

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 : Ecologie et environnement
Spécialité : Agro-écologie
Présenté par :

Fradj Fadhila

Louibda Hanane

Thème

Impact de l'inoculation de microbionte PGPR isolé de la rhizosphère de plantes steppiques et mise en évidence de leur intérêt agricole dans la culture de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Soutenu publiquement le : /06/2019

Jury :

Président : M. Hassani A
Encadreur : M. Boufares Kh
Examinatrice : M^{me} Chahbar S

Année universitaire 2018 / 2019

Remerciements

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.

Nos remerciements s'adressent également au Pr. Hassani A qui a suivi ce travail et accepté la présidence du jury.

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

Dédicace

A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait

A mon Père

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation, ...

A 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 et mes chères sœurs

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

Chaque jour je remercie Dieu de m'avoir donnée une famille aussi solidaire. Prenons à jamais le même chemin et tous unis.

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

A tous mes enseignants, depuis mes premières années d'études

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

Résumé

Les écosystèmes extrêmes peuvent être une source de micro-organismes inexploités capables de produire de nouveaux composés bioactifs d'intérêt agricole. En conséquence, notre recherche s'inscrit dans cette thématique et propose l'isolement de bactéries d'intérêt agricole à partir de la rhizosphère de plantes spontanées provenant des écosystèmes extrêmes. Les rhizobactéries seront caractérisés phénotypiquement, biochimiquement en premier lieu, puis soumises à une série de tests *in vitro* et *in situ* pour sélectionner les isolats les plus actifs impliqués dans l'amélioration de la tolérance 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 microbiotes racinaires appartiennent à trois familles de bactérie, Staphylococcus, Bacillus et Pseudomonas. La réponse des plantules de tomate au stress salin est variable en fonction de l'intensité du stress et des inoculations. 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 (SR), (SB). En ce qui concerne le comportement morpho-physiologique et biochimique, les résultats montrent que la plupart des plantules subissent une diminution de leur teneur en chlorophylle totale, et une augmentation de la teneur en acides aminés (proline, glycine bêtaïne) à l'exception des graines inoculées avec les souches de la rhizosphère de l'Alfa 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 : PGPR, Rhizobactéries, Stress salin, Tomate, Proline, Glycine bêtaïne, Phytostimulation, Microbiote racinaire, Biofertilisation.

Abstract

Extreme ecosystems can be a source of untapped micro-organisms capable of producing new bioactive compounds of agricultural interest. As a result, our research is part of this theme and proposes the isolation of bacteria of agricultural interest from the rhizosphere of spontaneous plants from extreme ecosystems. Rhizobacteria will be characterized phenotypically, biochemically first and then subjected to a series of *in vitro* and *in situ* tests to select the most active isolates involved in improving salt stress tolerance applied at three concentrations 100, 200 and 300 mM.

The results of the rhizobacteria pre-identification test have allowed us to estimate that these root microbiota belong to three families of bacteria, Staphylococcus, Bacillus and Pseudomonas. The response of tomato 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 especially bacteria-contaminated seeds (SR), (SB). 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 of the rhizosphere of Alfa that 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 : PGPR, Rhizobacteria, Saline stress, Tomato, Proline, Glycine betaine, Phytostimulation, Root microbiota, Biofertilization.

Table des matières

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 01 : Partie bibliographique	4
1 Généralités sur la tomate	4
1.1. Systématique de la tomate	4
1.2. Description botanique de la plante	5
1.2.1 Le type de croissance de la plante	5
1.2.2 La nature du collet des fruits à la maturité	6
1.3. Importance nutritionnelle	6
1.3.1 Dans le monde	6
1.3.2 En Algérie	7
2 Définition de stress	9
2.1. Stress abiotiques	9
2.2. Différentes stratégies d'amélioration des cultures contre le stress salin.....	10
3 Diversité microbienne du sol.....	12
3.1. La rhizosphère	12
3.2. Les rhizobactéries	13
3.3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.....	13
Chapitre 02 : Matériel et Méthodes	15
4 Objectif de l'étude	15
5 Développement méthodologique.....	16
5.1. Matériel biologique	16
5.2. Prélèvement des échantillons	17
5.2.1 Procédures d'isolement et purification des souches	17
5.3. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des isolats	19
5.3.1 Caractères morphologiques	19
5.3.2 Caractères microscopiques	19

5.3.2.1. Coloration différentielle de Gram.....	19
5.3.3 Caractères biochimiques	20
5.4. Germination des graines	22
5.5. Effets in vivo des isolats sur la croissance de la Tomate	24
6 Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpho- biochimiques de la Tomate en milieu salin	25
6.1. Effets de l'inoculation sur le taux de germination en milieu salin	25
6.2. Paramètres morphologiques	26
6.2.1 Longueur moyenne des racines	26
6.3. Paramètres biochimiques.....	26
6.3.1 Dosage de la chlorophylle totale	26
6.3.2 Dosage de la proline	27
6.3.3 Dosage de la glycine bêtaïne	28
Chapitre 03 : Résultats et discussion	29
6.4. Identifications des souches bactériennes	29
7 Analyse de l'effet de l'inoculation sur les paramètres morpho- biochimiques.....	30
7.1. Effets de l'inoculation sur le taux de germination en milieu salin	30
7.2. Effets de l'inoculation sur la moyenne des longueurs de racines en milieu salin	33
7.3. Paramètres biochimiques.....	34
7.3.1 Teneur en chlorophylle	34
7.4. Teneur en proline.....	35
7.5. Teneur en glycine bêtaïne.....	37
Conclusion.....	39
Listes des Annexes	40
Références bibliographiques	41

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
AF	Analyse factorielle
CFU	Colony forming units
Chl	Chlorophylle
Desf.	Desfontaines (botaniste)
DO	Densité optique
EDS	Eau distillée stérile
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations.
GB	Glycine Bétaïne
ITGC	Institut Technique des Grandes Cultures
M	Molaire
MF	Matière fraîche
mM	Millimolaire
N₂	Diazote
NH₃	Ammoniac
nm	Nanomètre
OAIC	Office algérien interprofessionnel des céréales
PGP	Plant growth promoting
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
rpm	Rotation par minutes
sp.	Species singular (espèce).
spp.	Species plural (espèces).
UV	Ultraviolet
var.	Variété.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux pays producteurs de la tomate en 2011.	6
Tableau 2 : Evolution de la production de la tomate en frais en Algérie entre (2001-2011).	8
Tableau 3 : Processus métaboliques dus aux microorganismes dans le sol.	14
Tableau 4 : Quantité de sels utilisés lors de la préparation des solutions salines.	23
Tableau 5 : Résultats du test de préidentification des rhizobactéries.	29

Liste des figures

Figure 1 : Différents organes de la tomate.	5
Figure 2 : Les mécanismes d'action des rhizobactéries	14
Figure 3 : Protocole expérimental.	16
Figure 4 : Photographies des deux plantes.	16
Figure 5 : Situation géographique de la zone de prélèvement	17
Figure 6 : Différentes étapes d'isolement des rhizobactéries.	18
Figure 7 : Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des isolats.	20
Figure 8 : Caractérisation chimiques rhizobactéries.	22
Figure 9 : Dispositif d'évaluation de l'effet des souches rhizobactériennes sur la germination.	23
Figure 10 : Evaluation des effets combinés stress et bactéries sur la plante en pots sous serre.	25
Figure 11 : Mesure de la chlorophylle par chlorophylle-mètre.	27
Figure 12 : Effet combiné du stress salin et de l'inoculation sur le taux de germination.	31
Figure 13 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la longueur des racines.	33
Figure 14 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en chlorophylle totale.	34
Figure 15 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en proline.	36
Figure 16 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en glycine bétaïne.	37

Introduction

La croissance rapide de la population humaine pose de plus en plus un nombre de défis agricoles et alimentaires. L'altération de la biodiversité, la dégradation des environnements et la diminution de la disponibilité des nutriments obligent à exploiter les ressources naturelles et à trouver des outils performants pour diminuer le risque dû aux facteurs environnementaux (Ashraf, M, et al., 2012).

L'ONU avait annoncé que la population mondiale a dépassé 7 milliards habitant sur terre en 2011, (Ashraf, M, et al., 2012). Cette population croissante exigera une quantité et une qualité croissante de nourriture provenant de l'agriculture. Pour répondre à ces nouvelles exigences, un doublement de la production sera probablement nécessaire dans les quarante prochaines années. À titre d'exemple, la demande mondiale de céréales devrait augmenter de 585 millions à 828 millions de tonnes en 2025, ce qui correspond à une augmentation de 42% (Waughray, 2011).

L'explosion démographique ne constitue pas la seule contrainte affectant la production agricole. En l'occurrence, plusieurs activités humaines, principalement liées à l'industrialisation et l'utilisation excessive des hydrocarbures, mais aussi à d'autres pratiques agricoles comme l'irrigation et l'application hystérique des fertilisants, pesticides et herbicides chimiques ont amélioré, ensemble, la vie humaine. Malheureusement, ces activités ont parallèlement provoqué une accumulation de quantités considérablement accrues de produits toxiques de différentes natures, menant à une dégradation sans précédent des terrains agricoles et à une privation des sols (Tak, H. I & Ahmad, F, 2013). Ainsi, une accentuation des changements climatiques de la planète, les pertes de la biodiversité, une diminution des réserves planétaires en eau, une dégradation de l'environnement et une salinisation des terrains agricoles en sont les résultats (Shahbaz, M. & Ashraf, M, 2013).

L'Algérie, un pays englobant toutes les variantes du climat méditerranéen, n'échappe pas à ce phénomène. La sécheresse observée depuis longtemps a conduit manifestement au processus de salinisation des sols sur 3,2 millions d'hectares affectés (Benmahioul B, et al., 2009).

Cette salinisation est plus marquée dans les régions steppiques 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 (Munns.R, 2009).

Cette salinisation conduit à l'appauvrissement des sols en matières organiques et à l'accumulation d'ions toxiques. Par conséquent, les terres agricoles productives sont détériorées. D'un autre côté, l'accroissement de la population a augmenté la demande pour les produits

agricoles. Ceci n'a pas seulement menacé la suffisance des ressources alimentaires disponibles, mais aussi a nécessité l'exploitation de terres marginales cultivées (Munn J, M, et al., 2008).

Selon les chercheurs, la résolution de ce problème résiderait l'amélioration des procédures de gestion et de choix appropriés aux cultivars des plantes, la sélection et l'amélioration de souches bactériennes osmotolérantes promotrices de la croissance des plantes (PGPR), et l'utilisation d'engrais naturels ne provoquant pas l'accumulation des ions toxiques (Ghoul.M, 1990; Nabti E, et al., 2007).

En effet, l'application des PGPR ; de l'anglais : « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » constitue une importance majeure dans l'agriculture, elle permet d'améliorer la croissance des plantes par une multitude de mécanismes y compris l'amélioration de la disponibilité des minéraux par la dégradation de la matière organique, la chélation du fer, la solubilisation de certains éléments tels que le phosphate, la production de phytohormones de croissance, etc...

C'est dans ce contexte que les bio-alternatives y compris les PGPR sont considérées comme des options viables et efficaces pour résoudre ces problèmes.

Cette étude a pour but d'isoler et de caractériser de nouvelles souches bactériennes isolées à partir la rhizosphère du l'alfa et l'armoïse. (Région de d'Ain deheb wilaya de Tiaret), et d'évaluer leurs effets sur la croissance des plantes (une plante modèle a été choisie : la tomate).

Les principaux objectifs de l'étude :

- L'isolement et caractérisation des nouvelles souches PGPR à partir de la rhizosphère du l'alfa et l'armoïse ;
- évaluer l'impact de la salinité sur l'inoculation des plantes à travers des essais *in vitro* et en conditions contrôlées sous serre ;
- mettre l'accent sur certains mécanismes physiologiques et moléculaires associés à la tolérance de cette symbiose au stress salin.

Pour répondre à ces objectifs, le présent travail s'articule autour de trois chapitres.

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur les travaux portant sur les PGPR et leur utilisation et la plante.

Le second chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés pour répondre aux objectifs de cette recherche.

Le troisième chapitre constitue les résultats et discussion obtenus dans les différentes expériences

Enfin, nous terminons notre étude par une conclusion générale où sont récapitulés les principaux résultats obtenus

Chapitre 1 : Partie bibliographique

Chapitre 01 : Partie bibliographique

1 Généralités sur la tomate

Le terme tomate dérive du mot Nahuatl «tomalt», elle est originaire des Andes d'Amérique du Sud, fut domestiquée au Mexique, puis introduite en Europe en 1544. De là, sa culture s'est propagée en Asie du Sud et de l'Est, en Afrique et au Moyen-Orient, par la suite, la tomate a été introduite dans d'autres régions d'Amérique du Nord (Naika S, et al., 2005).

En Algérie, la tomate a été introduite par les cultivateurs du sud de l'Espagne. Sa culture a commencé dans la région d'Oran en 1905 puis, elle s'étendit vers le centre, notamment au littoral Algérois (Latigui A, 1984). Les botanistes ont attribué plusieurs nominations à la tomate, à savoir, « *Solanum esculentum*, *Solanum lycopersicum* L, ou *Lycopersicon lycopersicum* » et le nom finalement retenu est *Lycopersicon esculentum* Mil. Qui est attribué par Philip Miller en 1754 (Blancard D, et al., 2009).

Le nom du genre « *Lycopersicon* » est un mot Gréco-latin qui signifie « pêche de loup » et le nom de l'espèce « *esculentum* » signifie « comestible », cette comestibilité concerne, les fruits mûrs, car les feuilles et les jeunes fruits verts contiennent des alcaloïdes (tomatines et solanines) très toxiques, qui disparaissent lors de la maturation (Chaux C. & Foury C, 1994)

1.1. Systématique de la tomate

La tomate appartient à l'embranchement de Rosophytea, le sous-embranchement de Rosophytina, la classe des Magnoliopsida, la sous-classe des Asteridae, l'ordre de solanales, les familles des solanacées, au genre *lycipersicum* et elle a comme nom scientifique *lycopersicum esculentum*. D'après Arbaoui (1997), la tomate est classée dans :

Règne :	Plantae
Sous-règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Polémoniacée
Famille :	Solanaceae
Genre :	<i>Lycopersicum</i>

Espèce : *Lycopersicon esculentum* L.

1.2. Description botanique de la plante

La tomate est une plante maraichère, herbacée, annuelle, appartenant à la famille des Solanaceae. Elle est aromatique lorsqu'on la froisse, sa taille varie entre 40 cm à plus de 5 mètres selon les variétés et le mode de culture (Blancard D, et al., 2009).



Figure 1 : Différents organes de la tomate.

Les fleurs des variétés cultivées sont groupées en inflorescences simples ou ramifiées, leur nombre est variable allant de 5 à 12. Les fruits ce sont des baies charnues, tendres, lisses ou creusées de sillons. La pulpe est divisée en loges contenant les graines dans le mucilage (Bernard.C, 2009).

Selon (Blancard D, et al., 2009), il existe plusieurs caractères distinctifs qui permettent de différencier entre les variétés de la tomate.

1.2.1 Le type de croissance de la plante

- ✓ Croissance déterminée : La plante arrête son développement après 2 à 5 inflorescences et les pousses latérales stoppent leur développement après 1 à 3 inflorescences.
- ✓ Croissance indéterminée : la plante produit 7 à 10 feuilles et une inflorescence, puis à chaque fois, elle produit 3 feuilles et une inflorescence.

1.2.2 La nature du collet des fruits à la maturité

- ✓ Collet vert foncé avant maturité, se colorant plus ou moins comme l'ensemble de fruits par la suite.
- ✓ La forme et le calibre des fruits : Les fruits peuvent présenter des morphologies et des tailles assez différentes en fonction des variétés : plus ou moins gros, aplaties, cylindriques, elliptiques, cordiformes, ovales, en forme de poire, lisses ou côtelées.
- ✓ La couleur de fruits : Les fruits révèlent également une coloration distincte suivant les variétés : Rouges, jaunes, orangés, crèmes, bruns, montrant des zébrures plus foncées.
- ✓ La résistance aux bio-agresseurs et aux maladies non parasitaires : Il s'agit d'un caractère désignant la sensibilité de la plante aux différents bio-agresseurs. Généralement ce caractère est monogénique dominant mentionné dans le catalogue des semenciers. Il est ne se distinguant pas du reste des fruits qui est donc de couleur uniforme

1.3. Importance nutritionnelle

1.3.1 Dans le monde

La tomate est l'une des principales productions légumières dans le monde, elle est cultivée sous toutes les latitudes sur une superficie d'environ 4,73 millions d'hectares (FAO, 2011). La production de la tomate a progressé régulièrement, elle est passée de 48 millions de tonnes en 1978 à 159 millions de tonnes en 2011 (Blancard D, et al., 2009); (FAO, 2011).

Tableau 1 : Principaux pays producteurs de la tomate en 2011.

Classement	Pays	Production	Classement	Pays	Production
1	Chine	48.57	8	Brésil	4.41
2	Inde	16.82	9	Espagne	3.82
3	États-Unis	12.62	10	Ouzbékistan	2.58
4	Turquie	11.00	11	Mexique	2.43
5	Egypte	8.10	12	Russie	2.20
6	Iran	6.82	13	Ukraine	2.11
7	Italie	5.95	14	Tunisie	1.28

Source : (FAO, 2011)

1.3.2 En Algérie

La tomate occupe une place privilégiée dans le secteur maraîcher en Algérie. Elle est considérée comme une espèce prioritaire et classée en troisième lieu après la pomme de terre et l'oignon. La production moyenne en 2011 est de 790 mille tonnes avec un rendement moyen de 336 Qx / ha ((Snoussi S.A, 2010) ; (FAO, 2011)). La superficie totale réservée pour cette culture est de 23500 ha, dont la répartition géographique est tributaire des conditions climatiques d'une part et de la vocation des terres d'autre part. Les zones réservées pour la tomate sont concentrées au niveau :

- ✓ Des plaines du littoral à climat tempéré : Alger, Tipaza, Bejaia, Oran, Annaba, Skikda.
- ✓ Centre : Blida, Ain Defla, Chlef.
- ✓ Le Sud à climat aride (Biskra) : Dans ces régions, les investissements sont très importants, du fait du climat qui permet d'avoir des récoltes entre décembre et avril avec des rendements qui peuvent atteindre jusqu'à 750 Qx / ha (Snoussi S.A, 2010)

Tableau 2 : Evolution de la production de la tomate en frais en Algérie entre (2001-2011).

Année	Production (tonnes)	Rendement (Qx / ha)	Surface cultivée (ha)
2001	830, 531.00	208, 518.96	39, 830.00
2002	814, 941.00	191, 705.72	42, 510.00
2003	887, 097.00	193, 985.63	45, 730.00
2004	1, 092, 270.00	233, 695.63	46, 729.00
2005	1, 023, 450.00	241, 641.88	42, 354.00
2006	796, 160.00	256, 784.39	31, 005.00
2007	567, 313.00	282, 540.47	20, 079.00
2008	559, 249.00	284, 532.69	19, 655.00
2009	641, 034.00	308, 352.49	20, 789.00
2010	718, 240.00	336, 412.18	21, 350.00
2011	790, 000.00	336, 170.21	23, 500.00

Source : (FAO, 2011)

2 Définition de stress

De nombreux facteurs entraînent une baisse de la productivité des cultures conduisant à l'insécurité alimentaire en particulier dans les pays en voie de développement. Parmi ces facteurs, la disponibilité des terres agricoles, les ressources en eau douce, une faible activité économique dans le secteur agricole et l'incessante croissance des stress biotiques et abiotiques. Il est généralement admis que les stress abiotiques sont considérés comme la principale cause de la chute du rendement agricole (Nultsch, 1998). Les pertes potentielles de rendement sont estimées à 17 % dues à la sécheresse, 20 % à la salinité, 40 % à la température élevée, 15 % à la basse température et 8 % à d'autres facteurs (Ashraf, M, et al., 2012).

2.1. Stress abiotiques

La sécheresse et la salinité sont deux stress abiotiques majeurs qui influent sur différents aspects de la vie humaine d'une population, dont la santé humaine et la productivité agricole. Selon les rapports de l'ONU, les changements climatiques ont augmenté la fréquence et l'intensité de la pénurie d'eau dans les zones sub-tropicales d'Asie et d'Afrique. Il est attendu, si la situation persiste, que d'ici 2025, 1,8 milliard de personnes vivront dans des régions où la pénurie d'eau est absolue. Comme la pénurie d'eau, la forte concentration de sels solubles est une autre menace pour les vies humaines. Le problème de la salinité existe depuis longtemps. L'augmentation de la sécheresse et la salinité entraîne une baisse de la productivité agricole et cause la dégradation des terres arables. À l'heure actuelle, l'étendue des terres affectées par la salinité à travers le monde ne cesse d'augmenter (Marouf & Raynaud, 2007) et constitue une entrave majeure et grave pour la production agricole (Munees & Mulugeta, 2013) en particulier dans les zones arides et semi-arides. Selon une estimation de la FAO en 2008 plus de 6 % des terres de la planète sont touchés par la salinité. En outre, sur 230 millions d'hectares de terres irriguées, 45 millions d'hectares (environ 20%) en sont affectés. Cependant, l'intensité du stress de la salinité varie d'un endroit à l'autre. En général, la salinité des terres arides a été classée en trois types différents : faible salinité (C_e 2-4 dS / m), salinité modérée (C_e 4-8 dS / m) et salinité élevée ($C_e > 8$ dS/m) (Ben Ahmed, et al., 2008). Selon le type de source à partir de laquelle le sol est devenu salin, la salinité peut être classée en salinisation primaire et secondaire :

- La salinisation primaire ou naturelle est due à l'altération des minéraux et des sols issus de roches mères salines
- La salinisation secondaire est causée par l'interférence humaine : l'irrigation, la déforestation, le surpâturage ou la culture intensive (Ben Ahmed, et al., 2008).

2.2. Différentes stratégies d'amélioration des cultures contre le stress salin

De nombreuses stratégies peuvent être adoptées pour faire face à la salinité. Les deux importantes développées sont les approches technologiques et biotiques (Rabie & Almadini, 2005) :

L'approche technologique consiste à modifier le sol salé par des mesures de remise en état et par des pratiques permettant aux plantes de se développer et de produire un rendement raisonnable. Cependant, ces méthodes sont coûteuses et ne sont pas toujours une solution convenable au problème de la salinité des sols.

L'adoption d'une approche biotique a été proposée pour contrer le problème (Salehi, et al., 2008). Cela a été possible pour deux raisons principales: (i) l'absorption et l'assimilation des nutriments minéraux, y compris Na^+ et Cl^- sont génétiquement contrôlées et peuvent être manipulées (Park, et al., 2004), (ii) certaines plantes ont la capacité de se développer dans des conditions salines élevées (Nultsch, 1998) . L'approche biotique est prometteuse et considérable pour atténuer le problème de la salinité du sol. Par conséquent, il est très important de développer une méthode fiable, rapide, simple, pratique et économique d'évaluation pour le dépistage des génotypes tolérants au sel.

Bien que des travaux considérables ont été accomplis pour la réalisation de cet objectif par le biais d'élevage conventionnel, ces progrès ne sont pas satisfaisants en vue de la demande actuelle croissante de la productivité des cultures dans un environnement salin. Le développement de plantes tolérantes au stress salin est très important pour répondre à la demande alimentaire croissante. Diverses recherches visant à développer des cultures tolérantes au sel ne sont pas une démarche facile et économique pour une agriculture durable, alors que l'inoculation microbienne pour diminuer le stress salin est une meilleure option (Amini & Ehsanpour, 2005).

L'utilisation des microorganismes comme inocula dans l'agriculture est l'approche la plus prometteuse afin d'améliorer la production et le rendement dans les régions touchées par la salinité. La grande opportunité pour la recherche sur la tolérance à la salinité est la capacité d'utiliser les bactéries comme inoculant et d'attirer l'attention sur les stratégies futures de la recherche pour le développement d'une meilleure croissance des plantes en utilisant différentes bioformulations. Outre la bioformulation, la remise en état et l'amélioration de la fertilité des sites stressés est une autre visée à considérer. L'approche prometteuse pour s'attaquer au

problème de la salinité des sols en utilisant les microorganismes bénéfiques fera la plus grande contribution à l'économie agricole, si peu coûteuse et facile à utiliser (Bernard.C, 2009).

3 Diversité microbienne du sol

Le sol supporte une large proportion de la biodiversité terrestre. Il héberge en effet une grande diversité d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) dont la plupart sont responsables de processus de biotransformation et de transfert des éléments ou des composés. Cette diversité biologique est associée à une importante diversité fonctionnelle et à une grande complexité des interactions écologiques. Ainsi de nombreux processus se déroulant dans le sol sont assurés par des organismes très variés (bactéries, champignons, protozoaires, racines, faune). Les organismes du sol affectent aussi la productivité végétale, que ce soit de manière directe ou indirecte (modifications des cycles du carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites et pathogènes). La distribution dans le temps et dans l'espace des processus biologiques n'est ni aléatoire, ni homogène. Les activités des organismes du sol sont concentrées dans des sites généralement associés à la disponibilité en substrats carbonés. C'est ainsi que les habitats microbiens sont associés aux fractions organiques, aux agrégats, à la litière en décomposition, au sol influencé par les vers de terre et au contact étroit des racines (rhizosphère) (Young & Crawford, 2004).

3.1. La rhizosphère

La rhizosphère est le volume de sol influencé par les racines. On distingue en général le rhizoplan qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence. Elle est le lieu des échanges entre sol, racines, microorganismes et faune associés. Ces échanges, intenses, se traduisent par des flux bidirectionnels d'eau et de nutriments (Lynch, 1990). La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance. Dans la rhizosphère jusqu'à 30 % des composés photosynthétisés par la plante sont remis à la disposition des micro-organismes qui y vivent par le biais d'un phénomène appelé exsudation racinaire. Ces exsudats racinaires incluent une grande quantité d'acides organiques et de sucres ainsi que des composés organiques complexes. Ils sont transformés en biomasse microbienne ou réoxydés en CO₂. La richesse de la rhizosphère en sucres, en amino-acides, en acides organiques, en isoflavonoïdes, en régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante, rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries (Gobat, et al., 2010).

3.2. Les rhizobactéries

Un grand nombre de microorganismes vivent dans le sol. On compte les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires et les algues. Les bactéries sont les organismes les plus nombreux et représentent en moyenne 6.10^8 cellules par gramme de sol et un poids de 10000 kg/ha équivalant à 5 % du poids sec des composés organiques du sol. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries (Balesdent, et al., 2015). Celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Bourbonnais, 2010). Si la plante libère des composés organiques, à l'inverse elle prélève de l'eau et des éléments minéraux indispensables à son métabolisme. Les échanges entre la plante et le sol sont influencés par les rhizobactéries et ce d'autant plus que leur densité et leur activité sont élevées. Les rhizobactéries sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement comTomates à l'intérieur même de la rhizosphère. Les rhizobactéries utilisent en effet de nombreux substrats provenant de la plante: les cellules corticales et épidermales des racines qui se détachent, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, etc. (Bais, et al., 2006). L'abondance des bactéries dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et d'éléments nutritifs (Balesdent, et al., 2015).

3.3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes

Les rhizobactéries connues sous le terme PGPR stimulent directement la croissance de plantes en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Elles stimulent indirectement la croissance des végétaux par leur effet antagoniste sur la microflore néfaste, en transformant les métabolites toxiques et en stimulant la nodulation des légumineuses par les Rhizobia. L'établissement de l'association PGPR-plante est primordiale pour l'expression des effets bénéfiques. Les rhizobactéries sont les bactéries ayant la capacité de coloniser les racines de façon intense. Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp. fluorescents* (Bais, et al., 2006).

Plusieurs études sur la relation PGPR/amélioration de l'absorption des nutriments ont conclu que l'application des inoculations bactériennes améliore considérablement l'absorption du N, P, et K.

En outre, le processus d'inoculation avec *Azospirillum* et *Bacillus* spp. a montré une nette accumulation de ces minéraux dans les tissus de la plante (Delarras, 2007).

Tableau 3 : Processus métaboliques dus aux microorganismes dans le sol.

La fixation biologique de l'azote	Conversion bactérienne de l'azote moléculaire en ammoniac
L'immobilisation	L'absorption et l'assimilation de l'ammonium ou de nitrate par les microorganismes
Ammonification	Catabolisme bactérien et fongique de la matière organique azotée dans le sol en ammonium.
Nitrification	L'oxydation bactérienne de l'ammonium en nitrite puis des nitrites en nitrates.
Dénitrification	Conversion bactérienne du nitrate en oxyde nitreux et en azote moléculaire.
Minéralisation	Catabolisme bactérien et fongique de la matière organique dans le sol en azote moléculaire à travers l'ammonification ou la nitrification.

La source : (Prescott, 2002).

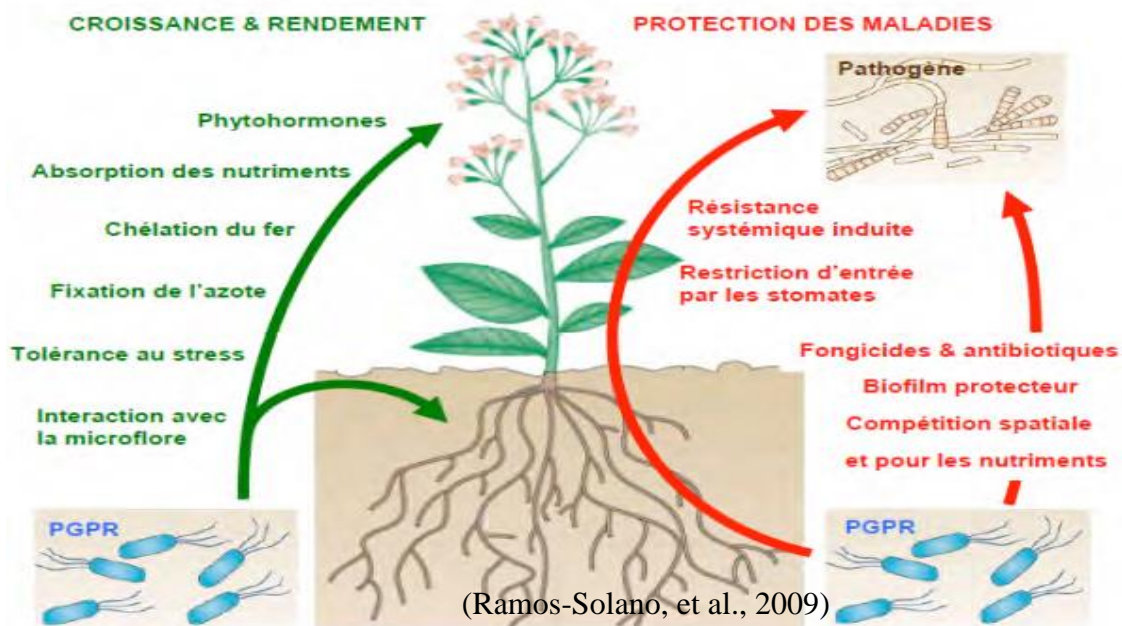


Figure 2 : Les mécanismes d'action des rhizobactéries

Chapitre 02 : 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), isolés 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 préidentification 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 Tomate (*Solanum lycopersicum* L) 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 :

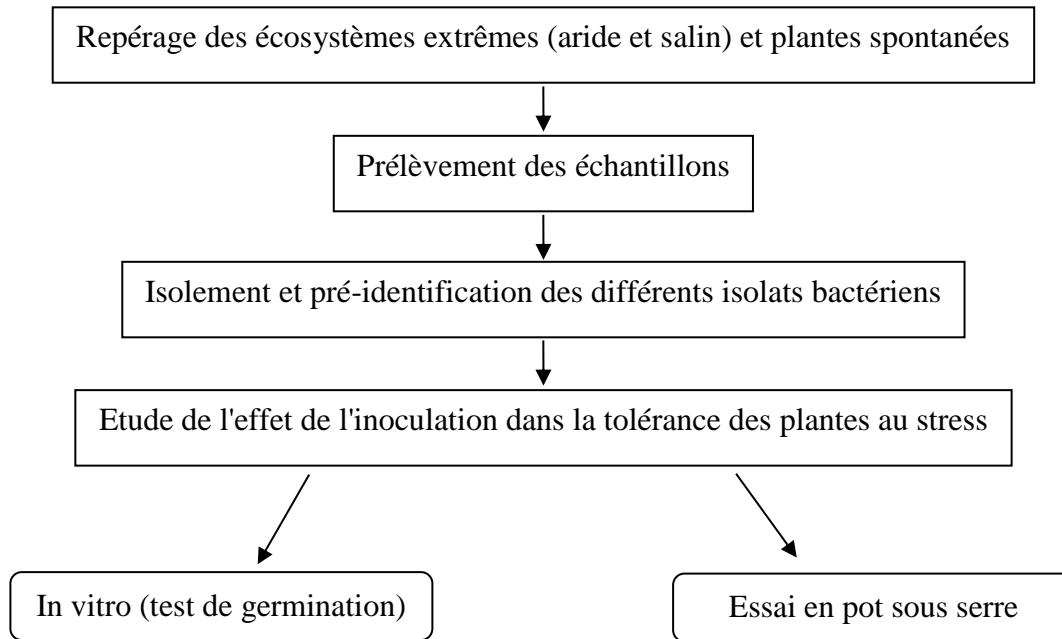


Figure 3 : Protocole expérimental.

5 Développement méthodologique

5.1. Matériel biologique

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



L'armoise blanche

L'alfa

Figure 4 : Photographies des deux plantes.

Le matériel végétal ayant fait l'objet de cette étude est composé de semences de Tomate (*Solanum lycopersicum L.*) variété « Zahra », couramment cultivée en Algérie.

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 (Benkhattou, et al., 2016). Le choix des sites s'est basé sur la diversité édapho climatique pouvant influencer la composition de la microfaune Rhizosphérique.

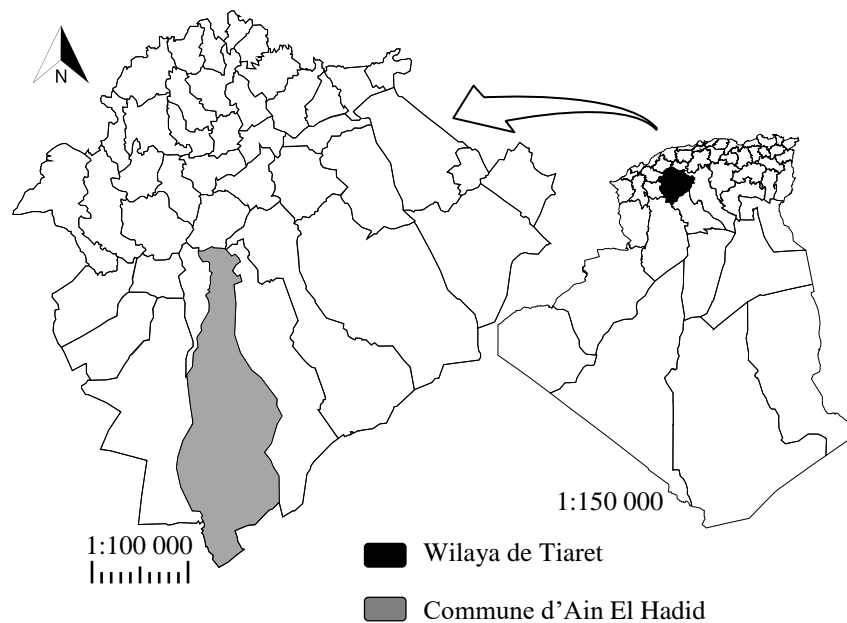


Figure 5 : Situation géographique de la zone de prélèvement

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°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.

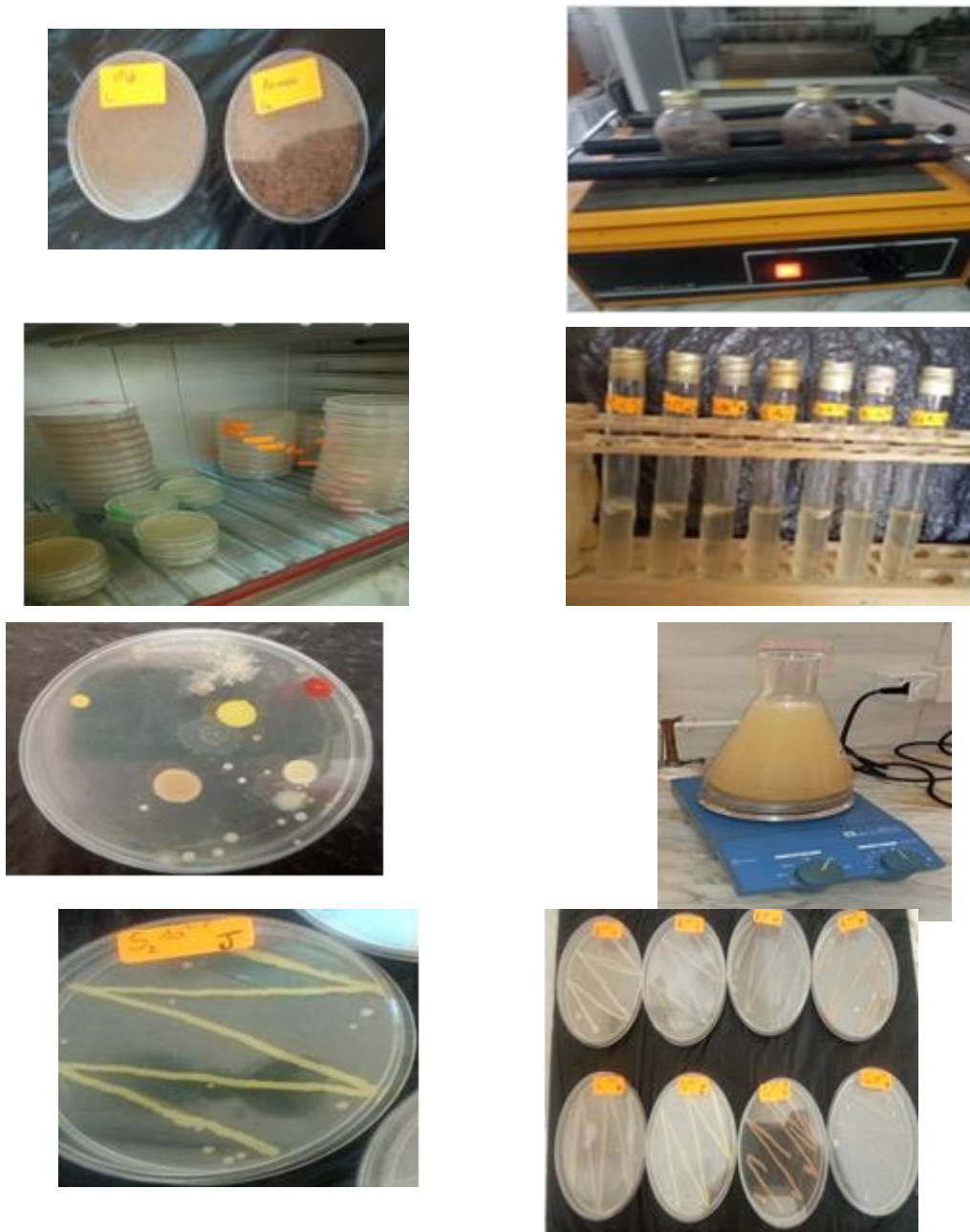


Figure 6 : Différentes étapes d'isolement des rhizobactéries.

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, et al., 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.

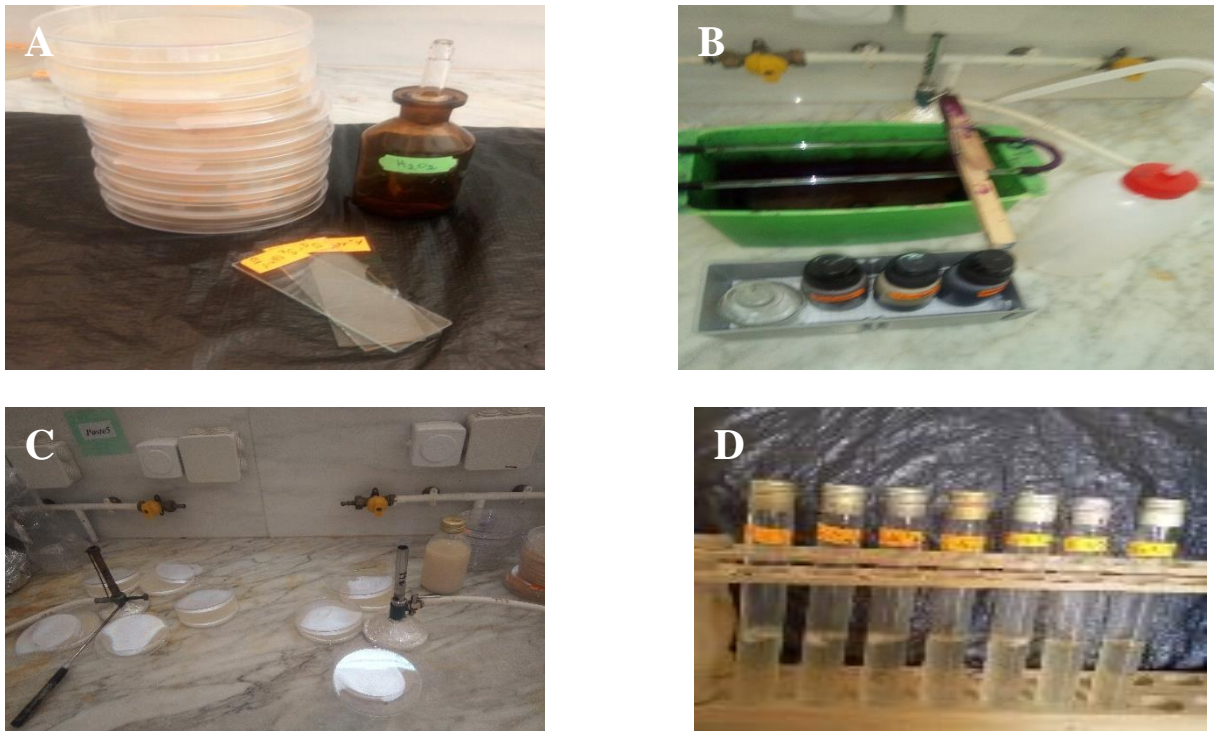


Figure 7 : Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des isolats.

A : Teste catalase. **B** : colorations de Gram. **C** : solubilisations de phosphate. **D** : teste indole.

5.3.3 Caractères biochimiques

Test catalase :

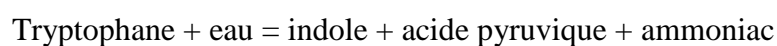
La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage.



La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H_2O_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±2°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°C pendant 72 heures. La présence d'un halo indique la production de substances dissolvant le phosphore (Gaur, 1990).

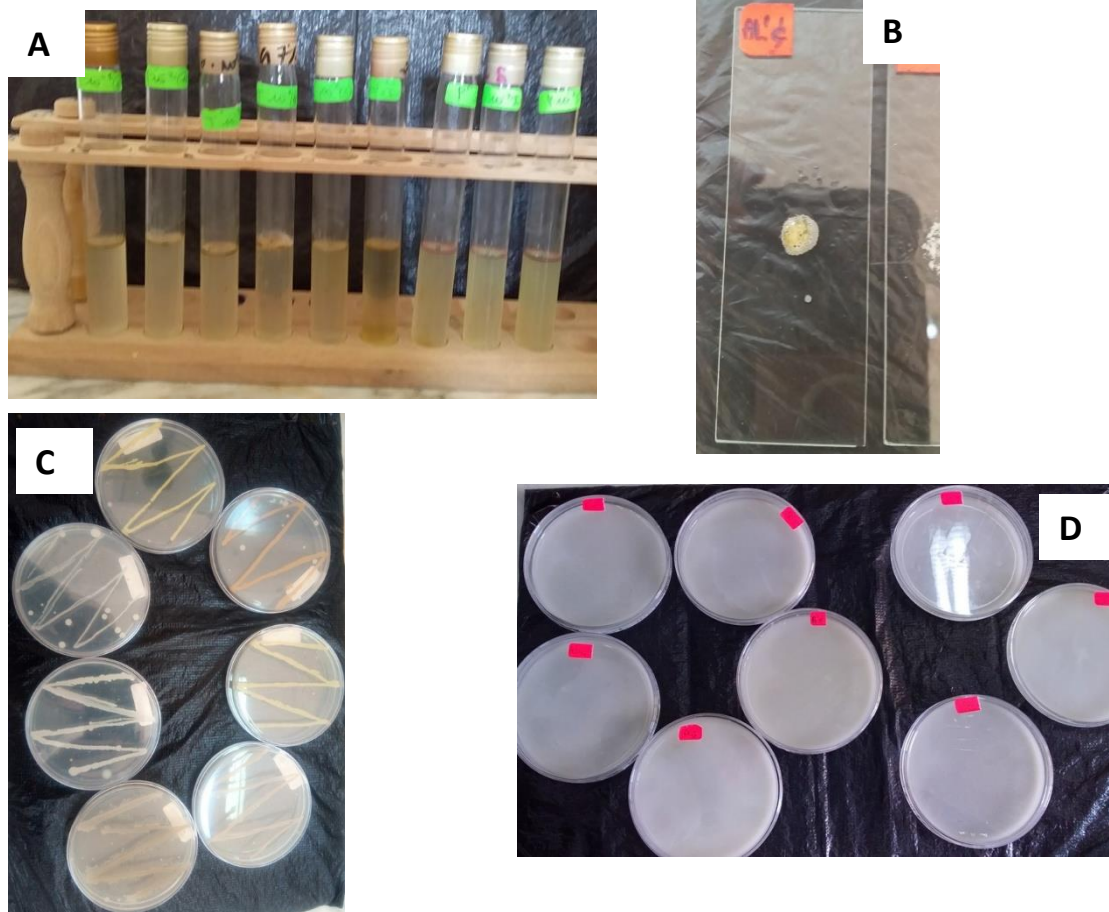


Figure 8 : Caractérisation chimiques rhizobactéries.

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 Tomate 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 4 : Quantité de sels utilisés lors de la préparation des solutions salines.

	100 mM	200 mM	300 mM	Témoin
NaCl g.L ⁻¹	5.84	11.68	17.53	Eau distillée



Figure 9 : 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 0.5 cm 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 de la Tomate

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 8 graines 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 10).

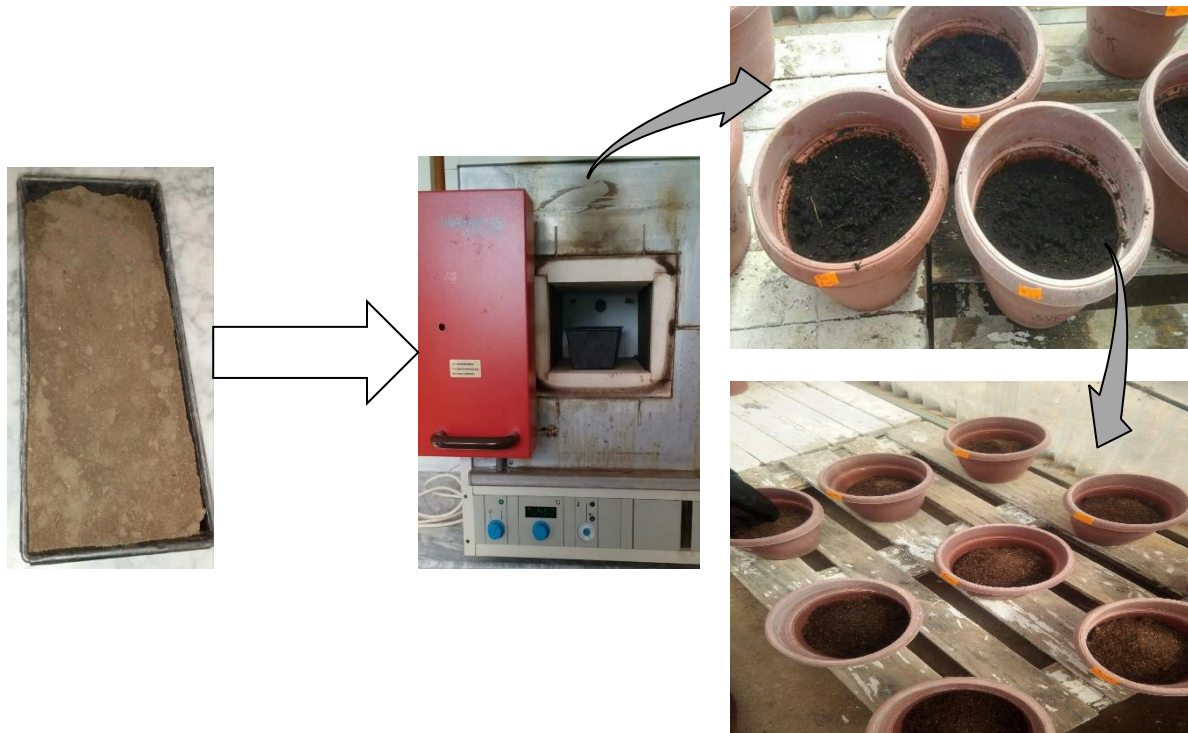


Figure 10 : Evaluation des effets combinés stress et bactéries sur la plante en pots sous serre.

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

6 Effets de l'inoculation bactérienne sur la croissance et sur les paramètres morpo- biochimiques de la Tomate 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-502Plus KONICA 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. 11) 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 11 : 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 (CH_3COOH), 1 ml d'un mélange contenant (12ml d'eau distillée, 30ml d'acide acétique, 80 ml d'acide ortho phosphorique (H_3PO_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 Na_2SO_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, et al., 1973) :

6.3.3 Dosage de la glycine bétaïne

Le dosage de la glycine bétaïne 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 NH₂SO₄), 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 bétaïne est déterminée en se rapportant à une courbe standard préparée à partir d'une solution de la glycine bétaïne préparée dans l'acide sulfurique 2 N sur la base de concentrations connues (150-300 µg/mL) (annexe).

La gamme étalon se fait par un mélange (H₂SO₄, 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 bétaïne obtenue après optimisation de la longueur d'onde et temps de lecture après dissolution des cristaux de glycine bétaïne dans le 1,2-dichloroéthane.

Chapitre 03 : Résultats et discussion

Chapitre 03 : Résultats et discussion

6.4. Identifications des souches bactériennes

L'observation des colonies bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de l'alfa et l'armoise a révélé différents types de colonies, aux caractéristiques similaires pour quelques-unes et relativement variables pour d'autres.

Tableau 5 : Résultats du test de préidentification des rhizobactéries.

	SO	SB	SR	SM	SJ	SMc	SG
La forme	Cocci	Cocci o bacille	Bacille	Cocci-	Cocci- bacille	Bacille	Bacille
couleur	orange	blanc	rose	marron	jaune	Marron claire	gris
Coloration de gram	G+	G+	G-	G+	G+	G-	G-
catalase	+	+	-	+	+	-	-
indole	-	-	-	-	-	-	-
Fixation d'azote	-	+	+	+	-	+	+
Solubilité de phos	-	+	-	+	+	-	+
Genre	Staphylococcus	Bacillus	Pseudomonas	Staphylococcus	Bacillus	Pseudomonas	Pseudomonas

Ces PGPR ont été identifiés comme : Staphylococcus (SO, & SM) et Bacillus (SB & SJ) et Pseudomonas (SR, SMc & SG) selon les catalogues d'identification. Bacillus représente le genre bactérien le plus dominant dans la rhizosphère de tomate. Cette observation est confirmée par Rawat et al. et peut être attribuée à la capacité de Bacillus à former des endospores et à produire des substances antimicrobiennes qui inhibent l'apparition d'autres compétiteurs dans la rhizosphère. De même, les bactéries appartenant au groupe des Pseudomonas sont parmi les bactéries à Gram négatif les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Kaioua et GrairiImene,

2015), dans une étude réalisée par Singh et al (Singh, et al., 2013) ont trouvé que sur 7 souches isolées à partir de la rhizosphère de la tomate, les Bacillus et les Pseudomonas représentent plus des 75% des isolats (02 isolats sont des Bacillus et 03 isolats sont des Pseudomonas 02 isolats sont Staphylococcus).

Les Pseudomonas sont des bacilles à Gram négatif, asporulants, de forme droite ou légèrement courbée. Les Pseudomonas ont la capacité à croître à des températures extrêmes qui varient de 4°C à 42°C. Toutes les espèces ou souches saprophytes se multiplient à des températures optimales situées entre 28°C et 30°C (Kushwaha, et al., , 2013). Quelques espèces, comme *P. syringae*, sont phytopathogènes (karhikeyan, et al., 2015). Les Pseudomonas ont un taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries. Ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire.

Bacillus, ils comprennent les espèces d'intérêts industriels, biotechnologiques et environnementaux, ainsi que des souches cliniquement importantes (Slepecky & Hemphill, 2006). En termes de propriétés métaboliques, ils présentent un groupe très diversifié, car ils peuvent dégrader divers substrats et produire de nombreuses molécules, y compris les biosurfactants lipopeptidiques, les antibactériens, les antifongiques et les antiviraux (Saharan, et al., 2014.). Ils sont couramment utilisés dans l'agriculture, la production alimentaire, la chimie, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques (Grażyna, et al., 2015).

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

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

Cette expérimentation compare les résultats exprimant la variation aux taux de germination en fonction des différentes concentrations en sel (100, 200, 300 Mm et avec solution nutritive) sur la germination du Tomate.

La germination constitue un stade critique dans le cycle de développement de la plante. Elle conditionne l'installation de la plantule, sa fixation sur le milieu, et probablement sa productivité ultérieure. La germination des plantes, qu'elles soient halophytes ou glycophytes, est affectée par la salinité (Debez , et al., 2001) .

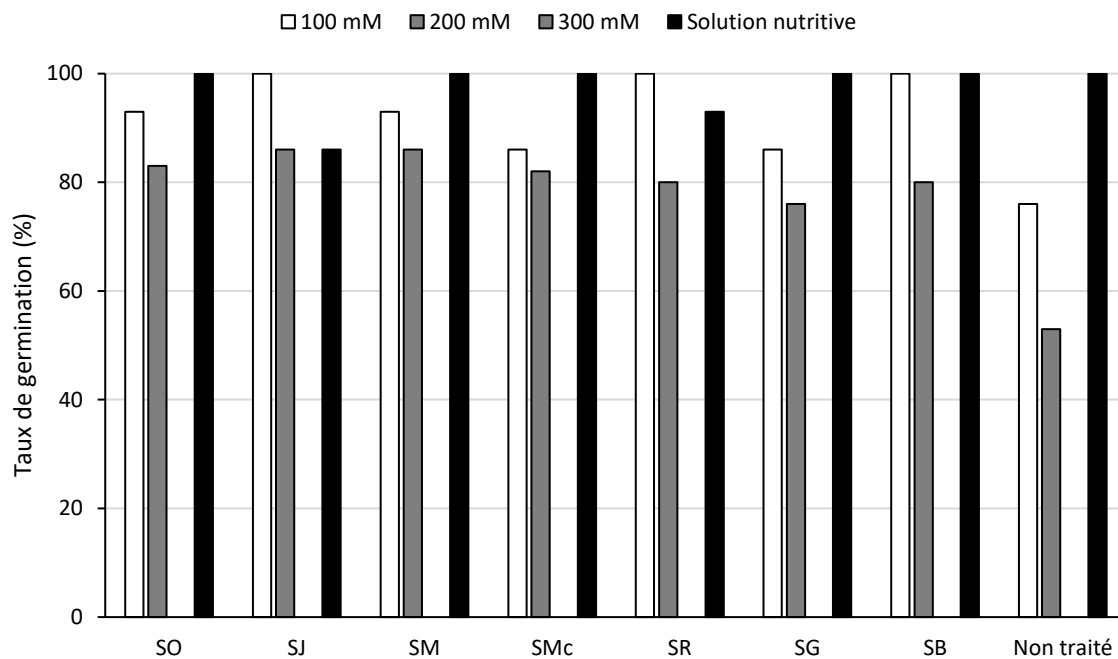


Figure 12 : Effet combiné du stress salin et de l'inoculation sur le taux de germination.

Le taux de germination des graines de la tomate est rapporté à la figure 12. Cette figure montre que la réponse des plantules de tomate 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 (76 % pour 100mM et 53 % pour 200mM) comparativement aux témoins respectifs, à l'exception des graines inoculées ont pu maintenir un taux de germination légèrement proche aux témoins (solution nutritive) (94 % pour 100mM et 79 % pour 200mM). Lorsque l'intensité du stress est encore plus élevée (300 mM), la plupart des graines sont fortement affectées et leurs taux de germination ne dépassent pas les 5 %.

D'après les mêmes chiffres, on a constaté que l'inoculation des graines à améliorer le taux de germination, c'est le cas des deux souches (SR), (SB) ou on a enregistré 100% pour la concentration 100mM.

D'après Mohameden, et al., (2011) le taux de germination des graines de différentes variétés de tomates diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration du NaCl. Dans ce cas, il a noté que le taux de mortalité des plantes devient significatif à partir de la concentration 300 mM par rapport au témoin, tandis que la même concentration saline a provoqué un taux de mortalité moins important en cas d'inoculation des graines par les PGPR. Cependant, les deux concentrations les plus élevées 200 et 300 ont pu discriminer nettement le degré de sensibilité

des souches. A l'issue de cette étude, il a constaté que la salinité dans la limite des concentrations examinées a significativement réduit la capacité germinative des graines de la plante de tomate dès la première concentration 100mM. Lorsque le stress salin est sévère, la diminution du pourcentage de germination est plus prononcée chez toutes les plantes.

Cette diminution a été rapportée par plusieurs auteurs comme (Passam & Kakouriotis , 1994), dans leurs travaux sur le concombre (Cuartero & Fernandez-Munez, 1999), (Amini & Ehsanpour, 2005), avaient signalé que des concentrations salines croissantes dans le milieu, induisent sensiblement des réductions du pourcentage de germination, mais également, elles ralentissent la vitesse de germination de quelques cultivars de tomate exposés à la contrainte saline. Ces résultats montrent, que la tomate est sensible à la salinité au stade germination.

La diminution du pourcentage de germination est due soit à une augmentation de la pression osmotique externe, ce qui affecte l'absorption de l'eau par les graines, ou à une accumulation des ions Na^+ et Cl^- au niveau de cellules de l'embryon.

L'influence de NaCl sur la germination des solanacées, se traduit soit par un allongement de la phase de latence avant la germination, soit par l'inhibition complète de celle-ci (Farissi, et al., 2011) ; (Farissi, et al., 2013). Bartels et Sunkar, (2005) ont noté que les pourcentages de germination des graines chez d'autres plantes diminuaient à partir d'une concentration de 50 mM NaCl. Ces réductions peuvent être dues à la création d'un potentiel osmotique externe qui empêche l'absorption d'eau ou à des effets toxiques des ions sodium et chlorure sur les graines en germination (Debez , et al., 2001). En fait, le stress salin affecte le métabolisme de l'embryon des graines en germination et induit des perturbations dans les processus impliqués dans la mobilisation des réserves de l'endosperme (Farissi, et al., 2013). La salinité entraîne une réduction de l'activité des enzymes hydrolytiques de l'endosperme des graines, telles que les amylases, les protéases et les phosphatases (Dubey , 1994).

7.2. Effets de l'inoculation sur la moyenne des longueurs de racines en milieu salin

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

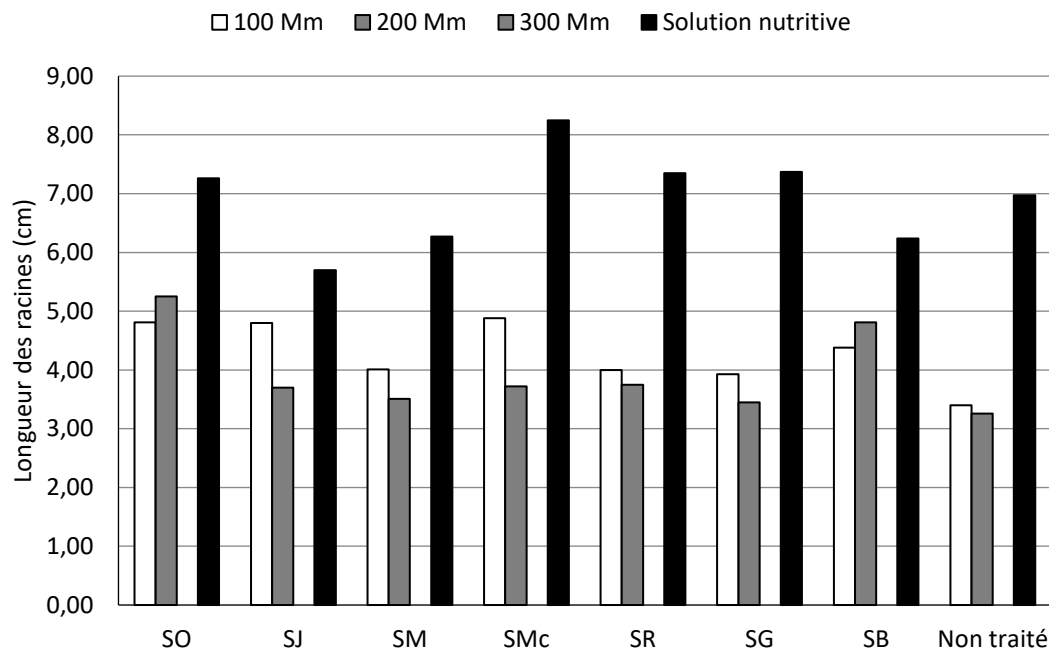


Figure 13 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la longueur des racines.

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 SO et SMc est améliorée à presque 160 % et 120% respectivement pour les concentrations 100 et 200 mM par rapport au témoin non inoculé.

Avec la troisième concentration, l'effet de l'inoculation sur ce paramètre est nul puisqu'à cette concentration aucune graine n'a germé.

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).

Selon Ben Ahmed, et al., (2008), l'action dépressive du sel se manifeste par une réduction de la production de biomasse fraîche des différents organes de la plante. Elle se manifeste également par la réduction de la longueur de racine des plantes et les résultats d'autres travaux confirment cette observation (Singh & Prasad, 2009).

Plusieurs causes sont évoquées pour expliquer le déterminisme de la réduction de la croissance sous les conditions de stress salin, incluant entre autres, la diminution du contrôle du statut hydrique (Khajeh-hossini & Powell , 2003;), le désordre nutritionnel (Farissi, et al., 2011), le ralentissement de la synthèse protéique, la perturbation de la stabilité des structures membranaires et l'inhibition de l'activité des enzymes (Blaha , et al., 2000) (Faghire, et al., 2011), les changements dans l'extensibilité de la paroi cellulaire en relation avec sa composition protéique, et la réduction de la capacité photosynthétique (Erice , et al., 2010) ; (Amooaghaie, 2011).

Mezni , et al., (2010) a montré que le stress causé par la salinité inhibe de manière significative la croissance de différents organes de la tomate, toutefois, les racines sont souvent plus touchées que les parties aériennes, mais il a évoqué aussi que l'inoculation par les PGPR influence la formation des racines et augmenter la concentration en éléments nutritifs dans la plante hôte

7.3. Paramètres biochimiques

7.3.1 Teneur en chlorophylle

La Chlorophylle est le principal pigment assimilateur des végétaux photosynthétique. Ce pigment situé dans les chloroplastes des cellules végétales intervient dans la photosynthèse pour intercepter l'énergie lumineuse, première étape dans la conversion de cette énergie en énergie chimique. La teneur en chlorophylle sous l'effet combiné l'inoculation et stress salin est représenté dans la figure 14.

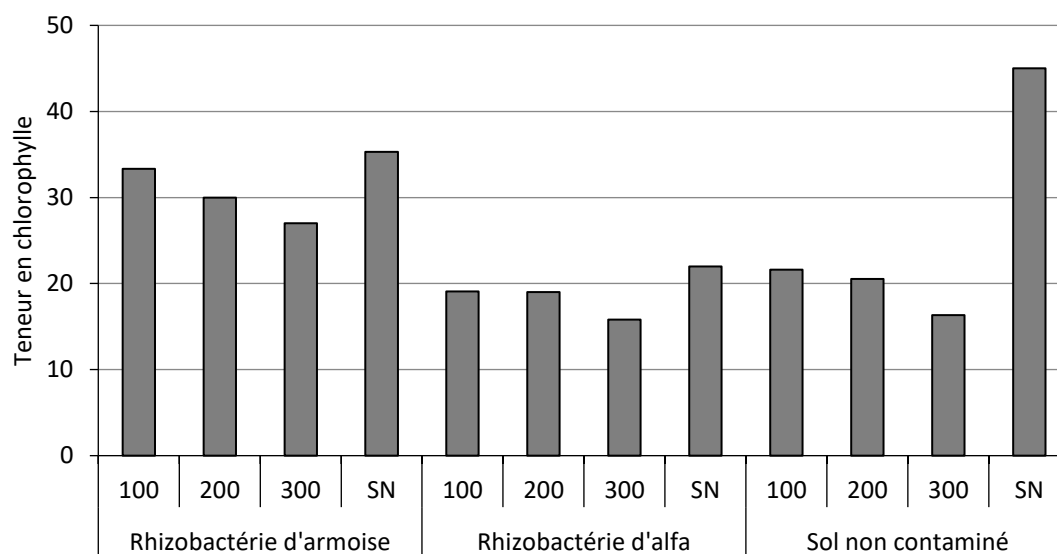


Figure 14 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en chlorophylle totale.

D'après ces résultats on observe que la teneur en chlorophylle est significativement réduite par la salinité. Ces résultats corroborent avec les observations de (Cengiz Kaya., et al., 2009) ; (Feigin, et al., 1991) (Grattan & Grieve, 1994). À l'instar des paramètres de croissance, la réponse des plantules au stress salin est très variable. Ceci s'observe d'abord au niveau des pigments photosynthétiques qui ont subi sensiblement des réductions de leur teneur dans les feuilles des plantules.

Utilisation des rhizobactérie provenant de la rhizosphère de l'armoise, semble atténuer cet effet et nous permet de constater que la teneur en chlorophylle s'est améliorée par rapport au sol traité par Alfa, ses deux valeurs sont meilleures que ceux des plantes non traitées, mais restent inférieures aux résultats obtenus de sol non contaminé irrigué par solution nutritive.

Selon (El Iklil, et al., 2002), la réduction de la chlorophylle peut être liée à la sensibilité de l'une des étapes de sa biosynthèse au chlorure de sodium. Levitt (1980), attribue la dégradation de chlorophylles foliaires sous l'effet du stress salin, à la destruction des pigments chlorophylliens et à l'instabilité du complexe pigmentaire protéique perturbé par l'excès des ions Na^+ et Cl^- . Ces résultats rejoignent ceux de (Sivtsev, 1973) sur tomate, de (Tewar & Singh, 1991.) sur la lentille (*Lens esculenta* M); qui rapportent que le NaCl a un effet antagoniste sur l'absorption de l'azote (N) qui est une composante essentielle de la structure de la molécule de chlorophylle.

Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par (Chibani, 2017) (Sharaf, et al., . 1990.), qui ont constaté que la teneur en chlorophylle diminue en présence du sel et en absence de l'inoculation. Mais selon ses mêmes 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.

7.4. 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 le glycine bêtaïne. Une comparaison entre l'évolution de la proline des plantes témoins et des plantes inoculées de tomate a montré que le taux de la proline change beaucoup sous l'effet du stress.

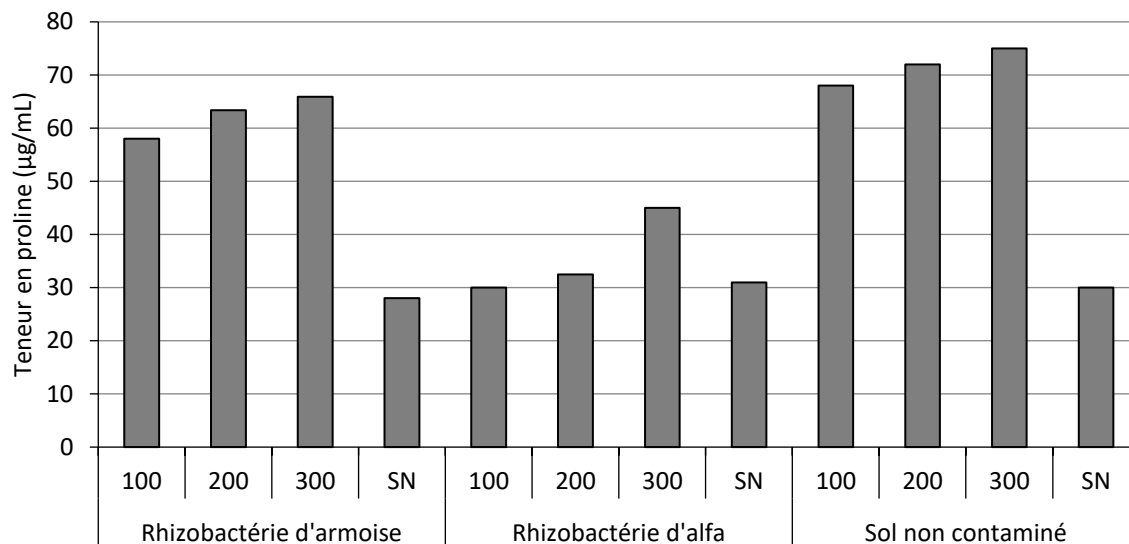


Figure 15 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en proline.

Selon les résultats de figure 15, on constate que la teneur de proline augmente lorsqu'on augmente la concentration en sel. La proline, de teneur habituellement faible dans les tissus des plantes cultivées sur milieu dépourvu de sel et donc peu contraignant sur le plan nutritionnel, se trouve accumulée de façon spectaculaire en réponse au stress salin. Dans le cas des trois concentrations, les taux de la proline augmentent beaucoup chez les plantes non inoculées on note des valeurs de 65,30 µg/mL à 75,63 µg/mL. Cependant, les plantes inoculées en été moins sensible au stress salin et ont enregistré des valeurs proches et légèrement inférieures à ceux du témoin non inoculé. Cette diminution dans la teneur en proline est net surtout en présence des isolats de la rhizosphère de l'Alfa. En absence de sel, l'inoculation est inefficace.

Plusieurs auteurs, dont Hernandez et al. (2000) ; (Khedr, et al., 2003); (Claussen, 2005.) et (Debnath, 2008.), avaient mentionné que cet acide aminé fait partie des osmoticums que les plantes synthétisent une fois exposées au stress hydrique ou salin. Son rôle est nécessaire pour l'ajustement osmotique pour équilibrer le potentiel osmotique du sol conformément à ce qui a été démontré par d'autres travaux dont ceux de (Gadallah, 1999.) et de (Demir, 2000.). Par contre une forte accumulation de cet acide aminé est un signe de perturbation métabolique (Cheikh M'hamed, et al., 2008).

L'accumulation de la proline serait attribuée à l'effet inhibiteur du stress sur son oxydation dans les mitochondries (Sell & Koeppe, 1981) ; (Hsiao, 1973.). La néosynthèse de la proline serait déclenchée par la perte de la turgescence due à la salinité. Celle-ci active une série d'événements complexes corrélés avec le niveau du stress, la tolérance de la plante et sa croissance (Huer, 1993).

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 Bowen et Rovira, (1999), 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. Maggio, et al., (2002) Syed, et al., (2011) suggèrent que la capacité de certaines PGPR dans la diminution de la synthèse de la proline en état du stress salin peut être liée à son incorporation dans les protéines.

7.5. Teneur en glycine bêtaïne

Selon les résultats de la figure 16, on constate que la teneur en glycine bêtaïne 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 bêtaïne sont supérieures à ceux enregistrés avec échantillons contaminés par les isolats de l'Alfa. Ces deux résultats sont inférieurs par rapport à ceux des échantillons non contaminés pour les trois concentrations (100, 200 et 300 mM).

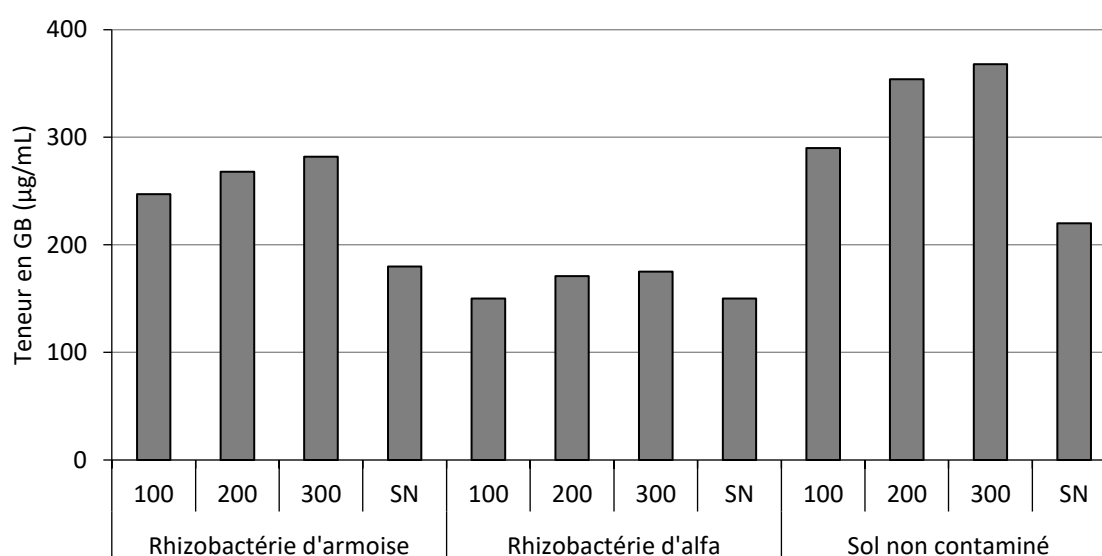


Figure 16 : Effet combiné de stress salin et inoculation sur la teneur en glycine bêtaïne.

Pour les échantillons contaminés on remarque que teneur en glycine bêtaïne augmente passant d'une valeur de 150, 171 et 175 $\mu\text{g/mL}$ respectivement pour les trois concentrations (100, 200 et 300 mM) à 247, 268 et 282 $\mu\text{g/mL}$ pour les mêmes concentrations. On a observé aussi la concentration de glycine bêtaïne des plantes inoculées stressées est peu élevée que celle des témoins non inoculés. En outre, nos isolats améliorent de manière significative la croissance des plantes de la tomate dans les différentes conditions de stress.

Les plantes tolérantes à la salinité réalisent l'ajustement osmotique en concentrant les ions salins dans leurs tissus, mais, les quantités accumulées deviennent rapidement toxiques, dès lors, une des stratégies d'adaptation consiste à synthétiser des osmoprotecteurs, principalement des sucres et des composés aminés tels que la proline et la glycine bêtaïne (Farissi, et al., 2011) .

D'après Farissi, et al., (2011), la glycine bêtaïne est l'osmoprotecteur le plus puissant du monde végétal. Elle augmente la pression osmotique dans la cellule végétale afin d'éviter la fuite de l'eau hors de la cellule aboutissant à sa mort, elle permet la rétention ou la diffusion de l'eau et des oligo-éléments par la gestion de cette pression osmotique.

Plusieurs auteurs (Chen & , Murata, 2002) ; (Bohnert & , Jensen, 1996) ont lié l'accumulation de la proline à la tolérance des plantes à la salinité, certaines espèces connues pour accumuler glycine bêtaïne naturellement ont été signalés pour bien grandir dans la sécheresse et une solution saline environnement (Chen & Murata , 2008) et son accumulation est liée aussi à l'amélioration de la tolérance a la sécheresse et au froid (PARC, et al., 2006).

Conclusion

Certains micro-organismes possèdent des propriétés agronomiques réellement intéressantes pour leur plante-hôte. Ce travail de recherche a pour objectif de développer des bioalternatives à base de microbiote racinaire qui apporteront un réel bénéfice aux cultures, en participant à l'amélioration de la nutrition des plantes en solubilisant par exemple des éléments minéraux bloqués dans le sol ou encore stimuler la croissance racinaire par la sécrétion de phytohormones.

Les résultats préliminaires obtenus jusque-là démontrent l'efficacité des souches isolées de la rhizosphère de l'Alfa, ces isolats affectent la croissance et la tolérance de la tomate au stress salin en stimulant leur croissance par l'amélioration de leur taux de germination et en réduisant la teneur de proline et glycine bêtaïne dans les feuilles.

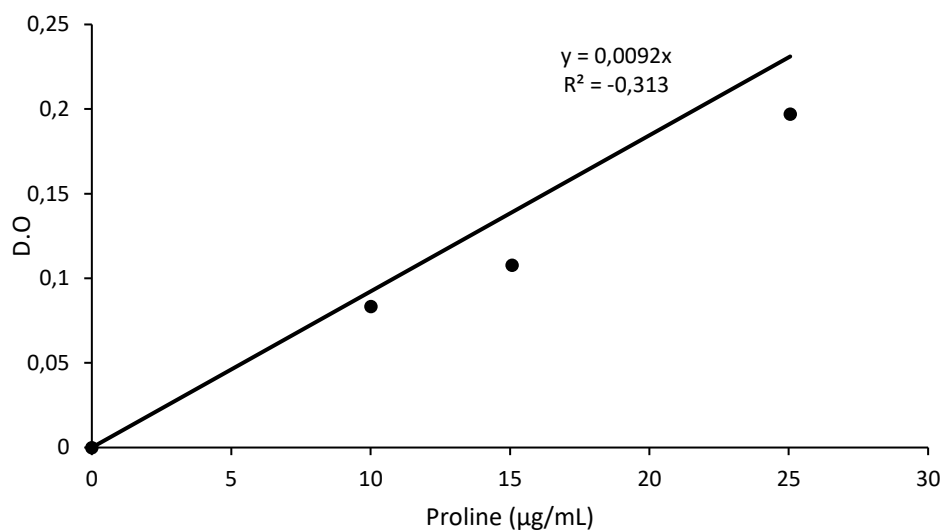
Ceci pourrait apporter une solution au problème de salinisation qui indigne la culture de tomate et laisse envisager la possibilité de les exploiter dans les prochaines études expérimentales dans l'objectif de produire des biofertilisants.

À la lumière de ces résultats obtenus et suite aux remarques que nous avons faites au cours des essais réalisés, nous considérons que notre étude, comme toute autre, ne peut être que partielle et qu'elle nécessite absolument d'être complétée par d'autres recherches.

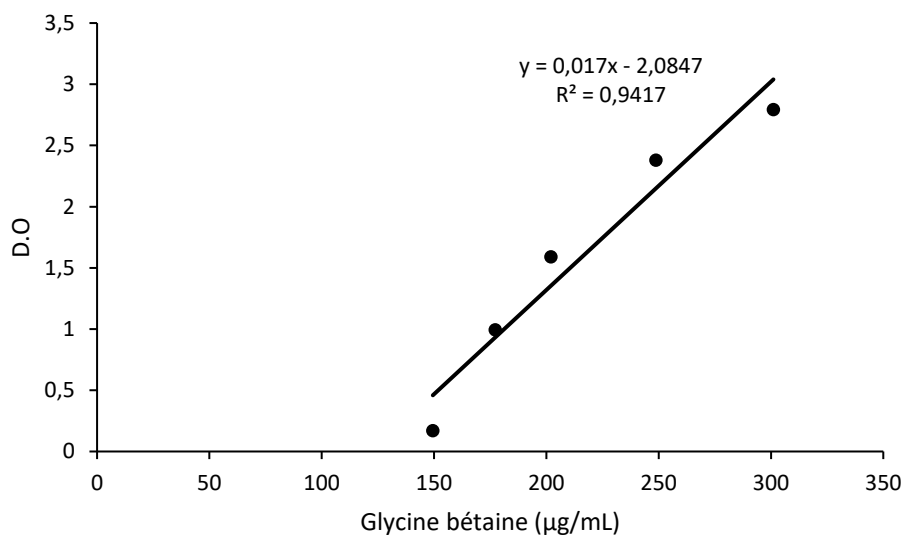
Les perspectives de notre étude visent à contribuer à l'enrichissement des recherches sur les effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes inoculées. Comme complément à la présente étude, les points suivants nous semblent assez pertinents :

- l'étude de la compréhension des mécanismes biochimiques liés à l'installation de cette symbiose et au langage moléculaire entre les deux partenaires ;
- l'évaluation du potentiel rhizobactéries, afin de classer puis sélectionner les bactéries les plus performantes ;
- Procéder à l'élaboration d'un programme d'identification des isolats basé sur les techniques moléculaires et phylogénétiques, qui sont les techniques en mesure de préciser le genre, l'espèce et éventuellement le biovar.

Listes des Annexes



Annexe 1 : Courbe étalon du dosage de la proline



Annexe 2 : Courbe étalon du dosage de la glycine bétaine

Références bibliographiques

- Amini , F. & Ehsanpour, A., 2005. *Soluble Proteins, Proline, Carbohydrates and Na⁺/K⁺ Changes in Two Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) Cultivars under in vitro Salt Stress. Am J. Biochem Biotech.,, s.l.: s.n.*
- Amooaghaie, R., 2011. *The effect of hydro and osmopriming on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under salt stress. Afr J Biotech, s.l.: s.n.*
- Ashraf, M, Ahmad, M. S. A, Öztürk, M. & Aksoy A, 2012. *Crop Improvement through Different Means: Challenges and Prospects. In: Ashraf, M. et al. (eds). Crop Production for Agricultural Improvement. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht,, s.l.: The Netherlands.*
- Bais, H. et al., 2006. *The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. , s.l.: Annu. Rev. Plnt Biol,57:..*
- Balesdent, J., Dambrine, E. & Fardeau, J., 2015. *Les sols ont-ils de la mémoire? : 80 clés pour comprendre les sols .. s.l.:Edition Quae.*
- Bartels, D. & Sunkar, R., 2005. Drought and salt tolerance in plants.. *Critical Reviews in Plant Science.24*, p. 23–58.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 8, 39(1), pp. 205-207.
- Ben Ahmed, H., Arafet, M. & Zid , E., 2008. *Tolérance à la salinité d'une Poaceae à cycle court : la séttaire (Setaria verticillata L.), s.l.: s.n.*
- Benkhetto, A., Zedek, M. & Boudaoud, A., 2016. Étude des agroécosystèmes en milieu aride dans la région de Tiaret, Algérie.. *Écologie-Environnement*, Volume 12, pp. 7-16.
- Benmahioul B , Daguin F & Kaid-Harche M, 2009. *Effet du stress salin sur la, s.l.: C. R. Biologies.*
- Bernard.C, 2009. *Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de cultures sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques., s.l.: Université-Nancy, Nancy.*
- Blahe , G. et al., 2000. . *Preparation of functional ribosomal complexes and effet of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. Methods Enzymo, s.l.: s.n.*
- Blancard D, Laterrot H, Marchoux G & et Candress, 2009. *Les maladies de la tomate, identifier, connaitre et maitriser., s.l.: Quae. Paris.*
- Bohnert, . H. & , Jensen, . R., 1996.): *Strategies for en-gineering water-stress tolerance in plants. Trends Biotechnol.,, s.l.: s.n.*
- Bourbonnais , G., 2010. *La chimie de la vie , chapitre : la nutrition chez les végétaux , le cycle de l'azote.. s.l.:s.n.*
- Cengiz Kaya,, et al., 2009. *The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. Scientia Horticul, s.l.: s.n.*

- Chaux C. & Foury C, 1994. *Production légumière. Tome3 : Légumineuses potagère, légumes et fruits. Edition : Technique et documentation, s.l.: Lavoisier. Paris..*
- Cheikh M'hamed, . H. et al., 2008. *Evaluation de la tolérance au stress salinde quelques accessions d'orge (Hordeumvulgare L.) cultivées en Tunisie:Approche physiologique. Sci. Tech., s.l.: s.n.*
- Chen, . T. & Murata , N., 2008. . *Glycinebetaine: un protecteur efficace contre le stress abiotique chez les plantes.Trends Plant Sci. , .06.007 : s.n.*
- Chen, . T. & , Murata, . N., 2002. *Amélioration de la tolérance au stress abiotique par génie métabolique de bétaines et d' autres solutés compatibles. , s.l.: CurrOpin usine Biol..*
- 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., mostaghanem: s.n.*
- Claussen , . W., 2005.. *Proline as a measure of stress in tomato plant. Plant Sci., , s.l.: s.n.*
- Cuartero , J. & Fernandez-Munez, R., 1999. *Tomato and salinity. Scientia. Hort., s.l.: s.n.*
- Darrah, P., 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach, *Plant and Soil* 156.. pp. 1-20..
- Debez , A., Chaibi, W. & Bouzid , S., 2001. *Effet du NaCl et de régulateurs de croissance sur la germination d'Atriplex halimus L. Cah Agric, s.l.: s.n.*
- Debnath, . M., 2008. . *Responses of Bacopa monnieri to salinity and drought stress in vitro. J. Med. Plant. Res., s.l.: s.n.*
- Delarras, C., 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques., s.l.: Éditions Médicales Internationales.*
- Delauney, . A. J. & Verma, . D. P. S., 1993.. *Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, s.l.: s.n.*
- Demir, . Y., . 2000. . *Growth and proline content of germinating wheat genotypes under ultraviolet light. Turk. J. Bot., s.l.: s.n.*
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y., 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere.. *Plant Sci.* 22:, pp. 107-149..
- Dubey , R., 1994. *Protein synthesis by plant under stress ful condition in handbook of plant and crop stress , s.l.: s.n.*
- Dubey, . R. S. & Ran, i. M., 1990. . Influence of NaCl salinity on the behavior of protease, aminopeptidase, and carboxy-peptidase in rice seedlings in relation to salt tolerance. *Aust. J. Plant Physiol.* Volume 17:, p. 215–221..
- El Iklil, y., Karrou , M., Mrabet, R. & Benichou, M., 2002. *Effet du stress salin sur la variation de certains métabolites chezLycopersicon esculentum et Lycopersicon sheesmanii, s.l.: . Can. J. Plant Sci.,.*
- Faghire, m. et al., 2011. *Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (Phaseolus vulgaris L.) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region ofMorocco. Symbiosis 2, s.l.: s.n.*
- FAO, 2011. *FaoStat Database, s.l.: FAO.*

- FAO, 2011. *FaoStat Database*. Available from <http://faostat.fao.org>, s.l.: FaoStat Database. Available from <http://faostat.fao.org>.
- Farissi, M. et al., 2011. *Agro-physiological responses of Moroccan alfalfa (Medicago sativa L.) populations to salt stress during germination and early seedling stages*. *Seed Sci Technol*, s.l.: s.n.
- Farissi, M., Ghoulam, C. & Bouizgaren, A., 2013. *Variabilité de la tolérance à la salinité de la luzerne : évaluation au stade germination de populations issues de différents agro-écosystèmes marocains*. *Fourrages*, s.l.: s.n.
- Feigin, A., Pressman, E., Imas, P. & Milta, O., 1991. *Combined effects of KNO₃ and salinity on yield and chemical composition of lettuce and Chinese cabbage*. *Irrig.Sci.*, s.l.: s.n.
- Gadallah, . M., 1999.. *Effects of proline and glycine betaine on Vicia fabae responses to salt stress*. *Biol. Plant*, , s.l.: s.n.
- Gaur, A., 1990. *Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers*. 1st Edn., Omega Scientific Publishers, New Delhi, India: s.n.
- Ghoul.M, 1990. *L'halotolérance de E. coli. Effet des osmoprotecteurs naturels*. Thèse de Doctorat. Université de Rennes I, s.l.: France,.
- Gobat, J., Aragno, M. & Matthey, W., 2010. *Le sol vivant : bases de pédologie , biologie des sols ..* s.l.:PPUR Presses polytechniques.
- Grattan, S. & Grieve, . C., 1994. . *Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments*. In: *Pessarakli, M.*, s.l.: Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, New York.
- Grażyna, . A. P. et al., 2015. *Characterization of Bacillus strains producing biosurfactants*. In *Environmental Sustainability*, s.l.: Springer, New Delhi...
- 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: s.n.
- Hsiao, . T. C., 1973.. *Plant responses to water stress*. *Ann. Rev. Plant Physiol*. Volume . 24:, p. 519–570..
- Huer, . B., 1993. *Osmoregulatory role of proline in water and salt stressed plants*.. p. 363–381.
- karhikeyan, B., Jaleel, . C., Lakshmanan, . G. & , Deiveekas, 2015. . *Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches d'actinomycètes et du genre Pseudomonas isolées des sols rhizosphériques*. *Identification de souches représentative*.mémoire de master ., s.l.: s.n.
- Khajeh-hossini, M. & Powell , A., 2003;. . *The interaction between salinity stress and seed vigor during germination of soybean seed*., s.l.: Seed Sci Technol .
- Khedr, A. et al., 2003. . *Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of Pancratium maritimum L. to saltstress*. *J. Exp. Bot.*,, s.l.: s.n.

- Kushwaha, ., A. S. B., BAILY, . A., MAXTON1 & RAM, . G. D., , 2013. "Isolation and characterization of PGPR associated with cauliflower roots and its effect on plant growth." *The Bioscan*, s.l.: s.n.
- Latigui A, 1984. *Effets des différents niveaux de fertilisation potassique sur la fructification de la tomate cultivée en hiver sous serre non chauffée. Thèse de Doctorat en Science Agronomique.*, s.l.: INA EL-Harrach. Alger.
- MacWilliams, M. & P., M., 2009. *Indole Test Protocol.*, s.l.: American society for microbiology.
- Magné, C. & Larher, F., 1992. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry*, 1 1, 200(1), pp. 115-118.
- Marouf, A. & Raynaud, J., 2007. *La botanique de A à Z.*, paris: s.n.
- Munees, A. & Mulugeta, K., 2013. *.Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective*, s.l.: s.n.
- Munn J, M, .January & Cutright TJ, 2008. *Greenhouse evaluation of EDTA effectiveness at enhancing Cd, Cr, and Ni uptake in Helianthus annuus and Thlaspidicaerulescens. J.*, s.l.: Soils Sediments,.
- Munns.R, 2009. *Strategies for Crop improvement in Saline Soils.. In M.Ashraf, M. Ozturk, H.R. Athar (ed.) Salinity and water stress, improving crop efficiency, Springer Science.*, s.l.: Business Media B.V..
- Nabti E, , et al., 2007. *A halophilic and osmotolerant Azospirillum brasilense Strain from Algerian Soil restores Wheat Growth under Saline Conditions*, s.l.: Eng. Life.Sci.
- Naika S, et al., 2005. *La culture de la tomate : production, transformation et commercialisation*, s.l.: Wageningen, pays-bas.
- Nultsch, W., 1998. *Botanique générale*. p. 603.
- PARC, . E., , JEKNIC, . Z. & CHEN TH., M., 2006. *L'application exogène des augmentations de glycine betaine chilling tolerance dans les plants de tomates. Plant*, s.l.: Cell Physiol de. ; 47 : 706-14. d.
- Park, E.-J. et al., 2004. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *The Plant Journal*, 13 10, 40(4), pp. 474-487.
- Passam, H. & Kakouriotis, D., 1994. *The effects of osmoconditioning on the germination emergence and early plant*, s.l.: s.n.
- Prescott, L., 2002. *Microbiology, 5th edition. The McGraw-Hill Companies*, s.l.: New York, USA.
- Ramos-Solano, B., Barriuso-Maicas, J. & Gutierrez-Mañer, 2009. *Biotechnology of the Rhizosphere. In: Kirakosyan A, Kaufman PB (eds.) Recent Advances in Plant Biotechnology. 137.*, s.l.: Springer Science & Business Media. . .
- Rodge & P, S., 2016. *Isolation and Characterization of PGPR from Roots of Ficus religiosa growing on Concrete Walls and its Effect on Plant Growth in Drought Condition.*, s.l.: s.n.
- Saharan, Govind, . S. & et al, 2014. *. White rust of crucifers: Biology, Ecology and Management. Springer.*, s.l.: s.n.

- Salehi, . M., Salehi, . F., Poustini, . K. & Heidari-Sharifabad, 2008. The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage.. Volume 4, pp. :413-415..
- Sell, G. D. & Koepp,, . D. E., 1981. . Oxidation of proline by mitochondr iisolated from water stressed maize shoots. *Plant Physiol.* Volume 68: , p. 1058–1063..
- Shahbaz, M. & Ashraf, M, 2013. *Improving salinity tolerance in cereals. Crit.*, s.l.: Rev. Plant Sci.
- Sharaf, A., Labib, S. & El-Massry, R., . 1990.. *Effect of kinetin on the biochemical constituents of tomato plants under different levels of salinity*, s.l.: . Zagazig Journal of Agricultural Research (Egypt). .
- Singh,, . R., Singh, . R. & Yadav, ,. M., 2013. *Molecular and biochemical characterization of a new endoinulinase producing bacterial strain of Bacillus safensis AS-08.*, s.l.: s.n.
- Singh, A. & Prasad , R., 2009. *Salt stress growth and cell bound enzumes in Archis hypogea L. seedling. I.J.I.B.*, s.l.: s.n.
- Sivtsev, M., 1973. . *Photochemical activity of chloroplast and bound strength complex in cultured plants during action of salinization and biologically active compounds Fizol. Rast.* , s.l.: In Libbey Eurotext, Paris,.
- Slepecky, ,. R. A. & Hemphill, ,. H. E., 2006. *The genus Bacillus—nonmedical. In The prokaryotes (pp. 530-562). Springer US. soybean plants inoculated with Azospirillum brasilense is not necessarily due to generalenhancement of mineral uptake. Appl. Environ. Microbiol.*, s.l.: s.n.
- Snoussi S.A, 2010. *Etude de base sur la Tomate en Algérie*, s.l.: s.n.
- Tak, H. I & Ahmad, F, 2013. *Advances in the Application of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Phytoremediation of Heavy Metals. In: Whitacre DM (ed.) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, s.l.: Springer Science+Business Media, New York.
- Tewar, T. N. & Singh,, B. B., 1991.. *Stress studies in lentil (Lensesculenta M.) II. Sodicyty induced changes in chlorophyll, nitrateand nitrate reductase, nucleic acid, proline, yield and yield componentsin lentil. Plant Soil*, s.l.: s.n.
- 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.* s.l.:Blackwell Scientific.
- Waughray, D., 2011. *Agriculture. In: Waughray, D. (ed). The World Economic Forum Water Initiative, Water Security: The Water-Food-Energy-Climate Nexus*, s.l.: World Economic Forum, Washington, USA.
- Young, I. M. & Crawford, J. W., 2004. *Interaction and self-organization in the soil-microbe complex.* s.l.:s.n.

