

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun–Tiaret  
Faculté des Sciences de la nature et de la vie  
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Génétique moléculaire et amélioration des plantes  
Présenté par :

Fendi Imene

Mohamedi Karima

Saadani Hanane

Thème

**Amélioration de la tolérance des plantes de blé dur au stress salin  
par l'apport de microbiote racinaire PGPR isolée des écosystèmes  
steppiques**

Soutenu publiquement le : 04 /06/2019

Jury :

Président : M.Lahouel N  
Encadreur : M.Boufares Kh  
Examinatrice : M<sup>me</sup> Chahbar S

Année universitaire 2018 / 2019

## **Remerciements**

Avant tout, nous remercions Allah, pour la volonté et la patience qu'il nous a attribuées, pour la force et la foi d'être arrivés à ce stade-là.....notre gratitude à Allah

Nous remercions tout particulièrement notre encadreur, M. BOUFARES KH, pour nous avoir encadrées en dépit de ses multiples préoccupations, il a su consacrer un temps précieux au suivi de notre travail et à la correction de ce manuscrit. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance pour sa disponibilité, ses conseils, ses critiques, sa rigueur et ses encouragements.

Nous sommes très reconnaissantes et nous adressons toute notre gratitude à M<sup>me</sup>Chahbar S, pour nous avoir fait l'honneur d'avoir bien voulu examiner ce mémoire de fin d'études.

Nos remerciements s'adressent également au M. Lahouel N qui a suivi ce travail et accepté la présidence du jury.

Nos sincères remerciements s'adressent également à l'ensemble de nos enseignants depuis les années primaires jusqu'à l'université et à l'équipe des laboratoires de notre université Ibn Khaldoun –Tiaret-

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre travail et à notre réussite.

## **Dédicace**

Avec l'aide d'Allah le tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail

Que je dédie

A

Mes chers parents qui me donnent la volonté et l'espoir durant toute ma vie

A

Mes deux frères, Benyamina et Abd samad

A

Tous les membres de ma belle famille qui me soutient et me donne la joie

A

Mes chères et belles amies et à toute personne chère à mon cœur

*Karima*

## Dédicace

À ceux qui m'ont indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait

À

mon Père et ma mère

Sachez que je vous aime profondément et que je vous suis très reconnaissant pour votre patience, vos efforts, vos conseils et toutes les souffrances que vous avez endurées. Soyez infiniment remerciés et que Dieu vous accorde une longue et heureuse vie.

Mes frères Abd El Rahmane et Mohamed Amine et ma sœur Fatima Zahra

Le reste de la famille : je vous remercie tous pour votre soutien durant toutes mes années d'études.

À

mes très chères amies je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande affection et en souvenir des agréables moments passés ensemble.

À

tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis citer

*Imane*

## Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A

*À ceux qui ont attendu avec patience les fruits de leur bonne éducation,*

A mes chers parents sur qui j'ai pu compter

Et me ressourcer d'affection et bénédictions durant toute ma vie

A

Mes frères, Djilali, Abdelkader et Baghedad

A

Mes sœurs, Fatima et Khadija

A

Tous les membres de ma famille

A

Toutes mes amies

*Hanane*

## Résumé

Dans cette étude des souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de plantes steppique, identifiées sur la base des caractéristiques, morphologiques et biochimiques ont été utilisées pour évaluer leur capacité à promouvoir la croissance et la tolérance des plantules de blé dur (*Triticum durum* Desf.) au stress salin appliqué à trois concentrations 100, 200 et 300 mM. Les résultats du test de préidentification des rhizobactéries nous ont permis d'estimer que ces microbiote racinaire appartiennent à deux familles de bactérie, *Pseudomonas* et *Bacillus*. La réponse des plantules du blé dur au stress salin est variable en fonction de l'intensité du stress et inoculation. En effet, la plupart des graines étudiées sont fortement affectées et leurs taux de germination comparativement aux témoins respectifs ne dépassent pas les 60 %. Cependant, les graines inoculées montrent une plus grande tolérance au sel et particulièrement les graines bactérisées avec les souches A2 et A4. En ce qui concerne le comportement morpho-physiologique et biochimique, les résultats montrent que la plupart des plantules subissent une diminution de leur teneur de chlorophylle totale, et une augmentation de la teneur en acides aminés (proline, glycine bêtaïne) à l'exception des graines inoculées avec les souches A4, A2 et A'5 qui ont pu maintenir des teneurs légèrement proches aux témoins. Les bactéries utilisées représenteraient ainsi un partenaire valable dans l'agriculture biologique par ses propriétés biostimulantes et bioprotectrices.

**Mots-clés :** Rhizobactéries, Stress salin, Blé dur (*Triticum durum* Desf.), Proline, Glycine bêtaïne, Phytostimulation, Microbiote racinaire.

## Abstract

In this study of bacterial strains isolated from the rhizosphere of steppe plants, identified on the basis of characteristics, morphological and biochemical were used to evaluate their ability to promote the growth and tolerance of durum wheat seedlings (*Triticum durum* Desf. ) salt stress applied at three concentrations of 100, 200 and 300 mM. The results of the pre-identification test of rhizobacteria allowed us to estimate that these root microbiota belong to two families of bacteria, *Pseudomonas* and *Bacillus*. The response of barley seedlings to salt stress is variable depending on the intensity of stress and inoculations. In fact, most of the seeds studied are strongly affected and their germination rates compared to the respective controls do not exceed 60%. However, the inoculated seeds show a greater tolerance to salt and particularly the bactericidal seeds with strains A2 and A4. With respect to morphophysiological and biochemical behavior, the results show that most seedlings undergo a decrease in their total chlorophyll content, and an increase in the amino acid content (proline, glycine betaine) with the exception of seeds inoculated with strains A4, A2 and A'5 which were able to maintain levels slightly close to the controls. The bacteria used would thus represent a valid partner in organic farming by its biostimulant and bioprotective properties.

**Keywords :** Rhizobacteria, Saline Stress, Hard Wheat (*Triticum durum* Desf.), Proline, Glycine Betaine, Phytostimulation, Root Microbiota.

## المخلص

في هذه الدراسة قمنا بعزل سلالات بكتيرية من جذور نباتات سهبية. و قد تمت دراسة خصائصها البنيوية و الكيميائية الحيوية. استعملت هذه البكتيريا لتقييم قدرتها على تعزيز نمو و مقاومة القمح الصلب للإجهاد الملحي المطبق بثلاثة تركيزات 100. 200 و 300 ميلي مول . اختبارات التحديد المسبق لنوع البكتيريا أظهرت أنها تنتمي إلى عائلتي « *Pseudomonas* » و « *Bacillus* ». استجابة نباتات القمح الصلب للإجهاد الملحي كانت متغيرة على حسب شدة الإجهاد و التلقيح بالبكتيريا، غالبية البذور المدروسة تأثرت بشدة و لم تتجاوز معدلات إنباتها 60% مقارنة بالشواهد ذات الصلة. البذور المعاملة بالبكتيريا أظهرت مقاومة كبرى للملح خاصة البذور المعاملة بالسلالات البكتيرية A2 و A4 . نتائج الدراسة المورفوفيزيولوجية و الكيميائية الحيوية أظهرت أن النباتات خضعت لتناقص في مستويات الكلوروفيل و تزايد في مستويات الأحماض الامينية ( برولين و جليسين بيتاين) ماعدا البذور المعاملة بالبكتيريا A2, A4, A'5 التي أعطت نتائج قريبة للشاهد . هذه البكتيريا المستعملة قد تمثل عامل صالح في الزراعة البيولوجية بفضل خصائصها الحيوية المنشطة و الحامية .

**كلمات البحث :** بكتيريا الجذور, الإجهاد الملحي, القمح الصلب, برولين, جليسين بيتاين, التسميد الحيوي, التحفيز الحيوي .

## Table des matières

Introduction .....	1
<b>Chapitre 01 : Partie bibliographique.....</b>	<b>3</b>
1 Généralité sur le blé dur .....	3
1.1. Classification taxonomique .....	3
1.2. La culture de blé dur.....	4
1.3. Problème de production.....	4
1.3.1 Problèmes climatiques .....	4
1.3.2 Problèmes agronomiques .....	4
1.4. Solution pour améliorer la production de blé dur.....	4
2 La relation intime « sol–système racinaire ».....	6
2.1. Réseau trophique dans le sol .....	6
2.2. Généralités sur la rhizosphère .....	7
2.2.1 Rhizobactéries stimulatrices de la croissance végétale .....	8
2.3. Interactions PGPR - plante .....	9
2.3.1 Promotion de la croissance de l’hôte .....	10
2.3.2 Renforcement de la capacité défensive de l’hôte.....	10
2.4. Potentiel biotechnologique .....	10
3 Généralité sur le stress.....	11
3.1. Différents types de stress.....	11
3.1.1 Stress biotique.....	11
3.1.2 Stress abiotique.....	11
3.1.2.1. Stress hydrique.....	11
3.1.2.2. Stress thermique.....	11
3.1.2.3. Stress salin .....	11
3.2. Effets du stress salin sur la plante .....	12
3.3. Mécanismes d'adaptation aux stress .....	13

3.3.1	La proline.....	13
3.3.2	La glycine bêtaïne.....	13
<b>Chapitre 02 : Matériel et méthodes</b>	.....	<b>16</b>
4	Objectif de l'étude.....	16
5	Développement méthodologique.....	17
5.1.	Matériel biologique.....	17
5.2.	Prélèvement des échantillons.....	18
5.2.1	Procédures d'isolement et purification des souches.....	18
5.3.	Caractérisation phénotypiques et fonctionnelle des isolats.....	20
5.3.1	Caractères morphologiques.....	20
5.3.2	Caractères microscopiques.....	20
5.3.2.1.	Coloration différentielle de Gram.....	20
5.3.3	Caractères biochimiques.....	21
5.4.	Germination des graines.....	23
5.5.	Effets in vivo des isolats sur la croissance du blé.....	24
6	Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpho-biochimiques du blé en milieu salin.....	26
6.1.	Effets de l'inoculation sur le taux de germination en milieu salin.....	26
6.2.	Paramètres morphologiques.....	26
6.2.1	Longueur moyenne des racines.....	26
6.3.	Paramètres biochimiques.....	27
6.3.1	Dosage de la chlorophylle totale.....	27
6.3.2	Dosage de la proline.....	27
6.3.3	Dosage de la glycine bêtaïne.....	28
<b>Chapitre 03 : Résultats et discussion</b>	.....	<b>31</b>
6.4.	Identification des souches bactériennes.....	31
7	Analyse de l'effets de l'inoculation sur les paramètres morpho- biochimiques.....	33
7.1.	Effets de l'inoculation sur le taux de germination en milieu salin.....	33
7.2.	Effets de l'inoculation sur la longueur des racines en milieu salin.....	35

7.3. Paramètres biochimiques.....	36
7.3.1 Teneur en chlorophylle .....	36
7.3.2 Teneur en proline .....	37
7.3.3 Teneur en glycine bétaine .....	39
Conclusion.....	40
Listes des Annexes .....	41
Références bibliographiques .....	42

## Liste des abréviations

<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>AF</b>	Analyse factorielle
<b>CFU</b>	Colony forming units
<b>Chl</b>	Chlorophylle
<b>Desf.</b>	Desfontaines (botaniste)
<b>DO</b>	Densité optique
<b>EDS</b>	Eau distillée stérile
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations.
<b>GB</b>	Glycine Bétaïne
<b>ITGC</b>	Institut Technique des Grandes Cultures
<b>M</b>	Molaire
<b>MF</b>	Matière Fraîche
<b>mM</b>	Millimolaire
<b>N<sub>2</sub></b>	Diazote
<b>NH<sub>3</sub></b>	Aammoniac
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>OAIC</b>	Office algérien interprofessionnel des céréales
<b>PGP</b>	Plant growth promoting
<b>PGPR</b>	Plant growth promoting rhizobacteria
<b>rpm</b>	Rotation par minutes
<b>sp.</b>	Species singular (espèce).
<b>spp.</b>	Species plural (espèces).
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>var.</b>	Variété.

## Liste des tableaux

Tableau 1 : classification taxonomique du blé dur.....	3
Tableau 2 : Substances promotrices de la croissance émises par les PGPR. ....	9
Tableau 3 : Quantité de sels utilisés lors de la préparation des solutions salines.....	23
Tableau 4 : Résultats du test de préidentification des rhizobactéries.....	32

## Liste des figures

Figure 1: Protocole expérimental. ....	17
Figure 2 : Photographies des deux plantes .....	17
Figure 3 : Situation géographique de la zone de prélèvement.....	18
Figure 4 : Différentes étapes d'isolement des rhizobactéries.....	19
Figure 5 : Test de coloration différentielle de Gram. ....	21
Figure 6 : Caractérisation chimiques rhizobactéries. ....	22
Figure 7 : Dispositif d'évaluation de l'effet des souches rhizobactériennes sur la germination. ....	24
Figure 8 : Evaluation des effets combinés stress et bactéries sur la plante en pots sous serre.....	25
Figure 9: Mesure de la chlorophylle par chlorophylle-mètre.....	27
Figure 10 : Résultats du tests préliminaires d'identification des souches. ....	31
Figure 11 : Effet combiné du stress salin et de l'inoculation sur le taux de germination. ....	33
Figure 12 : Effet combiné du stress salin et de l'inoculation sur le taux de germination. ....	34
Figure 13 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la longueur des racines.....	35
Figure 14 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en chlorophylle totale. ....	36
Figure 15 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en proline.....	38
Figure 16 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en glycine bêtaïne.....	39

---

## Introduction

En Algérie, la culture des céréales occupe une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. La production des céréales, jachère comprise, occupe environ 80% de la superficie agricole utile du pays. La superficie emblavée annuellement en céréales se situe entre 3 et 3,5 millions d'ha. Les superficies annuellement récoltées représentent 63% des emblavures (Djermoun, 2009). Aussi, les importations des céréales représentent 43% des valeurs globales des importations du pays et le blé dur représente la majorité des importations (Smadhi & Zella, 2009). L'agriculture algérienne est structurellement inapte à satisfaire une demande de blé de plus en plus importante, ce qui a classé l'Algérie en 2008 au quatrième rang au monde des pays importateurs de blé, après l'Europe, le Brésil et l'Égypte (Benmati, 2014).

Les performances de rendement de la culture du blé dur (*Triticum durum* Desf.) sont limitées par l'action des facteurs environnementaux, la variation des rendements, d'une année à l'autre et d'un lieu à l'autre, a pour origine la sensibilité du matériel végétal, la céréaliculture est pratiquée essentiellement dans les zones semi-arides, dont l'évapotranspiration est intense ce qui favorise et crée des conditions propices à la salinisation des sols.

Cette salinisation est plus marquée dans ces régions arides du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient. Elle provient aussi de l'irrigation le plus souvent mal contrôlée (Bais, Park, Weir, Callaway, & Vivanco, 2004).

Cette salinisation conduit à l'appauvrissement des sols en matières organiques et à l'accumulation d'ions toxiques (Hamdy, 1999). Par conséquent, les terres agricoles productives sont détériorées ce qui limite la productivité des plantes (Cheverry, 1995).

La biotechnologie végétale a déjà apporté et elle apportera un certain nombre de réponses aux problèmes actuels de l'agriculture, et ce en développant de nouvelles techniques telles que le mécanisme symbiotique plante-microorganismes.

En agriculture, les micro-organismes ont longtemps été perçus exclusivement comme des agents pathogènes. Cette vision négative est désormais désuète et l'étude des communautés microbiennes associées aux plantes ont permis de mettre en évidence de nombreux micro-organismes d'intérêt agronomique (Ahemad & Kibret, 2013), ces micro-organismes ne sont pas des principes actifs ou des fertilisants au sens propre. Ce sont de véritables partenaires des cultures qui tissent avec elles des relations complexes allant bien au-delà de la fonction pour lesquels on les sélectionne. Accompagnée d'une vie microbienne diversifiée, une plante forme

à elle seule un véritable écosystème et l'on sait aujourd'hui que plus cet écosystème est complexe, plus il a de chance de résister aux aléas extérieurs (Bartels & Sunkar, 2005). Des recherches récentes ont prouvé que l'utilisation des microbiote racinaires exogènes comme inoculant constitue une alternative biologique soutenable pour la production végétale. Autrement dit, le végétal qui pousse selon le respect des grands cycles naturels, acquiert une résistance accrue aux différents types de stress (Benmati, 2014).

L'utilisation des microbiote racinaire exogène comme une approche biologique semble être la solution prometteuse afin d'améliorer la production de blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zones semi-arides, dont les sols sont de piètre qualité.

Dans ce cadre s'inscrit notre travail qui vise à évaluer l'impact de l'effet de l'inoculation par des rhizobactéries exogènes provenant des écosystèmes extrêmes à promouvoir la croissance et la tolérance des plantules blé dur au stress salin appliqué à différentes concentrations.

Le mémoire proposé s'articule autour des trois parties. Dans la première partie, nous proposons de présenter une synthèse bibliographique, au cours de la deuxième partie, sont présentés les matériels et méthodes utilisés pour la réalisation de cette étude. Enfin, la troisième partie et la dernière sera consacrée à la présentation des résultats obtenus et leurs discussions et une conclusion générale.

# *Chapitre 1*

## *Partie bibliographique*

## Chapitre 01 :Partie bibliographique

### 1 Généralité sur le blé dur

Le blé est l'une des premières espèces cueillies et cultivées par l'homme au proche Orient, il y a environ 10.000 à 15.000 ans avant J.C. Des restes de blé diploïde et tétraploïde ont été découverts sur des sites archéologiques au proche Orient d'après (HARLAN, 1975) et on croit que le blé dur provient des territoires de la Turquie, la Syrie, l'Iraq et l'Iran (Oudjani, 2009)

Parmi ces céréales, le blé occupe la première place pour la production mondiale et la deuxième après le riz, comme source de nourriture pour les populations humaines, il assure 15% de ses besoins énergétiques (Bajji, Lutts, & Kinet, 2001) Le blé est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen à climat arides et semi-arides là où l'agriculture est dans la plus mauvaise passe

Le blé dur est l'une des céréales les plus employées dans l'alimentation de l'homme et des animaux. La production de blé est présente sur les cinq continents, il est quasiment absent dans les zones équatoriales et tropicales, les grands bassins de productions se trouvent en Europe du sud-est de l'Angleterre jusqu'à l'Ukraine, au nord de l'Inde, les plaines du nord de Chine, les plaines d'Amérique du Nord, l'extrême sud de l'Afrique et l'Australie (Magdelaine, 2011).

#### 1.1. Classification taxonomique

Le blé appartient à la famille des graminées, et sa position taxonomique est présentée dans la classification suivante (Feillet, 2000) :

Tableau 1 : classification taxonomique du blé dur

Famille	Gramineae
Sous-famille	Festucoideae
Tribu	Triticeae
Sous-tribu	Triticineae
Genre	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum durum</i> sp.

## **1.2. La culture de blé dur**

Les blés cultivés en Algérie se rapportent à deux espèces principales : blé dur (*Triticum durum* Desf.), qui sert à la fabrication des semoules, du couscous et des pâtes alimentaires, et le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) dont le grain est utilisé pour la fabrication de la farine et du pain.

## **1.3. Problème de production**

L'agriculture algérienne est structurellement inapte à satisfaire une demande de blé de plus en plus importante, ce qui a classé l'Algérie en 2008 au quatrième rang au monde des pays importateurs de blé, après l'Europe, le Brésil et l'Égypte (FAO, 2012). La faiblesse relative des niveaux de rendement, trouve son explication dans deux raisons principales: l'une climatique et l'autre agronomique.

### **1.3.1 Problèmes climatiques**

L'Algérie présente un climat de type méditerranéen caractérisé par une longue période de sécheresse, et l'irrégularité pluviométrique (Température, la pluviométrie, le vent, l'humidité).

### **1.3.2 Problèmes agronomiques**

Les problèmes agronomiques sont essentiellement techniques rapportant à une mauvaise préparation du sol avec des outils inadaptés qui ont pour effet de diluer la matière organique et les éléments minéraux. Un autre problème qui est aussi important que le premier c'est la pauvreté du sol (Carence en azote N, en phosphore P et en potassium K), ce qui nécessite l'utilisation des engrais. Cette situation a obligé l'Algérie à se tourner vers les importations afin de combler la faible production (AMIROUCHE & DJAALEB, 2017).

## **1.4. Solution pour améliorer la production de blé dur**

La production de blé dur en Algérie ne parvient pas à satisfaire la demande des consommateurs en forte augmentation ce qui conduit à des importations régulières. (Benmati, 2014)

Il devient donc important de développer différentes méthodes biologiques par l'utilisation des organismes naturels pour améliorer les performances de blé en termes de rendements, de qualité boulangère et de valeur nutritionnelle. (Benmati, 2014)

Parmi les solutions utilisées, on trouve les souches bactériennes qui sont capables d'augmenter le rendement et d'améliorer la qualité des cultures. On les appelle « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou PGPR. Leurs caractères interviennent à plusieurs niveaux du développement végétal (au niveau racinaire et aérien). L'utilisation des PGPR en agriculture

peut permettre de stimuler la croissance des plantes et de contourner leurs pathogènes (Beauchamp, 1993). De plus, en formant des symbioses, les PGPR augmentent la capacité des plantes à se nourrir en développant leur système racinaire.

## 2 La relation intime « sol–système racinaire »

Le sol est le biomatériau le plus complexe de la planète (Young & Crawford, 2004). Il est le support de la vie terrestre et un réservoir de matières organiques et minérales, et représente un carrefour multifonctionnel, contrôleur et révélateur de nombreux processus écologiques. Il renferme un habitat à diversité très élevée, conditionnées par ses propriétés tels que : la texture, la structure, la micromorphologie, la porosité, le régime hydrique et la température. Avec son organisation systémique interne, le sol régule les échanges et les flux des écosystèmes et met en place des systèmes d'épuration et de transformation de matières (Gobat, Aragno, & Matthey, 2010).

Pour les végétaux, le sol joue le rôle d'un « berceau » où ils puisent les ressources indispensables à leur croissance et leur prospérité (Balesdent, Dambrine, & Fardeau, 2015). Il y a 2000 ans, Aristote croyait que les plantes ne se formaient qu'à partir des éléments du sol : quand une plante pousse, c'est la terre, en quelque sorte, qui se transforme en matière végétale. Son hypothèse a été réfutée par Vont Helmont puis par Hales et Theodore de Saussure qui ont démontré les rôles que jouent les facteurs essentiels comme ; l'eau et le gaz carbonique (Bourbonnais , 2010). Mais l'hypothèse d'Aristote reste proche de la réalité ; même si l'homme a appris à développer des plantes hors sol malgré l'organisation trophique double des végétaux : la partie aérienne renferme les organes autotrophes alors que la souterraine est entièrement hétérotrophes, il faut insister sur le fait que les associations « sol-plante » constituent le fondement de tous nos écosystèmes fonctionnels.

Ainsi, pour une plante, l'ensemble des constituants minéraux et organiques des sols, ainsi que les organismes morts et vivants qu'il recèle, permet, grâce à sa structure meuble et ses propriétés physiques, chimiques et biologiques, un développement normal des racines des végétaux.

### 2.1. Réseau trophique dans le sol

L'étude de ce réseau trophique au cours des dernières décennies a mis en évidence son rôle capital dans l'harmonie de la croissance biologique des plantes.

Le développement du réseau trophique des sols doit devenir pour les cultivateurs la première des priorités ; en effet, c'est de ce parfait développement que dépendent la stabilité des sols (dynamique de l'air et de l'eau), leur fertilité (rétention et mise à disposition des nutriments), leur état sanitaire (suppression des ravageurs et des maladies par équilibrage des colonies), la croissance saine des plantes (par production d'antibiotique ou induction d'électeurs stimulant

la résistance aux pathogènes) et la saveur des végétaux par une meilleure alimentation des plantes en oligoéléments (notion de terroir).

Disséquer et expliquer le fonctionnement de chaque organisme est le rôle des scientifiques et des chercheurs.

Le chef d'orchestre – l'agriculteur –, dans l'exercice de son métier, se contente de faire en sorte que chacun joue sa partition.

## **2.2. Généralités sur la rhizosphère**

La rhizosphère telle qu'elle a été définie par (Hiltner, 1904), est le volume du sol qui entoure les racines et dans lequel la microfaune est influencée par ces dernières. C'est un microécosystème abritant les microorganismes qui sont constitués principalement d'algues microscopiques, de protozoa, de champignons et de bactéries ; certains groupes sont phytopathogènes d'autres sont bénéfiques à la plante (Raaijmakers, 2009). Cette partie du sol est le siège des interactions mutuelles entre le sol, ses microorganismes et la plante. L'activité des microorganismes dans le sol est intense dans la rhizosphère, car, généralement, ils dépendent des substances libérées par les racines des plantes du fait que la plupart de ces microorganismes sont hétérotrophes au carbone et à l'azote (Scurkson, Johnson, & Olson, 2002). Ces substances, ou encore appelées exsudats racinaires (Hawes, 1998), représentent dans la rhizosphère la grande partie de la matière organique soluble dans l'eau (sucres, acides organiques, acides aminés) ou insoluble dans l'eau telle que les parois cellulaires et certains résidus du métabolisme. C'est une source importante de la nutrition des microorganismes qui colonisent la rhizosphère (Cheng, Coleman, Carroll, & Hoffman, 1994). D'autre part, les exsudats racinaires peuvent influencer les multiples interactions qui existent entre les microorganismes bénéfiques, ceux qui sont phytopathogènes et la plante en tant qu'une entité à part (Picard, Di Cello, Ventura, & Fani, 2000); (Hirsch, Bauer, Bird, Cullimore, Tyler, & Yoder, 2003).

Les différents processus vitaux des microorganismes du sol peuvent être des étapes très importantes dans les phénomènes d'assimilation par les plantes des macroéléments tels que l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K), ou les microéléments notamment le fer (Fe) et le zinc (Zn) (Darrah, 1993); (Bonkowski, Geoghegan, Birch, & Griffiths, 2001). En plus des relations trophiques, les microorganismes peuvent être impliqués dans la défense des plantes par la libération dans la rhizosphère de substances toxiques aux agents telluriques phytopathogènes (Bais, Park, Weir, Callaway, & Vivanco, 2004).

### **2.2.1 Rhizobactéries stimulatrice de la croissance végétale**

D'après (Kloepe, Lifshitz, & Zablutowicz, 1989) les rhizobactéries stimulatrices de la croissance végétale ou en anglais (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) sont des rhizobactéries bénéfiques pour les plantes. Elles doivent être compétitives aux autres communautés microbiennes rhizosphériques (Antoun & Prévost, 2005) Ce sont des rhizobactéries libres dans la rhizosphère dotée de potentialités bénéfiques très importantes pour l'agriculture (Babalola, 2010). Les PGPR offrent des applications intéressantes en agriculture comme la biofertilisation et la lutte biologique par les biopesticides ainsi que des applications en phytoremédiation et d'autres applications environnementales telles que l'amélioration du reboisement des sols stériles ou chimiquement pollués (Weyens, Van der Lelie, Taghavi, & Vangronsveld, 2009). Leurs effets positifs sur la plante se réalisent par des mécanismes d'actions directs ou indirects (Glick, 1995) ; (Somers, Vanderleyden, & Srinivasan, 2004) classent les PGPR selon leurs activités en biofertilisants (améliorent la disponibilité des nutriments aux plantes), phytostimulateurs (promotion de la croissance par la production des phytohormones), rhizoremédiateurs (dégradent les polluants organiques) et en biopesticides (biocontrôle des agents phytopathogènes).

Ces bactéries bénéfiques peuvent donc influencer l'acquisition des nutriments et aussi moduler les taux d'hormones et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques et abiotiques (Ahemad & Kibret, 2013) ; (Ngumbi & Kloepper, 2016)

De plus, les PGPR se trouvent dans des environnements hautement compétitifs. En conséquence, elles ont développé plusieurs moyens offensifs pour cette compétition intra et interspécifiques, comme : des substances antibiotiques, des enzymes bactériolytiques et des toxines de nature protéique communément connues sous le terme de bactériocines. Ces toxines sont capables de tuer les bactéries compétitives étroitement liées sans pour autant affecter la bactérie productrice (Mézaache, Haichour, Guechi, & Zerroug, 2016) (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012).

Tableau 2 : Substances promotrices de la croissance émises par les PGPR.

PGPR	Substance émise
<i>Pseudomonas sp. A3R3</i>	IAA, sidérophores
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Ralstonia metallidurans</i>	Sidérophores
<i>Enterobacter sp.</i>	ACC désaminase, IAA, sidérophore, solubilisation du phosphate
<i>Burkholderia</i>	ACC désaminase, IAA, sidérophore, solubilisation des métaux lourds, solubilisation du phosphate
<i>Azotobacter sp.</i> , <i>Mesorhizobium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>	IAA, sidérophore, activité antifongique, production d'ammoniac, HCN
<i>Rhizobium sp.</i>	IAA, sidérophores, HCN, ammoniac
<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>	Solubilisation du phosphate, IAA et sidérophores
<i>Pseudomonas putida</i>	Activité antifongique, sidérophore, HCN, solubilisation du phosphate
<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Flavobacterium</i>	IAA et sidérophores

Source : (munees & mulugeta, 2013)

### 2.3. Interactions PGPR - plante

Depuis que les eucaryotes sont apparus (à la suite d'endosymbioses efficaces), leur évolution est caractérisée par la diversité des relations symbiotiques établies entre les différents groupes et espèces. Il existe des exemples de symbioses dans tous les domaines du vivant et dans tous les milieux, il n'est donc pas possible de tous les énumérer et les décrire. Pour donner une petite idée de cette diversité, voici quelques exemples dont certains seront développés dans ce mémoire.

- Un lichen est une association symbiotique entre une algue unicellulaire ou une cyanobactérie et un champignon.
- Les mycorhizes sont le résultat de symbioses entre les racines d'une plante et des champignons mycorhiziens.
- Quelques espèces végétales, principalement des légumineuses, établissent des symbioses avec des rhizobactéries présentes dans le sol : les nodules racinaires fixateurs d'azote.

- *Acacia cornigera* et *Barteria* sont des arbres myrmécophytes : ils ne peuvent survivre qu'en association avec des fourmis.

### **2.3.1 Promotion de la croissance de l'hôte**

Certaines souches de PGPR des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodobacter*, *Azospirillum* ont récemment été décrites pour leur effet direct positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (légumes, pomme, citron, myrtille, mûre, abricot, framboise, betterave à sucre... (Suty, 2015). Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes-hôtes par divers mécanismes tels que la fixation d'azote ( $N_2$ ) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P) (Cakmakci, Donmez, Aydin, & Sahin, 2006), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante, la synthèse des phytohormones ou de vitamines (Dobbelaere & Okon, 2003) et en diminuant la toxicité des métaux lourds (Whipps, 2001)

### **2.3.2 Renforcement de la capacité défensive de l'hôte**

D'autre part, certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par la stimulation de mécanismes de défense inductibles dans la plante, ce qui peut rendre l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé « résistance systémique induite » (ISR, Induced Systemic Resistance) (Van Loon, PA, & CM., 1998)

## **2.4. Potentiel biotechnologique**

Utilisées comme outils pour améliorer la croissance des plantes, les PGPR ont plusieurs avantages pratiques : elles sont répandues sur les sept continents, ne sont pas limitées phylogénétiquement (au moins cinq phyla et 24 genres), et la plupart d'entre elles présentent une faible spécificité à l'hôte (Rubin, Groenigen, & Hangate, 2017).

Les PGPR sont classées en fonction de leurs activités fonctionnelles en :

- Biofertilisants : en augmentant la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère.
- Phytostimulants : par la promotion de la croissance des plantes généralement par les phytohormones.
- Agents de biocontrôle et de bioremédiation : en dégradant les polluants organiques et en luttant, contre les maladies, principalement par la production d'antibiotiques et de métabolites antifongiques (Antoun & Prévost, 2005)

### **3 Généralité sur le stress**

Ensemble des perturbations physiologiques et métaboliques ou pathologiques provoquées dans un organisme par des agents biotiques (parasite, pathogène) ou abiotiques (salinité, sécheresse, température, pollution). on parle aussi de stress en parlant d'un changement brutal d'environnement. (Marouf & Raynaud, 2007).

#### **3.1. Différents types de stress**

On peut distinguer deux types de stress dans la nature :

##### **3.1.1 Stress biotique**

Imposé par d'autres organismes (insectes, herbivores...), ils sont nombreux et ont pour origine les virus, les organismes phytophages et les pathogènes. Afin d'y faire trace, la plante met en place un système de défense qui intervient une chaîne de réaction. Les protéines végétales défensives produites font office de rempart contre les agents nuisibles (Cheng, Coleman, Carroll, & Hoffman, 1994).

##### **3.1.2 Stress abiotique**

Il est dû principalement à des facteurs environnementaux comme la sécheresse, les températures extrêmes, excès d'eau (asphyxie racinaire), la salinité, etc. On peut citer quelques types de stress abiotiques qui peuvent affecter les végétaux :

###### **3.1.2.1. Stress hydrique**

Provoqué par un déficit en eau constituant une menace permanente pour la survie des plantes, néanmoins, beaucoup d'entre elles produisent des modifications morphologiques et physiologiques qui leur permettent de survivre dans les régions de faible pluviosité et dont la teneur en eau des sols est peu élevée (Hopkins, 2015).

###### **3.1.2.2. Stress thermique**

Provoqué par la température, c'est l'un des facteurs les plus limitant et qui conditionne la production et la croissance des plantes (Nultsch, Botanique générale, 1998).

###### **3.1.2.3. Stress salin**

Le stress salin est défini comme une concentration excessive en sel. Le terme stress salin s'applique surtout à un excès des ions, en particulier  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Hopkins, 2015).

### 3.2. Effets du stress salin sur la plante

Les grandes concentrations en sel dissous dans la solution du sol ont des effets délétères sur les végétaux. Certains sont adaptés à ces concentrations par différents mécanismes physiologiques, ce sont les halophytes. Elles se développent à des teneurs de sels supérieures à 300 mM. Par contre les glycophytes y sont sensibles, leur croissance est fortement inhibée avec des concentrations de sel entre 100 et 200 mM (Zhu, 2007) Les conséquences d'un stress salin sur les végétaux peuvent résulter de trois types d'effets :

- **Le stress hydrique** : une forte concentration saline dans le sol provoque une importante diminution de la disponibilité en eau. Cela nécessite un ajustement osmotique adapté, afin que le potentiel hydrique cellulaire demeure inférieur à celui du milieu extracellulaire. Lorsque l'ajustement osmotique n'est pas suffisant, l'eau a tendance à quitter les cellules ce qui provoque un déficit hydrique et une perte de turgescence (Levigneron, F., G., P., P., & F., 1995); (Munns R. , 2009).

**Le stress nutritionnel** : des concentrations salines élevées dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale. L'accumulation des ions de  $\text{Na}^+$  dans la plante limite l'absorption de cations indispensables tels que  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Il y aurait une compétition entre  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  pour les mêmes sites de fixation apoplasmiques. La présence des  $\text{Cl}^-$  inhibe l'absorption des  $\text{NO}_3^-$ . Ce déséquilibre nutritionnel est une cause possible de la réduction de croissance en présence du sel lorsque des ions essentiels comme  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{NO}_3^-$  deviennent limitant (Levigneron, F., G., P., P., & F., 1995); (Zhu, 2007)

**Le stress ionique** : la toxicité ionique survient lorsque l'accumulation de sels dans les tissus perturbe des activités métaboliques de la plante comme l'absorption d'eau et de nutriments, l'ajustement osmotique, la synthèse de protéines et d'acides nucléiques, l'accumulation de solutés organiques, la respiration et la photosynthèse (Levigneron, F., G., P., P., & F., 1995). Des perturbations fonctionnelles apparaissent au niveau de la photosynthèse sont dues à plusieurs facteurs : la déshydratation des membranes cellulaires et la fermeture des stomates, ce qui réduit la perméabilité de  $\text{CO}_2$ , la toxicité du sel, la sénescence accrue induite par la salinité et le changement dans l'activité des enzymes (Parida & A.B., 2005).. En outre, le stress salin peut induire un stress oxydatif se traduit par une production excessive de radicaux libres d'oxygène y compris l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et les radicaux

hydroxyles (OH<sup>-</sup>). Ces espèces réactives causent des dysfonctionnements intra-membranaires et par conséquent la mort cellulaire (Parida & A.B., 2005).

### **3.3. Mécanismes d'adaptation aux stress**

La réponse au stress consiste en un renforcement du transport actif par lequel les ions sont à nouveau pompés vers l'extérieur. Simultanément, les ions sont remplacés par des substances organiques de faible poids moléculaire qui sont inoffensives pour la cellule, mais qui maintiennent le potentiel osmotique (Nultsch, Botanique générale, 1998).

On connaît 20 à 30 de ces substances, comme les sucres (saccharose), des alditols (mannitol), des acides aminés (proline), etc. aucune activation de gènes n'est nécessaire pour l'induction de la biosynthèse de ces substances (Nultsch, Botanique générale, 1998).

#### **3.3.1 La proline**

La proline joue un rôle dans la résistance au stress salin. Il s'agit d'un osmoticum dont l'accumulation cytoplasmique permet de neutraliser les effets ioniques et osmotiques de l'accumulation de sel dans la vacuole.

Les teneurs en proline s'accroissent rapidement chez de nombreuses mono ou dicotylédones soumises à un stress salin (Bais, Park, Weir, Callaway, & Vivanco, 2004). Cette augmentation de la concentration de proline cytoplasmique est consécutive à la stimulation de sa synthèse, résultante d'une élévation des quantités des messagers codants pour l'enzyme qui convertit le glutamate semi-aldéhyde en proline.

Il existe deux voies de biosynthèse de la proline chez les plantes, celle de l'ornithine et celle du glutamate. Cette dernière semble être prédominante sous conditions de stress (Silva-Ortega et al., 2008). Il semble que la stimulation de la synthèse de proline soit parallèle à une activation globale d'une voie métabolique partant du glutamate semi-aldéhyde et conduisant à la proline, mais aussi aux polyamines, via l'ornithine et l'arginine (Bartels & Sunkar, 2005).

#### **3.3.2 La glycine bêtaïne**

Le nom de bêtaïne vient de la betterave sucrière d'où a été extraite la première bêtaïne découverte, la triméthylglycine (TMG, historiquement appelée « bêtaïne ») aujourd'hui appelée « glycine bêtaïne ». Divers organismes végétaux (plantes supérieures, algues et bactéries) synthétisent des bêtaïnes comme molécules osmorégulatrices ou cryoprotectrices.

Ces molécules leur permettent de résister au froid ou au sel, en particulier chez les extrémophiles. Les bétaines permettent aussi à certaines plantes (*Plumbaginaceae*) de mieux résister à la chaleur et au stress hydrique via une synthèse irréversible de glycine bétaine, la méthylamine la plus courante et la mieux distribuée chez les végétaux, produites dans les tissus chlorophylliens via la choline et ensuite transportées dans les tissus en croissance par le phloème (Bartels & Sunkar, 2005).

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

---

## Chapitre 02 : Matériel et méthodes

### 4 Objectif de l'étude

Le travail présenté dans ce mémoire porte sur l'étude de micro-organismes telluriques (bactérienne), isolées de la rhizosphère de deux plantes steppiques (*Stipa tenacissima* et *Artemisia herba-alba*), aux taxonomies inconnues. Nous nous sommes interrogés sur les points suivants :

- Les populations bactériennes isolées sont-elles taxonomiquement proches ?
- L'efficacité de l'inoculation sur la tolérance des plantes au stress salin sera-t-elle observée ?
- Quel sera en outre l'effet de l'interaction des deux facteurs (inoculation et stress salin) sur le rendement ?

Pour répondre à ces questions, nous avons divisé notre travail expérimental en deux parties principales :

La première consiste à faire une pré-identification des différents isolats bactériens qui repose, dans un premier temps, sur des tests d'orientation simples : une caractérisation phénotypique de la diversité des isolats bactériens, basée sur les caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, afin d'approcher au maximum le sommet de la hiérarchie taxonomique.

La deuxième partie consiste à l'application d'un stress salin à des plantules de blé dur (*Triticum durum* Desf) inoculées par les isolats bactériens et étudier l'effet de l'inoculation dans la tolérance des plantes au stress salin.

Les essais ont été conduits au niveau des laboratoires de microbiologie et de physiologie végétale de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Tiaret).

Le protocole général de cette étude est présenté dans le schéma suivant :

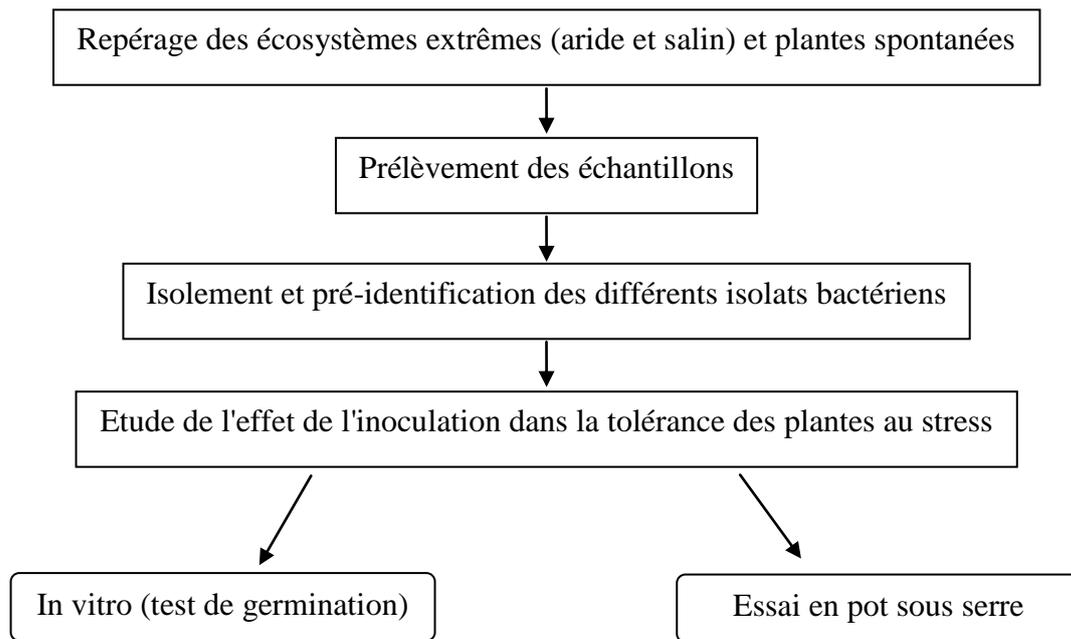


Figure 1: Protocole expérimental.

## 5 Développement méthodologique

### 5.1. Matériel biologique

L'inoculum a été préparé à partir des souches prélevées de la rhizosphère de deux plantes steppique l'Alfa (*Stipa tenacissima*) et l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*).



Figure 2 : Photographies des deux plantes (photos prises dans la région d'Ain El Hadid)

Le matériel végétal ayant fait l'objet de cette étude est composé de semences de blé dur (*Triticum durum* Desf.) variété « Vitron », couramment cultivée en Algérie. Les graines de cette variété nous ont été fournies gracieusement par l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) de Sebaine- Tiaret et elle est issue de la récolte de la campagne (2017/2018).

## 5.2. Prélèvement des échantillons

Les échantillons du sol ont été collectés dans différentes stations dans la commune steppique d'Ain El Hadid, (l'ouest d'Algérie) durant les mois de novembre, décembre 2018, la zone d'étude appartient à l'étage bioclimatique semi-aride caractérisé par des ressources naturelles limitées, un sol pauvre, des formations végétales à caractère herbacé ou plus ou moins arbustif (Benkhetou, Zedek, & Boudaoud, 2016). Le choix des sites s'est basé sur la diversité édapho-climatique pouvant influencer la composition de la microfaune Rhizosphérique.

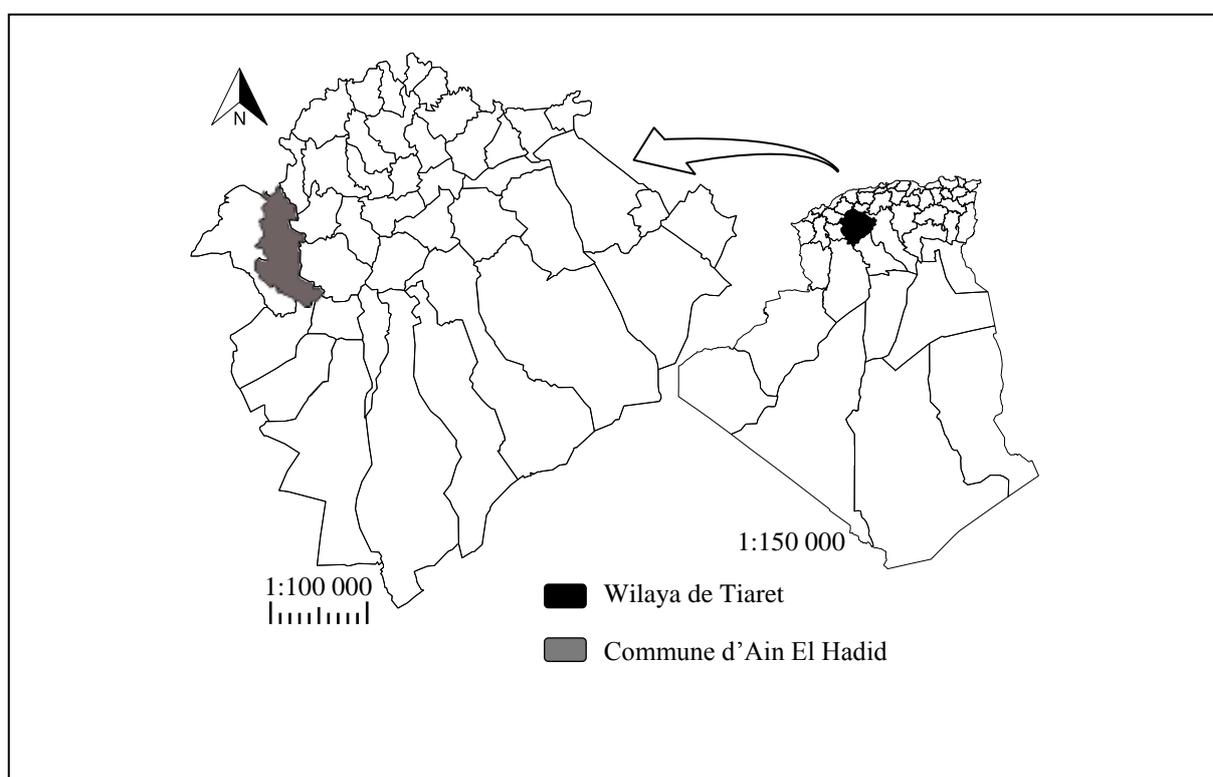


Figure 3 : Situation géographique de la zone de prélèvement (source : Google)

### 5.2.1 Procédures d'isolement et purification des souches

La collecte est réalisée selon la méthode de (Vincent, 1970), cette méthode consiste à :

- creuser à 15 cm autour de la plante et à une profondeur de 20 cm, ceci afin de prélever la plante entière avec tout son appareil racinaire sans l'endommager ;

- extraire délicatement le bloc de sol et enlever manuellement les cailloux et débris incrustés liés aux sol et racines en faisant attention à ne pas tirer dessus (surtout les racines secondaires qui sont les lieux des symbioses) ;
- placer la plante et la motte de terre, les racines en bas, dans un sac en plastique pour transporter au niveau du laboratoire ;

L'isolement des bactéries à partir des deux échantillons du sol a été réalisé sur gélose nutritive, 10 g de chaque échantillon de sol sont ajoutés à 90 ml d'eau distillée stérile et mélangés pour constituer la première dilution  $10^{-1}$ , à partir de laquelle, des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-7}$  ont été préparées. 1mL de chaque dilution est utilisé pour ensemercer 3 boîtes de pétrie contenant la gélose nutritive. Les boîtes sont incubées à une température de  $25^{\circ}\text{C}$  48h.

Après incubation et à partir des deux échantillons de sol, huit colonies présentant des aspects différents sont repiquées sur le même milieu de culture.

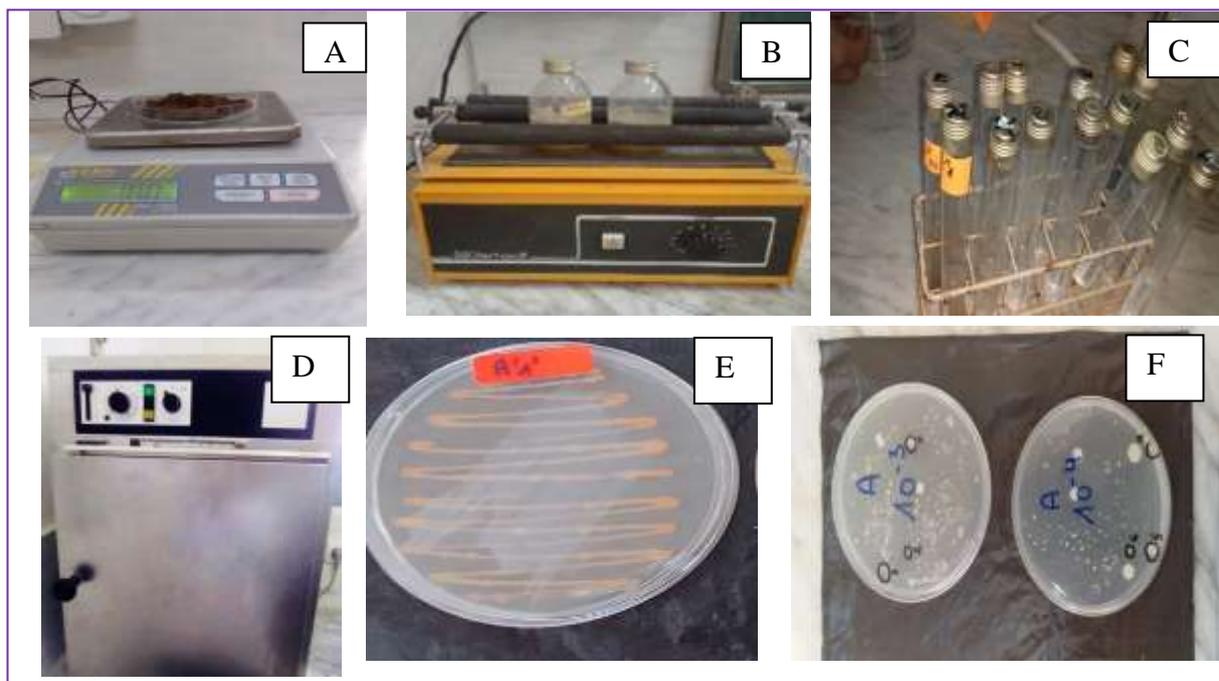


Figure 4 : Différentes étapes d'isolement des rhizobactéries.

#### Légende :

- (A) : Echantillon de 10 g du sol rhizosphérique
- (B) : Echantillons sous agitations rotative
- (C) : Dilution de la suspension
- (D) : Incubation des boîtes de pétri à l'étuve à  $25^{\circ}\text{C}$  pendant 48h
- (E) : Sélection des colonies bactériennes homogènes
- (F) : Multiplication des colonies sélectionnées

---

### **5.3. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des isolats**

Depuis la découverte du monde microbien, le souci des microbiologistes a toujours été d'identifier, de classer et de nommer chaque nouveau microorganisme qu'ils découvraient, c'est ce qu'on appelle la taxonomie.

Les tests effectués sont basés soit sur les critères classiques ou traditionnels utilisés dans les schémas d'identification pratiqués dans la plupart des laboratoires de microbiologie.

Les méthodes phénotypiques englobent les caractéristiques morphologiques (cellulaires et coloniales), physiologiques (conditions de croissance) et biochimiques (enzymes, métabolisme, etc.) des bactéries (Vandamme, Grillis, Kersters, & Swing, 1996), elles ne sont pas directement basées sur l'ADN ou l'ARN.

La taxonomie phénotypique aborde essentiellement :

#### **5.3.1 Caractères morphologiques**

La méthode macroscopique comprend toutes les techniques reposant sur la détermination de caractéristiques morphologiques, des bactéries via des techniques standardisées. La méthode consiste en l'observation des colonies bactériennes, à l'œil nu ou grâce à la loupe binoculaire. Les colonies, obtenues après 24 heures d'incubation à 25°C dans des boîtes de Pétri, sont décrites selon les éléments d'identifications macroscopiques suivant : la forme, l'aspect de la surface, la couleur, l'opacité, le contour (Vincent, 1970).

#### **5.3.2 Caractères microscopiques**

##### **5.3.2.1. Coloration différentielle de Gram**

La coloration de Gram a été effectuée selon la méthode classique comme suit : un frottis bactérien a été fixé à la chaleur par une solution de violet de gentiane, puis par une solution iodo-iodurée. Les bactéries ont été, ensuite, soumises à l'action de l'éthanol puis à la fuchsine. La coloration de Gram, nous a permis de connaître le type de Gram des bactéries et leur forme.

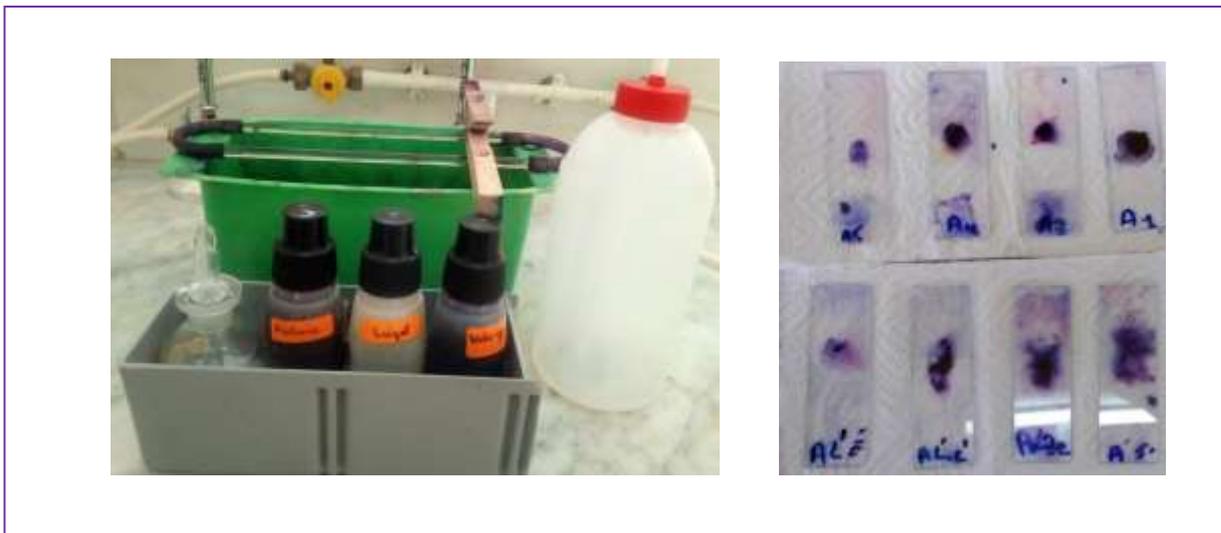
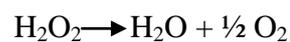


Figure 5 : Test de coloration différentielle de Gram.

### Test catalase :

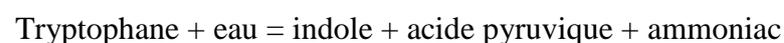
La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage.



La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Delarras, 2007).

### Test d'Acide 3-Indole acétique (AIA) :

Le test à l'indole recherche la capacité d'un organisme à dégrader l'acide aminé tryptophane et à produire de l'indole. (MacWilliams & P., 2009)



Dissoudre les ingrédients dans 1 litre d'eau stérile. Distribuer 9 ml par tube, autoclave pendant 15 minutes. Inoculer le tube de bouillon tryptone avec une petite quantité d'une culture pure. Incuber à 37 ° C pendant 48 heures. Pour tester la production d'indole, ajoutez 5 gouttes de réactif de Kovac directement dans le tube. Un test indole positif est indiqué par la formation d'une couleur rose à rouge dans la couche de réactif au-dessus du milieu quelques secondes après l'ajout du réactif (MacWilliams & P., 2009).

**Fixation de l'azote atmosphérique :**

Pour tester la capacité des bactéries à fixer l'azote, ces dernières ont été cultivées à  $25\pm 2^\circ\text{C}$  pendant 48 heures, sur milieu solide exempté d'azote « Ashby » ou « Burk's N-free » sans mannitol, selon le protocole de (Rodge & P, 2016) .Toute croissance sur ce milieu traduit la capacité des bactéries à fixer l'azote.

**Solubilisation du phosphate inorganique :**

Pour réaliser ce test, les souches bactériennes ont été incubées sur le milieu de Pikovskaya solide (PVK) contenant du  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphate. Après incubation des bactéries à  $30^\circ\text{C}$  pendant 72 heures. La présence d'un halo indique la production de substances dissolvant le phosphore (Gaur, 1990).

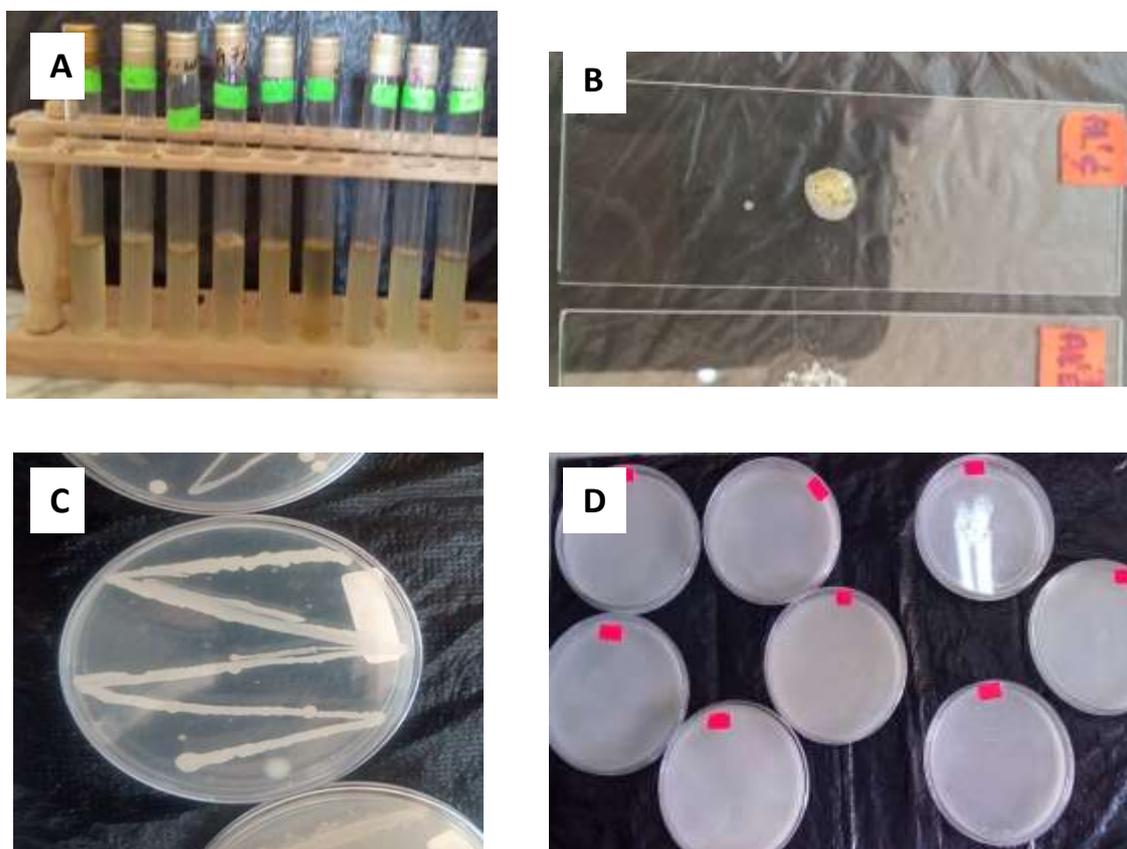


Figure 6 : Caractérisation chimiques des rhizobactéries.

**Légende :**

- (A) : Test d'indole
- (B) : Test catalase
- (C) : Fixation d'azote
- (D) : Solubilisation du phosphate

#### 5.4. Germination des graines

Afin de faciliter leur germination et d'évaluer leur capacité germinative, les graines de blé dur ont été triées à la main en fonction de leur bon état visuel (notamment téguments intacts, absence de carie ou autres). Elles ont été ensuite désinfectées en surface (trempage dans l'hypochlorite de Sodium à 1 % pendant 1-2 min, rinçages abondants à l'EDS, trempage pendant 30 secondes dans l'éthanol à 70°, rinçages de nouveau à l'EDS).

Pour la préparation d'une solution physiologique (solution à 9 ‰ en chlorure de sodium) 9g de Na Cl sont dissous dans 1L d'eau distillée puis la solution est stérilisée à l'autoclave, ensuite, les souches bactériennes sont ajoutées à des tubes contenant 9 ml de la solution préparée pour obtenir des suspensions bactériennes.

Les graines préalablement stérilisées ont été inoculées par trempage dans la suspension des souches rhizobactériennes, ensuite elles sont réparties en lots de 10 graines disposées dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre, tapissées de quatre couches de papier filtre, dans chaque boîte sont versées 3 ~ 7 ml d'eau distillée pour les graines témoins et le même volume des différentes solutions salines pour les graines stressées à la salinité.

Les cultures sont incubées à l'obscurité dans une étuve dotée d'un thermostat assurant une stabilité thermique convenable, à  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours où un contrôle quotidien et minutieux est effectué afin d'observer l'évolution de la germination des graines.

En ce qui concerne les solutions salines, elles sont préparées en mélangeant le chlorure de sodium NaCl par des pesées équivalentes à la concentration voulue dans un litre d'eau distillée. Les solutions utilisées sont illustrées dans le tableau au-dessous

Tableau 3 : Quantité de sels utilisés lors de la préparation des solutions salines.

	100 mM	200 mM	300 mM	Témoin
NaCl g.L <sup>-1</sup>	5.84	11.68	17.53	Eau distillée



Figure 7 : Dispositif d'évaluation de l'effet des souches rhizobactériennes sur la germination.

Dans notre cas, nous avons considéré qu'une graine a germé lorsque la radicule a percé l'enveloppe et dépasse 0.5cm de long. Au cours des observations, nous avons pris le soin d'imbiber le milieu de culture en arrosant dès que nécessaire.

Dès l'apparition de la pointe de la radicule à travers les enveloppes, nous avons procédé régulièrement au comptage des graines germées.

### 5.5. Effets *in vivo* des isolats sur la croissance du blé

La culture des plantes a été réalisée dans des pots en PVC d'une capacité de 2,5 kg, ayant une hauteur de 14 cm et dont les diamètres supérieurs et inférieurs sont respectivement de 16,5 cm et de 10 cm. Afin de laisser drainer l'eau en excès et éviter l'asphyxie des plantules, le fond des pots a été perforé, puis tapissé de 300 g de gravier fin.

Avant l'installation des cultures, le sol utilisé a subi un tamisage afin d'éliminer les débris végétaux, animaux et gravier. La fraction fine du sol obtenue a été stérilisée dans le four à 450°C pendant 5 min, afin d'éliminer tous les microorganismes, puis partagée en quantités égales, à savoir 1,2kg par pot. Chaque série de pots reçoit une quantité de sol provenant de la rhizosphère des plantes steppique et elles sont soigneusement mélangées afin de les contaminer par la microbiote steppique. Pour augmenter les chances de contamination les graines utilisées eux aussi ont été inoculées par le microbiote isolé, puis semer à raison de 8graines par pot à une profondeur de 1 cm avec un léger tassement, puis immédiatement arrosées avec les différentes solutions pour permettre un bon contact sol –graine.

Les pots ainsi préparés ont été placés sous serre vitrée. L'irrigation a été faite de manière à maintenir le sol dans une humidité suffisante et éviter tout stress hydrique durant l'expérimentation. (Figure 08).



Figure 8 : Evaluation des effets combinés stress et bactéries sur la plante en pots sous serre.

L'essai est conduit selon un dispositif expérimental en blocs, comportant 4 traitements. Chaque traitement est répété 3 fois (3 pots/traitement). Les traitements appliqués sont :

- Traitement 1 (T1) : constitué de pots contenant les échantillons de sols contaminés irrigués avec une solution saline de 100mM.
- Traitement 2 (T2) : constitué de pots contenant les échantillons de sols contaminés irrigués avec une solution saline de 200mM.
- Traitement 3 (T3) : constitué de pots contenant les échantillons de sols contaminés et irrigué avec une solution saline de 300mM.
- Traitement 4 (T4) : constitué de pots contenant les échantillons de sols contaminés et irrigué avec une solution normale.

- Traitement 5, 6 et 7 (témoins) : constitué de pots contenant les échantillons de sols sans apport de microbiote avec l'application du stress salin avec les 3 concentrations 100 , 200 et 300 mM.

## **6 Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpho- biochimiques du blé en milieu salin**

### **6.1. Effets de l'inoculation sur le taux de germination en milieu salin**

Le taux de germination c'est le pourcentage de graines pour lesquelles le germe est sorti dans un temps donné, c'est une mesure importante pour l'évaluation de la vigueur et la tolérance des plantes aux stress.

Dans notre cas, nous avons considéré qu'une graine a germé lorsque la radicule a percé l'enveloppe et est devenue visible à l'œil nu et en comptabilisant pour chaque concentration, les graines dont la longueur, d'au moins de leurs racines dépasse les 5 mm selon la définition de (Bartels & Sunkar, 2005).

Au cours des observations, nous avons pris le soin d'imbiber le milieu de culture en arrosant dès que nécessaire. L'ambiance de l'étuve est maintenue humide en plaçant dans le fond de celle-ci un bac plein d'eau.

Le taux de germination des graines relevé chaque 12 heures pendant 7 jours (toute la durée de germination) de mise en germination est exprimé en pourcentage et représente le nombre de graines germées par rapport au nombre total des graines initialement mises en germination, à travers le rapport suivant :

$$\text{Taux de germination (\%)} = \frac{\text{nombre de graines germées}}{\text{nombre total des graines}} \times 100$$

### **6.2. Paramètres morphologiques**

#### **6.2.1 Longueur moyenne des racines**

La longueur racinaire moyenne des grains germés est mesurée après 48 h, 72 h, 96 h et 120 h de traitement pour chaque concentration, en comptabilisant la longueur totale des racines pour chaque traitement et en la divisant par le nombre total de grains (germé ou pas) (Darrah, 1993). La mesure est effectuée à l'aide d'une ficelle de coton, qui permet de prendre en compte les courbures de la radicule.

### 6.3. Paramètres biochimiques

Au stade 4 à 5 feuilles les plantes sont récoltées et lavées à l'eau distillée, puis les paramètres biochimiques qui consistent à mesurer les quantités des constituants des feuilles en acides aminés : proline et glycine bêtaïne ont été analysés.

#### 6.3.1 Dosage de la chlorophylle totale

Pour mesurer la teneur en chlorophylle totale, nous avons utilisé un chlorophylle-mètre de référence : SPAD-502PlusKONICA MINOLTA. L'appareil nous a permis de réaliser des mesures rapides de la teneur en chlorophylle sans endommager les feuilles des plantes.

Le Chlorophylle-mètre (fig. 09) est un appareil permettant de mesurer les teneurs relatives en chlorophylles. Deux faisceaux (rouge et infrarouge) sont émis par la pince qui séquestre la feuille. Les faisceaux traversent la feuille et sont captés par la cellule réceptrice. L'énergie photonique est convertie en signal numérique. Le ratio des intensités de lumière rouge (650 nm, absorbée partiellement par les chlorophylles) et infrarouge (>800 nm, non absorbée) permet de définir une teneur relative en chlorophylles (unité SPAD : *soil plant analysis development*).



Figure 9: Mesure de la chlorophylle par chlorophylle-mètre

#### 6.3.2 Dosage de la proline

Le dosage de la proline est réalisé selon la méthode de (Magné & Larher, 1992). Le principe de la méthode consiste à prendre 100mg de feuilles coupées en petits morceaux; puis les introduire dans un tube à essai ; ajoute ensuite 3ml de méthanol à 80 % et chauffer le mélange au bain-marie à la température de 85°C pendant 1 heure. Les tubes sont fermés pour éviter la volatilisation de l'alcool. Après refroidissement, on prélève 1 ml d'extrait auquel est ajouté 1 ml

d'acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 1 ml d'un mélange contenant (12ml d'eau distillée, 30ml d'acide acétique, 80 ml d'acide ortho phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  densité 1.7) et 25 mg de la ninhydrine.

La solution est portée à ébullition pendant 30 min, elle vire progressivement au rouge, après refroidissement, on ajoute 5 ml de toluène à la solution, après agitation 2 phases se forment : phase supérieure contenant la proline et une phase inférieure dépourvue de proline.

On aspire la phase supérieure et on procède à sa déshydratation grâce à une pincée de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ajoutée dans chaque tube. Enfin la densité optique est déterminée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde 528nm.

La concentration en proline est déterminée en se rapportant à une courbe standard préparée à partir d'une solution de proline sur la base des concentrations connues (Annexe 01).

; l'équation permettant l'obtention de la courbe d'étalonnage est  $y = 0,0092x$  (Bates, Waldren, & Teare, 1973).

### 6.3.3 Dosage de la glycine bêtaïne

Le dosage de la glycine bêtaïne est réalisé selon la méthode (Park, et al., 2004). Des échantillons de 0,5 g du matériel végétal sec finement broyé, on a ajouté 20 ml d'eau distillée. La solution obtenue a été incubée pendant 48 h à 25 ° C. Les échantillons sont ensuite filtrés et le filtrat est stocké au congélateur jusqu'à l'analyse. Les extraits décongelés ont été dilués 1: 1 avec de l'acide sulfurique ( $2 \text{NH}_2\text{SO}_4$ ), 0,5 ml de la solution obtenue a été refroidie dans l'eau glacée pendant 1 h. Le réactif KI-I2 (0,2 ml) a été ajouté et le mélange a été doucement agité avec le vortex. Les échantillons ont été stockés à une température de l'ordre de 0 – 4°C pendant 16 heures. Ensuite, les échantillons ont été transférés dans des tubes pour les centrifuger à 14 000 tr/min pendant 5 min à 0 °C. Le surnageant est aspiré avec précaution avec micropipette. Comme la solubilité du complexe augmente nettement avec la température, il est important que les tubes soient maintenus jusqu'à ce que le complexe froid soit séparé du milieu acide. Le culot est dissous dans 9 ml de 1,2-dichloro éthane (réactif). Premier lavage avec 0,5 ml et laisser 5 minutes. Mélanger les tubes avec le vortex pour effectuer une solubilité complète dans le solvant. Après 2h, l'absorbance a été mesurée à 365 nm avec spectrophotomètre UV-visible.

La concentration en glycine bêtaïne est déterminée en se rapportant à une courbe standard préparée à partir d'une solution de la glycine bêtaïne préparée dans l'acide sulfurique 2 N sur la base de concentrations connues (150-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (annexe).

---

La gamme étalon se fait par un mélange ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , eau distillée) ; l'équation permettant l'obtention de la courbe d'étalonnage est  $y = 0,017x - 2,0847$  (Annexe 02)

Courbe d'étalonnage de la glycine bêtaïne obtenue après optimisation de la longueur d'onde et temps de lecture après dissolution des cristaux de glycine bêtaïne dans le 1,2-dichloroéthane.

## **Résultats et discussion**

## Chapitre 03 : Résultats et discussion

### 6.4. Identification des souches bactériennes

Notre travail expérimental consiste à isoler et identifier les souches des deux des rhizosphères de *Stipa tenacissima* et *Artemisia herba-alba*, l'isolement nous a permis d'obtenir 08 souches bactériennes. La caractérisation phénotypique de la diversité des isolats bactériens, basée sur les caractères macroscopiques, l'observation des colonies bactériennes isolées sur Gélose nutritive a révélé différents types de colonies, aux caractéristiques similaires pour quelques-unes et relativement variables pour d'autres, les colonies sont toutes rondes au contour régulier et avec une surface lisse brillante. Cependant, nous avons observé une variation dans la taille des colonies, la couleur et la consistance (Fig.10).

La coloration de Gram nous a permis de différencier les bactéries d'après leur forme (bacille, coccobacille, coque), et leur affinité pour les colorants, les bactéries à Gram positif se caractérisent par une couleur violette. Quant aux bactéries à Gram négatif, elles sont identifiées par une couleur rose.

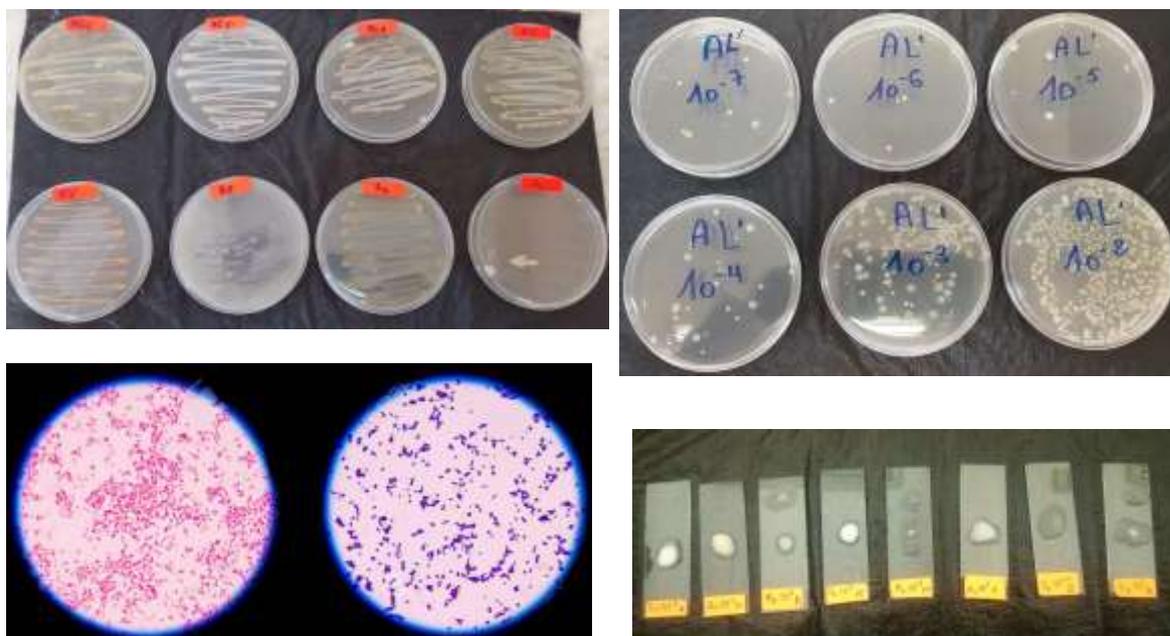


Figure 10 : Résultats des tests préliminaires d'identification des souches.

Les souches isolées des deux types de sols ont aussi subi des tests biochimiques afin d'estimer leur capacité de fixer l'azote, la solubilisation du phosphate et leur catalase. Ces caractères d'identification ont permis l'orientation vers les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* selon les

tableaux d'identification publiés dans plusieurs revues. Les résultats de pré-identification sont mentionnés dans le tableau 04.

Tableau 4 : Résultats du test de pré-identification des rhizobactéries.

Colonne1	À'1'	A2	A4	A5	A'5'	Ale	AL'E'	AL'C'
Couleur	Orange	Rose	jaune	Blache	blanche	Blanchâtre	blanche	Jaune
Forme	petit bacille	Bacille	bacille	bacille	petit bacille	coco bacille	coco bacille	coco bacille
Gram	+	+	+	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	-	-	+	-	+
Fixation d'azote	+	-	-	+	+	+	+	+
Test d'indole	+	-	+	+	+	+	+	+
Solubilisation du P	+	+	+	-	-	+	+	+

Les souches de *Bacillus* et les Gram- isolées de la rhizosphère des deux plantes : *Stipa tenacissima* et *Artemisia herba-alba*, représentent une fraction importante de la communauté microbienne du sol. La diversité dans la rhizosphère implique que la compétence est une caractéristique de souche pas seulement d'espèce ou de genre. Plusieurs études révèlent que les *Bacillus* sont abondants dans la rhizosphère du blé (Cherif, 2014.). Toutefois, leur dominance se trouve dans les régions salées. La capacité de sporulation de ce genre bactérien favorise d'une part l'ubiquité et d'autre part la survie dans des environnements très divers. Les bactéries à Gram négatif se trouvent communément dans diverses niches écologiques.

Une propriété importante des PGPR influençant directement la croissance des plantes est la fixation d'azote. Elle est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel la plante bénéficie de l'association microbienne.

Toutefois, seule 50% des souches de *Bacillus* sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Selon (Gaur, 1990), cette capacité mesurée par l'activité de la nitrogénase existe chez *Bacillus* et *Pseudomonas* isolés du sol algérien. De nombreux rapports sont disponibles sur l'application des *diazotrophes* libres, y compris *Bacillus* spp., pour un rendement accru de diverses cultures (Somers, Vanderleyden, & Srinivasan, 2004).

L'alimentation minérale en phosphate est également une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Plusieurs souches de *Bacillus* et des Gram- isolées sur milieu Pikovskayas Agar (PVK) additionné de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  solubilisent les phosphates à des taux appréciables. Elles peuvent être considérées comme des biofertilisants, car ces bactéries sont

capables de libérer une quantité de P supérieure à celle nécessaire à leur métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus (Dobbelaere & Okon, 2003) ; (Gaur, 1990).

Parmi les communautés bactériennes du sol, les souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* ont été décrites comme agents de solubilisation efficaces. Cependant, les *Bacillus* sont les plus performants (Kloeppe, Lifshitz, & Zablotowicz, 1989). De plus, la solubilisation du P est un caractère très commun chez les *Pseudomonas* et certains *Enterobacteriaceae* dont *P. agglomerans* (Cherif, 2014.).

## 7 Analyse de l'effet de l'inoculation sur les paramètres morpho- biochimiques

### 7.1. Effets de l'inoculation sur le taux de germination en milieu salin

Bien qu'il ne reproduise pas intégralement le comportement des plantes au champ, le taux de germination, en conditions de stress salin, donne toujours une tendance plus ou moins précise du comportement des plantes étudiées. Le taux de germination des graines de blé est rapporté à la figure 12. Cette figure montre que la réponse des plantules de blé au stress salin est variable en fonction de l'intensité du stress et du traitement (inoculation). En effet, pour un stress de 100 et 200 mM, la plupart des plantules subissent une diminution de leur taux de germination comparativement aux témoins respectifs, à l'exception des graines inoculées avec les souches A2 et ALe qui ont pu maintenir un taux de germination légèrement proche aux témoins. Lorsque l'intensité du stress est encore plus élevée (300 mM), la plupart des graines étudiées sont fortement affectées et leurs taux de germination ne dépassent pas les 80 % du témoin. Cependant, les graines traitées avec les souches A2, A4 et ALe montrent une plus grande tolérance au sel et affichent un taux de germination proche de 80 %.



Figure 11 : Effet combiné du stress salin et de l'inoculation sur le taux de germination.

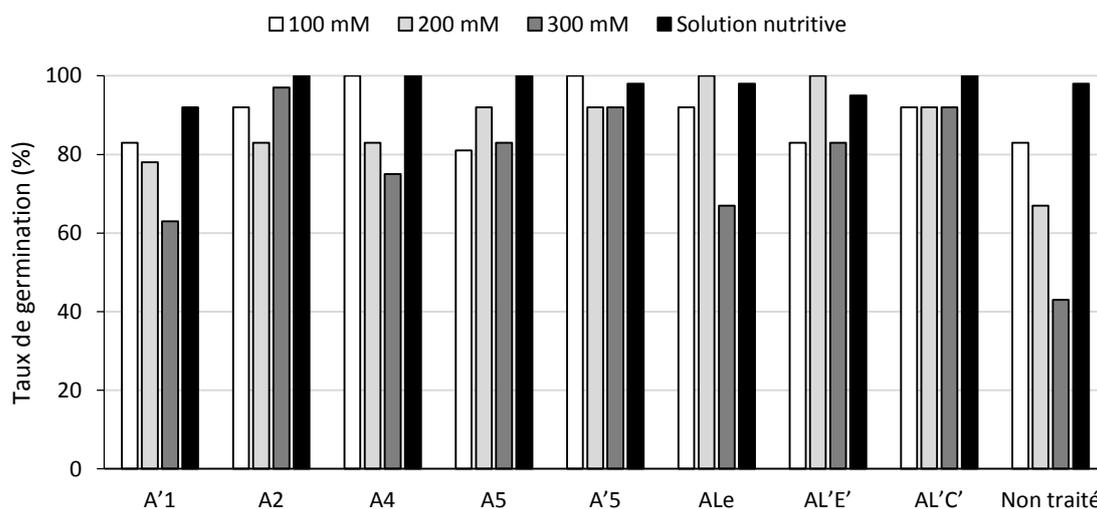


Figure 12 : Effet combiné du stress salin et de l'inoculation sur le taux de germination.

L'analyse du taux de germination a montré que le sel exerce, à fortes doses, un effet dépressif sur la germination des graines de blé. Cette inhibition peut être osmotique et/ou toxique. Dans la mesure où elle est d'origine osmotique, on devrait s'attendre à une reprise de la germination après levée de cette contrainte. Par contre, si des phénomènes de toxicité ionique interviennent, on peut prévoir l'absence de cette reprise de germination (Hajlaoui, Denden., & Bouslama, 2007).

Selon Ben Naceur et Rahmoun, (2001), le taux de germination, en conditions de stress salin, donne toujours une idée plus ou moins précise du comportement des plantes étudiées, la capacité germinative des graines stressées est réduite comparativement au témoin, et ils ont constaté que les plantes de blé inoculées se montrent plus résistantes et leur taux de germination plus élevés que celles non inoculées vis-à-vis au stress salin, même aux conditions les plus sévères.

Durant nos expériences, nous avons constaté l'effet dépressif du sel sur la germination des graines, nos résultats sont similaire à ceux de Ben Naceur et Rahmoun, (2001) et Rachidai et Driouich, (1994) qui ont notés aussi que les PGPR sont en mesure d'exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes telles que l'augmentation du taux de germination des graines en condition de stress salin.

## 7.2. Effets de l'inoculation sur la longueur des racines en milieu salin

L'autre aspect morphologique, l'étude du système racinaire sous l'effet combiné l'inoculation et stress salin est représenté dans la figure 13.

D'après ces résultats on observe que la mesure des longueurs des racines fait ressortir un effet positif visible de l'inoculation, pour les deux premières concentrations 100 et 200 mM, la longueur racinaire en présence des souches A'5 et ALe est améliorée à presque 160 % par rapport au témoin non inoculé. Avec la concentration 300 mM le développement racinaire est stimulé par les souches A5 et A'1 où on assiste à un rehaussement de la longueur de 180 % et 200 % respectivement par rapport au témoin (graines non inoculées). D'une manière générale l'effet de l'inoculation se manifeste par une augmentation de la longueur racinaire, à tous les niveaux de salinité, mais toutes ces augmentations restent inférieures à celle enregistrée avec le témoin 2 (solution nutritive).

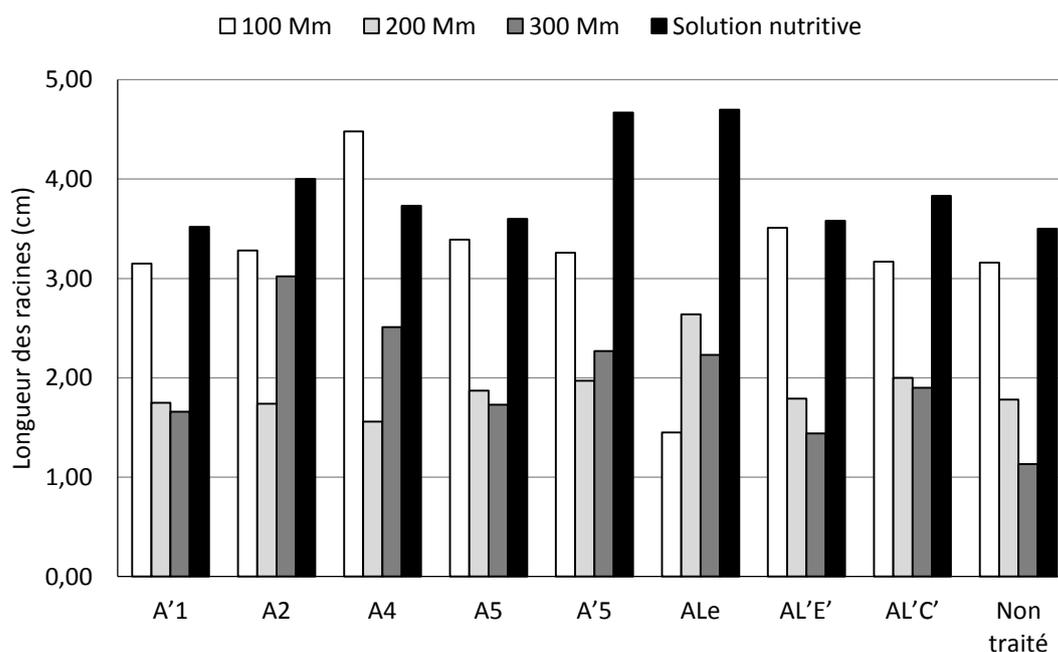


Figure 13 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la longueur des racines.

L'élongation racinaire est un processus très complexe, en conditions salines, l'organogenèse est affectée par le déséquilibre ionique manifeste par un état de toxicité des tissus de la graine due à l'accumulation des ions chlore (Grignon & Zid, 1989).

Il est connu depuis longtemps que l'inoculation des espèces végétales avec les PGPR peut influencer la formation des racines et augmenter la concentration en éléments nutritifs dans la plante hôte (Canbolat & Bilen, 2006). Cette augmentation peut s'accroître surtout chez les sujets exposés au stress salin, car la salinité du sol réduit significativement l'absorption des nutriments par les plantes, en particulier l'absorption du phosphate, qui se précipite avec les ions  $\text{Ca}^{+2}$  dans les sols salins (Grattan & Grieve, 1999) certaines PGPR améliorent l'absorption de ces éléments nutritifs en favorisant le développement des racines (munees & mulugeta, 2013) par la production de phytohormones. Un autre processus par lequel les PGPR facilitent l'absorption des ions minéraux est la stimulation de l'ATPase, la pompe à protons (Chibani, 2017).

### 7.3. Paramètres biochimiques

#### 7.3.1 Teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle est considérée comme paramètre de tolérance au stress abiotique. Le résultat de l'étude de la teneur en chlorophylle sous différentes doses de sel est représenté dans la figure 14. La salinité entraîne des réductions notoires des teneurs en chlorophylle totale avec l'intensité du stress salin appliqué.

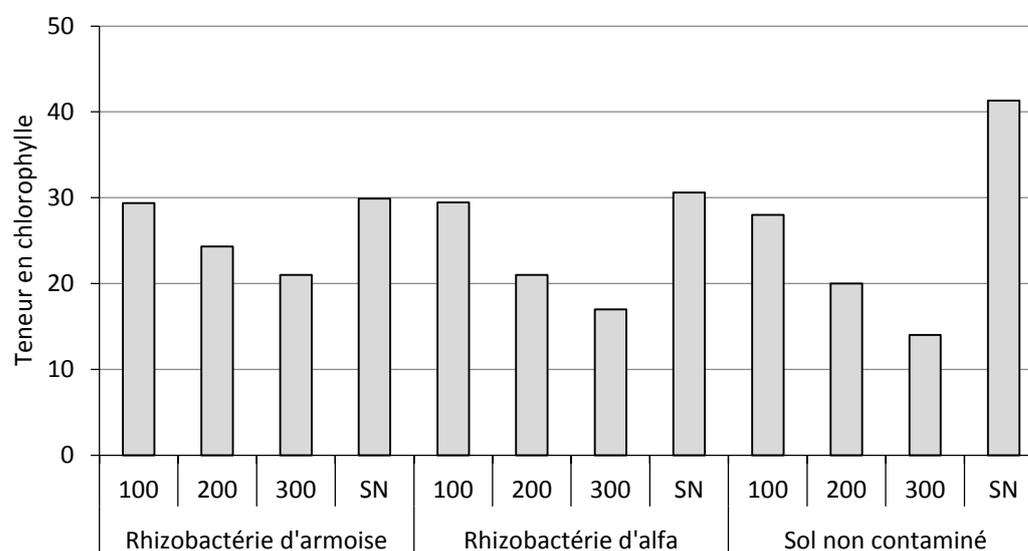


Figure 14 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en chlorophylle totale.

À 100 mM, la plupart des plantes ont pu maintenir une teneur en chlorophylle totale assez élevée, variant entre 67 et 71 % par rapport au témoin. Par contre lorsque l'intensité du stress s'accroît (200 mM), toutes les plantes répondent négativement et de la même manière et ont montré un taux de teneur en chlorophylle assez faible ( $\approx 45$  à  $48$  % du témoin), à l'exception des graines inoculées par les souches provenant de la rhizosphère de l'alfa, qui se montrent les

plus tolérantes au sel avec une teneur proche de 60 % comparativement au témoin. Même résultat est obtenu pour les échantillons traités par la solution 300mM ou la teneur diminue sévèrement (39 à 41 %) sauf pour les échantillons traités avec les isolats de la rhizosphère d'alfa, mais avec des valeurs qui restent inférieures à 50 % par rapport à celle du témoin. En résumé et d'une manière générale nous constatons que les souches isolées de la rhizosphère de l'alfa ont une forte influence sur la tolérance des plantules aux stress salins en améliorant les teneurs en chlorophylle totale à tous les niveaux de salinité.

Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par (Chibani, 2017), où elle a constaté que la teneur en chlorophylle diminue en présence du sel et en absence de phosphore soluble. Selon ses résultats, le test d'inoculation par les souches semble avoir un effet significatif sur la teneur des feuilles en chlorophylle avec l'ensemble des trois traitements appliqués.

### **7.3.2 Teneur en proline**

La figure 15 montre que l'irrigation des plantules avec des solutions salines, augmente la teneur en des feuilles en proline. En effet, au niveau cellulaire, le maintien d'une pression osmotique interne élevée lors d'un déficit salin s'effectue majoritairement par l'accumulation de certaines molécules ; parmi ceux-ci, la proline et la glycine bêtaïne. Une comparaison entre l'évolution de la proline des plantes témoins et des plantes inoculées de blé dur étudiées a montré que le taux de la proline change beaucoup sous l'effet du stress (Fig. 15). Dans le cas de stress 200 et 300mM, les taux de la proline augmentent beaucoup chez les plantes sans inoculation on note des valeurs de 54,30 µg/mL ; 48,63 µg/mL respectivement. Cependant, les plantes inoculées ont des valeurs proches aux témoins sans stress et sans inoculation. Cet effet est net surtout en présence des isolats de la rhizosphère de l'Alfa. En absence de sel, l'inoculation est inefficace.

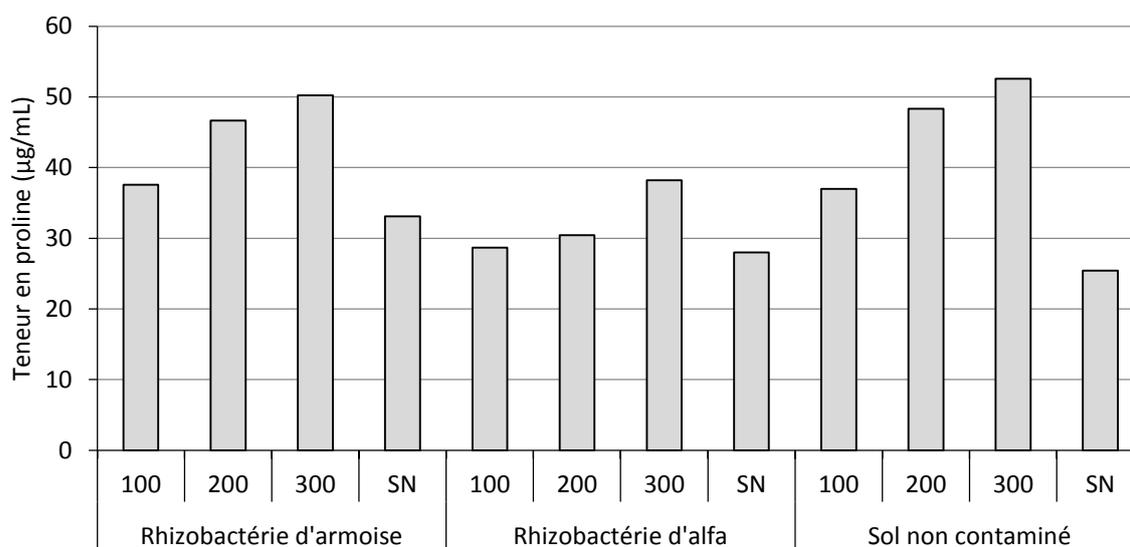


Figure 15 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en proline.

Les résultats obtenus par Cherif, (2014) montrent que l'analyse de la teneur en proline foliaire révèle que la salinité stimule sa synthèse intracellulaire. L'inoculation entraîne une diminution de sa teneur foliaire sous l'effet du stress salin. Pour leur osmorégulation, les plantes soumises à un stress salin accumulent diverses molécules telles la proline, la glycine, la bétaine, etc, qui protègent l'activité enzymatique (Munns & A, 1986).

La proline est évidemment l'acide aminé le plus largement accumulé par les plantes (McCue & A.D., 1990), la présence de la proline à des concentrations élevées est l'une des manifestations des stress hydriques et salins (Benlaribi & P., 1988) ; (Ali Dib, P., & J.L., 1992).

Plusieurs travaux affirment l'effet bénéfique des bactéries dans la résistance au stress salin en montrant leur rôle dans la diminution des teneurs des osmoprotecteurs, selon (Han & K.D, 2005) et (AMIROUCHE & DJAALEB, 2017), l'inoculation diminue de façon significative la teneur en proline de soja (*Glycine max* L.) croissant dans des conditions salines par rapport à un témoin non inoculé.

Nos résultats obtenus sur les teneurs en chlorophylle et en proline s'accordent avec ceux de certains auteurs (Han & K.D, 2005) ; (Magné & Larher, 1992) qui ont signalé l'existence d'une connexion vraisemblable entre les voies de synthèse des pigments chlorophylliens et celles de la proline. Une compétition entre ces deux composés pour leur précurseur commun, le glutamate, peut être à l'origine de ce phénomène. Le stress salin provoque l'augmentation de la proline foliaire ; parallèlement, une baisse dans les teneurs en pigments chlorophylliens totaux (chlorophylles a et b) est enregistrée (Cherif, 2014.).

La compartimentation des ions entre les organes (racines/parties aériennes), les tissus (épiderme/mésophile) ou encore entre les compartiments cellulaires (vacuole/cytoplasme) est l'un des mécanismes d'adaptation à la contrainte saline. L'ajustement osmotique implique l'accumulation d'ions minéraux ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ) et/ou de solutés organiques comme la proline, la glycine-bétaïne, les sucres solubles, les acides organiques, etc. (Morgan, 1984).

### 7.3.3 Teneur en glycinebétaine

Selon les résultats de la figure 16, on constate que la teneur en glycine bétaine foliaire augmente lorsqu'on augmente la concentration en sel quel que soit le milieu. Pour les échantillons contaminés par les isolats d'armoise, on remarque que leurs teneurs en glycine bétaine sont supérieures à celles enregistrées avec échantillons contaminés par les isolats de l'Alfa. Ces résultats sont inférieurs par rapport à ceux des échantillons non contaminés pour les trois concentrations.

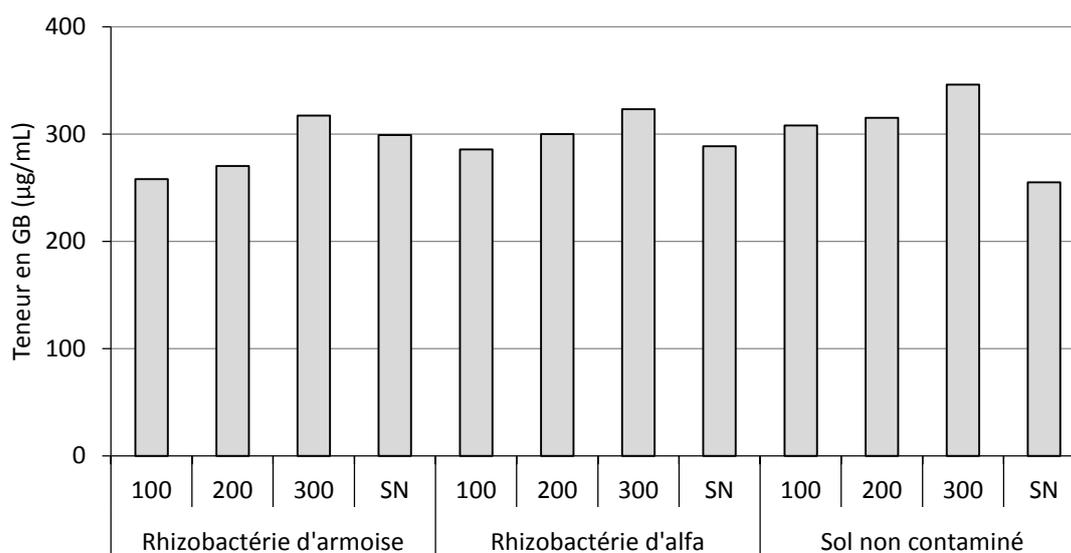


Figure 16 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en glycine bétaine.

L'étude réalisée par Amirouche et Djaaleb, (2017) montre que la concentration de glycinebétaine des plantes stressées est peu élevée que celle des témoins. Un travail important sur la glycine bétaine a suggéré ses rôles variés dans les plantes. De nouvelles preuves suggèrent que la contribution de l'expression différentielle des gènes endogènes de la glycine bétaine médié de la tolérance au stress chez les plantes (Dobbelaere & Okon, 2003).

---

## Conclusion

L'amélioration de la tolérance des plantes est l'une des stratégies courantes pour accroître la production agricole et promouvoir la croissance dans des conditions de stress, l'utilisation directe de microbiote racinaire exogène a reçu un intérêt considérable.

Ce travail visant à étudier l'interaction plante-microbiote racinaire exogène sous l'effet du stress salin nous a permis d'apporter une contribution à l'étude des principaux effets bénéfiques induits par l'apport de microbiote racinaire exogène isolée à partir des rhizosphères d'Alfa et d'Armoise sur la tolérance du blé dur au stress salin.

Les résultats rapportés montrent que toutes rhizobactéries étudiées montrent une variabilité dans le test Gram, et que, la majorité des isolats ont présenté une capacité de fixation d'azote et de solubilisation du phosphore insoluble. A partir de ces données expérimentales et des résultats qui en découlent et en se basant sur les critères morpho-cultureux, nutritionnels et biochimiques, on peut inclure nos isolats dans la famille des *Pseudomonas* et *Bacillus*. Seules les techniques moléculaires et phylogénétiques sont en mesure de préciser le genre, l'espèce et éventuellement le biovar.

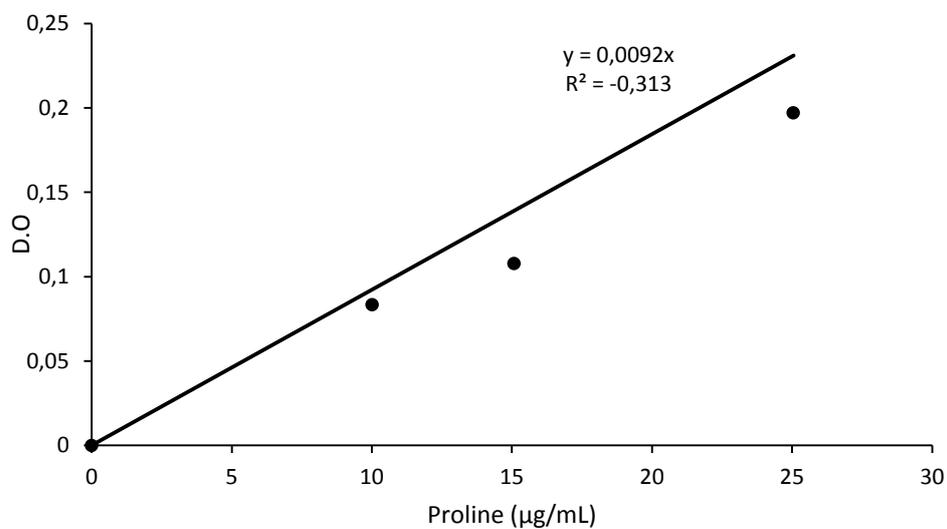
Enfin, les essais conduits en pots et les mesures et analytiques effectuées après 90 jours de culture, nous ont permis de mettre en évidence un effet net de l'apport des microbiotes sur le développement végétatif de la plante. Ils montrent aussi que le blé dur est une plante sensible à l'action du NaCl, en parallèle, ils montrent la capacité de ces rhizobactéries à restaurer la croissance du blé dur sous stress salin à une certaine concentration de NaCl, mais à des fortes concentrations, des phénomènes de toxicité peuvent se manifester.

En outre, nos PGPR améliorent de manière significative la croissance des plantes du blé dans les différentes conditions de culture (stress salin), aussi certaines souches produisent un changement du taux de chlorophylle et taux de proline et GB chez le Blé.

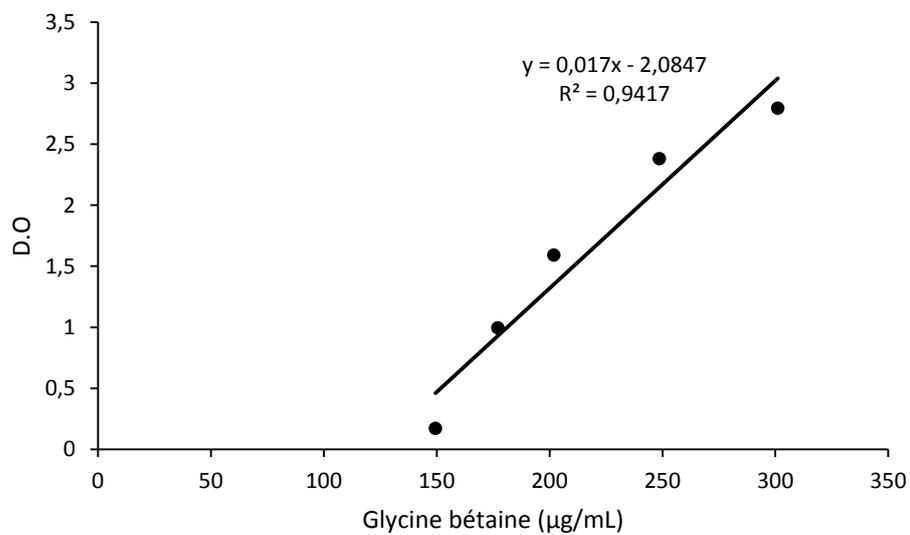
Malgré l'amélioration de quelques paramètres de nutrition minérale de la plante, notre étude reste cependant incomplète. En effet, la période de l'essai n'est pas suffisante pour apprécier l'influence de l'apport des microbiotes étrangers sur les paramètres de rendement de la culture.

Notre étude a pour perspectives la contribution à l'enrichissement des recherches sur l'évaluation du potentiel rhizobactéries, afin d'identifier et à sélectionner les bactéries les plus performantes qui contribuent à améliorer la croissance et la tolérance de Blé, et d'étude la compréhension des mécanismes biochimiques liés à l'installation de cette symbiose et au langage moléculaire entre les deux partenaires.

## Listes des Annexes



Annexe 1 : Courbe étalon du dosage de la proline



Annexe 2 : Courbe étalon du dosage de la glycine bétaine

## Références bibliographiques

Ahemad, M., & Kibret, M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26 , pp. 1-20.

Ali Dib, T., P., M., & J.L., A. (1992). Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie*, 12 , pp. 381-393.

AMIROUCHE, A., & DJAALEB, R. (2017). *Comparaison de quelques paramètres biochimiques chez quatre variétés de blé dur sous stress oxydatif généré par un stress hydrique*. Université des Frères Mentouri Constantine.

Antoun, H., & Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In : PGPR: Biocontrol and Biofertilization. *Springer, The Netherlands* , pp. pp: 16-39.

Babalola, O. (2010). Ethylene quantification in three rhizobacterial isolates from *Striga hermonthica*-infested maize and sorghum. *The Egyptian Journal of Biology* 12 , pp. 1-5.

Bais, H., Park, S., Weir, T., Callaway, R., & Vivanco, J. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9 , pp. 26-32.

Bajji, M., Lutts, S., & Kinet, J.-M. (2001). Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions.. *Plant Sci.* 160 , pp. 669 -681.

Balesdent, J., Dambrine, E., & Fardeau, J. (2015). *Les sols ont-ils de la mémoire? : 80 clés pour comprendre les sols* . Edition Quae.

Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science*.24 , pp. 23–58.

Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* , 39 (1), 205-207.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*, 35(4 Suppl) , pp. 1044-1051.

Benkhettou, A., Zedek, M., & Boudaoud, A. (2016). Étude des agroécosystèmes en milieu aride dans la région de Tيارت, Algérie. (U. I. Khaldoun, Éd.) *Écologie-Environnement* , 12, 7-16.

Benlaribi, M., & P., M. (1988). Etude comparée du comportement en situation de déficit hydrique de deux variétés algériennes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) adaptées à la sécheresse. *C R. Acad.Agr. France*, 74. , pp. 73-83.

Benmati, M. (2014). *PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur: Aspects moléculaires et génétiques*.

Bonkowski, M., Geoghegan, I., Birch, A., & Griffiths, B. (2001). Effects of soil decomposer invertebrates (protozoa and earthworms) on an above-ground phytophagous insect (cereal aphid), mediated through changes in the host plant. *Oikos* 95 , pp. 441-450.

Bourbonnais , G. (2010). *La chimie de la vie , chapitre : la nutrition chez les végétaux , le cycle de l'azote*.

Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A., & Sahin, F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38(6) , pp. 1482-1487.

Canbolat, M., & Bilen, s. (2006). Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biologie and fertility of soils*, 42(4) , pp. 350-357.

Cheng, W., Coleman, D., Carroll, C., & Hoffman, C. (1994). Investigating short term carbon flows in the rhizospheres of different plant species, using isotopic trapping. *Agronomy Journal* 86. , pp. 782-788.

Cherif, H. (2014.). *Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec Bacillus sp. et Pantoea agglomerans isolées de sols arides*. Université Ferhat Abbas Sétif 1.

Cheverry, C. (1995). Plant behaviour in saline environment. *Action d'eau* ,4. , p. 49.

Chibani, H. (2017). *Sélection et caractérisation des bactéries solubilisants le phosphate isolées du sol salin dans l'ouest algérien: effet sur la promotion de la croissance du blé*. université Abdelhamid benbadis, mostaghanem.

Darrah, P. (1993). The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach, *Plant and Soil* 156. pp. 1-20.

Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques*. Éditions Médicales Internationales.

Djermoun, A. (2009). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Natureet Technologie* (1) , pp. 45-53.

Dobbelaere, S., & Okon, Y. (2003). Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Plant Sci.* 22: , pp. 107-149.

Feillet, P. (2000). *Le grain de blé. Composition et utilisation. Mieux comprendre.* INRA.

Gaur, A. (1990). *Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers. 1st Edn., Omega Scientific Publishers.* New Delhi, India.

Glick, B. (1995). Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 4 , pp. 109-117.

Gobat, J., Aragno, M., & Matthey, W. (2010). *Le sol vivant : bases de pédologie , biologie des sols .* PPUR Presses polytechniques.

Grattan, S., & Grieve, C. (1999). Mineral nutrient acquisition and response by plant grown in saline environments . *Handbook of plant and crop stress,2* , pp. 203-229.

Grignon, C., & Zid, E. (1989). *Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique.* Anzième journée scientifique du du réseau de biotechnologies végétales. *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides, AUPELF/URE.* Tunis.

Hajlaoui, H., Denden., M., & Bouslama, M. (2007). *TROPICULTURA*, 25 , pp. 168-173.

Hamdy, A. (1999). Saline irrigation assessment for a sustainable use. Halophyte Production and Utilization . *Project No. IC 18CT 96-0055* , pp. 152-226.

Han, H., & K.D, ,. L. (2005). *Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity.*

HARLAN, J. (1975). Our vanishing genetics resources. *Science* , 188, pp. 618-621.

Hawes, M. (1998). *Function of root border cells in plant health :pioneers in the rhizosphere .Annual Review of phytopathology* 36.

Hiltner, L. (1904). Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brachebrache. *Arbeit und Deutsche Landwirtschaft Gesellschaft* 98, , pp. 59-78.

Hirsch, A., Bauer, W., Bird, D., Cullimore, ,. J., Tyler, B., & Yoder, J. (2003). Molecular signals and receptors: Controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84. , pp. 858-868.

Hopkins, W.-G. (2015). *Physiologie végétale.* (d. Boeck, Éd.) de Boeck.

Itamar, V., & D.J., R. (1988). Germination of Guar seed under salt and temperature stress. *Soc. Hart. Sci., 113 (3)* , pp. 437-440.

Kloeppe, J., Lifshitz, R., & Zablutowicz, R. (1989). Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology 7* , pp. 39-44.

Quae2015Les végétaux Des symbioses pour mieux vivreQuae

Levigneron, A., F., L., G., V., P., B., P., F., & F., C. D. (1995). Les plantes face au stress salin. *Cahier Agric. 4* , pp. 63-73.

MacWilliams, M., & P., M. (2009). *Indole Test Protocol*. American society for microbiology.

Magdelaine, C. (2011). Les pesticides: une pollution planétaire. . *Le portail notre-planete.info : environnement, géographie, photos. Rambouillet .France*.

Magné, C., & Larher, F. (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry , 200 (1)*, 115-118.

Marouf, A., & Raynaud, J. (2007). *La botanique de A à Z*. paris.

McCue, K., & A.D., H. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol,8* , pp. 358-362.

Mézaache, S., Haichour, N., Guechi, A., & Zerroug, M. (2016). Bacteriocins Contributing in Rhizospheric Competition among Fluorescent Pseudomonas. *Annual Research & Review in Biology 11(4)* , pp. 1-9.

Morgan, J. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.,35* , pp. 299-319.

munees, A., & mulugeta, K. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - science. , 26*, 1-20.

Munns, , R., & A, , T. (1986). *Whole-plant responses to salinity*.

Munns, R. (2009). Strategies for Crop improvement in Saline Soils. Chapter 11. In M. Ashraf, M. Ozturk, H.R. Athar (ed.), Salinity and water stress, improving crop efficiency. *Springer Science. Business Media B.V* .

Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). *Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. Applied Soil Ecology 105(2016)*.

Nultsch, W. (1998). Botanique générale . p. 603.

- Nultsch, W. (1998). *Botanique générale* (éd. de Boeck). Paris: de Boeck.
- Oudjani, W. (2009). *Diversité de 25 génotypes de blé dur (Triticum durum Desf.) : étude des caractères de production et d'adaptation. Mémoire de magister : Mémoire de magister*. Constantine.
- Parida, A., & A.B., D. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotox. Environ. Safety*. 60 , pp. 324-349.
- Park, E.-J., Jeknić, Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N., et al. (2004). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *The Plant Journal* , 40 (4), 474-487.
- Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., & Fani, R. (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*. , pp. 948-955.
- Raaijmakers, J. (2009). *The rizosphere : a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms*. *Plant and soil* 321.
- Rodge, & P, S. (2016). *Isolation and Characterization of PGPR from Roots of Ficus religiosagrowing on Concrete Walls and its Effect on Plant Growth in Drought Condition*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 5.9.
- Rubin, R., Groenigen, K. K., & Hangate, B. (2017). *Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis*. Department of Biological Sciences Northern Arizona University. USA.
- Scurkson, J., Johnson, K., & Olson, R. (2002). *Estimating net primary productivity from grassland biomass dynamics measurements*. *Global change Biology* 10.8.
- Smadhi, D., & Zella, L. (2009). Céréaliculture en sec et précipitations annuelles : le cas de l'Algérie du nord. *Sécheresse*, 20 (2) , pp. 199-203.
- Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* 30. , pp. 205-240.
- Van Loon, L., PA, B., & CM., P. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol* , pp. 453–483.
- Vandamme, P., Grillis, P., Kersters, K., & Swing, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.*
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. (Oxford, Éd.) Blackwell Scientific.

Weyens, N., Van der Lelie, D., Taghavi, S., & Vangronsveld, J. (2009). Phytoremediation: plant endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology* 20, pp. 248-254.

Whipps, J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, pp. 487-511.

Young, I., & Crawford, J. (2004). *Interaction and self-organization in the soil-microbe complex*.

Zhu, J. (2007). Plant salt stress. *Encyclopedia of life sciences*.