

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abderrahmane Mira - Bejaia

Faculté de sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie
Ecologie microbienne



Réf :.....

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude des bactéries symbiotiques sous contrainte saline
(Symbiose rhizobia-légumineuse)

Présenté par :

Mlle KHIDER Meriem & Mlle BOUHEDDOU Kahina

Soutenu le : **25/09/2021**

Devant le jury composé de :

Mlle YANAT Betitera

MCA

Président

Mlle SALMI Adouda

MCB

Encadreur

Mlle BOUAOUD Yousra

MCB

Examineur

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Avant tout, on remercie « ALLAH » tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la patience et la volonté, pendant toutes ces années d'études et pour mener à terme ce travail.

Nous remercions en premier lieu notre promotrice Mlle Salmi.A, pour avoir dirigé ce travail et pour les conseils, les orientations et les moyens qu'elle a mis à notre disposition afin de le réaliser, ainsi sa bonté et sa générosité.

Nous remercions les membres de jury d'avoir accepté la charge d'examiné ce travail.

Nos profonds remerciements vont également à Mm Boulila.F et à tous le personnel du laboratoire d'Ecologie microbienne d'avoir nous accueillir et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens nécessaires pour accomplir notre recherche.



Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail

À mes chers parents, à qui je dois un remerciement profond pour leurs sacrifices, patience, soutien et encouragements. Puisse DIEU me les garder.

A la mémoire de ma chère grand-mère qui m'a tant apporté, que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

A ma grand-mère paternelle à qui je souhaite une longue vie.

A mes chers frère et sœurs ainsi ma belle-sœur et beaux frères

A ma sœur Mima particulièrement, que je remercie pour son soutien moral malgré la distance.

A mes chers neveux et nièces, mes meilleurs vœux de succès dans vos études.

A tous mes amis (es) sans exception.

Sans oublier tout ce qui ont travaillé dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne et que j'avais de la chance de travailler avec eux.

*Les collègues de la promo d'Ecologie Microbienne et de Microbiologie,
Merci pour ces bons moments que nous avons partagés ensemble
durant ce petit temps.*



Meriem

Table des matières

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations

Introduction1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. La symbiose rhizobia-légumineuse.....	3
I.1. Définition	3
I.2. Intérêts de la symbiose rhizobia-légumineuse	3
II. Légumineuses (le macro-symbiote).....	3
II.1. Définition	3
II.2. Classification des légumineuses	4
II.3. Intérêts des légumineuses	4
III. Rhizobia (le micro-symbiote)	4
III.1. Définition.....	4
III.2. Classification des rhizobia.....	5
III.3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	6
IV. Interaction symbiotique rhizobia- légumineuse	7
IV. 1. Fixation d'azote atmosphérique par la symbiose rhizobienne	7
IV. 2. Le Processus de la nodulation	7
IV. 2.1. Pré échange du signal d'infection	7
IV. 2.2. Infection	7
IV. 2.3. Développement du nodule.....	8
V. Facteurs influençant la symbiose rhizobia-légumineuse.....	8
V.1. Stress biotique.....	8
V.2. Stress abiotique.....	9
VI. Effet de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuse	9
VI.1. Définition de la contrainte saline	9
VI.2. Effet de la salinité sur le partenaire bactérien (rhizobia).....	10
VI.3. Effet de la salinité sur le partenaire végétal (légumineuse).....	11
VI.3.1. Effet sur la germination.....	11
VI.3.2. Effet sur la croissance et développement	11
VI.4. Effets de la salinité sur le métabolisme de l'azote et la nodulation	12
VII. Mécanismes de tolérance des partenaires symbiotiques à la salinité.....	12
VIII. Solutions possibles pour une meilleure agriculture en sols salins	13

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

I. Matériel biologique	15
I.1. Souches bactériennes.....	15
I.2. Matériel végétal.....	15
II. Méthodes.....	15
II.1. Caractérisation morphologique et cellulaire	15
II.2. Caractérisation biochimique des souches.....	16
II.2.1. Mise en évidence de l'activité cellulolytique.....	16
II.2.2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique.....	16
II.2.3. Mise en évidence de l'activité chitinolytique	16
II.2.4. Mise en évidence de l'activité gélatinolytique.....	16
II.2.5. Hydrolyse de l'urée.....	17
II.2.6. Réduction des nitrates	17
II.3. Recherche des caractéristiques PGP	18
II.3.1. Production de l'auxine : Acide Indole 3-Acétique (AIA).....	18
II.3.2. Solubilisation du phosphate tricalcique	18
II.3.3. Production des sidérophores	18
II.4. Effet du NaCl sur les souches étudiées	19
II.4.1. Détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices).....	19
II.4.2. Effet du NaCl sur la croissance des souches.....	19
II.4.3. Détermination du temps de génération et taux de croissance	20
II.5. Effet du NaCl sur les caractéristiques PGP	20
II.5.1. Effet du NaCl sur la production d'AIA	20
II.5.2. Effet du NaCl sur la production des sidérophores	20
II.6. Effet du NaCl sur la symbiose « <i>Lupinus Albus - Bradyrhizobium sp</i> ».....	21
II.6.1. Effet du NaCl sur la germination en présence et en absence de <i>Bradyrhizobium</i>	21
II.6.2. Effet du NaCl sur la croissance des plantes inoculées et non inoculées.....	22

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Caractérisation morphologique et cellulaire	24
II. Caractérisation biochimique des souches.....	25
III. Recherche des caractéristiques PGP	26
IV. Effet du NaCl sur les souches étudiées	27

IV.1. Détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices)	27
IV.2. Effet du NaCl sur la croissance des souches	28
IV.3. Temps de génération et taux de croissance des souches sous l'effet du NaCl.....	29
V. Effet du NaCl sur les caractéristiques PGP	30
VI. Effet du NaCl sur la symbiose « <i>Lupinus albus- Bradyrhizobium sp</i> »	31
VI.1. Effet du NaCl sur la germination en présence et en absence de <i>Bradyrhizobium</i>	31
VI.2. Effet du NaCl sur la croissance des plantes inoculées et non inoculées	34
VI.2.1. Evaluation de la croissance	34
VI.2.2. Effet du NaCl sur la nodulation.....	36
VI.2.3. Effet du NaCl sur le nombre de feuillies.....	37
VI.2.4. Effet du NaCl sur la longueur de la partie aérienne et racinaire	37
VI.2.5. Effet du NaCl sur le poids frais et le poids secs.....	39
Conclusion	42
Annexe	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des sols salés.....	10
Tableau II : Caractéristiques morphologiques des graines utilisées.....	15
Tableau III : Résultats de l'activité enzymatique des souches.....	25
Tableau IV : Niveau de tolérance des souches au NaCl (CMI).....	27
Tableau V : Temps de génération et taux de croissance des souches sous effet du NaCl.....	29
Tableau VI : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la nodulation de <i>L.albus-Bradyrhizobium</i>	36
Tableau VII : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur le nombre de feuillies.....	37

Liste des figures

Figure 1 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur les séquences de l'ARNr.....	5
Figure 2 : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR.....	6
Figure 3 : Différentes étapes de nodulation de la symbiose rhizobia-légumineuse.....	8
Figure 4 : Les facteurs influençant la symbiose Rhizobia-légumineuses.....	9
Figure 5 : Effets délétères liés à la toxicité du stress salin.....	13
Figure 6 : graines de lupin blanc utilisées dans l'étude.....	15
Figure 7 : Teste de recherche du nitrate réductase.....	17
Figure 8 : Teste de recherche de l'AIA.....	18
Figure 9 : Test de production dessidérophores.....	19
Figure 10 : Test de germination des graines de <i>L.albus</i> sous contrainte saline.....	21
Figure 11 : Les traitements à appliquer sur les plantules.....	22
Figure 12 : Plantules âgées de 24 h.....	23
Figure 13 : Plantules âgées de 6 jours.....	23
Figure 14 : Analyse agronomique appliquée sur les plantules.....	23
Figure 15 : Aspect des colonies de csa208 formées sur YMA.....	24
Figure 16 : Aspect des colonies de csa112 formées sur YMA.....	24
Figure 17 : Observation microscopique des cellules de csa208.....	24
Figure 18 : Observation microscopique des cellules de csa112.....	24
Figure 19 : Résultats des activités enzymatiques des souches étudiées.....	25
Figure 20 : Test d'uréase (+) sur YMA.....	26
Figure 21 : Nitrate réductase (+).....	26
Figure 22 : Production d'AIA(+).	27
Figure 23 : Solubilisation du phosphate (-).	27
Figure 24 : Production de sidérophores (+).	27
Figure 25 : Courbes de croissances de csa208 à différentes concentrations en NaCl en fonction du temps.....	28

Figure 26 : Courbes de croissances de csa112 à différentes concentrations de NaCl en fonction du temps.....	28
Figure 27 : Production d'AIA à différentes concentration de NaCl (csa208 / csa112)	30
Figure 28 : Production de sidérophores à différentes concentration de NaCl (csa208 / csa112)...	30
Figure 29 : Quantités d'AIA produites à différentes concentration de NaCl.....	30
Figure 30 : Germination des graines de <i>L.albus</i> sous stress salin (NaCl).....	31
Figure 31 : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la germination des graines de <i>L.albus</i> en absence de <i>Bradyrhizobium</i>	32
Figure 32 : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la germination des graines de <i>L.albus</i> inoculées par la souche csa208.....	33
Figure 33 : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la germination des graines de <i>L.albus</i> inoculées par la souche csa112.....	33
Figure 34 : Croissance de <i>L.albus</i> stressé par NaCl en présence et en absence d'inoculation	34
Figure 35 : Croissance de <i>L.albus</i> stressé par NaCl en présence et en absence d'inoculation.....	35
Figure 36 : Nodules observées sur les racines de <i>L.albus</i> inoculée par <i>Bradyrhizobium</i>	37
Figure 37 : Variation des longueurs de la partie aérienne de <i>L.albus</i> inoculée ou non par <i>Bradyrhizobium</i> en fonction de concentrations croissantes de NaCl.....	38
Figure 38 : Variation des longueurs de la partie racinaire de <i>L.albus</i> inoculée ou non par <i>Bradyrhizobium</i> en fonction de concentrations croissantes en NaCl.....	38
Figure 39 : Variation des poids frais de <i>L.albus</i> inoculée ou non par <i>Bradyrhizobium</i> en fonction de concentrations croissantes de NaCl.....	39
Figure 40 : Variation des poids secs de <i>L.albus</i> inoculée ou non par <i>Bradyrhizobium</i> en fonction de concentrations croissantes de NaCl.....	40

Introduction

La salinisation des sols est un problème majeur dans le monde. Selon les estimations les plus récentes de la FAO (Food Agriculture Organisation), la contrainte saline affecte plus de 350 millions d'hectares de terres cultivées et en menace gravement une surface équivalente (Alves et al., 2020), dont plus de 50 millions d'hectares se trouvent en Afrique. Ce problème est non seulement lié aux conditions climatiques, mais aussi à la mauvaise qualité et gestion des eaux d'irrigation (Benidire et al., 2015).

L'Algérie particulièrement, est un pays englobant toutes les variantes du climat méditerranéen, il n'échappe donc pas à ce phénomène. La sécheresse observée depuis longtemps a conduit au processus de salinisation des sols dans ce pays (Grandi et al., 2020).

La salinité est un facteur limitant de la productivité des cultures et constitue une menace globale pour la sécurité alimentaire du futur. Avec la croissance démographique croissante, l'accès à la terre devient plus difficile. Par conséquent, il est urgent de développer des stratégies efficaces pour réhabiliter les terres salées. La réduction de la salinité et les cultures à haut rendement constituent un défi majeur pour les pays en développement. (Tani et al. 2018).

Les bactéries telles que rhizobium et bradyrhizobium, sont d'une importance en agriculture à cause de leur capacité d'établir une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. Elles peuvent jouer un rôle important dans la protection de l'environnement, la progression de la fertilité des sols et dans l'amélioration de la croissance et de la productivité des légumineuses à travers plusieurs sujets tels que leur interaction, la fixation d'azote, la diversité génétique et la tolérance aux stress biotique et abiotique y compris la salinité (Sanchez, 2017).

La recherche visant à trouver des solutions écologiquement viables pour une utilisation productive des sols affectés par la salinité est insuffisante en Algérie. En revanche, certaines études au niveau mondial proposent la phytoremédiation comme solution, la combinaison entre le cultivar de la plante et souches rhizobiennes qui présentent une tolérance à la salinité, cette stratégie semble efficace pour améliorer la productivité des légumineuses dans les sols affectés par la contrainte saline (Cheikh Oumar et al., 2020).

La fixation de l'azote atmosphérique par un couple symbiotique tolérant à la salinité serait une alternative intéressante pour l'amélioration de la fertilité des sols salins et l'augmentation de la productivité agricole (Hernandez et al., 2020).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre recherche qui a pour objectif l'étude des souches de *Bradyrhizobium* sous conditions de salinité et l'effet du NaCl sur la symbiose rhizobia-légumineuse (*Lupinus albus* et *Bradyrhizobium*) afin d'évaluer leurs tolérance à cette contrainte.

Ce travail est réalisé en trois parties, un premier chapitre sous forme d'une synthèse bibliographique, principalement des généralités sur la symbiose rhizobia légumineuse et le stress salin. Un deuxième chapitre décrit les matériels et la méthodologie de travail adoptés afin d'évaluer l'effet du NaCl sur la croissance et l'activité des souches du genre *Bradyrhizobium* ensuite sur la symbiose rhizobia-légumineuse (*Bradyrhizobium-Lupinus.albus*). Le dernier chapitre est consacré à la présentation et discussion des résultats obtenus.

Synthèse bibliographique

I. La symbiose rhizobia-légumineuse

I.1. Définition

En biologie le terme « symbiose » signifie « vivre ensemble » et traduit une association entre deux ou plusieurs organismes appelés « symbiotes », d'espèces différentes qui sont en contact direct l'un avec l'autre. Dans le règne végétal, le type de symbiose le plus étudié est celui des légumineuses avec les micro-organismes symbiotiques (Lefèvre et al., 2010).

La symbiose rhizobia-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie fixatrice d'azote dite rhizobium (Faria et al., 2010). Ce dernier induit la formation d'un organe spécialisé sur les racines qualifié de « nodule », à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde, résident en tant que symbiote intracellulaire et convertie l'azote atmosphérique en ammoniac (sous forme réduite) qui peut être facilement assimilé par les plantes hôtes. En échange la plante fournit à la bactérie l'énergie et les nutriments nécessaires à son métabolisme et développement (Day et al., 2001). La symbiose améliore non seulement la disponibilité de l'azote pour la plante hôte, mais stimule également la fixation du carbone (Concha et Doerner, 2020).

I.2. Intérêts de la symbiose rhizobia-légumineuse

L'intérêt principal de la symbiose rhizobienne est la fixation d'azote qui permet aux légumineuses d'assurer leurs besoins et d'être relativement indépendantes vis-à-vis de l'azote du sol. L'importance de cet intérêt devient évidente avec l'ascension des prix des engrais azotés et au vu des problèmes de pollution par les nitrates, la symbiose permet le maintien de la fertilisation du sol et la réduction d'incidences sur l'environnement dérivé par l'utilisation étendue des engrais industriels (Hussain et Al., 2010 ; Dwivedi et al., 2015).

II. Légumineuses (le macro-symbiote)

II.1. Définition

Les légumineuses représentent la troisième plus grande famille de plantes à fleurs, elles font partie de la famille des *Fabaceae*, diversifiées avec 770 genres et près de 20000 espèces (Yahara et al., 2013). Elles sont très cosmopolites, présentes sur tous les continents excepté l'antarctique et elles colonisent tous les milieux y compris les plus extrêmes. Ces plantes sont largement caractérisées par leurs structures florales inhabituelles, leurs fruits et leur capacité à former des nodules en association avec les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, ce processus permet aux légumineuses d'être cultivées sans utilisation d'engrais azoté (Sierra et Tournebize, 2019).

II.2. Classification des légumineuses

Les légumineuses sont divisées en trois sous-familles : deux monophylétiques (*Papilionoideae* et *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinoideae*) (Botineau, 2010). La majorité des légumineuses d'intérêt appartient au papilionacées comme : le pois, les lentilles, le trèfle, le haricot, le soja et la luzerne (Cronk et al., 2006), parmi cette sous-famille une espèce du genre *Lupinus* a été concernée par cette étude, il s'agit du Lupin blanc.

II.3. Intérêts des légumineuses

Il est avantageux de cultiver les légumineuses car elles sont d'une importance considérable pour l'homme et pour l'environnement, elles présentent de différents intérêts dans plusieurs domaines notamment : agro-écologique, économique, alimentaire, industriel et médical.

Les légumineuses sont une source d'engrais vert, elles contribuent naturellement à enrichir le sol en azote. Au total le trèfle fixe entre 50 et 100 Kg d'azote par hectare/an. Le soja et le lupin, apportent au sol entre 300 et 500 kg d'azote par hectare/an (Frontier et al., 2004). Certaines légumineuses sont utilisées en phytoremédiation, pour le piégeage et la dégradation de contaminants du sol, tels : les métaux lourds (Afzal et al., 2014). Elles sont aussi des sources importantes de nutriments (protéines, vitamines, sucres...etc.) (Vasconcelos et Gomes, 2016). En plus de leur consommation par l'homme, les légumineuses sont utilisées dans l'alimentation des animaux, comme fourrage vert ou sec (Zaidi et kaved, 2017).

En industrie, elles peuvent être broyées en farine, ou sous forme liquide pour production du lait et du yaourt, aussi utilisé dans la fabrication des : plastiques biodégradables, huiles, gommés, encres, teintures, médicaments, parfums et substances antimicrobiennes (Iskounen, 2012). Les légumineuses sont également utilisées dans la médecine populaire (Abderrahim et Imakhloufene, 2016).

III. Rhizobia (le micro-symbiote)

III.1. Définition

Les rhizobia sont des bactéries du sol capables de fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec les légumineuses en formant des nodules soit au niveau des racines ou plus rarement sur les tiges de la plante. Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif, aérobies strictes, mobiles, sous forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 μm de largeur et d'environ 1 à 3 μm de longueur, arrondies à leurs extrémités et non sporulantes (Boukecha et al., 2017).

La croissance optimale de la plupart des souches se situe entre 25°C et 30°C et un pH de 6 à 7. Elles se développent généralement sur milieu YMA (Yeast Mannitol Agar), sur lequel les colonies de rhizobia apparaissent sous forme circulaire, souvent punctiformes, blanches ou crèmes, opaques ou laiteuses, humides, translucides et peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles et sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Hamdaoui et Hammiche, 2019).

III.2. Classification des rhizobia

Selon **Bergey's Manuel (2012)**, les rhizobia appartiennent au domaine des *Eubacteria*, au phylum des *Proteobacteria* et à la classe des *Alpha* et *beta*, elles comportent environ 13 genres et plus d'une centaine d'espèces (figure 1). La majorité des rhizobiums appartient à la classe des α -*Proteobacteriaceae* (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*,...etc.) (Yaw Boakye et al., 2016). Cette taxonomie est continuellement en évolution et en changement.

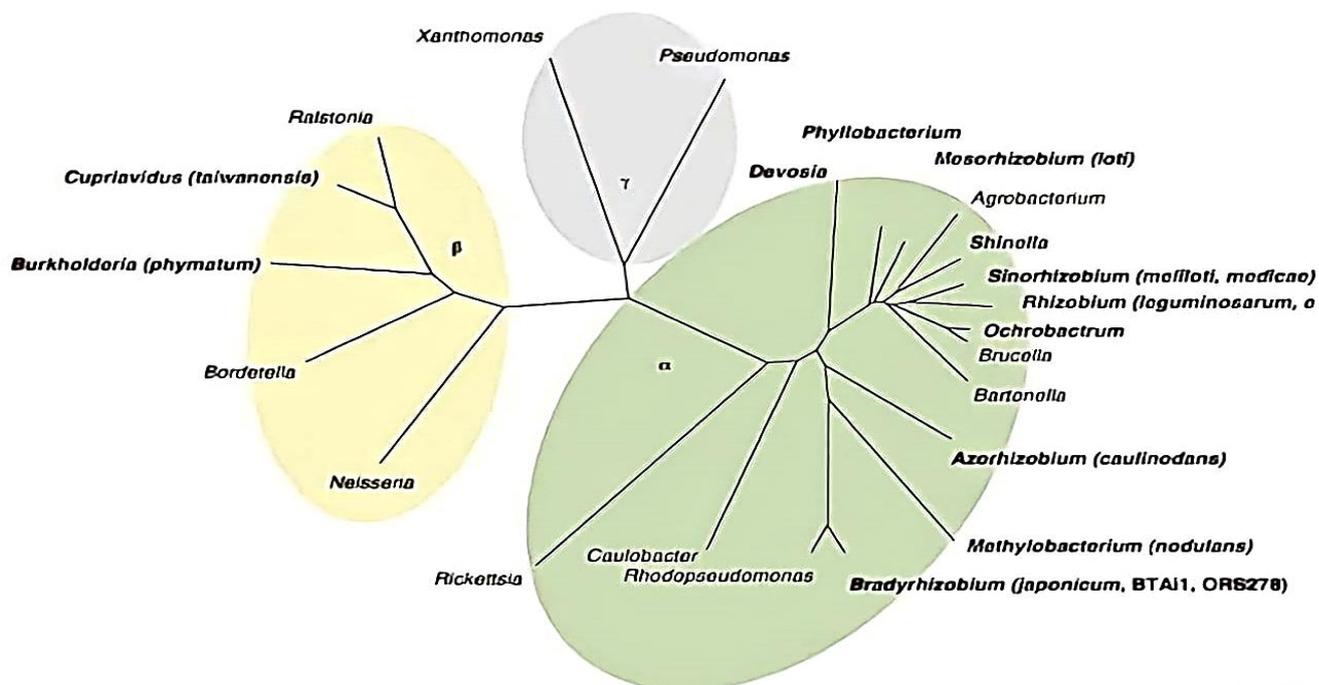


Figure 1 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur les séquences de l'ARNr 16s (Masson-Boivin et al., 2009).

III.3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les rhizobactéries connues sous le terme PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), sont les micro-symbiotes ayant la capacité de coloniser les racines de façon intense, elles jouent un rôle très important dans l'amélioration de la croissance des plantes à différents stades de leur développement et dans la réduction des maladies causées par les phytopathogènes (virus, bactéries, champignons, nématodes) (Affati et Kerdouci., 2020). Certaines PGPR stimulent des changements physiques ou chimiques améliorant les défenses de la plante, elles jouent aussi un rôle vital pour les plantes par la fixation de l'azote atmosphérique et sa disponibilité conséquente dans le sol, de plus, les PGPR partagent le même environnement avec les racines des plantes, elles sont donc exposées aux mêmes contraintes environnementales que ces dernières (Saharan et Nehra., 2011).

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les PGPR dont les modes d'action sont directs ou indirects (Figure 2). Les mécanismes indirects en général se produisent en dehors de la plante. Les PGPR protègent les plantes contre des infections par des agents phytopathogènes : par la compétition pour l'espace et les nutriments et la synthèse d'enzymes limitant les phytopathogènes, par l'antibiose (sécrétion d'antibiotiques) et par la résistance systémique induite (ISR). Tandis que les mécanismes directs se produisent à l'intérieur de la plante tels que : la fixation d'azote, la solubilisation des phosphates, la production des sidérophores et des phytohormones comme l'auxine (acide indole acétique AIA) qui est le premier régulateur de croissance chez les végétaux. Ces mécanismes pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes (Cherif, 2014 ; Giroux, 2015).

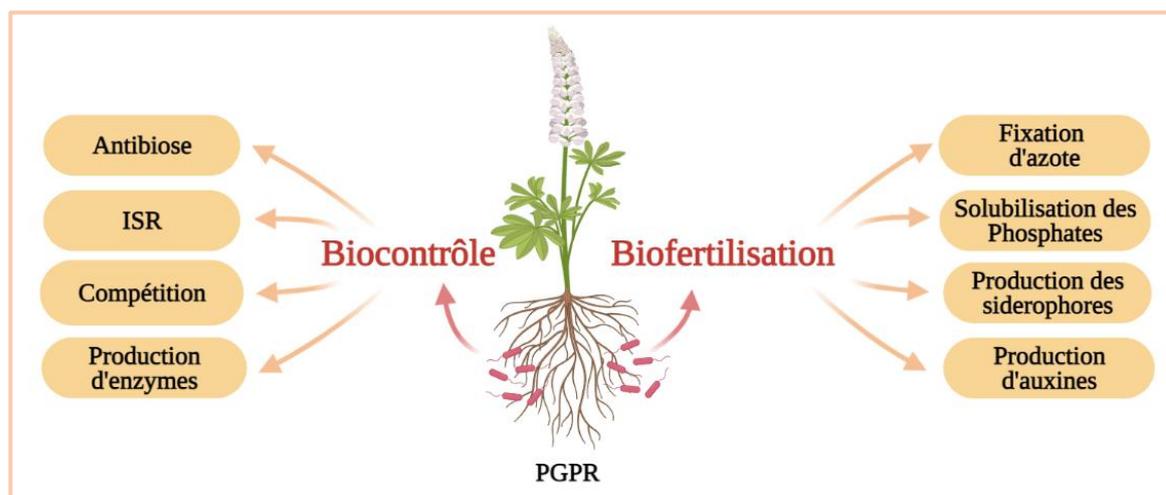


Figure 2 : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR

IV. Interaction symbiotique rhizobia-légumineuse

L'interaction symbiotique se manifeste par la nodulation c'est-à-dire l'apparition d'un nouvel organe appelé « nodule », au sein duquel les bactéries symbiotiques, différenciées en bactéroïdes, fixent l'azote atmosphérique.

IV.1. Fixation d'azote atmosphérique par la symbiose rhizobienne

La fixation biologique de l'azote (N_2) est une activité microbienne aussi importante que la photosynthèse pour le maintien de la vie sur le globe terrestre, puisque l'azote est un élément nutritif majeur pour la plante, et constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Les plantes acquièrent l'azote sous forme minérale, mais malheureusement, la concentration de ses formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, etc.) est souvent limitante pour la bonne croissance des plantes (Hamdaoui et Hammiche, 2019). Ce processus de fixation symbiotique permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote présent dans l'atmosphère et l'environnement, par la réduction enzymatique du N_2 (azote moléculaire) en NH_3 (azote ammoniacal), en NO_2^- (nitrite) ou en NO_3^- (nitrate) (Latati, 2012).

IV.2. Le Processus de la nodulation

La formation de nodosités peut se résumer en trois grandes étapes : le dialogue entre les deux partenaires symbiotiques basé sur un échange de molécules chimiques, l'infection, correspondant à l'entrée des bactéries libres dans la légumineuse, et le développement du nodule (Perry et al., 2004 ; Shimoda et al., 2012).

IV.2.1. Pré échange du signal d'infection

Initialement, un échange de signaux moléculaires spécifiques se produit entre la plante et la bactérie. Les plantes libèrent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines, qui vont déclencher la transcription des facteurs Nod chez les rhizobia (figure3/1), ces facteurs à leur tour jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules, ils stimulent la croissance des poils absorbants, qui en réponse vont se courber pour entourer les cellules bactériennes et former une structure appelée « crosse de berger » (figure3/2) (Patriarca et al., 2004 ; Yang et al., 2010).

IV.2.2. Infection

L'infection débute après l'attachement du rhizobia aux racines de la plante, elle consiste en la pénétration de ces bactéries dans les cellules végétales par des filaments infectieux, formés pour faciliter l'entrée du rhizobia aux couches les plus profondes (figure3/3). La pénétration est ainsi

facilitée par les enzymes qui fragilisent la paroi, secrétées par le poil absorbant (Dupuy et Nougier, 2005 ; Estrada, 2016). Le temps de pénétration diffère d'une plante à une autre, il est de 5 heures chez le soja, de 17 heures chez le lupin et de 2 jours chez le pois (Heller et al., 1989).

IV.2.3. Développement du nodule

Le stade final du processus infectieux est atteint une fois les bactéries sont libérées à l'intérieur des cellules végétales à partir des cordons d'infection (figure 3/4). De ce fait, une série de divisions cellulaires se réalise suivi d'une différenciation en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de « bactéroïdes » (figure 3/5). Enfin la croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées (Perry et al., 2004 ; Babaarbi, 2016 ; Affati et Kerdouci, 2020).

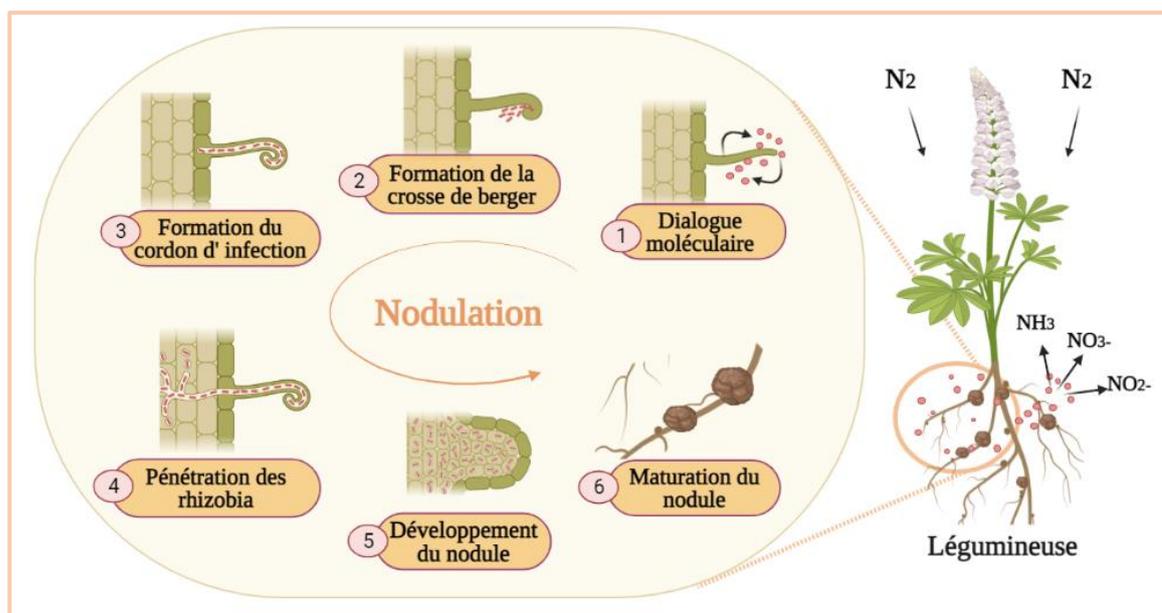


Figure 3 : Différentes étapes de nodulation de la symbiose rhizobia-légumineuse

V. Facteurs influençant la symbiose rhizobia-légumineuse

La survie des rhizobias dans le sol, la formation des nodosités et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action d'un certain nombre de facteurs écologiques, dits édaphiques ou limitants lorsqu'ils nuisent au fonctionnement habituel de la plante fixatrice d'azote. Ces contraintes se divisent en deux catégories, stress biotique et abiotique (figure 4) (Kinkema et al., 2006 ; Abolhasaniet al., 2010 ; Concha et Doerner, 2020).

V.1. Stress biotique

Représente les paramètres physico-chimiques ou biologiques qui découlent de l'existence de l'action des êtres vivants comme les champignons, les insectes, les bactéries et les virus. La symbiose fixatrice d'azote peut être limitée par ces agents pathogènes qui s'attaquent aux nodosités ou provoquent une pourriture racinaire (Odile, 2017).

V.2. Stress abiotique

Il est dû principalement à des facteurs environnementaux liés aux caractéristiques physiques et chimiques du sol (texture et structure), comme la sécheresse, les températures extrêmes, les pH extrêmes, présence de polluants, excès d'eau, l'acidité du sol et la salinité. Ces facteurs influencent sur les deux partenaires (rhizobium et légumineuse), ils ont un impact négatif sur la survie et la croissance des rhizobia, donc diminuent la fixation du N_2 et la productivité des légumineuses et provoquent une diminution de la nodulation (Iskounen, 2012 ; Abd-allah, 2014).

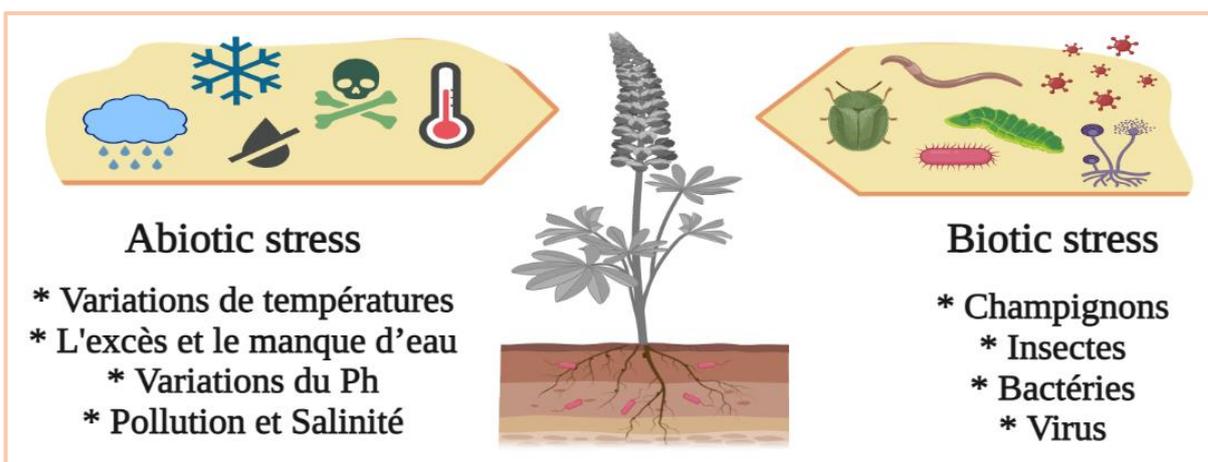


Figure 4 : Les facteurs influençant la symbiose rhizobia-légumineuse

VI. Effet de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuse

VI.1. Définition de la contrainte saline

La contrainte saline est définie comme une concentration excessive en sel, le chlorure et le sulfate sont les prédominants dans les sols salins et le terme stress salin s'applique surtout à un excès des ions, en particulier Na^+ et Cl^- (Ilangumaran et al., 2017), un sol est considéré comme salin si sa conductivité électrique dépasse 4 dS/m (tableau I) avec un taux de sodium échangeable supérieur à 15% (Shrivastava et Kumar, 2015).

Cette salinité peut être naturelle ou induite et les facteurs causals sont principalement : l'irrigation, le lessivage des cations, l'évapotranspiration, les conditions climatiques et la nature du sol (Ilangumaran et al., 2017).

Tableau I : Classification des sols salés (Tahri, 2018)

Classe	Conductivité (dS/m)
Non salins	0 – 2
Légèrement salins	2 – 4
Modérément salins	4 – 8
Fortement salins	8 - 16
Très fortement salins	>>16

La salinité est responsable de la détérioration du sol, elle réduit le potentiel hydrique, provoque le déséquilibre ionique et d'importantes pertes de récolte dans le monde, particulièrement dans les régions arides et semi-arides (Saadallah et al., 2001). Selon R'him et al., (2013), sur 1.5 milliard d'hectares de terre cultivée dans le monde, environ 77 millions d'hectares (5%) sont affectés par la teneur excessive en sel. Ce chiffre ne cesse d'augmenter d'une année à l'autre à cause de la mauvaise qualité de l'eau d'irrigation. Le stress salin est devenu une menace croissante à la production alimentaire, depuis que l'irrigation est considérée comme étant un problème majeur dans les champs agricoles suite à la salinisation progressive (Mouhous et Aliouat , 2018).

Il est admis que la salinité affecte la multiplication et la survie des rhizobiums, la croissance des plantes, l'assimilation des nutriments, le métabolisme et la synthèse des protéines et la fixation symbiotique de l'azote en limitant le fonctionnement des nodosités par une baisse de leur conductance à la diffusion de l'oxygène, tout cela provoque la diminution des rendements (Ben Khaled et al., 2003 ; Mouhous et Aliouat , 2018)

VI.2. Effet de la salinité sur le partenaire bactérien (rhizobia)

Le stress salin affecte d'une manière délétère la croissance, la survie et l'activité des souches rhizobienne dans le sol. Il a été rapporté que les sels de type chlorure sont plus toxiques pour les rhizobiums que les sulfates (El-Hilali, 2006) et la plupart des rhizobiums sont inhibés par des concentrations de 100 mM en NaCl, certaines souches tolérantes peuvent croître à des concentrations variant de 300 à 700 mM (Lebrazi et Benbrahim, 2014). Généralement, les cellules de rhizobia exposées aux concentrations élevées de sel sont capables de s'adapter à ces

conditions et d'améliorer la croissance des plantes et cela dépend de l'efficacité de leurs mécanismes d'osmorégulation (Brhada et Le Rudulier, 1995).

Ces bactéries développent souvent des mécanismes moléculaires protecteurs comme des acides aminés tels que la proline et la bétaine, les sucres et autres qui leur permettent de survivre et de croître, de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Essendoubi et al., 2006).

VI.3. Effet de la salinité sur le partenaire végétal (légumineuse)

La salinité peut affecter n'importe quel processus du cycle de vie de la plante :

VI.3.1. Effet sur la germination

Le stade de germination se montre le plus sensible que les autres stades et souvent limité par la contrainte saline, les semences répondent à celle-ci, en réduisant le nombre total des graines germées et en ralentissant la vitesse de germination ce qui expose les graines aux risques. La réduction du potentiel osmotique de la solution du sol (stress osmotique), empêche l'imbibition de la graine suite à une variation de l'équilibre hormonal, une diminution des activités enzymatiques et une forte absorption de Na^+ (stress ionique), ce qui conduit à une toxicité embryonnaire et un retard dans les processus métaboliques (Luu Doan Trung, 2020).

VI.3.2. Effet sur la croissance et développement

Les effets de la salinité sur le développement des plantes se manifestent par : la perturbation ou l'arrêt de croissance de l'appareil végétatif, le dépérissement des tissus et la diminution du gradient hydrique ce qui entraîne une perte de turgescence cellulaire, suivi par une chute des feuilles et finalement par la mort de la plante. L'excès du sel dans le sol provoque le plus souvent un retard dans le développement d'une manière générale la hauteur, le diamètre et la biomasse des organes, tiges et racines, le nombre des feuilles ainsi que les gousses des fruits, diminués d'une façon importantes avec l'augmentation de la salinité (Ilangumaran et al., 2017).

Le métabolisme de la plante est également affecté par la contrainte saline, cette dernière induit un changement dans le modèle d'expression des gènes, des changements qualitatifs et quantitatifs dans la synthèse et une perturbation de la composition lipidique et protéique au niveau de la membrane cellulaire, affectant ainsi sa stabilité (Teggar, 2015 ; Ilangumaran et al., 2017 ; Luu Doan Trung, 2020).

VI.4. Effet de la salinité sur le métabolisme de l'azote et la nodulation

La fixation symbiotique de l'azote ainsi que le processus d'infection et le développement des nodules, sont plus touchés par la contrainte saline que le rhizobia et la plante seule. En effet l'initiation nodulaire est extrêmement sensible à la salinité en raison de la perturbation de la synthèse protéique, la réduction des sites d'infection de la racine, la réduction du nombre de poils racinaires et de la proportion de ceux qui portent les cordons d'infection (Predeepa et Ravindran, 2010).

VII. Mécanismes de tolérance des partenaires symbiotiques à la salinité

Dans les conditions salines, les rhizobia induisent une tolérance systémique par un réseau complexe d'événements et de signalisation qui se produisent au cours de l'interaction plante-microbe et qui permettent aux plantes de surmonter le choc initial après la salinisation, par conséquent, l'atténuation du stress. La réponse des plantes à ce dernier, varie selon le degré de salinité, l'étape de croissance et le type, la forme ainsi que la disponibilité des éléments nutritifs dans la rhizosphère (Smith et al., 2017 ; Ilangumaran et al., 2017).

Les plantes développent plusieurs mécanismes biochimiques et moléculaires pour résister aux effets néfastes de la salinité du sol. Les composantes d'un stress salin peuvent être regroupées en trois catégories : stress osmotique, oxydatif et ionique (figure 5).

Le déséquilibre osmotique et les dommages oxydatifs sont réduits par une biosynthèse améliorée d'accumulation de solutés et d'antioxydants compatibles. Il s'agit généralement des acides aminés et leurs dérivés ou des sucres (la proline, la glycine-bétaïne, saccharose, ...) qui fonctionnent comme des osmoprotecteurs induisant une tolérance à la salinité, il s'agit aussi d'activités enzymatiques antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase, peroxydase, ...) ou de molécules antioxydantes (polyphénols, flavonoïdes, ...) (Ilangumaran et al, 2017 ; Luu Doan Trung, 2020).

Les bactéries aident à maintenir l'équilibre ionique par la libération de l'ion potassium (K^+) et limitent l'entrée de sodium au niveau des racines en produisant des exo-polysaccharides et en modifiant la structure des racines. Pour qu'une plante soit en mesure de tolérer un stress salin, il est important que le rapport des ions K^+/Na^+ dans les cellules racinaires soit élevé et que ces cellules contiennent peu de Na^+ . Différentes stratégies permettent aux plantes d'y parvenir ;

elles impliquent des systèmes de transport contribuant à l'homéostasie ionique entre le K^+ , élément essentiel, et le Na^+ , élément toxique (Ilangumaran et al, 2017 ; Luu Doan Trung, 2020).

Il existe d'autres mécanismes par lesquels les bactéries peuvent faire face au stress comme : la signalisation phytohormonale (libération des hormones exogènes tel que l'AIA et l'ACC désaminase qui peuvent protéger efficacement les plantes contre une gamme de stress) et l'induction de protéines protègent les processus importants tels que la photosynthèse et la respiration (Arbaoui, 2016).

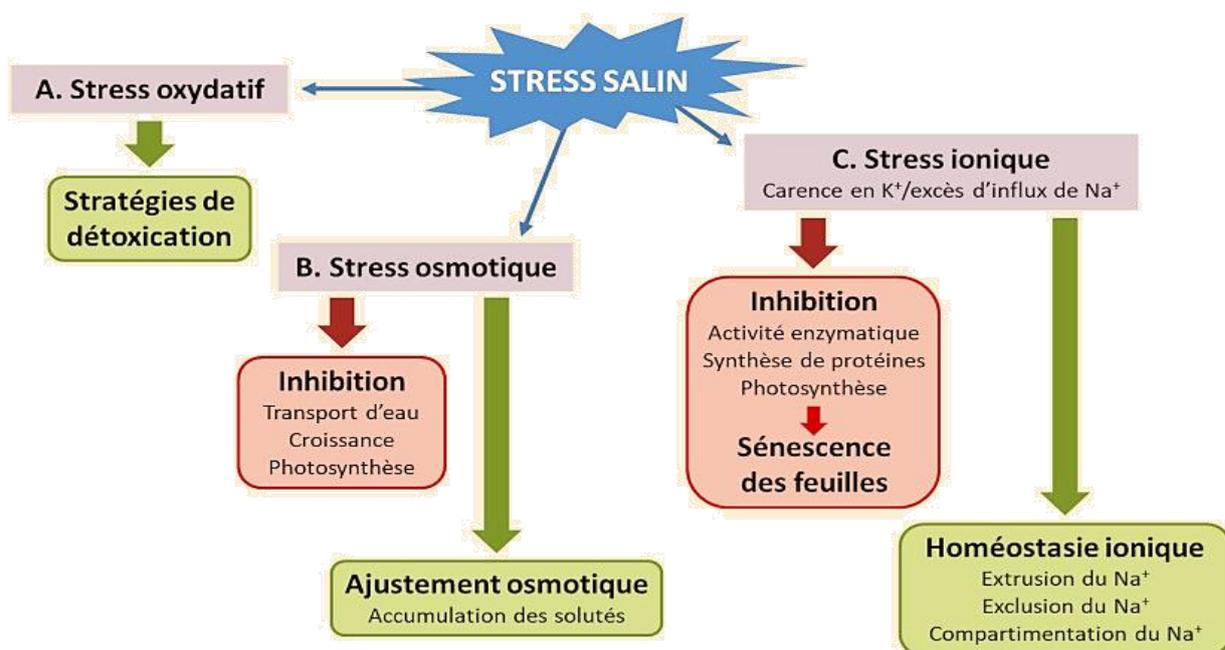


Figure 5 : Effets délétères liés à la toxicité du stress salin (Luu Doan Trung, 2020)

VIII. Solutions possibles pour une meilleure agriculture en sols salins

Actuellement, plusieurs stratégies sont utilisées pour limiter les menaces causées par le sel et aboutir à des rendements meilleurs sous contrainte de salinité élevée, soi-disant l'agriculture bio-saline. Donc, il est possible d'améliorer la production alimentaire et fourragère dans ces conditions, et de valoriser les terres cultivables affectées par le sel à travers :

(1) la phytoremédiation : c'est la culture de bonnes variétés de plantes halotolérantes, le choix d'une collection d'espèces sélectionnées, connues pour leur tolérance au stress salin (Fahima, 2009 ; Cheikh Oumar et al., 2020). Les multiples expériences d'utilisation des légumineuses pour reboiser les zones dégradées, les sols dépourvus de matière organique et affectés par la salinité, montre le rôle important de ce groupe de plantes dans la durabilité des systèmes de production agricole et animale (Castro et al., 2017).

(2) L'inoculation des cultures avec des souches de rhizobium préalablement sélectionnées, qui sont adaptées aux conditions de stress du sol (Franzini et al., 2019 ; Tewari et Sharma, 2020). Des recherches récentes ont montré que l'inoculation avec des rhizobiums dans des conditions de salinité produit une diminution de stress, augmente la tolérance des plantes, le processus de nodulation et la photosynthèse (Khaitov et al., 2020 ; Hernandez et al., 2020).

(3) l'utilisation exogène de solutés compatibles connus pour leur rôle osmoprotecteur qui ont un effet remarquable de stimulation des taux de croissance lorsqu'ils sont ajoutés au milieu (Ashraf et al., 2012).

(4) l'utilisation d'amendements organiques, le traitement des graines pour remédier à la salinité des sols et la production des cultures génétiquement modifiées appropriées à ces conditions de salinité (RAI, 2017)

(5) La vérification de la quantité et la qualité de l'eau d'irrigation (lixiviation et drainage), par le suivie d'un mode d'irrigation spécifique, comme la technique du goutte à goutte. Cette technique retarde considérablement le processus de salinisation, donc on peut diminuer effectivement la quantité d'eau apportée, ce qui va diminuer la quantité de sel apportée. En outre, cette eau doit avoir un degré faible ou moyen de salinité (Labidi, 2020).

(6) L'amélioration chimique et l'utilisation d'engrais et fertilisants appropriés comme le calcium. L'addition de Ca^{2+} dans le sol est considéré comme moyen d'augmentation de la tolérance au stress, il contribue dans l'ajustement osmotique (Hamdoud, 2012).

En effet, les deux premières apparaissent les meilleures solutions et les plus écologiques, en revanche, les autres semblent couteuses ou difficiles à réaliser.

Matériels
et
Méthodes

Afin d'étudier l'effet du NaCl sur les micro-symbiotes du genre *Bradyrhizobium* ainsi que sur la symbiose rhizobia-légumineuse, plusieurs tests caractéristiques et symbiotiques ont été réalisés au niveau du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'université de Bejaia, durant une période de 3 mois. Dans ce chapitre nous décrivons le matériel biologique utilisé ainsi que les méthodes adoptées dans la réalisation de notre étude.

I. Matériels biologiques

I.1. Souches bactériennes

L'étude a été réalisée sur deux souches (csa112 et csa208) identifiées comme *Bradyrhizobium* appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université de Bejaia. Les souches ont été préalablement isolées par Salmi et al., (2018) à partir des nodules racinaires de *Calicotome spinosa* dans la région d'Azzaba, Skikda. La revivification des souches conservées à -80°C est faite par repiquage sur milieu gélosé YMA (Yeast Mannitol Agar) (annexe1) et l'incubation à 28°C pendant 10 jours, les cultures ont été utilisées dans les différents tests ainsi que pour la préparation de l'inoculum.

I.2. Matériel végétal

Des graines de Lupin blanc (*Lupinus albus*) (figure 6) (Disponibles au marcher) ont été utilisées pour la mise en évidence de l'effet du NaCl sur la symbiose rhizobia légumineuse. Les principales caractéristiques morphologiques de la graine sont mentionnées dans le tableau II.

Tableau II : Caractéristiques morphologiques des graines utilisées	
Couleur	Jaune orangée
Forme	sphéroïdale allongée
Poids sec	~ 0.45 g
Poids frais	~ 0.95 g
Taille	~ 1 cm



Figure 6 : Graines de lupin blanc utilisées dans l'étude

II. Méthodes

II.1. Caractérisation morphologique et cellulaire

II.1.1. Aspect morphologique des colonies

L'observation à l'œil nu des colonies pour déterminer leurs formes, couleurs, tailles, ...etc. a été faite après repiquage des souches sur YMA (annexe1) et incubation à 28°C pendant 10 jours.

II.1.2. Aspect microscopique des cellules

- L'observation à l'état frais est réalisée pour voir la mobilité bactérienne et la forme des cellules, une colonie pure est prélevée, mélangée avec une goutte d'eau physiologique stérile entre lame et lamelle et observée sous microscope optique au grossissement x40.
- La coloration de GRAM permet de déterminer le Gram, la forme des cellules et la pureté des cultures. Le test est réalisé sur des frottis colorés suivant la méthode classique (annexe3).

II.2.Caractérisation biochimique des souches

En vue de rechercher certaines enzymes qui jouent un rôle lors de la nodulation et l'infection des racines par les bactéries symbiotiques à savoir la cellulase, la chitinase, la pectinase et la gélatinase, des tests ont été effectués sur milieu YMA (annexe1) modifié, où le mannitol est remplacé par 0.5% du substrat à dégrader « CMC (carboxy-méthyl-cellulose), chitine, pectine et gélatine ». L'ensemencement des souches a été réalisé en spots, toutes les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 10 jours.

II.2.1. Mise en évidence de l'activité cellulolytique

Après incubation, les boîtes sont rincées à l'eau, colorées avec 10ml de la solution du rouge Congo (annexe2) pendant 30min puis décolorées avec une solution d'NaCl 1M (annexe2) pendant 15min, le rouge Congo donne une couleur rouge orangée sur la gélose et l'apparition d'une zone incolore autour des colonies indique la présence d'une activité cellulolytique (Pinky et al., 2012).

II.2.2. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

Après incubation, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau puis inondées par une solution d'acétate de cuivre (annexe2) pendant 15 min. L'apparition d'une zone blanche indique la présence d'une activité pectinolytique (Snaiki et al., 2006).

II.2.3. Mise en évidence de l'activité chitinolytique

La production de chitinase se traduit par l'apparition de zones claires autour de colonies formées.

II.2.4. Mise en évidence de l'activité gélatinolytique

Après incubation, les boîtes sont rincées à l'eau puis recouvertes d'une solution de chlorure de mercure (Annexe 2) pendant 15 min. L'apparition d'une zone blanche indique la présence d'une activité gélatinolytique (Balan et al., 2012).

II.2.5. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence l'activité uréasique, les souches à tester sont ensemencées sur milieu YMA (annexe1) additionné de 2% d'urée et 0.012 g de Rouge de Phénol comme indicateur de pH. Le milieu solide sans l'urée est stérilisé à l'autoclave puis refroidi jusqu'à environ 45°C. La solution d'urée est ajoutée au milieu par filtration ($\varnothing=0.22\mu\text{m}$). Après incubation à 28°C pendant 10 jours, une couleur rose représente l'alcalinisation du milieu ce qui indique l'hydrolyse de l'urée (Burbank et al., 2012).

II.2.6. Réduction des nitrates

Les souches ont été mises en culture dans des tubes contenant 5 ml de bouillon nitraté (annexe1) pendant 6 jours à 28°C. La réduction des nitrates (NO_3^-) est mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes des réactifs NR1 et NR2 (Nitrate réductase 1 et 2) dans chaque tube (figure 7), l'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates ont été réduits en nitrites (NO_2^-). Si le milieu reste incolore on rajoute une pincée de poudre de zinc pour vérifier la présence ou l'absence des nitrates non dégradés dans le milieu. Après quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge signifie la présence des ions nitrates (résultat négatif) et l'absence de coloration du milieu indique l'absence d'ions nitrates dans le milieu (résultat positif), donc les bactéries ont dégradé les nitrates au-delà du stade nitrites NR++ (Delarras, 2014).

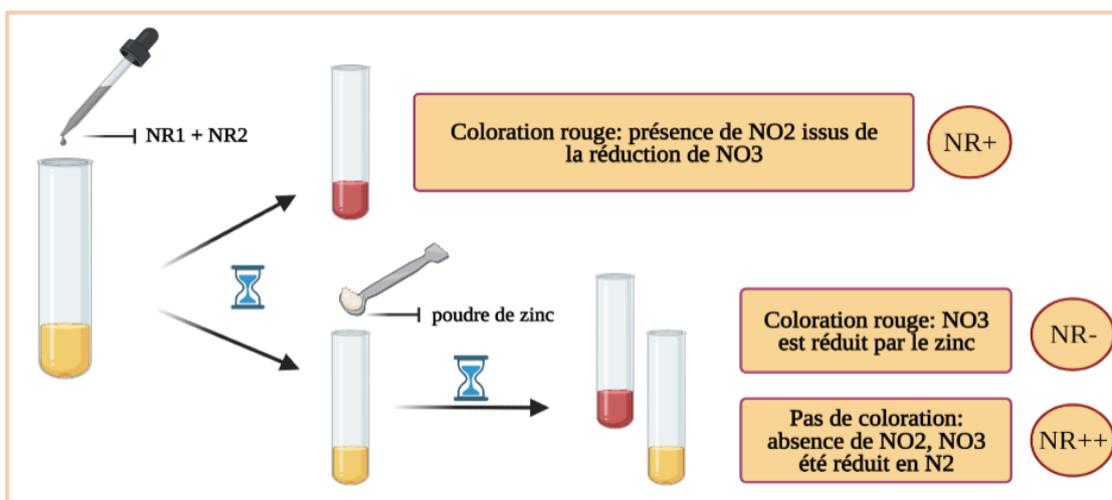


Figure 7 : Teste de recherche du nitrate réductase

II.3. Recherche des caractéristiques PGP

II.3.1. Production de l'auxine : Acide Indole 3-Acétique (AIA)

La capacité des deux souches à produire l'AIA a été testée selon la méthode de Malik et Sindhu (2011) modifiée, sur milieu liquide YMB (annexe1) additionné de 0.5mg/ml de L-tryptophane, ce dernier a été ajouté au milieu par filtration ($\text{\O} = 0.22\mu\text{m}$).

Des tubes contenant 5 ml de ce milieu ont été inoculés avec une suspension bactérienne de 10^7 cellules/ml, trois répétitions ont été faites pour chaque souche. Après 6 jours d'incubation à 28°C , les cultures ont été centrifugées à 14000tr/min pendant 5min ensuite 1ml du surnageant a été ajouté à 2ml du réactif de Salkowski (annexe2) (figure8). Après l'incubation du mélange à l'obscurité pendant 30min, l'apparition d'une coloration rose indique la présence de l'AIA.

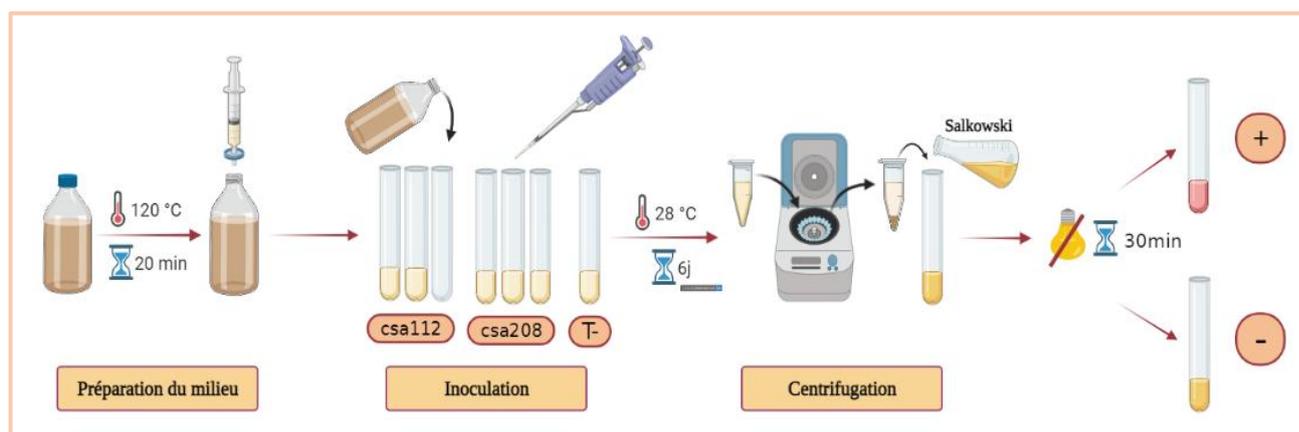


Figure 8 : Teste de recherche de l'AIA

II.3.2. Solubilisation du phosphate tricalcique

Pour tester la capacité de nos souches à solubiliser le phosphate tricalcique, quelques colonies d'une culture fraîche sont ensemencées sur milieu Pikovskaya solide (annexe1) additionné de 0,7 g/L de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphate insoluble, l'expérience a été faite en trois répétitions. Après incubation à 28°C pendant 10 jours, l'apparition d'une zone claire autour des colonies indique la solubilisation du phosphate par les bactéries (Hmissi et al., 2015).

II.3.3. Production des sidérophores

La Capacité des deux souches à produire des sidérophores a été testée sur le milieu solide à base de CA-S (chrome azurol S) (annexe1) selon la méthode des disques d'agar.

A partir des cultures des deux souches sur milieu YMA, des disques sont prélevés soigneusement dans des conditions stériles. Trois disques de chaque souche ont été déposés sur boîte contenant le milieu à base de CA-S puis incubés à 28 °C (figure 9), l'expérience a été faite en trois répétitions. Après 10 jours d'incubation, les bactéries élaborant des sidérophores forment un halo orange sur le milieu bleu-vert (Schwyn et al., 1987 ; Venkat et al., 2017).

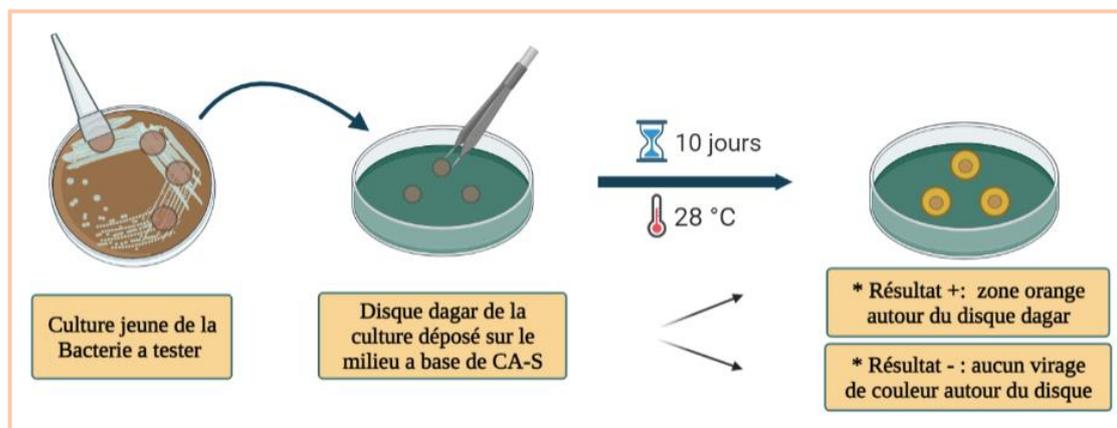


Figure 9 : Test de production des sidérophores

II.4.Effet du NaCl sur les souches étudiées

II.4.1. Détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices)

La tolérance des deux souches à la salinité a été étudiée sur le milieu YMB (annexe 1) additionné de différentes concentrations de NaCl (0 à 1000mMol). Des tubes à essai contenant 5 ml de milieu ont été ensemencés avec 100µl d'une suspension bactérienne de 10^7 cellules/ml, ensuite sont incubés à 28°C pendant 6 jours, l'expérience a été réalisée en triplicata pour chaque souche et concentration. La CMI est déterminée par l'observation de la turbidité en se référant à un tube témoin non ensemencé et incubé dans les mêmes conditions (+ croissance /- inhibition).

II.4.2. Effet du NaCl sur la croissance des souches

L'évaluation de la croissance des souches sous différentes concentrations en sel (0 à 600mMol) est réalisée sur milieu YMB en suivant le protocole précédemment mentionné.

La croissance bactérienne est estimée par la mesure de la densité optique des cultures toutes les 24 h pendant 10 jours à l'aide d'un spectrophotomètre (annexe 11) à une longueur d'onde de 630nm, un témoin non inoculé (YMB) est prévu comme témoin(-).

II.4.3. Détermination du temps de génération et taux de croissance

Après mesure de la D.O, les courbes de croissance ont été tracées (annexe5) et le temps de génération «G» et le taux de croissance «T» ont été déterminés à la phase exponentielle de croissance de chaque souche et à chaque concentration à l'aide des formules suivantes :

$$G = t \log 2 / (\log N2 - \log N1)$$

$$T = 1/G$$

G : temps de génération (h)

N : nombre de division

t : temps (24h)

T : taux de croissance (h⁻¹)

II.5.Effet du NaCl sur les caractéristiques PGPR

Dans le but d'estimer l'effet du NaCl sur la production des substances favorisant la croissance des plantes par les PGPR, les souches étudiées ont été testées pour leurs capacités à produire les sidérophores et l'AIA sous contrainte saline :

II.5.1. Effet du NaCl sur la production d'AIA

L'expérience a été faite en suivant le protocole préalablement mentionner. A la différence, du NaCl a été ajouté au milieu de culture à des concentrations croissantes (0 à 600 mMol), trois répétitions ont été faite pour chaque souche et concentration et un témoin sans inoculation est également inclut. A la dernière étape du protocole, l'absorbance des solutions colorées a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm.

Les quantités d'AIA produite par chaque souche ont été calculées par extrapolation sur une courbe d'étalonnage préparée de la même façon par des concentrations croissantes d'AIA pure dans un intervalle de 0 à 100 µg/ml (annexe6).

II.5.2. Effet du NaCl sur la production des sidérophores

L'effet du sel sur la production de sidérophores est déterminé, selon le protocole déjà mentionné. Cependant, le milieu de culture est préparé à des concentrations croissantes en NaCl allant de 0 à 600 mMol.

II.6.Effet du NaCl sur la symbiose « *Lupinus albus-Bradyrhizobium sp* »

II.6.1. Effet du NaCl sur la germination en présence et en absence de *Bradyrhizobium*

Afin d'évaluer l'effet de la salinité sur le pouvoir germinatif des graine de *L.albus* en présence et en absence de bactéries symbiotiques, un test suivant les étapes sous-mentionnées a été réalisé :

II.6.1.1. Stérilisation des graines

Dans des conditions stériles, les graines de *L.albus* ont été triées puis immergées dans de l'hypochlorite de sodium 3% pendant 5 min, suivi d'un rinçage 10 fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace résiduelle de l'hypochlorite de sodium.

II.6.1.2. La mise en germination des graines

Les graines ainsi traitées sont réparties en 5 lots : celles du premier lot témoin, sont mises à imbiber dans l'eau distillée stérile, tandis que les graines des 4 lots restants sont mises à imbiber séparément dans des solutions salines stériles à différentes concentrations allant de 100 à 400 mMol, et sont ensuite mise au réfrigérateur pendant 24 h.

Après 24 h chaque lot a été divisé en deux :

- Germination en absence de *Bradyrhizobium*

Une moitié des graines ont été mises à germer sur boites de pétri de diamètres identiques, doublement tapissées de papier absorbant stérile et humidifier avec les solutions saline à différentes concentrations et le témoin avec l'eau distillée stérile, les graines ont été placées à raison de 10 par boite avec deux répétitions pour chaque concentration (figure10).

- Germination en présence de *Bradyrhizobium*

La bactérisation a été réalisée en trempant séparément la deuxième moitié des graines dans des suspensions bactériennes de 10^7 cellules/ml des deux souches étudiées, puis sont mises à germer (figure11) en suivant les mêmes étapes de l'expérience préalablement décrite.



Figure 10 : Test de germination des graines de *L.albus* sous contrainte saline

Toutes les boîtes sont par la suite incubées à 25°C à l'obscurité totale, et suivies pendant 4 jours. Les graines germées ont été dénombrées chaque 24 h (annexe7).

II.6.2. Effet du NaCl sur la croissance des plantes inoculées et non inoculées

En vue d'estimer le niveau de tolérance des plantules de *L.albus* à la salinité en présence et en absence de bactéries symbiotiques, ainsi que en présence d'une source d'azote minéral « $Ca(NO_3)_2$ », les étapes ci-dessous ont été suivies :

II.6.2.1. Mise en germination des graines

Le traitement des graines a été effectué tout comme mentionné précédemment jusqu'à la germination. Cependant, l'imbibition était uniquement avec l'eau distillée stérile.

II.6.2.2. Mise en culture hydroponique

Après 4 jours, les graines ayant germées ont été transférées en hydroponie dans des flacons de 250 ml contenant le milieu Jensen stérile (annexe1). Les flacons sont ensuite recouverts avec du papier pour assurer l'obscurité à la partie racinaire de la plante, puis réparties en 4 lots (figure11).

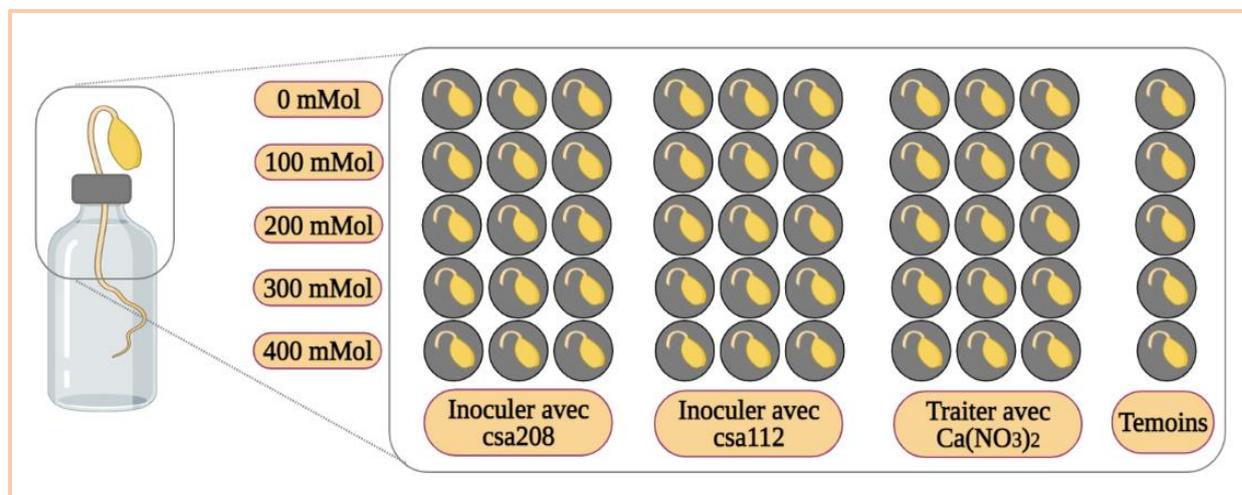


Figure 11 : Les différents traitements appliqués sur les plantules de *L.albus*

II.6.2.3. Inoculation des plantules

L'inoculation des plantules des deux premiers lots est réalisée 24h après la mise en culture (figure12), avec 1 ml de l'inoculum bactérien de chaque souche de 10^7 cellules/ml. Pour le troisième lot 0.1% de Nitrate de calcium « $Ca(NO_3)_2$ » ont été ajoutées à chaque flacon.

II.6.2.4. Application du stress

Le stress salin a été appliqué à partir du 6^{ème} jour (stade de 2 feuilles) (figure13) par l'ajout d'une solution saline concentrée de façon à atteindre les concentrations souhaitées (100, 200, 300 et 400 mMol) en plus du témoin sans sel. Afin d'éviter le choc osmotique, les doses ont été augmentées graduellement à des jours alternatifs jusqu'à la concentration finale. L'expérience a été réalisée en triplicata pour chaque traitement.



Figure 12 : Plantules âgées de 24 h



Figure 13 : Plantules âgées de 6 j

II.6.2.5. Evaluation de la croissance

Après 5 semaines de culture, les plantules ont été récoltées, leur croissance et leur réponse au sel a été évaluée par une analyse agronomique (figure14) qui est la mesure des paramètres suivants :

- Le taux de survie et de nodulation
- Le nombre de feuilles.
- La longueur de la partie aérienne et racinaire.
- Le poids de la matière fraîche (MF) de l'ensemble de la plante.
- Le poids de matière sèche (MS) des plantes après séchage à 80 °C pendant 48h à l'étuve.

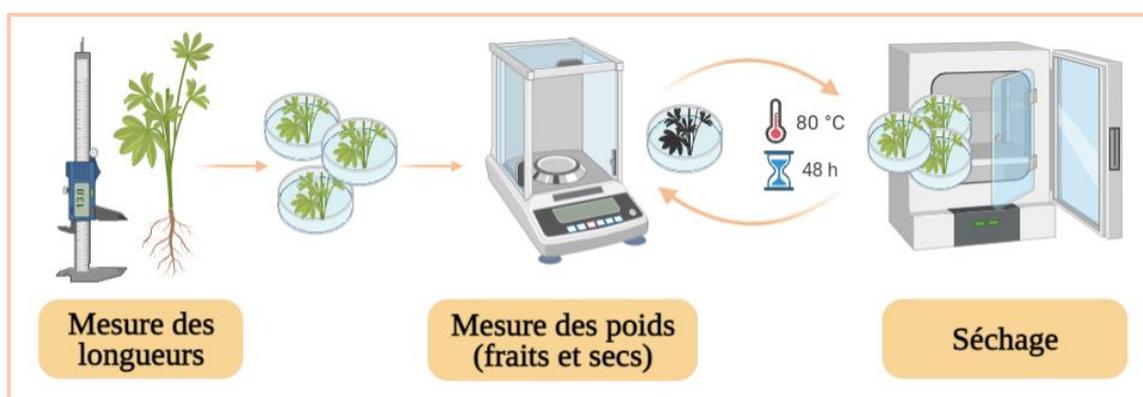


Figure 14 : Analyse agronomique appliquée sur les plantules

Résultats et discussion

I. Caractérisation morphologique et cellulaire

I.1. Aspect morphologique des colonies

Après ensemencement sur milieu YMA, les colonies des deux souches sont apparues au bout de 10 jours d'incubation à 28°C. Ceci permet de les classer en bactéries à croissance lente. La souche csa208 forme des petites colonies rondes, de 2 à 3 mm de diamètre, opaques, bombées, brillantes à surfaces lisses et contours réguliers et de couleur beige (Figure15). Les colonies de la souche csa112 sont beiges, punctiformes, translucides, bombées, de contours réguliers, de diamètre inférieur à 2 mm et de surface lisse et brillante (Figure16). De plus, la souche csa208 possède des exo-polysaccharides contrairement à csa112.



Figure 15: Aspect des colonies de csa208 formées sur YMA

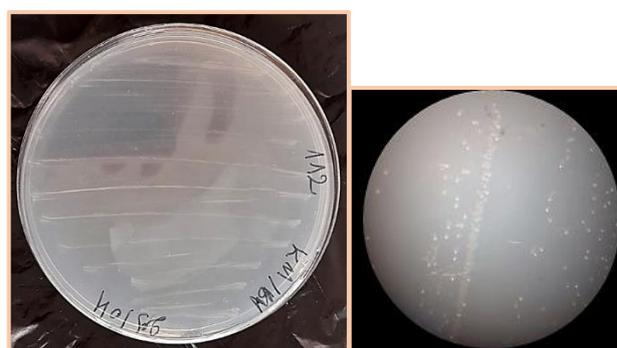


Figure 16 : Aspect des colonies de csa112 formées sur YMA

I.2. Aspect microscopique des cellules

L'observation microscopique (GX40) à l'état frais d'une culture bactérienne âgée de 10 jours, a révélé que les deux souches sont de petits bacilles à extrémités arrondies et mobiles (Figures 17 et 18). La coloration de Gram a montré qu'elles appartiennent aux bactéries Gram négatif (GX100).

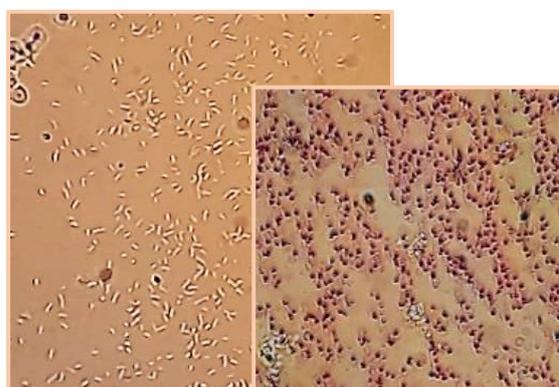


Figure 17 : Observation microscopique des cellules de csa208

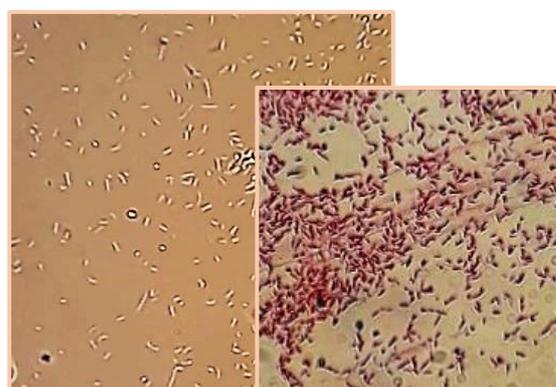


Figure 18 : Observation microscopique des cellules de csa112

II. Caractérisation biochimique des souches

Cette partie permet de mettre en évidence la capacité des souches à dégrader certains substrats et la révélation de la présence des enzymes impliquées, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III :

Le substrat dégradé	cellulose	Pectine	Chitine	gélatine	urée	nitrate	Capacité %
csa208	-	-	-	-	+	+	33,33%
csa112	-	+	-	+	+	+	66,66%

Les résultats montrent que les deux souches étudiées possèdent au moins deux activités enzymatiques parmi les différentes activités testées. L'absence d'halo dans les cultures réalisées (figure19) signifie l'absence de l'activité cellulolytique chez les deux souches, un résultat négatif est aussi noté concernant l'activité chitinolytique. La souche csa112 laisse apparaître une activité pectinolytique et une activité gélatinolytique positives qui se manifestent par l'apparition des zones blanches (figure19) contrairement à csa208.

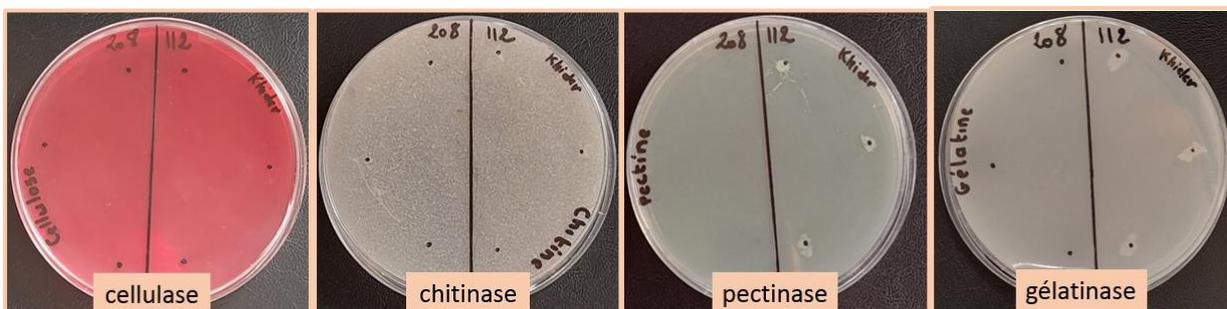


Figure 19 : Résultats des activités enzymatiques des souches étudiées

Les résultats de l'activité uréasique montrent que les deux souches possèdent une uréase (figure20) qui hydrolyse l'urée en dioxyde de carbone et d'ammoniac qui alcalinise le milieu et lui donne la couleur rose, selon la réaction qui suit : $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$.

Comme le montre la figure 21, les deux souches possèdent l'enzyme nitrate réductase et sont donc capable de réduire le nitrate en nitrite en donnant une couleur rouge après l'addition des réactifs NR1 et NR2, selon la réaction suivante : $\text{NO}_3^- + 2(\text{H}^+) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$.

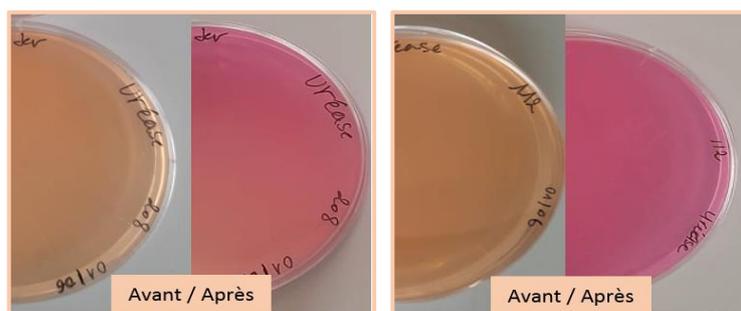


Figure 20 : Test d'uréase (+) sur YMA

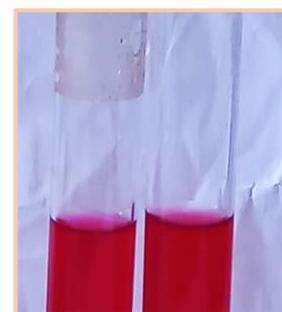


Figure 21 : Nitrate réductase (+)

Les rhizobia sont parmi les principales sources d'enzymes extracellulaires présentes dans le sol. Ces enzymes sont les médiateurs et les catalyseurs de processus biochimiques importants dans le fonctionnement du sol, qui aident directement ou indirectement à la promotion de la croissance des plantes et augmentent leur tolérance au stress biotique et abiotique (Jog et al., 2012). Ces enzymes sont impliquées dans la phase initiale du processus d'infection (Robledo et al., 2008). La capacité à hydrolyser l'urée et à réduire les nitrates est une caractéristique écologiquement importante. En effet, il est bien connu que l'excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'infection des légumineuses par les rhizobia (Lucinsni et al., 2002).

III. Recherche des caractéristiques PGP

III.1. Production de l'auxine : Acide Indole 3-Acétique (AIA)

L'acide indole acétique est l'une des plus importantes hormones végétales qui accélère la croissance des racines. La capacité des souches à produire cette phytohormone a été testée sur bouillon YMB additionné de tryptophane. Les deux souches étudiées ont montré une réaction positive avec le réactif de Salkowski, l'apparition d'une coloration rose reflète la présence de l'AIA. On se basant sur l'intensité de cette couleur, la production par la souche csa112 semble plus élevée que celle de la souche csa208 (figure22). Les résultats obtenus concordent avec plusieurs travaux précédents qui ont démontré la capacité des *Bradyrhizobium* isolées des nodules de différentes espèces à produire différentes concentrations d'AIA (Dutta et Basu, 2000 ; Kumar et al., 2021).

III.2. Solubilisation du phosphate tricalcique

Les souches testées pour leur capacité à solubiliser le phosphate sur milieu Pikovskaya solide contenant $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphate, ont pu se développer sur ce milieu, bien qu'elles n'aient montrées aucun halo de solubilisation (figure23). Il est possible qu'une moindre solubilisation se soit produite sans formation du halo caractéristique autour des

colonies comme observé par Perez et al. (2007) car la capacité de solubilisation sur milieu solide est réduite par rapport au milieu liquide (Arif ; Giroux, 2015). Cependant Kumar et al. (2021) ont démontré que la solubilisation du phosphate n'est pas un caractère généralisé chez les rhizobia et que certaines souches n'ont pas cette capacité. Daimon et al. (2006) ont montré que les souches de *Rhizobium* solubilisent mieux le phosphate relativement aux souches de *Bradyrhizobium*. Comme il apparaît dans l'étude de Marra et al. (2011), que la forme du phosphate ($CaHPO_4$ et $FePO_4...$) joue un rôle sur le résultat de solubilisation des *Bradyrhizobium*.

III.3. Production des sidérophores

La figure 24, révèle clairement, que les deux souches testées produisent des sidérophores en formant des halos orange autour des disques après 10 jours d'incubation. La production de ces molécules représente une caractéristique importante, vue leur implication dans la promotion de la croissance des plantes, ce sont des chélateurs du fer ferrique disponible dans le sol, qui est un élément important pour la croissance microbienne et végétale (Zloch et al., 2016). Bien que plusieurs travaux ont montré la capacité des rhizobia à synthétiser des sidérophores (Kumar et al., 2017 ; Zhao et al., 2020) cependant, certains ont rapporté que cette capacité est limitée uniquement à un nombre de rhizobia (Kuldep et al., 2018).



Figure22 : Production d'AIA(+)

Figure23 : Solubilisation du phosphate (-)

Figure 24 : Production de sidérophores (+)

IV. Effet du NaCl sur les souches étudiées

IV.1. Détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices)

Tableau IV : Niveau de tolérance des souches au NaCl (CMI)

NaCl (mMol)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
csa208	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
csa112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Une bonne tolérance a été révélée pour les deux souches sur milieu YMB supplémenté de NaCl (0 à 1M). Selon Cacciari et al. (2003) ; Tarek et al. (2021), la tolérance des rhizobia à des concentrations de NaCl > 1,5 % (~250mM) est rare. Les résultats du tableau 4 montrent que les CMI de csa112 et csa208 sont respectivement 900mM et 700mM de NaCl. Dong et al., (2017) ont démontrés que la sensibilité des *Bradyrhizobium* à la salinité varie d'une souche à l'autre.

IV.2. Effet du NaCl sur la croissance des souches

La croissance des souches en milieu salin a été également évalué en fonction du temps pendant 10 jours. Les D_{630nm} ont été enregistrées et représentées dans les figures suivantes :

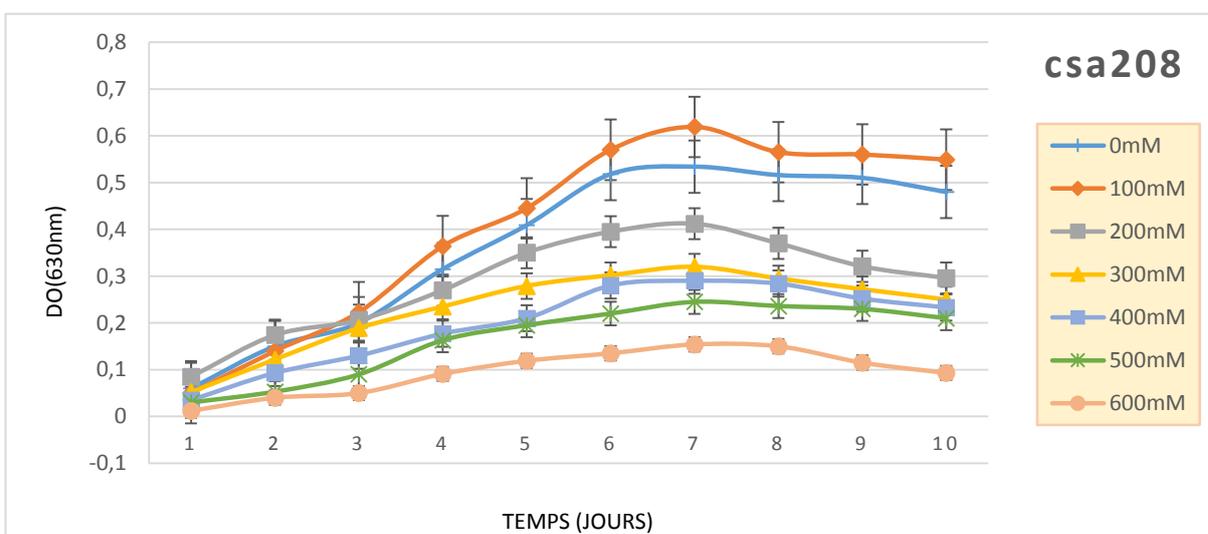


Figure 25 : Courbes de croissances de csa208 à différentes concentrations de NaCl en fonction du temps

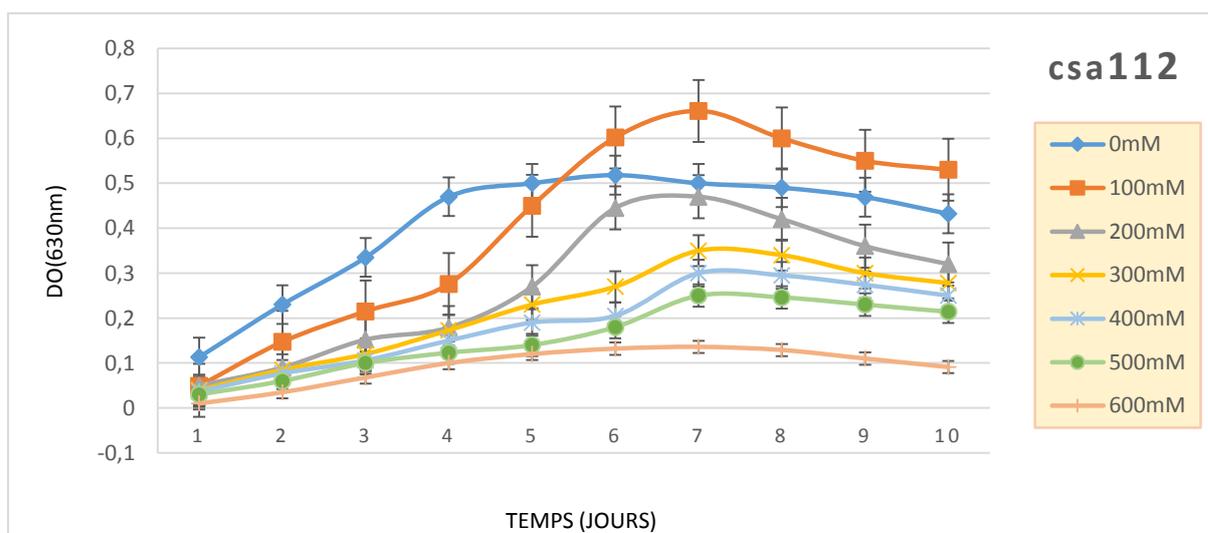


Figure 26 : Courbes de croissances de csa112 à différentes concentrations de NaCl en fonction du temps

Une bonne tolérance au sel a été observée chez les deux souches entre 0- 600 mMol de NaCl, avec des maximums de croissances à 100 mM, remarquablement, les croissances étaient plus élevées à cette concentration par rapport aux témoins sans NaCl, par contre, elle était moins importante à 600mM. Les souches étaient évidemment affectées par le stress salin. Comme le montre les figures 25 et 26, la croissance bactérienne a été réduite avec l'augmentation des concentrations en NaCl, on remarque que la présence du NaCl à retarder la phase exponentielle de croissance. La valeur de la densité optique la plus élevée qui correspond à un maximum de croissance a été obtenus le 7eme jour chez csa112 (DO=0,661) suivie de csa208 (DO=0,619). Ces valeurs ont été réduites de 29% chez csa112 et de 44% chez csa208 à 200mM et continuent de diminuer jusqu'à 80% et 76% respectivement à 600mM de NaCl (tableau 8, voir annexe). Des résultats proches ont été obtenus par Dong et al. (2017) où la souche de *Bradyrhizobium* la plus tolérante au sel a montré le même comportement que nos souches. Cependant, sa croissance a été inhibée à 500mM à partir du 6eme jour.

IV.3. Temps de génération et taux de croissance des souches sous l'effet du NaCl

Les temps de génération aux conditions de contrôle estimés de 63,7h pour csa208 et de 49,13h pour csa112 confirment que nos souches sont des *Bradyrhizobium* à croissance lente. Le tableau V montre un allongement dans les temps de génération et une réduction dans les taux de croissance par rapport aux témoins. Il a été démontré par Cacciari et al.(2003) et Abed, (2010), que la présence du sel dans le milieu ralentie la croissance des souches bactériennes. Ils ont obtenus dans leurs études des résultats proches des nôtres, une diminution dans les taux de croissance des souches et une augmentation des temps de génération, supérieurs de 3 à 5 fois que celui du témoin.

Tableau V : Temps de génération et taux de croissance des souches sous effet du NaCl

NaCl (mMol)	Csa208		Csa112	
	G (h)	T (h-1)	G (h)	T (h-1)
0	63,70	0,0157	49,13	0,0204
100	70,37	0,014	34,03	0,0293
200	64,10	0,0156	40,47	0,0247
300	96,93	0,0103	58,41	0,0171
400	97,31	0,0102	70,37	0,0142
500	137,91	0,0073	80,36	0,0124
600	131,87	0,0076	91,24	0,0110

V.Effet du NaCl sur les caractéristiques PGPR

La mise en culture des souches a été faite dans des milieux à différentes concentrations en NaCl, les résultats sur les figures 27 et 28, démontrent clairement que la présence du sel à des concentrations élevées peut réduire la production des deux souches en AIA et en sidérophores.

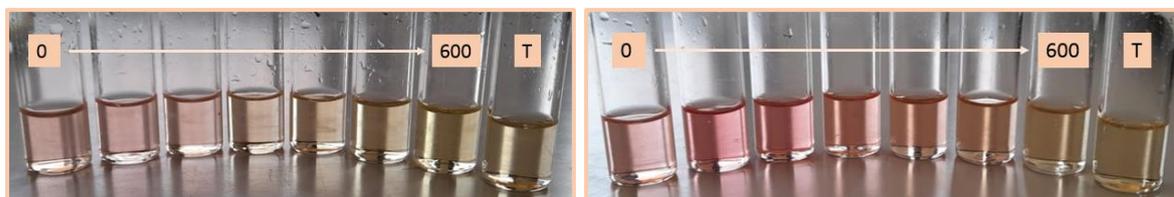


Figure 27 : Production d'AIA à différentes concentration de NaCl (csa208 / csa112)

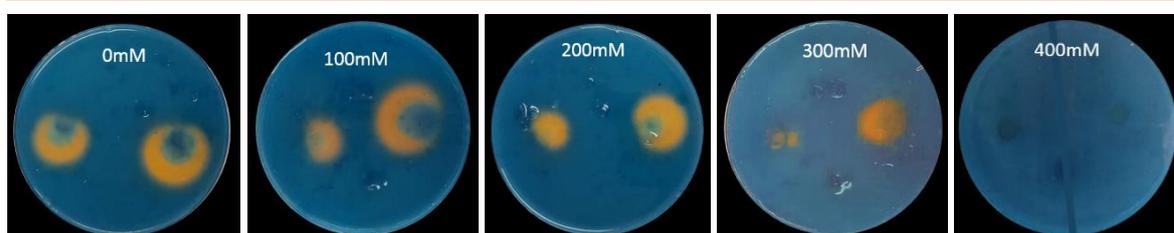


Figure 28 : Production de sidérophores à différentes concentration de NaCl (csa208 / csa112)

Remarquablement et comme représenté sur la figure 29, la quantité d'AIA produite est améliorée en présence de NaCl par rapport aux témoins (sans NaCl), en atteignant le maximum à 100 mM avec un taux de 53,5 μ g/ml chez csa112 et 16,57 μ g/ml chez csa208. Puis elle chute progressivement avec l'augmentation des concentrations en NaCl, pour atteindre des concentrations très faibles (1.43 μ g/ml chez csa112 et 0.54 μ g/ml chez csa208) à 600 mM. Il est à noter que la souche csa112 présente la plus forte concentration d'AIA produite. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Banerjee et al., (2010) ; Hamoum et Hamdi, (2016), rapportant une diminution importante de production d'AIA pour toutes les rhizobactéries testées, à partir de 300 mM du NaCl.

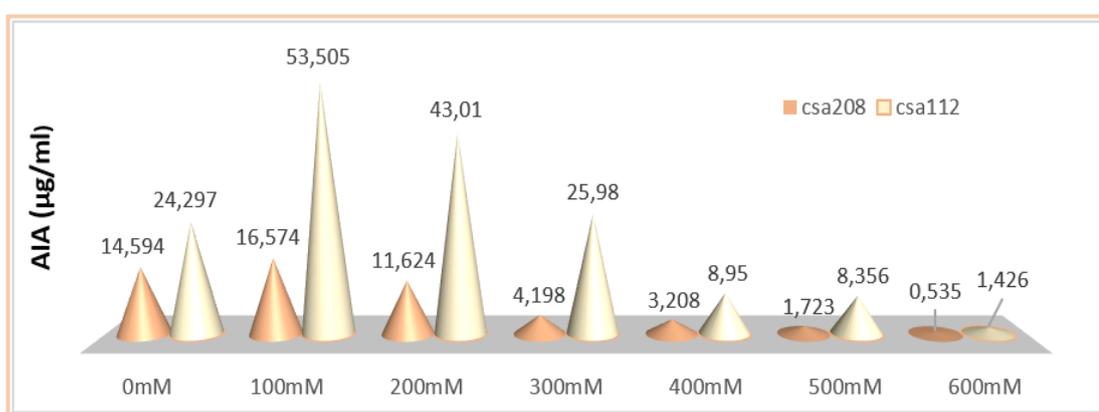


Figure 29 : Quantités d'AIA produites à différentes concentration de NaCl

La production des sidérophores est affectée par les concentrations de NaCl testées (figure 29), elle était légèrement plus importante dans les conditions de contrôle (sans NaCl) puis diminue graduellement avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Les diamètres des zones colorées variaient de 10 à 3 mm. Cependant, à 300mM il n'y avait pas de production significative et à partir de 400 mM, la production a été totalement inhibée. La souche csa112 a produit des halos plus grands en comparaison avec la souche csa208. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Paul et al., (2014) ou ils ont évalué l'effet du NaCl sur la production de sidérophores par certains rhizobia, ils ont démontré qu'elle est affectée au-delà de 300 mM de NaCl.

La production des caractères PGP dans les conditions salines, apparait 3 fois plus élevée chez (csa112) la souche qui tolère plus le sel (800mM) par rapport à (csa208/600mM). Ce résultat est en accord avec celui de Dong et al., (2017), et ces caractères améliorent la tolérance des rhizobia à la salinité et pourraient favoriser la croissance des plantes en sol salin (Bianco et al., 2006 ; Zahir et al., 2010 ; Sadeghi et al., 2012 ; Shrivastava et Kumar, 2015). Ces constatations permettent la suggestion des souches étudiées comme bioinoculants ou biofertilisants efficaces pour la croissance de légumineuses dans les conditions salines.

VI. Effet du NaCl sur la symbiose « *Lupinus albus* et *Bradyrhizobium* sp. »

VI.1. Effet du NaCl sur la germination en présence et en absence de *Bradyrhizobium*

- Germination en absence de *Bradyrhizobium*

Après la mise en germination des graines de *L.albus* en présence du NaCl, les résultats démontrent clairement que la capacité germinative est affectée par la salinité, mais présente une certaine résistance vis-à-vis le stress salin. A des concentrations élevées de NaCl, on observe une faible germination avec pourriture rapide des graines (figure 30).

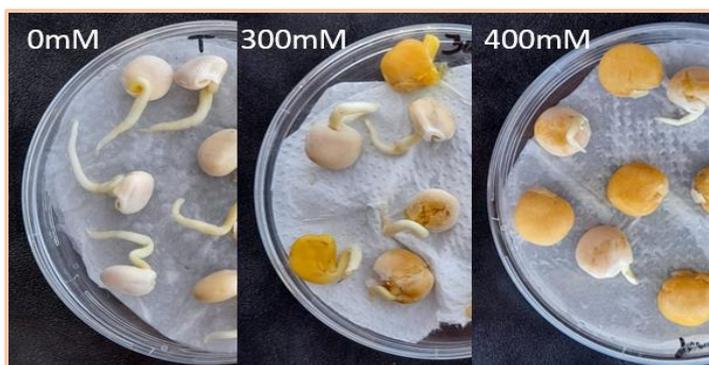


Figure 30 : Germination des graines de *L.albus* sous stress salin (NaCl)

On observe sur la figure 31, une diminution dans les taux de germination finale lorsque la concentration en NaCl est supérieure à 100 mM, elle n'est significative qu'au-delà de 200 mM. Les graines témoins débutent la germination dès le 1^{er} jour et atteignent le maximum (100%) au 3^{ème} jour après semis, suivie par celles traitée de 100 mM de NaCl qui atteignent 100% au bout du 4^{ème} jour. Pour les doses 300 et 400mM, la germination des graines commence à partir du 2^{ème} jour après semis, leurs taux augmentent légèrement et atteignent respectivement 55% et 30% au 4^{ème} jour.

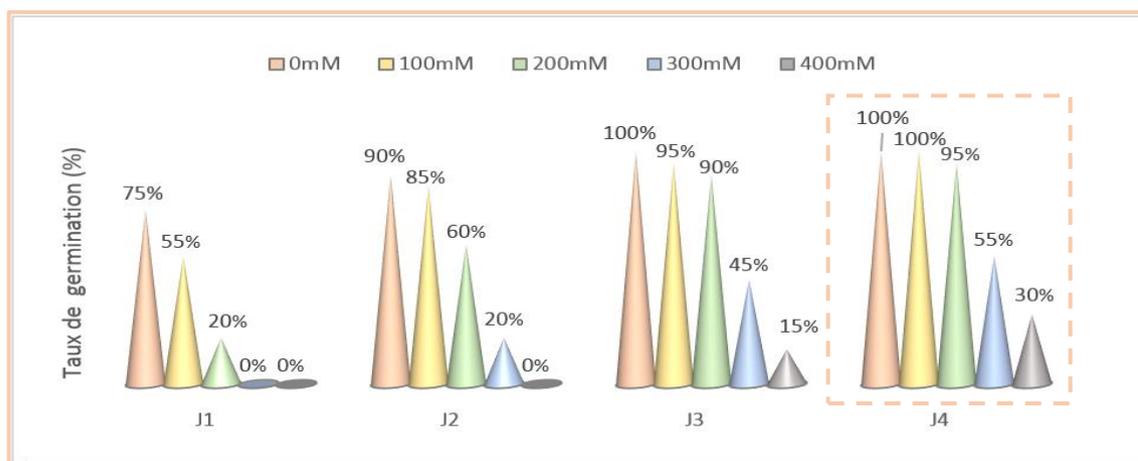


Figure 31 : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la germination des graines de *L.albus* en absence de *Bradyrhizobium*

Il ressort de ce test que la salinité élevée réduit les taux de germination finale et diminue leur capacité germinative pendant les premiers jours (ralentit la vitesse de germination avec l'augmentation du stress). Ces résultats confirment de nombreux travaux mettant en évidence l'effet négatif de la contrainte saline sur la capacité germinative de différentes légumineuses (Benidire et al., 2015 ; Camara et al., 2018 ; Borlu et al., 2018).

Selon Daroui et al., (2012), les perturbations observées pourraient être expliquées par une diminution du potentiel osmotique du milieu suite à l'ajout du sel, le retard est ainsi expliquées par le temps nécessaire aux graines pour déclencher les mécanismes permettant d'ajuster cette pression osmotique, également d'une difficulté d'hydratation des graines suite au potentiel osmotique entraînant une certaine inhibition des mécanismes aboutissant à la sortie de radicule.

La tolérance à la salinité varie selon les espèces, en effet, nos résultats révèlent que *L. albus* semble avoir résistances au stress salin au stade germinatif, dont la germination n'est affectée que pour des concentrations élevées de NaCl (300-400mM), comparés aux résultats de Lachhab et al., (2013) qui montrent une inhibition de la germination de la luzerne à une faible concentration de sel (200mM).

- Germination en présence de *Bradyrhizobium*

La capacité germinative des graines inoculées séparément (csa208/csa12), a été évaluée pour chaque concentration de NaCl. Les résultats sur les figures 32 et 33 montrent également une diminution dans les taux de germination finale avec l'augmentation de la concentration de NaCl.

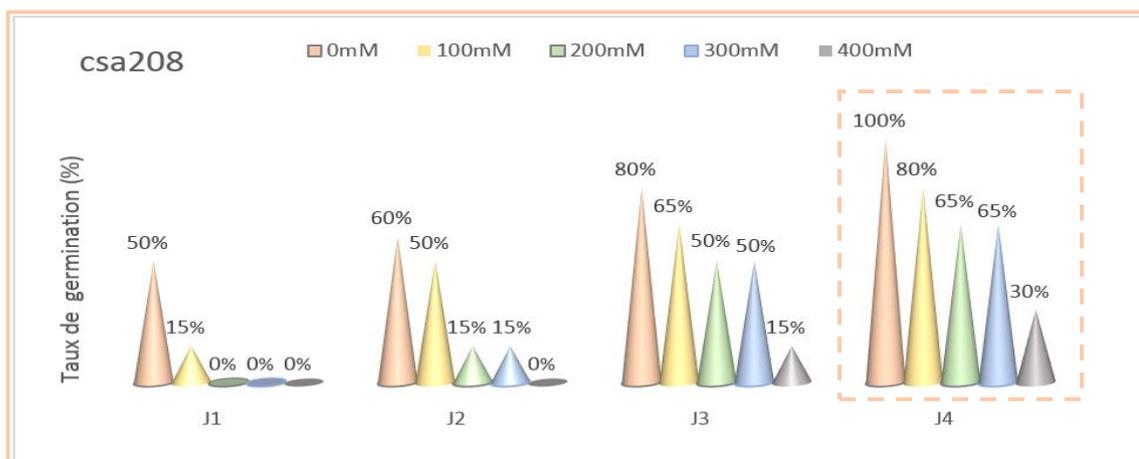


Figure 32 : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la germination des graines de *L. albus* inoculées par la souche csa208

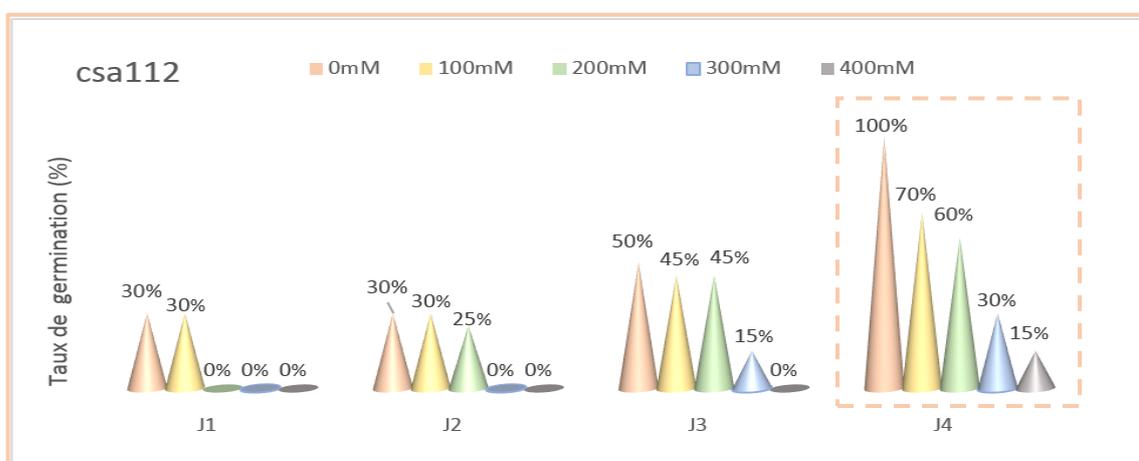


Figure 33 : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la germination des graines de *L. albus* inoculées par la souche csa112

Les souches ont entraîné des valeurs plus faibles, le pourcentage germinatif final des graines inoculées est réduit comparativement aux graines non inoculées (figure 31), mais il reste toujours proche de celui de ces dernières, les taux les plus faibles ont été observés chez la souche csa112. On observe un allongement de temps de latence, aucune germination n'a été enregistrée le premier jour chez les graines traitées par 200, 300 et 400mM de NaCl et cela pour les deux souches, la germination à ces concentrations débute à partir du 2ème et 3ème jour.

Ces résultats apportent que la bactérisation des graines de *L.albus* avec *Bradyrhizobium* csa112 et csa208 a provoqué un retard et une réduction de la germination à tous les niveaux de stress, elle n'induit pas une forte diminution dans les taux de germination final mais elle a un effet significatif sur la vitesse de germination, en effet il est possible que ces souches produisent des métabolites qui perturbent le stade germinatif de *L.albus*.

VI.2. Effet du NaCl sur la croissance des plantes inoculées et non inoculées

VI.2.1. Evaluation de la croissance

L'analyse des plantes cultivées sur milieu Jensen préparé à différentes concentrations de NaCl a été faite après 35 jours de culture. D'après les résultats représentés sur la figure 34, il est évident que l'augmentation de la salinité a affectée négativement la croissance des plantes, en présence et en absence d'inoculation. Cependant, on observe une variation significative dans les résultats des différents lots (L1 : inoculé par csa112 ; L2 : inoculé par csa208 ; L3 : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et le témoin négatif sans inoculation).

On constate que la croissance de toutes les plantes diminue avec l'augmentation des concentrations en NaCl. Cependant, les plantes inoculées avec les souches de *Bradyrhizobium* montrent une amélioration très significative par rapport aux plantes non inoculées (témoin -) et semble comparables à celles traitées avec le nitrate de calcium. Des résultats similaires ont été apportés par Meng et al., (2016) ou ils ont démontré les effets bénéfiques de l'inoculation avec des souches de *Bradyrhizobium* sur les caractères morphologiques des plantules de soja cultivées sous stress salin.

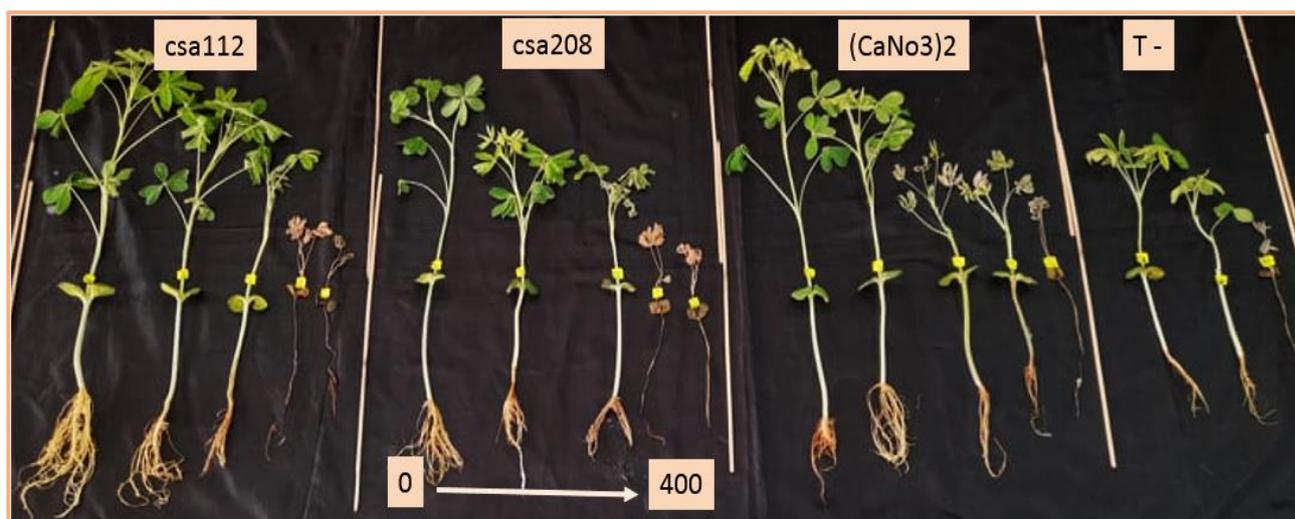


Figure 34 : Croissance de *L.albus* stressé par NaCl en présence et en absence d'inoculation

Sous les faibles concentrations en NaCl (0, 100 et 200 mM), la croissance des plantes inoculées par la souche csa112 apparait proches de celle des plantes traitées avec le nitrates de calcium, par contre elle est plus élevée comparativement à celle inoculées par la souche csa208 (figure35). Cette variation est peut-être due à la capacité élevée de la souche ca112 à tolérer le stress salin et à produire des métabolites favorisant la croissance de plantes telle que l'AIA et les sidérophores sous ces conditions de stress, comme il a été démontré dans les résultats précédents.

Sous les plus hauts niveaux de salinité du milieu (300 et 400 mM), la croissance des plantes témoins négatifs a été complètement inhibée par rapport ou autre lots ou elles ont été sévèrement affectées (figure35). Cela est peut-être dû à l'absence de source d'azote qui est un élément important pour le développement des plantes. Selon Maaouia et al., (2008), sous contrainte saline, l'accumulation d'ions toxiques (Na^+) sur les racines peut entraîner la mort des plantes avant la fin de leur cycle de développement.



Figure 35 : Croissance de *L. albus* stressé par NaCl en présence et en absence d'inoculation

VI.2.2. Effet du NaCl sur la nodulation

Après 35 jours de culture, les résultats de nodulation des plantules de *L.albus* cultivés dans des conditions de salinités sont représentés dans le tableau VI. Seules les plantes inoculées avec les souches *Bradyrhizobium* (csa208 et csa112) ont la capacité de former des nodosités (une nodulation négative a été observée pour les plantes non inoculées), la nodulation a été observé chez toutes les plantes cultivées en milieu sans NaCl (figure 36), ainsi qu'à des concentrations de 100 mM. Au-delà de cette concentration on remarque l'absence de la nodulation. A l'exception la nodulation des plantes inoculées avec csa112 a été inhibée à 200mM de NaCl.

Tableau VI : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur la nodulation de *L.albus*-*Bradyrhizobium* (présence de nodules + / absence de nodules -)

	0mM	100mM	200mM	300mM	400mM	
csa112	++	+	+	-	-	
csa208	++	+	-	-	-	
Ca(NO3)2	-	-	-	-	-	
Témoins	-	-	-	/	/	

Selon Farissi et al., (2014) ; Sunita et al., (2019) la salinité affecte la multiplication et la survie du rhizobia dans le sol et inhibe ainsi le processus d'établissement de l'infection rhizobienne, entraînant une diminution dans le nombre de nodules, cela constitue la principale limitation de la fixation symbiotique de l'azote sous contrainte saline. Nos résultats confirment de nombreux travaux qui démontrent la sensibilité du stade nodulaire d'autres légumineuses à la salinité (Borucki et al., 2008 ; Timzit & Semmane, 2011 ; Al-Saedi et al., 2016).



Figure 36 : Nodules observées sur les racines de *L.albus* inoculée par *Bradyrhizobium*

VI.2.3. Effet du NaCl sur le nombre de feuillies

Les nombres moyens de feuillies des plantules de *L. albus* soumises à différentes concentrations de NaCl (en présence et absence de *Bradyrhizobium*) sont représentées dans le tableau VII. Selon les résultats observés, ce stade est également affecté par la salinité, le nombre moyen de feuillies a été réduit avec l'augmentation des concentrations de NaCl, une forte diminution a été observées au-delà de 100mM. Cependant, chez les plantes inoculées on remarque une amélioration marquante de 50% par rapport aux témoins négatifs (non inoculées). Des valeurs similaires ont été également représentées par les plantes traitées avec le nitrate de calcium.

Tableau VII : Effet des concentrations croissantes de NaCl sur le nombre de feuillies

	0mM	100mM	200mM	300mM	400mM	
csa112	12	11	5	4	3	
csa208	10	8	5	3	2	
Ca(NO3)2	10	9	6	4	3	
Témoins	5	4	2	/	/	

La diminution du nombre de feuillies par plante est due essentiellement à un retard de tallage. Ben Khaled et al., (2013) ont montré que tous les paramètres de rendement tel que le nombre de talles par plante subissent une réduction sous l'action de la salinité et que, plus la salinité est élevée plus le rendement est réduit. En effet, les concentrations de NaCl supérieures ou égales à 100 mM réduisent le nombre de feuillies par plante. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Flowers & Hamm (1980) ; Ben Khaled et al., (2013) qui ont montré que la salinité provoque une réduction du nombre de talles et par conséquent le nombre de feuilles chez les céréales et le blé dur. De plus, l'augmentation du nombre de feuilles lors de l'inoculation peut être liée à l'amélioration de l'activité photosynthétique dans les plantes inoculées qui est due à la fixation symbiotique d'azote atmosphérique par ces *Bradyrhizobium*.

VI.2.4. Effet du NaCl sur la longueur de la partie aérienne et racinaire

Après la récolte, on remarque une diminution significative des longueurs aériennes et racinaires avec l'augmentation des concentrations en NaCl chez toutes les plantes (inoculées et non inoculées), les plantes témoins négatifs présentent une croissance très faible (figure 37 et 38). Des résultats similaires ont été rapportés par Soares et al. (2015) qui ont observé une réduction de la croissance des pousses de soja soumises à un stress en NaCl.

Il a été démontré que l’effet de la salinité se traduit généralement par une réduction de la croissance de la tige et la diminution du gradient hydrique ce qui entraîne une perte de turgescence cellulaire, plus la pression osmotique est élevée plus il est difficile pour les racines d’absorber l’eau ce qui induit un ralentissement de leur croissance (Luu Doan Trung, 2020). De même, Ben Khaled et al., (2013) ont signalé que, sous l’effet de la salinité, les plantes peuvent manifester un faible allongement des organes.

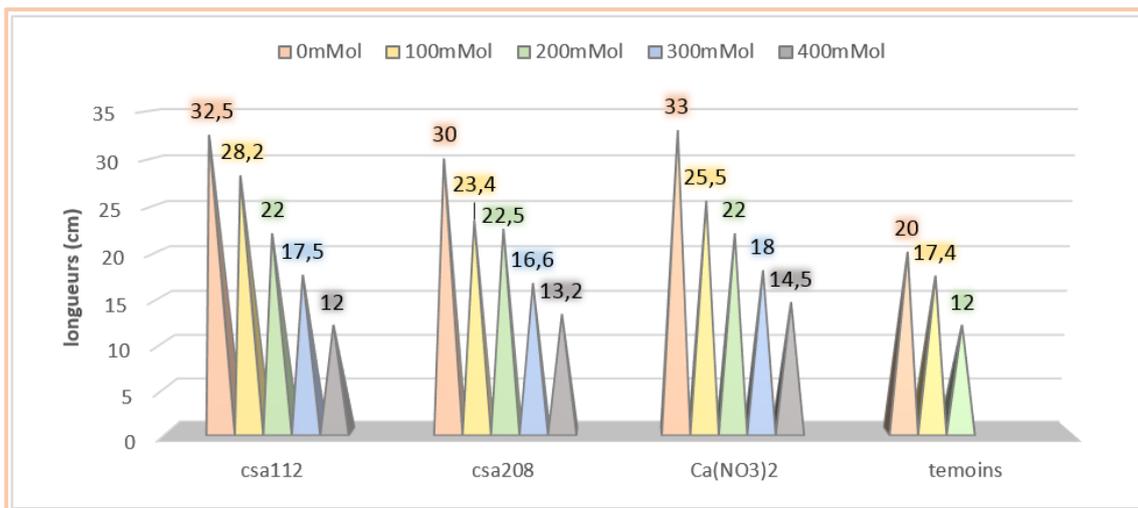


Figure 37 : Variation des longueurs de la partie aérienne de *L.albus* inoculée ou non par *Bradyrhizobium* en fonction de concentrations croissantes de NaCl

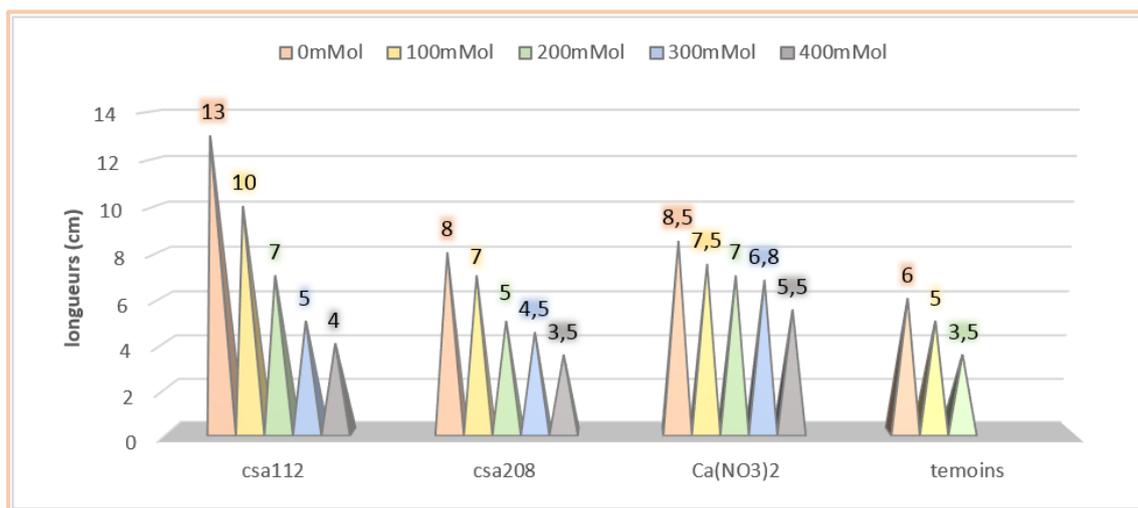


Figure 38 : Variation des longueurs de la partie racinaire de *L.albus* inoculée ou non par *Bradyrhizobium* en fonction de concentrations croissantes de NaCl

D'après nos résultats, l'effet de l'inoculation de *L.albus* par *Bradyrhizobium* se manifeste par une augmentation de la taille de la plante (racinaire et foliaire) en présence de différentes concentrations de NaCl, ces résultats confirment ceux de Hernandez et al., (2020).

On remarque que les deux souches ont eu des effets significatifs sur la partie aérienne des plantes par rapport aux témoins non inoculés (figure37), ils ont induit une amélioration élevée et comparable à celle supplémentées par le nitrate de calcium (L3).

La souche csa112 apparait plus performante que la souche csa208, elle a révélé des résultats intéressants sur la partie racinaire (figure38). Les longueurs racinaires des plantes inoculées avec *Bradyrhizobium* csa112 étaient supérieures, montrant une amélioration à tous les niveaux de stress d'environ 55% par rapport aux témoins non inoculés.

VI.2.5.Effet du NaCl sur le poids frais et le poids secs

Les valeurs du poids frais des plantules obtenues après 35 jours de croissance sous contrainte saline, était très affecté par la salinité a (T0) (figure39), Il a été rapporté par Cheikh Oumar et al., (2020) que les concertations élevées de sel conduisait à une réduction de la biomasse végétale. La mesure du poids des plantes a fait ressortir un effet positif visible de l'inoculation en présence et en absence de sel. En effet, l'inoculation par *Bradyrhizobium* csa112 a significativement améliorée le poids de la matière fraîche des plantules stressées par rapport à la souche csa208 qui a apporté une légère amélioration relativement à la fertilisation azoté.

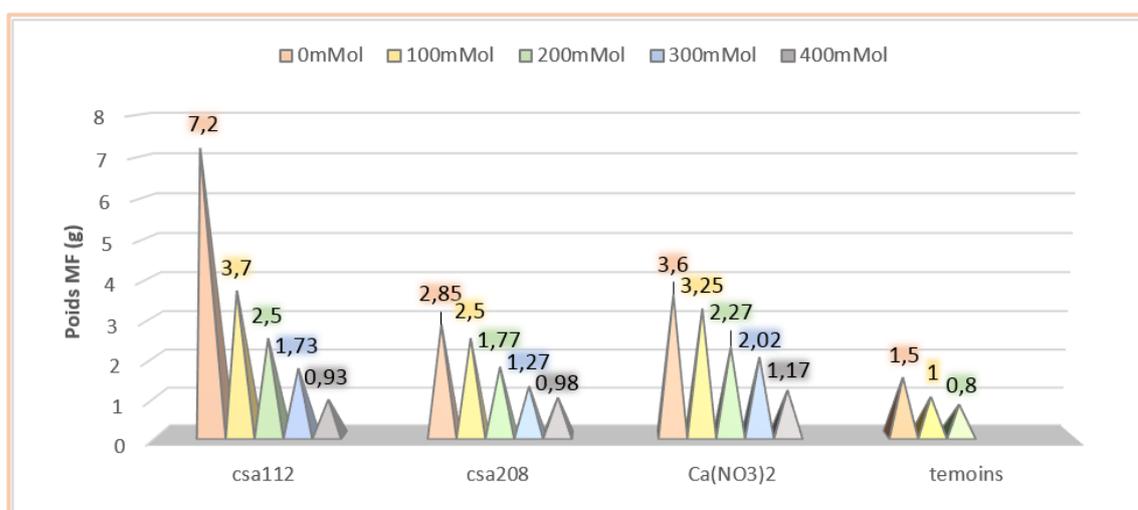


Figure 39 : Variation des poids frais de *L.albus* inoculée ou non par *Bradyrhizobium* en fonction de concentrations croissantes de NaCl

Les valeurs des poids secs ont également suivies la même allure, les plantes inoculées avec la souche csa112 ont enregistrées les valeurs les plus élevées (figure40). Cependant, la présence du NaCl a entraîné une diminution dans les pois secs de ces plantes comparativement au témoin sans NaCl. En comparant la figure 39 et 40, on constate que le poids de la matière fraîche est moins affecté par la présence de sel que le poids de la matière sèche, cela est peut être dû à la suppression de la photosynthèse qui serait à l'origine de la réduction de la masse sèche des tiges (Akhtar & Hussain, 2009). Des résultats similaires ont été apportés par Timzit & Semmane, (2011), ou ils ont évalué l'effet du NaCl sur la fève inoculée par *Rhizobium*.

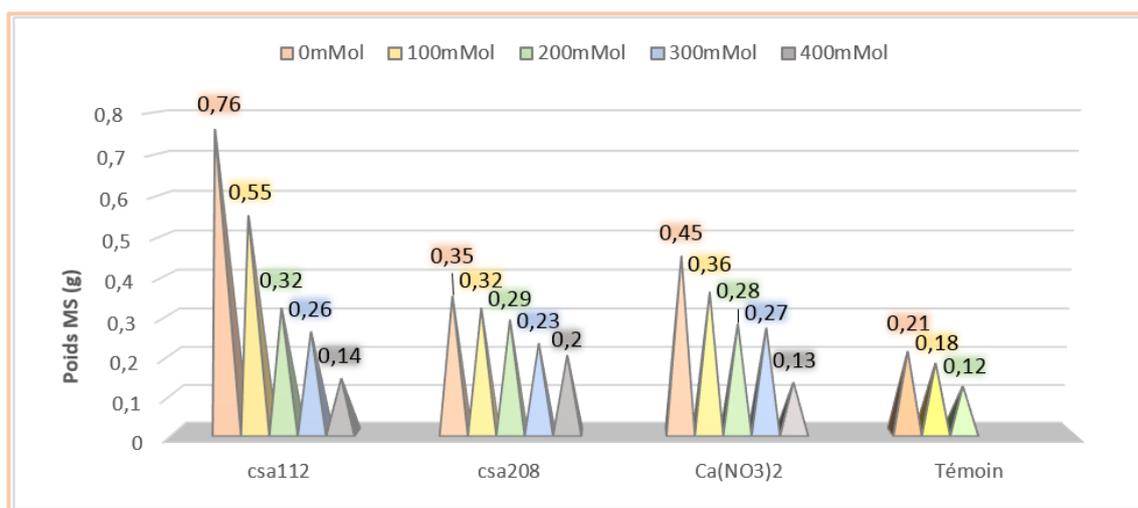


Figure 40 : Variation des poids secs de *L.albus* inoculée ou non par *Bradyrhizobium* en fonction de concentrations croissantes de NaCl

L'analyse agronomique des plantes nous a permis de confirmer l'effet néfaste du NaCl sur la germination ; le développement de la longueur des racines ainsi sur la hauteur des tiges ; sur les poids frais et secs des plantes ; sur le processus d'infection et le nombre de talles. Mezni et al., (2010) a montré que le stress causé par la salinité réduit de manière significative la croissance de différents organes de légumineuses, toutefois, les racines sont souvent plus touchées que les parties aériennes Farissi et al., (2014). Ce ralentissement de croissance végétale est dû à la réduction de l'activité hydrique et photosynthétique, à la toxicité ionique spécifique (sodium et chlore) et à la diminution de la disponibilité des nutriments essentiels (Lima et al., 2021).

Pour s'adapter au stress salin, la plante peut éviter les dommages par la réduction de sa croissance (Benmahioul et al., 2009), cette réduction est une capacité adaptative nécessaire à la survie d'une plante exposée à un stress abiotique. En effet, ce retard de développement permet à la plante une accumulation de l'énergie et des ressources pour combattre le stress.

Selon nos résultats, une meilleure symbiose en conditions salines pourrait être obtenue si les deux symbiotes et les différentes étapes de la symbiose sont tolérants au facteur de stress imposé. Ainsi, pour améliorer la croissance d'une plante dans des conditions de salinité, il est important d'augmenter sa capacité à survivre et à croître dans ces conditions. L'une de ces options est l'application de l'inoculation de *Bradyrhizobium* qui sont associés aux racines des plantes, et sont connus pour être bénéfiques pour la croissance globale des légumineuses comme il a été démontré par Omara et al., (2018) qui ont testés l'atténuation des effets du stress salin par *Bradyrhizobium* dans le niébé fourrager.

En outre, il y a une variation dans les effets des souches utilisées sur la plante de *L.albus*, csa112 a montré la plus grande augmentation dans tous les paramètres étudiés (la taille de la plante, les poids frais et secs, le taux de nodulation et le nombre de feuilles). Cela pourrait s'expliquer par la bonne tolérance de cette souche à la salinité du milieu (800mM), ainsi sa capacité à produire des activités PGP à des concentrations élevées de sel (l'acide indole acétique (AIA) jusqu'à 600 mM de NaCl et de sidérophores jusqu'à 300 mM de NaCl).

L'amélioration des différents paramètres morphologiques a été observée à tous les niveaux de stress au NaCl par contre la nodulation a été inhibé a 100 mM chez csa208 et a 200mM chez csa112. Ben khaled et al., (2003) rapportent que le processus d'installation de la nodosité est plus sensible au stress osmotique que le métabolisme des racines et des parties aériennes de la plante.

L'utilisation des engrais azoté est l'un des mécanismes efficaces pour se défendre contre le stress salin, après avoir comparé les valeurs obtenues par les plantes inoculées par *Bradyrhizobium* avec les résultats de la fertilisation azotée, on constate que les souches ont atténué les effets néfastes du stress salin et ont considérablement influencé la croissance des plantes. Ces souches tolérantes pourrait être utilisées comme biofertilisant potentiel dans des essais sur le terrain et remplacer le mécanisme de défense par engrais chimiques qui peut être couteux et à la fois nuisible à la santé humaine et a l'environnement. Selon Rocha et al., (2019), l'une des stratégies de culture de légumineuses sous stress salin est l'utilisation de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, visant à réduire l'utilisation d'engrais azotés.

Conclusion

Le travail réalisé a pour but, l'étude de deux souches du genre *Bradyrhizobium* (csa208 et csa112) sous stress salin (NaCl), dans leur état libre ainsi qu'en symbiose avec la légumineuse *L. albus*. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure ce qui suit :

Les deux souches ont un potentiel de biofertilisants. Elles ont la capacité de fixer l'azote et de produire des caractères PGP. Les concentrations d'AIA produites permettent de classer les souches comme d'excellents phytostimulateurs. Elles sont également performantes dans la production des sidérophores et la dégradation de certaines enzymes.

Les résultats indiquent que les conditions de stress salin ne constituent pas une limite absolue à la présence de populations rhizobiennes compétentes. L'évaluation de l'effet de la salinité sur la croissance des souches montre qu'elles se caractérisent par une tolérance élevée au stress salin, bien que leur croissance ait été affectée.

Par ailleurs, nos résultats montrent une corrélation entre la résistance des souches au stress salin et leurs effets sur la plante cultivée sous les mêmes conditions. On a observé que la souche csa112 qui a montré une meilleure tolérance au sel ainsi qu'une bonne production de caractères PGP sous stress élevé a grandement aidé à la promotion de croissance des plantes de lupin blanc comparativement à csa208 qui s'est montré moins tolérante. Cependant le niveau de tolérance des souches libres est plus élevée en comparaisant avec la résistance des deux partenaires en symbiose. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce qu'une souche rhizobienne halotolérante garde sa pleine capacité si les facteurs limitant imposent des limitations à la vigueur de la légumineuse hôte. De plus, la formation de nodules fixateurs d'azote efficaces dans des conditions de stress salin dépend de la présence de souches efficaces.

Notre étude a montré que le stress salin a un effet dépressif sur la croissance et le développement des plantes, la présence du NaCl affecte les paramètres morphologique de la plante, généralement la biomasse, la taille et le nombre de talles ainsi que le processus de nodulation, mais avec moins d'intensité lorsqu'elle est inoculée avec des bactéries symbiotiques résistantes à la salinité. L'inoculation de *L.albus* avec les souches étudiées a permis d'améliorer la tolérance de cette espèce à la contrainte saline. Les résultats de l'expérience confirment que l'inoculation par un PGPR peut améliorer la tolérance des plantes à la salinité en augmentant leurs paramètres de croissance.

Les souches bactériennes testées dans cette étude peuvent être développées comme bioinoculants ou biofertilisants potentiels qui peuvent aider au développement d'une agriculture

écologique et durable. Nous tenant à encourager les agriculteurs à appliquer des inocula tolérants au sel dans les pratiques agricoles afin d'aider la plante à contourner les conditions défavorables et améliorer la qualité de la production, c'est une solution efficace, moins coûteuse et plus respectueuse de l'environnement.

Les résultats obtenus au laboratoire sur milieux hydroponiques méritent donc une expérimentation plus large en plein champ de sol affecté par la salinité, pour confirmer les performances de ces souches et leur capacité à contribuer à une augmentation de la tolérance chez d'autres espèces légumineuses ou non légumineuses.

Il serait souhaitable ainsi de compléter ce travail par l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au stress salin (osmoprotecteurs) et de procéder à une analyse statistique pour mieux évaluer les résultats.

Références bibliographiques

A

- **Abd-Alla M.H., Issa A.A. & Ohyama T. (2014).** Impact of Harsh Environmental Conditions nodule formation and dinitrogen fixation of legumes. In Ohyama T (Eds). Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation, pp. 131-193.
- **Abderrahim S. & Imakhloufene S.(2016).** Etude de la tolérance aux stress abiotiques de bactéries nodulant la féverole. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. p .67
- **Abed N. (2010).** Effet de l'inoculation sur la croissance et le rendement de *Vinga unguiculata*. *L.walpers* sous contrainte saline. Mémoire de magister en Biotechnologie. Université d'Oran. p .184
- **Affati D. & Kerdouci K. (2020).** Etude des différents types d'interactions microbiennes avec les plantes légumineuses. Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945 Guelma. p .126
- **Afzal M., Khan Q.M & Sessitisch A. (2014).** Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. Chemosphere, 117. 232-242.
- **Aissat A., Mehdadi Z., Leogrande R., & Stellacci A. M. (2019).** Characterization of *Medicago arborea* L. Response to Water and Salt Stress. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 15(4).
- **Al-Saedi S.A., Razaq I.B. & Ali N.A. (2016).** Utilisation de l'analyse de dilution 15N pour mesurer l'efficacité de la fixation biologique de l'azote sous le stress de la salinité du sol". Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(1) : 1468-1479
- **Arbaoui M. (2016).** Effet de stress salin sur des plantules de tomates cultivées sur substrat sableux amendé en Bentonite. Thèse de Doctorat en science biologique. Université d'Oran. p. 21-38
- **Arif F. (2015).** Effet du stress salin et d'osmoprotecteur naturels sur la germination de blé dur inoculé par *Pseudomonas fluorescens*. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Ferhat abas setif 1. p. 205
- **Ashraf M., Ahmad M.S.A, Öztürk M. & Aksoy A. (2012).** Crop Improvement through Different Means: Challenges and Prospects. Crop Production for Agricultural Improvement. Springer Science Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands, 1-15
- **Aya L. (2020).** La salinisation des sols constitue une vraie menace pour la sécurité alimentaire mondiale, agrimaroc.ma.

B

- **Baba Arbi S. (2016).** Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis Rhode et Melilotusindicus* (L.) présentes dans les

palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse de Doctorat, Microbiologie Appliquée. Université Badji Mokhtar Annaba. p. 13, 33

- **Balan S.S, Nethaji R. & Sankar S. (2012).** Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2: 1811-1816.
- **Banerjee S., Palit R., Sengupta C. & Stranding D. (2010).** Stress induced phosphate solubilisation by *Arthrobacter* sp. And *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. Aus. j. crop, 4: 378-383.
- **Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R. & Hernandez J.P. (2014).** Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant and Soil, 378(1-2): 1-33.
- **Benamar B., Florence D. & Kaid-Harche M. (2009).** Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistaciavera L.*). Comptes Rendus Biologies, 332 (8):752-758.
- **Benidire L., Daoui K., Fatemi Z.A., Achouak W., Bouarab L. & Oufdou K. (2015).** Effet du stress salin sur la germination et le développement des plantules de *Vicia faba L.* JMESC, 6 (3) : 840-851.
- **Benmahioul B., Daguin F. & Kaid-Harche M. (2009).** Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistacia vera L.*). Compte rendu. Science directe. Agronomie C.R. Biologies, 332: 752-758.
- **Ben Khaled L., Asunción G., Mario H. & Abdallah O. (2003).** Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. Agronomie, EDP Sciences, 23 (7) : 553-560.
- **Bianco C., Imperlini E., Calogero R., Senatore B., Amoresano A., Carpentieri A., Pucci P & Defez R. (2006).** L'acide indole-3-acétique améliore les défenses d'*Escherichia coli* contre le stress. Cambre. Microbiologie, 185 :373–382
- **Borlu H. O., Celiktas V., Duzenli S., Hossain A. & El Sabagh A. (2018).** Germination and Early Seedling Growth of Five Durum Wheat Cultivars (*Triticum durum Desf.*) Is affected by Different Levels of Salinity. Fresenius Environmental Bulletin, 27(11) : 7746-7757.
- **Borucki W. & Sujkowska M. (2008).** The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisumsativum L.*) plants. Acta Phys, 30: 293-301.
- **Bouda S. & Haddioui A. (2011).** Effet du stress salin sur la germination de quelques espèces du genre *Atriplex*. Nature & Technologie, 5:72-79.
- **Boukecha O & Hammadi L. (2017).** Caractérisation des souches isolées de *Hedysarum coronarium*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. p. 75.

- **Botineau M. (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Tec & doc. Paris : Lavoisier. P .598.
- **Brhada F & Le Rudulier MP. (1995).** Osmorégulation des bactéries en général et spécialement chez Rhizobium : effet glycine bêtaïne chez Rhizobium leguminos arumbv. *Viciae* osmoregulation", Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 77 :127-137.
- **Burbank M.B., Weaver T.J., Williams C.B & Crawford R.L. (2012).** Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria Malcolm B. Burb. University of Chicago. Journal de géomicrobiologie, 29(4) : 389-395.

C

- **Cacciari I.E, Di Mattia P, Quatrini M.C, Moscatelli S., Grego D. Lippi & De paolis M.R. (2003).** Réponses adaptatives des isolats de Rhizobium aux stress. : Un arbre au désert. *Acacia raddiana* Paris, 183-200.
- **Camara B., Sanogo S., Cherif M. & Kone D. (2018).** Effet du stress salin sur la germination des graines de trois légumineuses (*Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* et *Vigna unguiculata*). Journal of Applied Biosciences, 124: 12424-12432.
- **Carpici N., Celik G., Bayram B. & Asik B. (2010).** The effects of salt stress on the growth, biochemical parameter and mineral element content of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. Afr. J. Biotechnol., 9(41) : 6937-6942.
- **Castro D., Urzúa J., Rodriguez-Malebran M., Inostroza-Blancheteau C. & Ibáñez C. (2017).** “Woody leguminous stress: New uses for sustainable development of dry lands”. Journal of Sustainable Forestry, 36(8): 764-786
- **Cheikh O.S, Dethie W, Elhadji F. & Mouhamadou M.D. (2020).** Effet du stress salin sur la croissance de quatre provenances d’anacardier (*Anacardium occidentale* L.) en milieu semi-contrôlé. VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement. 28462
- **Cherif H. (2014).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus sp* et *Pantoeaagglomerans* isolées de sols arides. Thèse de Doctorat en Sciences. Université de Ferhat Abbas, Sétif, Algérie. P.162.
- **Concha C. & Doerner P. (2020).** The impact of the rhizobia–legume symbiosis on host root system architecture. Journal of Experimental Botany, 71(13) : 3902–3921.
- **Cronk Q., Ojeda I. & Pennington R.T. (2006).** Legume comparative genomics:progress in phylogenetics and phylogenomics. CurrOpin Plant Biol, 9 : 99-103.

D

- **Daimon H., Nobuta K., Ohe M., Harada J. & Nakayama Y. (2006).** Tricalcium phosphate solubilizing by root nodule bacteria of *Sesbania cannabina* and *Crotalaria juncea*. *Plant Production Science*, 9: 388- 389.
- **Daroui E., Boukroutea A., Kouddanea N., Berrichia A. (2012).** Effet de la salinité sur la germination et la croissance in vitro du *Washingtonia filifera* ». *Nature & Technologie*, Université Mohamed Premier, Oujda Maroc, 5 (1): 32-38.
- **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.
- **Day D.A, Poole P.S, Tyerman S.D. & Rosendahl L. (2001).** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(1) : 61-71.
- **Delerras C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier. p. 31-70-126-143-145.
- **Dong R., Zhang J., Huan H., Bai C., Chen Z. & Liu G. (2017).** Tolérance élevée au sel d'une souche de *Bradyrhizobium* et sa promotion de la croissance de *Stylosanthes guianensis*. *Revue internationale des sciences moléculaires* , 18 (8) : 1625.
- **Dupuy Y. & Nougier P. (2005).** Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses.Paris. p 256.
- **Dwivedi S.L, Sahrawat K.L., Upadhyaya H.D., Mengoni A., Galardini M., Bazzicalupo M., Biondi E.G, Hungria M., Kaschk G., Blair M.W. & Ortiz R. (2015).** Chapter one advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Advances in Agronomy*, 129: 1-116.

E

- **El-Hilali I. (2006).** La symbiose rhizobium-lupin : Biodiversité des micro-symbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V- Agdal. Faculté des Science, Rabat. P 206.
- **Essendoubi M., Brhada F., Eljamali J.E, Filali-Maltouf A., Bonnassie S., Georgeault S. & Jebbar M. (2007).** Osmo-adaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara. *Environmental Microbiology*, 9(3) : 603–611.
- **Estrada-Navarrete G., Cruz-Mireles N., Lascono R., Alvarado A., Hernández-Barrera A., Barraza A., Olivares J.E., Arthikala M-K., Cárdenas L., Quinto C. & Sanche F. (2016).** An Autography-Relatedkinas essential for the symbiotique relationship between *Phaseplus vulgaris* and both rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi the plant cell. 28 : 2326.

F

- **Fahima N. (2009).** Effet de la salinité sur la germination, la croissance et les composantes du rendement du *Vigna unguiculata L.* (Walp.) , Mémoire de Magister en Biotechnologies végétales, École Nationale Supérieure Agronomique D'El Harrach, Alger. 133 p.
- **Faria S.M, Diedhiou A.G, De Lima H.C, Ribeiro, R.D, Galiana A, Castilho A.F & Henriques J.C. (2010).** Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. *Journal of Experimental Botany*, 61(11) : 3119-3127.
- **Farissi M., Faissal A., Abdelaziz B. & Cherki G. (2014).** Legume-rhizobia symbiosis under saline conditions: Agro-physiological and biochemical aspects of tolerance. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 11(1) : 96-104.
- **Flowers D.B. & J.W. Hamm, (1980).** Crop response to saline soil conditions in the park land area of Saskatchewan. *Can. J. Soil*, 60 (3) : 439-449.
- **Franzini V.I, Azcón R, Ruiz-Lozano J.M & Aroca R. (2019).** Rhizobial symbiosis modifies root hydraulic properties in bean plants under non-stressed and salinity-stressed conditions. *Planta*, 249(4): 1207-1215
- **Frontier S., Piched-Viale D., Leprêtre A., Davoult D., Luczak C. (2004).** Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution. 3ème Edition Dunod, Paris. p. 549.

G

- **Giroux L. (2015).** Caractérisation de rhizobactéries du groupe des Bacillus bénéfiques à la croissance de la tomate. Mémoire. Trois-Rivières, Université du Québec à Trois-Rivières. p. 77.
- **Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ & Shachar-Hill Y. (2005).** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435 : 819–823.
- **Graham P.H. & Vance C.P. (2003).** Importance des légumineuses et contraintes à une plus grande utilisation. *Physiologie végétale*, 131 : 872-877.
- **Grandi M., Kebbas S., Rihane Y., Benhbiles F., Guendouz A. & Hirche A. (2020).** *Gleditsia triacanthos L.*, entre résistance au stress hydrique et statut écologique : quelle place pour cette espèce dans le cadre de la réhabilitation des zones dégradées en Algérie. *Revue Agrobiologia* 10(2): 2141-15.

H

- **Hamdaoui A. & Hammiche M. (2019).** Isolement, purification et caractérisation des souches rhizobiennes de *Spartium junceum L.* Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. p. 74.

- **Hamdoud N. (2012).** Effet du stress salin sur la croissance et la physiologie de la féverole (*Vicia faba L.*). Mémoire de magister en Science Agronomique. ENSA El-Harrach, Alger. P 21-38.
- **Hamoum F. & Hamdi H. (2016).** Etude de l'effet du stress salin sur la croissance et le potentiel de production de quelques activités liées à la PGP par des Rhizobactéries. Mémoire de master. Biotechnologie des microorganismes. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. p. 60.
- **Harter F. S, Harter L, dos S. H & Meneghello G. E. (2018).** Rice Seed Production Under Conditions of Salinity Stres. *Ciência Rural*, 48(9).
- **Heller R., Esnart R., Lance C. (1989).** Physiologie végétale. 4ème Edition Masson, Paris. p. 273.
- **Hernandez I., Estevez p., Susana L., Maida D., Napoles y. & María C. (2020).** Selection of promising rhizobia to inoculate herbaceous legumes in saline soils. *Cuban J. Agric.* ,54(3) : 435-450.
- **Hmissi I., Abdi N., Bargaz A., Bouraoui M., Mabrouk Y., Mouldi S. & Sifi B. (2015).** Inoculation with Phosphate Solubilizing *Mesorhizobium* Strains Improves the Performance of Chickpea (*Cicer aritenium L.*) Under Phosphorus Deficiency. *J Plant Nutr*, 38 (11): 1656-1671.

I

- **Ilangumaran G., & Smith D. L. (2017).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Amelioration of Salinity Stress: A Systems Biology Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- **Irekti H. (2011).** Effet de la salinité sur la physiologie de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique chez l'haricot. Mémoire de master en science agronomique. ENSA. p20-22
- **Iskounen T. (2012)** Isolement et caractérisation de bactéries nodulant les légumineuses *Calycotome spinosa*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. P 69.

J

- **Jadhav R. N. (2013).** (Isolation of rhizobia from soybean cultivated in latur area & study of its phosphate solubilization activity) *Bioscience Discovery*, 4(1) :100-103.
- **Jean-Marc S. (2017).** Légumineuse / Bactérie Rhizobium = Symbiose. Agriculture de conservation.
- **Jog R., Nareshkumar G. & Rajkumar S. (2012).** Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5) : 1154–1164.

K

- **Khaitov B., Karimov A., Abdiev A., Farrukh J. & Park K. (2020).** "Beneficial effect of *Rhizobium* inoculation on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum L.*) in saline soils". Bulgarian Journal of Agricultural Science, 26(1) : 96-104.
- **Kumar S, Kumar R.S., Shiv C.K, Umakant B, Kumar A.P, Ashish P & Akansha P.S. (2021).** Estimation of plant growth hormone (IAA) production ability by *bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of pigeon pea (*cajanus cajan*), Plant Archives, 21: 1567-1570.
- **Kumar S., Kumar R.S., Shiv C.K., Umakant B., Kumar A.P., Ashish P. & Akansha P.S. (2021).** Evaluation of phosphate solubilizing ability of the bacterial strains isolated from root nodules of pigeon pea (*Cajanus cajan*). Plant Archives, 21: 1562-1566.
- **Kumar V.S., Soumya M., Happy A., Divya G. (2017).** Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores, Resource Efficient Technologies, 3(4): 434-439.
- **Singh K., Gera R. & Kumar R. (2018).** Isolation and characterization of siderophore producing rhizobia from *Sesbania sesban* using different types of Indian soils. International Journal of Chemical Studies, 6(3): 797-800.

L

- **Lachhab I., Louahlia S., Laamarti M. & Hammani. (2013).** Effet d'un stress salin sur la germination et l'activité enzymatique chez deux génotypes de *Medicago sativa*. International Journal of Innovation and Applied Studies. 3 : 511-516.
- **Latati M. (2012).** Adaptation de la symbiose légumineuse haricot-rhizobium à la déficience en phosphore. Mémoire de Magister, Biotechnologie Végétale. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach-Alger. p. 19.
- **Lebrazi S. & Benbrahim KF. (2014).** Environmental stress conditions affecting the N₂ fixing Rhizobium-legume symbiosis and adaptation mechanisms. Afr J Microbiol Res 8:4053–4061.
- **Lefèvre T., Renaud F., Selosse M-A., Thomas F., Bernstein C., Broennimann O., Charlat S., De Mazancourt C., De Meeüs T. & Fleury F.(2010).** Evolution des interactions entre espèces. In : F. Thomas TL& MR, ed. Biologie évolutive. De Boeck, 533–616.
- **Lima A. F. D. S., Santos M. F. D., Oliveira M. L., Sousa G. G. D., Mendes P. F., & Luz L. N. D. (2021).** Physiological responses of inoculated and uninoculated peanuts under saline stress. *Revista Ambiente & Água*, 16. (1).
- **Lucinski R., Polcyn W., Rotayczak L. (2002).** Nitrate reduction and nitrogen in symbiotic association Rhizobium - legumes. Acta. BiochimiaPolonia, 49 (2) : 537 – 546
- **Luu Doan T. (2020).** « Comment les plantes supportent-elles un régime salé ? », Encyclopédie de l'environnement, Vivant et facteurs du milieu. HAL Id : hal-02959183, version 1

M

- **Maaouia Houimli S., Denden M. & Ben El Hadj S. (2008).** Induction of salt tolerance in pepper (*Capsicum annuum*) by 24-epibrassinolide. *EurAsia J BioSci.*, 2 : 83-90.
- **Malik DK. & Sindhu S. (2011).** Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*), *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17 (1) : 25-32.
- **Manasa K., Subhash Reddy R. & Triveni S. (2017).** Characterization of potential PGPR and antagonistic activities of *Rhizobium* isolates from different rhizosphere soils. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(3): 51-54.
- **Marra L. M., Oliveira S. M., de, Soares C. R. F. S & Moreira, F. M de S. (2011).** Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, 68(5) : 603–609.
- **Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X. & Batut J. (2009).** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol*, 17: 458–466.
- **Meng N., Yu B-J. & Guo J-S. (2016).** Ameliorative effects of inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* on *Glycine max* and *Glycine soja* seedlings under salt stress. *Plant Growth Regul.* 80(2): 137-147.
- **Mezni M., Albouchi A., Bizid E. & Hamza M. (2010).** Minerals uptake, organic osmotica contents and water balance in alfalfa undersalt stress. *J Phytol*, 01–12.
- **Mouhous F. & Aliouat S. (2018).** Etude de la croissance des rhizobia isolées des zones arides sous l'effet de différents pH et teneurs en NaCl. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. P 23.

O

- **Odile D. (2017).** Diversité fonctionnelle des rhizobia associés à la féverole en agroécosystème Sud de France, Interactions entre organismes. Université Paris Sciences et Lettres. HAL Id: tel-02107043.
- **Omara A. & El-Gaafarey T. (2018).** Atténuation des effets du stress salin dans le niébé fourrager (*Vigna unguiculata* L.) par *Bradyrhizobium* sp. Inoculation. *Microbiology Research Journal International*, 23 (3) : 1-16.

P

- **Patriarca E.J, Tate R, Ferraioli S & Iaccarino M. (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *Int RevCytol*, 234: 201 – 62.

- **Sangeeta P., Bhandappa, JyotiKumarThakur C-A., Khan M.A. (2014).** Effect of Salt on Growth and Plant Growth Promoting Activities of *Azotobacter chroococcum* isolated from Saline Soils. *Environment&Ecology*, 32 (4) : 1255-1259.
- **Perez, E., Sulbarán M., Ball M.M. & Yarzabal L.A. (2007).** Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2905-2914.
- **Perry J.J., Staley J.T & Lory S. (2004).** *Microbiologie*. Edition Dunod, Paris.
- **Pinky P. (2012).** In vitro Cellulose Rich Organic Material Degradation by Cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768). *Mal. J. Microbiol*, 8(3) : 164-169
- **Predeepa R.J. & Ravindran D.A. (2010).** Nodule formation, distribution and symbiotic efficacy of *Vigna unguiculata* L. Under different soil salinity regimes, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22: 275-284.

Q

- **Quezel P & Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome I, 462-541.

R

- **Rai A. (2017).** Effet du stress salin sur les bactéries du sol : rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. p 16.
- **R'him T., Tlili I, Hnan I., Ilahy R, Benali A. & Jebari H. (2013).** Effet du stress salin sur le comportement physiologique et métabolique de trois variétés de piment (*Capsicum annum* l.). *J. Appl. Biosci*, 66: 5060-5069.
- **Robledo M, Jiménez-Zurdo J.I, Velázquez E, Trujillo M.E, Zurdo-Pineiro J.L, Ramirez-Bahena M.H, Ramos B, Diaz-Minguez J.M, Dazzo F., Martínez-Molina E., & Mateos P.F. (2008).** *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc. Natl. Acad.USA*, 105: 7064-7069.
- **ROCHA HGS., CASTRO H S., FREITAS JRB. (2019).** Resposta de feijão-caupi à inoculação comestirpe de rizóbio. *Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias*, 4(2) : 123-134.

S

- **Saadallah K., Drevon J-J. & Abdelly C. (2001).** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie*, 21: 627-634.

- **Sadeghi A., Karimi E. & Dahaji, PA. (2012).** Activité favorisant la croissance des plantes d'un isolat producteur d'auxine et de sidérophores de *Streptomyces* dans des conditions de sol salin. *Monde J Microbiol Biotechnol*, 28 : 1503-1509.
- **Saharan B. S. & Nehra, V. (2011).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sci. Med. Res*, 21: 1-30.
- **Salmi A, Boulila F, Bourebaba Y, Le Roux Ch, Belhadi D, Lajudie P. (2018).** Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Calicotome spinosa* in the Northeast of Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(5) : 452-459.
- **Schwyn B. & Neilands JB. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Biochimie analytique*, 160 (1) : 47-56.
- **Shimoda Y., Luhan, Yannazak T., Suzuki R, Hayashi M. & Imaizumi-Anraki H. (2012).** Rhizobial and Fungal Symbiosis Show Different Requirement for Calmodulin Binding to Calcium Calmodulin-Dependent Protein Kinase in *Lotus japonicus*. *The plant cell*. 24:304.
- **Shrivastava P. & Kumar R. (2015).** Soilsalinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2) : 123–131.
- **Sierra J. & Tournebize R. (2019).** Fixation symbiotique d'azote par les légumineuses en association. Résultats obtenus en Guadeloupe. (hal-02373208), p 12.
- **Smith D.L, Gravel V & Yergeau E. (2017).** Editorial: signaling in the phytomicrobiome. *Front. Plant*, 8:611.
- **Snaiki J., Nadif A. & Ouhssine M. (2006).** Détection biochimique d'Erwinia carotovora sub sp. carotovora de tubercules de betterave sucrière atteints de pourriture molle. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 145:53-60.
- **Soares, M.M. et al. Estresse hídrico e. (2015).** Estresse hídrico e salino em sementes de soja classificadas em diferentes tamanhos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, 45(4): 370-378.
- **Sparvoli F., Bollini R. & Cominelli E. (2015).** Nutritional Value. *In* : Springer Science + Business Media , Grain Legumes, Handbook of Plant Breeding 10, New York, 191-325.
- **Sunita K., Srivastava M., Abbasi P. & Muruganandam M. (2019).** Impact de la salinité sur la croissance et la fixation de N₂ chez *Melilotus indicus*. *The Journal of Plant Science Research* , 35(1) : 109-119.

T

- **Tahri M. (2018).** Recherche de paramètres liés à la tolérance au sel chez l'haricot (*Phaseolus vulgaris* L). Thèse de doctorat, Université de Mostaganem, Algérie. p16.

- **Tarek H. & Amrani S. (2021).** « Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches bactériennes nodulant *Acacia ehrenbergiana* ». Institut National de Recherche Forestière. Laboratoire de Biologie du Sol, USTHB Bab-Ezzouar, Alger. 11(1) : 42-52.
- **Teggar N. (2015).** « Etude de l'effet du stress salin sur la nodulation et sur quelques paramètres biochimique et morphologiques de lentille », Mémoire de magister, en Biologie Végétal, Université d'Oran. P 13-25.
- **Tewari S. & Sharma S. (2020).** " Rhizobial exopolysaccharides as supplement for enhancing nodulation and growth attributes of *Cajanus cajan* under multi-stress conditions: A study from lab to field". Soil and Tillage Research, p198.
- **Timzit & Semmane (2011).** « Effet du NaCl sur la symbiose Rhizobium-légumineuse ». Mémoire master. Université Abderrahmane MIRA de Bejaia.

V

- **Venkat Kumar S., Menon S., Agarwal H. & Gopalakrishnan D. (2017).** Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. Resource-Efficient Technologies, 3(4) : 434-439.

Y

- **Yahara T., Javadi F., Onoda Y., de Queiroz L.P, Faith DP, Prado DE., Akasaka M., Kadoya T., Ishihama F. & Davies S. (2013).** Global legume diversity assessment : Concepts, key indicators, and strategies, 62 : 249–266.
- **Yang S., Tang F., Gao M., Koishnam H.B, Zhu H. (2010).** R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. PNAS, 107. 18735.
- **Yaw Boakeye E., Dotse Lawson I.Y, Akyea Danso S.K & Kwame offei S. (2016).** Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. Symbiosis, p 69-89.

Z

- **Zahir Z.A., Shah M.K., Naveed M. & Akhter M.J. (2010).** La production d'auxine dépendante du substrat par *Rhizobium phaseoli* améliore la croissance et le rendement de *Vigna radiata* L. dans des conditions de stress salin. J. Microbiol. Biotechnologies, 20 :1288-1294
- **Zaidi F. & Kared Y. (2017).** Isolement et caractérisation des endosymbiotes de *Medicago polymorpha*. Mémoire fin de cycle Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. P 40.
- **Zakaria B. (2019).** Caractérisation phénotypique et génotypique des germoplasmes de blé (*Triticum aestivum* L) vis-à-vis de la salinité. Mémoire du Master Protection des Plantes et Biotechnologie. Université Moulay Ismail Meknès Maroc. p 92.

- **Zhao J., Zhao X., Wang J., Gong Q., Zhang X. & Zhang G. (2020).** Isolement, identification et caractérisation de la bactérie endophyte *Rhizobium oryzihabitans* sp. nov., de la racine de riz à potentiel biotechnologique en agriculture. *Micro-organismes*, 8(4):608.
- **Zloch, M., Thiem, D., Gadzala-Kopciuch, R., and Hryniewicz, K. (2016).** Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to Cd 2+. *Chemosphere* 33156 : 312–325.

Annexe

Annexe 1 : Milieu de culture

Milieu YMA (Yeats mannitol agar) (g/l)

Mannitol	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
Na cl	0.1g
Agar Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Milieu YMB (Yeats mannitol broth) (g/l)

Mannitol	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
Na cl	0.1g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Milieu Pikovskaya solide (g/l)

Glucose	10g
Extrait de levure	3g
NaCl	0,2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,41g
NH ₄ NO ₃	0,373g
FeCl ₃	0,003g
Agar	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 7

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Bouillon nitraté (g/l)

21g de poudre dans 1000ml d'eau distillée
pH= 7
Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Milieu à base de CA-S (chrome azurol S)

A. Solution du colorant bleu :

Solution 1 :Dissoudre 0,06 g de CA-S dans 50 ml de l'eau distillée.

Solution 2 : Dissoudre 0,0027 g de Fe Cl₃ -6 H₂O dans 10 ml d'HCl à 10 mM.

Solution 3 : Dissoudre 0,073 g de HDTMA dans 40 ml de l'eau distillée.

Mélanger la solution 1 avec 9 ml de solution 2. Puis mélanger avec la solution 3. Stériliser le mélange à l'autoclave à 120°C pendant 20minutes (il doit être de couleur bleu-violet).

B. Solution du mélange :

- Solution saline de milieu minimal 9 (MM9) : Dissoudre 15 g de KH₂PO₄ ; 25 g de NaCl et 50 g de NH₄ Cl dans 500 ml d'H₂O
- Solution de glucose 20% :Dissoudre 20 g de glucose dans 100 ml d'H₂O.
- Solution de Casamino acide : Dissoudre 3 g d'acide Casamino dans 27 ml d'H₂O.
- Solution de NaOH : Dissoudre 25 g de NaOH dans 150 ml d'H₂O ; Le pH ~12.

C. Préparation de la gélose CAS :

- Ajouter 100 ml de solution saline MM9 à 750 ml de l'eau distillée.
 - Amener le pH à 6 et ajouter lentement 32,24 g de pipes (acide 2-éthanesulfonique), en remuant. Le pH diminuera au fur et à mesure que les pipes se dissolvent. Tout en remuant, portez lentement le pH à 6,8 avec la solution du NaOH.
 - Ajouter 18 g d'agar.
 - Stériliser le mélange a l'autoclave à 120°C pendant 20minutes.
- Sous la hotte à flux laminaire :**
- Ajouter 30 ml de solution d'acide Casamino et 10 ml de solution de glucose par filtration (0.22µm) au mélange stérile (MM9/PIPES).
 - Ajouter lentement 100 ml de solution de colorant bleu stérile le long de la paroi en verre en agitant suffisamment pour bien mélanger. La couleur du milieu devienne bleu-vert
 - Verser le milieu dans les boites de pétrie.

Milieu Jensen (pour plantes)

• **Solution minérale stock (10X)**

CaHPO ₄	10 g
K ₂ HPO ₄	02g
MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	05 g
NaCl.....	02g

pH= 7,0

• **Solution FeCl₂ (10X)**

FeCl ₂	0.1g.
H ₂ O.....	100 ml

• **Solution d'oligo-éléments (10X)**

CuSO ₄	0.16g
ZnSO ₄	0.4g
MnSO ₄	3.6g
Na ₂ MoO ₄ ,2.....	0.5g
H ₃ BO ₃	0.004g
H ₂ O	200 ml

• **Dilution (1X)**

Solution minérale stock (10X)	100 ml
Solution FeCl ₂ (10X)	0.3 ml
Solution d'oligo-éléments (10X)	0.1 ml
H ₂ O	900 ml

Diluer encore dans 2500 ml d'H₂O

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Eau physiologique (g/l)

NaCl	9g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 7

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Annexe 2 : Réactifs et colorants

Solution du rouge Congo

Poudre de rouge Congo	0.1 g
Eau distillée	100 ml

Solution d'NaCl (1M)

NaCl	5.84 g
Eau distillée	100 ml

Solution d'acétate de cuivre

Acétate de cuivre	10 g
Eau distillée	100 ml

Solution de chlorure de mercure

HgCl ₂	15g
HCl concentré	20 ml
Eau distillée	100 ml

Réactif de Salkowski

FeCl ₃	7.5 ml (1.35g/10ml d'eau)
H ₂ SO ₄	150 ml
Eau distillée	250 ml

Annexe 3 : Coloration de Gram

- Préparation et séchage du frottis par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
 - Coloration par violet de gentiane pendant 1 minute, rinçage à l'eau distillée.
 - Fixation par lugol pendant 30 secondes, rinçage à l'eau distillée.
 - Décoloration rapide à l'alcool.
 - Recoloration à la fuchsine pendant 30 secondes.
 - Lavage léger à l'eau distillée et séchage de la lame.
- Observation sous microscope optique au grossissement X100 après avoir déposé une goutte d'huile à immersion sur le frottis.

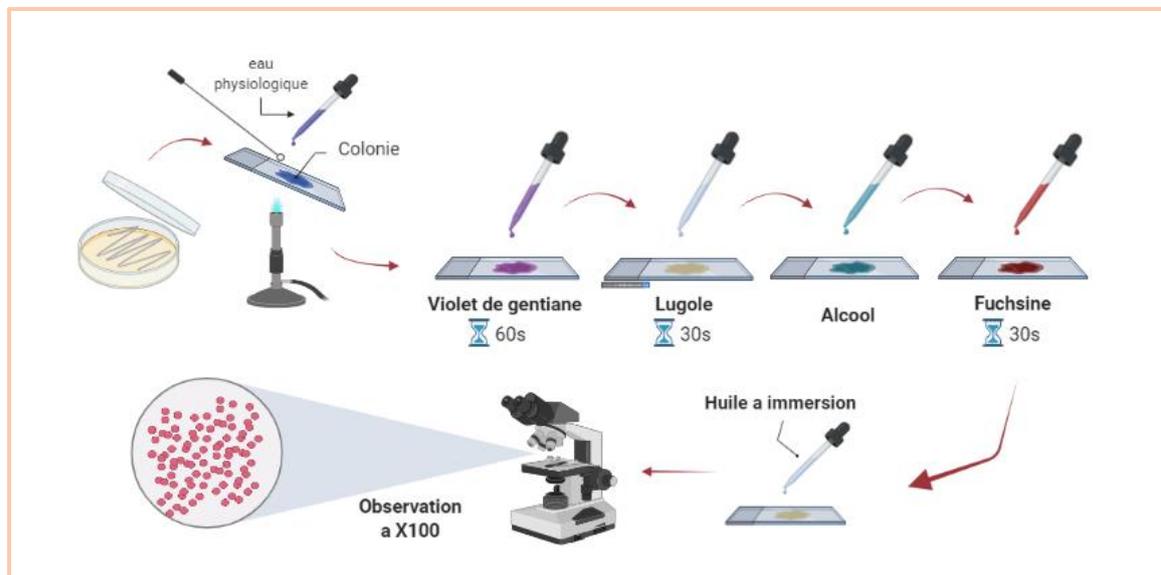


Figure 42 : coloration de gram

Annexe 4

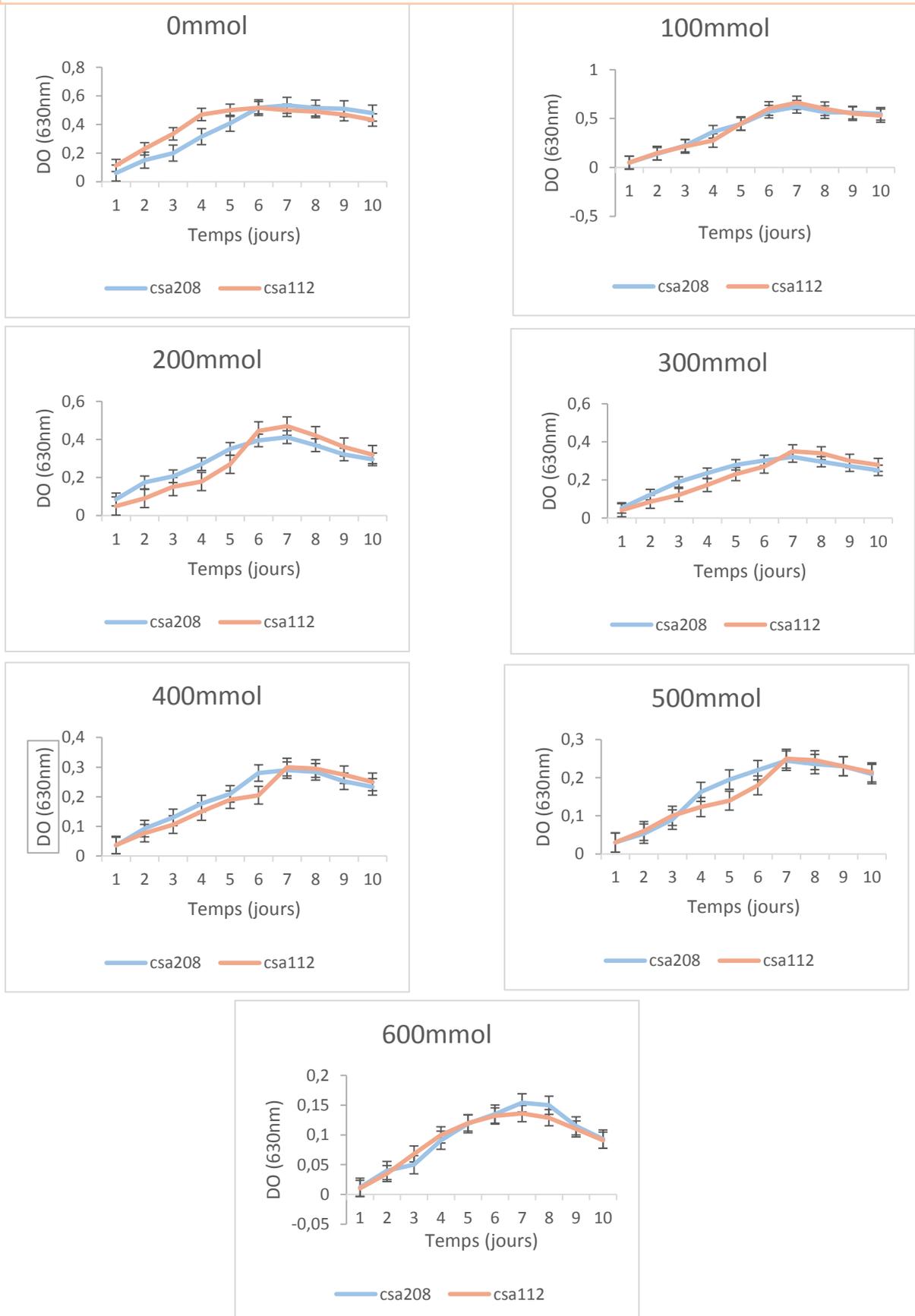
Tableau 8 : résultat de l'effet du NaCl sur la croissance des souches (moyenne des DO (630nm))

Csa208										
NaCl (mMol)	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
0mM	0,06	0,15	0,2	0,315	0,409	0,518	0,534	0,516	0,51	0,48
100mM	0,05	0,14	0,223	0,364	0,445	0,57	0,619	0,565	0,56	0,549
200mM	0,085	0,174	0,206	0,27	0,35	0,395	0,412	0,37	0,321	0,296
300mM	0,052	0,122	0,189	0,235	0,279	0,302	0,32	0,295	0,272	0,25
400mM	0,035	0,093	0,13	0,177	0,21	0,28	0,29	0,284	0,252	0,233
500mM	0,03	0,053	0,09	0,163	0,195	0,22	0,245	0,236	0,23	0,21
600mM	0,012	0,04	0,05	0,091	0,119	0,135	0,154	0,15	0,115	0,093

Csa112										
NaCl (mMol)	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
0mM	0,113	0,23	0,335	0,47	0,5	0,518	0,5	0,49	0,469	0,432
100mM	0,049	0,147	0,215	0,276	0,45	0,602	0,661	0,6	0,55	0,53
200mM	0,05	0,09	0,152	0,179	0,27	0,445	0,47	0,42	0,36	0,32
300mM	0,04	0,085	0,12	0,173	0,23	0,27	0,35	0,34	0,3	0,278
400mM	0,037	0,077	0,106	0,15	0,19	0,205	0,3	0,295	0,274	0,25
500mM	0,03	0,06	0,1	0,123	0,14	0,18	0,25	0,246	0,23	0,214
600mM	0,01	0,035	0,068	0,1	0,12	0,132	0,136	0,129	0,11	0,091

Annexe 5

Figure 43 : courbes de croissances des souches sous stress salin (moyenne des DO (630nm))



Annexe 6 : courbe d'étalonnage d'AIA

Figure 44 : Différentes concentrations de l'AIA



Figure 45 : Courbe d'étalonnage de l'AIA

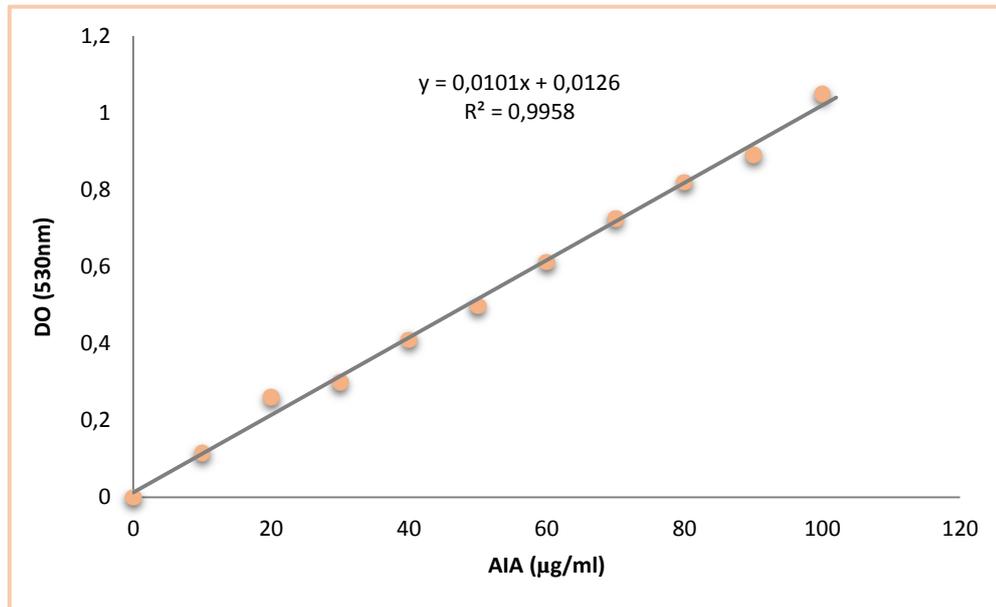


Tableau 9 : résultat de l'effet du NaCl sur la production de l'AIA (moyenne des DO (630nm))

Souche \ NaCl (mMol)		NaCl (mMol)							
		0	100	200	300	400	500	600	
Csa208	DO (530nm)	0,16	0,18	0,13	0,055	0,045	0,03	0,018	
	AIA (µg/ml)	14.594	16.574	11.624	4.198	3.208	1.723	0.535	

Souche \ NaCl (mMol)		NaCl (mMol)							
		0	100	200	300	400	500	600	
Csa112	DO (530nm)	0,255	0,553	0,447	0,275	0,103	0,097	0,027	
	AIA (µg/ml)	24,297	53,505	43,01	25,98	8,95	8,356	1,426	

Annexe 7

Tableau 10 : taux de germination de graines de *L.albus* non inoculées, sous stress salin

Germination /20 graines	0mMol	100mMol	200mMol	300mMol	400mMol
Jour (1)	15/20	11/20	4/20	0/20	0/20
Jour (2)	18/20	17/20	12/20	4/20	0/20
Jour (3)	20/20	19/20	18/20	9/20	3/20
Jour (4)	20/20	20/20	19/20	11/20	6/20

Tableau 11 : taux de germination de graines de *L.albus* inoculées avec la souche csa112, sous stress salin

Csa112	0mMol	100mMol	200mMol	300mMol	400mMol
Jour (1)	6/20	6/20	0/20	0/20	0/20
Jour (2)	6/20	6/20	5/20	0/20	0/20
Jour (3)	10/20	9/20	9/20	3/20	0/20
Jour (4)	20/20	14/20	12/20	6/20	3/20

Tableau 12 : taux de germination de graines de *L.albus* inoculées avec la souche csa208, sous stress salin

Csa208	0mMol	100mMol	200mMol	300mMol	400mMol
Jour (1)	10/20	3/20	0/20	0/20	0/20
Jour (2)	12/20	10/20	3/20	3/20	0/20
Jour (3)	16/20	13/20	10/20	10/20	3/20
Jour (4)	20/20	16/20	13/20	13/20	6/20

Annexe 8

Tableau 13 : les valeurs moyennes des longueurs de la partie aérienne de *L.albus* (inoculé ou non inoculé) cultivée sous stress salin

Longueur (cm)	0mMol	100mMol	200mMol	300mMol	400mMol
csa112	32,5	28,2	22	17,5	12
csa208	30	23,4	22,5	16,6	13,2
Ca(NO3)2	33	25,5	22	18	14,5
Témoins	20	17,4	12	/	/

Tableau 14 : les valeurs moyennes des longueurs de la partie racinaire de *L.albus* (inoculé ou non inoculé) cultivée sous stress salin

Longueur (cm)	0mMol	100mMol	200mMol	300mMol	400mMol
csa112	13	10	7	5	4
csa208	8	7	5	4,5	3,5
Ca(NO3)2	8,5	7,5	7	6,8	5,5
Témoins	6	5	3,5	/	/

Tableau 15 : les valeurs moyennes des pois frais de *L.albus* (inoculé ou non inoculé) cultivée sous stress salin

Poids (g)	0mMol	100mMol	200mMol	300mMol	400mMol
csa112	6,20	3,70	2,50	1,73	0,93
csa208	2,85	2,50	1,77	1,27	0,98
Ca(NO3)2	3,60	3,25	2,27	2,02	1,17
Témoins	1,50	1,00	0,80	/	/

Tableau 16 : les valeurs moyennes des pois secs de *L.albus* (inoculé ou non inoculé) cultivée sous stress salin

Poids (g)	0mMol	100mMol	200mMol	300mMol	400mMol
csa112	0,76	0,55	0,32	0,26	0,14
csa208	0,35	0,32	0,29	0,23	0,20
Ca(NO3)2	0,45	0,36	0,28	0,27	0,13
Témoïn	0,21	0,18	0,12	/	/

Résumé

Dans cette étude l'effet de la contrainte saline (NaCl) sur deux souches *Bradyrhizobium* csa112 et csa208 a été déterminé en plus de leur capacité de production des activités promotrice de croissance de plantes sous stress salin. Les résultats ont montré que les souches présentent une bonne résistance à la salinité avec des concentrations minimales inhibitrices de 900mM et 700mM pour csa112 et csa208 respectivement, l'analyse enzymatique a identifié 4 activités chez csa112 et 2 chez csa208. Le stress salin a réduit la production d'acide indole acétique et de sidérophores chez les deux souches et a ralenti leur croissance.

L'effet de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuse a aussi été étudié, des graines de *Lupinus albus* ont été mises en germination puis en culture hydroponique sous conditions de salinité (NaCl) et inoculé séparément par les deux souches étudiées. Les résultats ont montré que les contractions en NaCl affectent le développement et la nodulation de la plante. L'inoculation avec les souches étudiées a augmenté la résistance de la plante à la salinité.

Mot clés : Salinité, NaCl, *Bradyrhizobium*, PGPR, légumineuse, *Lupinus albus*.

Abstract

In this study, the effect of salt stress (NaCl) on two *Bradyrhizobium* strains csa112 and csa208 was determined in addition to their capacity to produce Plant Growth Promoting activities under salt stress. The results showed that the strains have resistance to salinity with minimum inhibitory concentration of 900mM and 700mM for csa112 and csa208 respectively, enzymatic analysis identified 4 activities in csa112 and 2 in csa208. Salt stress reduced the production of AIA and siderophores in both strains and slowed their growth.

The effect of salinity on the rhizobia-legume symbiosis was also studied, seeds of *Lupinus albus* were germinated then cultured in hydroponics under salinity conditions (NaCl) and inoculated separately with the two studied strains. The results showed that the NaCl contractions affect the development and nodulation in the germination of the plant. Inoculation with the strains increased the resistance of the plant to salinity.

Keywords : Salinity, NaCl, *Bradyrhizobium*, PGPR, legume, *Lupinus albus*