

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

UNIVERSITE FERHAT ABBAS SETIF

**Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie**

Mémoire

Présenté par :

RABHI Nour El Houda

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTERE

OPTION

Génie microbiologique

THEME

**Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents
d'un sol salé.
Effet d'osmoprotecteurs naturels**

Soutenu le :14/11/2011

Devant le jury composé de :

Président	L. LAROUS	Pr. U. F. A. Sétif
Rapporteur	M. GHOUL	Pr. U. F. A. Sétif
Examineurs :	A. GUECHI	Pr. U. F. A. Sétif
	R. BELHATTAB	M. C. U. F. A. Sétif

Année universitaire : 2011/ 2012

Remerciements

Je tiens à remercier infiniment Monsieur le Professeur **M. GHOUL** de l'Université de Sétif, pour m'avoir accordé la chance de travailler au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait profiter de ses connaissances. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et mes sincères reconnaissances. Je le remercie également pour tous ses efforts et ses critiques constructives pour me diriger vers un esprit scientifique ; ainsi que pour sa disponibilité, sa rigueur, sa modestie et son honnêteté. Merci monsieur.

Je remercie Monsieur le Professeur **L. LAROUS** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Mes remerciements vont également à Messieurs le Professeur **A. GUECHI** et le Docteur **R. BELHATTAB** d'avoir accepté de participer à ce jury malgré ses nombreuses occupations. Je leur témoigne toute ma gratitude.

Je voudrais remercier plus particulièrement Mme **F. ARIF** qui m'a régulièrement suivi dans la réalisation pratique de ce travail. Je la remercie pour son soutien, ses conseils, sa simplicité, sa générosité scientifique et sa qualité humaine.

J'exprime ma pleine reconnaissance à Mr et Mme **SILINI** pour leur disponibilité, pour leurs nombreuses orientations et surtout pour leur aide précieuse dans la partie statistique de ce travail. J'exprime mes vifs remerciements à Mr **S. HABI** pour ses conseils avisés.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Sommaire	I
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Introduction	1

Revue bibliographique

I- Salinisation	5
1- Définition.....	5
2- Effets de la salinité.....	6
2-1- Sur la structure du sol.....	6
2-2- Sur les plantes.....	6
2-3- Sur les bactéries du sol.....	7
II- Osmorégulation	8
1- Chez les bactéries.....	8
2- Chez les halophytes.....	9
3- Solutés compatibles.....	11
3-1- Les acides aminés.....	12
3- 2- Les sucres et les polyols.....	14
3- 3- Les bétaines.....	15
3-4- Les sulfoniums tertiaires.....	16
III- Interactions microbes-plantes-sol	18
1- Rhizosphère.....	18
2- Rhizodépôts.....	18
3- Structuration et stabilité du sol.....	19
4- Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes.....	21
4-1- Effets directs.....	21
4-1-1- Fixation d'azote.....	21
4-1-2- Solubilisation des phosphates.....	21
4-1-3- Production de sidérophores.....	22
4-1-4- Production des régulateurs de la croissance végétale.....	22
4-1-5- Production d'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC- désaminase).....	23
4-2- Effets indirects.....	23
4-2-1- Compétition pour l'espace et les nutriments.....	23

4-2-2- Antibiose	24
4-2-3- Résistance systémique induite ou ISR	24
IV- <i>Pseudomonas</i> spp. : bactéries du sol	25
1- Caractéristiques générales.....	25
2- Interactions de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents dans la rhizosphère	26
3- <i>Pseudomonas</i> spp. face aux stress abiotiques	27
4- Osmoadaptation chez <i>Pseudomonas</i> spp.....	30
Matériel et méthodes	
I- Echantillonnage	32
II- Analyses microbiologiques du sol	34
1- Isolement des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	34
2- Identification des souches	34
3- Conservation des souches	35
4- Caractéristiques promotrices de la croissance végétale	35
4-1- Solubilisation du phosphate sur un milieu solide et liquide	35
4- 2- Production de l'acide cyanhydrique (HCN)	35
4- 3- Activité antifongique	36
III- Mise en évidence de l'halotolérance des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents 37	
1- Préparation des inocula bactériens.....	38
2- Estimation de la concentration maximale de NaCl tolérée	38
IV- Effet d'osmoprotecteurs sur la croissance des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. en présence du sel	38
1- Effet de glycine bétaine	38
2- Effet de l'extrait de l'halophyte	39
A-Choix de l'halophyte.....	39
B- Récolte de la plante	40
C- Préparation de l'extrait hydro-alcoolique de <i>A. halimus</i>	40
D- Mesure de la capacité osmoprotectrice	40
V- Effet de la salinité et d'osmoprotecteurs sur certaines activités physiologiques de souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	42
1- Sur la production de l'acide indole-3- acétique (AIA)	42
2- Sur la production de sidérophores.....	42
VI- Analyses statistiques	43

Résultats

I- Caractéristiques physico-chimiques du sol étudié	45
II- Identification des souches	45
1- Caractéristiques morphologiques	45
2- Examen microscopique.....	48
3- Caractéristiques biochimiques	48
4- Caractéristiques promotrices de la croissance végétale.....	50
4-1- Solubilisation du phosphate.....	50
4-2- Production de HCN	53
4-3- Activité antifongique	54
III-Etude de l'halotolérance de souches de <i>Pseudomonas fluorescents</i>	57
1- Effet du milieu sur l'halotolérance	57
2- Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la croissance des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
IV- Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur quelques activités physiologiques de <i>Pseudomonas fluorescents</i>	62
1-Sur la production de l'acide indole-3- acétique (AIA)	62
2- Sur la production de sidérophores.....	65
Discussion	
I- Caractéristiques physico-chimique du sol	70
II- Caractéristiques des souches de <i>Pseudomonas fluorescents</i>	70
1- Solubilisation du phosphate	71
2- Production de HCN.....	72
3- Activité antifongique	72
III- Halotolérance bactérienne	73
1- Influence du milieu sur la croissance.....	73
2- Effet du NaCl sur la croissance.....	74
3- Effet osmoprotecteur de GB	76
4- Effet osmoprotecteur de l'extrait de <i>A. halimus</i>	78
IV- Effet du NaCl, de la GB et de l'extrait de <i>A. halimus</i> sur la production de l'AIA	79
V- Effet du NaCl, de la GB et de l'extrait de <i>A. halimus</i> sur la production de sidérophores	80

Conclusion	82
Résumé	86
Abstract	88
الملخص	89
Communications scientifiques	90
Références bibliographiques	90
Annexes	111

Liste des tableaux

Tab. 1: Paramètres physico-chimiques du sol étudié.....	45
Tab. 2: Caractères morphologiques de souches de <i>Pseudomonas</i> isolées.....	46
Tab. 3: Quelques caractères biochimiques de souches de <i>Pseudomonas</i> isolées.....	49
Tab. 4: Solubilisation du phosphate.....	51
Tab. 5: Diamètre des colonies de <i>F. oxysporium</i> et de <i>A. alternata</i> en présence des souches <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	55
Tab. 6: Effet du sel, de la GB (1mM) et/ou d'extrait de <i>A. halimus</i> (1/100 ^{ème}) sur la croissance des souches de <i>Pseudomonas</i>	61
Tab. 7: Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la production de l'AIA.....	64

Liste des figures

Fig. 1 : Etapes de la réponse osmotique chez les bactéries.....	10
Fig. 2 : Structure des principaux solutés compatibles.....	17
Fig. 3 : Diagramme simplifié d'une racine et des rhizodépôts.....	20
Fig. 4 : Interactions entre les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents, les microorganismes pathogènes et les cellules racinaires.....	29
Fig. 5 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	33
Fig. 6 : <i>Atriplex halimus</i>	39
Fig. 7 : Estimation de l'halotolérance en présence des osmoprotecteurs naturel ou synthétique.....	41
Fig. 8 : Aspect de quelques colonies sur King B.....	47
Fig. 9 : Colonies de <i>Pseudomonas</i> fluorescents avec halo de solubilisation.....	50
Fig. 10 : Quantité de phosphate solubilisée par les souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents sur milieu liquide.....	52
Fig. 11 : Détection de HCN.....	53
Fig. 12 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des colonies de <i>F. oxysporium</i> et de <i>A. alternata</i> en présence des souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	54
Fig. 13 : Activité antagoniste de quelques souches de <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporium</i>	56
Fig. 14 : Activité antagoniste de quelques souches de <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis de <i>Alternaria alternata</i>	56
Fig. 15 : Appréciation de l'halotolérance des souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents en présence de NaCl dans un milieu riche (LB) et minimum (GMM).....	57
Fig. 16 : Production de sidérophores par <i>Pseudomonas</i> en absence de sel.....	66
Fig. 17 : Effet du sel, de la GB et de l'extrait de <i>A. halimus</i> sur la production de sidérophores par les souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	67

Introduction

Plusieurs contraintes environnementales sont limitantes pour la production agricole mondiale. La salinité et la sécheresse sont considérées comme les deux facteurs majeurs influant l'agriculture dans les zones arides et semi arides. Les surfaces agricoles affectées par la salinité dans le monde seraient de 340 millions d'hectares soit 23% des terres cultivées (Cheverry, 1995). Approximativement 70 % des terres sont totalement ou en partie confrontées à l'aridité.

L'Algérie fait partie du groupe des pays méditerranéens où la sécheresse, observée depuis longtemps, a conduit manifestement au processus de salinisation des sols sur 3,2 millions d'hectares de terres (Belkhodja et Bidai, 2004). 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 (Anonyme, 2008).

Dans des conditions de salinité et/ou aridité élevées les cellules vivantes ont subi une forte pression osmotique. Une diminution brutale de la teneur en eau dans le sol entraîne une déshydratation cellulaire. Celle-ci tend à compacter les organites et les macromolécules cytoplasmiques, ce qui ralentit fortement la survie des plantes et des microorganismes telluriques ou arrête complètement leur croissance. De plus, l'accroissement de la concentration de sels dans le sol conduit à un effet toxique spécifique des ions, en menaçant le fonctionnement physiologique de la cellule (Levigneron *et al.*, 1995 ; Le Rudulier *et al.*, 2002).

Comment restaurer la vie cellulaire et améliorer par conséquent la croissance et la productivité végétale dans les régions salées et/ou arides ?

Plusieurs solutions sont préconisées afin de lutter contre la progression de salinité et aridité. La plupart concernent surtout des méthodes coûteuses et parfois difficiles à appliquer comme la lixiviation, le drainage, l'inondation et l'utilisation d'une eau d'irrigation de qualité. Dès lors, l'exploitation du potentiel microbiologique des sols, en particulier certaines souches bactériennes osmotolérantes promotrices de la croissance végétale PGPR (e.g. *Azospirillia*, *Bacillus*, *Rhizobia*, *Pseudomonas*,...) considérée comme une technologie émergente et écologiquement très intéressante.

Parmi les bactéries d'intérêt agricole (PGPR) les *Pseudomonas* spp. fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants offre un bon rendement même dans des conditions sévères (Ali *et al.*, 2009 ; Bano et Fatima, 2009). Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore ou par la production de sidérophores. Elles

peuvent modifier la morphologie et la physiologie racinaire par la production de régulateurs de croissance comme les auxines. Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses grâce à leur activité antagoniste vis-à-vis de pathogènes (Lemanceau, 1992).

L'adaptation des ces bactéries aux fortes concentrations en sel est due à leur faculté de synthèse ou de transport à partir du milieu externe des solutés compatibles ou d'osmoprotecteurs. Ceux-ci ont pour rôles d'osmorégulation et protection cellulaire contre divers types de stress (salinité, chaleur, froid...). La molécule osmoprotectrice majeure accumulée chez les bactéries étant la glycine bêtaïne. Elle est retrouvée abondamment chez les halophytes (Rhodes et Hanson, 1993).

L'objectif, à long terme, de ce travail est d'utiliser des halophytes comme un engrais vert en vue de restaurer la vie des souches bactériennes et d'améliorer leur relation avec les plantes, et donc rétablir la production dans les régions salées et /ou arides.

Il est bien établi que l'halophyte *Atriplex halimus* est riche en osmoprotecteurs, particulièrement en glycine bêtaïne (Larguet, 1998 ; Ben Hassine et Lutts, 2010). De ce fait, il est proposé à travers cette étude d'utiliser l'extrait de *A. halimus* comme une source naturelle d'osmoprotection sur la croissance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, isolées d'un sol affecté par la salinité, en présence des concentrations croissantes de NaCl. La réponse des souches de *Pseudomonas* fluorescents à l'apport de glycine bêtaïne comme osmoprotecteur pur, dans des conditions de salinité élevée, est testée en premier temps.

Enfin, un test de production de l'acide-3-indole acétique et de sidérophores est effectué à différentes concentrations de NaCl en présence de la glycine bêtaïne et/ou de l'extrait de *A. halimus*.

Revue bibliographique

I- Salinisation

1- Définition

La salinisation est le processus d'accumulation des sels minéraux solubles dans le sol à des niveaux nuisibles pour les plantes. Ces sels dissous sont constitués d'un mélange de cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) et d'anions (Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^-) (Tanji, 2005). Un sol est considéré salin lorsque sa conductivité électrique (CE) est supérieure à 4 deciSiemens par mètre (dS/m). Cette valeur correspond à 40 mM de NaCl (2,4 g/l) (Hillel, 2005). La salinisation est identifiée comme une cause majeure de la dégradation des terres, particulièrement dans les régions arides et semi-arides. Elle peut être causée soit par des processus naturels, **salinisation primaire**, ou être induite par des activités humaines, **salinisation secondaire** (Ghassemi *et al.*, 1995) :

La première est le résultat d'une accumulation progressive des ions nécessaires à la formation des sels solubles. Ces ions sont libérés suite à une altération de certaines roches sédimentaires, volcaniques et hydrothermales (Loyer, 1991). Ils peuvent aussi être libérés à partir d'accumulations salines anciennes (Munns, 2009). L'intrusion d'eaux marines dans les zones côtières est une autre source. Les sels libérés sont transportés par des eaux souterraines. Ils sont accumulés à la surface des zones basses où le taux d'évapotranspiration est élevé (Pitmani et Lauchli, 2004).

La seconde est le résultat d'accumulation des sels apportés par l'eau supplémentaire induite par des activités humaines. Les quantités d'eau apportées au fil du temps entraînent un dépôt cumulé de sel dans les sols (Ghassemi *et al.*, 1995). L'irrigation des terres cultivées conduit à la salinisation de beaucoup de sols, en particulier dans les régions arides et semi-arides (Munns, 2009). Ce type de salinisation peut être aussi induit par l'élévation de la nappe phréatique, les engrais, la création de barrages, les épandages d'effluents agricoles ou urbains, les implantations de serre, etc (Loyer, 1991).

La présence de ces sels et l'élévation conséquente de la pression osmotique de la solution du sol, entraînent la formation de paysages particuliers, soit occupés par une végétation naturelle spécialisée dite halophyte (chotts), soit présentant une absence totale de végétation (sebkhas), selon le degré de salinité atteint (Loyer, 1991).

2- Effets de la salinité

2-1- Sur la structure du sol

La structure du sol peut être définie comme le regroupement de particules primaires du sol dans les agrégats. Ces derniers sont séparés entre eux par des pores dans lesquels le gaz et le liquide peuvent circuler. La structure du sol a une importance considérable sur son fonctionnement. D'une part, elle détermine la pénétration des racines dans le sol, d'autre part, elle agit sur les déplacements d'eau, d'éléments nutritifs de la masse du sol vers les racines (Lavelle et Spain, 2001). L'augmentation de la quantité de sodium dans un sol entraîne la destruction de sa structure. Un excès de sodium favorise la dispersion des colloïdes minéraux et par conséquent la réduction de la structure poreuse du sol. La salinisation augmente ainsi l'imperméabilité des couches profondes du sol ce qui empêche l'aération et la pénétration de l'eau nécessaire pour une croissance normale des plantes (Ghassemi *et al.*, 1995).

2-2- Sur les plantes

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 *et al.*, 1995 ; Munns, 2009).
- **Le stress nutritionnel :** Des concentrations salines élevées dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale. L'accumulation des ions de Na^+ dans la plante limite l'absorption de cations indispensables tels que K^+ et Ca^{2+} . Il y aurait une compétition entre Na^+ et Ca^{2+} pour les mêmes sites de fixation apoplasmiques. La présence des Cl^- inhibe l'absorption des NO_3^- . Ce déséquilibre nutritionnel est une cause possible de la réduction de croissance en présence du sel lorsque des ions essentiels comme K^+ , Ca^{2+} ou NO_3^- deviennent limitants (Levigneron *et al.*, 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 *et al.*, 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 CO₂, la toxicité du sel, la sénescence accrue induite par la salinité et le changement dans l'activité des enzymes (Parida et Das, 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 (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les radicaux hydroxyles (OH⁻). Ces espèces réactives causent des dysfonctionnements intramembranaires et par conséquent la mort cellulaire (Parida et Das, 2005).

2-3- Sur les bactéries du sol

Dans leur habitat naturel, les micro-organismes sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. En effet, la salinité élevée du sol peut interférer avec la croissance et l'activité des bactéries. Une diminution de celle-ci dans les sols salins conduit à une accumulation de la matière organique non dégradée, ce qui agit négativement sur la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance végétale (Zahran, 1997). Une augmentation brusque de l'osmolarité du sol modifie la disponibilité de l'eau à la cellule. L'abaissement de l'activité de l'eau extérieure a pour conséquence de modifier le volume cellulaire. Elle modifie aussi la pression de turgescence qui constitue la force mécanique nécessaire à l'élongation de la cellule durant la croissance (Csonka, 1989). La membrane cytoplasmique des bactéries est perméable à l'eau mais constitue une barrière efficace vis-à-vis des solutés du milieu et des métabolites présents dans le cytoplasme (Csonka, 1989). La circulation des molécules d'eau à travers cette bicouche lipidique est accélérée par la présence de canaux dits aqueux (Kempf et Bremer, 1998). Si les bactéries n'ont aucun moyen de répondre ou de s'adapter à l'augmentation de la force ionique (Na⁺, Cl⁻) dans le sol, le flux rapide de l'eau vers l'extérieur conduira à la plasmolyse cellulaire (Le Rudulier *et al.*, 2002). Une plasmolyse subite aboutit à l'inhibition de certaines fonctions cellulaires comme l'adsorption de nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse de macromolécules (Lucht et Bremer, 1994).

II- Osmorégulation

1- Osmorégulation chez les bactéries

Le terme "osmoadaptation" décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement de forte ou de faible osmolarité (Galinski, 1995). L'osmorégulation est le processus majeur d'osmoadaptation contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule dans des conditions de culture osmotiquement stressantes (Csonka, 1989). En réponse à des teneurs élevées de sel du milieu externe, la cellule bactérienne maintient une osmolarité interne supérieure à celle de l'environnement extracellulaire (Pocard *et al.*, 1994). Elle accumule dans le cytoplasme des molécules osmotiquement actives afin de restaurer une pression de turgescence cellulaire (Kempf et Bremer, 1998). La stratégie d'osmoadaptation chez les bactéries halotolérantes, et modérément halophiles consiste en premier lieu en l'accumulation d'ions K^+ et de glutamate (réponse primaire) (Sleator et Hill, 2001 ; Le Rudulier *et al.*, 2002) puis des molécules organiques, non chargées, de faible poids moléculaire si le choc persiste ou augmente (réponse secondaire) (Fig. 1) (Lucht et Bremer, 1994 ; Bartlett et Roberts, 2004). Ces molécules accumulées sont appelées des **solutés compatibles** du fait de leur compatibilité avec les fonctions cellulaires même à des concentrations élevées (Yancey *et al.*, 1982).

Les bactéries halophiles sont, en revanche, adaptées à la vie dans un environnement hypersalé. Les halobactéries ont développé des mécanismes d'adaptation leur permettant de disposer d'une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations intracellulaires de sel, principalement du KCl (Oren, 1999).

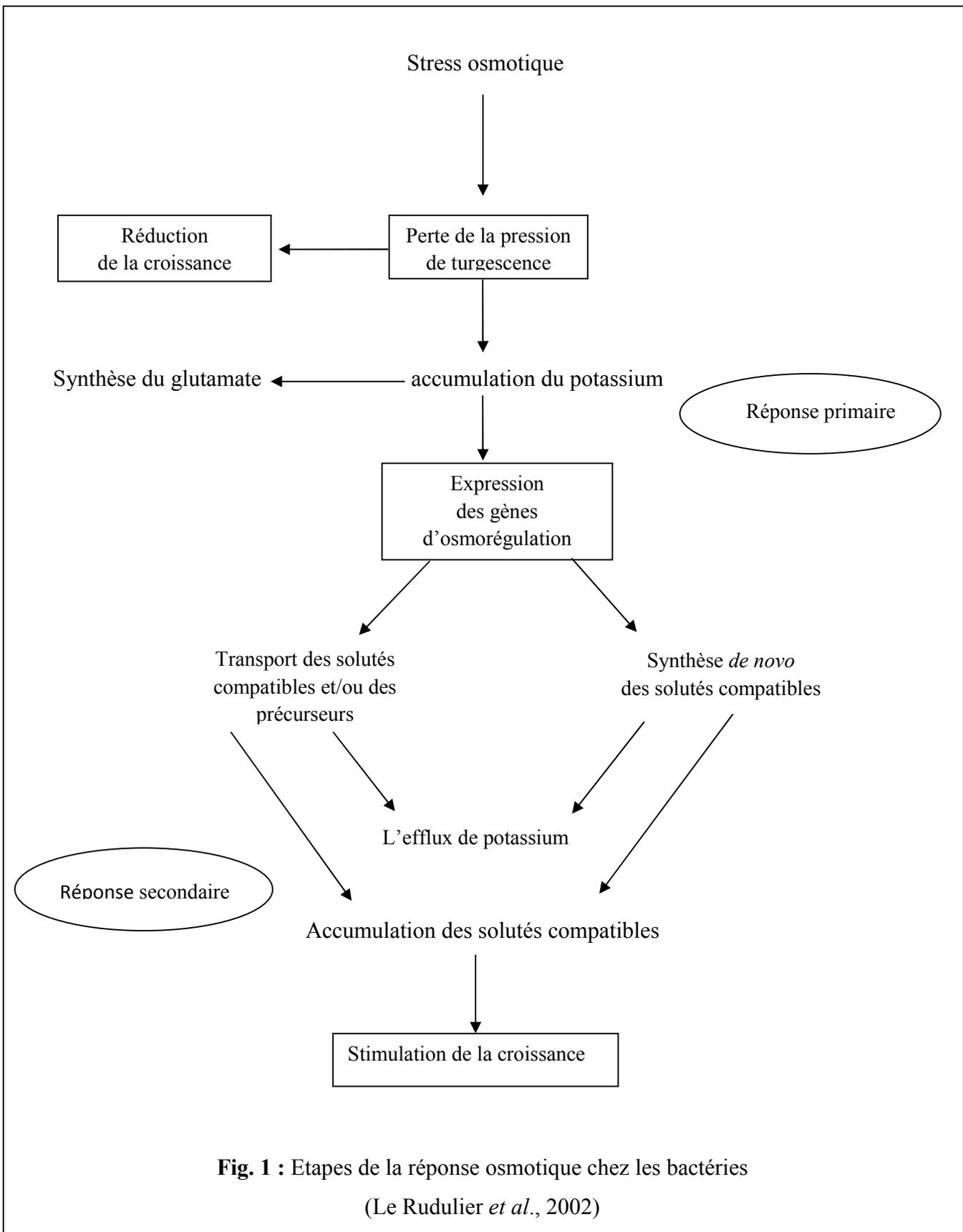
2- Osmorégulation chez les halophytes

Les halophytes sont des plantes naturellement tolérantes au sel et se développent aussi bien, voire mieux, dans un environnement salin qu'en conditions normales.

Du point de vue écophysiological, il existe deux catégories d'halophytes (Le Houérou, 1993) :

- Les halophytes obligatoires ; leur développement exige la présence des sels (40 à 100 mM) (e.g. *Plantago maritima*, *Aster tripolium*...)
- Les halophytes préférentielles : présentent une meilleure croissance sous conditions salines (100 à 500 mM) (e.g. *Atriplex* spp., *Tanarix* spp., *Maireana* spp. *Salicornia* spp., *Suaeda* spp.,...)

Ces plantes réalisent l'ajustement osmotique cellulaire en concentrant les ions de Na^+ et de Cl^- dans des vacuoles par la stimulation des pompes à protons (Parida et Das, 2005). L'accomplissement de cette étape nécessite une composition lipidique modifiée des vacuoles pour empêcher toute perte de Na^+ vers le cytoplasme (Edward et Brown, 1999). Cette accumulation d'ions dans la vacuole permet à la fois d'ajuster son potentiel osmotique et de détoxifier le cytoplasme où s'effectue la plupart des processus métaboliques cellulaires (Levigneron *et al.*, 1995). Mais l'augmentation de la pression osmotique vacuolaire risque d'entraîner une succion importante sur le cytosol. Dès lors, une stratégie d'adaptation consiste à synthétiser des composés dits "solutés compatibles". Ces derniers, par leur concentration, assurent l'ajustement osmotique entre le cytosol et la vacuole (Flowers et Colmer, 2008). Les solutés compatibles les plus communs sont : les sucres (tréhalose, saccharose), les polyols (sorbitol), les acides aminés (proline), les bétaines (glycine bétaine) et les sulfoniums tertiaires (Flowers et Colmer, 2008).



3- Solutés compatibles

Il faut distinguer deux classes de solutés compatibles. Les uns n'ont aucun effet sur la croissance cellulaire en milieu à forte osmolarité (ex : K^+ , glutamate). Les autres, par contre, ont un important effet de stimulation sur le taux de croissance lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de culture. Ce sont des **osmoprotecteurs** (Strom *et al.*, 1983). Il s'agit des molécules dipolaires, solubles et ne portent pas une charge électrique nette à pH physiologique (Bremer et Karmer, 2000 ; Sleator et Hill, 2001). Le transport à partir du milieu externe ou la synthèse de ces solutés compatibles organiques est la réponse secondaire au stress osmotique. Au contraire aux ions inorganiques, les osmoprotecteurs sont accumulés à de fortes concentrations intracellulaires (1M) sans aucun effet sur les fonctions cellulaires (la réplication de l'ADN, interactions ADN-protéines et les mécanismes métaboliques) (Kempf et Bremer, 1998). Ces derniers agissent à de concentrations extérieures aussi faibles que 1mM et leur accumulation est accompagnée par une augmentation du volume d'eau du cytoplasme en évitant la déshydratation cellulaire (Kempf et Bremer, 1998) (Fig. 2). La structure chimique de ces composés présente une affinité pour les groupements carbonés des protéines. En effet, ils stabilisent leurs structures et leurs fonctions et en les protégeant contre les effets dénaturants de la force ionique (Yancey, 2001). Ces osmolytes permettent non seulement aux cellules microbiennes de résister à une osmolarité élevée mais aussi de coloniser des écosystèmes fortement inhibiteurs (Kempf et Bremer, 1998 ; Bremer et Kramer, 2000).

Bremer et Kramer (2000) ont classé les solutés compatibles selon leurs caractéristiques biochimique en :

- Acides aminés (glutamate, proline).
- Dérivés des acides aminés (ectoïne).
- Ammoniums quaternaires appelés bétaines (glycine bétaine, carnitine) et leurs dérivés (proline-bétaine, alanine-bétaine, sérine bétaine, valine bétaine, trigonelline, dimethylsulfoniopropionate, diméthysulfanioacétate).
- Peptides courts (N-acétylglutamine amide, γ -glutamylglutamine).
- Ester de sulfate (Choline-*o*-sulfate).
- Polyols (glycérol, glucosylglycérol).
- Sucres (tréhalose, saccharose).

Les bactéries sont capables de synthétiser des osmoprotectants endogènes (glycine bétaine, proline, ectoïne) comme elles peuvent les puiser dans leurs écosystèmes. Ces composés peuvent être libérés dans le milieu extérieur soit par d'autres microorganismes producteurs suite à une chute de l'osmolarité, soit par les cellules végétales, animales ou bactériennes en cours de décomposition. Ils peuvent être aussi libérés par les exsudats racinaires ou par les mammifères via certains fluides excrétés, comme l'urine (Ventosa *et al.*, 1998).

- Les ions potassium (K⁺)

Les ions potassium constituent l'osmolyte cytoplasmique majeur chez de nombreuses espèces bactériennes. Ils contribuent à la fois dans l'équilibre de la pression osmotique à travers la membrane plasmique et dans la stabilisation de la pression de turgescence cellulaire (Csonka, 1989). Toutefois, chez certaines bactéries à Gram positif (e.g. *Corynebacterium glutamicum*, *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*) et chez les bactéries à Gram négatif modérément halophiles (*Halomonas elongata* ou *Pseudomonas halosaccharolytica*), sa concentration intracellulaire augmente proportionnellement à l'osmolarité externe du milieu de croissance (Ventosa *et al.*, 1998). Chez les entérobactéries, ces ions jouent le rôle de « messenger secondaire » nécessaire à la mise en place de système de régulation de la pression osmotique interne (Ventosa *et al.*, 1998 ; Bartlett et Roberts, 2004).

Chez les plantes, les ions K⁺ sont accumulés dans des vacuoles afin de maintenir sa concentration stable dans le cytoplasme (180 mM). Ils jouent un rôle majeur dans la synthèse protéinique, en maintenant l'association entre ARNt et le ribosome au cours de la traduction (Flowers et Colmer, 2008).

1- Les acides aminés

- Le glutamate

Du fait de sa charge négative à pH neutre, le glutamate joue un rôle de contre-ion de la charge positive des ions K⁺ (Csonka, 1989). Il est synthétisé chez les entérobactéries (e.g. *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*) (Bartlett, 2004) et accumulé chez les espèces de *Pseudomonas* et *Azospirillum* dans des conditions de stress osmotique. Chez *Azospirillum brasiliense*, il est l'acide aminé dominant lorsque la bactérie est cultivée en présence de concentrations modérées ou élevées de NaCl (0,3M- 0,5M) (Miller et Wood, 1996). Le β-glutamate (Empadinhas et da Costa, 2008) la γ-glutaminyglutamine et le glutathion contribuent également à contrebalancer la charge positive de K⁺ (Lucht et Bremer, 1994).

- **La proline**

La proline peut occuper plus de 20% du poids sec des cellules (da Costa *et al.*, 1998). Chez les bactéries à Gram négatif son accumulation s'effectue à partir du milieu externe par augmentation de l'activité de transport. Toutefois, plusieurs espèces bactérienne à Gram positif (e.g. *Bacillus* et *Streptomyces*) sont capable de synthétiser cet acide aminé (Bremer et Kramer, 2000). Sa synthèse endogène n'est pas stimulée par le stress osmotique (Csonka, 1981). La production de la proline chez les halophytes a été décrit comme moyen de défense contre la salinité et la sécheresse. En plus de son rôle dans l'osmoprotection, elle stabiliserait les membranes par interaction avec les phospholipides (Ashraf et Foolad, 2007).

- **L'ectoïne**

L'ectoïne est un acide aminé cyclique chargé positivement. Elle a été identifiée pour la première fois chez une bactérie phototrophe halophile, *Ectothiorhodospira halochloris*, (Galinski *et al.*, 1985 in Roberts, 2005). Récemment elle a été identifiée comme un important soluté compatible chez les bactéries methano et méthylophiles (Trotsenko et Khmelenina, 2002 in Oren, 2008). Certaines espèces halophiles de *Pseudomonas* (*halosaccharolytica* et *halophyla*) ont la capacité de synthétiser et d'accumuler ce composé comme soluté compatible (Miller et Wood, 1996). Les bactéries incapables de la synthétiser (e.g. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Corynebacterium glutamicum*) assurent son transport à partir du milieu extérieur (Bremer et Kramer, 2000). L'accumulation de l'ectoïne est proportionnelle à la force osmotique du milieu (Bernard *et al.*, 1993), elle ne réprime pas la synthèse de solutés compatibles endogènes (Talibart *et al.*, 1994). L'ectoïne et son dérivé hydroxyectoïne ont ainsi des propriétés protectives contre le stress osmotique, la chaleur, la congélation et la dessiccation (Ciula *et al.*, 1997).

- **Le N-acetylglutaminylglutamine- amide(NAGGN)**

Le N-acetylglutaminylglutamine-amide est un dipeptide typique d'un nombre de bactéries halophiles pourpres (Roberts, 2005) et d'autres protéobactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcalcaligenes* *P. putida*, *Sinorhizobium meliloti* (Talibart *et al.*, 1997) et *Azospirillum brasiliens* (Galinski et Truper, 1994).

2- Les sucres et les polyols

- Le tréhalose

Le tréhalose est un disaccharide non-réducteur. Il joue un rôle important dans la protection des différents organismes contre divers types de stress y compris la dessiccation, l'oxydation, la congélation, la chaleur et l'hyperosmolarité (Bremer et Kramer, 2000). La synthèse du tréhalose en réponse au stress osmotique externe est régulée par l'accumulation de K^+ -glutamate (Kempf et Bremer, 1998). Chez *E. coli* le tréhalose exogène est utilisé comme source de carbone et d'énergie et non pas comme osmoprotecteur (Strom et Kaasen, 1993). Plusieurs microorganismes accumulent le trehalose : *Azotobacter chroococum*, *E. coli* et *Salmonella thyohimirium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhizobium meliloti* (Talibart *et al.*, 1997 ; Bremer et Kramer, 2000) et *Sinorhizobium meliloti* (Gouffi *et al.*, 1998). Il s'agit d'un soluté compatible majeur chez une variété espèce de *Pseudomonas* (Miller et Wood, 1996).

- Le glycosylglycérol

Le glycosylglycérol est un osmolyte dominant chez les cyanobacteries (e.g. *Synechocystis* sp.), il est synthétisé *de novo* ou transporté à partir du milieu externe. Ce polyol est synthétisé aussi chez deux espèces halotolérantes de *Pseudomonas* (*mendocina*, *pseudoalcaligenes*) (Pocard *et al.*, 1994 ; Miller et Wood.,1996). Son analogue, glycosylglycérate, est synthétisé chez la bactérie halophile extrême, *Methanohalophilus portucalensis*, dans des conditions où l'azote est limitant (Bartlett et Roberts, 2004).

- **Le glycérol, le mannitol et l'arabitol** sont répandus chez les algues et les champignons. Les bactéries utilisent rarement les polyols comme soluté compatible à l'exception du mannitol chez *Pseudomonas putida* (Kets *et al.*, 1996) et du sorbitol chez *Zymomonas mobilis* (Empadinhas et da Costa, 2008). En état de stress salin, l'algue marine *Dunaliella* sp. accumule le glycérol comme osmoprotecteur. En revanche, le champignon *Dendryphielle* sp. accumule le mannitol et l'arabitol (Bartlett et Roberts, 2004). **L'inositol** est présent chez de nombreuses halophytes (Apiaceae, Cyperaceae, Iridaceae, uncaceae, Juncaginaceae, Poaceae, Primulaceae, Zosteraceae) ; et **le pinitol** chez Aizoaceae, Chenopodiaceae, Cyperaceae, Plumbaginaceae et Tamaricaceae. **Le sorbitol** est retrouvé chez la seule famille des Plantaginaceae (Flowers et Colmer, 2008).

3- Les bétaines

Les bétaines sont des ammoniums quaternaires méthylés dérivés d'acides aminés. Leur rôle comme osmolytes compatibles est reconnu chez différents organismes vivants : bactérie, algues, plantes, animaux. Il s'agit essentiellement de la glycine bétaine, la proline bétaine, l'hydroxyprolinebétaine, pipécolatebétaine, choline-*o*-sulfate (Rhodes et Hanson, 1993). Les autres bétaines : la β -alanine-bétaine, la γ -butyrobétaine et la trigonelline (Bernard *et al.*, 1986) sont des osmoprotecteurs moins efficaces. Les bétaines ont été isolées à partir de plantes de zones arides où elles se concentrent parfois en grandes quantités. Elles sont aussi isolées à partir des algues marines (Ghoul, 1990). A chaque fois leur présence est liée à une meilleure adaptation au sel à une osmolarité élevée du milieu.

- La glycine bétaine

La glycine bétaine (GB) est l'osmoprotecteur le plus puissant. Elle est fréquemment accumulée par de nombreux microorganismes halophiles et halotolérants telles que les cyanobactéries, les bactéries aérobies hétérotrophes et les Archaea méthanogènes (Ventosa *et al.*, 1998 ; Oren, 2008). Quelques bactéries phototrophes (e.g. *Actinopolys porahalophila*, *Halomonas elongata*) et une bactérie méthanogène *Methanohalophilus portucalensis* sont capables de la synthétiser soit *de novo* (méthylation de la glycine), soit à partir de précurseurs comme la choline ou la carnitine (Roberts, 2005). Cependant, la plupart des bactéries possèdent des systèmes de transport lui permettant un influx rapide et en masse de ce composé depuis le milieu environnant (Lucht et Bremer, 1994). La présence de la GB dans le milieu de culture inhibe la synthèse de la proline chez *Bacillus subtilis* (Whatmore *et al.*, 1990), la synthèse du tréhalose chez *Corynebacterium glutamicum* ou la synthèse de l'ectoïne chez *Vibrio* spp. (Bernard *et al.*, 1993).

Plusieurs familles d'halophytes accumulent des quantités énormes de GB (Rhodes et Hanson, 1993). Elle est rencontrée chez les Chenopodiaceae où elle constitue un caractère chimique consistant. Les épinards (*Spinacia oleracea*), l'orge (*Hordeum vulgare*) le blé (*Triticum aestivum*) et le sorgho (*Sorghum bicolor*) sont des exemples de glycophytes accumulant la GB (Ashraf et Foolad, 2007). La betterave (*Beta vulgaris*) est à l'origine du nom bétaine car elle en contient d'importantes quantités (Levigneron *et al.*, 1995).

4- Les sulfoniures tertiaires

Le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) est un composé sulfonium tertiaire. Il a une structure analogue à celle des ammoniums quaternaires (N est substitué par S). Celui-ci est utilisé comme soluté compatible par différents microorganismes vivants (Rhodes et Hanson, 1993). En absence de stress, il est accumulé comme osmolyte majeur chez certaines algues (e.g. *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca*) (Ghoul, 1990). Cependant, en situation de contrainte osmotique sa concentration reste constante ce qui favorise l'accumulation d'autres types de solutés comme le saccharose et la proline (Bartlett et Roberts, 2004). Il est accumulé spécifiquement comme osmoprotecteurs lors d'une carence en azote dans le milieu (Ghoul, 1990). Le DMSP n'est jamais synthétisé *de novo* chez les procaryotes (Ciula *et al.*, 1997) mais il est assez répandu chez les plantes vasculaires (e.g. *Spartina* spp.) (Rhodes et Hanson, 1993). Le diméthylsulfonioacétate (DMSA) (ou diméthylthénine) est un puissant osmoprotecteur chez *E. coli* (Cosquer *et al.*, 1999), son effet est équivalent à celui de la GB (Chambers *et al.*, 1987).

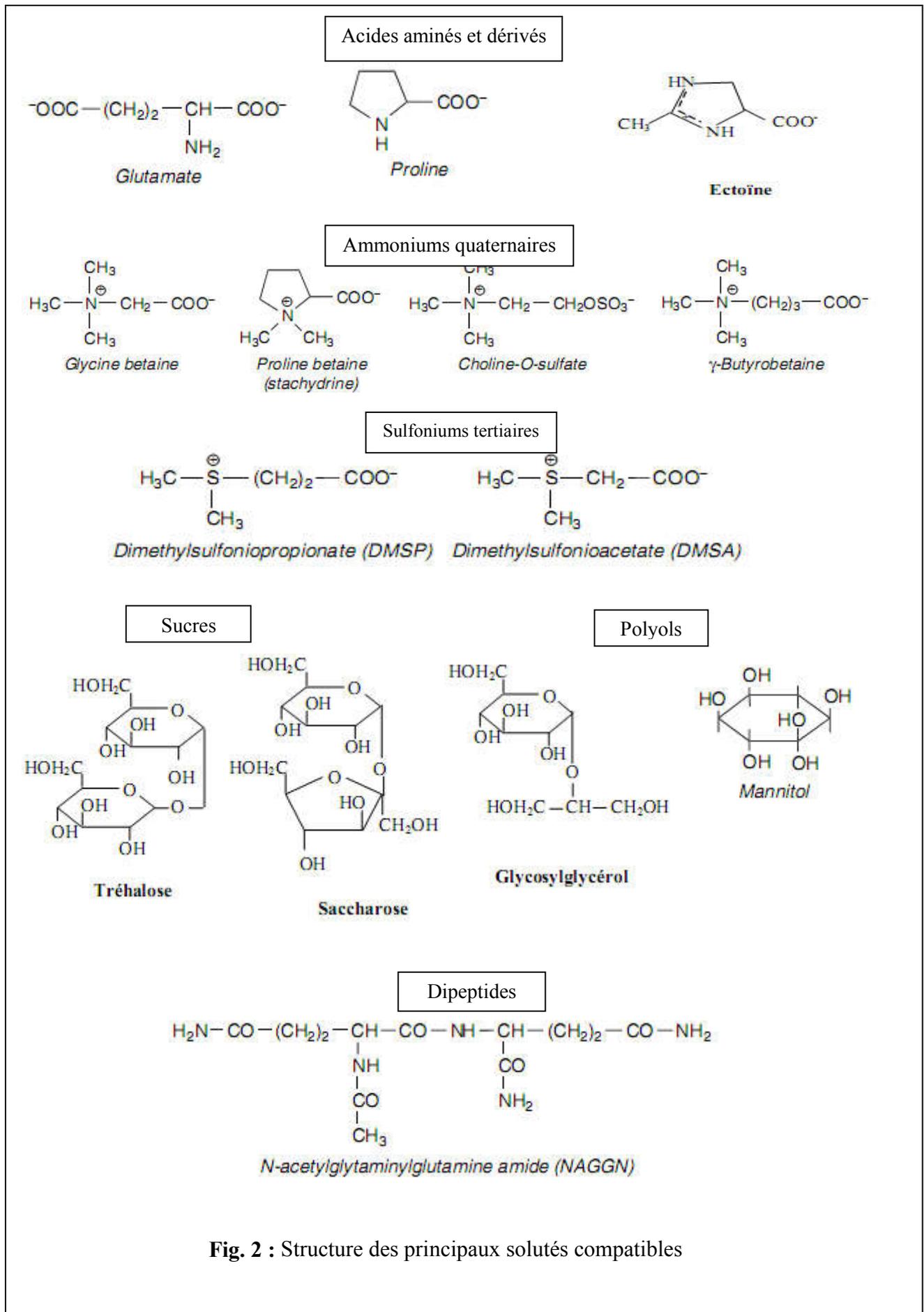


Fig. 2 : Structure des principaux solutés compatibles

III- Interactions microbes-plantes-sol

1- Rhizosphère

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "*rhizo*" ou "*rhiza*" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou d'influence. Hiltner (1904) a décrit la rhizosphère comme le lieu d'activités microbiennes autour des racines des légumineuses. Par la suite, cette définition a été étendue à toutes les plantes. Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «**l'effet rhizosphère**» (Lemanceau, 1992 ; Whipps, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Dans la rhizosphère *sensu stricto* il faut distinguer : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe *et al.*, 2008).

2- Rhizodépôts

Une grande variété de composés organiques libérés par les plantes est trouvée dans la rhizosphère. Elle peut être divisée en :

- **Exsudats**

Les exsudats sont des composés hydrosolubles de faible poids moléculaire tels que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les phytosidérophores, les flavonoïdes, les hormones et les vitamines. Ils sortent de la racine en suivant le gradient de concentration entre le cytosol de la racine et la solution du sol. La part des exsudats est la plus importante dans la rhizodépôt (Uren, 2007).

- **Substances sécrétées**

Les substances sécrétées sont des composés de poids moléculaire le plus souvent élevé. Elles sont représentées par les mucilages, les polymères de carbohydrates et les enzymes. Leur libération dans le sol est dépendante du métabolisme énergétique. Elles jouent un rôle très important dans le maintien de la stabilité du sol (Kennedy et de Luna, 2004).

- **Lysats**

Les lysats sont libérés quand les cellules des tissus corticaux des racines s'autolysent, ils incluent aussi les cellules desquamées de la coiffe et les membranes cellulaires (Bell-Perkins et Lynch, 2002) (Fig. 3).

- **Gaz**

Les gaz comme l'éthylène, le CO₂ et d'autres composés volatiles sont exportés vers le sol par respiration.

Les rhizodépôts impliquent un effet qualitatif et quantitatif sur la microflore de la rhizosphère (Walker *et al.*, 2003). Celle-ci peut soit utiliser les biomatériaux libérés comme source d'éléments nutritifs soit être inhibée par eux (Walker *et al.*, 2003 ; Brimecombe *et al.*, 2008). Du fait de leur solubilité dans l'eau, leur mobilité, ainsi que leur incorporation rapide dans les cellules microbiennes, les rhizodépôts peuvent changer le taux de décomposition de la matière organique du sol dans l'environnement de la racine (Brimecombe *et al.*, 2008).

3- Structuration et stabilité du sol

Le sol est constitué d'agrégats (combinaisons de composés organiques et minéraux) classés selon leur taille, en macro (diamètre > 250µm) et microagrégats (diamètre < 250µm). Les racines et les filaments mycéliens participent aux macroagrégats ; les résidus organiques, les bactéries et les polysaccharides participent aux microagrégats (Ranjard et Richaum, 2001). L'ensemble des interactions entre les microorganismes, les racines, le sol et l'eau provoque des modifications physicochimiques sur la structure et la stabilité (agrégation) du sol (Haynes et Swift 1990). Les racines secrètent au niveau de l'apex un mucilage constitué de polymères glucidiques dont la fonction première est d'assurer une protection contre la dessiccation (Bais *et al.*, 2006). La principale contribution des microorganismes rhizosphériques à la stabilité du sol est associée à la production de sécrétions, dont les exopolysaccharides (EPS). Ces derniers se présentent sous forme de gels hydratés autour des cellules. Ils constituent l'interface entre les microorganismes et leur environnement immédiat. Les EPS participent à la formation des agrégats bactériens et par conséquent ils aboutissent à l'amélioration de l'aération du sol, à l'infiltration de l'eau et à la progression de la racine (Sandhya *et al.*, 2009).

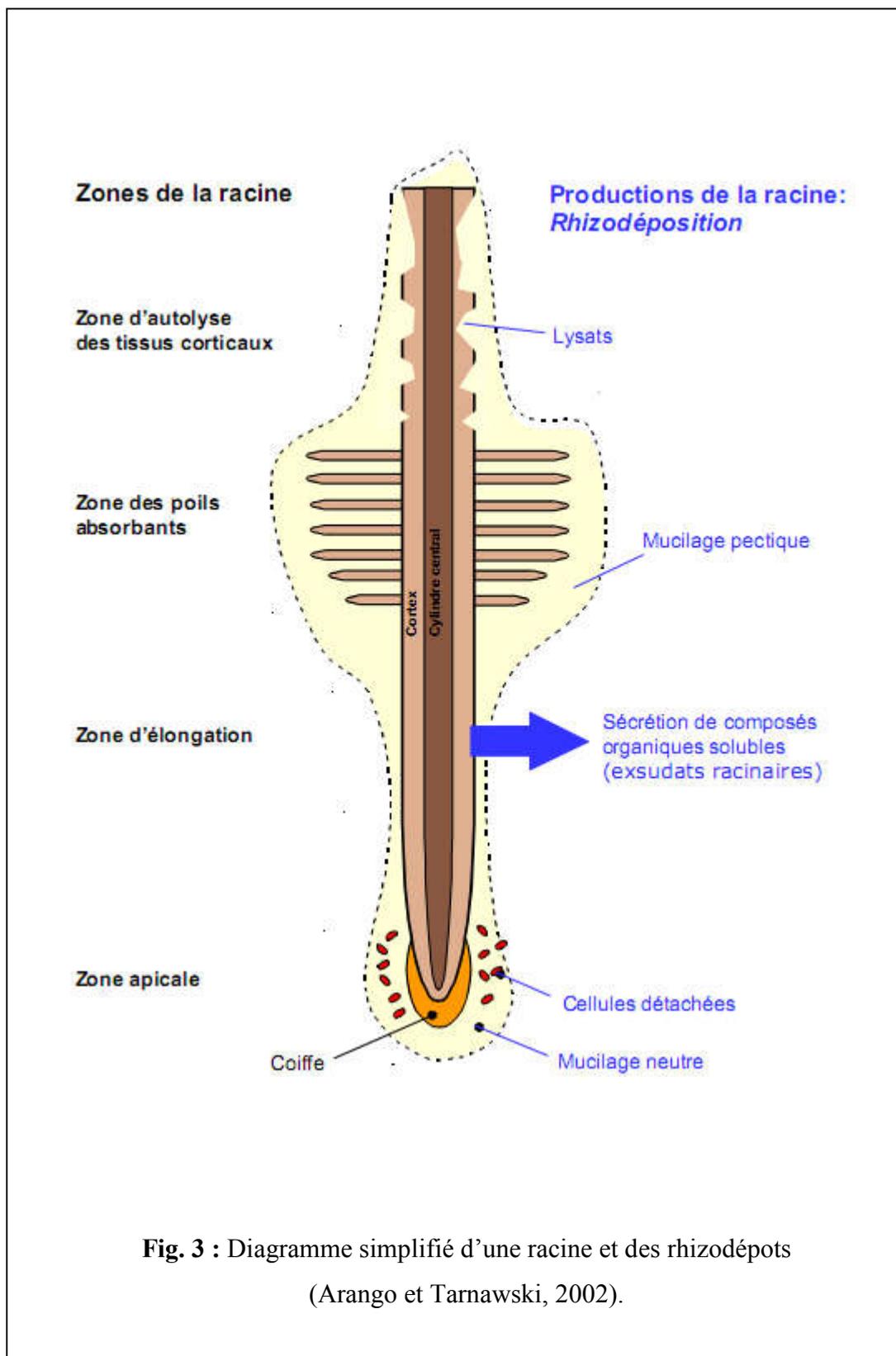


Fig. 3 : Diagramme simplifié d'une racine et des rhizodépôts (Arango et Tarnawski, 2002).

4- Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* (Gray et Smith, 2005) et *Streptomyces* spp. (Tokala *et al.*, 2002) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

4-1- Effets directs

4-1-1- Fixation d'azote

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N₂) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyens *et al.*, 2010). Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres dans la rhizosphère (e.g. *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herba spirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*) (Tilak *et al.*, 2005). En revanche d'autres fixatrices d'azote sont symbiotiques et fixent l'azote seulement en association avec certaines plantes. Il s'agit des *Rhizobia* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*) (Tilak *et al.*, 2005 ; Gray et Smith, 2005) associées aux légumineuses et des souches de *Frankia*, bactéries filamenteuses sporulantes associées à des plantes dites actinorhiziennes (Gray et Smith, 2005).

4-1-2- Solubilisation des phosphates

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques (H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻) (Ramos Solano *et al.*, 2008b ; Keneni *et al.*, 2010). *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* spp. *Bradyrhizobium* spp. *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida* et *Rhizobium* spp. sont des exemples de bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate inorganique en produisant de l'acide gluconique et l'acide 2- céto gluconique (Khan *et al.*, 2009).

Elles sont aussi capables de minéraliser le phosphate organique par l'excrétion des enzymes extracellulaires telles les phosphatases, les phytases et C-P lyases (Kim *et al.*, 1998 in Weyens *et al.*, 2010)

4-1-3- Production de sidérophores

Le fer est un élément capital aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer (Fe^{3+}) (Compant *et al.*, 2005), mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance des bactéries et des plantes. La plupart des microorganismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores. Ce sont des substances de faible poids moléculaire et servant de transporteur de l'ion ferrique Fe^{3+} à l'intérieur de la cellule microbienne (Jacques *et al.*, 1993). *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et de nombreux champignons sont capables de produire ces composés chélateurs de fer (Zahir *et al.*, 2004). Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992). Ils jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels le Zn et Pb (Dimkpa *et al.*, 2009).

4-1-4- Production des régulateurs de la croissance végétale

Il existe cinq catégories des régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.*, 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007). Il est produit par un grand nombre de bactéries tels *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae* (Karnwal, 2009) *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., et *Comamonas acidovorans* spp. (Weyens *et al.*, 2010). Les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de développement de la partie aérienne (van Loon, 2007).

4-1-5- Production d'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC-désaminase)

L'éthylène est une phytohormone capable de lever la dormance des graines. Elle favorise également la maturation des fruits et déclenche l'abscission des feuilles (Bleecker et Kende, 2000). Cependant, l'élévation de sa concentration ($>$ à 25 μ g/l) en état de stress causé par les métaux lourds (Belimov *et al.*, 2005), les pathogènes (Wang *et al.*, 2000), la sécheresse (Mayak *et al.*, 2004a), la salinité (Mayak *et al.*, 2004b) et les contaminants organiques (Reed et Glick, 2005) se traduit par une inhibition de la formation des poils et l'élongation racinaire et par conséquent une réduction de la croissance végétale. La diminution de la teneur élevée de l'éthylène peut être réalisée en dégradant son précurseur direct, l'acide 1-Aminocyclopropane -1- carboxylique (ACC), à l'aide de l'ACC-désaminase. Cette enzyme est exprimée chez plusieurs rhizobactéries (e.g. *Alcaligenes* spp., *Bacillus pumilus*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* spp., et *Variovorax paradoxus*). Celles-ci peuvent dégrader l'ACC en α - ketobutyrate et en ammonium (Glick *et al.*, 2007).

4-2- Effets indirects

4-2-1- Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2005). Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant la colonisation racinaire sont la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme, les lipopolysaccharides (LPS), la capacité de synthétiser des vitamines et des macromolécules et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

4-2-2- Antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza *et al.*, 2003 ; Haas et Defago 2005). D'autre part l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine et la xanthobacine sont produites par *Bacillus* spp. , *Streptomyces* spp. et *Stenotrophomonas* spp. (Milner *et al.*, 1996 ; Nakayama *et al.*, 1999). Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001).

4-2-3- Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (van Loon, 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008a). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartiennent au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcesens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

IV- *Pseudomonas* spp. : bactéries du sol

1- Caractéristiques générales

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonaceae, ordre des Pseudomonales (Moore *et al.*, 2006). Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux, et souvent pathogènes des animaux et des végétaux. Elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries ; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Moore *et al.*, 2006).

Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5µm de long, mobiles et asporulées (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Ce sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines qui peuvent utiliser le NO³⁻ comme accepteur d'électrons. Elles ont un métabolisme mésophile et chimio-organotrophe oxydatif (Moore *et al.*, 2006). Les différentes espèces de *Pseudomonas* sont divisées en cinq groupes selon leur ARNr. Le sous-groupe des *Pseudomonas* fluorescents, appartenant au premier groupe génomique, est certainement le plus étudié. Il se distingue par la production de pigments jaune-vert fluorescents (pyoverdine ou pseudobactine) dans des conditions de carence en fer. Les espèces appartiennent à ce groupe sont : *Pseudomonas aeruginosa*, espèce pathogène pour l'homme, *P. syringae*, espèce phytopathogène et *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. chlororaphis* (= *Pseudomonas aerufaciens*) rassemblent des espèces saprophytes (Höfte et Altier, 2010).

2- Interactions de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents associés aux plantes incluent des souches pathogènes et des souches bénéfiques. Les souches influençant avantageusement l'hôte végétal sont désignées sous le terme « plant- probiotic fluorescent *Pseudomonas* spp. » (Höfte et Altier, 2010). Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines (Lemanceau, 1992). Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses que le piétin échaudage des céréales, les pourritures des tubercules de pomme de terre, les fusarioses des racines et du collet de la tomate (Bell-Perkins et Lynch, 2002).

Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ces bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive. Puis elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère (Lemanceau, 1992 ; Brimecombe *et al.*, 2008). Les exsudats racinaires, et en particulier les sucres et les acides aminés, attirent les bactéries par chimiotactisme à la surface des racines. Ils stimulent notamment la mobilité flagellée des bactéries, ce qui permet à ces dernières de coloniser la rhizosphère (de Weert *et al.*, 2002). Chez *P. fluorescens* WCS417 les chaînes lipopolysaccharides latérales constituant l'antigène 0 des LPS bactériens jouent un rôle important dans la colonisation racinaire (Mercado-Blanco et Bakker, 2007). L'adsorption des bactéries à la racine résulte d'interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine (Lemanceau, 1992). Cette seule colonisation peut entraîner une occupation de sites suffisantes pour empêcher la croissance des pathogènes (Kamilova *et al.*, 2005).

Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autres microorganismes. Elles peuvent aussi reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent (Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

D'autres métabolites produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent également interférer avec la croissance des phytopathogènes. Le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et les différents dérivés de la phenazine jouent un rôle très important dans son activité antagoniste contre *Gaeumannomyces graminis* (agent de la piétine échaudage). La production de HCN par la souche de *P. fluorescens* CHA0 réduit la

pathogénicité des champignons tels *Thielaviopsis basicola*, agent de la pourriture noire du tabac (Mercado-Blanco et Bakker, 2007).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont capables de synthétiser de nombreuses molécules appelés « déterminants ou éliciteurs ». Elles sont impliquées dans l'induction ou la potentialisation des réactions de défense de la plante et conduisant à leur tour à la mise en place d'une ISR. Ces molécules sont de natures variées et pouvaient être divisées en trois classes :

- des composants de surface cellulaire (e.g. LPS) ;
- des métabolites à activité chélatrice du fer (e.g. sidérophores, acide abscissique) ;
- des molécules à activité antibiotique (e.g. HCN, DAPG) (van Loon et Bakker, 2005).

Les éliciteurs stimulent la production, par la plante, de phytoalexines toxiques vis-à-vis du pathogène (Ramos Solano *et al.*, 2008 a).

Les espèces de *Pseudomonas* affectent également la croissance des plantes en améliorant leur alimentation minérale. *Pseudomonas striata* , *P. cissicola* , *P. fluorescens*, *P. pinophilum*, *P. putida* , *P. syringae* , *P. aeruginosa* , *P. putrefaciens* et *P. stutzeri* isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, du maïs, du soja et d'autres céréales solubilisent efficacement les phosphates (Tilak *et al.*, 2005). D'autre part, la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) par *Pseudomonas putida* GR12-2 améliore le rendement du colza (Patten et Glick, 2002). La stimulation du métabolisme hormonal de la plante via la sécrétion de phytohormones telles les auxines, les cytokinines et les gibbérellines favorisent le développement racinaire et par conséquent la croissance végétale (Sandhya *et al.*, 2010) (Fig.4).

3- *Pseudomonas* spp. face aux stress abiotiques

Divers rhizobactéries, regroupées sous le terme PGPR, ont une capacité à promouvoir la croissance de leur plante hôte par des effets sur : la nutrition, l'architecture racinaire ou la santé de leur partenaire végétal (Grover *et al.*, 2010). Ils peuvent aussi déclencher l'expression des mécanismes de **la tolérance systémique induite (TSI)** vis-à-vis de différents facteurs de stress abiotiques tels la sécheresse, la salinité et les métaux lourds (Yang *et al.*, 2009) (Fig. 4). L'inoculation de la souche *Pseudomonas* AMK-P6, par exemple, induit une thermotolérance au sorgho (47-50°C) ; ceci est réalisé par une amélioration de sa biomasse végétale ainsi que de sa teneur en chlorophylle, en sucres, en acides aminés et en proline (Ali *et al.*, 2009). Chez le maïs (*Zea mays*), l'inoculation de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* induit une réaction de tolérance au sel se traduisant par une augmentation de la production de

proline, un maintien de la teneur en eau dans les feuilles et une absorption sélective des ions K^+ (Bano et Fatima, 2009). Malgré la présence de cadmium, la croissance du colza (*Brassica napus*) pourrait améliorer suite à l'inoculation des souches de *Pseudomonas (tolasii* ou *fluorescens*) résistantes au cadmium. La production de sidérophores, de l'AIA et l'expression de l'ACC-désaminase par ces dernières permet de diminuer la toxicité de ce métal (Dell'Amico *et al.*, 2008). Certaines espèces de *Pseudomonas* possèdent la machinerie enzymatique nécessaire à lever l'inhibition de la croissance végétale causée par une forte production d'éthylène. Par exemple *Pseudomonas putida* qui possèdent l'ACC-désaminase confèrent une résistance efficace au blé et au colza, en abaissant la synthèse d'éthylène induite par un stress salin (Zahir *et al.*, 2009 ; Cheng *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* R75 et *P. savastanoi* CB35 peuvent améliorer la croissance d'Elyme de Daourie (*Elymus dauricus*) par la dégradation des contaminants organiques tels les chloro-benzoates (Zhuang *et al.*, 2007). Les naphthalènes sont dégradés par *P. putida* (Kuiper, 2001). Les exopolysaccharides (EPS) produits par *Pseudomonas putida* GAP-P45 jouent un rôle positif dans les phénomènes de régulation de la teneur en eau, et la diffusion de la source de carbone aux plantes notamment dans des conditions de stress hydrique (Sandhya *et al.*, 2009). Ces effets sont constatés pour les sols salés dans la plupart des régions arides et semi-arides où la productivité est limitée.

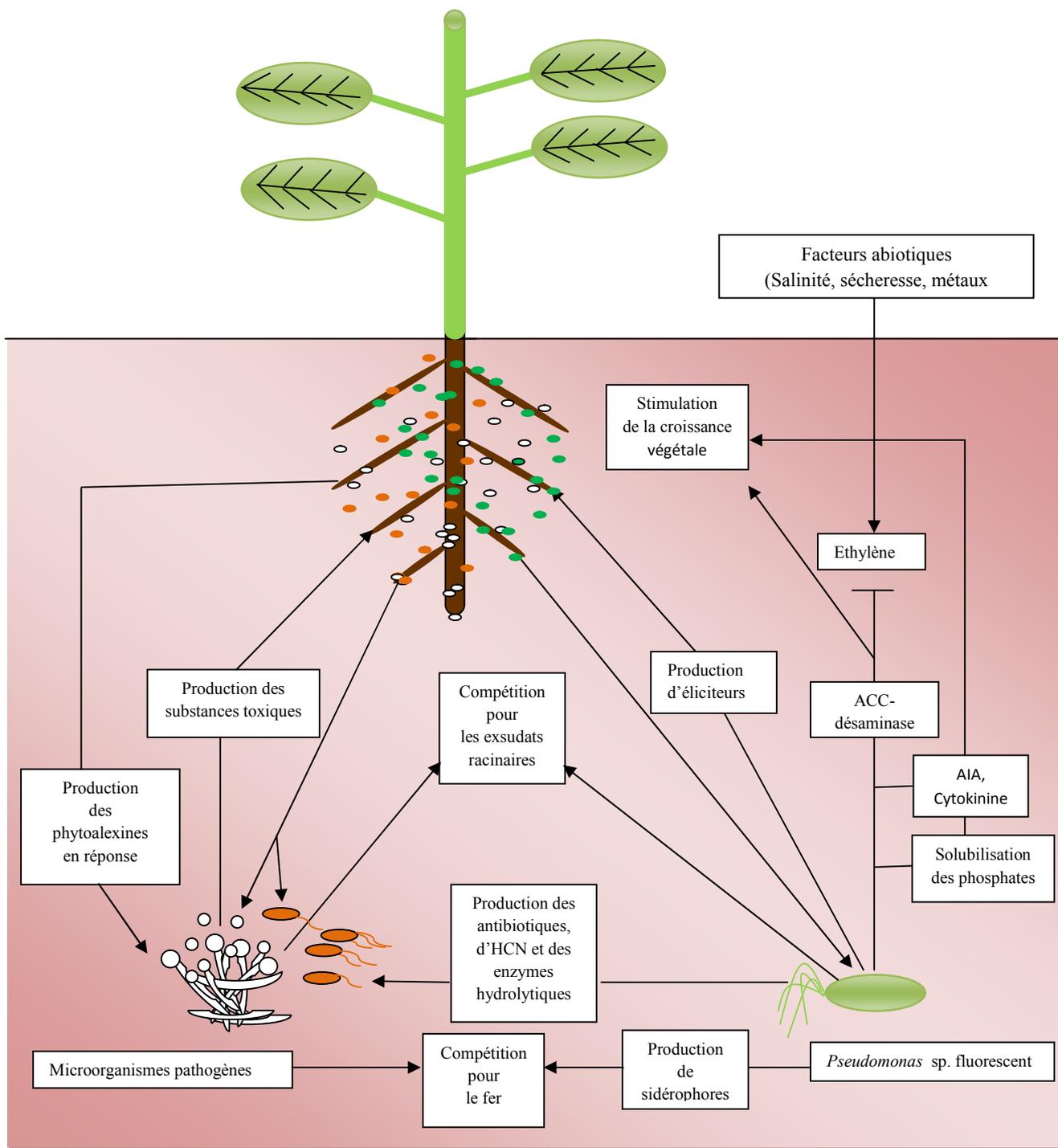


Fig. 4 : Interactions entre les *Pseudomonas* spp. fluorescents, les microorganismes pathogènes et les cellules racinaires.

4- Osmoadaptation chez *Pseudomonas* spp.

Les espèces de *Pseudomonas* ont un métabolisme très diversifié, ce qui signifie son pouvoir d'habiter une grande variété d'écosystèmes à partir des eaux douces jusqu'aux milieux hypersalins (D'Souza-Aul *et al.*, 1993 ; Pocard *et al.*, 1994). Les espèces fluorescentes de *Pseudomonas* sont dominantes dans les régions à faible concentration de sel, tandis que les régions salées sont occupées par des espèces halotolérantes représentées par *Pseudomonas alcaligenes* et *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Rangarajan *et al.*, 2001). L'adaptation d'espèces de *Pseudomonas* à l'osmolarité du milieu extérieur passe, notamment, par l'accumulation des solutés compatibles à l'intérieur du cytosol. Chez les espèces de *Pseudomonas* étudiées, plusieurs types de solutés compatibles ont été détectés. Dans des conditions de stress, *P. halosaccharolytica* et *P. halophila* sont capables d'accumuler les bétaines, l'ectoïne et l'hydroxyectoïne à partir de milieu de croissance (Kets, 1996). En revanche et en absence de bétaines exogènes *P. aeruginosa* synthétise et accumule le glutamate, le tréhalose et le N-acetylglutamine amide (NAGGN). L'accumulation de la GB exogène est accompagnée généralement d'une baisse de la concentration de ces trois osmolytes endogènes (D'Souza-Aul *et al.*, 1993). A faible osmolarité, la GB la choline et la carnitine peuvent améliorer la croissance microbienne en servant comme source de carbone et d'azote (Sarra *et al.*, 2002). Ils jouent aussi un rôle important dans l'osmoprotection à forte osmolarité mais seule la GB s'accumule à l'intérieur du cytosol (Lucchesi *et al.*, 1995 in Diab *et al.*, 2006). *P. mendonica* et *P. pseudoalcaligenes* sont capables de synthétiser ou de transporter à partir du milieu externe d'autres solutés compatibles comme le O- α -glucopyranosyl- α (1,2)-glycérol (glucosylglycérol) et l' α -glycérolglucoside (Pocard *et al.*, 1994). L'existence du mannitol chez *P. putida* a été reportée par Kets (1996).

Matériel et méthodes

I- Echantillonnage

Le sol étudié a été prélevé en Mars 2010 à partir d'un champ d'orge moissonné situé à Chott El Beïdha dans la région de Hammam Essoukhna (Latitude 35°55'N et Longitude 05°45'E), au Sud-Est de Sétif (Fig. 5). Le site se compose de deux habitats particuliers (sujet à la convention RAMSAR): le premier est la sebkha, c'est un lac naturel, excessivement salin, temporaire et dépourvu de végétation. Il s'inonde en période pluvieuse et s'assèche en été formant des croues blanchâtres de sel. Le second est un chott ou prairie humide cernant la sebkha. Cette partie moins salinisée est aux halophytes. Les terrains voisins sont, dans leur grande majorité, des exploitations agricoles où la céréaliculture est l'activité la plus répandue. Les sols entourant le site sont alcalins à structures dégradées, argileux plus ou moins hydromorphes (Anonyme, 2005 ; Khaznadar *et al.*, 2009). Les échantillons du sol sont prélevés aseptiquement en plusieurs parcelles de champ (nb=6) distantes d'environ 100 m du lac principal sur une profondeur de 0 à 30 cm (Dellal et Halitim, 1992), après avoir écarté la couche superficielle du sol. Ils sont transportés au laboratoire et maintenus à 4 °C. Une première moitié du sol a servi pour les tests d'isolement ; l'autre moitié, pour les analyses physico-chimiques du sol. Celles-ci ont été effectuées au niveau du laboratoire de l'Agence Nationale des Ressources Hydrauliques (Constantine).

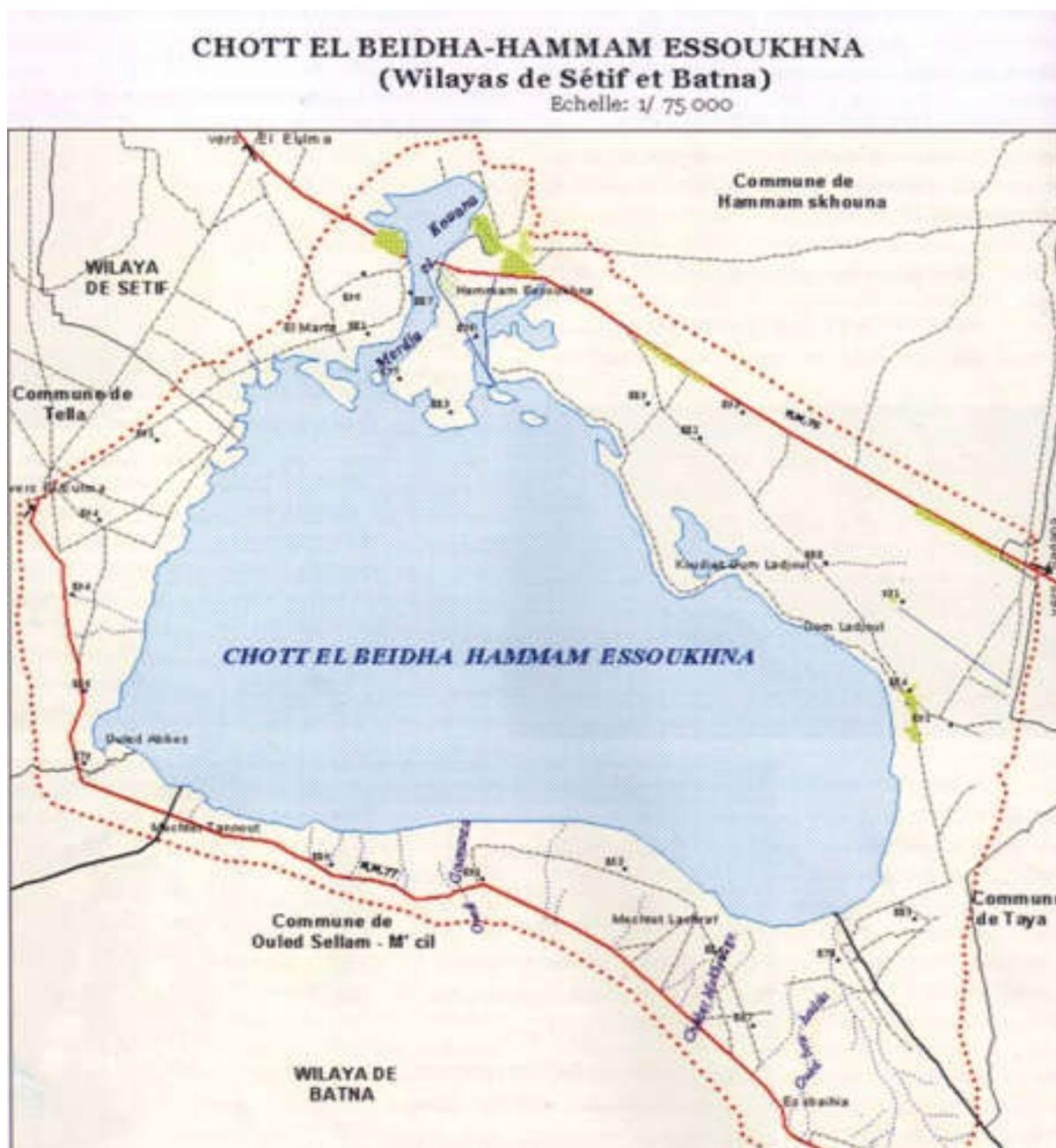


Fig. 5 : Localisation géographique de la zone de prélèvement
 (Anonyme, 2004)

II- Analyses microbiologiques du sol

1- Isolement des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Pour isoler les souches de *Pseudomonas* à partir du rhizoplan de l'orge, de petits morceaux de racines sont immergés dans un tampon phosphate salin (pH 7) (Annexe1) et agités pendant 10 min à l'aide d'un vortex. Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-8}) sont réalisées à partir de cette suspension dans une solution d'eau physiologique (8,5g/l NaCl) stérile. 0,1ml de chaque dilution est étalé à la surface du milieu sélectif S₁ additionné de triméthoprime (20 ppm) afin d'inhiber la croissance des souches de *Pseudomonas* non fluorescents (Gould *et al.*, 1985).

La composition du milieu sélectif S₁ est la suivante :

Saccharose	10 g
Glycérol	10 ml
Casamino-acides	5 g
NaHCO ₃	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
K ₂ HPO ₄	2,3 g
Sodium Lauryl Sarcosique (S.L.S)	1,2 g
Triméthoprime	20 mg
Agar agar	18g
Eau distillée	q.s.p
	1000 ml

La solution de triméthoprime est stérilisée à travers un filtre type Millex (porosité : 0,22µm).

Le pH final est de 7,4.

Le milieu ensemencé est incubé à 28°C/72h.

2- Identification des souches

Dix colonies d'aspects différents, fluorescentes sous UV (365nm), sont purifiées sur le milieu solide de King B (King *et al.*, 1954) (Annexe 2) puis désignées par un numéro de code. L'identification de ces souches isolées est déterminée à base de l'aspect phénotypique de colonies, de l'examen microscopique et des caractères biochimiques spéciaux. L'observation morphologique (forme de la colonie, taille, couleur, aspect, odeur et transparence) et microscopique (coloration de Gram, taille, forme, mode de groupement et mobilité) permet une orientation préliminaire. Les tests biochimiques réalisés sont : la fluorescence sur milieux de King A et B, la croissance à 4 et 42°C, le test de l'oxydase, de la catalase, de la gélatinase, de la protéase, de l'uréase, de l'arginine dihydrolase (ADH), de la lysine décarboxylase

(LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la tryptophane désaminase (TDA) et de la nitrate réductase. La voie d'attaque du glucose, la dégradation de citrate, la production d'indole et la réaction de Voges-Proskauer sont également réalisés. Les caractères phénotypiques et biochimiques des souches sont déterminés et comparés à ceux décrits dans le manuel de Bergey (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9^{ème} édition)

3- Conservation des souches

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents pures sont conservées en milieu LB plus 15 % de glycérol à -20°C.

4- Caractéristiques promotrices de la croissance végétale

4-1- Solubilisation du phosphate sur un milieu solide et liquide

La capacité des souches isolées à dissoudre le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a été testée selon la méthode décrite par Nautiyal (1999). Les bactéries isolées sont déposées sous forme de spots (5 μl) sur le milieu solide NBRIP (National Botanical Research Institut's phosphate) (Annexe 3). Après incubation à 28°C/10 jours, le diamètre total (diamètre du halo + diamètre de la colonie) est mesuré. Le diamètre du halo de solubilisation pour chacun des souches est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total.

Pour estimer la quantité du phosphate soluble, 10 ml de milieu liquide de NBRIP sont inoculés (1%) avec une culture fraîche de *Pseudomonas* (24h), et incubés à 28 °C sous agitation (150 rpm). Après incubation à 28°C/10 jours les cultures sont centrifugées (1000 rpm/15 min). Le phosphate soluble dans le surnageant est déterminé par la méthode colorimétrique de Bray et Kurtz (1945). 9 ml de chaque surnageant sont ajoutés à 11 ml de réactifs d'extraction du phosphate soluble (Annexe 8) puis le volume est complété à 25 ml avec de l'eau distillée. Le mélange est agité vigoureusement et laissé à reposer 5 minutes. La lecture spectrophotométrique est réalisée à 660 nm contre un blanc. La quantité de phosphate solubilisée est déterminée d'après la courbe d'étalonnage (Annexe 14).

4- 2- Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La capacité à produire l'acide cyanhydrique par les souches de *Pseudomonas* est étudiée selon la méthode de Bakker et Schippers (1987). Chaque souche est inoculée, à l'aide d'une anse, sur le milieu Trypticase soja (Fluka) (Annexe 4) additionné de glycine (4,4 g/l). Un papier Whatman 3MM ($\text{Ø} = 5$ cm) imprégné d'une solution de couleur jaune (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium) est déposé sur le couvercle de chaque boîte de Pétri en position

inversée. Celles-ci sont scellées avec du papier Parafilm® et incubées à 28 °C/4 jours. Elles sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les souches, HCN⁺, capables de virer la couleur du papier, du jaune à l'orangé (Abbas-Zadeh *et al.*, 2010).

4- 3- Activité antifongique

Ce test est effectué pour vérifier l'existence d'une éventuelle action inhibitrice des souches de *Pseudomonas* isolées vis-à-vis de deux agents phytopathogènes: *Fusarium oxysporium* et *Alternaria alternata* (Cattelan *et al.*, 1999; Hariprasad *et al.*, 2009 ; Sgroy *et al.*, 2009). Ils sont isolés par l'équipe de phytopathologie du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Université de Sétif). Un cylindre de 3 mm de diamètre de chaque mycélium est prélevé à partir d'une culture fraîche de 6 jours à l'aide de l'emporte-pièce, puis placé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 5) inoculé avec 5µl de chaque culture bactérienne étudiée. Le témoin est inoculé uniquement par le champignon à tester (Hariprasad *et al.*, 2009). Les boîtes sont incubées à 25 et à 28°C et/10 jours selon la température optimale du champignon pathogène. Les résultats sont notés lorsque la croissance des mycelia dans les boîtes des témoins atteint les points d'inoculation des souches bactériennes (Hariprasad *et al.*, 2009). La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas*, comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$I = [(T-C)/T] \times 100$$

I : pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

T : diamètre moyen de mycélium dans la boîte de témoin (mm).

C : diamètre moyen de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (mm).

III- Mise en évidence de l'halotolérance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

L'étude de l'halotolérance des dix souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées (Ps1, Ps2, Ps3, Ps4, Ps6, Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13) est réalisée sur deux milieux différents : riche (complexe) et minimum (minérale).

A/ Le milieu Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972)

Le milieu LB est un milieu riche utilisé couramment pour la culture des bactéries.

Tryptone		10g
Extrait de levure		5g
NaCl		10g
Eau distillée	q.s.p	1000ml

Le pH final est de 7,0. Le milieu est stérilisé à 120 C°/15 min

B/ Le milieu minéral minimum de glucose (GMM) (Bonaterra *et al.*, 2007)

C'est un milieu chimiquement défini.

Glucose		5g
NH ₄ Cl		1g
KH ₂ PO ₄		3g
Na ₂ HPO ₄		2,4g
NaCl		0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,2g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

Le pH final est ajusté à 7,0. Le milieu est stérilisé à 120 C°/ 15 min.

N.B : Les produits utilisés sont de degré de pureté « ultrapure »

- Les milieux LB et GMM sont préparés avec les concentrations croissantes de sel (NaCl) : 0,3 M (17,58 g/l) - 0,5 M (29,3 g/l) - 0,8 M (46,88g/l) - 1 M (58,6 g/l). Des témoins sans sel sont préparés à chaque fois. Le milieu LB et GMM contiennent initialement 0,17 M et 0,008M et de NaCl respectivement, dont il faut tenir en considération.

1-Préparation des inocula bactériens

Un volume de 5 ml de bouillon LB estensemencé par une culture fraîche (de 24h) de souches de *Pseudomonas*. Après incubation à 28°C/24h, les cultures sont centrifugées à 3000 rpm/10 min. Les culots obtenus sont lavés trois fois par 5 ml d'eau physiologique (8,5g/l NaCl) puis repris finalement dans 5ml. Les suspensions bactériennes lavées serviront à inoculer les différents milieux de cultures.

2- Estimation de la concentration maximale de NaCl tolérée

Afin de sélectionner les souches de *Pseudomonas* fluorescents les plus halotolérantes, 5 µl de chaque suspension bactérienne lavée des souches ont servi à inoculer les milieux LB et GMM salés. 200µl de ces derniers sont répartis dans des puits à fond rond de microplaques stériles (Fig. 7). Des témoins sans apport de sel sont réalisés à chaque fois. La croissance bactérienne dans les différents puits est déterminée par appréciation visuelle du trouble après d'incubation à 28°C/48h. La concentration maximale tolérée correspond à la plus forte concentration en NaCl permettant la croissance bactérienne. Ce test est réalisé en duplicata.

IV-Effet d'osmoprotecteurs sur la croissance des souches de *Pseudomonas* spp. en présence du sel

Parmi les souches de *Pseudomonas* fluorescents sélectionnées, cinq souches (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13) sont choisies car halotolérantes. Elles ont servi à étudier l'effet du sel sur leur croissance en présence et en absence d'osmoprotecteurs (Fig. 7). La souche de référence *Pseudomonas fluorescens* CHA0 est également incluse. Elle a été isolée pour la première fois à partir de la rhizosphère du tabac dans un sol résistant aux pourritures racinaires (Keel et Défago, 1997). Cette souche nous a été fournie par le Professeur Défago (Institute of plant sciences, Zurich, Zwitzerland).

1- Effet de la glycine bétaine (GB)

Une solution-mère de GB (100 mM) (Fluka) stérilisée à travers une membrane type Millex (porosité : 0,22 µm) est ajoutée au milieu GMM salé ou non à une concentration finale de 1 mM (Ghoul, 1990). 100µl de la suspension lavée des souches de *Pseudomonas* étudiées (D.O_{600nm} : 0,01-0,05) servent à inoculer 10 ml de milieu GMM additionné de GB (1mM) en présence ou en absence de sel. La croissance bactérienne a été déterminée après incubation, en aérobiose, à 28°C/4 jours L'effet osmoprotecteur de la molécule testée est estimé en comparant les valeurs de la D.O (à 600nm) finale avec celles des témoins sans osmoprotecteur. Le test est réalisé en duplicata.

2- Effet de l'extrait de l'halophyte

A- Choix de l'halophyte

L'halophyte *Atriplex halimus* est retenue dans cette étude (Fig. 6). Elle fait partie de la famille des Chenopodiaceae, elle est plus répandue dans les régions arides et semi-arides (Le Houérou, 1993). De nombreuses recherches ont démontré ses capacités d'accumuler les osmoprotecteurs, notamment la GB, qui contribue fortement dans l'ajustement osmotique de la plante en condition de stress osmotique. (Larguet, 1998 ; Ben Hassine et Lutts, 2010). Cette caractéristique nous amène à tester l'effet d'osmoprotecteur naturel de l'extrait hydro-alcoolique de *Atriplex halimus* sur la croissance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

La systématique de *Atriplex halimus* est représentée comme suit :

Embranchement: Spermaphytes (Phanérogames)

Sous-embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Apétales

Ordre : Centrospermales

Famille : Chenopodiaceae

Espèce : *Atriplex halimus*

Nom commun : Pourpier de mer

Nom arabe : « *Guettaf* », connue à l'Ouest Algérien et au Maroc sous le nom de « *Chenane* ».

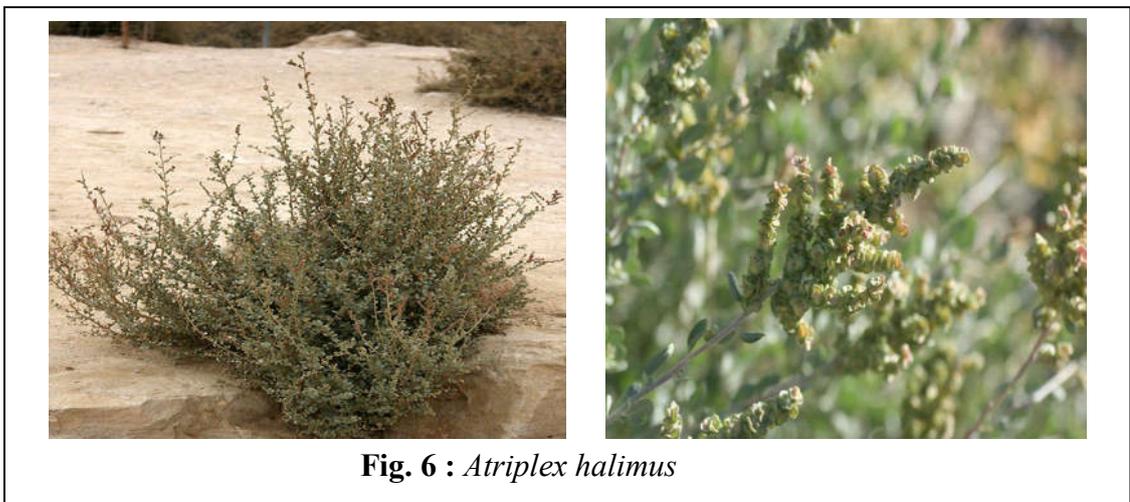


Fig. 6 : *Atriplex halimus*

B- Récolte de la plante

L'halophyte *Atriplex halimus* a été récoltée dans la région de Chott El Beïdha au Sud-Est de Sétif, en Novembre 2010. Après un lavage à l'eau courante, elle est laissée à sécher à température ambiante et à l'obscurité pendant trois semaines. Elle est, ensuite, réduite en poudre à l'aide d'un broyeur à lame de façon à faciliter un meilleur relargage ultérieur des substances intracellulaires.

C- Préparation de l'extrait hydro-alcoolique de *A. halimus*

25 g de poudre de la plante sont additionnés de 250 ml d'éthanol 70 %. Après agitation et filtration, l'extrait est évaporé à sec sous vide à 45 °C puis récupéré dans 10 ml d'eau distillée (Larguet, 1998).

D- Mesure de la capacité osmoprotectrice

Des dilutions au 1/100^{ème} sont effectuées à partir d'extrait hydro-alcoolique de *A. halimus* dans 10 ml de milieu GMM additionné ou non de sel. Les solutions obtenues sont stérilisés à 120°C/20 min. Elles sont ensuite inoculées par 100 µl de différentes suspensions lavées (D.O_{600nm} : 0,01-0,05). Le test est réalisé en duplicata. La croissance bactérienne est détectée par mesure de la densité optique après 4 jours d'incubation en aérobiose à 28 °C. La capacité osmoprotectrice de l'extrait testé est estimée en comparant les valeurs de la D.O (à 600nm) finale avec celles des témoins sans extrait d'halophyte.

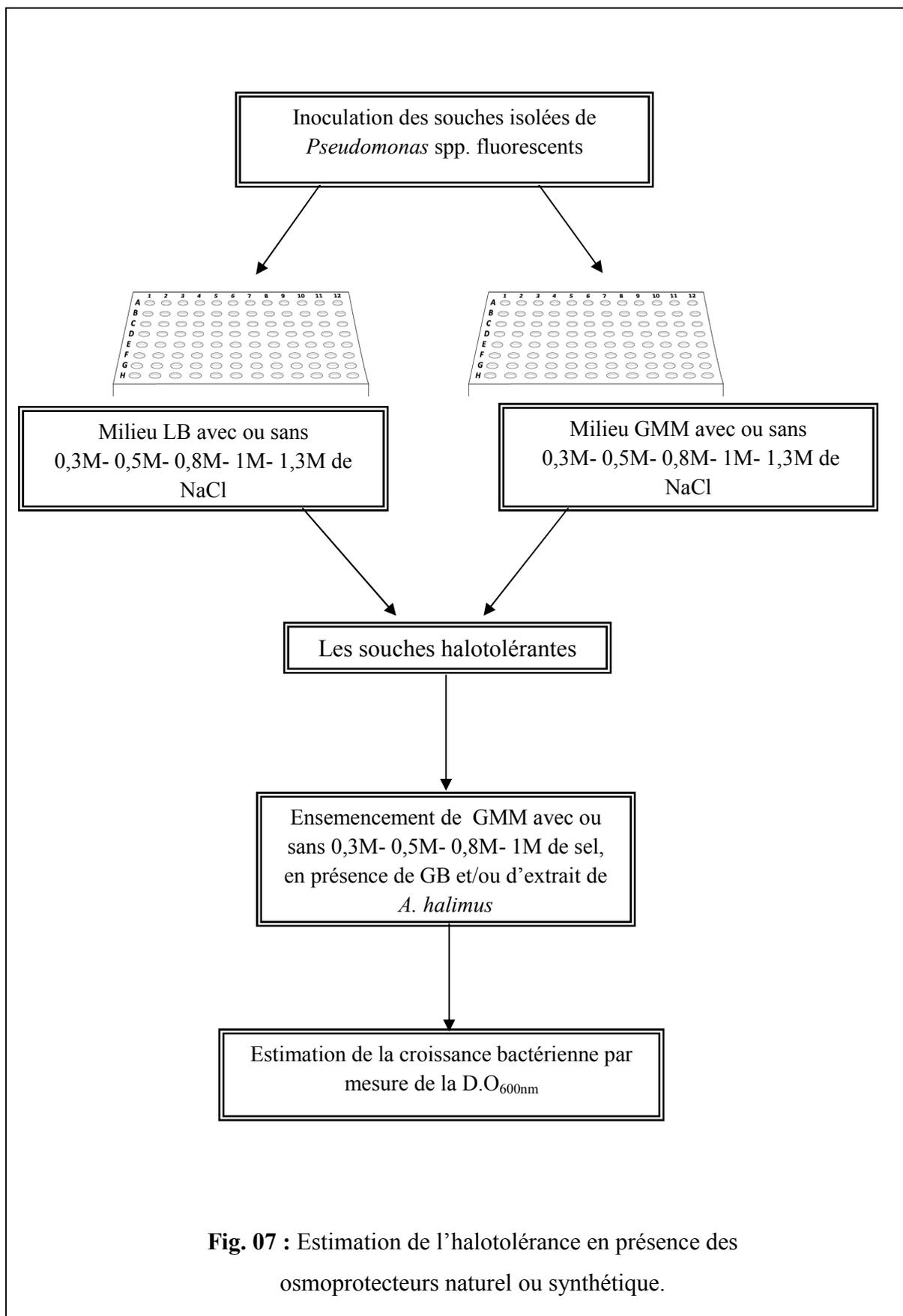


Fig. 07 : Estimation de l'halotolérance en présence des osmoprotecteurs naturel ou synthétique.

V- Effet de la salinité et d'osmoprotecteurs sur certaines activités physiologiques de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Il s'agit à travers cette étude d'évaluer l'effet du sel, de la GB et de l'extrait hydro-alcoolique de *A. halimus* sur la production bactérienne de l'acide indole-3-acétique (AIA) et de sidérophores. En plus des souches halotolérantes de *Pseudomonas*, précédemment décrites, deux autres souches sensibles au sel (Ps2 et Ps3) ont été également incluses.

1- Production de l'AIA

La production de l'AIA par les différentes souches étudiées a été testée sur un milieu minimum MS (Minimal salt medium) (Annexe 6) (Edi, 2003) additionné de tryptophane à une concentration finale de 5 mM (Fluka) (Khalid *et al.*, 2004). Ce dernier est ajouté après une stérilisation de la solution-mère (100 mM) à travers une membrane de 0,22µm de porosité. Le milieu MS est préparé aux concentrations salines suivantes: 0,5 M- 0,8 M. La GB (1 mM) et/ou l'extrait de *A. halimus* (1/100^{ème}) sont rajoutés à chaque fois. Des témoins sans sel, sans GB et sans extrait d'halophyte sont évidemment réalisés. Les tubes de 10 ml de chaque milieu sont inoculés par 100 µl de différentes suspensions bactériennes non lavés, d'une culture fraîche (de 24h). Après incubation à 28°C/48h sous agitation (120 rpm), les cultures sont centrifugées à 3000 rpm /15min. 1ml de chaque surnageant obtenu est mélangé à 2 ml de réactif de Salkowski (Annexe 9). L'apparition d'une couleur rose indique la présence de l'AIA. La quantité de ce dernier est déterminée, d'après la courbe d'étalonnage (Annexe 15), par lecture de l'absorbance à 530 nm contre un témoin (1 ml de milieu non-inoculé + 2 ml de réactif de Salkowski). Ce test est réalisé en duplicata.

2- Production de sidérophores

La production de sidérophores en présence des concentrations croissantes de sel est testée en milieu pauvre en fer. Le milieu utilisé est le King B. Ce dernier additionné ou non de sel (0,5 M- 0,8 M), de GB (1mM) ou d'extrait de *A. halimus* (1/100^{ème}) est inoculé avec 5 µl d'une culture bactérienne fraîche (de 24h). Après 24 h d'incubation, 15 ml de milieu Chrome Azurol S (CAS) (Fluka) (Schwyn et Neilands, 1987) modifié par Mahmoud et Abd Alla. (2001) (Annexe 7) sont versés sur le King B contenant les bactéries cultivées. Après 15 min de contact un changement de couleur, du bleu à l'orange, commence à apparaître autour des bactéries productrices des sidérophores (Pérez-Miranda *et al.*, 2007). Le diamètre du halo de production de sidérophores, pour chacun des isolats, est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total (halo+colonie). Ce test est réalisé en duplicata.

VI- Analyses statistiques

L'ensemble des résultats a été analysés à l'aide d'un programme statistique, ASSISTATS (Version 7.6 ; Edition 2010), par l'utilisation du test de Tukey dont le seuil d'erreur alpha est $\leq 0,05$. Ces études ont été pour but d'évaluer l'effet de la souche, du sel, de la glycine bétaine et de l'extrait de *A. halimus* sur:

- La croissance dans un milieu minéral minimum (GMM).
- La production de l'AIA.
- La production de sidérophores.

Résultats

I- Caractéristiques physico-chimiques du sol étudié

L'ensemble des résultats des analyses physico-chimiques est résumées dans le tableau suivant:

Tab. 1 : Paramètres physico-chimiques du sol étudié

Taux d'humidité	pH	deciSiemens (dS/m)	milliéquivalents/l (még/l)						
		Conductivité électrique (CE)	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
4,67	8,2	8	2,4	180	1160	63,7	77,8	834,8	6,4

A la base des normes de salinité (Annexe 12), le sol étudié est considéré comme salin. Il est majoritairement dominé par les ions sodium (Na⁺), les ions chlorure (Cl⁻) les ions sulfate (SO₄⁻²), mais carencé en ions potassium (K⁺) et en ions hydrogénocarbonate (HCO₃⁻). La concentration des cations divalents (Mg⁺⁺ et Ca⁺⁺) est modérée. De plus, il présente un caractère sec et alcalin.

II- Identification des souches

L'identification des souches isolées a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de Bergey et *al* (1994).

1- Caractéristiques morphologiques (Tab.2)

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées cultivent rapidement (24h) sur milieu King B en donnant des colonies crème à blanchâtres. Elles sont capables d'élaborer un pigment jaune-vert fluorescent sous UV (365nm) diffusible dans le milieu. Les souches Ps1, Ps2, Ps3, Ps4, Ps6 et Ps13 présentent des colonies rondes pigmentées aux bords réguliers, des reliefs bombés et des surfaces lisses. Au contraire, Ps7, Ps8, Ps 12, Ps10 ont des colonies rugueuses au centre opaque et aux bords clairs irréguliers. Elles présentent des petites plages d'autolyse autour de la colonie donnant un reflet irisé (Fig. 8). La présence d'une odeur aromatique de seringat est assez caractéristique chez toutes les souches. Sur milieu liquide LB elles donnent un trouble homogène avec un voile à la surface.

Tab.2 : Caractères morphologiques des souches de Pseudomonas isolées.

Souches	Forme	Taille (mm)	Elévation	Surface	Opacité	Pigment
Ps1	Ronde	6	Bombée	Lisse brillante	Translucide	Vert, soluble
Ps2	Ronde	4	Bombée	Lisse brillante	Opaque	Vert, soluble
Ps 3	Ronde	3	Bombée	Lisse brillante	Translucide	Vert, soluble
Ps4	Ronde	6	Bombée	Lisse brillante	Opaque	Vert, soluble
Ps6	Ronde	6	Bombée	Lisse brillante	Translucide	Vert, soluble
Ps7	Irrégulière	6	Convexe	Rugueuse	Opaque	Vert, soluble
Ps8	Irrégulière	10	Plate	Rugueuse	Opaque	Vert, soluble
Ps10	Irrégulière	10	Convexe	Rugueuse	Opaque	Vert, soluble
Ps12	Irrégulière	6	Plate	Rugueuse	Opaque	Vert, soluble
Ps13	Ronde	6	Bombée	Lisse brillante	Opaque	Vert, soluble

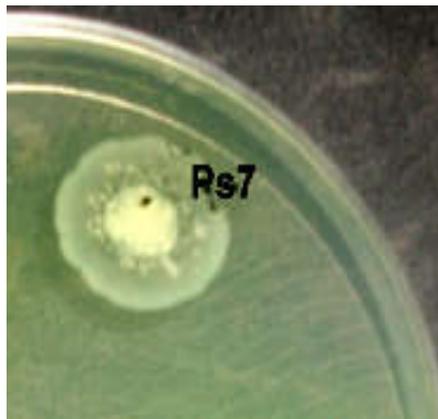
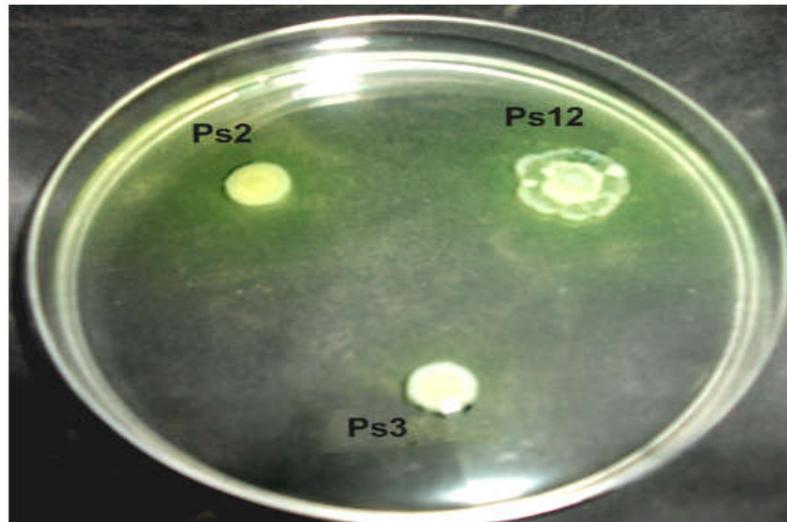


Fig. 8 : Aspect de quelques colonies sur King B

2-Examen microscopique

L'observation microscopique révèle des bacilles à Gram négatif droits ou légèrement incurvés à bouts arrondis. Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux. Elles sont mobiles et asporulées.

3- Caractéristiques biochimiques

Toutes les souches étudiées ainsi que la souche de référence, *Pseudomonas fluorescens* CHA0, sont oxydase⁺, catalase⁺, nitrate réductase⁺, protéinase⁺, ADH⁺, citrate⁺, et elles dégradent le glucose par voie oxydative. Par ailleurs, elles donnent une réponse négative aux LDC, ODC, TDA, indole, uréase, Voges-Proskauer, production d'H₂S (Tab. 3). Toutes les souches produisent un pigment soluble dans l'eau, la pyoverdine, sur le milieu de King B. Trois entre elles (Ps1, Ps3, Ps6) sont incapables de synthétiser, la pyocyanine, pigment soluble dans le chloroforme sur King A ; elles ne cultivent pas à 42°C. Ces caractères orientent leur identification vers les espèces de *P. fluorescens* ou *putida*. La croissance de la souche Ps6 à 4°C confirme son appartenance à l'espèce *P. fluorescens*. En revanche, l'absence de gélatinase chez les souches Ps1 et Ps3 fait penser à *P. putida*. Le reste des souches (Ps2, Ps4, Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13) synthétisant la pyocyanine et cultivant à 42 et non à 4°C sont identifiées comme des *P. aeruginosa*.

Tab. 3 : Quelques caractères biochimiques de souches de *Pseudomonas* isolées

Tests	Souches										
	Ps1	Ps2	Ps 3	Ps4	Ps6	Ps7	Ps8	Ps10	Ps12	Ps13	CHA0
Coloration de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatinase	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance sur KingA	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Croissance sur KingB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine décarboxylase(LDC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine décarboxylase (ODC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane désaminase (TDA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'acide à partir du glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 42C°	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Croissance à 4C°	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

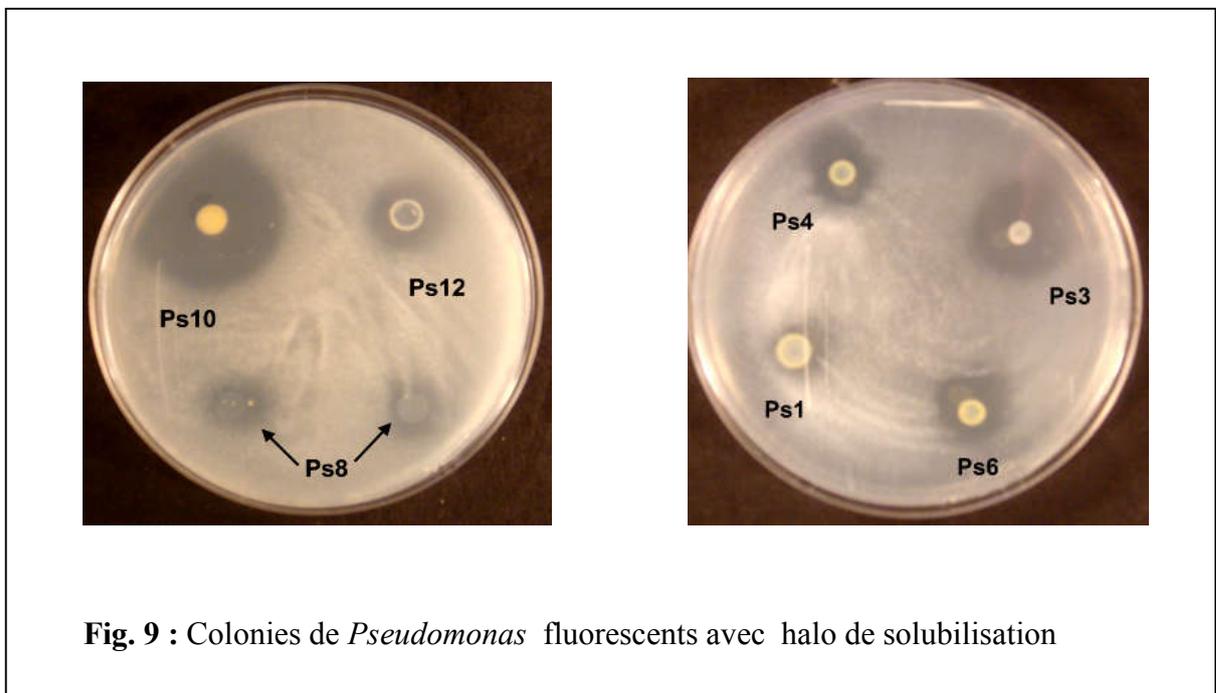
+ : Positif

- : Négatif

4- Caractéristiques promotrices de la croissance végétale

4-1- Solubilisation du phosphate

Les dix souches de *Pseudomonas* fluorescents retenues ont été testées pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique sur un milieu solide NBRIP contenant le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphore. Après 10 jours d'incubation à 28°C, huit souches ont produit une zone claire autour de la colonie traduit une solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Fig. 9). Les souches Ps10, P3, P7 avec un halo de solubilisation de 15, 13, 12, mm, respectivement, semblent être les plus efficaces (Tab. 4). Les souches Ps1, Ps4, Ps6, 12, Ps13 et CHA0 solubilisent modérément le phosphate et le diamètre du halo varie de 4 à 6mm. Le halo est absent chez Ps2 et Ps8.



Tab. 4 : Solubilisation du phosphate

Souches	Diamètre de la colonie (mm)	Diamètre du halo de solubilisation (mm)
Ps1	6	5
Ps2	4	0
Ps3	3	13
Ps4	6	4
Ps6	5	6
Ps7	6	12
Ps8	6	0
Ps10	6	15
Ps12	6	6
Ps13	6	6
CHA0	6	6

L'estimation quantitative du phosphate soluble sur milieu liquide NBRIP est déterminée aussi après 10 jours d'incubation à 28°C. La quantité de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilisée par les souches varie de 21 à 90,42µg/ml. Malgré qu'aucun halo de solubilisation n'ait été observé autour des colonies de la souche Ps2 sur milieu solide, cette dernière atteint la quantité maximale de solubilisation (96,42µg/ml) sur milieu liquide. Elle est la plus efficace suivi par Ps3 avec 67,94 µg/ml. Les souches CHA0, Ps12, Ps10 Ps13 Ps6 solubilisent aussi une grande quantité du phosphate (50,8- 46,87- 44,47- 32,23- 31,63 µg/ml respectivement). Le taux le plus faible est observé chez Ps1 (21 µg/ml), Ps4 (21,60 µg/ml) et Ps7 (26,61 µg/ml). La souche Ps8 ne solubilise pas le phosphate (Fig. 10).

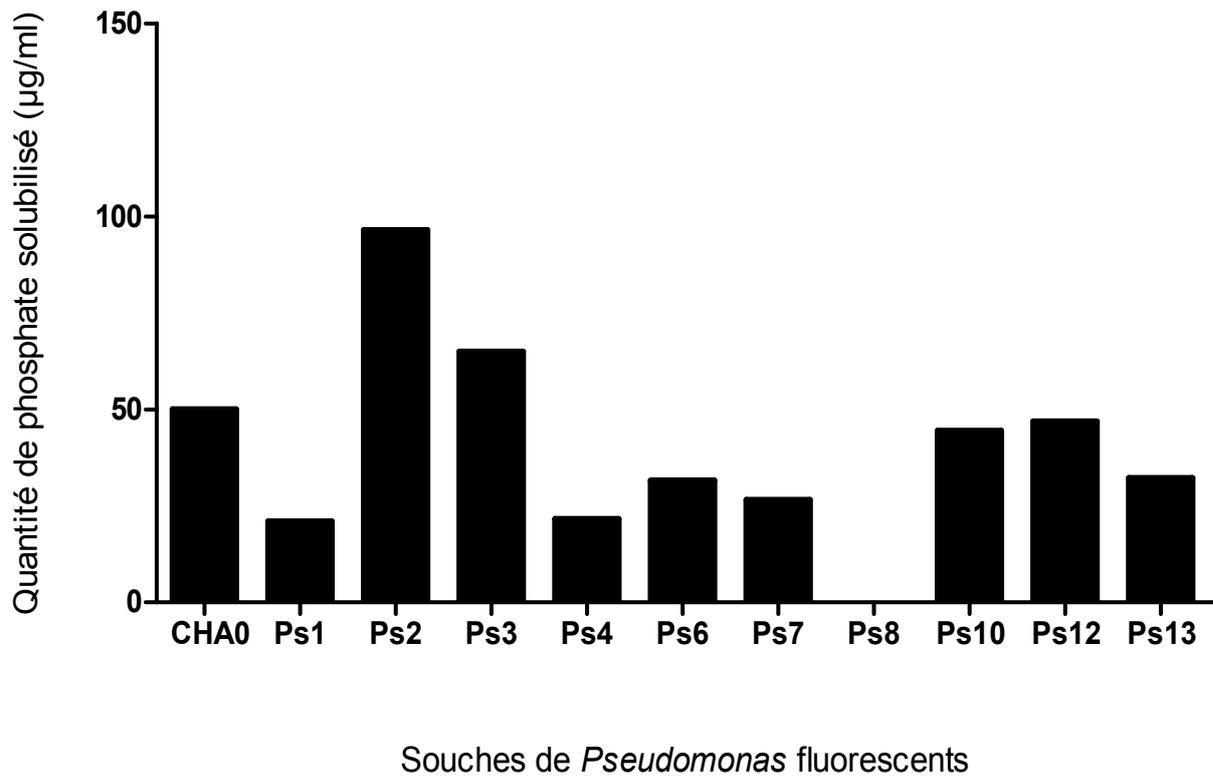


Fig. 10 : Quantité de phosphate solubilisée par les souches de *Pseudomonas* fluorescents sur milieu liquide.

4-2- Production de HCN

Sept souches de *Pseudomonas* sont HCN⁺. La production est faible chez Ps2, Ps8, Ps7, Ps10, Ps12, tandis qu'elle est forte chez Ps13 et CHA0. Ces dernières semblent les plus performantes en production de HCN, en virant la couleur du papier filtre vers l'orangée foncée (Fig. 11). Le reste des souches ne semblent pas posséder l'activité cyanogène.

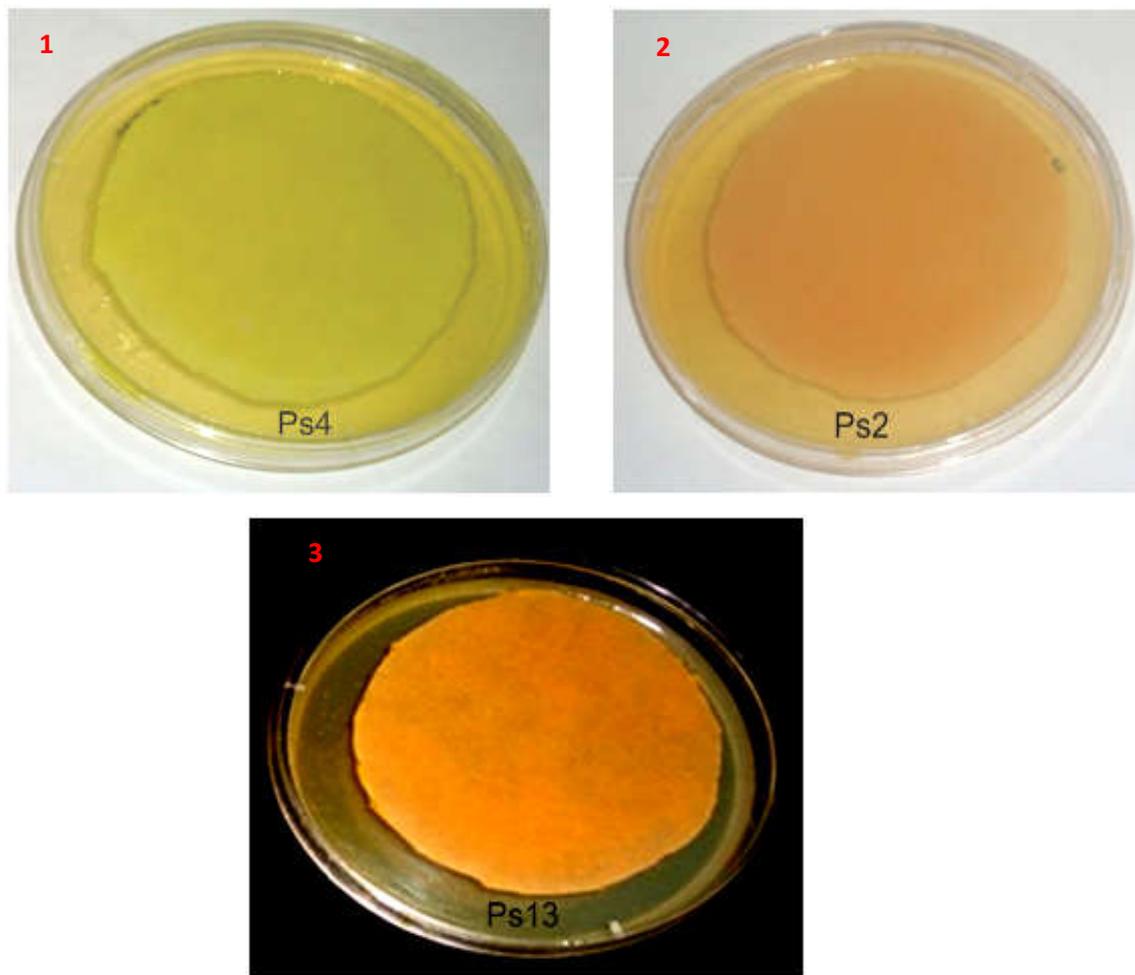


Fig. 11 : Détection deHCN

- (1) Couleur jaune : aucune production ; (2) Couleur orangée claire : production faible ;
(3) Couleur orangée foncée : forte production

4-3- Activité antifongique

Au terme de 10 jours d'incubation à 28°C toutes les souches manifestent une action inhibitrice vis-à-vis de *Fusarium oxysporium* et d'*Alternaria alternata* (Fig. 12).

Le diamètre des colonies mycéliennes de *F. oxysporium* a été réduit fortement en présence des souches antagonistes de *Pseudomonas* fluorescents, comparé au témoin non inoculé (Fig. 13 ; Tab. 5). Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne observé chez les souches Ps3 et Ps8 est de l'ordre de 36%. Le taux d'inhibition des souches Ps6 et Ps2 avec 30% et Ps4 avec 29% est relativement faible que ceux des Ps1, Ps7, Ps10, Ps12 et Ps13 (32%). *P. fluorescens* CHA0 représente la plus faible action antagoniste 25% (Fig. 12).

En revanche, les souches de *Pseudomonas* ont révélé une activité inhibitrice moindre envers *A. alternata* comparée à celle observée envers *F. oxysporium* (Fig. 12 ; 14 ; Tab. 5). L'action antagoniste la plus forte est estimée à 27% pour *P. fluorescens* CHA0, 20% pour Ps10 et 18% pour Ps1 et Ps8. Les souches Ps3 et Ps4 (15%) manifestent un effet inhibiteur inférieur à celui de Ps7 et Ps6 (16%). Par contre, la souche Ps12 montre la plus faible action inhibitrice de la croissance mycélienne de *A. alternata* (9%) suivi par Ps2 et Ps13 avec 6%.

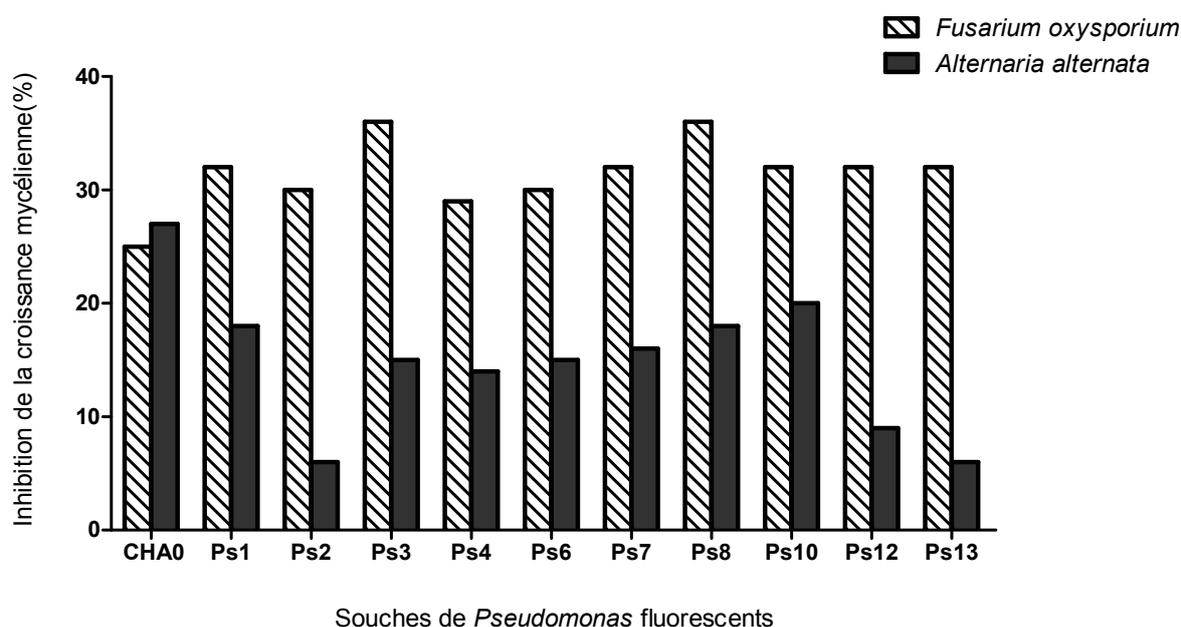


Fig. 12 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des colonies de *F. oxysporium* et de *A. alternata* en présence des souches de *Pseudomonas* fluorescents.

Tab. 5 : Diamètre des colonies de *F. oxysporium* et de *A. alternata* en présence des souches de *Pseudomonas* fluorescents.

Souches	Diamètre de croissance (mm)	
	<i>F. oxysporium</i>	<i>A. alternata</i>
Ps1	54,5	52,5
Ps2	56	60
Ps3	51	54,5
Ps4	56,5	55
Ps6	56	54.5
Ps7	54,5	53,5
Ps8	51	52,5
Ps10	54,5	51,5
Ps12	54,5	58,5
Ps13	54,5	60
CHA0	60	47
Témoin	80	64

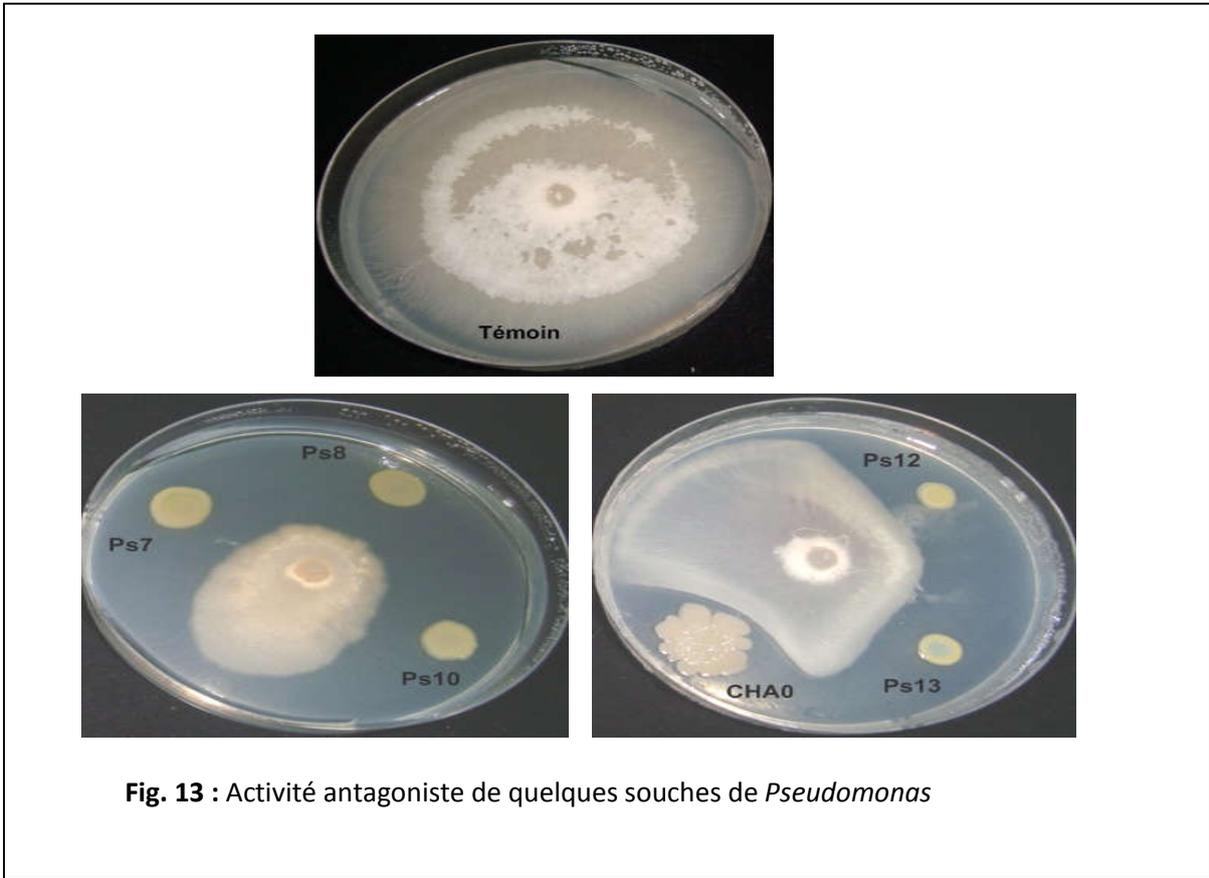


Fig. 13 : Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas*

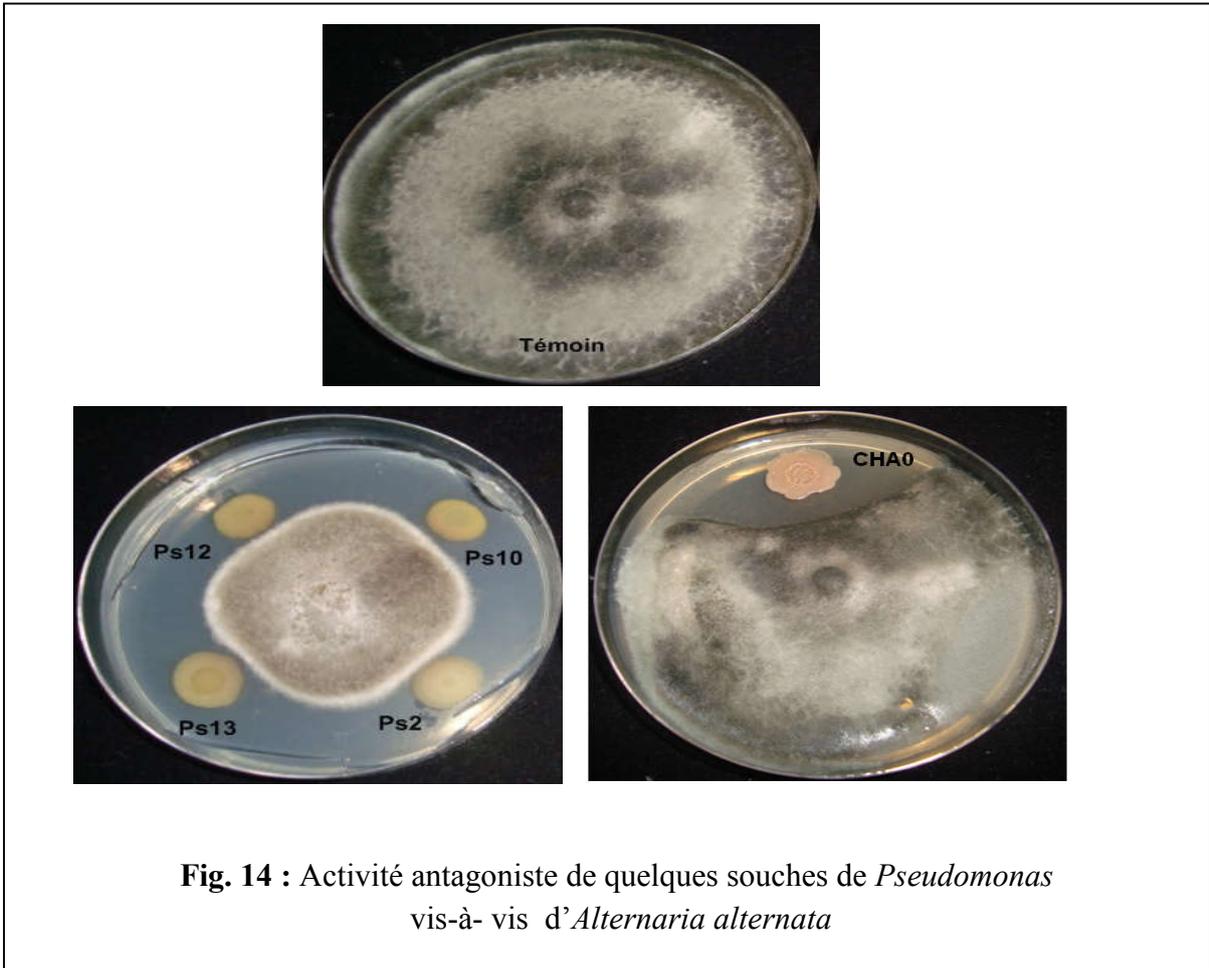


Fig. 14 : Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas* vis-à-vis d'*Alternaria alternata*

III-Etude de l'halotolérance de souches de *Pseudomonas* fluorescents

1- Effet du milieu sur l'halotolérance

Après 48h d'incubation à 28°C, l'appréciation visuelle du trouble permet de distinguer 3 groupes de souches bactériennes en milieu riche (LB) et seulement 2 groupe dans le milieu minimum (GMM) (Fig. 15).

- En milieu LB, la croissance de la souche Ps2 et Ps3 est fortement inhibée à 0,5M/NaCl. Les souches Ps1, Ps4 et Ps6, par contre, tolèrent jusqu'à 0,8M/NaCl. La concentration inhibitrice de la croissance de Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13 et la souche de référence CHA0 atteint 1M/NaCl. A 1,3M aucune croissance bactérienne n'est constatée.
- En milieu GMM, la tolérance des souches Ps1, Ps2 Ps3 Ps4, Ps6 ne dépasse guère 0,5M. Cependant, Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13 et CHA0 conservent une bonne capacité de croissance jusqu'à 0,8M/NaCl. Aucune croissance n'est observée au-delà de cette concentration.

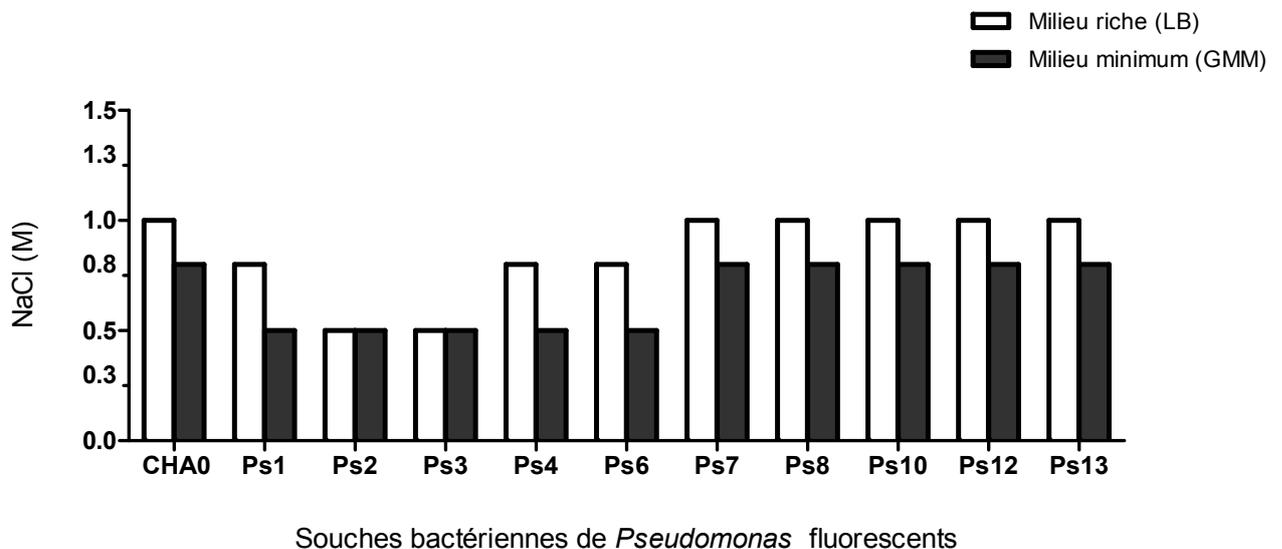


Fig. 15 : Appréciation de l'halotolérance des souches de *Pseudomonas* fluorescents en présence de NaCl dans un milieu riche (LB) et minimum (GMM).

A travers cette première appréciation d'halotolérance, les souches de *P. aeruginosa* (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13) présentent donc les meilleures dispositions de résistance à la salinité (800 mM dans un milieu minéral) et ont servi alors aux expérimentations ultérieures.

2- Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la croissance des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Après 4 jours d'incubation à 28°C sur milieu GMM, la croissance des souches de *P. aeruginosa* est significativement affectée par l'apport de NaCl, de la GB (1mM) et de l'extrait hydro-alcoolique de *A. halimus* (1/100^{ème}) (Annexe 10 a).

Les souches étudiées ont une bonne capacité de tolérance au sel. Leur croissance est observée jusqu'à 0,8M avec un optimum situé entre 0,3M (Ps7, Ps10) et 0,5M (Ps8, Ps12 et Ps13). Aux deux concentrations extrêmes (0 et 1M), la croissance est lente et les valeurs de D.O_{600nm} chutent significativement (Annexe 11). La souche Ps10 cultive aussi bien en absence qu'en présence de sel.

L'effet de l'apport de la GB et de l'extrait de *A. halimus* est hétérogène :

- **En absence de sel :**

- La GB n'apporte aucune amélioration chez les souches Ps8, Ps12 et Ps13. Chez Ps10 (3x) et Ps7 (x 3,5) la croissance est fortement stimulée.
- L'extrait de *A. halimus* inhibe nettement la croissance de Ps8 (réduction de 35%) et Ps10 (réduction de 60%). Il n'a aucun effet sur la croissance de la souche Ps13. Chez Ps7 et Ps12 il présente une augmentation remarquable de la croissance, environ 3,5 facteurs.

- **En présence de 0,3M/NaCl :**

- La croissance des souches Ps8 et Ps13 est améliorée avec 2,65 et 3 facteurs respectivement suite à l'apport de la GB, mais elle reste inchangée chez Ps10 et Ps12 (Annexe 11). Une réduction remarquable de la croissance est notée chez Ps7 (53,71%).
- L'extrait de *A. halimus* présente un meilleur pouvoir osmoprotecteur que celui de la GB chez Ps7 (x2,8), Ps8 (x3,58), Ps12 (x3,36) et Ps13 (x5,36) (Annexe 11 ; Tab. 6). La croissance de la souche Ps10 est réduite de 40%.

- **En présence de 0,5M/NaCl :**

- L'apport de la GB améliore modérément la croissance chez Ps7 (x1,8), Ps12 (x2,3) et Ps13 (x2,1), mais elle agit faiblement sur la croissance des souches Ps8 (x1) et Ps10 (x1,2) (Tab. 6).
- L'extrait de *A. halimus* inhibe la croissance de Ps7 (réduction de 39,69%) de Ps12 (réduction de 31,88%) et de Ps13 (réduction de 39,88%). Chez Ps8 et Ps10 la croissance est faiblement améliorée (x1,1) (Annexe 11).

- **En présence de 0,8M/NaCl :**

- La GB atténue modérément l'effet inhibiteur du sel particulièrement chez Ps12 (x2,5) et Ps13 (x2,7) (Annexe 11). Le facteur d'augmentation de la croissance étend de 1,37 à 1,8 chez le reste des souches.
- L'extrait de *A. halimus* a révélé l'effet inverse de la GB, en inhibant la croissance. Ce phénomène est observé chez toutes les souches à l'exception de Ps10 dont la croissance est légèrement améliorée (x1,7). La plus forte action inhibitrice est constatée chez Ps8 (80,8%) suivi par Ps13 (59%) Ps12 (50%) et Ps7 (45%) (Annexe 11).

- **En présence de 1M/NaCl :**

- Le pouvoir osmoprotecteur de la GB est manifeste chez toutes les souches (Annexe 11 ; Tab. 6). La croissance est restaurée fortement chez Ps13 (x6,5) et Ps8 (x4), discrètement chez Ps10 (x3,48), Ps12 (x3) et faiblement chez Ps7 (x2,4).
- En présence de l'extrait de *A. halimus* toutes les souches révèlent une restauration remarquable de leur croissance (Tab. 6). Chez Ps8, Ps10 et Ps13 la croissance est restaurée d'un facteur de 5 de 3,77 et de 3,5 respectivement. La plus forte action osmoprotectrice est constatée chez la souche Ps12 (x23), alors que la faible action est enregistrée chez Ps7 (x2).

* *Pseudomonas fluorescens* CHA0

La souche de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 cultive dans une large gamme de salinité de 0 à 0,3M ; au-delà de cette dernière concentration la croissance est ralentie progressivement.

En absence de sel, la GB et l'extrait de *A. halimus* améliorent discrètement la croissance (x1,2). A 0,3 et 0,5M, une action osmoprotectrice est bien marquée néanmoins, celle de l'extrait de *A. halimus* est légèrement meilleure (x1,3 et 1,5 respectivement) que celle de la GB (x1,2 et x1,4 respectivement). A 0,8M, la croissance est 3,6 et 5,59 fois mieux en présence de la GB et l'extrait végétal (Annexe 11). L'effet osmoprotecteur des molécules apportées est plus prononcé à 1M. La croissance est augmentée d'un facteur de 13 et 14 suite à l'application de la GB et de l'extrait de *A. halimus* respectivement.

D'une façon générale, une certaine teneur en NaCl (0,3M- 0,5M) est nécessaire pour la croissance des souches. Cependant, Ps10 manifeste une bonne croissance en absence de stress osmotique. D'un autre côté, la GB joue un rôle osmoprotecteur important dans une large gamme de salinité, de 0,3 à 1M. Les valeurs maxima de D.O_{600nm} sont notées à une teneur de salinité égale à 0,5M (Annexe 11). En revanche, une activité inhibitrice de l'extrait de *A. halimus* existe et particulièrement pour une concentration saline comprise entre 0,5 et 0,8M. Les meilleures valeurs de D.O_{600nm} sont enregistrées à 0,3M NaCl (Annexe 11).

Une affinité élevée à la GB existe chez Ps10, Ps13, mais elle est discrète chez Ps12 et Ps8. La souche Ps12 répond mieux à l'apport de l'extrait de *A. halimus* comparée à Ps8 et Ps13. Ce dernier présente un effet osmoprotecteur faible chez Ps10. La souche Ps7 répond de la même manière à la GB et à l'extrait de *A. halimus*.

En somme, le pouvoir osmoprotecteur de la GB est mieux marqué que celui de *A. halimus*.

Les cinq souches halotolérantes de *P. aeruginosa* cultivées en milieu GMM salé présentent sensiblement les mêmes caractéristiques de croissance et d'adaptation à la salinité. Néanmoins, une croissance légèrement plus importante est notée pour la souche de référence, *P. fluorescens* CHA0.

Tab. 6 : Effet du sel, de la GB (1mM) et/ou d'extrait de *A. halimus* (1/100^{ème}) sur la croissance des souches de *Pseudomonas*

NaCl	0M			0,3M			0,5M			0,8M			1M		
Traitements Souches	Sans Osmo	Plus GB	Plus A. h	Sans Osmo	Plus GB	Plus A. h	Sans Osmo	Plus GB	Plus A. h	Sans Osmo	Plus GB	Plus A. h	Sans Osmo	Plus GB	Plus A. h
Ps7	+	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+	+	++	-	-	++	+++
Ps8	++	++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	-	-	+++	+++
Ps10	++	+++	+	++	++	+	++	+++	++	+	++	+++	-	++	+++
Ps12	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	-	-	++	+++
Ps13	+	+	+	+	++	+++	++	+++	++	+	++	+	-	++	+
CHA0	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	-	++	+++

Osmo : osmoprotecteurs

A. h : *Atriplex halimus*

(-) très faible croissance

(+) croissance discrète

(++) bonne croissance

(+++) très bonne croissance

IV- Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur quelques activités physiologiques de *Pseudomonas fluorescents*

1-Sur la production de l'acide indole-3- acétique (AIA)

La production de l'AIA par les sept souches de *Pseudomonas fluorescents* étudiés a été mesurée après 48h d'incubation à 28°C (Tab. 7).

- **En absence de sel :** à l'exception de Ps10, toutes les souches sélectionnées produisent l'AIA. La quantité produite par Ps2 (12,53±0,14µg/ml), Ps3 (16,72±0,14 µg/ml), Ps13 (15,72±0,28 µg/ml) est plus élevée. Les souches Ps7 (1,60 ±0,35 µg/ml), Ps8 (3,30±0,49 µg/ml) et Ps12 (3,9±0,91 µg/ml) ont une production faible.
- L'ajout de GB augmente significativement la production chez toutes les souches sauf chez Ps8. Cette dernière manifeste une réduction de 68% par rapport au témoin. Une forte production de l'AIA est enregistrée chez Ps3 (47,16±0,14 µg/ml), Ps2 (30,39±0,56 µg/ml) et Ps13 (21,71± 0 µg/ml). Le taux de production est modéré chez Ps7 (8,59±0,91 µg/ml) et Ps12 (10,63±0,14 µg/ml). La souche Ps10 a récupéré sa capacité de production suite à l'apport de cette molécule osmoprotectrice.
- L'ajout de l'extrait de *A. halimus* ne modifie pas le taux de production chez la souche Ps3 mais il l'améliore chez Ps2 (x1,3) et Ps12 (x2,1). Une réduction de 16% et de 48% de la quantité de l'AIA produite est enregistrée chez Ps8 et Ps13, respectivement. Une inhibition totale est observée chez Ps7.
- **En présence de 0,5M/NaCl :** le taux de production n'a pas été modifié comparé aux témoins sans sel, il étend de 0 à 16,17µg/ml.
- La quantité d'AIA produite par les souches Ps2 et Ps12 est 2 fois supérieure en présence de la GB. Aucune augmentation significative n'apparaît chez Ps3 et Ps13. Cependant une inhibition totale de la production est observée chez Ps7 et Ps8.
- L'addition de l'extrait de *A. halimus* inhibe la production chez toutes les souches à l'exception de Ps2 où il reste sans effet.

- **En présence de 0,8M/NaCl** : une inhibition totale de la production est enregistrée chez toutes les souches. Aucune restauration de la production n'est constatée quel que soit l'osmoprotecteur apporté.

Concernant la souche de référence, *P. fluorescens* CHA0, une quantité importante de l'AIA ($36,43 \pm 0,21$ et $43,31 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$) est obtenue à 0 et à 0,5M/NaCl respectivement. Une inhibition totale est remarquée lorsque la salinité passe à 0,8M (Tab. 7).

- L'ajout de GB entraîne une augmentation notable de la quantité produite en absence de sel ($46,31 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$) qu'en présence de 0,5 M/NaCl ($57,23 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$).
- L'apport de l'extrait de *A. halimus* montre une augmentation légère dans un milieu dépourvu de sel, mais il reste sans effet à une concentration de 0,5 M/NaCl.

L'effet osmoprotecteur de la GB et de l'extrait de *A. halimus* se manifeste clairement à 0,8M/ NaCl. En effet, en présence de la GB, l'activité est fortement restaurée et la quantité de l'AIA produite atteint $45,76 \mu\text{g/ml}$. Un effet positif de l'extrait de *A. halimus* est également observé ($14,43 \mu\text{g/ml}$).

D'une façon générale, les souches de *Pseudomonas* fluorescents se comportent de manière identique lorsqu'elles sont dans un milieu sans sel ou avec 0,5 M/NaCl. Parmi les sept souches étudiées, Ps2, Ps13, Ps3 semblent plus performantes en terme d'efficacité de production de l'AIA. Leur réponse à la GB mieux que celle à l'extrait de *A. halimus*, particulièrement en absence de stress osmotique.

Tab. 7 : Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la production de l'AIA. Les valeurs sont la moyenne \pm SD (n = 2)

NaCl	AIA ($\mu\text{g/ml}$)		
	Sans osmoprotecteur	Plus GB	Plus extrait de <i>A. halimus</i>
Souches			
0M			
Ps2	12,53 \pm 0,14	30,39 \pm 0,56	16,37 \pm 0,49
Ps3	16,72 \pm 0,14	47,16 \pm 0,14	16,37 \pm 0,49
Ps7	1,60 \pm 0,35	8,59 \pm 0,91	0 \pm 0
Ps8	3,30 \pm 0,49	2,25 \pm 0,28	0,56 \pm 0,14
Ps10	0 \pm 0	3,35 \pm 0	0 \pm 0
Ps12	3,9 \pm 0,91	10,63 \pm 0,14	8,29 \pm 0,35
Ps13	15,72 \pm 0,28	21,71 \pm 0	7,64 \pm 0,14
CHA0	36,43 \pm 0,21	46,31 \pm 0,21	42,76 \pm 0,41
0,5M			
Ps2	12,33 \pm 0,14	18,96 \pm 1,05	14,13 \pm 0,28
Ps3	16,17 \pm 2,75	16,07 \pm 0,49	0 \pm 0
Ps7	1 \pm 0,34	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps8	3,85 \pm	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps10	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps12	1,9 \pm 0,9	3,95 \pm 0,28	0 \pm 0
Ps13	15,12 \pm 0,7	15,87 \pm 0,21	0 \pm 0
CHA0	43,31 \pm 0,62	57,23 \pm 1,97	37,92 \pm 0,62
0,8M			
Ps2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps3	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps7	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps8	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps10	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps12	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Ps13	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
CHA0	0 \pm 0	45,76 \pm 1,97	14,43 \pm 0,14

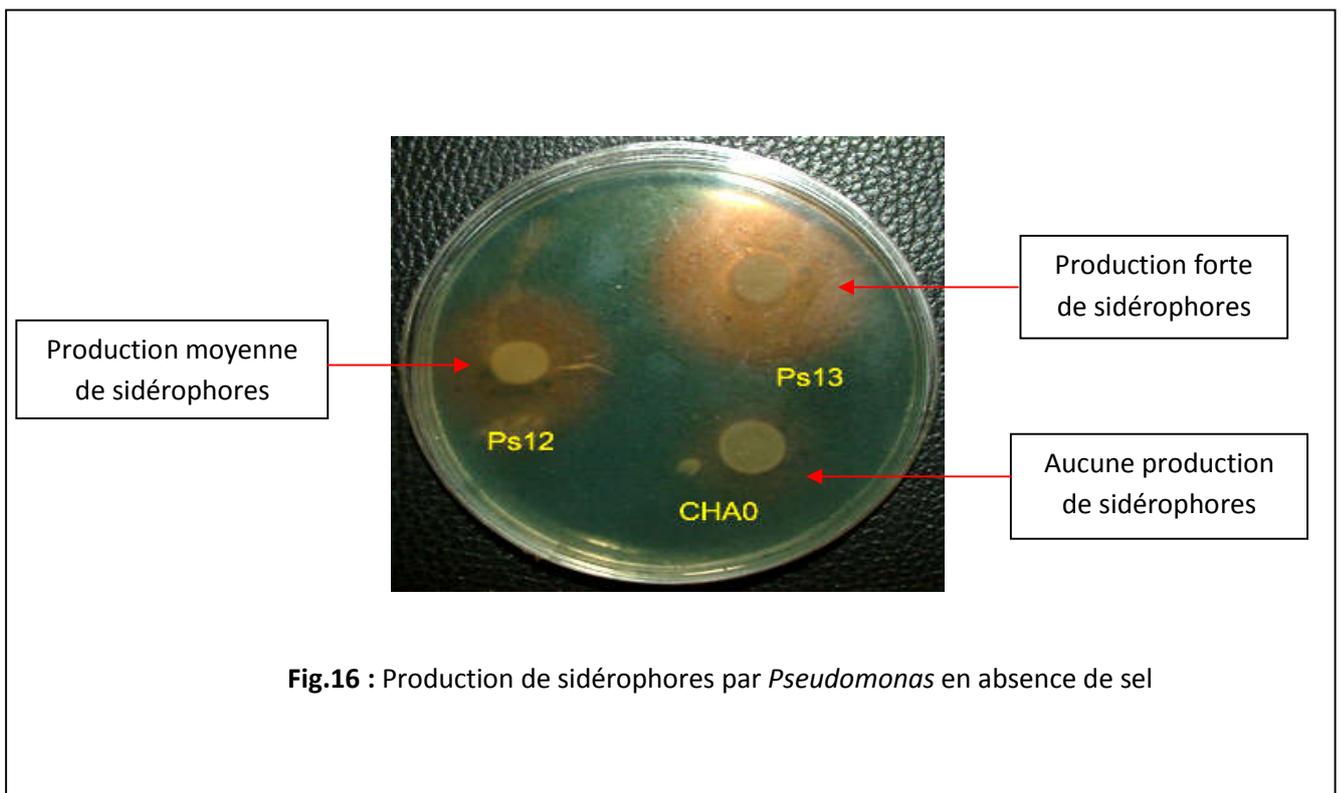
2- Sur la production de sidérophores

La production de sidérophores par les souches de *Pseudomonas* étudiés a été déterminée après 24h d'incubation à 28°C (Fig.16)

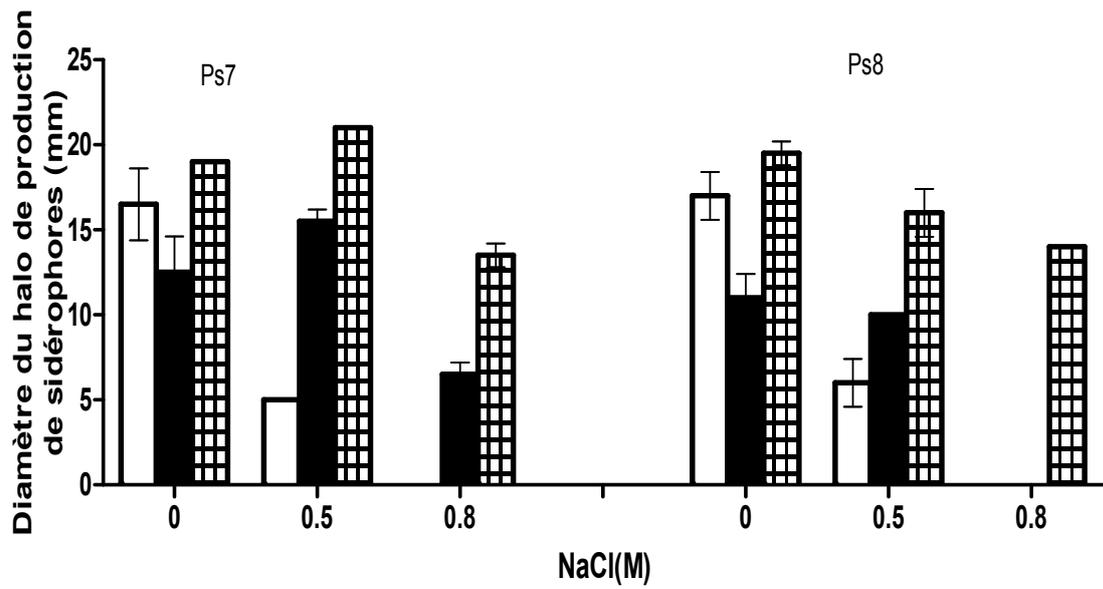
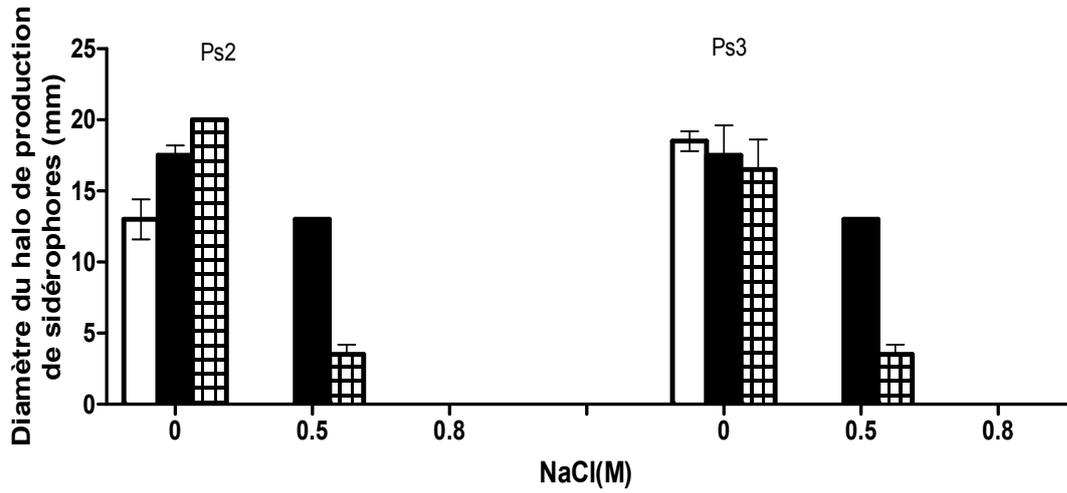
- **En absence de sel :** les souches Ps3 (18 mm), Ps8 (17 mm) Ps10 (17,5 mm) manifestent relativement une production supérieure à celle présentée par Ps2 (16 mm) Ps13 (15 mm). La plus faible production est notée chez Ps12 (12 mm) alors que *Pseudomonas fluorescens* CHA0 a une production nulle (Fig.16).
- La réponse des souches à l'apport de GB semble très hétérogène. Une production forte est constatée chez Ps3 Ps2 et Ps12 (17,5 mm). Cependant elle est faible chez Ps7 (12 mm), Ps8 (11 mm) et Ps10 (14 mm). Aucune stimulation n'est enregistrée chez Ps13. Dans les mêmes conditions la production de sidérophores est restaurée chez CHA0 (8,5 mm).
- L'apport de l'extrait d'halophyte stimule légèrement cette activité chez toutes les souches (Fig.17).
- **En présence de 0,5M/NaCl :** une forte réduction de production est observée chez la souche Ps7 (7mm), Ps8 (8mm) et Ps10 (1mm) comparée aux témoins sans sel. Une inhibition totale de l'activité a été constatée chez le reste des souches.
- L'addition de GB restaure efficacement la production de sidérophores et le plus grand diamètre est atteint par la souche Ps7 (15,5mm) et Ps10 (15mm). La souche Ps2 et Ps3, avec 13mm de diamètre, semblent modérément productrices. La moindre activité est révélée à la souche Ps13 (4 mm).
- L'efficacité de l'extrait d'*A. halimus* est appréciée nettement chez la souche Ps7 (21mm) et Ps13 (21,5mm). Chez Ps10, il manifeste un effet similaire à celui de la GB (15mm). Cet extrait apparut plus efficace que la GB chez toutes les souches à l'exception de Ps2 et Ps3.

- **En présence de 0,8M/NaCl** : une inhibition totale de l'activité est constatée. L'effet de la GB se manifeste seulement chez la souche Ps7 (6,5mm).
- L'extrait de *A. halimus* exprime une forte restauration de la production de sidérophores. En effet, le plus grand diamètre du halo peut atteindre 17,5mm. Ce dernier est enregistré chez la souche Ps10. Par ailleurs, le plus petit diamètre (7mm) est révélé à la souche de référence CHA0. Les souches Ps7, Ps8, Ps12, Ps13 présentent respectivement 13,5- 14- 12 et 12,5mm de diamètre. L'extrait végétal reste sans effet chez la souche Ps2 et Ps3.

D'une façon générale, les souches Ps7, Ps10 sont performantes en terme de production de sidérophores. D'autre part, la quasi-totalité des souches testées répondent favorablement à l'apport de l'extrait de *A. halimus*, particulièrement Ps10.



-  Milieu sans osmoprotecteur
-  Milieu+GB(1mM)
-  Milieu+extrait hydro-alcoolique de *A. halimus* (1/100^{ème})



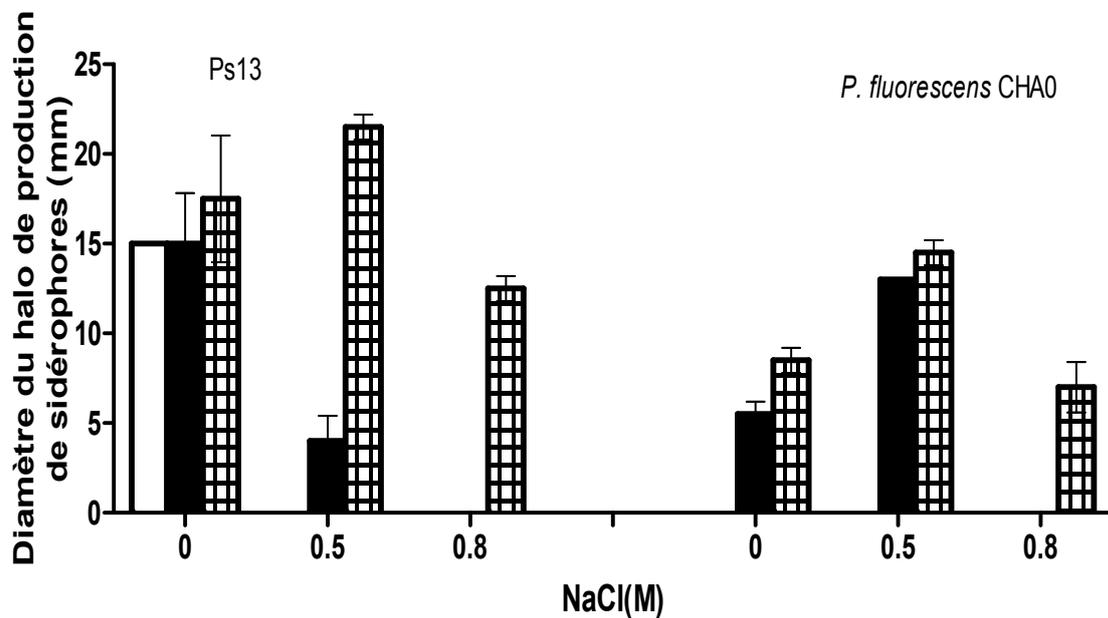
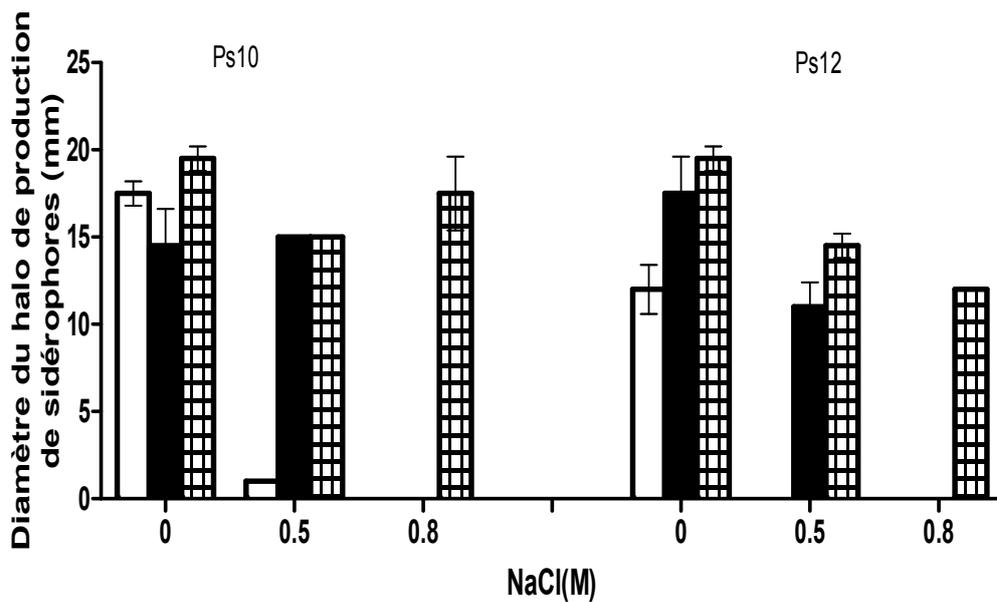


Fig. 17 : Effet du sel, de la GB et de l'extrait de *A. halimus* sur la production de sidérophores par les souches de *Pseudomonas* fluorescents. Les valeurs sont la moyenne \pm SD (n = 2).

Discussion

I- Caractéristiques physico-chimique du sol

A la base des normes de salinité, le sol étudié est considéré comme salin. Sa conductivité électrique (8dS/m) est supérieure à 4dS/m, elle correspond à 96 mM (5,64g/l de NaCl). La concentration en Na^+ et en Cl^- dans ce sol atteint plusieurs milliéquivalents/l (un équivalent correspondant à une mole multipliée par la valence). Elle est nettement supérieure à celle des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2+}). L'abondance des ions Na^+ et Cl^- dans ce sol pourrait revenir à la qualité médiocre de l'eau d'irrigation appliquée. En effet, la concentration en sel des eaux utilisées dans les zones arides et semi-arides est souvent importante du fait d'une faible pluviométrie conjuguée à une forte évaporation.

La présence des quantités élevée de sels dans la solution du sol abaisse le potentiel hydrique et réduit fortement la disponibilité de l'eau, ceci signifie le faible taux d'humidité du sol étudié (4,67). Le pH de ce dernier est basique (8,2), il est compatible avec celui des milieux naturels salés (Loyer, 1991).

II- Caractéristiques des souches de *Pseudomonas* fluorescents

Le sol rhizosphérique est un habitat particulièrement favorable à la croissance comparé au sol sans racines. La survie des souches de *Pseudomonas* peut varier en fonction de la proximité des racines (de Weert *et al.*, 2002). Selon Miller *et al.* (1990) le groupe de *Pseudomonas* fluorescents isolées à partir du rhizoplan de l'orge et du blé peut représenter respectivement 58,9% et 23% de la population bactérienne totale dans la rhizosphère.

Le milieu S_1 utilisé pour leur isolement est très sélectif. La présence de Sodium lauryl Sarcosique (SLS) permet seulement la croissance des bactéries à Gram négatif. En outre, l'amendement du milieu en triméthoprime empêche la croissance des espèces non fluorescentes de *Pseudomonas*. Du fait de sa composition spéciale, ce milieu permet la récupération de 82,5% des phénotypes fluorescents à partir du sol (Gould *et al.*, 1985).

Les tests clefs d'identification ont permis la détection d'une souche de *P. fluorescens* (Ps6), et deux autres de *P. putida* (Ps1 et Ps3) tandis que les restes appartiennent à l'espèce de *P. aeruginosa*. Au fait, les plantes exercent naturellement une pression sélective qui tend généralement à réduire la diversité microbienne. La qualité et la quantité des éléments nutritifs déversés dans la rhizosphère peuvent favoriser la croissance et la multiplication des espèces ou des souches particulières (Bertrand *et al.*, 2000). Aussi, la colonisation du rhizoplan est soumise à des contraintes supplémentaires liées à la capacité des bactéries à adhérer aux surfaces racinaires.

De plus, les habitats salés sont caractérisés par une faible diversité microbienne. Ils sont souvent influencés par de nombreux facteurs interagissant susceptibles de réduire la croissance et la capacité de survie des organismes. La diversité des microorganismes vivants dans ces biotopes dépend de la salinité, de la solubilité de l'oxygène, de la température, du pH, du potentiel hydrique et la disponibilité des éléments nutritifs. Les souches doivent donc posséder les caractéristiques requises pour s'adapter aux diverses contraintes de l'environnement (Cacciari *et al.*, 2003). Aux facteurs abiotiques, il faut encore ajouter les facteurs biotiques négatifs comme la compétition et la prédation, etc. Dans de tels habitats, la capacité de survie d'une souche bactérienne revient de sa capacité à croître à un taux suffisant pour compenser la mort causée par les facteurs précédemment recensés.

Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents sont dominantes dans les régions à faible concentration de sel. Néanmoins, *P. aeruginosa*, *fluorescens* et *stutzeri* peuvent être rencontrées dans les régions salées à côté des espèces non fluorescentes (*P. alcaligenes* et *P. pseudoalcaligenes*) (Rangarajan *et al.*, 2001).

1- Solubilisation du phosphate

Les sols salins, formés dans des conditions d'aridité élevée et de hautes températures, sont souvent alcalins et peuvent présenter une disponibilité réduite en phosphore, fer, zinc et manganèse (Cacciari *et al.*, 2003).

Lors de la solubilisation du phosphate en milieu liquide, les bactéries à Gram négatif acidifient l'espace périplasmique par une oxydation directe du glucose. Ceci conduit à la libération de différents acides organiques tels les acides lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique. L'acide gluconique est fréquent chez les espèces de *P. aeruginosa*, *cepacia* et *fluorescens*. Malgré qu'aucune solubilisation n'ait été observée chez la souche Ps2 sur milieu solide, celle-ci solubilise efficacement le phosphate en milieu liquide (96,42µg/ml). Au fait les acides organiques sécrétés, afin de solubiliser le phosphate, circulent difficilement en milieu solide. Alors que ce n'est pas le cas en milieu liquide (Nautiyal, 1999). L'absence de phosphate soluble chez la souche Ps8 ou sa faible quantité obtenue chez les souches Ps1 (21µg/ml), Ps4 (21,60µg/ml), Ps7 (26,61µg/ml) en milieu liquide seraient s'expliquées par leur déficience enzymatique. En effet, la disponibilité de formes solubles du phosphate dans le milieu entraîne leur association avec les acides organiques libérés, en formant des composés organo-phosphatés. Ces derniers seraient difficiles à dégrader par les souches bactériennes de *Pseudomonas* (Chaiharm et Lymyong, 2009).

2- Production de HCN

Une différence existe entre les souches en terme d'efficacité de production de HCN, celle-ci revient à la variabilité d'expression des gènes (*hcnB* et *hcnC*) présentés chez les *Pseudomonas* producteurs. Cette variabilité permettant de les classer en deux groupes : faibles (Ps2, Ps7, Ps8, Ps10, Ps12,) et forts producteurs (Ps13, CHA0) (Ramette *et al.*, 2003). L'absence de production chez certaines souches (Ps1, Ps3, Ps4, Ps6) serait due à la perte des gènes responsable de la biosynthèse. La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression de différents d'agents pathogènes. Il agit directement sur les cellules en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire. Il contribue également à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci (Blumer et Haas, 2000).

3- Activité antifongique

La forte activité antifongique exercée par les souches de *Pseudomonas* fluorescents à l'encontre de *Fusarium oxysporium* (taux d'inhibition étend de 29 à 36%) pourrait associer à l'implication de sidérophores. La diffusion de ses molécules a accentué le déficit en fer au voisinage de la colonie bactérienne, en conduisant à l'inhibition de la croissance mycélienne à sa proximité. Les mêmes constatations sont signalées par Albouvette *et al.* (1998) ; la suppression de la croissance radiale de *F. oxysporium* est induite par une compétition du fer par les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Comparée à l'activité inhibitrice manifestée envers *F. oxysporium*, les souches de *Pseudomonas* exercent un effet antagoniste moindre vis-à-vis de *A. alternata* (taux d'inhibition étend de 6 à 27%). Ce phénotype observé serait causé par des composés autres que les sidérophores. Les substances antibiotiques comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'acide phénazine carboxilique (PCA), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyoluteorine (PLT) sont probablement reliées à cette inhibition. La variabilité dans l'inhibition observée entre les souches, Ps10 (18%), Ps12 (9%), Ps2 (6%) s'expliquerait par la quantité d'antibiotique produite.

Vu de la faculté de souches de *Pseudomonas* à solubiliser le phosphate inorganique (Ps2), à produire l'HCN (Ps13) et à présenter une performance antagoniste, il serait envisageable de les utiliser en tant que biofertilisants afin d'améliorer l'alimentation minérale des végétaux en phosphore, et d'augmenter leur résistance aux attaques des phytopathogènes (*F. oxysporium* et *A. alternata*).

III- Halotolérance bactérienne

1- Influence du milieu sur la croissance

La capacité d'halotolérance des souches de *Pseudomonas* cultivées en milieu riche (LB) n'est pas uniforme. Selon leur teneur en NaCl maximale tolérée, trois catégories de souches se dégagent. La première comprend les souches sensibles au sel dont le seuil maximal d'halotolérance ne dépasse guère 0,5M/NaCl. La seconde rassemble les souches modérément halotolérantes, en tolérant jusqu'à 0,8M/NaCl. La dernière, enfin, est composée de souches halotolérantes qui se développent à 1M/NaCl. Elles sont particulièrement résistantes au choc hyper-osmotique en milieu riche. La présence de molécules potentiellement osmoprotectrices dont probablement la GB dans l'extrait de levure et les peptones pourrait contrecarrer l'impact du stress salin sur leurs capacités de croissance (Madkour *et al.*, 1990). Il existerait ainsi un effet synergique entre les différents osmoprotecteurs du milieu LB qui explique le rendement élevé de la croissance à forte osmolarité (Ghoul, 1990).

La capacité d'halotolérance des souches cultivées en milieu minéral minimum (GMM) y est réduite par rapport à celle observée en milieu LB. Une concentration saline de 0,5M s'avère inhibitrice pour la moitié des souches (Ps1, Ps2, Ps3, Ps4, Ps6). En effet, le milieu minéral pauvre accentue le stress salin.

L'intensité de la résistance au sel serait liée à la possibilité de synthèse de la cellule. La tolérance vis-à-vis du sel est donc un caractère propre à chaque souche, elle est souche dépendante ; chacune possède un contenu protéique donné et présente, par conséquent, un niveau de résistance au stress létal différent. L'halotolérance intrinsèque ne permet cependant qu'une adaptation limitée au stress osmotique.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13) sont particulièrement résistantes au sel quelle que soit la richesse du milieu de culture. Elles peuvent tolérer jusqu'à 0,8M/NaCl en milieu GMM. Cette concentration est cohérente avec celle estimée en milieu LB (1M/ NaCl). Ceci reflète leur capacité intrinsèque de tolérance.

Enfin, les écosystèmes fluctuants (faible a_w , forte salinité) favorisent le développement de bactéries présentant une bonne tolérance au stress osmotique, ceci suppose l'existence d'une pression de sélection exercée par le milieu naturel. Ces constatations confirment donc le lien étroit entre l'halotolérance des souches et leur origine.

Les souches de *P. aeruginosa* (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13) ont une forte capacité d'adaptation au sel, pour cette raison elles ont été retenues pour étudier l'effet du NaCl et des osmoprotecteurs sur leur croissance.

L'utilisation des microplaques lors de la phase de lecture demeure dans certain cas délicate. En effet, l'appréciation visuelle du trouble dans un puits peut varier d'un observateur à un autre. Toutefois, ces cas restent rares et limités à quelques concentrations salines maximales tolérées par la bactérie. D'autre part, les faibles volumes de milieux (200µl) et l'absence d'agitation pourraient influencer l'apparition et la densité du trouble.

2- Effet du NaCl sur la croissance

La croissance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans un milieu GMM sous contrainte osmotique est significativement affectée ($P < 0,01$). Les valeurs finales de $D.O_{600nm}$ des souches diminuent lentement pour des concentrations en NaCl inférieures à 0,3 M puis rapidement au-delà de 0,5M. Une certaine teneur en ions Na^+ est par conséquent nécessaire pour une meilleure croissance bactérienne. Plusieurs travaux ont montré l'importance de cet ion dans : (Dimroth, 1987)

- les processus de transport Na^+ /soluté
- la conservation et la transduction d'énergie,
- les mécanismes de l'équilibre du pH,
- l'activation d'enzymes spéciales.

Dans la présente étude les souches de *P. aeruginosa* peuvent conserver une forte capacité de croissance en présence de sel. Ceci est exclusivement dû à l'accumulation, par synthèse endogène, d'une variété de solutés compatibles. Ils permettant de restaurer une pression de turgescence cellulaire compatible avec les fonctions cellulaires. En similitude avec d'autres bactéries, les souches de *Pseudomonas* accumulent des ions K^+ et du glutamate puis des petites molécules organiques si le choc augmente en intensité. Selon D'Souza-Ault *et al.* (1999) le dipeptide NAGGN et l'osmoprotecteur majeur chez *P. aeruginosa* alors que le taux de tréhalose est mineur. D'autres solutés compatibles tels le O- α -glucopyranosyl- α (1,2)-glycérol (glucosylglycérol) et l' α -glycérolglucoside ont été rapportés chez *P. mendonica* et *P. pseudoalcaligenes* (Pocard *et al.*, 1994). Les cellules de *P. fluorescens* soumises à un stress osmotique synthétisent le tréhalose, le NAGGN, et le glycosylglycérol comme osmolytes endogènes majeurs (Bonaterra *et al.*, 2007). Le mannitol est accumulé chez *P. putida* (Kets *et al.*, 1996).

La régulation de la réponse des espèces de *Pseudomonas* aux différents types de stress imposés par l'environnement est contrôlée par un facteur de transcription (facteur sigma, *AlgU*) qui, en se fixant à l'ARN polymérase, lui confère une spécificité de reconnaissance vis-à-vis de certains promoteurs. L'activation de ce facteur provoque une augmentation la transcription de la plupart des gènes exprimés en condition de forte osmolarité (Schnider-Keel *et al.*, 2001). Ils codent pour des protéines impliquées dans la biosynthèse des osmolytes tels le tréhalose et le NAGGN.

A une concentration équivalente à 0,8M/NaCl, la croissance des souches de *P. aeruginosa* ralentit significativement. La présence d'une telle concentration dans le milieu réduit les taux de croissance et allonge le temps de latence. De plus, elle pourrait provoquer un choc hyperosmotique modéré conduit à une plasmolyse transitoire, ceci entraîne des modifications de la physiologie des bactéries, particulièrement sur leur capacité à utiliser les nutriments du milieu. Toutefois, cette concentration en sel (0,8M) est connue comme étant complètement inhibitrice en milieu pauvre pour *P. mendocina* (Pocard *et al.*, 1994) *E. coli* et *S. thyphimerium* (Csonka, 1989). Selon D'Souza-Ault *et al.* (1999), *P. aeruginosa* est inhibé par 0,7M/NaCl.

La croissance des souches est fortement atténuée en présence de 1M. En fait, la brusque diminution de l'activité de l'eau du cytoplasme induit une plasmolyse sévère. Celle-ci inhibe les fonctions cellulaires telles l'absorption de nutriments, la réplication de l'ADN et la biosynthèse de macromolécules (Csonka, 1989). Or, la forte synthèse d'osmolytes endogènes ne permet pas aux souches testées une meilleure résistance au sel, une osmoprotection externe est nécessaire.

En général, les cinq souches halotolérantes de *P. aeruginosa* cultivées en milieu GMM salé dépourvu de sources d'osmoprotecteurs présentent sensiblement les mêmes caractéristiques de croissance et d'adaptation à la salinité. Cependant une croissance légèrement plus significative est notée pour la souche de référence, *P. fluorescens* CHA0. Ceci pourrait s'expliquer par la variabilité génétique entre eux et par l'origine de la souche.

La méthode basée sur la mesure du trouble est un procédé simple et rapide pour évaluer la masse microbienne, néanmoins elle ne permet pas de différencier entre les cellules mortes et les cellules vivantes.

3- Effet osmoprotecteur de GB

La restauration et l'amélioration de la croissance des souches de *P. aeruginosa* cultivées en milieu GMM/NaCl 0,8 ou 1M par la GB sont significatives ($P < 0,01$). L'effet bénéfique de l'apport de GB exogène (1mM) dans telles conditions serait lié à la capacité des cellules de l'accumuler dans leur cytoplasme. Sa nature dipolaire évite l'accumulation d'autres charges et maintient l'électroneutralité de la cellule (Le Rudulier, 1983). Cette substance hygroscopique joue un rôle dans l'attraction et la rétention des molécules d'eau dans la cellule. Elle participe ainsi dans le maintien de la pression de turgescence en augmentant le volume cellulaire. Elle stabilise aussi la structure et la fonction des protéines en améliorant l'état d'hydratation et de compaction. Un apport exogène de la GB avec une concentration de 20 μ M est efficace chez *P. aeruginosa* (D'Souza-Ault *et al.*, 1999).

La GB atténue mais ne peut surmonter complètement le stress osmotique imposé aux cultures bactériennes. Son pouvoir protecteur est mieux visible à une valeur de contrainte osmotique ne permettant aucune croissance en son absence. Par ailleurs, les valeurs maxima de D.O_{600nm} sont notées à une teneur de salinité égale à 0,5M, celle-ci est la concentration optimale de croissance pour la quasi-totalité des souches en dehors de toute osmoprotection externe. Ce phénomène pourrait s'interpréter par la forte activation de systèmes de transports qui est accompagnée par une croissance maximale.

Le rôle de la GB dans l'accroissement de l'osmolarité a été suggéré chez plusieurs bactéries entériques telle *E. coli*, et *Klebsiella pneumoniae* (Le Rudulier et Bouillard, 1983 ; Ghoul, 1990) chez *Sinorhizobium meliloti* (Bernard *et al.*, 1986) et chez *Bacillus* (Boch *et al.*, 1996).

Les bactéries possèdent souvent plusieurs systèmes de transport de solutés compatibles ayant parfois chacun plusieurs substrats potentiels, ceci permet l'accumulation d'un large spectre d'osmoprotectants à partir de l'environnement. Ces systèmes se répartissent en deux grandes familles structurales: les transporteurs ABC et les transporteurs actifs secondaires. En situation de contrainte osmotique, les espèces de *Pseudomonas* accumulent des osmoprotecteurs exogènes grâce au système de transport : **OpuC**. Il s'agit d'un transporteur ABC, identifié chez *P. syringae*, et régulé par l'osmolarité du milieu extérieur. Il doit fonctionner efficacement à forte osmolarité et à des concentrations ioniques élevées tandis que les transporteurs de nutriments sont souvent inhibés dans de telles conditions (Chen et Beattie, 2007).

La cellule accumulera la GB préférentiellement à tout autre osmoprotectant (Kempf et Bremer, 1998). Son transport est énergétiquement plus favorable que la synthèse (Oren, 1999). Chez *P. aeruginosa* elle représente les 2/3 de la concentration totale des osmolytes intracellulaires (D'Souza-Ault *et al.*, 1993). Toutefois, l'accumulation de solutés compatibles exogènes a pour conséquence de diminuer fortement la synthèse endogène. Ceci expliquerait la réduction de la croissance chez la souche Ps7 en présence de la GB à 0,3M/NaCl. En effet, la combinaison du NAGGA et du glycosylglycérol en absence de GB osmoprotège mieux la cellule que la GB seule. Cette observation concorde avec celle rapportée par Pocard *et al.* (1994) où l'addition de la GB au milieu apporte un effet modéré quant à l'amélioration de l'halotolérance de *P. mendocina*.

Outre son rôle dans l'osmoprotection, la GB pourrait également améliorer la croissance des souches de *Pseudomonas* à faible osmolarité, en servant comme source de carbone et d'azote (Diab *et al.*, 2006). Ceci justifie l'augmentation considérable de la croissance des souches (Ps7, Ps10) dans un milieu dépourvu de sel. Le catabolisme de la GB en aérobiose a été mieux étudié chez *Rhizobium meliloti* (Smith *et al.*, 1988) *Corynebacterium* (Suzuki *et al.*, 2005 in Diab *et al.*, 2006) et *Arthrobacter* (Meskys *et al.*, 2001 in Diab *et al.*, 2006). Elle est métabolisée suite une série de déméthylation aboutissant à la formation de diméthylglycine (DMG), de la sarcosine (monométhylglycine) et enfin de la glycine. Selon Wargo *et al.* (2008), la présence de la GB dans le cytoplasme de *P. aeruginosa* induirait la transcription des gènes (*gbcA* et *gbcB*) responsables de l'activation de la glycine bétaine transméthylase (EC2.1.1.5) (GBT). Cette enzyme catalyse la première étape de déméthylation de la glycine bétaine en DMG (Serra *et al.*, 2002). L'accumulation de la glycine bétaine chez *P. aeruginosa* dans un milieu hyper-osmotique, sans être métabolisée, serait due à la diminution de l'activité de cette enzyme (Serra *et al.*, 2002). Au contraire, chez *E. coli*, la GB n'est pas utilisée comme source de carbone ou d'azote. Elle intègre seulement dans l'osmoprotection (Perroud et Le Rudulier, 1985).

En absence de NaCl, la croissance n'est pas modifiée par l'ajout de la GB chez le reste des souches (Ps8, Ps12, Ps13). Ces dernières ne métabolisent pas la GB dans de telles conditions. De ce fait, la tolérance au sel et la possibilité d'utiliser la glycine bétaine comme source de carbone ou d'osmoprotection ne semble pas être une caractéristique spécifique à l'espèce, mais est plutôt dépendante aux souches.

4- Effet osmoprotecteur de l'extrait de *A. halimus*

L'apport de l'extrait hydro-alcoolique de *A. halimus* (1/100^{ème}) agit potentiellement sur la croissance des souches de *P. aeruginosa* en présence de 0,3M de NaCl, et sa capacité osmoprotectrice est très importante et dépasse en générale celle de la GB. Outre de sa richesse en osmoprotecteur, notamment la GB, il est considéré comme fournisseur de minéraux essentiels, de glucides, de substances pectiques, de polyols, des acides aminés et des vitamines (Larguet, 1998). Ces éléments nutritifs favoriseraient ainsi la croissance bactérienne. Des observations similaires ont été obtenues par notre équipe de recherche (Laboratoire d'Ecologie Microbienne) sur *Rhizobium meliloti* (Larguet, 1998) *Pseudomonas* spp. fluorescents (Arif, 2004) et *Azotobacter* spp. (Ameur, 2004).

L'extrait de *A. halimus* présente, cependant, un effet inhibiteur de la croissance entre 0,5 et 0,8M. En effet, chez *P. aeruginosa* l'ajout de la GB à une concentration finale supérieure à 1mM permettrait sa dégradation aussi bien à faible que à forte osmolarité (Diab *et al.*, 2005). Vu de la richesse de l'extrait de l'halophyte en GB elle est possible donc d'être catabolisée, et la réduction de la croissance chez les souches de *P. aeruginosa* peut être correspond à une phase de latence. La longueur de cette dernière serait due à leur nécessité à synthétiser des enzymes inductibles pour métaboliser la GB contenant dans l'extrait végétal. Selon Diab *et al.* (2005) la souche *P. aeruginosa* PAO cultivée dans un milieu contenant le glucose et la GB présente une courbe de croissance biphasique. Après une première phase de croissance exponentielle, la croissance s'arrête (phase de latence) puis reprend à nouveau de façon exponentielle. Il s'agirait d'un phénomène de diauxie. Pendant la première phase, la bactérie utilise en priorité le glucose car métabolisé par des enzymes constitutives; quand ce dernier est épuisé, elle métabolise alors la GB. Les résultats de Vargas *et al.* (2006) confirme l'arrêt de croissance chez la bactérie halophile *Chromohalobacter salexigens* cultivée en milieu salé contenant le glucose et la GB.

L'halophyte *A. halimus* apporte non seulement des osmoprotecteurs, mais aussi d'autres composés toxiques ou non tels les tanins (Benhammou *et al.*, 2009). Ces derniers sont connus par leur capacité à former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines. Selon Villalba *et al.* (2002) les tanins induisent des changements dans la physiologie de plusieurs espèces de bactéries du rumen (e.g. *Streptococcus gallolyticus*) en prolongeant la longueur de la phase de latence.

Par ailleurs, l'insolubilité de certaines substances dans l'éthanol (70%), utilisé dans la technique d'extraction, s'ajouterait à l'effet de l'osmolarité et la carence nutritionnelle du milieu.

La souche Ps10 montre, par contre, une amélioration notable de croissance en présence de l'extrait à 0,5 et à 0,8M/NaCl. La possibilité d'utiliser l'extrait d'halophyte comme osmoprotectants semble donc une caractéristique dépendante de la souche.

La croissance des souches étudiées est significativement restaurée ($P < 0,01$) en présence de l'extrait de *A. halimus* à 1M/NaCl. Son effet est plus remarqué chez la souche Ps12 et CHA0. Ceci serait le résultat de la mise en œuvre d'une stratégie d'haloadaptation à partir de l'effet combinée de diverses substances provenant de la plante. La forte stimulation de la croissance bactérienne serait donc due à un phénomène de synergie.

IV- Effet du NaCl, de la GB et de l'extrait de *A. halimus* sur la production de l'AIA

Les communautés bactériennes peuvent affecter directement la croissance des plantes par la production de molécules biologiquement actives, telles les substances de croissance (Glick, 1995). Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'AIA (Sandhya *et al.*, 2009). La production de cette hormone par *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance et le développement végétal. Elle joue un rôle très important dans la division cellulaire, l'élongation des racines, la prolifération des poils absorbants et dans le mécanisme de tolérance de la plante (Marulanda *et al.*, 2009 *in* Sandhya *et al.*, 2010). Maintenir une croissance racinaire constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau tel le milieu salin et/ou aride.

La fluctuation de la quantité de l'AIA produite par les souches de *Pseudomonas*, dans des conditions non stressantes, est probablement due à la variabilité génétique entre eux. Selon Mirza *et al.* (2001) *In* Mishra *et al.* (2010) la production de cette hormone est influencée par les conditions de culture, le stade de croissance et par la disponibilité du substrat dans le milieu. L'absence de production chez certaines souches (Ps10) serait liée à la perte de l'appareil génétique et physiologique de la biosynthèse. La production de l'AIA augmente significativement chez les souches Ps2 (30,39 $\mu\text{g/ml}$), Ps3 (47,16 $\mu\text{g/ml}$) et Ps13 (21,71 $\mu\text{g/ml}$) suite à l'apport de la GB. Ces dernières ont par conséquent la capacité de la transporter et de l'accumuler.

Le taux de l'AIA produit en absence du sel n'a pas été modifié en présence de 0,5M de NaCl chez les souches. Ce comportement semble être revenu à leur capacité à résister au stress osmotique. Ces constatations correspondent à ceux indiqués par Sundhya *et al.* (2010).

L'amélioration de la quantité de l'AIA produite par les souches Ps2 (18,96 µg/ml), Ps3 (16,07 µg/ml), Ps12 (3,95 µg/ml) Ps13 (15,87 µg/ml) suite à l'apport de la GB serait liée à leur capacité d'halotolérance. Cependant, chez certaines (Ps7, Ps8) aucune augmentation de la production n'a été observée en présence de la GB. Ceci justifierait par la régulation négative de l'AIA et de ses intermédiaires. En effet, les microorganismes peuvent détruire l'AIA afin d'éviter sa suraccumulation dans le milieu de croissance à cause de leurs effets antibactériens (Golubev *et al.*, 2011).

L'apport de l'extrait d'*A. halimus* présente une inhibition partielle ou totale de la production chez les souches à 0, 0,5M et à 0,8M/NaCl. Au fait, puisque toutes les parties de la plante étaient utilisées afin de récupérer le maximum d'osmoprotecteurs, il est fort probable que *A. halimus* relarguerait aussi des métabolites secondaires outre des osmoprotecteurs. Il s'agit des tanins, des flavonoïdes, des saponines, des alcaloïdes et des résines. Elle présente également plus de 10% de NaCl (Benhammou *et al.*, 2009). Par conséquent, l'effet combiné du stress salin et de ces composés pourraient être à l'origine de cette inhibition.

La production de l'AIA est assez importante chez CHA0 quel que soit l'osmoprotecteur ou la teneur en NaCl apportée. Ce comportement est probablement lié à sa variété génétique.

Enfin, les données obtenues permettant de ressortir les souches les plus productrices de cette phytohormone : Ps2, Ps3 et Ps13. Il est à souligner qu'une concentration de 0,5M/NaCl est inhibitrice pour la plupart de plantes d'intérêt agronomique. De ce fait, l'utilisation de ces souches en tant que bioinoculants serait possible dans de telles conditions.

V- Effet du NaCl, de la GB et de l'extrait de *A. halimus* sur la production de sidérophores

La salinité du sol et de l'eau d'irrigation appliquée dans les régions arides et semi-arides augmentent la sensibilité des plantes aux attaques des agents pathogènes. Ces derniers tolèrent des salinités élevées et sporule abondamment dans un environnement salin (Besri, 1988). Plusieurs bactéries appartenant du genre *Pseudomonas* sont capables de protéger les plantes grâce à la production de sidérophores (Lemanceau, 1992). Ces substances affectent la croissance de microorganismes phytopathogènes (*Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium oxysporum*, *cucumerinum*, *melonis*, *Pythium*) par une compétition pour le fer.

La fluctuation dans la production de sidérophores constatée chez les souches de *Pseudomonas* serait due à leur exigence en fer (Mazumdar *et al.*, 2007), ou au degré d'affinité du système d'assimilation du fer existant. Ce dernier peut-être de faible ou de haute affinité (Page *et al.*, 1982).

Malgré la tolérance des souches de *P. aeruginosa* au sel, les concentrations de 0,5M et 0,8M/NaCl sont considérées comme totalement inhibitrices de cette activité. Selon Faddin (1986) des teneurs en sel supérieures à 2% ont des effets délétères sur la production de pigment sur le milieu King B.

La restauration et l'amélioration de la production de sidérophores par la GB et l'extrait de *A. halimus* sont significatives ($p < 0,01$). Néanmoins, les propriétés osmoprotectrices de l'extrait de *A. halimus* sont évidentes et dépassent celles de la GB. Cette forte restauration de l'activité serait justifiée par l'apport en éléments nutritifs et osmoprotecteurs véhiculés par l'extrait végétal. De plus, la présence de molécules potentiellement osmoprotectrices (peptones) dans le milieu de King B pouvant minimiser l'impact du stress salin imposé aux souches. Il existerait ainsi une synergie entre les osmoprotecteurs apportés par le milieu et par l'extrait de *A. halimus*. La restauration de la croissance n'a pas été démontrée chez les souches, sensibles au sel, de *P. putida* (Ps3) et de *P. aeruginosa* (Ps2) suite à l'addition de la GB et de l'extrait. Ceci s'expliquerait par la déficience en équipement enzymatique nécessaire pour le transport et l'accumulation des osmoprotecteurs. De ce fait, il semble y avoir une relation entre l'halotolérance au sel et la production de sidérophores.

Enfin, l'action de l'extrait de *A. halimus* dans la restauration de la production de sidérophores chez toutes les souches est à souligner. Celle-ci est faible chez (Ps2 et Ps3), modérée chez (Ps8, Ps12 et Ps13) et forte chez (Ps7 et Ps10). L'utilisation de ces deux dernières souches fait partie des alternatives prometteuses à l'emploi des pesticides chimiques.

Conclusion

Ce travail se proposait d'étudier l'halotolérance de souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées d'un sol salin et de tester leur capacité à utiliser la GB comme osmoprotecteur synthétique, et l'extrait hydro-alcoolique de l'halophyte *Atriplex halimus* comme une source naturelle d'osmoprotection. Ces souches ont des propriétés promotrices de la croissance végétale telle : les capacités de solubiliser le phosphate inorganique, d'inhiber la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporium* et *Alternaria alternata*) et de produire l'acide cyanhydrique (HCN).

Le comportement d'halotolérance des *Pseudomonas* fluorescents diffère selon les souches. La meilleure capacité de résister au sel est manifestée par cinq souches de *Pseudomonas aeruginosa*, (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13). Leur halotolérance atteint 0,8M et 1M/NaCl respectivement en milieu pauvre (GMM) et riche (LB). Ce dernier est considéré plus performant à la croissance des souches sous contraintes osmotiques.

Une certaine teneur en NaCl (0,3M) est nécessaire pour la croissance des souches de *P. aeruginosa*. Au-delà de 0,5M, la croissance diminue graduellement.

La GB (1mM) joue un rôle osmoprotecteur important dans une large gamme de salinité, de 0,3 à 1M/NaCl. Son action osmoprotectrice est nette à 1M, une concentration inhibitrice en son absence. Elle se révèle toutefois plus discrète chez Ps12 et Ps8. Une réponse fortement positive est observée chez la souche Ps10 et Ps13.

L'extrait hydro-alcoolique de *A. halimus* (1/100^{ème}) exerce un effet osmoprotecteur sur les souches étudiées. Il est fort chez Ps12 modéré chez Ps8, Ps13 et faible chez Ps10. La souche Ps7 répond de la même manière aux deux osmoprotecteurs apportés.

D'une autre côté, il n'est pas étonnant de trouver une action inhibitrice de l'extrait de *A. halimus*, particulièrement entre 0,5 et 0,8 M ; à cause de sa richesse en NaCl (10%) et en autres métabolites secondaires présenteraient un effet inhibiteur.

Les souches de *P. aeruginosa* atteignent des maxima de croissance à 0,5 et 0,3M/NaCl en présence de GB et de l'extrait d'*A. halimus* respectivement. La souche de référence CHA0 présente une croissance légèrement meilleure que les souches de *P. aeruginosa* étudiées.

Toutefois, il ressort clairement que la GB est préférentiellement accumulé par ces souches et son pouvoir osmoprotecteur est mieux marqué que celui de l'extrait de *A. halimus*.

La résistance aux concentrations élevées en sel représenterait pour les souches de *Pseudomonas* un caractère important pour leur survie et pour leur reproduction en conditions de salinité et de sécheresse.

Quant à la production de l'AIA, toutes les souches de *Pseudomonas* semblent productrices sauf Ps10. L'effet de la GB (1mM) et de l'extrait de *A. halimus* (1/100^{ème}) sur cette activité est net en conditions non stressantes. Un taux élevé de l'AIA est enregistré chez Ps3 (47,16 µg/ml), Ps2 (30,39µg/ml) et Ps13 (21,71µg/ml). L'effet de l'extrait de *A. halimus* est remarquable chez Ps2 (16,37 µg/ml) et Ps12 (8,29 µg/ml).

Les souches de *Pseudomonas* produisent sensiblement les mêmes quantités de cette phytohormone en absence et en présence de 0,5 M/NaCl. A cette dernière concentration, la GB améliore particulièrement la production de Ps2 (18,96 µg/ml) et Ps12 (3,95 µg/ml). L'apport de l'extrait de *A. halimus* inhibe la production chez toutes les souches sauf chez Ps2 (14,13 µg/ml). Aucun osmoprotecteur n'est capable de lever l'inhibition imposée par une teneur de salinité égale à 0,8M.

Contrairement aux souches étudiées, la souche de référence CHA0 maintient un niveau élevé de production de l'AIA en dépit de l'élévation de la salinité et quel que soit l'osmoprotecteur apporté.

La production de sidérophores diminue graduellement en fonction de la concentration de NaCl. La GB (1mM) et *A. halimus* (1/100^{ème}) améliorent considérablement la production de sidérophores, néanmoins l'action de l'extrait végétal est meilleur. L'effet de la GB est appréciable chez Ps3, Ps2 et Ps12 (17,5 mm) en absence de sel. Dans ces conditions, l'effet de l'extrait de *A. halimus* est manifeste chez toutes les souches.

La GB et l'extrait de *A. halimus* exercent un effet remarquable sur l'amélioration de la production chez les souches Ps7 et Ps10, en présence de 0,5M/NaCl.

Une forte restauration de la production de sidérophores est acquise à 0,8M/NaCl suite à l'apport de l'extrait végétal ; et le plus grand diamètre de production est révélé à la souche Ps10 (17,5mm). Le pouvoir osmoprotecteur de cet extrait est modéré chez Ps7 (13,5mm), Ps8 (14mm), Ps12 (12mm) et Ps13 (12,5mm), mais il est faible chez la souche de référence CHA0 (7mm).

En somme les souches Ps2, Ps3, Ps13 semblent les plus productrices de l'AIA. En revanche Ps7 et Ps10 sont les plus performantes à la production de sidérophores.

L'halophyte *A. halimus* est une source d'osmoprotection efficace pour *Pseudomonas* fluorescents. La dégradation de cette halophyte enrichi le sol en osmoprotecteurs et permettrait le maintien de l'association bactéries-plantes dans les sols salés.

Les *Pseudomonas* présentent des caractéristiques physiologiques peuvent contribuer à leur survie dans les environnements salins. Leur halotolérance (Ps10, Ps12, Ps13) et leur capacité à produire l'AIA (Ps2, Ps3, Ps13) et de sidérophores (Ps7, Ps10) sont en faveur de leur utilisation pour les essais d'inoculation des plantes d'intérêt agricole (e.g. orge, blé). L'exploitation des souches en tant que bioinoculants en association avec *Atriplex halimus*, comme engrais vert, seraient une solution prometteuse pour rétablir la production dans des régions affectées par la salinité et/ou l'aridité.

Au terme de ce travail, d'autres perspectives semblent nécessaires à réaliser :

- Confirmer l'identification des souches de *Pseudomonas* par des tests chimiotaxonomiques et des analyses phylogénétiques.
- Etudier l'effet de la salinité sur d'autres activités promotrices de la croissance végétale (solubilisation des phosphates, production d'HCN, activité antifongique,...).
- Identifier les molécules osmoprotectrices contenues dans l'extrait de *A. halimus*.
- Rechercher d'autres halophytes permettant la restauration et l'amélioration de la croissance bactérienne et végétale sur des sols salés et/ou arides.

Résumés

L'halotolérance des souches de *Pseudomonas* fluorescents (nb=10) isolées du rhizoplan de l'orge cultivée dans un champ affecté par la salinité (EC : 8dS/m), dans la région de Hammam Essoukhna, au Sud-Est de Sétif est menée. L'appréciation de la croissance bactérienne est réalisée sur milieu riche (LB) et minimum (GMM) additionnée ou non de NaCl (0 à 1,3M). Cinq souches halotolérantes de *Pseudomonas aeruginosa* (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13), tolérant 0,8M/NaCl en GMM et 1M/NaCl en LB, ont servi à étudier l'effet du NaCl (0,3- 0,5- 0,8 et 1M), de la glycine bêtaïne (GB) (1mM) et d'extrait hydro-alcoolique de l'halophyte *Atriplex halimus* (1/100^{ème}) sur leur croissance et sur leur capacité à produire l'acide indole-3-acétique (AIA) et les sidérophores. Deux souches sensibles au sel *P. aeruginosa* (Ps2) et *P. putida* (Ps3) ont également subi ces deux derniers tests.

La croissance maximale des souches de *P. aeruginosa* est enregistrée entre 0,3 et 0,5M/NaCl en GMM. Comparée à l'extrait de *A. halimus*, la GB osmoprotège mieux les souches de *Pseudomonas*. Son affinité la plus élevée est constatée chez les souches Ps10 et Ps13. La souche Ps12 répond mieux en présence de l'extrait de *A. halimus*. Ps7 se comporte de manière identique quel que soit l'osmoprotecteur apporté. La quantité de l'AIA produite à 0,5M/NaCl est similaire à celle obtenue en absence de sel. Le taux maximum de l'AIA est constaté chez la souche Ps2 (30,39 µg/ml), Ps3 (47,16 µg/ml) et Ps13 (21,71 µg/ml) suite à l'apport de la GB sous conditions non stressantes. La production de sidérophores est inhibée par des concentrations croissantes de NaCl. Une forte restauration de la production est constatée chez la quasi-totalité des souches à 0,8M/NaCl en présence de l'extrait de *A. halimus* ; le diamètre de production étend de 12 à 17,5 mm. Les souches Ps10 et Ps7 sont les plus productrices de sidérophores.

L'inoculation des souches halotolérantes et productrices de sidérophores et d'AIA en association avec *A. halimus*, comme biofertilisant, pourrait améliorer la productivité des sols salés et/ou arides.

Mots clés : *Pseudomonas* fluorescents, halotolérance, osmoprotection, GB, *Atriplex halimus*, AIA, sidérophores.

Abstract

The halotolerance of fluorescent *Pseudomonads* strains (nb = 10) isolated from barley rhizoplane grown in a field affected by salinity (EC: 8dS /m) in the area south of Hammam Essoukhna, South-Est of Setif, was studied. Appreciation of bacterial growth was performed in rich medium (LB) and in minimal medium (GMM) with or without NaCl addition (0 to 1,3 M). Five halotolerant strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13), tolerate up to 0,8M/ NaCl in GMM and 1M/NaCl in LB, were used to study the effect of NaCl (0,3- 0,5- 0,8 and 1M), glycine betaine (GB) (1 mM) and hydroalcoholic extract of the halophyte *Atriplex halimus* (1/100) on their growth and their ability to produce indole-3-acetic acid (IAA) and siderophores. Two salt-sensitive strains of *P. aeruginosa* (Ps2) and *P. putida* (Ps3) were also included in the last two tests.

Optimal growth of *P. aeruginosa* strains was occurred at 0,3 and 0,5 M /NaCl in GMM. Compared to hydroalcoholic extract of *A. halimus*, the GB osmoprotect better *Pseudomonas* strains. Its highest affinity was observed in Ps10 and Ps13 strains. Ps12 responds better to *A. halimus* extract. Ps7 strain responds with a same way regardless the osmoprotectant amended. The amount of IAA produced at 0,5M/NaCl was similar to that obtained in the absence of salt. The maximum rate of IAA was achieved by the strains Ps2 (30,39 µg/ml), Ps3 (47,16 µg/ml) and Ps13 (21,71 µg/ml) in the presence of GB at non-stressed conditions. Siderophores production was inhibited by increasing NaCl concentrations. A strong recovery in production was observed in the presence of extract of *A. halimus* at 0,8 M/NaCl with a diameter production extends from 12 to 17,5mm. Ps7 and Ps10 strains were the most siderophore producers.

Inoculation of halotolerant strains producing siderophores and IAA associated with *A. halimus* as biofertilizer could restore the production in saline and / or dry soils.

Key words: fluorescent *Pseudomonads*, halotolerance, osmoprotection, GB, *Atriplex halimus*, IAA, siderophores.

الملخص

عزلت عشر سلالات من بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* من سطح جذور نبتة الشعير المزروع في حقل متضرر من الملوحة (درجة الملوحة : 8 dS/m) الواقع بمنطقة حمام السخنة جنوب شرق سطيف، وقد اختبرت مقدرتها على النمو في وسط مركب (LB) و آخر معدني (GMM) يحتوي كل منهما على تراكيز عالية من NaCl (من 0 إلى 1,3M). أظهرت خمس سلالات من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (Ps7, Ps8, Ps10, Ps12, Ps13) قدرة عالية على تحمل الملوحة (NaCl/ 0,8M في الوسط GMM و NaCl/ 1M في الوسط LB) والتي تم استخدامها في دراسة تأثير NaCl (-0,3- -0,5 -0,8 -1M)، glycine bétaine (1mM) والمستخلص الكحولي للنبتة الملحية *Atriplex halimus* (مخفف إلى 1/100) على نموها من جهة وعلى قدرتها على إنتاج acide indole-3- acétique و sidérophore من جهة أخرى. تم إدراج سلالتين حساستين للملوحة في هذين الاختبارين الأخيرين هما (Ps2) و *P. aeruginosa* (Ps3) و *P. putida*. نمت سلالات *Pseudomonas aeruginosa* بصفة مثالية بوجود 0,3 و 0,5M من NaCl كما كان تأثير مركب glycine bétaine على نموها أفضل من تأثير المستخلص الكحولي لـ *A. halimus*. استجابت السلالة Ps13 و Ps10 بدرجة كبيرة لمركب glycine bétaine أما السلالة Ps12 فكانت أكثر استجابة لمستخلص النبتة الملحية. استجابة السلالة Ps7 هي نفسها بغض النظر عن المركب المضاف. كمية acide indole-3- acétique المنتجة في وجود NaCl / 0,5M تماثل كميته المنتجة في غياب الملح. و قد سجلت أعلى نسبة من هذا المركب عند السلالات Ps2 (30,39µg/ml) ، Ps3 (47,16µg/ml) و Ps13 (21,71µg/ml) في غياب الملح وعند إضافة glycine bétaine. تأثرت إنتاجية البكتيريا لمركب sidérophore سلبا بزيادة درجات الملوحة غير أنها استرجعت عند إضافة مستخلص النبتة بوجود NaCl /0,8 M. السلالتين Ps7 و Ps10 هما الأكثر إنتاجية لهذا المركب. استخدام بكتيريا *Pseudomonas* المتحملة للملوحة و المنتجة لـ sidérophore و acide indole-3- acétique كلقاح للنبات، بالإضافة للنبتة الملحية *A. halimus* كسماد حيوي يمكنه أن يساعد على استرجاع إنتاجية التربة الملحية و الجافة.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas fluorescent* ، تحمل الملوحة، *Atriplex halimus*

Communications scientifiques

Arif, F., **N.E.H. Rabhi.**, H. Cherif, et M. Ghoul. 2010. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads isolated from Algerian soil. Les Journées Internationales de Biotechnologie de l'Association Tunisienne de Biotechnologie. Yasmine Hammamet, Tunisie. 19-22 Déc.

Rabhi, N.E.H., F. Arif, H. Cherif, et M. Ghoul. 2011. Production of secondary metabolites by indigenous halotolerant strains of fluorescent pseudomonads. The Mediterranean Conference on Natural Products (MCNP). Tipaza, Algérie. 9-10 Oct.

Rabhi, N.E.H., F. Arif, H. Cherif, A. Silini, M. Ghoul. 2011. Activités promotrices de la croissance végétale des souches halotolérantes de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées d'un sol salin. Cinquième colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM) en collaboration avec l'Association Tunisienne de Biotechnologie, Hammamet, Tunisie. 14-16 Nov

Rabhi, N.E.H., F. Arif, A. Silini, et M. Ghoul. 2011. Production of plant regulator, Indole-3-acetic acid, by fluorescent *Pseudomonas* strains under saline condition. 17^{èmes} Journées Nationales de Microbiologie, Sétif, Algérie. 20-21 Nov.

Rabhi, N.E.H., F. Arif et M. Ghoul. 2011. Effect of salt stress on plant growth promoting *Pseudomonas aeruginosa* and responses to natural osmoprotectants added. Les Journées Internationales de Biotechnologie de l'Association Tunisienne de Biotechnologie. Sousse, Tunisie. 19-22 Déc.

Références bibliographiques

- Abbas-Zadeh, P., N. Saleh-Rastin, H. Asadi-Rahmani, K. Khavazi, A. Soltani, A.R. Shoary-Nejati, et M. Miransari. 2010.** Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta. Physiol. Plant.* **32**: 281-282
- Albouvette. C., B. Schippers., P. Lemanceau. P.A.H.M. Bakker. 1998.** Biological control of *Fusarium* wilts, p. 15-36. *In* G.J. Boland., L. D. Kuykendall (ed.), *Plant-microbe interactions and biological control*. Marcel Dekkar, INC. New York.
- Ali, S.k.Z, V. Sandhya, M. Grover, N. Kishore, L.V. Rao, et B. Venkateswarlu. 2009.** *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils.* **46**: 45–55
- Ameur, H. 2004.** Halotolérance de *Azotobacter* spp. isolés du sol. Effet osmoprotecteur d'halophytes. Thèse de magister. Université de Sétif. Algérie
- Anonyme. 2004.** Direction générale des Forêts. Atlas des zones humides d'importance internationale.
- Anonyme. 2005.** Fiche descriptive sur les zones humides RAMSAR. Ministère de l'agriculture et du développement rural direction générale des forets. Algérie.
- Anonyme. 2008.** Les sols salins en Algérie. Institut National des Sols, de l'irrigation et du Drainage (INSID).
- Arango, M., et S. Tarnawski, S. 2002.** La plante: une intermédiaire essentiel entre le CO₂ atmosphérique et le carbone du sol. *Bulletin de la société Suisse de Pédologie.* **26**: 5-9
- Arif, F. 2004.** Halotolérance des *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés du sol. Effet osmoprotecteur d'halophytes. Thèse de magister. Université de Sétif. Algérie
- Ashraf, M., et M.R. Foolad. 2007.** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* **59**: 206-216

- Bais, H.P., T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy, et J.M. Vivanco. 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233-266
- Bakker, A.W., et B. Schippers. 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth-stimulation. *Soil. Biol. Biochem.* **19**: 451-457
- Bano, A et M. Fatima. 2009.** Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fert. Soils.* **45**: 405–413
- Bartlett, D.H., et M. Roberts. 2004.** Osmotic stress, p. 754-766. *In* M. Schaechter (ed.), The desk encyclopedia of microbiology, Elsevier. Academic Press. Canada.
- Belimov, A.A., N. Hontzeas, V.I. Safronova, S.V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta, et B.R. Glick. 2005.** Cadmium tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol. Biochem.* **37**: 241–250
- Belkhodja, M., Bidai, Y. 2004.** Réponse des graines d'*Atriplex halimus* L. à la salinité au stade de la germination. *Sécheresse.* **15** : 331-5
- Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch. 2002.** Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. *In* G. Bitton (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- Benhammou, N., F.A. Bekkara., et T.K. Panovska. 2009.** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie.* **12**: 1259- 1266
- Ben Hassine, A., et S. Lutts. 2010.** Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *J. Plant Physiol.* **167**: 1448–1456

Bernard, T., M. Jebbar, Y. Rassoli, S. Hamidi-Kebbab, J.H. Hamelin, et C. Blanco.

1993. Ectoïne accumulation and osmotic regulation *Brevibacterium lines*. J. Gen. Microbiol. **139** : 129-136

Bernard, T., J.A. Pocard, B. Perroud, et D. Le Rudulier. 1986. Variations in the response of salt stress *Rhizobium* strains to betaines. Arch. Microbiol. **143**: 359-364

Bertrand, H., C. Plassard, X. Pinochet, B. Touraine, P. Normand, et J.C. Cleyet-Marel. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobium (*Achromobacter* sp.). Can. J. Microbiol., **46**: 229- 36

Besri, M. 1988. Effet de la salinité sur le développement des maladies des plantes. Société coopérative agricole marocaine. 9-11

Bleecker, A.B., et H. Kende. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **16**: 1-18

Blumer, C., et D. Haas. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch. Microbiol **173**: 170-177

Bonaterra, A., J. Cabrefiga, J. Camps, et E. Montensinos. 2007. Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. FEMS. Microbiol. Ecol. **61**: 185-195

Boch, J., B. Kempf, R. Schmid et E. Bremer. 1996. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis* : characterization of the gbs AB genes. J. Bacteriol. **178**: 5121-5129

Bray, R.H., et L.T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci. **59**: 39-45

Bremer, E., et R. Kramer. 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, p. 79-97. *In* G. Storz et R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington.

Brimecombe, M. J., F.A. De Leij, et J.M. Lynch. 2007. Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. *In* R. Pinto, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. CRC Press. New York

Cacciari, I., E. Dimattia, P. Quatrini, M.C. Moscatelli, S. Grego, D. Lippi, et M.R. De paolis. 2003. Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress, p. 231-248. *In* M. Grouzis, E. Le Floch, (ed.), Un arbre ou désert, *Acacia raddiana*. IRD Éditions. Paris.

Cattelan, A. J., P.G. Hartel, et J.J. Fuhrmann. 1999. Screening for Plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 1670-1680

Chambers, S.T., C.M. Kunin, D. Miller et A. Hamada. 1987. Dimethylthein can substitute for glycine betaine as an osmoprotectant molecule for *E. coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4845- 4847

Chaiharm, M., et S. Lymyong. 2009. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 305-314

Chen. C., et G.A. Beattie. 2007. Characterization of the osmoprotectant transporter OpuC from *Pseudomonas syringae* and demonstration that cystathionine--synthase domains are required for its osmoregulatory function. *J. Bacteriol.* **189**: 6901-6912

Cheng, Z., E. Park, et B.R. Glick. 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylatedeaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can. J. Microbiol.* **53**: 912-918

Cheverry, C. 1995. Plant behaviour in saline environment. Action eau. Ed. Acad. Agro, Paris, France, 49 pages.

Ciula, R. A., M.R. Diaz, B.F Taylor, et M.F. Roberts. 1997. Organic osmolytes in aerobic bacteria from Monolake, an alkaline moderately hypersaline environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 220-226

Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, et E. Ait Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951-4959

Cosquer, A., V. Pichereau, J.A. Pocard, J. Minet, et T. Bernard. 1999. Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3304- 3311

Csonka. L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121-147

Da Costa, M. S., H. Santos et E.A. Galinski. 1998. On overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and Archeae, p. 118-153. *In* G. Antranikian (ed.), *biotechnology of extremophiles*. Springer-verlage, Berlin, Heidelberge.

Defago, G. 1993. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* **42**: 311–312

Defago, G., D. Haas, C.H. Berling, U. Burger, C. Keel, C. Voisard, P. Wirthner, et B. Wuthrich. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms, p. 93-108. *In* D. Hornby (ed.), *Biological control of soil-borne plant pathogens*. CAB Int

Dellal, A et A. Halitim. 1992. Activités microbiologiques en conditions salines : cas de quelques sols salés de la région de Relizane (Algérie). *Cahiers Agric.* **1** : 335-340

Dell'Amico, E., L. Cavalca, et V. Andreoni. 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium resistant rhizobacteria. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 74–84

D'Souza-Ault, M.R., L.T. Smith, et G.M. Smith. 1993. Roles of N-Acetylglutaminyglutamine Amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to Osmotic Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 473- 478

De Souza, J. T., M. De Boer, P. DeWaard, T.A. Van Beek, et J.M. Raaijmakers. 2003. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7161-7172

De Weert, S., H. Vermeiren, I.H.M. Mulders, I. Kuiper, N. Hendrickx, G.V. Bloemberg, J. Vanderleyden, R. De Mot, et B.J.J. Lugtenberg. 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 1173-1180

Diab, F., T. Bernard, A. Bazire, D. Haras, C. Blanco¹, et M. Jebbar. 2006. Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology.* **152**: 1395-1406

Dimkpa, C., I. Tanjaweinad, et F. Asch. 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x. p 1-13

Dimorth, P. 1987. Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol. Rev.* **51**: 320-340

Edi, H . 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promoting activities *in vitro*. *Indo. J. Agric.* **4**: 27-31

Edward, P. G., et J. J. Brown. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**: 227-255

Empadinhas, N., et M.S. da Costa. 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.* **11**: 151–161

Faddin, M. 1986. Media for medical bacteria, p. 652-656. Williams and Wilkins, London

Flowers, T. J., et T.D. Colmer. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.* **179:** 945–963

Galinski, E.A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37:** 273-328

Galinski, E.A., H.P. Pfeiffer, et H.G. Truper. 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. Anovelcuclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothio rhodospira*. *Eur. J. Biochem.* **149:** 135-139

Galinski, E.A., et H.G. Truper. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS microbiol. Rev.* **15 :** 95-108

Gamalero, E., G. Lingua, G. Berta, et B.R. Glick. 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* **55:** 501–514

Ghassemi, F., A.J. Jakeman, et H.A. Nix. 1995. Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Center for resource and environmental studies, The Australian National University, Canberra, Australia. 125 pages.

Ghoul, M. 1990. Halotolerance de *Escherichia coli*: effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de Doctorat. Université de Rennes I. France.

Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41:** 109-117

Glick, R.B., Z. Cheng, et J. Czarny. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminas-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119:** 329-339

Golubev, S.N., A.Y. Muratova, L. Wittenmayer, A.D. Bondarenkova, F. Hirche, L.Y. Matora, W. Merbach, et O.V. Turkovskaya. 2011. Rhizosphere indole-3-acetic acid as a mediator in the *Sorghum bicolor*–phenanthrene–*Sinorhizobium meliloti* interactions, *Plant Physiol. Biochem.* Doi: 10.1016/j.plaphy.2011.03.007

Gouffi, K., V. Pichereau, J.P Rolland, D. Thomas, T. Bernard, et C. Blanco. 1998. Sucrose is a non accumulated Osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **180** : 5044-5051

Gould, W. D., C. Hagedorn., R. Bardinellit, et R.M. Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent Pseudomonads from various habitats. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 28-32

Gray, E. J., et D.L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. Soil Biol. Biochem. **37**: 395- 412

Grover, M.S.k.Z. Ali, V. Sandhya, A. Rasul, et B. Venkateswarlu. 2010. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. World J. Microbiol. Biotechnol. Doi: 10.1007/s11274-010-0572-7

Haas, D., et G. Defago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat. Rev. Microbiol. **3**: 307-319

Haas, D., et C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Ann. Rev. Phytopathol. **41**: 117-153.

Hariprasad, P., H.M. Navya, S. Chandranayaka, et S.R. Niranjana. 2009. Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. Biol. Control. **50**: 307-316

Haynes, R.J., et R.S. Swift. 1990. Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. J. Soil Sci. **41**: 73–83

Hillel, D. 2005. Salinity, p. 435-442. In D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), Encyclopedia of soil in the environment. Vol03. Columbia University, USA

Höfte, M., et N. Altier. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* **161**: 464-471

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth edition.

Jacques, P., P. Delfosse, M. Ongena, P. Lepoivre, P. Cornélis, N. Koedam, L. Neirinckx, et P. Thonart. 1993. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agric.* **2** : 301-307

Jourdan, E., M. Ongena, et P. Thonart. 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**: 437-449

Kamilova, F., S. Validov, T. Azarova, I. Mulders, et B. Lugtenberg. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1809–1817

Karnwal, A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* **91**: 61-63

Kempf, B., et E. Bremer.1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330

Keneni, A., F. Assefa, et P.C. Prabu. 2010. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *faba bean* of Ethiopia and their abilities on solubilization insoluble phosphates *J. Agr. Sci. Tech.* **12**: 79-89

Kennedy, A. C., et L.Z. de Luna. 2004. Rhizospher, p. 399-409. *In* D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment*. Vol03. Columbia University, USA

Kets, E.P.W., E.A. Galinski, M. De Wit, J. A. M. De Bont, et H.J. Heipieper. 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* **23:** 6665-6670

Khalid, A., M. Arshad, et Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* **96:** 473-480

Khan, A. A., G. Jilani, M.S. Akhtar, S. M. S. Naqvi, et M. Rasheed. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *J. agric. biol. sci.* **11:** 48-58

Khaznadar, M., I. N. Vogiatzakis, et G. H. Griffiths. 2009. Land degradation and vegetation distribution in Chott El Beida wetland, Algeria. *J. Arid. Environ.* **73:** 369-377

Kim, K.Y., D. Jordan, et G. A. McDonald. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil Soils.* **26:** 79-87

King, E.O., M.K. Ward, et D.E. Raney. 1954. Two simple methods for the determination of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44:** 303-304

Kuiper, I., G.V. Bloemberg, et B.J.J. Lugtenberg. 2001. Selection of a plant bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **14 :** 1197-205

Larguet, A. 1998. Effet osmoprotecteur d'extraits d'halophytes sur *Rhizobium meliloti*. Thèse de magister. Université de Sétif. Algérie

Lavelle, P., et A.V. Spain. 2001. Soil ecology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 654 pages.

Lee J.Y., et B. K Hwang. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48 :** 407-417

Lemanceau, P. 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie*. **12**: 413-437

Le Houérou, H.N. 1993. Salt-tolerant plants for the aride regions of the Mediterranean isoclimatic zone, p. 403-4222. In H. Leith and A. Al Masoom (ed.), Towards the rational use of the high salinity tolerant plant, Vol.1.1. Kluwer Publisher, Netherlands.

Le Rudulier, D., et L. Bouillard. 1983. Glycine Betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 152-159

Le Rudulier, D., K. Mandon., L. Dupont., et J.C. Trinchant. 2002. Salinity effects on physiology of soil microorganisms, p. 2774-2789. In G. Bitton (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology. A Wiley-Interscience Publication. Canada.

Levigneron, A., F. Lopez, G. Vansuyt, P. Berthomieu, P. Fourcroy, et F. Casse Delbart. 1995. Les plantes face au stress salin. *Cahier Agric.* **4**: 263-73

Loyer, J.Y. 1991. Classification des sols salés : les sols salic. *Cah. Orston. sér. Pédol.* **26**: 51-61

Lucchesi, G.I., T.A, Lisa, C.H, Casale, et C.E, Domenech. 1995. Carnitine resembles choline in the induction of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C and in its action as an osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* **30**: 55-60

Lucht, J.M., et E. Bremer. 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments : osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 3-20

Lugtenberg, B., et F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-56

Madkour, M., L.T. Smith, G.M. Smith. 1990. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56:** 2876- 2881

Mahmoud, A.L.E., et M. H, Abd Alla . 2001. Siderophores production by some microorganisms and their effect on *Bradyrhizobium*-mung bean symbiosis. *Inter. J. Agric. Biol.* **3:** 157-162

Marulanda, A., J.M. Barea, R. Azoen. 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *J. Plant growth regul.* Doi : 10.1007/s00344-009-9079-6

Mazumdar, T., C. Goswami., et N.C. Talukdar. 2007. Characterisation and screening of beneficial bacteria obtained on King's B agar from tea rhizospher. *Indian. J. Biotechnol.* **6:** 490- 494

Mayak, S., T. Tirosh, et B.R. Glick. 2004 a. Plant growth- promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Sci.* **166:** 525-530

Mayak, S., T. Tirosh, et B.R. Glick. 2004b. Plant growth- promoting bacteria confer resistance in to tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42:** 565-572

Mercado-Blanco, J., et P.A.H.M. Bakker. 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* **92:** 367-389

Meskys, R., R.J. Harris, V. Casaite , J. Basran, et N. S. Scrutton. 2001. Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter* spp. implications for glycine betaine catabolism. *Eur. J. Biochem.* **268:** 3390–3398

Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold spring harbor, NY: Cold spring harbor laboratory.

Miller, H.J., E. Liljeroth, G. Henken, et J.A. Van Veen. 1990. Fluctuations in the fluorescent pseudomonad and actinomycet populations of rhizosphere during the growth spring wheat. *Can. J. Microbiol.* **36** : 254- 258

Miller, J.K., et J.M. Wood. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-36

Milner, J.L., L. Silo-Suh, J.C. Lee, H. He, J. Clardy, et J. Handelsman. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3061-3065

Mishra, M., U. Kumar, P.K. Mishra, et V. Prakas. 2010. Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria for the enhancement of *Cicer arietinum* L. growth and germination. *Adv. Bacterial. Research.* **4**: 92-96

Miza, M.S., W. Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, et K.A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization and effect of plant growth promoting bacteria on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant soil.* **237**: 47-54

Moore, E.R.B., B.J. Tindall, V.A.P. Martins Dos Santos, D.H. Pieper, J.L. Ramos, et N.J. Palleroni. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*, p.646-703. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA

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.

Nakayama, T., Y. Homma, Y. Hashidoko, J. Mizutani, et S. Tahara. 1999. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4334-4339

Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 265-270

Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.* **63**: 334-348

Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst.* **4** : 1-13

O'Sullivan, D.J., et F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676

Page, W.J. et M. Von tigeewtrom.1982. Iron- and molybdenum-repressible outer membrane proteins in competent *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **151**: 273-242

Parida, A.K.A., et A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotox. Environ. Safety.* **60**: 324-349

Patten, C.L., et B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3795-3801

Perroud, B., et D. Le Rudulier. 1985. Glycine betaine transport in *E. coli* : osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161** : 393-401

Pérez-Miranda, S., N. Cabirol, R. George-Téllez, L. S. Zamudio-Rivera, et F.J. Fernandez. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Meth.* **70**: 127-131

Pitmani, M. G., et A. Lauchli. 2004. Global impact of salinity and agricultural ecosystems, p.3-20. *In* A. Läuchli, et U. Lüttig (ed.), *Salinity : Environment-plants-molecules*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Pocard J.A., L.T. Smith, G.M. Smith, et D. Le Rudulier. 1994. A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bacteriol.* **176**: 6877-6884

Pujic, P., et P. Normand. 2009. La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur.* **298**: 26-29

Ramette, A., M. Frapolli, G. Defago, et Y. Moenne-Loccoz. 2003. Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol Plant Microbe Interact.* **16:** 525-535

Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, et F.J. Gutiérrez Mañero. 2008 a. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), p. 41- 52. *In* : I. Ahmad, J. Pichtel et S. Hayat(ed.), *Plant-bacteria interactions*. Wiley -Vch, Weinheim.

Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, M.T. Pereyra de la Iglesia, J. Domenech, et F. J. Gutiérrez Mañero. 2008 b. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology.* **98:** 451-457

Rangarajan, S., P. Loganathan, L.M. Saleena, et S. Nair. 2001. Diversity of pseudomonads isolated from three different plant rhizospheres. *J. Appl. microbiol.* **91:** 742-749

Ranjard, L., et A. Richaum. 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbio.* **152:** 707-716

Reed, M. L. E., et B.R. Glick. 2005. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.* **51:** 1061-1069

Rhodes, D., et A.D. Hanson. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* **44:** 357-384

Roberts, M.F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic Saline Syst. **1:** 1-30

Sandhya, V., S.K.Z. Ali, M. Grover, G. Reddy, et B. Venkateswarlu. 2009. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils.* **46:** 17-26

Sandhya, V., S.K.Z. Ali, B. Venkateswarlu, G. Reddy, et M. Grover. 2010. Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Arch. Microbiol.* **192**: 867-876

Schnider-Keel, U., K.B. Lejbolle, E. Baehler, D. Hass, et K. Keel. 2001. The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5683-5693

Schwyn, B., et J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Biochemistry.* **160**: 47-56

Serra, A. L., J.F. Mariscotti, J.L. Barra, G. I. Lucchesi, C.E. Domenech, et A.T. Lisa. 2002. Glycine betaine transmethylase mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**: 4301–4303

Sgroy, V., F. Cassán, O. Masciarelli, M. Florencia Del Papa, A. Lagares, et V. Luna. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopisstom bulifera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-009-2116-3

Sleator, R.D., et C. Hill. 2001. Bacterial osmoadaptation : the role of osmolytes bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71

Smith, L.T., J.A. Pocard, T. Bernard et D. Le Rudulier. 1988. Osmotic control of glycine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **170**: 3142-3149

Strom, A.R., P. Falkenberg, et B. Landfald. 1986. Genetics of osmoregulation in *E. Coli*: uptake and biosynthesis of organic osmolytes. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 79- 86

Strom, A.R., et I. Kaasen. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**: 205-210

Strom, A.R., D. Le Rudulier, M.W. Jakowec, R.C. Bunnell, et R.C. Valentine. 1983. Osmoregulatory (Osm) genes and osmoprotective compounds, p. 39-59. *In* T. Kosuge, C. Meredith and A. Hollaender (ed.), Genetic engineering of plants. Plenum publishing corp, New York.

Spaepen, S., J. Vanderleyden, et R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 425-448

Talibart, R., M. Jebbar, C. Gouesbet, S. Hamidi-Kebbab, H. Wroblewski, C. Blanco et T. Bernard. 1994. Osmoadaptation in rhizobacteria : ectoïne-induced salt tolerance. *J. Bacteriol.* **176**: 5210-5217

Talibart, R., M. Jebbar, K. Gouffi, V. Pichereau, G. Gouesbet, C. Blanco, T. Bernard, et J.A. Pocard. 1997. Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in salt-stressed cultures of *Sinorhizobium meliloti* *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4657-4663

Tanji, K. K. 2004. Salinity in the soil environment. Chap 2, p 21-51. *In* A. Läuchli, et U. Lüttig (ed.), Salinity : environment-plants-molecules. Kluwer, Dordrecht. Netherlands.

Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, Shilpi Mittal, A.K. Tripathi, et B.N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* **89**: 136-150

Whatmore, A.M., et J.A. Chudeket R.H. Reed. 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pool of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2521-2526

Tokala, R. K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford., H. Salove, L.A. Deobald, F.J. Bailey, et M.J. Morra. 2002. Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S. lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2161-2171

Trotsenko, Y.A., et V.N. Khmelenina. 2002. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch. Microbiol.* **177**: 123-131

Uren, N. C. 2007. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants, p. 1-15. *In* R. Pinton, Z. Varanini, et P. Nannipieri (ed.), The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. CRC Press, New York

van Loon, L.C., et P.A.H.M. Bakker. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, p. 39-66. *In* Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer Science Dordrecht, The Netherlands

van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254

Vargas, C., M. Jebbar, R. Carrasco, C. Blanco, M.I. Calderon, F. Iglesias-Guerra, et J.J. Nieto. 2006. Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Appl. Microbiol.* **100**: 98–107

Ventosa, A., J.J. Nieto, et A. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** : 504-544

Villalba, J. J., F.D. Provenza, et R.E. Banner. 2002. Influence of macronutrients and polyethylene glycol on intake of a quebracho tannin diet by sheep and goats. *J. Anim. Sci.*, **80**: 3154-3164

Walker, T. S., H.P. Bais, E. Grotewold, et J.M. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* **132**: 44-5

Wang, C., E. Knill, B.R. Glick, et G. Defago. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* **46**: 898-907

Wargo, J.M., B.S. Szwergold, et D.A. Hogan. 2008. Identification of two gene cluster and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism. *J. Bacteriol.* **190**: 2690-2699

Weyens, N., S. Monchy, J. Vangronsveld, S. Taghavi, et D. Vander Lelie. 2010. Plant-Microbe Partnerships, p. 254-2564 . *In* K.N. Timmis (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Whatmore, A. M., J.A. Chudek, et R.H. Reed. 1990. The effects of osmotic upshok on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2521-2526

Whippes, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* **52**: 487-511

Yancey, P.H. 2001. Water stress, osmolytes and proteins. *Amer. Zool.* **41**: 699-709

Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R. D. Bomlus, et G.N. Somero. 1982. Living with water stress : evolution of osmolyte system. *Science.* **21**: 1214-1222

Yang, J, J.W. Kloepper, et C.M. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.***4**:1-4

Zahir, Z. A, M. Arshad, et W.T. Frankenberger, Jr. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria : application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro.* **81**: 97-198

Zahir, AZ., U. Ghani, M. Naveed, S.M. Nadeem, et H.N. Asghar. 2009. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Arch. Microbiol.* **191**: 415-424

Zahran, H.H. 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soils.* **25**: 211-223

Zhu, J.K. 2007. Plant salt stress. *Encyclopedia of life sciences.* doi: 10.1002/9780470015902.a0001300.pub2.

Zhuang, X., J. Chen, H. Shim, et Z. Bai. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Int.* **33**: 406-413

Annexes

Annexe 1

Tampon phosphate salin

K ₂ HPO ₄		5,62 g
KH ₂ PO ₄		2,13 g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

pH final : 7

Annexe 2

Milieu de King B (Flucka)

Peptone de caséine		10g
Peptone de viande		10g
MgSO ₄ .7H ₂ O		1,5 g
K ₂ HPO ₄		1,5 g
Agar agar		12 g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

Annexe 3

Milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's phosphate) (Nautiyal,1999)

Glucose		10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂		5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O		5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,25 g
KCl		0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄		0,1 g
Agar agar		15g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

Annexe 4

Milieu Trypticase de soja (Fluka)

Peptone tryptique de caséine		17g
Peptone papainique de soja		5g
NaCl		5g
K ₂ HPO ₄	2,5g	
Glucose		5g
Agar-agar		12g
Eau distillée	q.s.p	1000ml

Annexe 5

Milieu de PDA (potato dextrose agar)

Extrait de pomme de terre		200g
Glucose		20g
Agar-agar		15g
Eau distillée	q.s.p	1000ml

pH final : 5,2

Annexe 6

Milieu MS (Minimal salt medium) (Edi, 2003)

K ₂ HPO ₄		1,36 g
Na ₂ HPO ₄		2,13g
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,2g
Eau distillée	q.s.p	1000 ml

Annexe 7

Milieu de CAS (Chrome Azurol S)

Le milieu utilisé est décrit par Schwyn et Neilands (1987) et modifié par Mahmoud et Abd Alla (2001). Ce dernier est préparé en mélangeant 2,7 mg de FeCl₃.6H₂O dissous dans 10 ml de HCl 10 mM avec 1,21g/l de chrome Azurol S (CAS) dissous auparavant dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange, de couleur violette foncée, est ajouté très lentement sous agitation à 1,821g de HDTMA (Hexaméthylammoniumbromure) dissous dans 40 ml d'eau distillée. La solution bleu foncé obtenue est autoclavée à 121 °C/15 min. Un autre mélange est préparé en

dissolvant 30,24 g du tampon de Pipes et 15 g d'agar dans 750 ml d'eau. Le pH de cette solution est ajusté au pKa de Pipes (6,8) en ajoutant le KOH 50% (w/v).

Annexe 8

Réactif d'extraction du phosphate soluble

- Solution A : solution d'extraction du phosphate (0.025 N d'HCl et 0.03 N de NH_4F) (Bray et Kurtz, 1945)

- Solution B : molybdate d'ammonium [$(\text{NH}_4)_6 \text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (12 mM).

1ml de la solution diluée de chlorure d'étain SnCl_2 (5 mM) (1ml de la solution concentré dans 33ml d'eau distillé) est ajouté à 5 ml de la solution A et à 5ml de la solution B

Annexe 9

Réactif de de Salkowski

2% de FeCl_3 (0,5 M) dans une solution de 35% d'acide perchlorique.

Annexe 10

Analyse de la variance

A / Effet de la souche, de sel, de la GB et de l'extrait d'halophyte sur la croissance.

Source	DL	F
Souches (a)	5	356.9553 **
Traitements (b)	2	1315.3028 **
Concentrations de sel (c)	4	952.1294 **
Interactions (a) x (b)	10	88.8336 **
(a)x (c)	20	108.8619 **
(b) x (c)	8	237.2798 **
(a) x (b) x (c)	40	95.9799 **
Erreur	0.00030	

** : Significative à un seuil de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

* : Significative à un seuil de 5% de probabilité ($.01 \leq p < 0.05$)

Ns : Non-significative ($p \geq 0.05$)

B / Effet de la souche, de sel, de la GB et de l'extrait d'halophyte sur la production de l'AIA

Source	DL	F
Souches (a)	7	5656.2616 **
Traitements(b)	2	1486.0726 **
Concentrations de sel (c)	2	5133.9107 **
Interactions (a) x (b)	14	240.8629 **
(a) x (c)	14	628.5993 **
(b) x (c)	4	274.8377 **
(a) x (b) x (c)	28	186.6652 **
Erreur	0.29974	

** : Significative à un seuil de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

* : Significative à un seuil de 5% de probabilité ($.01 \leq p < 0.05$)

Ns : Non-significative ($p \geq 0.05$)

C/ Effet de la souche, de sel, de la GB et de l'extrait d'halophyte sur la production sidérophores

Source	DL	F
Souches (a)	7	65.3671 **
Traitements (b)	2	802.6306 **
Concentrations de sel (c)	2	1530.8013 **
Interactions (a) x (b)	14	46.3212 **
(a) x (c)	14	48.7805 **
(b) x (c)	4	160.9934 **
(a) x (b) x (c)	28	17.7956 **
Erreur	1.04861	

** : Significative à un seuil de 1% de probabilité ($p < 0.01$)

* : Significative à un seuil de 5% de probabilité ($.01 \leq p < 0.05$)

Ns : Non-significative ($p \geq 0.05$)

Annexe11

Effet du sel et d'osmoprotecteurs sur la croissance. Les valeurs sont la moyenne \pm SD (n=6)

NaCl Souches	D.O _{600nm}		
	Sans osmoprotecteur	Plus GB	Plus extrait de <i>A. halimus</i>
0M			
Ps7	0,035 \pm 0,004	0,123 \pm 0,009	0,122 \pm 0,017
Ps8	0,071 \pm 0,005	0,079 \pm 0,007	0,025 \pm 0,004
Ps10	0,123 \pm 0,013	0,364 \pm 0,031	0,074 \pm 0,024
Ps12	0,061 \pm 0,013	0,058 \pm 0,018	0,193 \pm 0,017
Ps13	0,060 \pm 0,015	0,063 \pm 0,015	0,062 \pm 0,012
CHA0	0,201 \pm 0,047	0,215 \pm 0,012	0,259 \pm 0,033
0,3M			
Ps7	0,121 \pm 0,001	0,065 \pm 0,013	0,340 \pm 0,024
Ps8	0,082 \pm 0,015	0,205 \pm 0,008	0,294 \pm 0,012
Ps10	0,146 \pm 0,006	0,129 \pm 0,002	0,059 \pm 0,019
Ps12	0,097 \pm 0,011	0,102 \pm 0,018	0,326 \pm 0,008
Ps13	0,071 \pm 0,004	0,222 \pm 0,005	0,359 \pm 0,006
CHA0	0,309 \pm 0,052	0,377 \pm 0,064	0,389 \pm 0,004
0,5M			
Ps7	0,131 \pm 0,009	0,242 \pm 0,011	0,052 \pm 0,009
Ps8	0,138 \pm 0,009	0,163 \pm 0,009	0,152 \pm 0,005
Ps10	0,106 \pm 0,025	0,137 \pm 0,010	0,127 \pm 0,018
Ps12	0,138 \pm 0,029	0,320 \pm 0,020	0,044 \pm 0,012
Ps13	0,116 \pm 0,005	0,249 \pm 0,009	0,066 \pm 0,010
CHA0	0,209 \pm 0,033	0,286 \pm 0,015	0,305 \pm 0,002
0,8M			
Ps7	0,070 \pm 0,005	0,127 \pm 0,006	0,032 \pm 0,016
Ps8	0,078 \pm 0,012	0,107 \pm 0,020	0,063 \pm 0,008
Ps10	0,063 \pm 0,004	0,110 \pm 0,027	0,113 \pm 0,004
Ps12	0,070 \pm 0,018	0,175 \pm 0,011	0,035 \pm 0,016
Ps13	0,064 \pm 0,005	0,173 \pm 0,022	0,038 \pm 0,009
CHA0	0,045 \pm 0,007	0,159 \pm 0,009	0,247 \pm 0,026
1M			
Ps7	0,020 \pm 0,020	0,049 \pm 0,010	0,040 \pm 0,018
Ps8	0,018 \pm 0,004	0,091 \pm 0,003	0,065 \pm 0,016
Ps10	0,028 \pm 0,008	0,094 \pm 0,008	0,103 \pm 0,012
Ps12	0,013 \pm 0,002	0,158 \pm 0,007	0,273 \pm 0,011
Ps13	0,019 \pm 0,012	0,118 \pm 0,026	0,063 \pm 0,005
CHA0	0,010 \pm 0,004	0,127 \pm 0,009	0,140 \pm 0,012

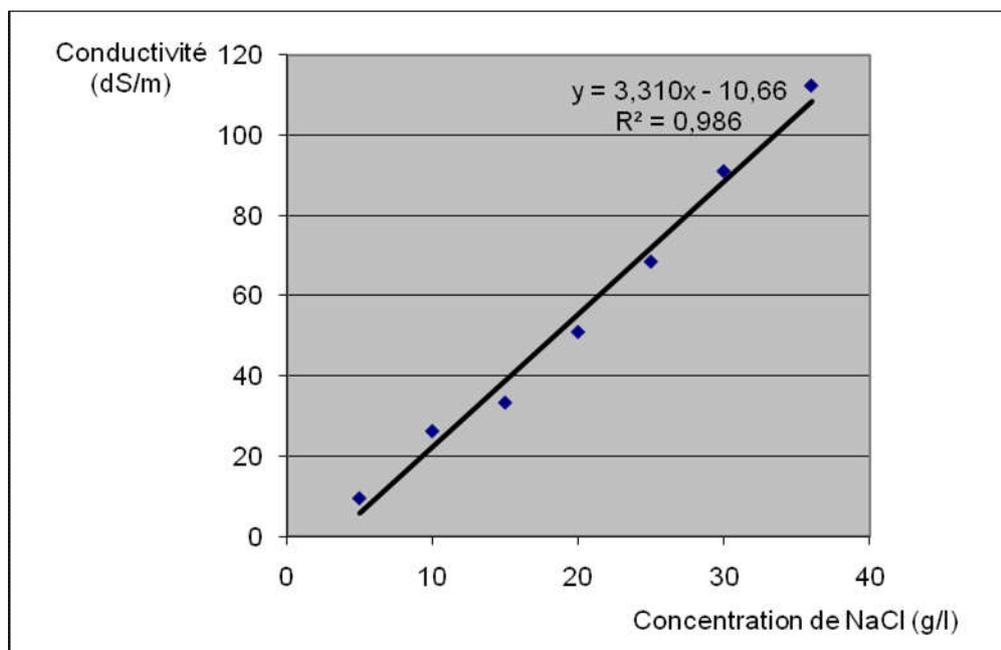
Annexe 12

Normes de la salinité en milliSiemens/cm selon la FAO (1984)

Conductivité électrique à 25°C : (CE)	Types du sol
CE= 4	Sols légèrement salins
4<CE< 8	Sols modérément salins
8<CE< 10	Sols salins
CE >10	Sols à salinité très élevée

Annexe 13

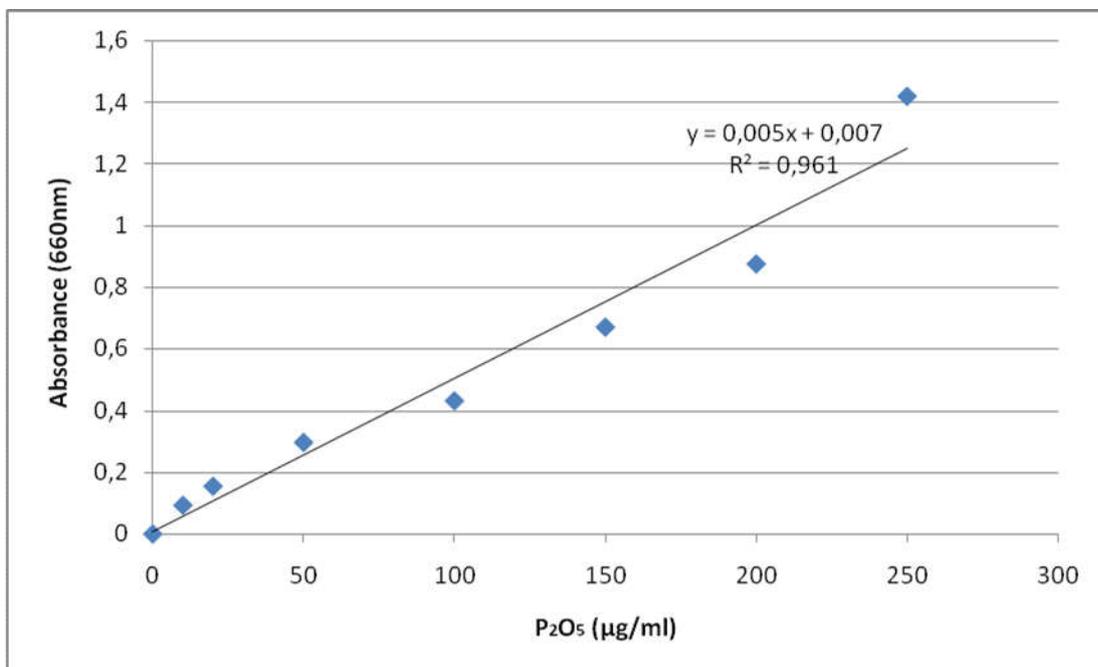
Mesure de la conductivité électrique du sol.



Annexe 14

La courbe d'étalonnage de P_2O_5

0,34g de KH_2PO_4 est dissout dans 250ml d'eau distillée. Cette solution contient 709,8 μg de P_2O_5/ml . Les dilutions (1,2- 1,5- 2-3-6- 15-30) de la solution standard du phosphore sont préparées dans des fioles de 25ml. 5ml de fluorure d'ammonium (NH_4F) + 5ml de molybdate d'ammonium [$(NH_4)_6 MoO_{24} \cdot 4H_2O$] + 1ml de chlorure d'étain ($SnCl_2$) (1/33) sont ajoutés à 9ml de chaque dilution. Le volume total est complété à 25ml avec de l'eau distillée. Après 5min, la concentration de P_2O_5 est mesurée par spectrophotométrie à 660nm.



Annexe 15

La courbe d'étalonnage de l'AIA

A partir d'une solution de l'AIA ($10^{-3}M$), les dilutions 2- 3- 4- 5- 10- 15- 20- 50-100 sont effectuées . 1ml de chaque dilution préparée est mélangé à 2 ml de réactif de Salkowski.

Après 30 min, la concentration de l'AIA est mesurée par spectrophotométrie à 530nm.

