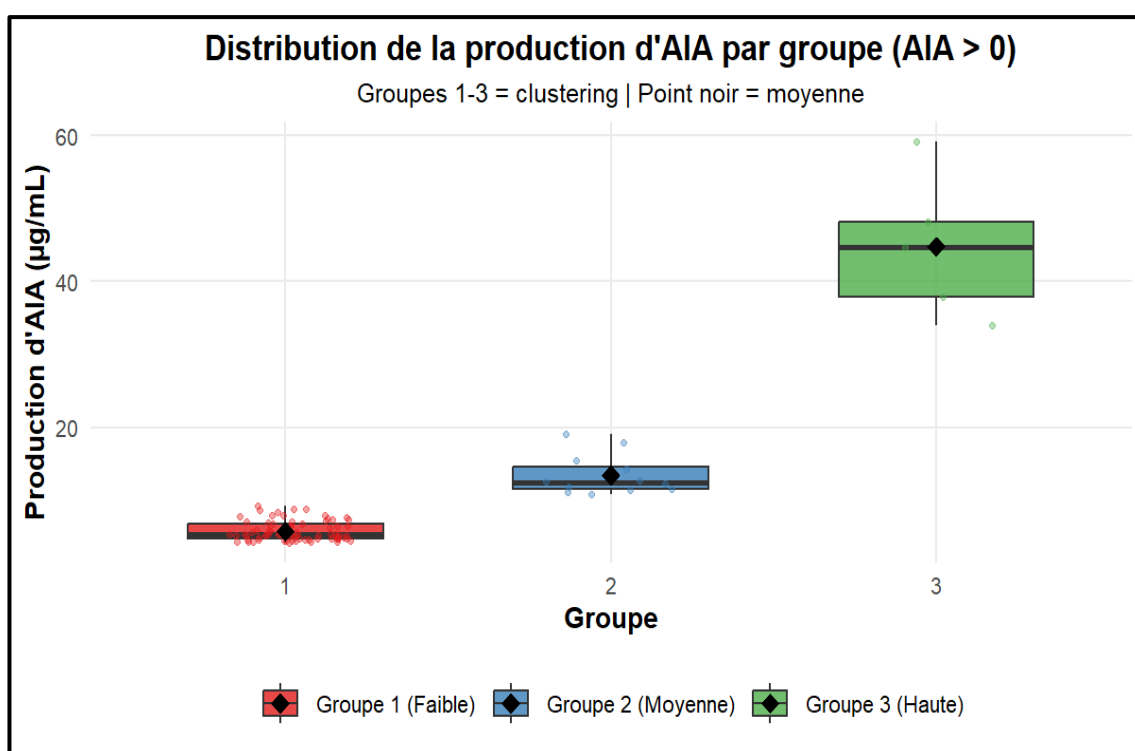


Figure 11 : Box-plot comparatif de la production d'AIA (µg/mL) par groupe.

Le point noir représente la moyenne.

L'étude macroscopique des isolats a révélé une diversité morphologique importante (**Figure 12**). Les colonies présentaient majoritairement une forme ronde avec des tailles variables et une couleur variait du blanc au translucide. Certaines colonies avaient un aspect crémeux et lisse, tandis que d'autres présentaient une texture sèche.

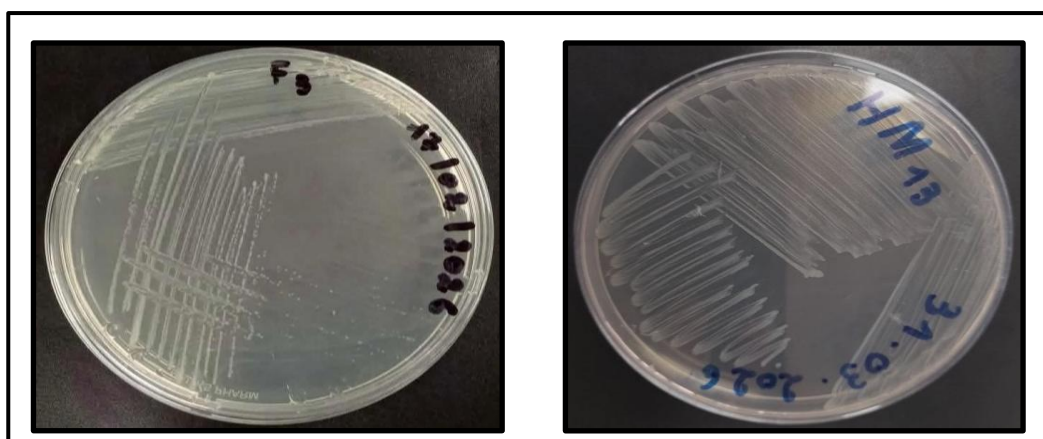


Figure 12 : observation macroscopique de l'isolat F3 et HM13.

Le test catalase a montré que (100%) des isolats étaient catalase positive. La recherche de l'oxydase est parmi les tests biochimique d'identification des isolats, les résultats de ce test ont montré que (60%) des isolats sont oxydase négative et (40%) sont oxydase positive (**Figure 13**).

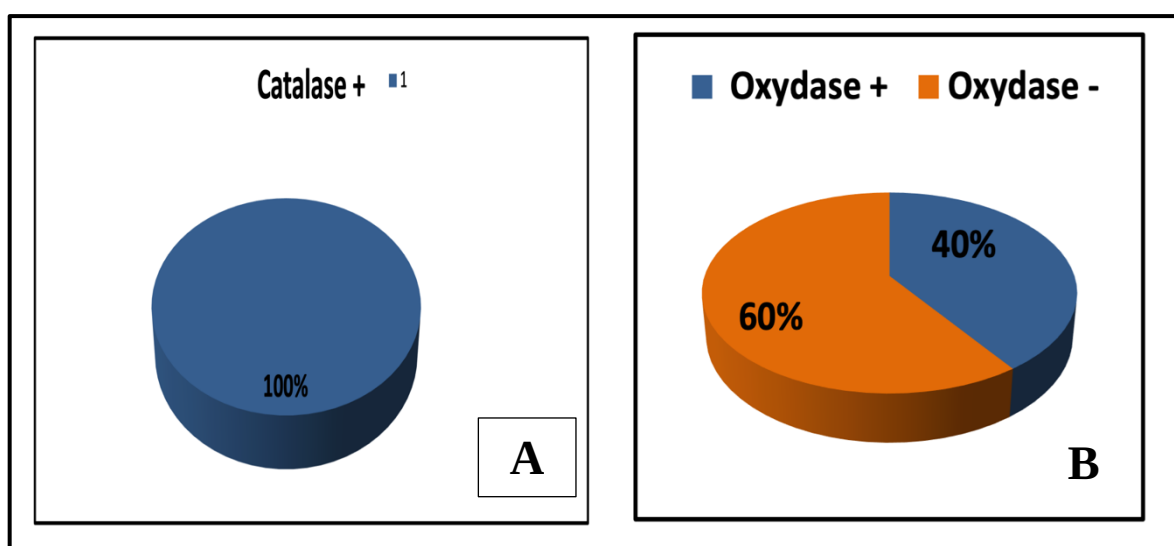


Figure 13 : les tests biochimiques des isolats.

A : pourcentages da catalase pour les isolats.

B : pourcentages d'oxydase pour les isolats.

La production des phytohormones par les bactéries rhizosphériques et leurs effets bénéfiques sur la croissance des plantes ont été rapportés par plusieurs auteurs (**Bashan et Holguin, 1997** ; **Patten et Glick, 1996**). Environ 80 % des bactéries de la rhizosphère peuvent sécréter de l'AIA (**Johri et al., 2003**), le dosage colorimétrique a montré que 57,9 % des isolats testés étaient capables de produire de l'AIA sur milieu YMB contenant le Tryptophane, cela a montré que ces isolats dépendent du précurseur L-Trp et synthétisent probablement l'AIA par les voies dépendantes du tryptophane. Dans des conditions naturelles, les racines des plantes excrètent

des composés organiques, dont le L-Trp, qui peuvent être utilisés par les rhizobactéries pour la biosynthèse de l'AIA (**Ahmad *et al.*, 2005**).

Les résultats obtenus dans notre travail par l'isolat HM13 sont proche à ceux rapporté par **El-Khawas et Adachi (1999)**, tandis que des taux plus élevés que les taux rapportés par nos études ont été obtenue par **Lebrazi *et al.*, (2020)** et **Baliyan *et al.*, (2021)**. Il a été rapporté que la production d'AIA par les bactéries peut varier selon les espèces et les souches, et qu'elle est également influencée par les conditions de culture, le stade de croissance et la disponibilité en substrat (**Ait Bessai *et al.*, 2022**).

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail était d'isoler des bactéries rhizosphériques capables de produire l'acide indole-3-acétique (AIA), une phytohormone essentielle à la croissance et au développement des plantes.

Au total, 157 isolats bactériens ont été obtenus à partir des échantillons de rhizosphère analysés. Le criblage de leur capacité à produire l'AIA a révélé que 90 isolats étaient producteurs de cette phytohormone, mettant en évidence une importante diversité de bactéries promotrices de croissance végétale (PGPR) au sein de la rhizosphère étudiée. Parmi ces isolats, la souche HM13 s'est distinguée par sa forte capacité de production d'AIA.

Les résultats obtenus confirment le potentiel des bactéries rhizosphériques productrices d'AIA en tant qu'agents favorisant la croissance des plantes. Ils soulignent également l'intérêt de la rhizosphère comme source de microorganismes d'intérêt pour des applications en agriculture durable.

Cette étude constitue une base solide pour des investigations complémentaires visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la biosynthèse de l'AIA par l'isolat sélectionné. Des travaux futurs pourraient porter sur son identification moléculaire, l'étude de son potentiel à produire d'autres métabolites favorisant la croissance végétale, ainsi que l'évaluation de son efficacité en conditions de serre et en plein champ. Le développement d'une formulation adaptée et l'étude de sa stabilité permettraient également d'envisager son utilisation comme biofertilisant dans le cadre d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Ahmad, F., Ahmad, I., & KHAN, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turkish Journal of Biology, 29(1), 29-34.
- Alabouvette, C., & Cordier, C. (2018). Fertilité biologique des sols: des microorganismes utiles à la croissance des plantes. Innovations Agronomiques, 69, np.
- Aoi, Y., Tanaka, K., Cook, S. D., Hayashi, K. I., & Kasahara, H. (2020). GH3 auxin-amido synthetases alter the ratio of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology, 61(3), 596-605.

B

- Bakthavatchalu, S., Shivakumar, S., & Sullia, S. B. (2012). Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluation of their potential as biocontrol agents. Acta Biologica Indica, 1(1), 61-67.
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1997). Azospirillum–plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). Canadian journal of microbiology, 43(2), 103-121.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and molecular biology, 35(4 suppl 1), 1044-1051.

C

- Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., & Ljung, K. (2021). Auxin metabolism in plants. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 13(3), a039867.
- Cohen, J. D., Slovin, J. P., & Hendrickson, A. M. (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. Trends in plant science, 8(5), 197-199.
- Costacurta, A., Keijers, V., & Vanderleyden, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an Azospirillum brasilense indole-3-pyruvate decarboxylase gene. Molecular and General Genetics MGG, 243(4), 463-472.

D

- Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B., & Kausar, R. (2016). Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the

rhizosphere of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 37(1), 130-136.

- Datta, C., & Basu, P. S. (2000). Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiological research*, 155(2), 123-127.
- Dey, R. K. K. P., Pal, K. K., Bhatt, D. M., & Chauhan, S. M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 159(4), 371-394.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125.

E

- El-Khawas, H., & Adachi, K. (1999). Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biology and Fertility of Soils*, 28(4), 377-381.

F

- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid : A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant signaling & behavior*, 10(8), e1048052.

G

- Glick, B. R. (2012). Plant growth - promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012(1), 963401.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Ma, W. (2001). Bacterial promotion of plant growth. *Biotechnology Advances*, 19(2), 135-138.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.

H

- HAMOUM, H. (2017). Screening des diazotrophes non symbiotiques associés aux plantes des zones salines de l'ouest algérien : effet phyto-stimulateur sur la croissance du blé (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).
- Homthong, M., Kaewpuk, W., Yamsuan, S., THONGSIMA, A., MOKKAPAN, K., & PIKULTHONG, V. (2022). Screening of indole-3-acetic acid PGPB from three agricultural systems at Nakhon Pathom, Thailand. *Biodiversitas: Journal of Biological Diversity*, 23(11).

J

- Jasim, B., Jimtha John, C., Shimil, V., Jyothis, M., & Radhakrishnan, E. K. (2014). Studies on the factors modulating indole - 3 - acetic acid production in endophytic bacterial isolates from *Piper nigrum* and molecular analysis of ipdc gene. *Journal of applied microbiology*, 117(3), 786-799.
- Jinturkar B., (2014). AN APPLICATION ON INDOLE-3-ACETIC ACID BY RHIZOBIUM ISOLATES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF INNOVATION IN ENGINEERING RESEARCH & MANAGEMENT*. P1-4.
- Johri, B. N., Sharma, A., & Viridi, J. S. (2003). Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Biotechnology in India I*, 49-89.

K

- Kennedy, A. C. (1998). The rhizosphere and spermosphere. *Principles and applications of soil microbiology*, 389-407.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4.
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., ... & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(8), 689-695.
- Kloepper, J. W., Zablutowicz, R. M., Tipping, E. M., & Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers.

L

- Laird, T. S., Flores, N., & Leveau, J. H. (2020). Bacterial catabolism of indole-3-acetic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(22), 9535-9550.
- Lebrazi, S., Fadil, M., Chraibi, M., & Fikri-Benbrahim, K. (2020). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 21.
- Lin, H. R., Shu, H. Y., & Lin, G. H. (2018). Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiological research*, 216, 30-39.
- Lynch, J. M. (1983). *Soil biotechnology: Microbiological factors in crop productivity* (pp. x+-191).

Références bibliographiques

- Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and soil*, 129(1), 1-10.

M

- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., & Barash, I. (1994). Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology*, 140(5), 1045-1050.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. M. L. M., & Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319.

N

- Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2016). Fed-batch fermentation of indole-3-acetic acid production in stirred tank fermenter by red yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(3), 414-421.

P

- Paque, S., & Weijers, D. (2016). Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC biology*, 14(1), 67.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Pons, S. (2020). Les hormones dans la symbiose mycorhizienne : étude de la production et des effets d'hormones végétales par les champignons endomycorhiziens (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Prasad, R., Kumar, M., & Varma, A. (2014). Role of PGPR in soil fertility and plant health. In *Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants* (pp. 247-260). Cham: Springer International Publishing.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., & Van Onckelen, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6, 609-615.

Q

- Quittenden, L. J., Davies, N. W., Smith, J. A., Molesworth, P. P., Tivendale, N. D., & Ross, J. J. (2009). Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant physiology*, 151(3), 1130-1138.

R

- Rajkumar, M., Lee, K. J., & Freitas, H. (2008). Effects of chitin and salicylic acid on biological control activity of *Pseudomonas* spp. against damping off of pepper. *South African Journal of Botany*, 74(2), 268-273.
- Ranjan, A., Mahalakshmi, M. R., & Sridevi, M. (2013). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacterial species from different crop fields of Salem, Tamil Nadu, India. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(1), 29.

S

- Shahab, S., Ahmed, N., & Khan, N. S. (2009). Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African journal of Agricultural research*, 4(11), 1312-1316.
- Singh, A., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2012). Stereoselective biocatalytic hydride transfer to substituted acetophenones by the yeast *Metschnikowia koreensis*. *Process Biochemistry*, 47(12), 2398-2404.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *Afr. J. Agric. Res*, 9(16), 1265-1277.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448.
- Sridevi, M., Yadav, N. C. S., & Mallaiah, K. V. (2008). Production of indole-acetic-acid by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. *Res J Microbiol*, 3(4), 276-281.

V

- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., & Vanderleyden, J. (1999). Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1338-1342.

Y

- Yuan, C. L., Mou, C. X., Wu, W. L., & Guo, Y. B. (2011). Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 322-329.

Annexes

Annexe I

Composition des milieux de culture

- **Milieu Gélose nutritive (GN)**

Peptone	10g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
NaCl	5g
Agar.....	20g
Eau distillée	1000mL
PH =7,0 + 0,2	
Stérilisation à 121°C pendant 20 min.	

- **Milieu Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948)**

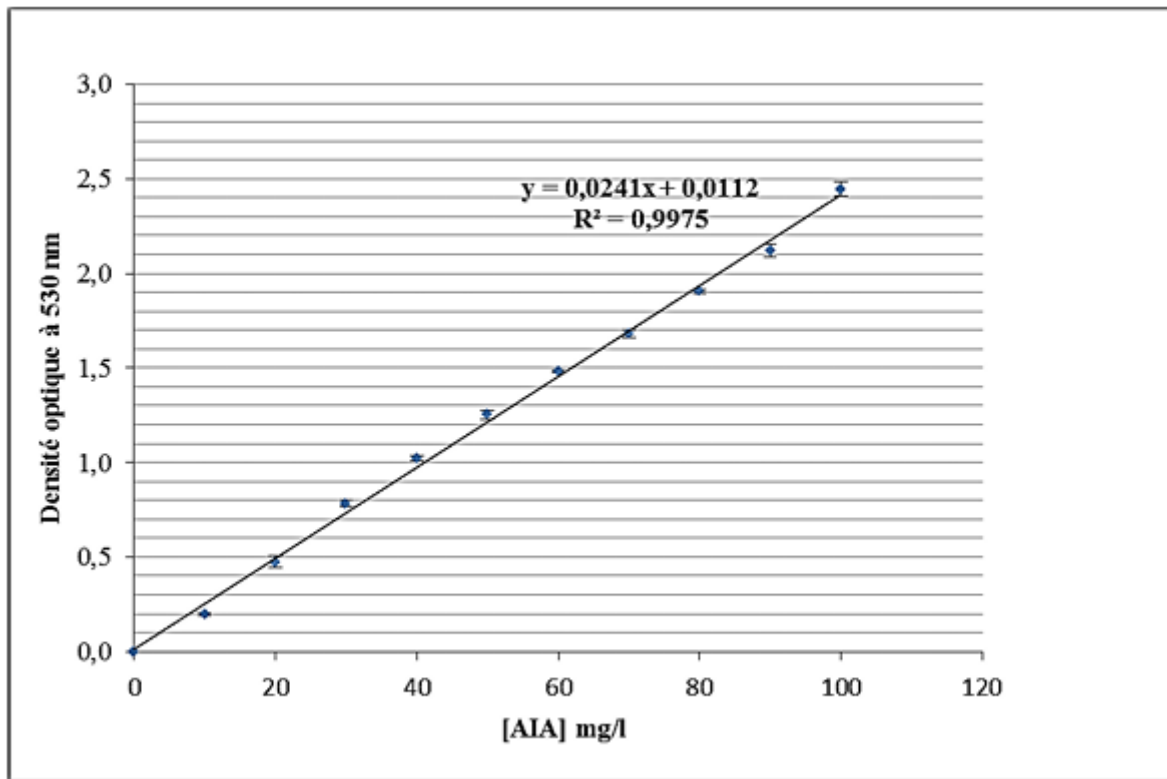
Glucose.....	10g
Extrait de levure	0,5 g
KCl	0,2g
NaCl	0,2g
(NH ₄) ₂ .SO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,002g
FeSO ₄	0,002g
Ca ₃ (PO ₄)	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000mL
PH =7,0	
Stérilisation à 121°C pendant 20 min.	

- **Milieu YMB (Yeast-Mannitol Brouth)**

Mannitol.....	10g
Extrait de levure	0,4g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
Nacl	0,1g
Eau distillée	1000ml
PH =6,8	
Stérilisation à 121°C pendant 20 min	

Annexe III

Courbe d'étalonnage



Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration d'AIA
(Hamoum,2017)

Annexe IV

Cordonnées cartographiques des échantillons

Échantillons	Date d'échantillonnage	Plantes	Cordonnées cartographiques	Lieu
HM	14/02/2026	Fève	36,1109444, 0,2741667	Ben Abdelmalek Ramdane
HN		Oignon	36,1109444, 0,2741667	Ben Abdelmalek Ramdane
HO		Fève	36,2968611, 0,6810833	Ouled Boughalem
HP		Oignon	36,2968611, 0,6810833	Ouled Boughalem
HQ		Fève	36,20072° N, 0,51231° E	Sidi Lakhdar
HR		Oignon	36,20072° N, 0,51231° E	Sidi Lakhdar
HS		Petits pois	36,20072° N, 0,51231° E	Sidi Lakhdar
HT		Menthe	36,20072° N, 0,51231° E	Sidi Lakhdar
HU		Pomme de terre	36,20072° N, 0,51231° E	Sidi Lakhdar
HV		Laitue	36,77234° N, 3,04975° E	Hadjadj
HW		Oignon	36,77234° N, 3,04975° E	Hadjadj
HX		Fève	36,09664° N, 0,32394° E	Hadjadj

Annexe V

Caractéristiques phénotypiques des isolats

SOUCHE	OXYDASE	CATALASE
HQ28	+	+
H6	-	+
K14	-	+
F11	-	+
J16	+	+
J13	+	+
HN22	+	+
HQ14	-	+
HQ25	-	+
C1	-	+
HO8	-	+
L7	+	+
F4	-	+
HS10	-	+
HO10	-	+
L6	+	+
G'1-6	-	+
Hv17	-	+
F3	+	+
L2	-	+
C3	+	+
C5	+	+
HU21	-	+
J9	-	+
HU23	-	+
HO9	+	+
J1	+	+
E1	-	+
HR14	+	+
A1'8	-	+
HS9	-	+

HU22	-	+
H7	-	+
HP12	-	+
A'1-9	-	+
G2	-	+
C6	-	+
C1'9	+	+
HN13	+	+
HM25	+	+
HM8	-	+
HX22	-	+
HP14	-	+
HR16	-	+
C7	-	+
J2	-	+
L8	-	+
F10	-	+
J7	-	+
L5	+	+
H5	+	+
H1	+	+
L10	-	+
A3	-	+
J3	+	+
H11	-	+
L3	-	+
K13	-	+
J11	-	+
A2	-	+
A1	+	+
J6	+	+
F9	-	+
F6	-	+
G1'11	+	+
C1'10	-	+

G1'12	-	+
G1'13	+	+
G1'2	+	+
G1'1	-	+
L1	+	+
E4	+	+
B1	+	+
G1'3	-	+
G1'10	-	+
E3	+	+
C2	-	+
HN17	+	+
HX5	-	+
HM12	+	+
HN16	-	+
HM15	-	+
HN12	+	+
HX10	+	+
HX3	+	+
HX12	-	+
HN5	+	+
1A'1	-	+
HR2	-	+
HB4	-	+
HW2	+	+
HM6	+	+
HR1	-	+
HR8	+	+
HW3	-	+
HX8	-	+
HN8	+	+
HN1	+	+
HM16	-	+
HN15	+	+
HN2	-	+

HX4	-	+
HX1	-	+
HN7	+	+
HN4	+	+
HX7	-	+
G1'5	-	+
L12	+	+
HR15	-	+
HR13	-	+
HO7	+	+
HG1	-	+
HW1	+	+
HM1	-	+
HM5	-	+
HM10	-	+
HM14	-	+
A4	-	+
HX9	-	+
HR6	-	+
HR9	+	+
B3	-	+
HM11	-	+
HX6	+	+
D2	+	+
HJ8	-	+
HR3	-	+
HN11	+	+
HR7	-	+
HR5	-	+
HR10	+	+
HN3	+	+
C4	+	+
HX2	-	+
HR4	-	+
HF5	-	+

HN14	+	+
HN10	+	+
HN9	+	+
HM17	+	+
HM7	-	+
HN6	+	+
4HG'1	-	+
HF1	+	+
HM18	-	+
F2	+	+
HV16	-	+
C1'11	-	+
G1'8	+	+