

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2019

THÈSE

Présentée par

RABHI Nour El Houda

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

**Effet phytobénéfique de *Pseudomonas knackmussii* MLR6 isolée
d'une halophyte *Salsola tetrandra* sur l'amélioration de
l'halotolérance de *Arabidopsis thaliana* et du blé dur**

Soutenue publiquement le/...../2019

DEVANT LE JURY

Président	ROUAG Nouredine	MCA UFA Sétif 1
Directeur	SILINI Allaoua	MCA UFA Sétif 1
Examineurs	HAMIDECHI M^d Abdelhafid	Pr UM Constantine 1
	KITOUNI Mahmoud	Pr UM Constantine 1
	BOUBENDIR Abdelhafid	MCA CU Mila

Laboratoire de Microbiologie appliquée

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2019

THÈSE

Présentée par

RABHI Nour El Houda

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

**Effet phytobénéfique de *Pseudomonas knackmussii* MLR6 isolée
d'une halophyte *Salsola tetrandra* sur l'amélioration de
l'halotolérance de *Arabidopsis thaliana* et du blé dur**

Soutenue publiquement le/...../2019

DEVANT LE JURY

Président	ROUAG Nouredine	MCA UFA Sétif 1
Directeur	SILINI Allaoua	MCA UFA Sétif 1
Examineurs	HAMIDECHI M^d Abdelhafid	Pr UM Constantine 1
	KITOUNI Mahmoud	Pr UM Constantine 1
	BOUBENDIR Abdelhafid	MCA CU Mila

Laboratoire de Microbiologie appliquée

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, Université Ferhat Abbas – Setif1, au Laboratoire des Microorganismes et Molécules Bioactives(LMBA), Université El Manar, Tunis et au Laboratoire de Stress Défense et Reproduction des Plantes (SDRP), Université de Champagne Ardenne dans le cadre d'une bourse PROFAS B+.

*J'exprime toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur **Allaoua SILINI** qui m'a orienté tout au long de cette thèse et pour l'ensemble du savoir pratique et théorique qu'il m'a transmis. Sa disponibilité, ses qualités humaines, et la qualité de son encadrement scientifique ont permis que cette thèse se passe dans de bonnes conditions.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à mon co-encadreur Madame **Hafsa CHERIF SILINI** qui a assuré le suivi scientifique de cette thèse et qui m'a fait partager ses connaissances et son expérience. Je la remercie pour sa grande disponibilité, sa gentillesse et pour tous ses conseils qui ont enrichi considérablement ce travail*

*Je tiens à remercier Monsieur **ROUAG Noureddine** pour l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération. Je remercie également Monsieur **BOUBENDIR Abdelhafid** d'avoir bien voulu être examinateur de ce travail, ainsi que Messieurs **HAMIDECHI M^d Abdelhafid** et **KITOUNI Mahmoud** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je suis très reconnaissante à Monsieur **Christophe CLEMENT** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de SDRP (Stress Défense et Reproduction des Plantes) ainsi que Monsieur **Essaid AIT BARKA** pour la bienveillante attention et pour sa qualité humaine. Je les remercie très sincèrement*

*Je remercie particulièrement Madame **Lisa SANCHEZ** qui a plus précisément suivi une partie de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de mes reconnaissances pour le temps et l'aide précieux qu'elle m'a accordé avec beaucoup d'enthousiasme et pour sa grande disponibilité et ses compétences.*

*Je tiens à remercier également Monsieur **BOUDEBOUS** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire LMBA (Laboratoire des Microorganismes et Molécules Bioactives) ainsi que Madame **Iman OUZARI** pour l'accomplissement de la partie Biologie moléculaire.*

*Je remercie Mesieurs **Charafeddine MOFEK** et **Abdelmalek LEKIRED**, qui ont généreusement accepté de m'aider dans la réalisation des analyses statistiques.*

Pour finir, je remercie ma famille, qui m'a toujours aidée et soutenue. Plus particulièrement mon mari, mes sœurs, mon frère et son épouse.

Et surtout, je voudrais adresser plus qu'un grand merci à mes Parents pour leur soutien non seulement tout au long de la thèse mais aussi depuis de nombreuses années. Je leur dédie ce travail.

Production scientifique

Publications :

Rabhi N.E.H., A. Silini¹, H. Cherif-Silini, B. Yahiaoui, A. Lekired, M. Robineau, Q. Esmaeel, C. Jacquard, N. Vaillant-Gaveau, C. Clement, E. Ait Barka and L. Sanchez. 2018. *Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. J. Applied Microbiol. **125** :1836- 1851. doi : doi.org/10.1111/jam.14082

Communications nationales :

Rabhi, N.E.H., F. Arif, A. Silini, et M. Ghou. 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. Ghou. 2013. Use of halotolerant *Pseudomonas spp.* producing bioactive molecules as biocontrol agent. 1^{er} séminaire national sur la biotechnologie des molécules bioactives en pathologies cellulaires. Batna, Algérie. 25-27 Oct.

Rabhi, N.E.H., F. Arif et M. Ghou. 2013. Antifungal activity of halotolerant *Pseudomonas spp.* strains isolated from salt affected rhizospheric soil. 1^{er} séminaire national sur les Etats des lieux, conservations et possibilités de valorisation des ressources biologiques dans l'Est algérien. Mila, Algérie. 11-12 Mar.

Rabhi, N.E.H., A. Silini H. Cherif et B. yahiaoui. 2015. Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la croissance et les activités PGPR des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents isolées d'un sol salé. 21^{ème} journées nationales de microbiologie. Bechar, Algérie. 8-9 Nov.

Communications internationales :

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

Arif, F., **N.E.H. Rabhi.**, et M. Ghou. 2011. Activités PGPR de *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Réponse au stress osmotique et aux osmoprotecteurs synthétique. Les Journées Internationales de Biotechnologie de l'Association Tunisienne de Biotechnologie. Sousse, Tunisie. 19-22 Déc.

Rabhi, N.E.H., F. Arif et M. Ghou. 2012. *Pseudomonas sp.* strain isolated from saline soil showing indole-3acetic acide production under saline condition. 3rd International Wokshope On Industial Biotechnology (IWIB). Sfax, Tunisie. 23- 24 Avr.

Arif, F., **N.E.H. Rabhi.**, H. Cherif et M. Ghou. 2012. Solubilisation des phosphates par les *Pseudomonas spp.* fluorescents isolées de la rhizosphère du blé. Effet de sel et

d'osmoprotecteurs. XVIII^{èmes} journées national de microbiologie. Tizi Ouzou, Algérie. 27 Nov.

Arif, F., **N.E.H. Rabhi.**, H. Cherif et M. Ghoul. 2013. Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* as biocontrol agents. 1^{er} congrès de biotechnologie et valorisation des bioressources (BVRB). Tabarka, Tunisie. 05-07 Mar.

Rabhi, N.E.H., F. Arif et M. Ghoul. 2013. Use of *Pseudomonas spp* strains producing siderophores as biopesticides and the halophyte *Atriplex halimus* as biofertilizer under saline conditions. 4th International Wokshope On Industial Biotechnology (IWIB). Tlemcen, Algeria. 10-11 Apr.

Arif, F., **N.E.H. Rabhi.**, H. Cherif et M. Ghoul. 2013. Characterization of fluoresens *Pseudomonad* isolated from wheat rhizospher as plant growth promoters. 4th International Wokshope On Industial Biotechnology (IWIB). Tlemcen, Algeria. 10-11 Apr.

Arif, F., **N.E.H. Rabhi.**, H. Cherif, Silini Allaoua, Habi Saleh et M. Ghoul. 2014. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 en tant que agent de biofertilisation et de biocontrôle. Halotolerance en présence et en absence de deux molécules osmoprotectrices. II^{ème} congrès international de biotechnologie et valorisation des bioressources (BVBR). Tabarka, Tunisie. 18-20 Mar.

Arif, F., **N.E.H. Rabhi.**, Silini Allaoua, Habi Saleh et M. Ghoul. 2014. Bioactive molecules produced by *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Effect of salt and synthetic osmoprotectants. 25^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'association tunisienne des sciences biologiques (ATSB). Hammamet, Tunisie. 24-27 Mar.

Rabhi, N.E.H., F. Arif, H. Cherif et M. Ghoul. 2014. Screening of efficient halotolerant phosphate solubilizing fluorescent *Pseudomonas* strains. 1^{er} colloque international de biotechnologie végétale et microbienne. Oran, Algérie. 2-3 Dec.

Rabhi, N.E.H., F. Arif, A. Silini H. Cherif et B. yahiaoui. 2015. Plant growth promoting activities of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from saline soil. III^{ème} congrès international de l'association tunisienne d'écologie microbienne (ATEM). Hammamet, Tunisie. 08-12 Mai.

Rabhi, N.E.H., A. Silini H. Cherif et B. yahiaoui. 2015. Diversity of rhizobacteria isolated from halophyte in three different sebkha soils. 1St international conference of microbial ecology. Sétif, Algeia. 12-14 Dec.

Rabhi, N.E.H., A. Silini¹, H. Cherif-Silini, B. Yahiaoui, A. Lekired, M. Robineau, Q. Esmaeel C. Jacquard, N. Vaillant-Gaveau, C. Clement, E. Ait Barka and L. Sanchez. 2018. *Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. 1^{er} symposium international sur les sciences et technologie de bioprotection des plantes. Reims, France. 27-30 Juin.

ملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة تأثير العزله MLR6 *Pseudomonas knackmussii* على تلقيح نبات *Arabidopsis thaliana* Col-0 و القمح الصلب في وسط مالح. عزلت هذه البكتيريا من جذور نبتة *Salsola tetrandra* التي جمعت من 7 سبخات من الجزائر. اظهر تعداد البكتيريا كثرتها داخل جذور النبتة مقارنة بسطح الجذور و التربة البعيدة عن النبتة. عزلت 76 بكتيريا منها 51 سلالة بكتيرية ذات غرام سالب ودرست قابليتها على تعزيز نمو النبات. كما كشفت تقنية دراسة التنوع الجيني polymorphism (ITS) Internal Transcribed Spacer عن وجود 17 نوعا مختلفا التي تم اختبارها لدراسة قدرتها على تحمل تراكيز عالية من NaCl و PEG₈₀₀₀ و pH وقد تبين ان معظمها متسامحة. كما اظهرت السلالات الخمس *Pseudomonas frederiksbergensis* SE1, *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia rettgeri* BR5 و *Providencia vermicola*, *Pseudomonas knackmussii* MLR6 قدره عاليه على تحليل الفوسفات، وإنتاج حاملة الحديد sidérophores و Acide indole acétique (IAA) في وجود تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0-0.3مول).

تلقيح *A.thaliana* بالسلالة MLR6 في وجود تركيز 0.2 مول من كلوريد الصوديوم حسن من سلوك الثغور ، معدل النتح ، محتوى الكلوروفيل والكاروتينات. كما ان استعمال السلالة MLR6 ادى الى زيادة المعالم المورفولوجيه للنبات في كل من غياب ووجود الملوحة و سمح كذلك بالمحافظة على غشاء الخلية عن طريق تقليل تسرب الشوارد في النباتات المجهدة. ومن جهة اخرى وجود البكتيريا سرع من تراكم ROS بعد تعرض النبتة القصير لـ كلوريد الصوديوم. زياده على ذلك ، التلقيح بالسلالة MLR6 زاد من معدل تعبير الجين At SOS1 وحافظ على تعبير كل من AtNHX1 و AtHKT1 At SOS2 و At SOS3 و At SAG و At PR1 إلى مستويات مماثلة للنباتات الغير معرضة للملوحة. يبدو أن استخدام السلالة البكتيرية MLR6 كلقاح يمثل استراتيجية واعدة لتحسين نمو النباتات في المناطق القاحلة.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا المعززة لنمو النبات. النباتات الملحية. التربة المالحة. القمح الصلب

Résumé

L'étude de l'inoculation par une rhizobactérie *Pseudomonas knackmussii* MLR6 isolée d'une plante halophyte sur la croissance végétale de *Arabidopsis thaliana* et du blé dur en milieu salin est menée. L'isolement des bactéries est réalisé à partir de la rhizosphère de la plante halophyte *Salsola tetrandra* collectée de sept Sebkhass en Algérie. Les numérations montrent une abondance des bactéries endophytes par rapport aux bactéries rhizosphériques et non-rhizosphériques. Les activités PGP sont étudiées sur les 76 isolats dont 51 à Gram négatif sont sélectionnés et appartiennent à 17 haplotypes différents, selon les analyses du polymorphisme des espaces inter géniques transcrits (ITS). Les effets du stress abiotique (salinité, pH et PEG₈₀₀₀) sur la croissance d'une souche à Gram négatif appartenant à chaque haplotype différent révèlent que la majorité des souches sont tolérantes. La solubilisation des phosphates et la production des sidérophores et de l'acide indole acétique (AIA), sous l'effet de concentrations de NaCl (0 et 0,3M), sont omniprésentes chez cinq (05) souches *Pseudomonas frederiksbergensis* SE1, *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia vermicola* ME1, *Providencia rettgeri* BR5 et *Pseudomonas knackmussi* MLR6. L'inoculation de *Arabidopsis thaliana* et du blé dur par *Pseudomonas knackmussii* MLR6, à des concentrations de 0,2M de NaCl, améliore les paramètres morphologiques et les pigments photosynthétiques. Elle stabilise la membrane cellulaire en réduisant la fuite d'électrolytes (EL%) chez *A. thaliana* stressée et accélère l'accumulation de ROS après une courte durée d'exposition au NaCl. En outre, MLR6 induit l'expression du gène AtSOS1 et maintient l'expression de AtNHX1, AtHKT1, AtSOS2 et AtSOS3 ainsi que AtSAG et AtPR1 à des niveaux similaires à ceux des plantes non stressées. L'utilisation de la souche MLR6 comme bioinoculant semble être une stratégie prometteuse pour améliorer la croissance des plantes glycophytes dans les zones arides.

Mots clés : PGP, halophytes, stress salin, *Pseudomonas knackmussii* MLR6, *Arabidopsis thaliana*, blé dur

Abstract

The impact of inoculation with rhizobacteria *Pseudomonas knackmussii* MLR6 isolated from a halophytic plant on plant growth of *Arabidopsis thaliana* and durum wheat under salt stress was studied. The isolation of the bacteria is carried out from the rhizosphere of the halophyte *Salsola tetrandra* collected from seven Sebkhass in Algeria. The bacteria numeration shows an abundance of endophytic bacteria compared to rhizospheric and non-rhizospheric bacteria. The PGP activities are studied on 76 isolates of which 51 were Gram-negative. From this later 17 different haplotypes were selected according to polymorphism analyzes of transcribed intergenic spaces (ITS). The effect of abiotic stress (salinity, pH, and aw) on the growth of a Gram - negative strains belonging to each different haplotype reveals that the majority of strains are tolerant. The solubilization of phosphates and the production of siderophores and indole acetic acid (AIA), under different NaCl concentrations (0 and 0.3M), are present in five (05) strains : *Pseudomonas frederiksbergensis* SE1, *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia vermicola* ME1, *Providencia rettgeri* BR5 and *Pseudomonas knackmussii* MLR6. Inoculation of *A. thaliana* and durum wheat with *P. knackmussii* MLR6, at 0.2M NaCl, improves morphological parameters and photosynthetic pigments. It stabilizes the cell membrane by reducing electrolyte leakage (EL%) in stressed *A. thaliana* and accelerates ROS accumulation after a short exposure to NaCl. In addition, MLR6 induces the expression of AtSOS1 gene and maintains the expression of AtNHX1, AtHKT1, AtSOS2 and AtSOS3 as well as AtSAG and AtPR1 at levels similar to those of the unstressed plants. The use of MLR6 strain as a bioinoculant appears to be a promising strategy for improving the growth of glycophyte plants in arid areas.

Key words: PGP, halophytes, salt stress, *Pseudomonas knackmussii* MLR6 *Arabidopsis thaliana*, durum wheat,

Liste des principales abréviations et acronyme

- ABA** : Acide abscisique
- ACC** : Amino-cyclopropane-1-carboxylate désaminase
- ACP** : Analyse en composantes principales
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AG** : Acide gibbérellique
- AIA** : Acide indole acétique
- AJ** : Acide jasmonique
- APX** : Ascorbate peroxidase
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique
- BET** : Bromure d'éthidium
- BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool
- CAT** : Catalase
- Cart** : Caroténoïdes
- C_E** : Conductivité électrique
- Chl *a*** : Chlorophylle *a*
- Chl *b*** : Chlorophylle *b*
- Ci** : Carbone inorganique
- CK** : Cytokinine
- DAB** : Iaminobenzidine
- DO** : Densité optique
- dS** : DéciSiemens
- EDTA** : Acide éthylène-diamine-tétraacétique
- EL** : Fuite d'électrolyte
- EPS** : Exopolysaccharides
- ET** : Ethylène
- ETRI** : Taux de transport des électrons du photosystème I
- ETRII** : Taux de transport des électrons du photosystème II
- Fv/Fm** : Rendement quantique maximal du PS II (à l'obscurité)
- ITS** : Espaces inter géniques transcrits
- mM** : milliMolaire
- NBT** : Nitro blue tetrazolium

P: Phosphore

PAM : « Puls Amplitude Modulated »

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Polyéthylèneglycol

PGPR: Plant Growth Promiting Rhizaobacteria

POX : Ascorbates peroxydases

QNP : Quenching non-photochimique

ROS : Reactive Oxygen Species

rpm: Rotation par minute

SA : Acide salicylique

SOD : Superoxyde dismutase

TE : Tris-EDTA

UV : Ultraviolet

Y(NPQ) : Dissipation d'énergie sous forme non photochimique régulée du PSI

ΦPS I : Rendement quantique du Photosystème I

ΦPS II : Rendement quantique du Photosystème II

Liste des figures

- Fig. 1 : Structure racinaire au niveau de la rhizosphère.**
- Fig. 2 : PGPR regroupées selon leur classification phylogénétique.**
- Fig. 3: Phytohormones produits par les PGPR aidant les plantes à tolérer au stress abiotique.**
- Fig. 4: Mode d'action de l'ACC deaminase.**
- Fig. 5: Mécanismes d'halotolérance des plantes induits par les PGPR.**
- Fig. 6: Mécanismes d'halotolérance des PGPR aidant les plantes à tolérées le stress salin.**
- Fig. 7: Différents mécanismes de promotion de la croissance végétale.**
- Fig. 8 : Localisation géographique des sites de prélèvement.**
- Fig. 9 : Site d'échantillonnage à sebkhet Soukhna.**
- Fig. 10: Site d'échantillonnage à Chott Ech Chergui et Sebkha d'Oran.**
- Fig. 11: Fréquences des isolats producteurs de diverses activités PGP.**
- Fig. 12 : Diagram de Venn des activités PGP des isolats.**
- Fig. 13: Taux des isolats producteurs de l'AIA selon le compartiment d'isolement.**
- Fig. 14: Production de l'AIA par quelques isolats.**
- Fig.15: Taux des isolats solubilisateurs de phosphate selon le compartiment d'isolement.**
- Fig. 16: Halo autour des colonies solubilisatrices du phosphate.**
- Fig.17: Taux des isolats producteurs de sidérophore selon le compartiment d'isolement.**
- Fig. 18: Halo orange autour des colonies productrices de sidérophores.**
- Fig .19: Fréquence des isolats producteurs des enzymes extracellulaires, de HCN et de NH₃ .**
- Fig 20: Exemple de quelques isolats producteurs de NH₃**
- Fig. 21: Activité cyanogène.**
- Fig. 22 : Activité chitinolytique.**

Fig. 23: Activité protéolytique.

Fig. 24: Activité antifongique des isolats (%) contre des champignons phytopathogènes.

Fig. 25 : Représentation schématique de l'opéron ribosomal d'ADNr des procaryotes.

Fig. 26: Exemple d'analyse en gel d'électrophorèse obtenu après amplification des fragments ITS par PCR à partir d'ADN extrait de souches bactériennes à Gram négatif.

Fig. 27: Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S des isolats.

Fig. 28 : ACP des activités PGP et du stress appliqué.

Fig. 29 : ACP de l'effet du stress sur les activités PGP des souches.

Fig. 30 : Production de l'AIA en présence de 0,3M NaCl par trois souches représentatives (BR5, ME1, MLR6).

Fig. 31 : Production de sidérophores en présence de 0,3M NaCl par trois souches représentatives (SE1, BR5, MLR6 et ME1).

Fig. 32 : Solubilisation du phosphate en présence de 0,3M NaCl par les souches SE1, BR5, MLR6 et ME1.

Fig. 33: ACP de l'effet de NaCl sur les activités PGP des souches sélectionnées.

Fig. 34 : Localisation géographique du lieu de prélèvement. Chott Melghir, El Oued

Fig. 35 : Effet de NaCl, PEG₈₀₀₀ et pH sur la croissance de MLR6

Fig. 36 : Activité chitinolytique de MLR6.

Fig. 37 : Effet inhibiteur (%) de MLR6 sur la croissance des champignons phytopathogènes.

Fig. 38: Colonisation racinaire de *A. thaliana* par la souche MLR 6 marquée à la GFP.

Fig. 39: Effet de MLR6 et du stress salin (NaCl 0,2 M) sur la hauteur, le poids sec et frais de *A. thaliana*.

Fig. 40: Phénotype des plantes de *A. thaliana* inoculées ou non par MLR6 en absence et en présence de 0,2M NaCl.

Fig. 41: Effet de MLR6 sur la biomasse de la plante en présence et en absence de NaCl (0,2M).

Fig. 42: Effet de MLR6 et du stress salin (0,2M NaCl) sur la chlorophylle a, la chlorophylle b, la chlorophylle totale et les caroténoïdes de *A. thaliana*.

Fig. 43: Effet MLR6 et du stress salin (0.2M NaCl) sur le taux de photosynthèse, la conductance stomatique, le taux de transpiration et le CO₂ intercellulaire, deux semaines après le 3^{ème} stress.

Fig. 44: Effet de MLR6 et du stress salin (0,2M NaCl) sur Φ PSI, ETR I, Φ PSII, ETR II, Fv / Fm et Y (NPQ) chez *A. thaliana* 24h après le 1^{er} stress.

Fig. 45: Effet de MLR6 et du stress salin (0.2M NaCl) sur Φ PSI, ETR I, Φ PSII, ETR II, Fv / Fm et Y (NPQ) chez *A. thaliana* deux semaines après le 3^{ème} stress.

Fig. 46: Colonies bactérienne après étalement sur milieu LB au cloramphénicol (25 μ g/ml).

Fig. 47 : Exemple de purification d'une colonie verte représentant la souche MLR6 marquée à la GFP.

Fig. 48: Production d'H₂O₂ (A) et O₂⁻ (B) sur les feuilles de *A. thaliana* après 24h du stress salin.

Fig. 49 : Fuite d'électrolytes dans les feuilles de *A. thaliana* traitée ou non avec MLR6 et de NaCl (0,2 M).

Fig. 50 : Dispositif expérimental des essais d'inoculation de blé par MLR6 en présence et en absence de 0,2M de NaCl.

Fig. 51 : Effet de MLR6 et de stress salin (0,2M NaCl) sur la longueur racinaire et sur la hauteur de blé.

Fig. 52 : Effet de MLR6 et du stress salin (NaCl 0,2 M) sur la hauteur, poids frais et sec de la partie foliaire du blé dur.

Fig. 53 : Effet de MLR6 et du stress salin (NaCl 0,2 M) sur la longueur, poids sec et frais des racines du blé dur.

Fig. 54: Effet de MLR6 et du stress salin (0,2M NaCl) sur la chlorophylle a, la chlorophylle b, la chlorophylle totale et les caroténoïdes des feuilles de blé dur.

Fig. 55 : Expression des gènes liés au stress dans les feuilles de *A. thaliana* inoculée ou non par MLR6 en absence et en présence de stress salin (0,2M NaCl).

Liste des tableaux

Tab. 1: Conductivité éclectique, pH des sebkhas et nummération des bactéries endophytes, rhizo et non rhizosphériques.

Tab. 2: Composition de Mix de PCR-ITS.

Tab.3: Composition de mix de PCR-16S.

Tab.4 : Affiliation taxonomique des 17 haplotypes identifiés.

Tab. 5: Effet de NaCl, PEG₈₀₀₀ et pH sur la croissance des souches bactériennes.

Tab. 6: Production de l'AIA, de sidérophores et la solubilisation du phosphate par les souches sélectionnées sous stress salin.

Tab. 7: analyse de la variance de l'effet de NaCl sur la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA et de sidérophores.

Tab. 8: Caractéristiques de la variété WAHA.

Tab. 9: Fixation de N₂ et production des biomolécules actives par MLR6.

Tab. 10 : Activités PGP de MLR6 sous stress salin

Tab. 11: Composition de Mix de RT.

Tab. 12: Composition de Mix de la PCR.

Tab. 13: Composition de Mix de qPCR.

Tab. 14: Gènes analysés par la qRT-PCR.

Table de matière

Remerciements.....	i
Production scientifique.....	ii
ملخص.....	iv
Résumé.....	v
Abstract.....	vi
Liste des principales abréviations.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	Xiii
Introduction.....	1
<i>Chapitre I : Revue bibliographique</i>	
I- Salinité.....	4
II- Effet de la salinité sur la croissance et le développement végétal.....	5
III- Halophytes et leur mécanisme d'halotolérance.....	6
IV- Rhizosphère.....	7
IV-1- Nature des Rhizodépôts et leur rôle dans la rhizosphère.....	8
V- Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).....	11
V-1- PGPR tolérantes au sel associées aux halophytes.....	13
V-2- Diversité des rhizobactéries tolérantes au sel.....	13
V-3- Mécanismes des PGPR à améliorer la croissance végétale sous stress salin.....	14
V-3-1-Mécanismes directs.....	14
a- Fixation d'azote.....	14
b- Solubilisation du Phosphate.....	15
c- Production de sidérophores.....	15
d- Production des phytohormones.....	16
➤ Acide indole acétique.....	16
➤ Cytokinines.....	17
➤ Gibbérellines.....	17
➤ Acide abscisique.....	17
e- Acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC- désaminase). 19	
V-3-2- Mécanismes indirects.....	20
a- Production des enzymes lytiques.....	20

b- Production des VOCs.....	20
c- Antibioses	21
d- Résistance systémique induite (ISR).....	21
e- Induction de la tolérance systémique induite (TSI)	22
VI- Mécanismes d'halotolérance des rhizobactéries	24
VI-1- Accumulation des osmolytes	24
VI-2- Production des exopolysaccharides (EPS)	25
VI-3- Détoxification des ROS	25
VII- Utilisation des PGPR dans l'agriculture.....	27
VII-1- Biofertilisation	27
VII-2- Phytoremédiation.....	28
VII-3- Bioprotection.....	28

Chapitre II : Isolement des bactéries cultivables et caractérisation de leurs activités promotrices de la croissance végétale

I- Matériel et méthodes.....	29
I-1- Prélèvement des échantillons de sols	29
I-2- Description des sites d'étude	30
I-3- Mesure du pH et de la conductivité électrique (C _E).....	35
I-4- Isolement des bactéries cultivables.....	35
I-5- Conservation des bactéries isolées	36
I-6- Activités promotrices de la croissance végétale.....	36
a- Production de l'acide indole acétique (AIA).....	36
b- Solubilisation du phosphate.....	36
c- Production de sidérophores	37
d- Production de NH ₃	37
e- Production de cyanure d'hydrogène (HCN)	37
f- Fixation d'azote	37
g- Production de cellulases.....	38
h- Production de chitinase.....	38
i- Production de protéase	38
j- Activité antifongique	38
I-7- Analyses statistiques	39
II- Résultats.....	39

II-1- Paramètres physicochimique des échantillons	39
II-2- Dénombrement, isolement et sélection des bactéries	39
II-3-Relation entre la salinité et la population bactérienne.....	40
II-4- Activités PGP des isolats.....	40
III- Discussion.....	49

Chapitre III : Etude de la diversité génétique des bactéries isolées

I- Matériel et méthodes.....	51
I-1- Extraction de l'ADN bactérien des isolats à Gram négatif	51
I-2- Dosage de l'ADN	51
I-3- PCR/ITS.....	51
I-4- Electrophorèse sur gel d'agarose.....	53
I-5- Analyse du gel.....	53
I-6- Identification moléculaire	53
a- PCR-16S	53
b- Séquençage de l'ADN 16S.....	54
c- Arbre phylogénétique	55
II- Résultats.....	55
II-1- Identification des souches et les analyses phylogénétiques	55
III- Discussion.....	58

Chapitre IV : Effet du stress salin sur la croissance et les traits PGPR des souches sélectionnées

I- Matériel et méthodes.....	61
I-1- Tolérance au NaCl au PEG₈₀₀₀ et au pH.....	61
I-2- Effet du NaCl sur les traits PGPR.....	61
a- Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate en milieu liquide	61
b- Effet du NaCl sur la production des siderophores en milieu liquide.....	62
c- Effet du NaCl sur la production de l'AIA.....	62
I-3- Analyses multivariées	62
II- Résultats.....	63
II-1- Effet de NaCl, PEG₈₀₀₀ et de pH sur la croissance bactérienne	63
II-2- ACP de l'effet de stress sur les souches sélectionnées.....	64

II-3- Effet du NaCl sur les activités promotrices de la croissance végétale.....	66
II-4- ACP de l'effet du NaCl sur les activités PGPR des souches retenues.....	70
III- Discussion.....	71
<i>Chapitre V : Effet de Pseudomonas knackmussii MLR6 sur l'amélioration de l'halotolérance de Arabidopsis thaliana et de blé dur (WAHA)</i>	
I- Matériel et méthodes.....	72
I-1- Matériel végétal.....	72
a- <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
b- Blé dur.....	72
I-2- Souche bactérienne.....	72
I-3- Vecteur.....	75
a- Plasmide pIN 301.....	75
I-4- Activités PGP de la souche MLR6.....	75
I-5- Préparation de bactéries électrocompétentes.....	75
I-6- Transformation de la bactérie par électroporation.....	75
I-7- Préparation de l'inoculum bactérien.....	76
I-8- Stérilisation des semis et test de colonisation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> avec MLR6 marqué.....	76
I-9- Inoculation des plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
I-10- Mesure de la teneur en chlorophylle.....	77
I-11-Paramètres photosynthétiques.....	78
I-12-Échanges gazeux.....	78
I-13-Persistance de la souche bactérienne et colonisation endophytique.....	78
I-14-Détection de H ₂ O ₂ et les radicaux O ₂ ⁻	79
I-15-Mesure de la fuite d'électrolytes (EL%).....	79
I-16-Stérilisation et inoculation des graines de blé dur Waha.....	79
I-17-Effet de <i>P. knackmussi</i> MLR6 sur la promotion de la croissance de blé dur.....	80
a- Analyse des paramètres morphologiques.....	80
b- Dosage de la chlorophylle.....	80
I-18-Analyses statistiques.....	81
II- Résultats.....	81
II-1- Isolement et identification moléculaire.....	81
II-2- Propriétés physiologiques et PGPR.....	81
II-3- Colonisation racinaire.....	84

II-4- Paramètres morphologiques	85
II-5- Teneur en chlorophylle	88
II-6- Échanges gazeux	90
II-7- Paramètres photosynthétiques	92
II-8- Persistance de MLR6	95
II-9- Production de ROS	96
II-10-Fuite d'électrolytes	97
II-11-Effet de MLR6 sur les paramètres morphologiques de blé	98
II-12-Effet de MLR6 sur la chlorophylle des feuilles du blé	102
III- Discussion	104

Chapitre VI : Analyse de l'expression des gènes liés au stress salin chez A. thaliana suite à son inoculation par la souche MLR6

I- Matériel et méthodes	108
I-1- Extraction de l'ARN, synthèse de l'ADNc et RT-PCR	108
I-2- Electrophorèse sur gel d'agarose	110
I-3- qRT-PCR	110
I-4- Analyses statistiques	111
II- Résultats	111
II-1- Expression des gènes liés au stress	111
III-Discussion	114
Conclusion	116
Références bibliographiques	118
Annexes	136

Introduction

En raison de leur nature mystérieuse, les plantes doivent s'adapter pour survivre. Dans plusieurs régions du monde, le stress salin, en particulier, constitue une menace pour l'agriculture depuis plus de 3000 ans (Flowers, 2006). La salinisation du sol est un facteur abiotique majeur affectant la croissance et la productivité des cultures dans le monde (Shrivastava et Kumar, 2015). Elle est principalement due aux mauvaises pratiques de l'irrigation en plus des processus naturels (Vaishnav *et al.*, 2016). Dans le monde, environ 20% des terres cultivables et 33% des terres agricoles irriguées sont affectées par la salinité. Cette salinisation augmente de 10% chaque année et elle devrait dépasser 50% des terres agricoles d'ici 2050 (Shrivastava et Kumar, 2015). En Algérie, près de 10 à 15 % des terres irriguées en sont affectées, occupant 3.2 millions d'hectares de la superficie totale, localisées aussi bien au Nord qu'au Sud du pays (Silini, 2016).

Le stress osmotique entraîne un déséquilibre nutritionnel, des dommages morphologiques et une photosynthèse réduite. Ceci conduit à une diminution de la croissance, de la productivité et par conséquent à la mort cellulaire (Panwar *et al.*, 2016). Comme beaucoup d'autres stress abiotiques, le stress salin limite la croissance des plantes en augmentant le potentiel osmotique du sol et en diminuant l'absorption d'eau par les racines. Les concentrations élevées du sel perturbent l'homéostasie du potentiel hydrique et la distribution des ions au niveau cellulaire et dans la plante entière. Pour faire face à ces contraintes, il existe deux principales stratégies que les plantes utilisent soit la compartimentation des ions toxiques (Na^+ et Cl^-) absorbées au sein de la vacuole et /ou leur exclusion hors de la cellule (Apse et Blumwald 2007).

Un autre mécanisme adopté par les plantes afin d'atténuer le stress salin est lié aux effets bénéfiques des microorganismes associées à la rhizosphère (Sgroy *et al.*, 2009 ; Szymanska *et al.*, 2016b).

L'utilisation des micro-organismes bénéfiques comme les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria PGPR) est utile pour stimuler et améliorer la durabilité de l'agriculture et de l'environnement. Les fonctions physiologiques perturbées des plantes affectées par le sel peuvent être réorganisées par les PGPR. Ces dernières peuvent favoriser la croissance des plantes par des mécanismes directs et indirects. Les mécanismes directs comprenant la production de phytohormones (telles que auxines, cytokinines, éthylènes et gibbérellines), la fixation de l'azote, la mobilisation des nutriments et la production de sidérophores (Hayat *et al.*, 2010). De manière indirecte, les PGPR empêchent

ou réduisent les effets négatifs des pathogènes sur les plantes en produisant des substances inhibitrices. Les PGPR induisent, aussi, une tolérance au stress salin par la modulation des processus physiologique et biochimique et l'induction d'une résistance systémique (Ilangumaran et Smith, 2017). L'inoculation de semences de diverses plantes cultivées, comme la tomate, le poivron, le canola, le haricot et la laitue avec des PGPR améliore la croissance des racines et des bourgeons. Elle augmente, aussi, le rendement des fruits et l'halotolérance des plantes (Egamberdieva et Lugtenberg, 2014). Cependant, pour une application réussie des PGPR dans les régions salines, les inoculants devraient être indigènes isolés des sols affectés par le sel.

Les halophytes, qui représentent environ 1% de la flore mondiale, survivent naturellement pour se reproduire dans un sol salin. Ces plantes ont développé divers mécanismes pour faire face à la salinité du sol tels l'ajustement osmotique, la régulation de l'absorption et le transport des ions (Flowers et Colmer, 2008 ; Wang *et al.*, 2015).

Les plantes appartenant au genre *Salsola* (famille: Chénopodiaceae) sont communes dans les régions arides et semi-arides (Hamed *et al.*, 2011). Il y'a plus de 100 espèces de *Salsola* distribuées dans les régions les plus sèches d'Asie, d'Europe et d'Afrique (Beyaoui *et al.*, 2012). Les micro-organismes présents dans la zone saline ou dans la rhizosphère des plantes halophytes peuvent constituer une ressource précieuse pour améliorer la tolérance des cultures à la salinité (Vaishnav *et al.*, 2016).

Des informations précieuses sur l'interaction bactéries-plantes ont été obtenues de diverses études. Cependant, seulement quelques rapports ont étudié l'effet promoteur des PGPR isolées des halophytes sur l'amélioration de la croissance des plantes glycophytes sous stress salin. Ce constat nous a amené à vérifier l'hypothèse suivante : les souches bactériennes isolées des halophytes peuvent-elles jouer le rôle de PGPR sur des plantes glycophytes ?

La présente étude se fixe comme objectif, d'évaluer, d'une part, l'impact de l'inoculation par une PGPR halotolérante *Pseudomonas knackmussii* MLR6, isolée de la rhizosphère d'une plante halophyte *Salsola tetrandra*, sur la croissance de *Arabidopsis thaliana* sous stress salin par l'évaluation des mécanismes photosynthétiques, des échanges gazeux, des teneurs en pigments et par l'étude de l'expression des gènes liés au stress chez *A. thaliana*. D'autre part, l'efficacité de MLR6 sur les paramètres morphologiques de croissance et sur la teneur des pigments chlorophylliens du blé dur dans les conditions salines sera, aussi, analysée.

Pour atteindre cet objectif final, nous avons au préalable:

- Sélectionné les meilleures souches bactériennes sur la base de leur performance en activités PGP à partir d'une collection des bactéries endophytes, rhizosphériques et non-rhizosphériques de l'halophyte *Salsola tetrandra*.
- Caractérisé la structure de la communauté bactérienne à Gram négatif par des analyses du polymorphisme des espaces inter géniques transcrits (ITS)
- Identifié la position taxonomique des différentes souches *via* l'analyse du gène ribosomal ADNr 16S.
- Evalué la tolérance et le potentiel PGP des bactéries à Gram négatif afin de sélectionner la souche la plus résistante et la plus performante aux effets des stress abiotiques.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I- Salinité

La salinité est l'un des principaux facteurs de stress abiotiques limitant la croissance et le développement des plantes (Pitman et Lauchli, 2004). La salinisation du sol est due aux activités naturelles ou humaines induisant l'augmentation de la concentration des sels dissous dans le sol, principalement le chlorure de sodium. La salinisation primaire est causée par des processus naturels conduisant à une accumulation des sels solubles dans le sol et les eaux souterraines. Ces sels sont libérés suite à une altération de certaines roches sédimentaires, volcaniques et hydrothermales (Loyer, 1991). Ils peuvent aussi être libérés des accumulations salines anciennes (Munns, 2009). Les sels libérés sont transportés par des eaux souterraines qui s'accumulent à la surface des zones basses où le taux d'évapotranspiration est élevé (Pitmani et Lauchli, 2004). En revanche, la salinisation secondaire est le résultat d'accumulation des sels apportés par l'eau supplémentaire induite par des activités humaines. Les opérations de culture telle l'irrigation et le drainage inadéquats sont les raisons principales. L'irrigation des terres cultivées conduit à la salinisation de beaucoup de sols, en particulier ceux des régions arides et semi-arides (Munns, 2009). Les quantités d'eau apportées au fil du temps entraînent un dépôt cumulé de sel dans les sols (Ghassemi *et al.*, 1995). Les sels se déposent dans la couche arable lorsque l'eau s'évapore, et forment même des brûlures de sol. La faible porosité du sol argileux agit comme une couche imperméable en provoquant le drainage inadéquat (Nassar et Horton, 1999). En effet, le sol argileux (à texture fine) est moins perméable que le limon (à texture moyenne) et le sol sableux (à texture grossière). Il a une capacité de rétention élevée avec un faible taux d'infiltration. Dans ces sols argileux l'eau peut être donc stockée et les sels se transmettront lentement vers la zone racinaire. La salinisation secondaire peut être aussi induite par l'élévation de la nappe phréatique (Loyer, 1991). À mesure que la nappe phréatique s'élève, elle mobilise les sels provenant des roches souterraines près de la zone racinaire pour s'accumuler et causer un stress salin aux plantes.

II- Effet de la salinité sur la croissance et le développement végétal

La salinité affecte la croissance et le rendement des plantes. Les cultures telles les céréales, les fourrages et les horticoles sont sensibles aux concentrations élevées des sels dissous dans l'eau d'irrigation ou présents dans le sol. El-Fouly *et al.* (2001) ont constaté que le poids sec de différents organes végétaux est réduit suite à l'augmentation du niveau de NaCl. Au début du stress salin, les principaux processus végétaux tels que la photosynthèse, le métabolisme lipidique et protéique sont affectés (Parida et Das, 2005).

La capacité photosynthétique diminue en raison du stress osmotique entraînant une fermeture partielle des stomates (Meloni *et al.* 2003). Les plantes peuvent également souffrir d'une déstabilisation membranaire et d'un déséquilibre nutritionnel en réponse à l'augmentation de l'absorption des ions Na^+ ou à une diminution de l'absorption des ions de Ca^{2+} et K^+ (Hasegawa *et al.*, 2000). Un excès de Na^+ et surtout de Cl^- peut affecter les enzymes végétales et provoquer un gonflement cellulaire ce qui entraîne une réduction de la production d'énergie. En cas de concentrations excessives de Na^+ et Cl^- dans la rhizosphère, des interactions compétitives avec d'autres ions nutritifs (K^+ , NO_3^- et H_2PO_4^-) s'établissent avec les protéines de transport au niveau des racines (Tester et Davenport 2003). Une fois que la capacité des cellules est épuisée, les sels s'accumulent dans l'espace intercellulaire en menant à la déshydratation et la mort cellulaire (White et Broadley 2001). En conditions salines, la forte pression osmotique dans la rhizosphère dépasse celle dans les cellules racinaires influençant l'absorption de l'eau et les nutriments. Les plantes avec un déséquilibre nutritionnel sont plus sensibles à l'invasion de différents microorganismes pathogènes et aux dysfonctionnements physiologiques.

Le stress osmotique induit une diminution de la croissance cellulaire, une réduction de la surface foliaire et de la teneur en chlorophylle avec une accélération de la sénescence (Shannon et Grieve 1999). Les parties comestibles des plantes deviennent également plus ou moins économique avec une valeur nutritionnelle réduite. Les plantes affectées se caractérisent généralement par des fruits petits non uniformes avec une courte durée de conservation (Romic *et al.*, 2008). Les effets de la salinité primaire donnent lieu à de nombreux autres effets tel le stress oxydatif qui est caractérisé par l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène potentiellement dangereux pour la membrane, les protéines, les enzymes et les acides nucléiques (Porcel *et al.*, 2012 ; Paul et Lad 2014).

III- Halophytes et leur mécanisme d'halotolérance

Les plantes sont classées en glycophytes et halophytes en fonction de leur tolérance au sel. Les halophytes sont des plantes qui vivent naturellement dans des environnements contaminés par le sel. Elles peuvent tolérer des concentrations élevées du NaCl, plus de 1M (Flowers et Colmer, 2008; Kumari *et al.*, 2015). Environ 1% de la flore totale du monde (dicotylédones et monocotylédones) sont des plantes halophytes. Elles sont distribuées, principalement, dans les sols arides, semi-arides et dans les zones humides des côtes tropicales et subtropicales (Kumari *et al.*, 2015). Les halophytes ont des gènes et des protéines sensibles au sel pour faire face aux effets néfastes de la salinité. Tandis que, les glycophytes ne tolèrent pas les fortes concentrations de sel (Askari *et al.*, 2006, Yu *et al.*, 2011). En fonction de leur résistance et de leur nécessité aux sels de sodium (NaCl), les halophytes sont divisées en halophytes obligatoires ou facultatives (Kumari *et al.*, 2015). Les halophytes facultatives peuvent croître en absence de sel, alors que les halophytes obligatoires ont besoin de sel pour survivre (Kumari *et al.*, 2015). Les hydrohalophytes et les xérohalophytes font partie d'une autre division. Les premières peuvent se développer dans des conditions aquatiques ou sur les sols humides. Les seconds poussent dans des habitats où le sol est toujours salin et sec (Kumari *et al.*, 2015). Les halophytes utilisent plusieurs mécanismes pour s'adapter à la salinité élevée du sol (Zhang et Shi, 2013; Joshi *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2015). Ces mécanismes entraînent des changements physiologiques, morphologiques et biochimiques (Wang *et al.*, 2001) telles :

(i) la modulation des hormones végétales (Parida et Das, 2005; Gupta et Huang, 2014) y compris l'acide indole acétique (AIA), l'acide jasmonique (AJ), la gibbérelline (AG), l'éthylène (ET) et l'acide abscisique (ABA), et l'induction des enzymes liées à leur biosynthèse.

(ii) la synthèse des solutés et des osmoprotecteurs compatibles (Sanchez *et al.*, 2008; Slama *et al.*, 2015);

(iii) le contrôle de l'absorption des ions, en particulier les ions K^+ , par les racines et les ions transférés aux feuilles. En raison de leur rôle dans le maintien d'une pression osmotique équilibrée, les ions K^+ jouent un rôle important dans la fermeture et l'ouverture des stomates ;

(iv) l'accumulation sélectif ou l'élimination d'ions toxiques (Mahajan et Tuteja, 2005);

(v) la production d'oxyde nitrique (ON) (Del Río, 2015);

(vi) l'activation des enzymes antioxydantes et la production des composés antioxydants (Wang *et al.*, 2013);

(vii) la production des polyamines (Shabala et Mackay, 2011);

(viii) l'altération des voies de la photosynthèse (Uzilday *et al.*, 2014);

(ix) la compartimentation des ions au niveau cellulaire et même dans de la plante entière (Pang *et al.*, 2010, Shabala et Mackay, 2011);

(x) le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la tolérance au sel. Au fait, les halophytes répondent au stress salin en régulant un grand nombre de gènes et des facteurs de transcription (Lim *et al.*, 2010, Gupta et Huang, 2014; Kumari *et al.*, 2015). Ceux-ci englobent : des gènes associés à la sénescence (e.g., SAG), des gènes de transport des ions ou d'homéostasie (e.g., SOS, AtNHX1 et H⁺-ATPase), les chaperons moléculaires (e.g., les gènes HSP) et les facteurs de transcription liée à la déshydratation (e.g., DREB) (Gupta et Huang, 2014).

Le potentiel d'utilisation des halophytes et d'autres espèces tolérantes au sel permettrait l'amélioration de la production agricole dans les régions arides et semi-arides du monde. Les halophytes ont de nombreux emplois y compris leur utilisation comme réservoir pour isoler les PGPR halotolérantes (Ksouri *et al.*, 2012; Song et Wang, 2014; Jesus *et al.*, 2015; Etesami, Beattie, 2018).

IV- 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). Les bactéries dans la rhizosphère peuvent être symbiotiques ou non symbiotiques, ce qui peut définir leur mode d'action direct ou indirect (Kumar *et al.*, 2015). Le système racinaire est la zone chimique où les composés phénoliques sont synthétisés et libérés. La composition de ces exsudats dépend de l'état physiologique de la plante, des espèces végétales et des micro-organismes présents (Kang *et al.*, 2010). Selon

Barea *et al.* (2005) la rhizosphère est divisée en trois : la rhizosphère, le rhizoplan et la racine elle-même (Fig.1). La rhizosphère : c'est la zone du sol influencée par les racines à travers les exsudats affectant les activités microbiennes. Le rhizoplan est la surface racinaire qui lie des particules du sol ; et en fin la racine qui est colonisée par les microorganismes. La concentration bactérienne dans la rhizosphère est de 10-1000 fois supérieure à celle du sol. Pour maintenir leurs effets bénéfiques dans la rhizosphère, les bactéries doivent être performantes et compétitives pour l'espace et les nutriments vis-à-vis de la microflore native (Goudaa *et al.* , 2018).

IV-1- Nature des rhizodépôts et leur rôle dans la rhizosphère

Une grande variété de composés organiques libérés par les plantes se trouve dans la rhizosphère. Ces composés se différencient en :

- **Exsudats** : Ce sont des substances hydrosolubles de faible poids moléculaire tels que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les phytosidérophores, les flavonoïdes, les vitamines comme B1, B2, B6, la thiamine, la riboflavine, la pyridoxine et certaines hormones,. Elles 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 rhizodéposition (Uren, 2007).
- **Sécrétions** : Ce sont des composés de poids moléculaire le plus souvent élevé. Elles sont représentées par les mucilages, les polymères de carbohydrates et les enzymes telles que des invertases, des cellobiases, des phosphatases. 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).
- **Mucilage** : Il représente le matériel gélatineux présent à la surface des racines, au niveau de la zone d'élongation et d'absorption (Uren, 2007). Le mucilage est un mélange de racines dégradées par la microflore du sol, de cellules microbiennes et de produits de synthèse microbiennes, associés aux colloïdes du sol. Il est constitué en grande partie par des polysaccharides de poids moléculaire élevé et se présente sous la forme d'un réseau fibrillaire et granuleux (Knee *et al.*, 2001).

- **Lysats** : Ils 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). La dégradation microbienne des parois permet par ailleurs de libérer le contenu cytoplasmique de ces cellules.
- **Gaz** : Les gaz comme l'éthylène, le CO₂, le propylène, des alcools (éthanol, méthanol) et des aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, propionaldéhyde) sont exportés vers le sol par respiration. Ils peuvent aussi influencer à distance la germination de spores fongiques (Prescott *et al.*, 1999).

Les rhizodépôts impliquent un effet qualitatif et quantitatif sur la microflore de la rhizosphère (Walker *et al.*, 2003). En effet, les débris racinaires, le mucilage et les exsudats représentent les plus importantes sources de matière organique apportée au sol (Wheatley *et al.*, 1990). Ceux-ci sont impliqués dans de nombreux processus incluant le maintien du contact racine-sol, l'acquisition de nutriments, les associations plante/micro-organismes, la régulation de la croissance des plantes et la détermination des structures des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Whipps, 2001). En effet, la flore rhizosphérique utilise soit 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). Ils interviennent, également, dans la régulation de la biodisponibilité des métaux lourds dans le sol comme, par exemple, la séquestration de l'aluminium pour réduire sa phytotoxicité (Luo *et al.*, 1999). D'autre part, les acides organiques présents dans les exsudats jouent un rôle important dans l'acquisition du phosphore (Karnh *et al.*, 1998). Enfin, les rhizodépôts et, plus particulièrement, les mucilages ont aussi une action lubrifiante, permettant à la racine de progresser dans le sol en limitant les blessures mécaniques causées par les particules de sol (Boeuf *et al.*, 1993).

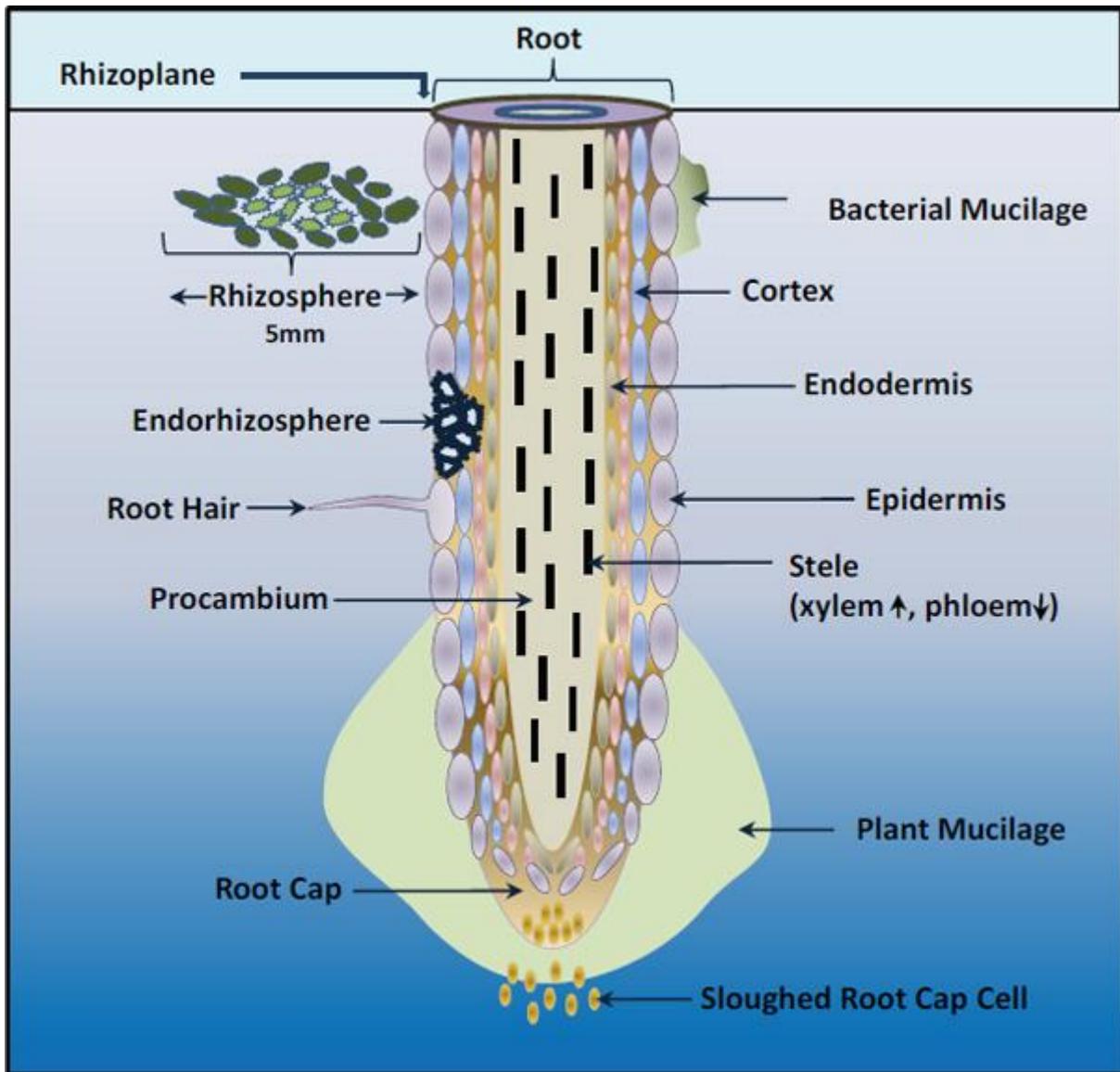


Fig. 1 : Structure racinaire au niveau de la rhizosphère (Maier et al., 2000).

V- Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

Le bactéries symbiotiques dans la rhizosphère exerçant des effets bénéfiques sur la plante hôte sont appelées Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Raza *et al.*, 2016) (Fig.2). Les PGPR sont impliqués dans diverses activités biotiques du sol pour le rendre dynamique et durable à la production agricole (Gupta *et al.*, 2015). Ces rhizobactéries colonisent de manière compétitive le système racinaire des plantes et améliorent leur croissance par différents mécanismes, y compris la solubilisation des phosphates (Ahemad et Khan, 2012), la fixation d' azote (Glick, 2012), la production de l' acide indole-3-acétique (AIA), la production de sidérophores (Jahanian *et al.*, 2012), la production de l' amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, et le cyanure d'hydrogène ; la synthèse des phytohormones et des antibiotiques ou des enzymes lytiques (Xie *et al.*, 2016). En outre, certains PGPR peuvent également présenter d'autres caractéristiques favorisant la croissance des plantes, telles que la détoxification des métaux lourds, la tolérance à la salinité et le contrôle biologique des insectes phytopathogènes (Egamberdieva et Lugtenberg, 2014).

Les PGPR peuvent être classées en deux types en fonction de leur degré d'association avec les cellules racinaires. Elles sont divisées en extracellulaires (ePGPR) et intracellulaires (iPGPR) (Gray et Smith, 2005 ; Viveros *et al.*, 2010). Les ePGPR habitent la rhizosphère (principalement le rhizoplan) ou dans l'espace intracellulaire du cortex racinaire. Tandis que les iPGPR résident, principalement, à l'intérieur des nodules. Les genres bactériens appartenant aux PGPR extracellulaires sont *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Par contre, les bactéries endophytes appartenant aux PGPR intracellulaires incluent *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, et *Rhizobium*, ainsi que les espèces de *Frankia*, qui peuvent fixer l'azote atmosphérique chez les plantes actinorhiziennes (Bhattacharyya et Jha, 2012 ; Goudaa *et al.* , 2018).

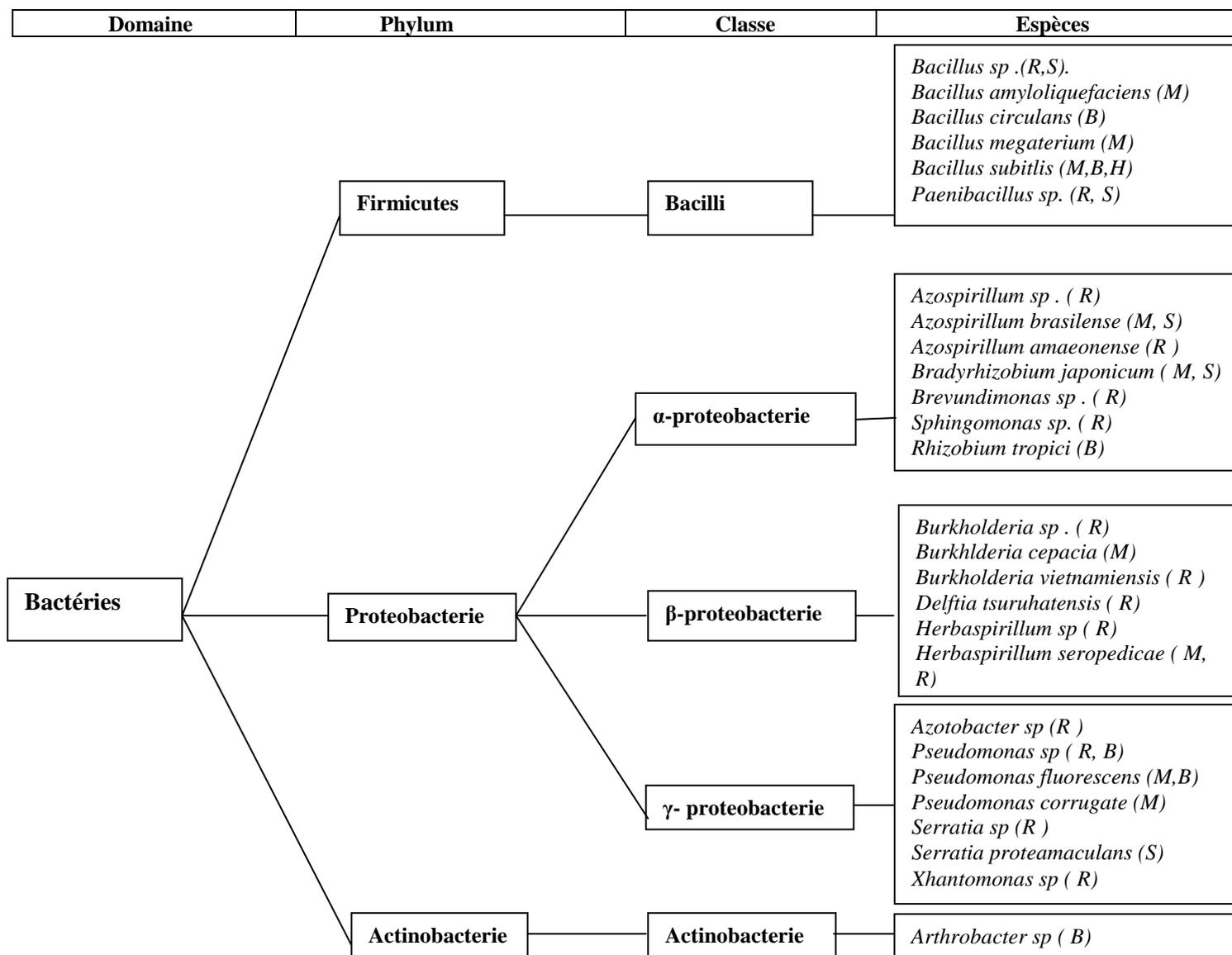


Fig. 2 : PGPR regroupées selon leur classification phylogénétique (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). M : maïs, R, riz, B : Blé, S: soja, H: Haricot

V- 1- PGPR tolérantes au sel associées aux halophytes

Les halophytes représentent un habitat idéal pour isoler les rhizobactéries. L'halophyte *Salicornia brachiata*, qui croit dans les zones côtières, en Inde, a été utilisée pour isoler *Brachybacterium saurashtrense* sp. nov., et *Pseudomonas* spp. Ces bactéries ont démontré des activités promotrices de la croissance végétale (Jha *et al.*, 2012). Les espèces *Brevibacterium epidermidis*, *Micrococcus yunnanensis*, et *Bacillus aryabhatai* ont été isolées de la rhizosphère de six halophytes à proximité de la mer Jaune, en Corée (Siddikee *et al.*, 2010). Les espèces *Brevibacillus borstenlensis*, *Pseudoalteromonas ruthenica* et *Halomonas sinaensis* ont été isolées de l'halophyte *Halocnemum strobilaceum* habitant les sites côtiers du golfe Persique, Inde (Al-Mailem *et al.*, 2010). En Australie et dans les régions arides en Algérie, la plante *Acacia* spp. a présenté différents genres bactériens tels, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Ochrobactrum* (Boukhatem *et al.*, 2012). Les bactéries *Rhizobium* spp. et *Bacillus* spp. ont été détectées dans la rhizosphère de l'halophyte *Salicornia bigelovii* (Rueda-Puente *et al.*, 2010).

V-2- Diversité des rhizobactéries tolérantes au sel

Les analyses génotypiques et phénotypiques des rhizobactéries indigènes peuvent aider à mieux comprendre leurs mécanismes d'interaction avec les plantes (Tripathi *et al.*, 2002). La salinité et la désertification causent une grande perturbation sur les interactions symbiotiques plantes-microbes dans les écosystèmes affectés. Il est rapporté que les nodules des légumineuses sont plus sensibles au stress salin que les *rhizobia* eux-mêmes (Zahran, 1991). Les *Pseudomonas* spp., souvent associés au riz, peuvent favoriser la croissance des autres plantes par leur présence dans la rhizosphère (Rangarajan *et al.*, 2002). Ces souches sont identifiées comme *P. aureginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. mallei* et *P. diminuta*. Les *Pseudomonas* fluorescents sont, souvent, présents dans les sols non-salés. Tandis que, les espèces *P. alcaligenes* et *P. pseudoalcaligenes* sont communes dans les sols salins. D'autres rhizobactéries tolérantes au sel, telles que *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes xylosoxidans* et *Ochrobactrum anthropi*, sont également isolées des racines de riz (Tripathi *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* est l'espèce dominante de la communauté bactérienne associée aux racines de riz (Tripathi *et al.*, 2002). Celle-ci est décrite comme opportuniste ; elle se trouve généralement dans le sol et les écosystèmes aquatiques. Le genre *Bacillus* est présent dans un large éventail d'habitats naturels (Logan, 2002), ce qui suggère un remarquable degré de son

adaptation physiologique et génétique dans la nature. Pour persister et se reproduire, la bactérie devrait être capable de s'adapter rapidement à différentes conditions environnementales du sol. Un certain nombre de souches bactériennes a été isolé à partir des environnements salins, tels les genres *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Candida tropicalis* et *Alcaligenes faecalis* (Sanchez-Porro *et al.*, 2003). Les espèces bactériennes, telles *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* et *Staphylococcus* ont été détectées dans la rhizosphère de différentes plantes (Kloepper et Beauchamp 1992).

V-3- Mécanismes des PGPR à améliorer la croissance végétale sous stress salin

La promotion de la croissance végétale par les PGPR entraîne des changements dans l'équilibre microbien rhizosphérique et des modifications de la physiologie de la plante (Glick *et al.*, 1997). Elles peuvent fournir des avantages aux plantes halophytes et aux glycophytes pour surmonter les contraintes de stress salin avec différents mécanismes. 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).

V-3-1- Mécanismes directs

a- Fixation d'azote

La majeure partie de l'azote se trouve sous forme d'azote gazeux (N_2) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). Sa fixation biologique existe uniquement chez les procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyens *et al.*, 2010). La fixation d'azote est effectuée par des interactions symbiotiques ou non-symbiotiques entre les microorganismes et les plantes. Parmi les PGPR symbiotiques qui fixent fréquemment le N_2 atmosphérique dans le sol : *Rhizobium* sp., *Azoarcus* sp., *Beijerinckia* sp., *Pantoea agglomerans* et *K. pneumoniae*. D'autres sont libres dans la rhizosphère (e.g., *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*) (Tilak *et al.*, 2005). La fixation de N_2 est réalisée par un gène particulier appelé *nif*, qui est impliqué dans l'activation des protéines, le don des électrons, la biosynthèse de cofacteurs et dans de nombreux autres gènes régulateurs pour la synthèse et l'activité des enzymes (Reed *et al.*, 2011). L'inoculation par

des PGPR fixatrices d'azote permet d'améliorer la croissance végétale, et de maintenir un niveau élevé d'azote dans les sols agricoles (Damam *et al.*, 2016).

b- Solubilisation du phosphate

Le phosphore est le deuxième nutriment essentiel pour une croissance optimale des plantes (Goudaa *et al.*, 2018). Il joue un rôle important dans tous les principaux processus métaboliques, y compris le transfert d'énergie, la transduction du signal, la respiration, la biosynthèse et la photosynthèse (Anand *et al.*, 2016). Cependant, 95-99% de phosphore est sous forme insoluble, immobilisé ou précipité; limitant sa disponibilité pour les plantes. La solubilisation de minéraux par les PGPR se fait par la production d'acides organiques de faible poids moléculaire comme l'acide gluconique (Sáenz-Mata *et al.*, 2016). Plusieurs souches bactériennes telles *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhizobium* et *Flavobacterium* ont la capacité de solubiliser le phosphate inorganique. L'utilisation de ces bactéries comme bioinoculants augmente sa disponibilité. Ces PGPR peuvent ainsi améliorer la croissance des plantes en atténuant l'effet négatif du stress salin (Giri *et al.*, 2003 ; Saharan et Nehra 2011 ; Idris *et al.*, 2016 ; Sáenz-Mata *et al.*, 2016).

c- Production de sidérophores

Les sidérophores sont des petites molécules organiques produites par des micro-organismes dans des conditions limitantes en fer afin d'améliorer son absorption. La plupart de sidérophores sont solubles dans l'eau et peuvent être divisés en extracellulaires et intracellulaires. Certains rhizobactéries utilisent des sidérophores homologues alors que d'autres utilisent ceux produits par d'autres rhizobactéries de différents genres (sidérophores hétérologues) (Khan *et al.*, 2009). Les PGPR comme *Pseudomonas putida* utilise les sidérophores produits par d'autres microbes présents dans la rhizosphère pour satisfaire leurs besoins en fer et afin d'augmenter sa disponibilité dans leur habitat (Rathore, 2015). Un sidérophore puissant, tel que le complexe ferrique-sidérophore, joue un rôle important dans l'absorption de fer par les plantes en présence d'autres métaux, tels que le nickel et le cadmium (Beneduzi *et al.*, 2012 ; Gouda *et al.*, 2018). Chez les rhizobactéries à Gram négatif et positif, le fer (Fe_3^+) dans les complexes Fe_3^+ -sidérophores est réduit en Fe_2^+ puis libéré dans la cellule. Les sidérophores bactériens aident à atténuer les contraintes sur les plantes imposées par des taux élevés de métaux lourds. Les plantes assimilent le fer libéré par différents mécanismes soit par l'absorption directe du complexe ou à travers les réactions

d'échange avec des microorganismes (Schmidt 1999). Par exemple, le complexe Fe-pyoverdine synthétisé par *Pseudomonas fluorescens* C7 est utilisé par *Arabidopsis thaliana*. Il entraîne l'augmentation du taux de fer dans les tissus végétaux ce qui améliore la croissance de la plante (Vansuyt et al 2007). Certaines souches bactériennes qui ne présentant aucun mécanisme de contrôle biologique peuvent agir comme agent de lutte biologique en utilisant les sidérophores qu'elles produisent. Au fait, ces sidérophores peuvent prévenir certains phytopathogènes d'acquérir le fer, limitant par conséquent leur capacité à proliférer (Parrey *et al.*, 2016)

d- Production des phytohormones

Les phytohormones ou les régulateurs de croissance des plantes sont des molécules organiques agissant à de faibles concentrations (<1 mM) pour favoriser, inhiber ou modifier la croissance et le développement végétal (Damam *et al.*, 2016). Les régulateurs de croissance des plantes sont également appelés hormones végétales exogènes, car ils peuvent être appliqués de manière exogène par certaines bactéries PGPR. Le groupe de phytohormones englobe les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique, l'éthylène, les stéroïdes et les auxines (Fig. 3).

➤ Acide indole acétique

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 impliqué aussi dans la division cellulaire et la formation des nodules. 80% des bactéries isolées de la rhizosphère peuvent produire l'AIA (Patten et Glick 1996), c'est le cas de *Aeromonas veronii*, *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes piechaudii*, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium*, *Comamonas acidovorans* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium*, *Rhizobium leguminosarum* et *Xantomonas*, (Weyens *et al.*, 2010). La production de l'AIA chez *Rhizobium* se fait via la voie de l'acide indole-3-pyruvique et la voie d'aldéhyde indole-3-acétique. Les facteurs environnementaux (e.g., pH acide, stress osmotique et limitation de carbone) et les facteurs génétiques (gènes de biosynthèse et le mode d'expression) peuvent ainsi influencer la synthèse de l'AIA (Spaepen *et al.*, 2007; Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

➤ **Cytokinines**

Les cytokinines stimulent la division des cellules végétales et dans certains cas le développement des racines et la formation des poils absorbants (Frankenberger et Arshad 1995). 90% des micro-organismes rhizosphériques sont capables de libérer des cytokinines. Environ trente des composés identifiés appartenant au groupe des cytokinines sont d'origine microbienne. Les souches de *Rhizobium* sont signalées comme les bactéries les plus productrices des cytokinines (Senthilkumar *et al.*, 2009).

➤ **Gibbérellines**

Les gibbérellines sont des hormones végétales responsables de l'élongation des tiges et l'expansion des feuilles. Elles sont appelées de GA1 à GA89 en fonction de l'ordre de leur découverte. L'application des gibbérellines permet d'obtenir des fruits parthénocarpiques de taille identique. Ces phytohormones augmentent la taille des fruits et le nombre de bourgeons et arrêtent la dormance des tubercules. Elles améliorent aussi la germination des graines et contrôlent la floraison. De nombreuses bactéries PGPR produisent les gibbérellines, y compris *Rhizobium* et *Sinorhizobium meliloti* (Frankenberger et Arshad 1995)

➤ **Acide abscisique**

L'acide abscisique est synthétisé dans les chloroplastes des feuilles. Sa production est accentuée sous contraintes environnementales tels les déficits en eau et les températures basses. La biosynthèse de l'acide abscisique se produit, indirectement, à travers la production de caroténoïdes. Le transport de l'acide abscisique peut se faire dans le xylème et les tissus du phloème. L'acide abscisique stimule la fermeture stomatique, favorise la croissance des racines et induit la transcription génétique des protéinases. Il peut, aussi, agir contre les pathogènes (Davies 1995). Certaines PGPR, telles *Rhizobium* sp. et *B. japonicum* sont capables de produire cet phytohormone (Dobbelaere *et al.*, 2003).

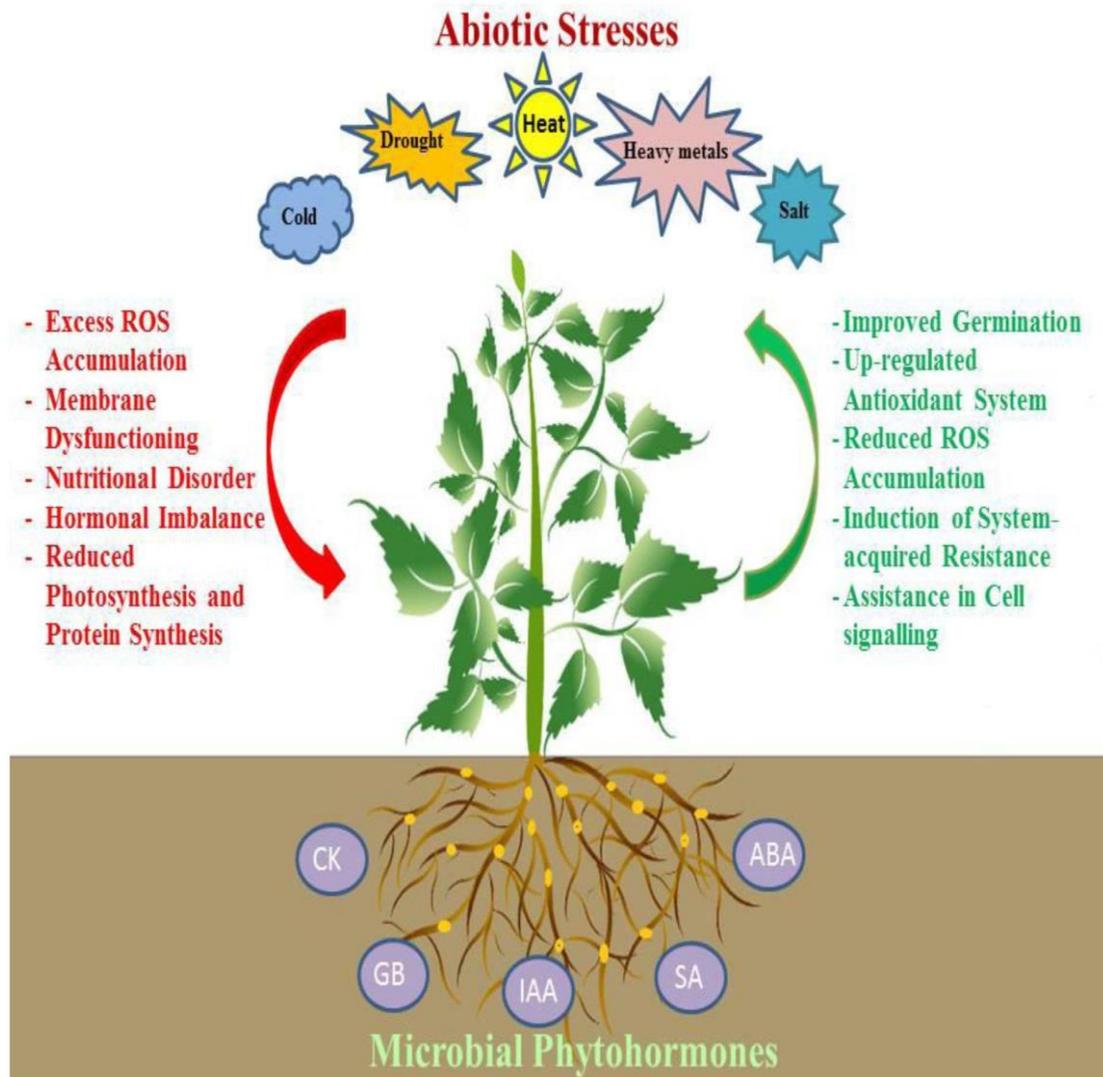


Fig. 3: Phytohormones produits par les PGPR aidant les plantes à tolérer le stress abiotique (Egamberdieva *et al.*, 2017). Cytokinine (CK), Gibbérelline (GB), Acide indole-3-acétique (IAA), Acide salicylique (SA) et Acide abscisique (ABA).

e- Acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC- désaminase)

L'inoculation de *Rhizobium* produisant l'ACC désaminase, réduit le niveau d'éthylène dans le sol entraînant l'élongation racinaire. La diminution de la teneur élevée en éthylène peut être réalisée par la dégradation de son précurseur direct, l'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique (ACC), à l'aide de l'ACC-désaminase. Cette enzyme peut soulager les contraintes causées par les métaux lourds, les pathogènes, la sécheresse, la salinité et les radiations (Fig.4). Cette enzyme est exprimée chez plusieurs rhizobactéries (ex : *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. D'autres souches, telles *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. hedysari*, *R. japonicum*, *R. gallicum*, *B. japonicum*, *B. elkani*, *M. loti* et *S. meliloti* peuvent aussi produire l'ACC désaminase. L'inoculation par ces bactéries favorise l'élongation des racines, la nodulation et l'absorption des minéraux (Glick 2012 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

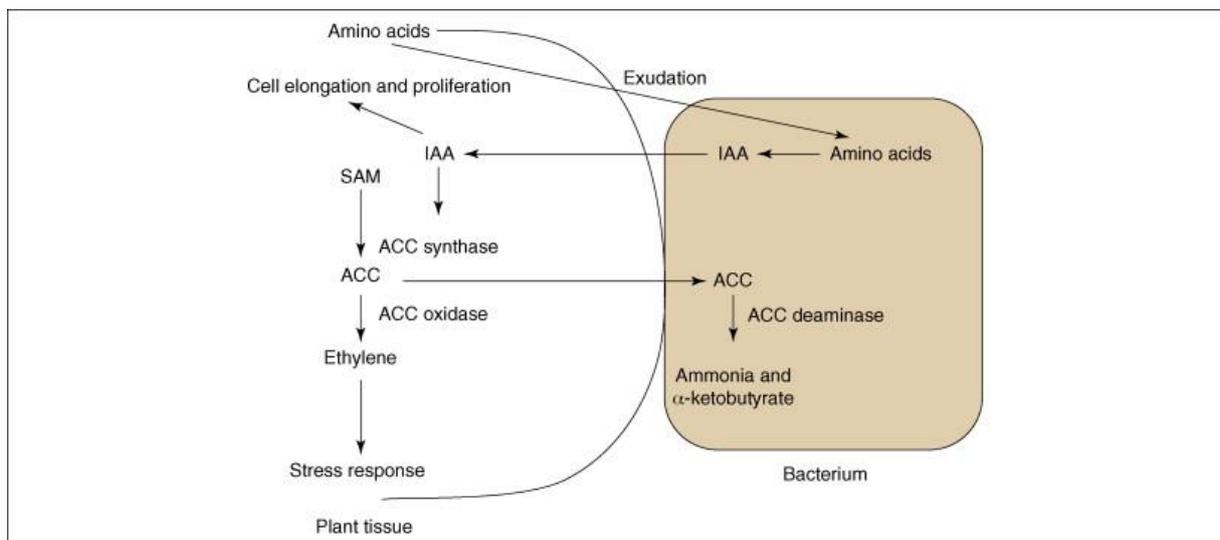


Fig. 4: Mode d'action de l'ACC deaminase (Arshad *et al.*, 2007).

V-3-2- Mécanismes indirects

a- Production des enzymes lytiques

Certains PGPR favorisent la croissance des plantes en produisant des métabolites agissant sur les agents phytopathogènes (Meena *et al.*, 2016). Il s'agit des enzymes lytiques telles la β -1,3-glucanase, la chitinase et les cellulases. Ces enzymes sont impliquées dans la lyse des parois cellulaires des agents pathogènes (Goswami *et al.*, 2016). Au fait la paroi des cellules fongiques est composée de β -1,4-N-acétyl-glucoseamine et de la chitine donc, les bactéries productrices de glucanase et de chitinase peuvent contrôler leur croissance. Les souches *Pseudomonas fluorescens* LPK2 et *Sinorhizobium fredii* KCC5 produisent la beta-glucanase et la chitinase inhibant la croissance de *Fusarium oxysporum*, agent de la fusariose (Goudaa *et al.*, 2018). Il a été démontré que la chitinase extracellulaire et la laminarinase synthétisées par *P. stutzeri* provoquent la lyse de *F. solani* (Lim *et al.*, 1991). En revanche, l'activité chitinolytique semble moins efficace chez *S. plymutica* IC14 contre *S. sclerotiorum* et *B. cinerea*, lorsque les protéases et d'autres activités de biocontrôle sont impliqués. Similaire aux sidérophores et aux antibiotiques, la production des enzymes lytiques (protéases et les chitinases, en particulier) implique des systèmes de régulation tels GacA / GacS ou GrrA / GrrS (Parray *et al.*., 2016).

b- Production des VOCs

Les VOCs produits par les souches de biocontrôle favorisent la croissance végétale en inhibant les agents pathogènes y compris les bactéries, les champignons et les nématodes. L'émissions des VOCs est une caractéristique commune d'une grande variété d'espèces bactériennes (e.g., *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Stenotrophomonas*). Elles produisent des VOCs pour stimuler la croissance des plantes et induire une résistance systémique contre les phytopathogènes (Raza *et al.*, 2016). Le 2, 3-Butanediol et l'acétoïne produit par *Bacillus* spp. sont parmi les VOC les plus efficaces contre les champignons (Santoro *et al.*, 2016). Les VOCs libérés comprennent le cyclohexane, le 2-(benzyloxy) éthanamine, le benzène, le méthyle, le décane, le 1- N-phénylcarbamyle, le 2-morpholinocyclohexène, le dodécane, le benzène (1-méthylnonadécyle), le 1-chlorooctadécane, le tétradécane, le 2,6,10-triméthyle, dotriacontane et le 11-decyldocosane. Cependant la quantité et la nature des VOCs émis varient selon les espèces (Goudaa *et al.*, 2018). Le traitement de *Arabidopsis* sous stress salin (NaCl 100 mM) avec les VOCs réduit

l'accumulation des ions Na^+ avec un taux de 50%. Cette réduction se fait suite à l'expression de HKT1 dans ses feuilles (Zhang et al., 2008 ; Ilangumaran Smith et 2017).

c- Antibioses

La production d'antibiotiques par les PGPR contre les phytopathogènes devient l'un des mécanismes de biocontrôle les plus efficaces et les plus étudiés (Ulloa-Ogaz *et al.*, 2015 ; Goudaa *et al.*, 2018). Les PGPR, comme *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp., jouent un rôle majeur dans l'inhibition des micro-organismes pathogènes à travers la production des antibiotiques. La plupart des espèces de *Pseudomonas* produisent une grande variété d'antibiotiques tels : l'amphisine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la pyrolutérine, la pyrrolnitrine, la tropolone et lipopeptides cycliques (de Souza et Raaijmakers 2003; Nielsen et Sorensen 2003) d'autres composés comprenant l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine A et la xanthobaccine sont produits par *Bacillus*, *Streptomyces* et *Stenotrophomonas* spp. (Kim *et al.*, 1999). La production de ces antibiotiques est étroitement liée à l'état métabolique de la cellule qui est influencée par la disponibilité des éléments nutritifs et d'autres facteurs abiotiques (Duffy et De'fago 2000). En outre, le stade de développement des plantes peut aussi influencer la production des antibiotiques. Au fait, la production de ces molécules n'est pas induite par les exsudats racinaires de jeunes plantes, mais plutôt par les exsudats de plantes les plus âgées. Ceci entraîne une pression sélective entre les microorganismes de la rhizosphère (Picard *et al.*, 2000). Le génotype de l'hôte végétal peut jouer, aussi, un rôle important dans l'interaction entre l'agent de biocontrôle et la plante (Parray *et al.*, 2016)

d- Résistance systémique induite (ISR)

La résistance des plantes est divisée en résistance systémique acquise (SAR) et résistance systémique induite (ISR). La résistance systémique acquise est généralement différenciée par l'apparition des nécroses. Elle se produit en réponse à l'infection d'un pathogène (Glick, 2012). Elle entraîne l'expression des gènes de défense (PR) et l'activation de la voie de l'acide salicylique. La résistance systémique induite, par contre, est activée suite à un contact avec les bactéries PGPR (Walters *et al.*, 2013). Elle fait appel à la voie de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) (Henry *et al.*, 2012 ; Parray *et al.*, 2016). Les PGPR peuvent induire une résistance systémique dans de nombreuses plantes contre plusieurs facteurs de stress environnementaux. Au cours de l'invasion des pathogènes, des signaux sont produits et

un mécanisme de défense est activé via le système vasculaire. Les signaux produits entraînent la voie de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) (Henry *et al.*, 2012 ; Parray *et al.*, 2016). Ceci conduit à l'activation d'un grand nombre d'enzymes de défense, telles la chitinase, la β -1, 3- glucanase, la phénylalanine ammonia lyase, la polyphénol oxydase, la peroxydase, la lipoxygénase, SOD, CAT et APX et certaines protéinases. La résistance systémique induite n'est pas spécifique contre un pathogène particulier, mais elle aide la plante à contrôler de nombreuses maladies (Kamal *et al.*, 2014). D'un autre côté, différents composants bactériens peuvent induire l'ISR, y compris les lipopolysaccharides, les lipopeptides cycliques, les sidérophores, le 2, 4- diacétylphloroglucinol, l'homosérine lactones, et les gaz volatiles, comme 2, 3- le butanediol et l'acétoïne. (Goudaa *et al.*, 2018)

e- Induction de la tolérance systémique induite (TSI)

Les PGPR, ont une capacité à promouvoir la croissance des plantes hôte par leur mécanismes bénéfiques (Grover *et al.*, 2010). Elles peuvent aussi déclencher l'expression des mécanismes de **la tolérance systémique induite (TSI)** suite à l'effet de VOCs qui induisent des changements physiques et chimiques dans les plantes. Ces changements améliorent l'halotolérance des plantes vis-à-vis de différents facteurs de stress abiotiques tels la sécheresse, la salinité et les métaux lourds (Yang *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2008) ont signalé que la promotion de la croissance des plantes déclenchée par les VOCs de *Bacillus subtilis* GB03 améliore l'halotolérance de *A. thaliana*. Ceci se traduit par une diminution du taux de Na^+ à travers l'expression de transporteur membranaire HKT1. De plus, l'inoculation des PGPR impacte positivement l'absorption du fer, la production des auxines, l'expansion des feuilles et la ramification des racines (Zhang *et al.*, 2008) (Fig. 5).

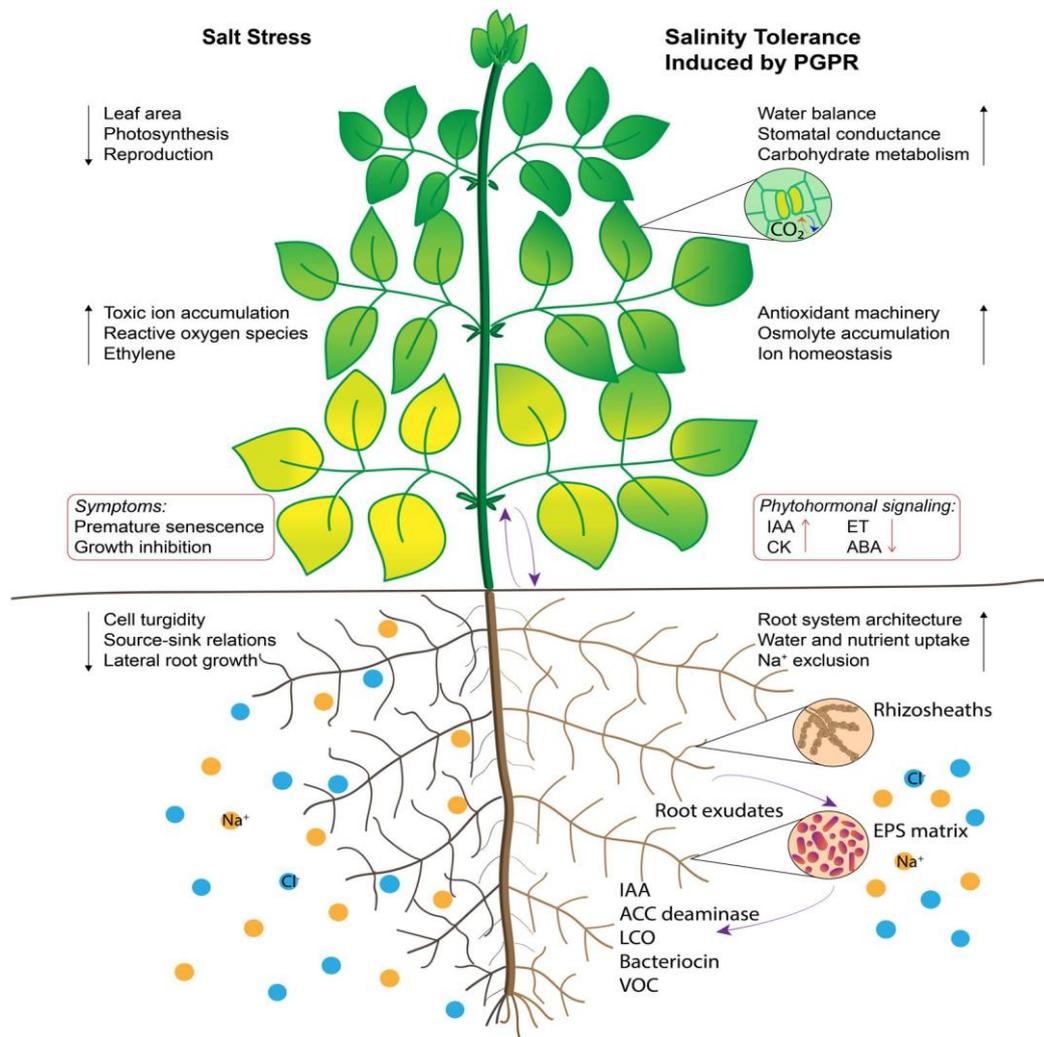


Fig. 5: Mécanismes d'halotolérance des plantes induits par les PGPR (Ilangumaran et Smith 2017).

VI- Mécanismes d'halotolérance des rhizobactéries

VI-1- Accumulation des osmolytes

L'exposition des microorganismes à des conditions d'osmolarité élevée entraîne un efflux rapide de l'eau vers l'extérieur ce qui réduit la turgescence et conduit par conséquent à la déshydratation cellulaire. La première réponse consiste en l'accumulation des ions de K^+ qui serviront, par la suite, comme « messenger secondaire » pour la mise en place d'un système de régulation de la pression osmotique interne (Ventosa *et al.*, 1998). Ce dernier consiste à accumuler des molécules organiques, non chargées et de faible poids moléculaire appelées **solutés compatibles**, il s'agit de la réponse secondaire. Les solutés compatibles comprennent les acides aminés et leurs dérivés (e.g., glutamate, proline, peptides et acide aminé N-acétylé), les amines quaternaires (e.g., glycine, bétaïne et carnitine), les sucres (ex : saccharose et tréhalose), etc. Ces osmoprotecteurs agissent à de faibles concentrations (1mM) et leur accumulation est accompagnée par une augmentation du volume d'eau intracellulaire en évitant la déshydratation (Kempf et Bremer, 1998). Ils stabilisent aussi la structure des protéines et leurs fonctions en les protégeant contre les effets dénaturants de la force ionique. 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).

Les bactéries sont capables de synthétiser des osmoprotectants endogènes (glycine bétaïne, proline, ectoïne) comme elles peuvent les puiser de leurs écosystèmes. Ces composés peuvent être libérés dans le milieu extérieur par d'autres microorganismes producteurs suite à une chute de l'osmolarité. Paul et Nair (2008) ont signalé que *Pseudomonas fluorescens* MSP-393, une souche PGPR, tolère le stress salin par la synthèse *de novo* de l'alanine, la glycine, l'acide glutamique, la sérine, la thréonine et l'acide aspartique dans son cytosol. Les *Pseudomonas* survivent dans des conditions de stress grâce à la production des exopolysaccharides, qui les protègent contre les fluctuations du potentiel hydrique et améliorent la rétention d'eau et la régulation de la diffusion des sources de carbone dans leur habitat (Sandhya *et al.*, 2009). D'un autre part, Diby *et al.* (2005) ont démontré différents gènes sensibles au sel qui sont exprimés chez la souche *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. De même, l'utilisation de la technologie de microarray chez *Escherichia coli* a révélé que le stress salin peut modifier l'expression de 152 gènes, dont 45 sont exprimés, tandis que 107 sont réprimés (Weber et Jung 2002). En outre, les analyses des empreintes de masse peptidique de *P. Fluorescens*, sous conditions de stress salin, ont révélé plusieurs protéines

de stress qui sont exprimées. Ces protéines peuvent aider les bactéries à maintenir un métabolisme stable dans les sols salins (Paul et Nair, 2008).

VI-2- Production des exopolysaccharides (EPS)

Les EPS sont un complexe de polymères de haut poids moléculaire ($PM \geq 10\ 000$) sécrétés par des bactéries en réponse à des contraintes environnementales tels les métaux lourds et les stress osmotiques (Nunkaew *et al.*, 2014). Les PGPR productrices des EPS peuvent améliorer la structure du sol en augmentant le volume des macropores du sol rhizosphérique ce qui entraîne une forte rétention de l'eau et une grande disponibilité de nutriments aux plantes. Les EPS peuvent également retenir les ions Na^+ en diminuant sa teneur absorbée par les plantes et atténuer, par conséquent, l'effet du stress salin. La capacité des EPS à lier les cations est associée, principalement, aux groupements hydroxyle, sulfhydryle, carboxyle et phosphoryle (Nunkaew *et al.*, 2014). Un polysaccharide (≈ 18 kDa) a été identifié chez la souche *Rhodopseudomonas palustris* PP803, composé principalement, de l'acide galacturonique qui est responsable de l'élimination du sel. Certaines rhizobactéries y compris *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* sp., *Planococcus rifietoensis*, *Halomonas variabilis*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium* et *Paenibacillus* produisent des EPS et facilitent la formation de biofilm (Nunkaew *et al.*, 2014 ; Sáenz-Mata *et al.*, 2016). Les exopolysaccharides (EPS) produits par *Pseudomonas putida* GAP-P45 jouent un rôle positif dans la régulation de la teneur en eau et la diffusion de la source de carbone aux plantes, notamment dans des conditions fluctuantes de stress hydrique (Sandhya *et al.*, 2010).

VI-3- Détoxification des ROS

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont générées suite à un stress osmotique. Ces molécules affectent négativement les cellules végétales par oxydation et altération de leurs lipides membranaires, leurs protéines et même leur ADN. Certaines enzymes y compris les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (CAT), les ascorbates peroxydases (POX) , et aussi les antioxydants non enzymatiques tels l'ascorbate, le glutathion, et tocophérol peuvent empêcher les effets négatifs des ROS. Les PGPR utilisent des mécanismes similaires pour faire face au stress oxydatif causé par les ROS tels les radicaux superoxyde (O_2^-), l'hydroxyle (OH^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Arora *et al.*, 2012; Upadhyay *et al.* 2011). Ces rhizobactéries augmentent la tolérance de plantes sensibles au sel cultivées sous stress salin par l'induction des enzymes antioxydantes. En effet, selon Sáenz-Mata *et al.*(

2016), les plantes des sols salins inoculées par différents genres bactériens tels *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* et *Escherichia* tolèrent mieux le stress oxydatif que les plantes cultivées dans un sol stérile.

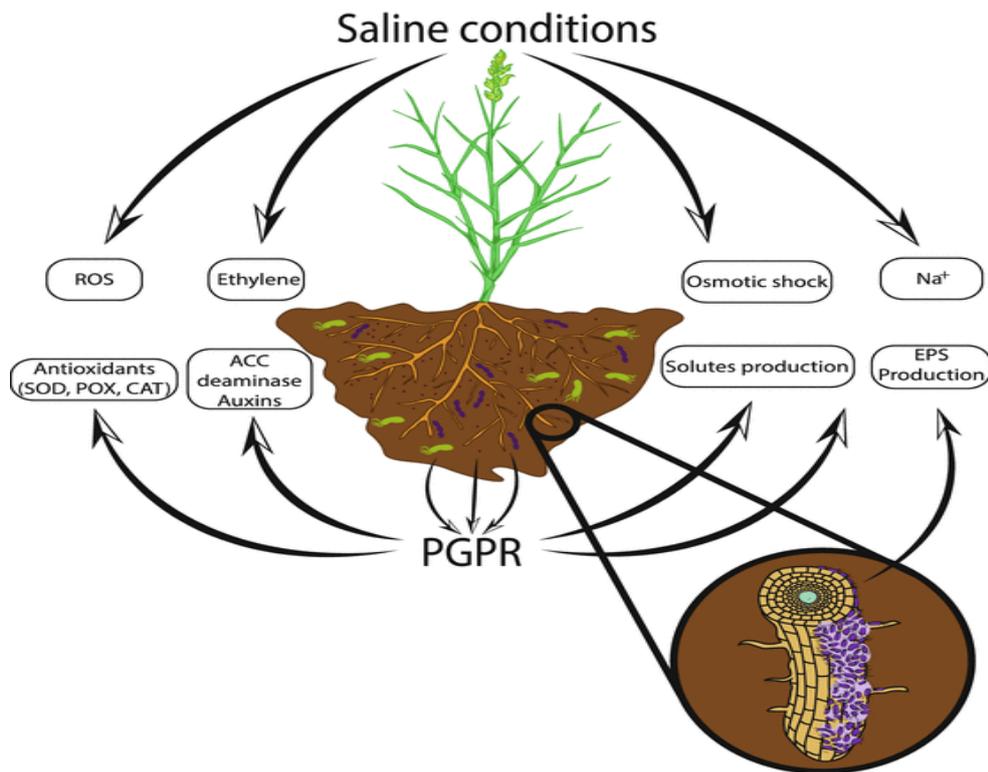


Fig. 6: Mécanismes d'halotolérance des PGPR aidant les plantes à tolérer le stress salin
(Sáenz-Mata *et al.*, 2016).

VII- Utilisation des PGPR dans l'agriculture

VII-1- Biofertilisation

Le terme «biofertilisant» est, souvent, utilisé pour certains microorganismes qui peuvent améliorer l'état nutritionnel de leurs plantes hôtes (Okon et Labanderagonzalez 1994). Lorsque ces microorganismes sont appliqués aux graines, aux surfaces des plantes ou au sol, ils colonisent la rhizosphère ou les parties internes de la plante Vessey (2003). Par conséquent, Cette colonisation favorise la croissance de leur hôte en augmentant l'apport ou la disponibilité de nutriments primaires (eg., fixation de N_2) (Fig.7). Les bactéries telles *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter* et *Azoarocus* sont utilisées comme biofertilisants, en raison de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique.

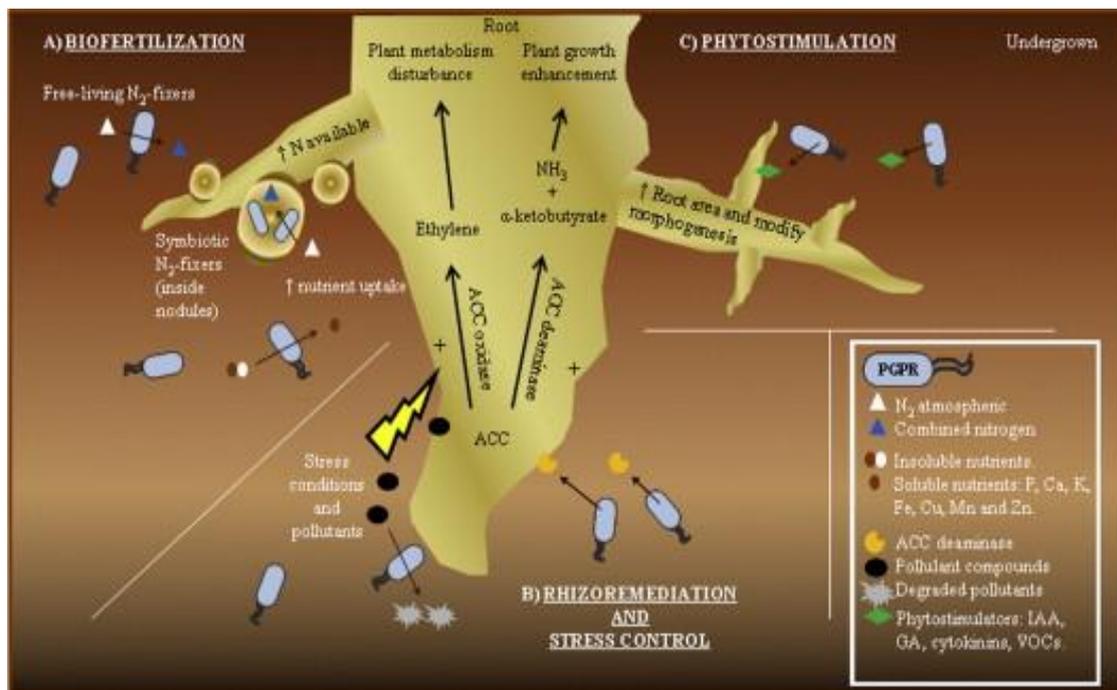


Fig. 7: Différents mécanismes de promotion de la croissance végétale

(Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

VII-2- Phytoremédiation

La phytoremédiation est une méthode de nettoyage des sols contaminés en se basant sur la capacité de certaines plantes à stabiliser, extraire, dégrader ou volatiliser les polluants dans leur voisinage (Pilon Smits, 2005). Cependant, les plantes souffrent souvent de l'effet toxique des métaux lourds ce qui affecte leur potentiel de phytoremédiation (Dimkpa *et al.*, 2009). L'inoculation des plantes par des bactéries bénéfiques du sol améliore la phytoremédiation. (Glick, 2003). En comparaison avec les autres méthodes de nettoyage, la phytoremédiation en utilisant des PGPR semblent très rentable et non destructive pour la structure du sol. En effet, les rhizobactéries pourraient améliorer la tolérance des plantes à des taux élevés de différents polluants du sol (Dimkpa *et al.*, 2009). Vu l'absence de l'activité de l'ACC désaminase chez les plantes, les plantes transgéniques ont été développées en utilisant le gène bactérien responsable de cette enzyme (Fig.7). Une telle stratégie pourrait améliorer la croissance des plantes et leur tolérance au stress métallique (Zhang *et al.*, 2008).

VII- 3- Bioprotection ou phytostimulation

Certaines bactéries colonisatrices des racines jouent un rôle important dans la protection de leur plantes hôtes contre différents types de stress biotiques et abiotiques. Les souches *P. fluorescens* TDK1, *Pseudomonas putida* UW4, *Bacillus* sp. et *Arthrobacter* sp., par exemple, sont capables d'améliorer la résistance des plantes contre divers pathogènes et d'atténuer aussi l'effet négatif du sel et de la sécheresse (Barriuso *et al.*, 2008). La souche *Bacillus subtilis* est largement utilisée en raison de ses propriétés de biocontrôle et sa tolérance à la toxicité du fer (Terré *et al.*, 2007). Les sidérophores produits par les PGPR peuvent protéger les plantes contre les bactéries pathogènes grâce à leur grande affinité au fer. Ils peuvent également protéger les plantes contre le stress oxydatif des métaux lourds (Dimkpa *et al.*, 2009). Cependant, les agents de biocontrôle doivent fournir une protection croisée contre divers facteurs de stress ce qui conduit à la construction d'un système agricole écologiquement et économiquement durable en réduisant le besoin des pesticides.

Chapitre II : Isolement des bactéries et caractérisation de leurs activités promotrices de la croissance végétale

L'objectif général de cette première partie est de dénombrer la communauté bactérienne dans la rhizosphère, l'intérieur des racines et dans le sol loin de l'influence des halophytes issus de 7 régions arides et semi arides à travers l'Algérie. L'évaluation du potentiel PGPR des isolats est aussi menée.

I- Matériel et méthodes

I-1- Prélèvement des échantillons de sols

Sept sebkhas dans diverses régions arides et semi-arides à travers l'Algérie ont été choisies (Fig. 8). Sur la base de sa prédominance comme plante dans les sebkhas, l'halophyte *Salsola tetrandra* a été choisie pour isoler les bactéries rhizosphériques et endophytes. Les bactéries non rhizosphériques ont été isolées du sol non affecté par les racines de l'halophyte. Les échantillons du sol ont été récoltés à une profondeur de 0 à 20 cm et mélangés pour obtenir un échantillon final représentatif de l'ensemble du site. Les échantillons composés de plantes, de leurs sols rhizosphériques et de sol loin de la plante sont recueillis dans des récipients stériles. Ils sont gardés au frais et transportés au laboratoire.

Les sols prélevés sont situés dans les régions suivantes :

Sol 1 : situé à Chott El Beïdha dans la région de Hammam Essoukhna, Sétif (35°55'N, 05°45'E, alt.866m), Est Algérien (Fig. 09)

Sol 2 et 3: situé à Sebkhet Baniou et Mcif respectivement dans la région de Bousaada ; Chott El Hodna (35° 22.000' N, 4° 32.513' E, alt.390m), Sud Algérien.

Sol 4 : Situé à Sebkha d' Oran, (35° N, 0° W, alt. 80 m), Ouest Algérien. (Fig. 10)

Sol 5 et 06 : Situé à Sebkhet Melghir et Felghir dans la région d'El Oued (34° 10.631' N, 6° 17.322' E, alt. 24m), Sud Est Algérien.

Sol 7 : situé à Chott Echergui, dans la région de Saida Chott Ech chergui (34° 03.376' N, 0° 05.164' W, alt. 978 m). Sud Ouest Algérien. (Fig.10).

Les sites sont caractérisés par un climat aride et semi-aride, les sols sont généralement de composition calcaire superficielle, sableux ou limoneux.

I-2- Description des sites d'étude

- **Chott El Beidha : Hammam Essoukhna**

S'étendant sur une superficie de 12.223 hectares. Le site est composé d'une sebkha, ou lac naturel, salé, temporaire, auquel se rattache une prairie humide permanente couverte par une végétation halophyte appelée Chott. Il chevauche sur deux wilaya, Sétif et Batna, et se situe à 4 km au Sud du village, chef lieu de Daïra de Hammam Sokhna. Le Chott, ou prairie humide, abrite sur ces berges une végétation composée de 42 espèces dont 18 espèces sont annuelles et 24 vivaces (Anonyme, 2004).

- **Chott El Hodna**

Chott El Hodna occupe une superficie de 362.000 hectares et fait partie d'une série de chotts qui se sont développés là où convergent les eaux provenant de l'Atlas Saharien au Sud et l'Atlas Tellien au Nord. Paysage végétal des hautes plaines steppiques, il fait partie du point de vue phytogéographique du domaine Maghrébin steppique (Anonyme 2005).

- **Chott Melghir et Felghir**

Chott Melghir et Felghir sont situés entre trois wilayas (EL Oued, Biskra et Khenchela), la plus grande partie de cette zone est localisée dans la wilaya d'El Oued et de Biskra. Le lac est limité au Nord par la commune d'El Haouch et El Feidh, et à l'Ouest par le lieu dit M'uibra (commune de Hamraia) et à l'Est la wilaya de Khenchela et au Sud par le chef lieu de Hamraia. C'est une dépression qui atteint dans certains endroits 24 m au dessous du niveau de la mer. Chott Melghir est séparé du lac voisin Chott Felghir. Le fond du lac est principalement composé de gypse et de boue et est couvert de sel en été. Le climat de Chott est chaud et aride avec une forte évaporation et de faibles précipitations. Les précipitations annuelles sont inférieures à 160 mm (Anonyme 2005).

- **Sebkha d'Oran**

La sebkha d'Oran se situe au Sud-Ouest de la ville d'Oran à 10 Km, son altitude moyenne est de l'ordre de 80m. La surface totale du bassin versant de la sebkha d'Oran s'évalue à plus de 2000 km². Elle constitue une dépression fermée, limitée au Nord par le djebel Murdjadjo (alt. Max. 589m.) où plusieurs villes (Misserghin, Boutlélis et El Amria) sont implantées, au Sud par le massif des Tessala (alt. Max.1061m) avec des villes comme Tamazougha et Arbal bordent la sebkha, à l'Est et à l'Ouest par des collines de faibles altitudes. La hauteur

moyenne d'eau écoulée serait de l'ordre de 450 mm/an, alors que celle de l'évaporation est nettement supérieure de l'ordre de 575 mm/an. La hauteur moyenne de pluie dans la plaine autour de la sebkha est de l'ordre de 450 mm/an près de la mer au Nord et à l'Ouest alors qu'elle n'est que de 350 mm/an au Sud-Est (Anonyme 2005).

- **Chott Ech Chergui**

Le chott Ech Chergui est une vaste sebkha située au centre des hautes plaines steppiques oranaises comprises entre l'Atlas Tellien au Nord et l'Atlas Saharien au Sud hauts plateaux d'Oranie, dans l'Ouest de l'Algérie. Il est occupé par une étendue d'eau peu profonde et à l'extension variable. Sa largeur est de 160 km et sa superficie varie en fonction des précipitations. Le chott Ech Chergui est une zone humide protégée par la convention de Ramsar depuis le 2 février 2001. Il a une superficie de 8 555 km², il constitue le foyer naturel pour de nombreuses espèces animales et végétales menacées et vulnérables. Il est limité, au Nord par les Monts de Saida et de Frenda, au Sud par les Monts des Ksour, à l'Est par le djebel Amour et à l'Ouest par Chott El Gharbi (Benslimane *et al.*, 2015)

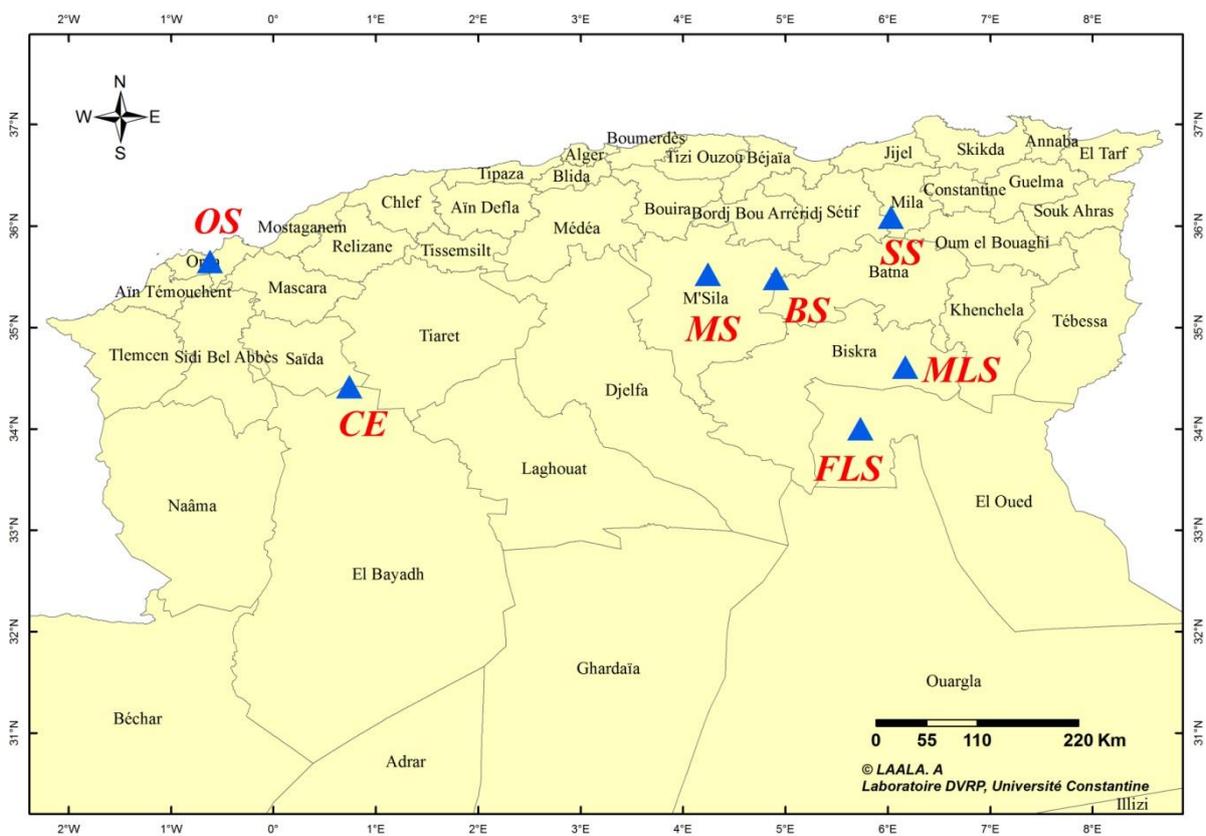


Fig. 8 : Localisation géographique des sites de prélèvement. Sebket Soukhna (SS); Sebket Baniou (BS) ; Sebket Mcif (MS) ; Sebka d’Oran (OS) ; Sebket Melghir (MLS) ; Sebket Felghir (FLS) ; Chott Ech Chergui (CE)

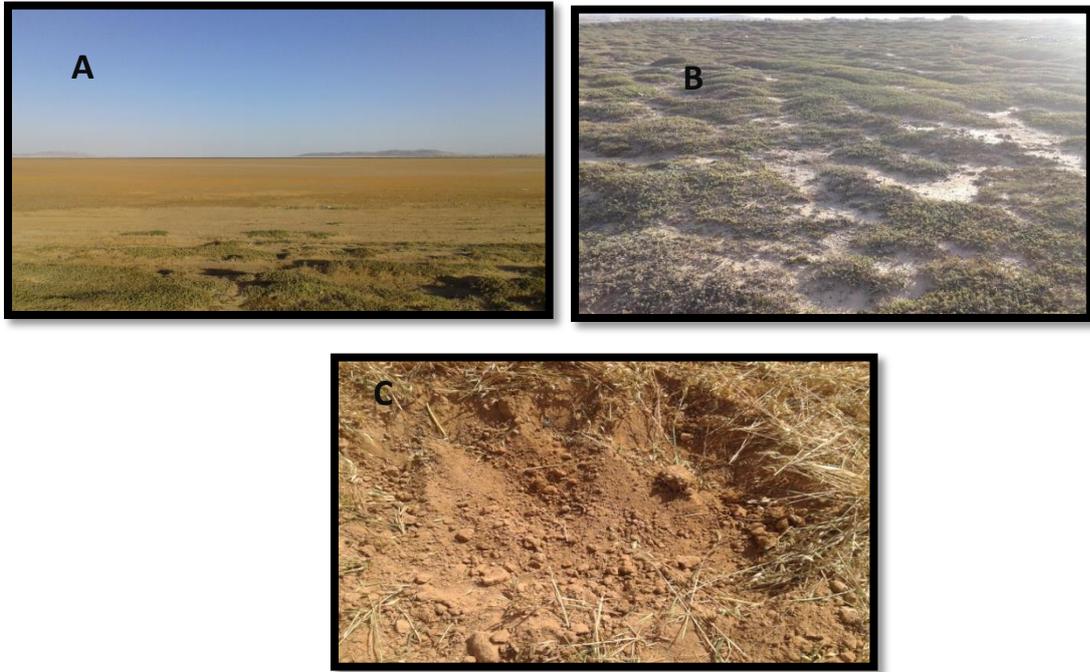


Fig. 9 : Site d'échantillonnage à sebkhet Soukhna. (A, B) site d'échantillonnage (C) Texture du sol non rhizosphérique.



Fig. 10 : Site d'échantillonnage à Chott Ech Chergui et Sebkhah d'Oran. Chott Ech Chergui wilaya de Saida (A,B). (C) Texture de sol non rhizosphérique à chott Ech chergui. Sebkhah d'Oran (D). (E) *Salsola tetrandra* au site d'échantillonnage. (F) Texture du sol non rhizosphérique.

I-3- Mesure du pH et de la conductivité électrique (C_E)

La mesure du pH consiste à homogénéiser 10 g de sol dans 25 ml d'eau distillée. Après agitation, pendant 15min et décantation, le pH du surnageant est déterminé. La C_E permet de déterminer le degré de salinité d'un sol. Elle s'effectue à partir de l'extrait du sol dilué au 1/5 dans l'eau distillée en homogénéisant 10g de sol/ 50 ml H₂O. Après agitation 30min et décantation, la C_E de l'extrait est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Hanna H1 9032). Les résultats sont exprimés en mS/cm. Les valeurs sont comparées à une échelle de salinité (Annexe 1)

I-4- Isolement des bactéries

L'isolement des bactéries est effectué à partir du sol rhizosphérique, non rhizosphérique et de la partie intérieure des racines.

Pour isoler les bactéries à partir de la rhizosphère des halophytes, de petits morceaux de racines sont immergés dans un tampon phosphate salin PBS (10mM, pH 7) (Annexe 2) et agités pendant 10 min. 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 TSA et King B (Annexe 3 et 4).

Pour isoler les bactéries non rhizosphériques, 10 g de sol loin de l'halophyte sont mis dans 90 ml d'eau physiologique. Le mélange est agité pendant 30 min à 150 tr / min. 0,1ml de chaque dilution préparé est étalé à la surface du milieu TSA et King B.

Pour isoler les endophytes, les racines ont subi une série de lavage avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer toutes les particules rhizosphériques. Elles sont, ensuite, désinfectées par l'eau oxygénée (30 volumes) additionnée de Tween 80 (1/4 du volume total) et agitées pendant 20min. Par la suite, les racines sont rincées avec une solution de MgSO₄.7H₂O stérile (0.1M) puis, plusieurs fois, avec l'eau distillée stérile. Afin d'assurer que les racines traités soient bien désinfectées elles sont découpées en petits morceaux et mises sur l'agar nutritif puis incubées à 28 ° C pendant 3-4 jours. 1 gramme de racines désinfectées est broyé dans un mortier stérile puis additionné à 9 ml d'eau distillée. 0,1ml de chaque dilution est étalé à la surface du milieu TSA et King B.

Les isolats présentant différentes morphologies de colonies ont été purifiés par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement. La densité microbienne a été estimée et exprimée en Unité Formant Colonie (UFC) par gramme de sol/racine après 3 à 5 jours d'incubation à 28 ° C.

Les isolats purs sont nommés en fonction de la région ainsi que de la station de laquelle ont été isolés suivie par un numéro de code.

Des isolats avec une désignation NR sont ceux isolés du sol non rhizosphérique; les isolats avec la désignation R sont ceux récupérés de la rhizosphère, et la lettre E désigne les bactéries endophytes.

Ces isolats ont subi, ensuite, une caractérisation morphologique basée sur des critères macroscopiques et microscopiques (forme cellulaire, agencement, Gram).

I-5- Conservation des bactéries isolées

Les souches bactériennes pures sont conservées soit pour de courtes périodes à +4°C dans des tubes de gélose inclinée soit congelées à -20°C ou à -80°C dans des tubes stériles contenant du glycérol à 20 %.

I-6- Activités promotrices de la croissance végétale

a- Production de l'acide indole acétique (AIA)

La production de l'AIA est détectée avec la méthode colorimétrique décrite par Bric *et al.* (1991). Les souches sont cultivées dans 10 ml de bouillon LB (Annexe 5) additionné de L-tryptophane (5 mM) et incubé à 28°C / 48 h. Les cultures sont, ensuite, centrifugées pendant 15 min à 10000 tr / min. 1 ml de surnageant est mélangé avec 2 ml de réactif de Salkowski (1 ml de FeCl₃ 0,5 M dans 50 ml de HClO₄ à 35%) et incubé à température ambiante pendant 30 min. La concentration de l'AIA est mesurée par spectrophométrie à 530 nm et sa quantité est déterminée d'après la courbe d'étalonnage (Annexe 17). Ce test est réalisé en triplicata.

b- Solubilisation du phosphate

La solubilisation du phosphate tricalcique Ca₃(PO₄)₂ a été détectée sur le milieu gélosé de Pikovskaya (Annexe 6) selon la méthode de Nautiyal, (1999). Les cultures des souches isolées sont déposées sous forme de spot (5 µl) à la surface du milieu. La capacité des souches à dissoudre le phosphate inorganique est estimée, après 7 jours d'incubation à 28 ° C. Le développement d'une zone claire autour de la colonie bactérienne indique une activité positive de solubilisation du phosphate. Ce test est réalisé en triplicata.

c- Production de sidérophores

La capacité des souches à produire les sidérophores est estimée selon la méthode de Pérez-Miranda *et al.* (2007). Les souches cultivées dans un milieu LB sont déposées sous forme de spot (5µl) à la surface de la gélose de King B (Annexe 3). Après 24 heures d'incubation à 28°C, 15 ml de milieu CAS agar décrit par Schwyn et Neilands, (1987) et modifié par Mahmoud et Abd Alla (2001) (Annexe 7) sont appliqués sur le King B contenant les souches cultivées. Le développement d'un halo orange autour des colonies bactériennes indique la présence de sidérophores. Ce test est réalisé en triplicata.

d. Production de NH₃

Ce test qualitatif est réalisé selon la méthode de Cappuccino et Sherman (1992). Il repose sur l'inoculation de 100µl de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau paptonnée (Annexe 8). Après incubation à 18°C/48h, 0,5 ml de réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube. Le développement d'une couleur brune à jaune indique la production de NH₃.

e- Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La production d'HCN est évaluée selon la méthode de Bakker et Schippers (1987). Chaque souche bactérienne isolée est incubée sous forme de strie à la surface de milieu gélosé de Trypticase soja (TSA) additionnée de glycine (4,4 g / l). La culture bactérienne est ensemencée par stries sur la gélose en boîte de Pétri. Un disque de papier filtre Whatman N° 3 imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) est déposé au fond du couvercle de la boîte de Pétri. Celle-ci est scellée avec du papier parafilm et incubées à 28°C/ 4 jours. L'activité de cyanogénèse est révélée par changement de la couleur du papier filtre du jaune au brun orangé. Ce test est réalisé en triplicata.

f- Fixation d'azote

La capacité des bactéries isolées à fixer l'azote atmosphérique est détectée en observant leur croissance sur milieu de Jensen semi-solide et non-N (1942) (Annexe 9). Celui-ci est inoculé sous forme de spot avec 5µl de souche bactérienne et incubé à 28°C /7 jours. Les isolats sont ré-inoculés trois fois sur le même milieu, pour confirmer la présence de l'activité. La croissance bactérienne à la surface indique une activité positive pour la fixation de l'azote.

g- Production de cellulase

La capacité des isolats à dégrader la cellulose est effectuée sur la gélose contenant du carboxyméthylcellulose (CMC) selon la méthode de Kasana *et al.* (2008) (Annexe 10). 5 µl d'une culture fraîche (24h) de chaque isolat sont déposés à la surface du milieu en trois répétitions. Après 48 h d'incubation à 28 ° C, la surface de la gélose est recouverte d'une solution rouge Congo (0,1%). La présence d'une zone claire autour des colonies indique la production de l'enzyme.

h- Production de chitinase

Les bactéries isolées sont étudiées pour leur capacité à dégrader la chitine sur un milieu gélosé additionnée de la chitine en suivant la méthode de Murthy et Bleakley (2012) (Annexe 11). Le milieu est inoculé sous forme de spot avec 5µl de cultures fraîches de chaque isolat puis incubé à 28°C / 7 jours. L'activité chitinasique est détectée par la révélation d'un halo clair autour de la colonie suite à l'inondation du milieu avec une solution d'iode (0,666% de KI, 0,333% d'iode) pendant 5 min

i- Production de protéase

La capacité des isolats à produire la protéase est évaluée sur la gélose au lait écrémé (3%) (Annexe 12). Après inoculation du milieu avec 5 µl de chaque isolat, les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C/ 48 h. L'activité protéolytique est détectée par la présence d'une zone claire autour des colonies bactériennes (Chang *et al.*, 2009).

j- Activité antifongique

L'activité antifongique est effectuée sur les souches bactériennes les plus performantes présentant les activités PGP de biocontrôle (HCN, enzymes lytiques, NH₃, sidérophores). Ces souches (36/76) sont testées pour leur capacité à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes *in vitro* sur gélose Potato-Dextrose agar PDA (Annexe 13). Les 4 souches fongiques utilisées sont *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora infestans* et *Aspergillus niger* provenant du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université de Sétif 1. Les isolats sélectionnés cultivés dans un bouillon LB sont ensemencés sur milieu PDA et laissés pousser pendant 48 h à 28 ° C. Un cylindre de 3 mm de diamètre de chaque mycélium est prélevé à partir d'une culture fraîche de 6 jours et déposé au centre de la boîte

inoculée (Dhingra et Sinclair 1985). Les boîtes sont incubées à 28°C/ 7 jours. 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).

I-7- Analyses statistiques

L'ensemble des résultats a été analysé à l'aide d'un programme statistique, SAS (V.9) (SAS Institute, Cary, NC, USA) par l'utilisation du test de Tukey dont le seuil d'erreur alpha est $\leq 0,05$.

II- Résultats

II-1- Paramètres physicochimique des échantillons

Les valeurs moyennes de la conductivité électrique varient de 11,29 ds/m dans la sebkha de Soukhna à 32,5 ds/m dans sebkhet M'cif. Selon la classification de Wetz (2001) (Annexe 1) les sites choisis sont considérés comme hyper salin. Le pH est alcalin, il s'étend de 7,94 à 8,20 (Tab. 1).

II-2- Dénombrement, isolement et sélection des bactéries

Un total de 76 bactéries cultivables montrant des différences macroscopiques (taille, pigmentation, contour, aspect...etc) ont été obtenues à partir des trois 3 compartiments étudiés (Tab. 1). L'ensemble des isolats croissent en condition aérobie sur milieux TSA et KB pendant 48 à 72h à une température d'incubation de 28°C. Sur les 76 isolats, 51 (67%) sont à Gram négatif après examen de coloration de Gram. Le nombre de bactéries isolées du sol rhizosphérique (46) est plus élevé que celui des bactéries non rhizosphériques (21) et des bactéries endophytes (09).

Le dénombrement (ufc/g) a révélé que la densité bactérienne des endophytes (3×10^7 - 2×10^{11} ufc/g) est considérable suivie par celles les bactéries rhizosphériques (2×10^4 - $4,5 \times 10^7$ ufc/g) puis non -rhizosphériques ($6,4 \times 10^3$ - 7×10^5 ufc/g).

Les bactéries endophytes sont abondantes dans les échantillons prélevés du site SS (2×10^{11} ufc/g) suivies par celles de BS, MS (2×10^{10} ufc/g) et OS ($9,5 \times 10^9$ ufc/g).

Tab. 1 : Conductivité électrique (C_E), pH des sebkhas et numération des bactéries endophytes, rhizo et non rhizosphériques

Site de prélèvement	Designation	C_E dS/m	pH	bactéries cultivables ^a		
				NR	R	E
Sebkhet Soukhna	SS	11.29	8.19	$(5.4 \pm 0) \times 10^5$	$(1 \pm 2.2) \times 10^7$	$(2 \pm 0) \times 10^{11}$
Sebkhet Baniou	BS	23.5	8.01	$(5.4 \pm 1.5) \times 10^5$	$(3 \pm 3.8) \times 10^7$	$(2 \pm 5.6) \times 10^{10}$
Sebkhet Mcif	MS	32.5	8.16	$(7 \pm 3.3) \times 10^5$	$(6. \pm 2) \times 10^6$	$(2 \pm 2.8) \times 10^{10}$
Sebkha d' Oran	OS	27	7.97	$(2.8 \pm 2.12) \times 10^4$	$(2.6 \pm 9.19) \times 10^5$	$(9.5 \pm 2.8) \times 10^9$
Sebkhet Melghir	MLS	31.1	8.20	$(1.5 \pm 4.4) \times 10^4$	$(5 \pm 9.8) \times 10^4$	$(5 \pm 4.2) \times 10^7$
Sebkhet Felghir	FLS	32.4	7.94	$(6.4 \pm 1.5) \times 10^3$	$(2 \pm 1.41) \times 10^4$	$(2 \pm 0) \times 10^7$
Chott Echerguie	CE	30	8.12	$(1.2 \pm 1.2) \times 10^4$	$(4.5 \pm 2.6) \times 10^7$	$(3 \pm 1.4) \times 10^7$
				Nombre des isolats étudiés		
				21	46	09

^a bactéries cutivables : NR, Non- rhizosphériques; R, rhizosphériques; E, Endophytes

II-3- Relation entre la salinité et la population bactérienne

Selon les normes de la salinité (Annexe1), les sols étudiés sont considérés comme très salin. Les populations bactériennes rhizosphériques, non rhizosphériques et endophytes sont globalement affectées par le degré de salinité du site de prélèvement (Tab.1). La numération des bactéries cultivables est remarquablement plus importante dans les échantillons prélevés du site SS, BS et OS qui sont caractérisés par les valeurs les plus faibles de la C_E (11,29-27ds/m). Toutefois, aux concentrations extrêmes (30- 31,1 et 32,4ds/m) des sites CE, MLS et FLS respectivement, le nombre de bactéries cultivables chutent considérablement. Le site MS par contre garde un nombre remarquable de bactérie malgré sa forte salinité (32,5ds/m).

II-4- Activités PGP des isolats

Les 76 bactéries sont testées pour leur capacité à produire l'AIA, et les sidérophores et à solubiliser le phosphate inorganique et à fixer l'azote atmosphérique. Les taux des isolats présentant les différentes activités PGP sont représentées dans la Fig. 11. Toutes les bactéries (100%) sont productrices de l'AIA, 64% d'entre elles sont productrices de sidérophores et 82% sont solubilisatrices de phosphate. Seulement 38% de bactéries sont fixatrices de N_2 atmosphérique. Le nombre de bactéries qui ont montré ces activités sont représentées dans le diagramme de Venn (Fig. 12). En effet, sur 76 isolats, 29 sont capables de fixer le N_2 et de produire l'AIA, tandis que 28 isolats sont capables de produire l'AIA, de solubiliser le phosphate et de fixer le N_2 . 21 isolats sont capables de produire l'AIA, les sidérophores et fixer le N_2 , alors que 20 isolats ont manifesté toutes les activités PGP étudiés.

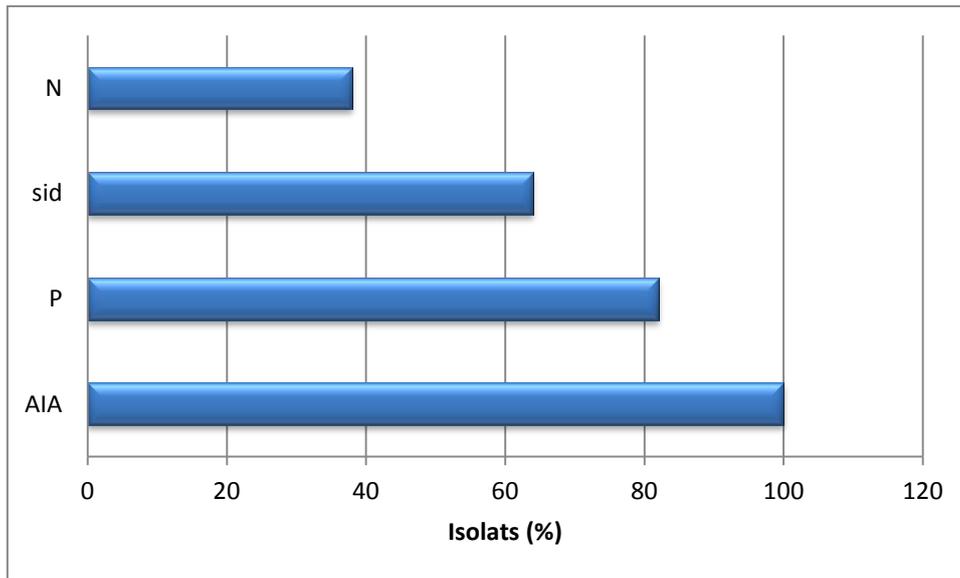


Fig .11: Fréquences des isolats producteurs de diverses activités PGP

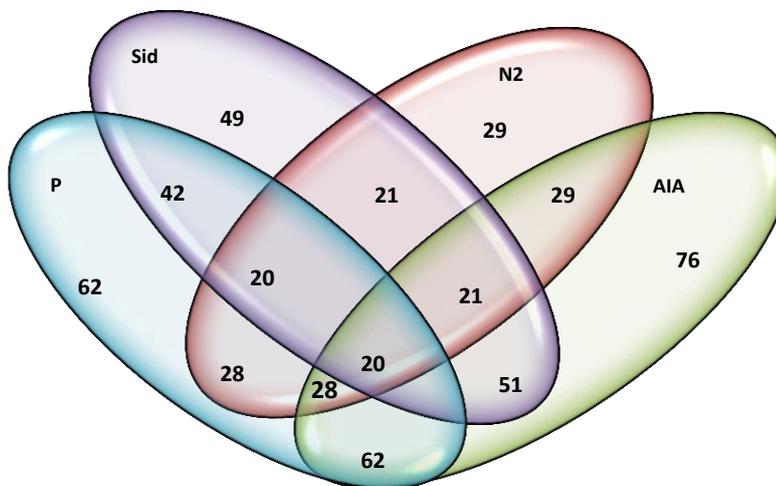


Fig. 12 : Diagram de Venn des activités PGP des isolats

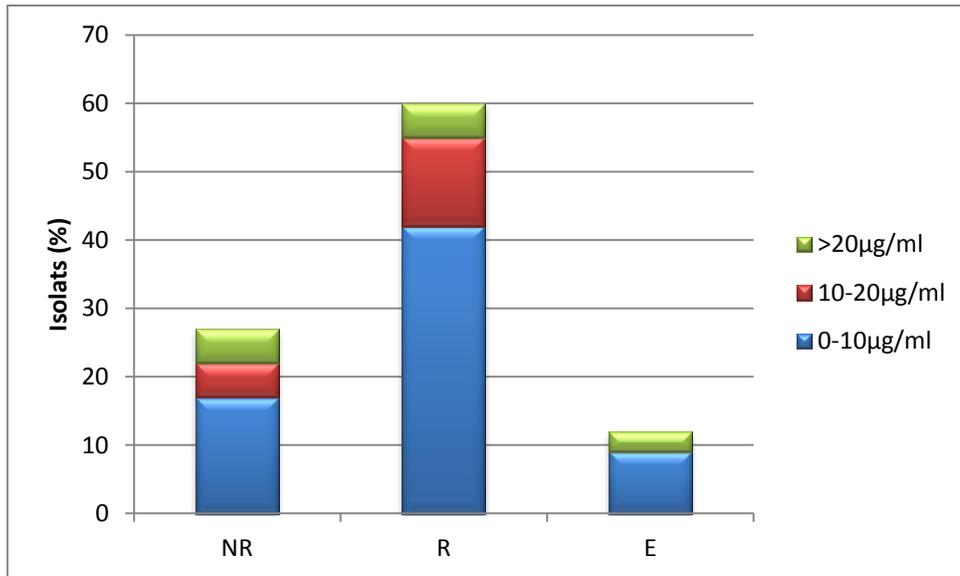


Fig. 13: Taux des isolats producteurs de l'AIA selon le compartiment d'isolement. R, rhizosphérique ; NR, non-rhizosphérique ; E, Endophytique.

La production de l'AIA par les bactéries est mesurée après 48h d'incubation à 28°C (Fig.14). La plupart des isolats non rhizosphériques (17 %), rhizosphériques (42%) et endophytes (9%) produisent de l'AIA avec un intervalle allant de 0 à 10 µg / ml en présence de L-tryptophane (Fig.13). Une production moyenne de 10 à 20 µg/ml est observée chez les bactéries rhizosphériques (13%) et non rhizosphériques (5%). 5% de bactéries rhizosphériques et non rhizosphériques ont la capacité de produire l'AIA à une quantité supérieure à 20 ug / ml. Par contre, seules 3% des bactéries endophytiques sont capables de synthétiser cette quantité.

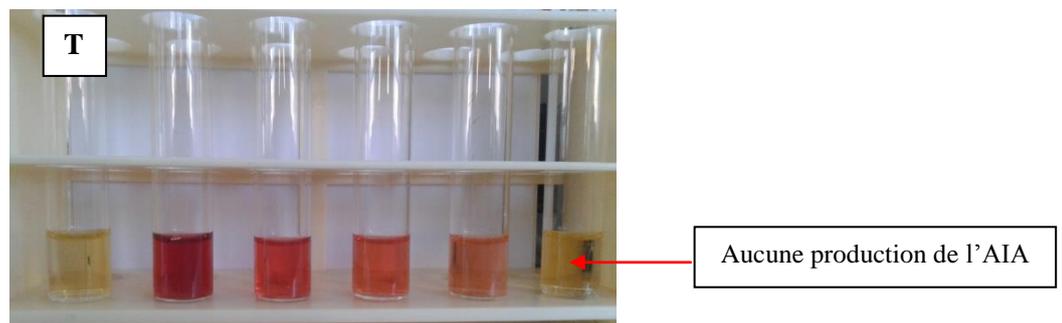


Fig. 14: Production de l'AIA par quelques isolats. L'intensité de la couleur varie selon la quantité de l'AIA produite en comparaison avec le témoin.

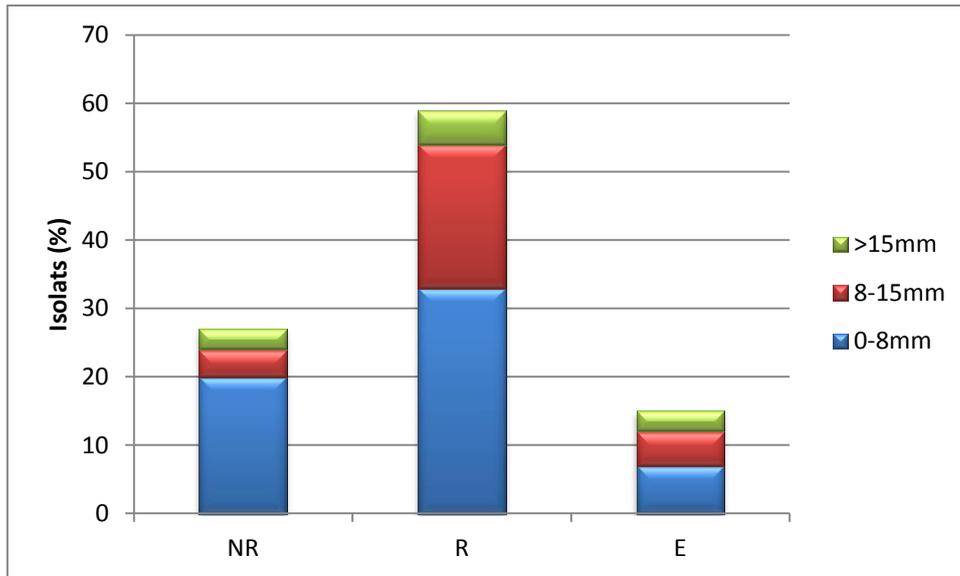


Fig.15: Taux des isolats solubilisateurs du phosphate selon le compartiment d'isolement. R, rhizosphérique ; NR, non-rhizosphérique ; E, Endophytique.

Après 7 jours d'incubation à 28°C, la majorité des bactéries présentent une zone claire autour de la colonie traduisant une solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Fig. 16). Environ 5 % des bactéries rhizosphériques révèlent un halo de solubilisation supérieur à 15 mm, suivies par 3% des endophytes et des isolats non rhizosphériques. Les bactéries rhizosphériques (21%) solubilisent modérément le phosphate avec un diamètre d'halo variant de 8 à 15mm. Viennent, ensuite des isolats non rhizosphériques (4%) et des endophytes (3%). Un diamètre de 0 à 8 mm est observé chez 33%, 20% et 7% des bactéries rhizosphérique, non rhizosphériques et endophytiques, respectivement (Fig. 15)

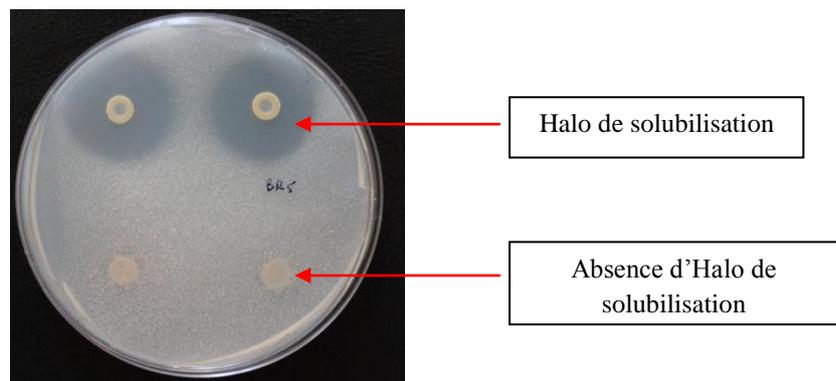


Fig. 16: Halo autour des colonies solubilisatrices du phosphate

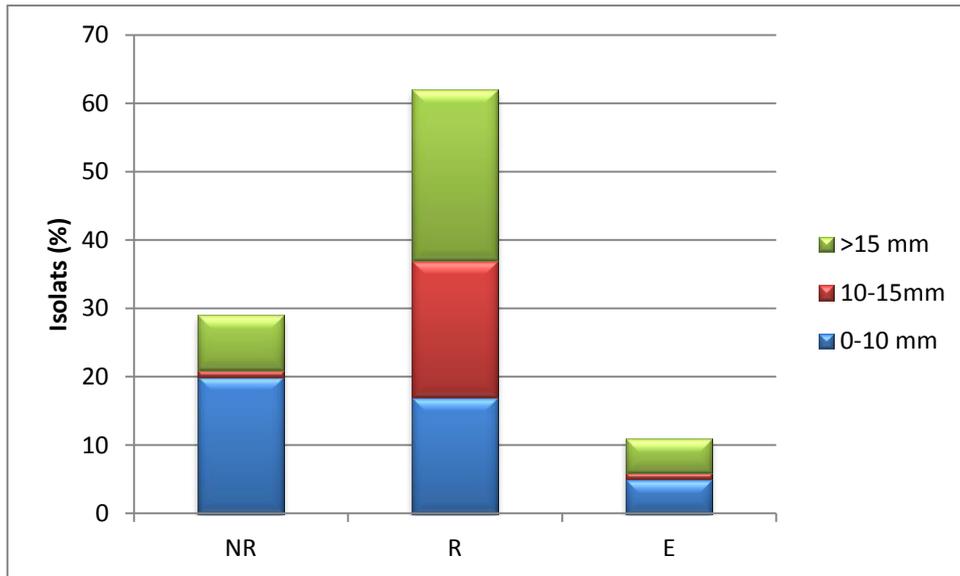


Fig.17: Taux des isolats producteurs de sidérophores selon le compartiment d'isolement. R, rhizosphérique ; NR, non-rhizosphérique ; E, Endophytique

La production de sidérophores par les bactéries étudiées est déterminée après 24h d'incubation à 28°C (Fig. 18). L'apparition d'une zone orangée autour de la colonie sur milieu de King B traduit une production de sidérophores. 25% des isolats rhizosphériques suivie par 8% d'endophytes et des souches non rhizosphériques ont présenté un diamètre d'halo supérieur à 15 cm sur King B (Fig. 17). Un diamètre moyen d'halo allant de 10 à 15 cm est observé chez 20% de bactéries rhizosphériques suivie par 1% pour les endophytes et les non rhizosphériques. Le diamètre de production le plus faible (0-10 cm) est enregistré chez 20% des isolats non rhizosphériques, 17% rhizosphériques et 5% endophytiques.

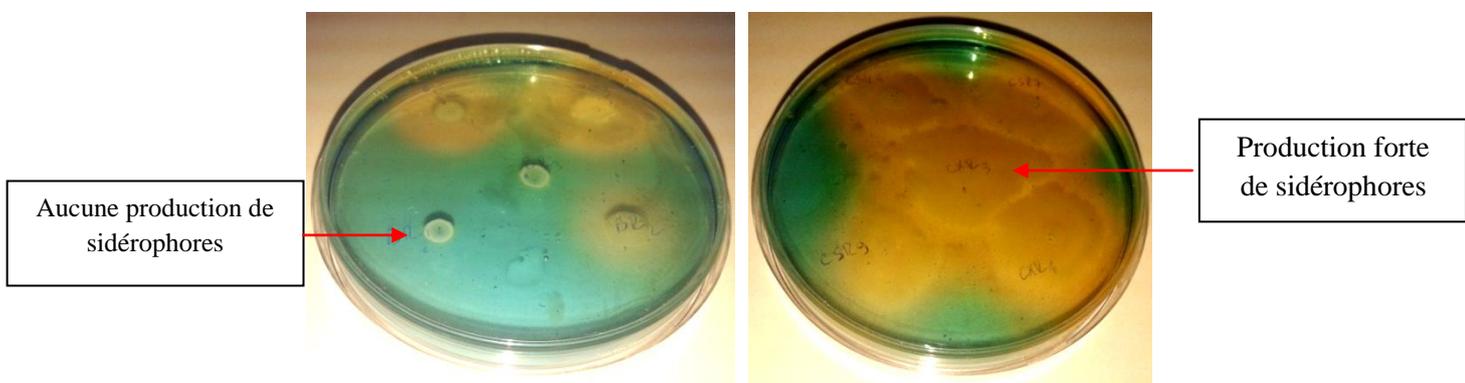


Fig. 18: Halo orange autour des colonies productrices de sidérophores

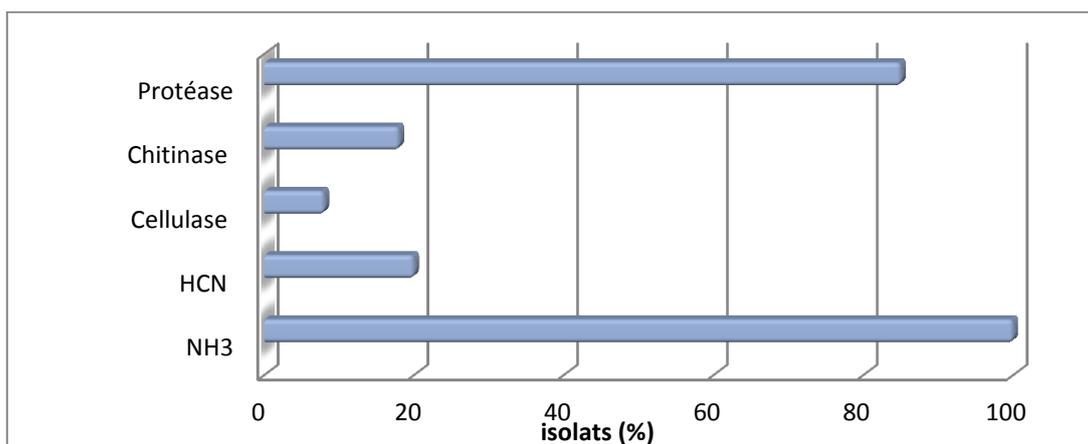


Fig. 19: Fréquence des isolats producteurs d'enzymes extracellulaires, de HCN et de NH₃.

Après 48h d'incubation à 28°C, 100% des bactéries produisent le NH₃ sur milieu peptoné (Fig. 20). 20% de bactéries sont HCN⁺ en virant la couleur du papier filtre vers l'orangée foncée en présence de la glycine (Fig. 21).

Les activités enzymatiques sont détectées par l'apparition d'une zone claire autour des colonies révélée avec une solution d'iode pour la chitinase et le rouge de Congo pour la cellulase (Fig. 22). Après 48h d'incubation sur un milieu contenant la chitine colloïdale, 18% des isolats semblent posséder l'activité chitinolytique. Par contre, seulement 8% ont présenté l'activité cellulolytique sur milieu contenant le carboxyméthyl cellulose. L'activité protéolytique est détectée après 24h d'incubation sur milieu gélosé au lait (Fig. 23). Plus que la moitié des bactéries isolées (58%) semblent productrices de la protéase (Fig.19).



Fig 20: Exemple de quelques isolats producteurs de NH_3 . L'intensité de couleur du milieu variant selon la quantité de NH_3 produite en comparaison avec le témoin

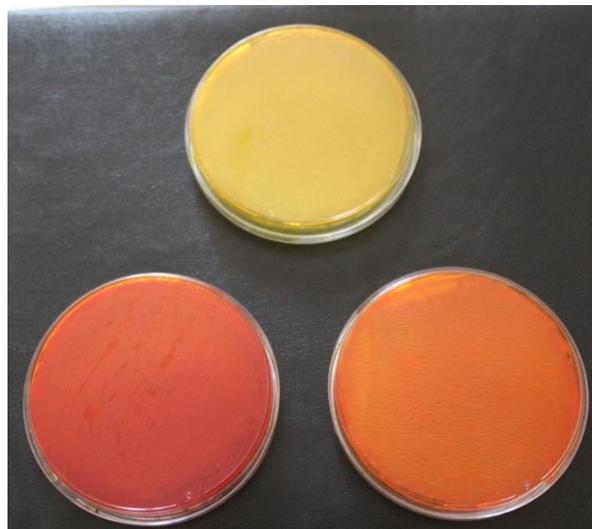


Fig. 21: Activité cyanogène. Couleur jaune (HCN^-), Couleur Orangé (HCN^+), couleur orangé foncée (HCN^{++})

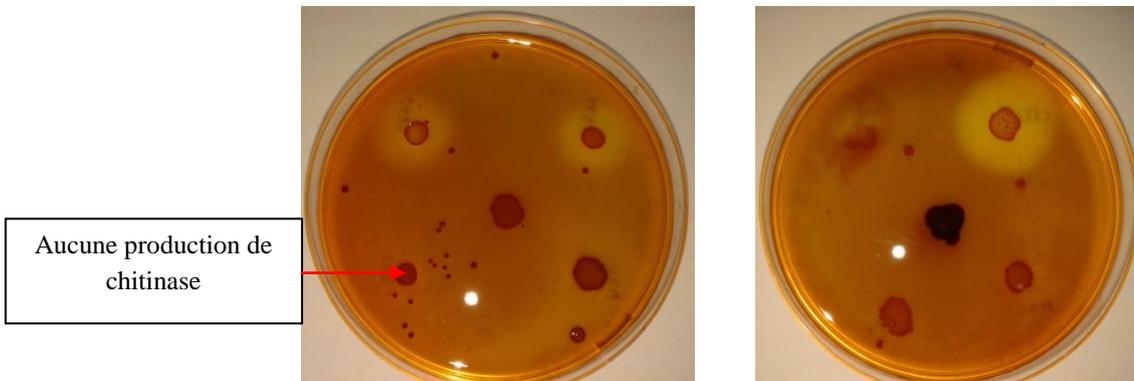


Fig. 22 : Activité chitinolytique. Halo autour des colonies productrices de chitinase

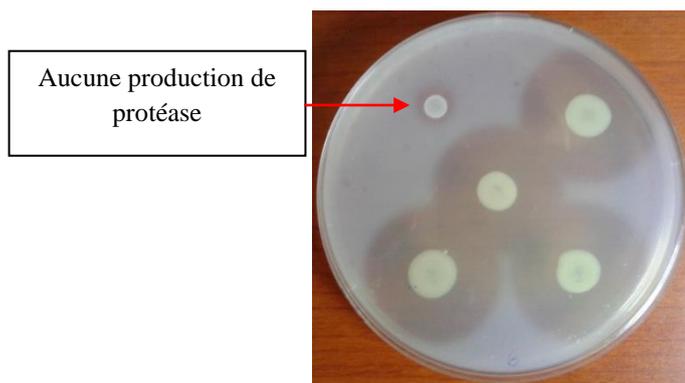


Fig. 23: Activité protéolytique. Halo autour des colonies productrices de protéase.

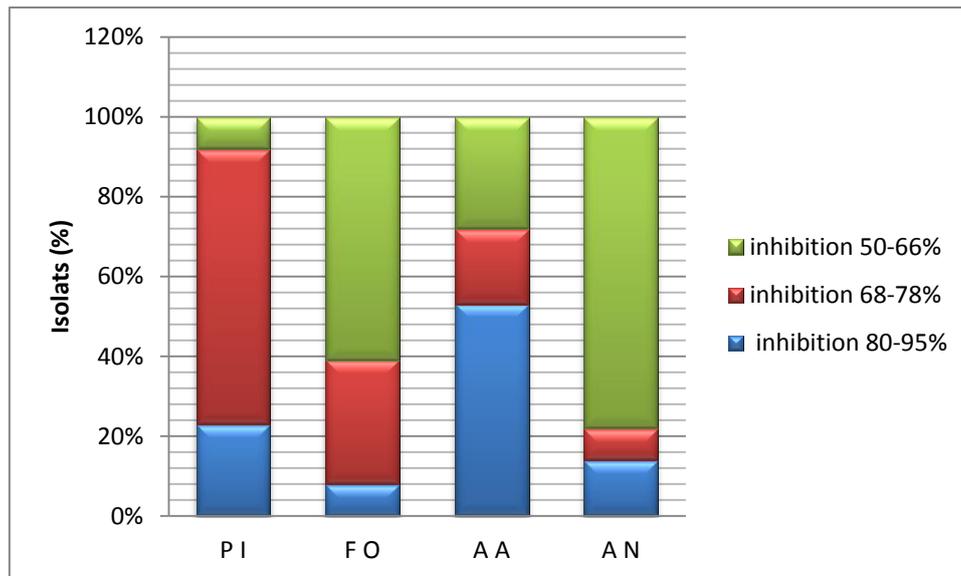


Fig. 24: Activité antifongique des isolats (%) contre des champignons phytopathogènes. *Aspergillus niger* (AN), *Phytophthora infestans* (PI), *Alternaria alternata* (AA) and *Fusarium oxysporum* (FO).

Sur les 76 bactéries isolées, 36 semblent posséder des activités enzymatiques, productrices de l'HCN et de NH₃. Celles-ci ont été retenues pour tester leur activité antifongique envers *Fusarium oxysporum* (FO), *Alternaria alternata* (AA), *Aspergillus niger* (AN) et *Phytophthora infestans* (PI) (Fig. 24). Au terme de 5 jours d'incubation à 28°C, toutes les souches manifestent une action inhibitrice vis-à-vis des champignons testés. Cette activité a été mise en évidence par mesure du pourcentage d'inhibition des champignons soumis à l'action des bactéries étudiées. Un taux d'inhibition maximal de 80-95% est enregistré chez 53% des isolats envers AA suivie par 23% et 14% envers PI et AN, respectivement. Seulement 8% des isolats ont révélé cette forte action antagoniste envers FO. En revanche, 69% des isolats ont présenté une activité inhibitrice moyenne de 68 à 78% envers PI suivie par 31% des isolats envers FO. L'activité inhibitrice la plus faible de 50 à 66% est estimée envers AN et FO à 78%, 61%, respectivement suivie par 28% des isolats contre AA et 8% contre PI.

III- Discussion

Les densités moyennes des bactéries endophytes sont significativement supérieures par rapport à celles du sol rhizosphérique et du sol non influencé par l'halophyte. La densité élevée de la population bactérienne endophytique pourrait s'expliquer par sa localisation à l'intérieur des racines qui les protègent contre le stress salin. Forchetti *et al.* (2007) ont signalé que les bactéries endophytes protègent leurs plantes hôtes contre les différents types de stress. Le nombre de bactéries cultivables isolées du sol rhizosphérique de l'halophyte est plus élevé que le nombre des bactéries non rhizosphériques et endophytiques. Ce nombre élevé de bactéries dans la rhizosphère est lié à la richesse de cette zone en exsudats racinaires secrétés (Merino *et al.*, 2015). Un tel résultat est observé par Mapelli *et al.* (2013) où la rhizosphère de Salicorne semble un habitat très riche en communautés bactériennes en comparaison avec le sol non rhizosphérique. Ceci revient à l'effet rhizosphère qui est décrit par plusieurs auteurs (Berg *et al.*, 2006 ; Marasco *et al.*, 2012 ; Ferjani *et al.*, 2015 ; Soussi *et al.*, 2016). De nombreux auteurs ont, ainsi, précisé que le mucilage et les exsudats représentent des sources de matière organique les plus importantes apportées au sol et assimilées par la microflore tellurique (Wheatley *et al.*, 1990). Selon Zhang *et al.*, (2014), les exsudats racinaires jouent un rôle important dans la dominance des communautés bactériennes rhizosphériques des herbacées et des arboricoles. Les halophytes peuvent aussi influencer le micro-écosystème du sol en agissant sur leurs propriétés physiologiques ainsi que sur sa communauté microbienne (Cao *et al.*, 2014).

Les habitats salés sont caractérisés généralement par une faible population microbienne. Ils sont souvent influencés par de nombreux facteurs interagissant susceptibles de réduire la croissance et la capacité de survie des organismes. La croissance et 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.

Tous les 76 isolats sont testés pour leurs propriétés PGP. La majorité des isolats sont producteurs de l'AIA, des sidérophores, solubilisent les phosphates et fixent le N₂. La présence de telles activités chez des bactéries isolées des sols extrêmes permet de leur offrir une capacité d'adaptation aux contraintes de la salinité. La production de l'AIA par des isolats est un critère important pour l'amélioration de la croissance des plantes. Cette phytohormone est détectée chez 80% des bactéries isolées de la rhizosphère (Upadhyay *et al.*, 2009). Dans notre étude, les bactéries endophytes et les bactéries non rhizosphériques présentent la capacité de produire l'AIA à un taux plus élevé de 20 µg / ml. Ces bactéries endophytes habitant la partie interne des racines pourraient établir des relations intimes avec la plante hôte meilleures que les bactéries résidant dans les autres parties de la plante (Forchetti *et al.*, 2007). L'AIA contribue à l'élongation et la ramification racinaire favorisant l'approvisionnement en eau et en minéraux ainsi que la colonisation racinaire par des bactéries PGPR. Ceci pourrait expliquer l'adaptation des plantes à des sols extrêmes (Felestrino *et al.*, 2017).

Plusieurs études, *in vitro*, ont montré que l'exposition des champignons phytopathogènes à des enzymes lytiques telle la chitinase, la protéase, la gluconase ou la cellulase entraîne une dégradation de la paroi fongique (El-Sayed *et al.*, 2014). L'existence de ces enzymes est une caractéristique associée aux PGPR et leur présence limite la croissance des phytopathogènes fongiques (Dunne *et al.*, 1998). Dans cette étude, sur 76 isolats, 18% produisent la chitinase et 20% produisent le HCN et seulement 8% des isolats sont capables de synthétiser la cellulase. Selon Wilson (2011) l'activité cellulolytique joue un rôle important dans le cycle du carbone. Cette activité est apparait chez un nombre limité des microorganismes du sol. Il a été bien démontré que les micro-organismes autochtones du désert favorisent la croissance des plantes dans les écosystèmes agro-désertiques avec un potentiel antagoniste contre les phytopathogènes (Soussi *et al.*, 2016). Les bactéries halotolérantes isolées des milieux salins pourraient améliorer la croissance des plantes par un mécanisme direct ou indirect (Shrivastava et Kumar, 2015). Tous les isolats sélectionnés dans cette étude sont antifongiques vu leur pouvoir inhibiteur. Ces observations concordent avec celles rapportées par plusieurs auteurs dans d'autres écosystèmes salins. El-Sayed *et al.* (2014) ont constaté que des rhizobactéries isolées de plantes du désert sauvage pourraient avoir une activité antagoniste contre *F. oxysporum* et *S. sclerotiorum*. Elles ont aussi des activités PGP tel la fixation de N₂, la production des sidérophores et de l'AIA et la solubilisation des phosphates.

Chapitre III : Etude de la diversité génétique des bactéries isolées

Une caractérisation taxonomique de la collection des souches à Gram négatif est menée. Cette caractérisation est effectuée par une approche moléculaire permettant une identification plus aisée. Une amplification des espaces inter géniques transcrits (ITS) a été engagée. L'identification taxonomique des souches représentantes de chaque haplotype a été, ensuite, établie par séquençage de l'ADNr 16S.

I- Matériel et méthodes

I-1- Extraction de l'ADN bactérien des isolats à Gram négatif

Un totale de 51 isolats à Gram négatif ont fait l'objet d'une extraction d'ADN par la méthode de Boiling. Des colonies bactériennes pures issues d'une culture fraîche (24h) sont introduites dans des tubes Eppendorf contenant un volume de 180 μ L de Tris-EDTA (TE) (1mM de Tris-HCl et EDTA 10mM (pH 7,4). Les tubes sont ensuite chauffés à 100°C pendant 10 min puis mis sous glace (0°C). Après centrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C), les surnageants contenant les acides nucléiques libérés sont transférés dans des nouveaux tubes Eppendorf. Les surnageants sont gardés à 4°C, pendant une nuit, pour permettre l'élimination de l'ARN.

I-2- Dosage de l'ADN

La quantité d'ADN extraite est évaluée par la mesure de la densité optique à l'aide d'un Spectrophotomètre UV (Nanodrop Thermoscientifique Applied Biosystem). 1 μ l de chaque surnageant est déposé dans une cellule de l'appareil. Le rapport DO_{260}/DO_{280} permet d'évaluer la contamination par des protéines, il doit être entre 1,7 et 1,9.

I-3- PCR/ITS

Afin d'évaluer la diversité génétique des bactéries à Gram négatif sélectionnées, une caractérisation moléculaire par l'amplification des espaces inter géniques transcrits (ITS) est effectué. Tout comme le 16SrDNA, les ITS peuvent être présents en multiples copies dans un même génome mais également variables d'une copie à l'autre sur le chromosome (Fig. 25). Plusieurs fragments d'ADN de différentes tailles sont observables donnant une première idée sur la biodiversité des isolats. L'amplification des ITS permet de donner des résultats rapides sur un grand nombre d'isolats.

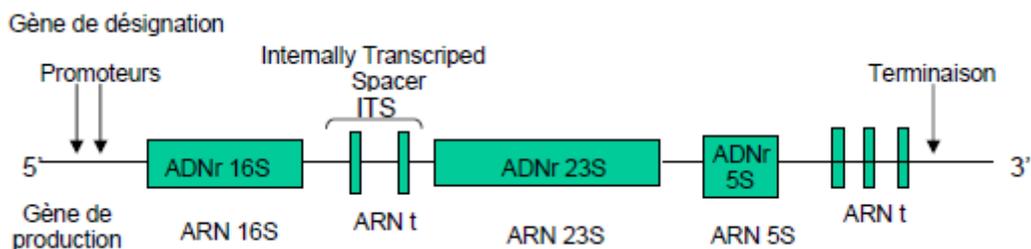


Fig. 25 : Représentation schématique de l'opéron ribosomal d'ADNr des procaryotes
(Konate, 2006).

Les molécules de l'opéron ribosomal 16S et 23S ainsi que la région ITS sont considérés par rapport à 5S très informatives. D'où leur utilisation dans les études de la diversité génétique et de la polygénie des rhizobactéries (Van Berkum *et al.*, 2003). L'ADN récupéré précédemment est utilisé pour l'amplification de la région ITS, en utilisant des amorces spécifiques : ITSR (5'CAAGGCATCCACGT3') et ITSF (5'GTCGTAACAAGGTAGCC GTA 3'). Le volume final du mélange réactionnel est fixé à 25µl. Un contrôle négatif contenant l'eau milli-Q stérile au lieu de l'ADN est inclus dans chaque réaction PCR.

La composition du mix est présentée dans le Tab.2 :

Tab. 2: Composition de Mix de PCR-ITS

Élément de mélange	Volume de prise (µl)
Tampon PCR (x10)	2.5
DNTPs (25mM)	0.25
Amorces (25mM)	0.5
Taq polymérase (5U/µl)	0.22
ADN (ng/µl)	1

Les amplifications PCR/ITS ont été conduites dans un thermocycleur (Bio-Rad) selon le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 94°C/3min
 - Dénaturation : 94°C/45s
 - Hybridation : 55°C/1min
 - Elongation : 72°C/2min
 - Elongation finale 72°C/7min
 - Refroidissement 4°C/10min
- } X35

I-4- Electrophorèse sur gel d'agarose

Après amplification, les produit de PCR sont vérifiés sur un gel d'agarose (2%) coloré avec le bromure d'éthidium BET (0.1%). Un volume de 4µl d'ADN amplifié plus 2µl de tampon de charge sont déposés dans les puits du gel. Les amplifias sont migrés dans le tampon TBE (Tampon Tris Borate) pendant 20 mn à 100V. Le gel est visualisé sous lumière UV.

I-5- Analyse du gel

Les images de gel ont été capturées en utilisant le système Gel Doc 2000 (Bio-Rad) et la redondance bactérienne a été réduite en évaluant les différents profils ITS. Les souches présentant les mêmes profils de bandes d'ITS sont regroupées dans le même haplotype. En combinant les différents profils obtenus, 17 haplotypes sont distingués dont une souche représentative de chaque profil a fait l'objet d'une amplification du gène de l'ARNr 16S et l'analyse phylogénétique.

I-6- Identification moléculaire

a- PCR-16S

La réaction de polymérisation en chaîne permet l'amplification sélective, *in vitro*, d'une séquence d'ADN génomique, plasmidique ou encore d'ADNc, conduisant ainsi à l'accumulation d'un grand nombre de copies de ce fragment. L'ADN préparé précédemment est utilisé pour l'amplification du gène de l'ADNr 16S. Les réactions d'amplification de l'ADN sont conduites dans un volume réactionnel de 25µl, en utilisant les deux amorces universelles 16SR (5'CTACGGCTACCTTGTTACGA3') et 16SF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'). Un témoin négatif sans ADN est réalisé pour chaque expérience pour s'assurer de l'absence de la contamination de l'ADN amplifié. La composition du mix est présentée dans le tableau ci-dessous :

Tab.3: Composition de Mix de PCR-16S

Elément de mélange	Volume de prise (µl)
Tampon PCR (x10)	2.5
DNTPs (25mM)	0.6
MgCl ₂ (25mM)	1.75
Amorces (25mM)	0.3
Taq polymérase (5U/µl)	0.22
DMSO (10%)	1.25
ADN (ng/µl)	1

L'amplification a été faite dans un thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) (Bio-Rad) en appliquant le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 94°C/3min
 - Dénaturation : 94°C/45s
 - Hybridation : 55°C/1min
 - Elongation : 72°C/2min
 - Elongation finale 72°C/7min
 - Refroidissement 4°C/10min
- } X35

b- Séquençage de l'ADN 16S

Les 17 isolats ont fait l'objet du séquençage du gène ADNr 16S. 60ng de chaque produit est utilisé comme matrice pour les réactions de séquençage sur un séquenceur (ABI 3130 Applied Biosystem), au laboratoire LMBA de l'Université d'El Mannar, Tunis. Les fragments d'ADN séquencés vont jusqu'au 1500pb. Les séquences nucléotidiques sont récupérées sous format FASTA puis introduites dans le logiciel « ChromasPro ». Elles sont analysées par la suite avec BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)) et comparées aux séquences d'ADNr 16S bactériennes disponibles dans la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information).

c- Arbre phylogénétique

Les séquences sont alignées en utilisant le ClustalW version 1.8. puis soumises à la construction d'un arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-Joining à l'aide d'un logiciel MEGA 6. Les séquences nucléotidiques sont soumises dans la base de données GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

II- Résultats

II-1- Identification des souches et les analyses phylogénétiques

Sur les 76 isolats bactériens, 51 sont à Gram négatif. Ces derniers ont été soumis à l'amplification des régions ITS pour déterminer leur diversité génotypique. La technique d'ITS permet de grouper le nombre des isolats et choisir les candidats représentatifs de chaque groupe à fin de les identifier. L'amplification des ITS des 51 isolats a abouti à l'obtention des bandes d'ADN distincts dont la taille et le nombre. 17 profils différents ont été obtenus par PCR ITS, ils ont été groupés et comparés. Après comparaison, ces profils ont montré des bandes polymorphes de taille comprise entre 200 et 500 pb (Fig. 26). Un isolat représentant de chaque haplotype a été caractérisé par le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Les résultats sont présentés dans le Tab 5. Le plus grand nombre de profils est observé dans la partie rhizosphérique (10 profils) suivie par la partie non-rhizosphérique (04 profils) et endophytique (03 profils), respectivement.

L'identification moléculaire du gène ADN 16S a révélé que les haplotypes H1, H2, H5, H6, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H16 et H17 appartiennent au genre *Pseudomonas*. Les haplotypes H 9, H12, H13 et H15 sont isolés des échantillons non rhizosphériques des sites MS, OS et SS. Les échantillons rhizosphériques sont représentés par 08 sur 12 haplotypes de *Pseudomonas*: H1, H2, H5, H6, H10, H11, H14, H16, et H17 (Fig. 27). Les haplotypes H3 et H4 sont assignés au genre *Providencia*, Ils ont été retrouvés dans la partie rhizosphérique et endophytique des sites MS et BS respectivement (Tab. 5).

Les haplotypes H8 et H15 appartiennent au genre *Acinetobacter*. Ils ont été isolés de la partie rhizosphérique et non rhizosphérique des sites FLS et MS, respectivement. L'haplotype H7 appartient au genre *Enterobacter*, il est d'origine endophytique du site BS.

L'arbre phylogénétique obtenu par Neighbor-joining dendrogramme a montré quatre cluster différents dont le cluster 1 appartient au genre *Pseudomonas*. 12 espèces de ce genre ont été

identifiées comme *P. knackmussii*, *P. marginalis*, *P. xanthomarine*, *P. putida*, *P. cremoricolorata*, *P.baetica*, *P.thivervalensis*, *P.fragi*, *P. frederiksbergensis*, *P. koreensis*, *P. punonensis* et *P. azotoformans* (Fig. 27). Toutes les espèces de *Pseudomonas* ont été réparties dans un large éventail de site dans le même phylum de Proteobacteria. Le second cluster regroupe une seule espèce présentant une très grande ressemblance à *Enterobacter cloacae*. Le troisième et le quatrième cluster sont affiliés à deux genres *Acinetobacter* et *Providencia* chacun d'entre eux est représenté par 2 espèces. Il s'agit de *A. schindleri*, *A. johnsonii*, et *P. vermicola*, *P. rettgeri*, respectivement.

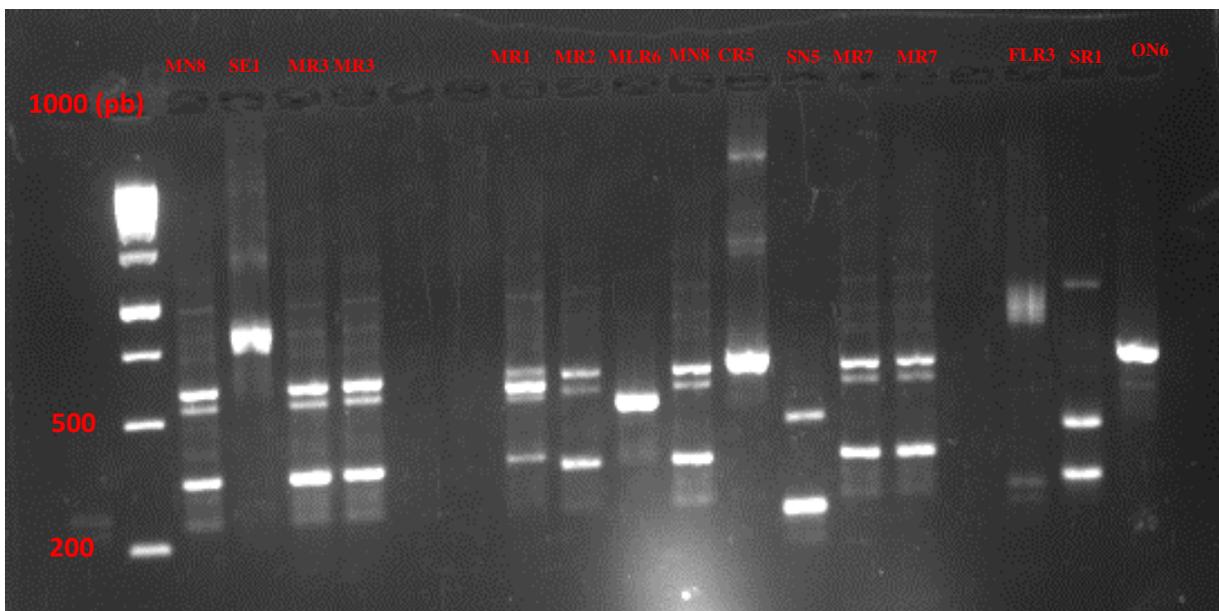


Fig. 26: Exemple d'analyse en gel d'électrophorèse obtenu après amplification des fragments ITS par PCR à partir d'ADN extrait de quelques souches bactériennes à Gram négatif.

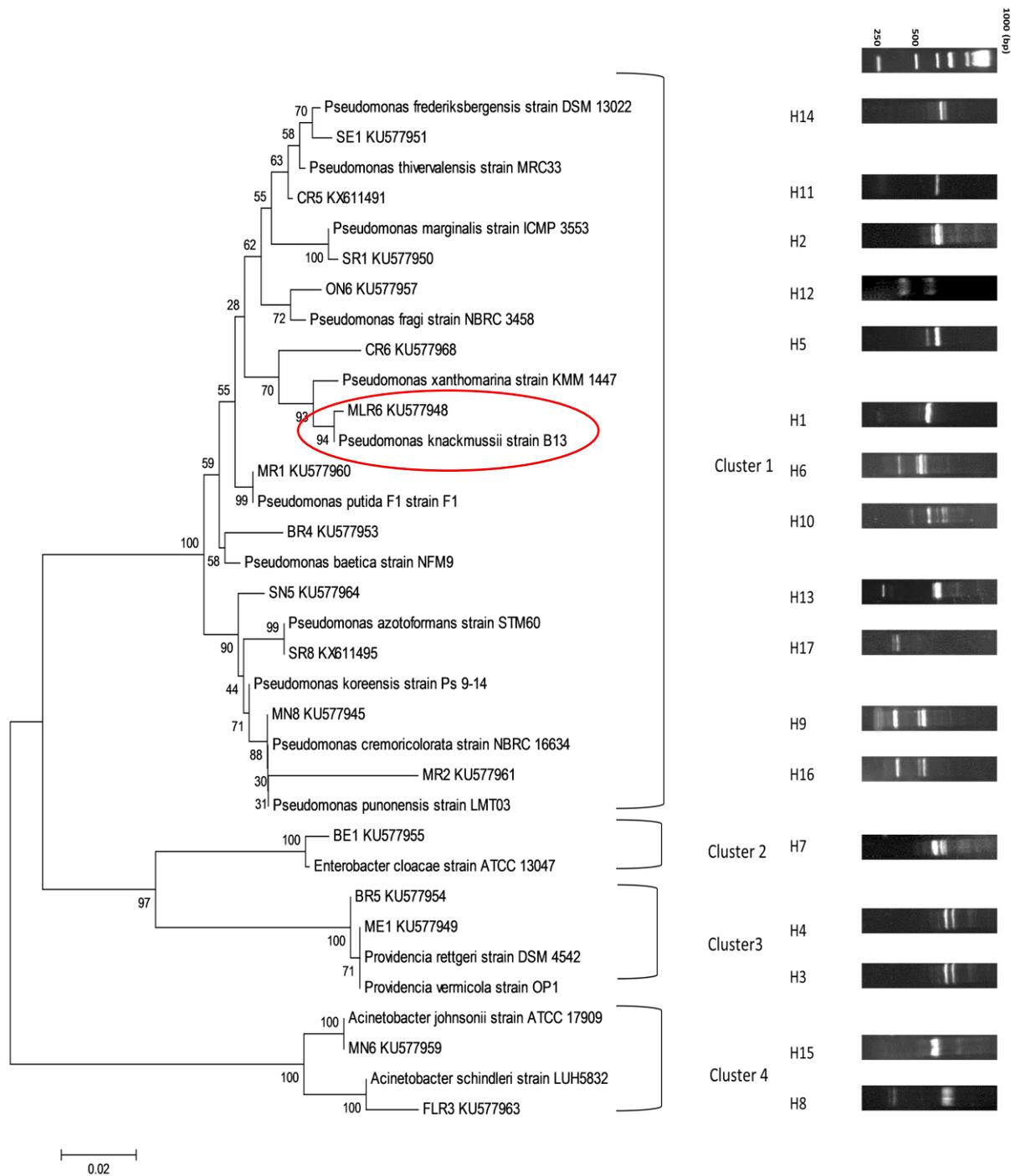


Fig. 27 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S des isolats. L'arbre est construit par la méthode de neighbor- joining. Les nombres sur l'arbre indiquent les pourcentages de 1000 réplifications.

Tab.4 : Affiliation taxonomique des 17 haplotypes identifiés

Souches représentative des Haplotypes d'ITS	Compartiment ^a	Origine ^b	Numéro d'accension	Similarité
H1-MLR6	R	MLS	KU577948	<i>Pseudomonas knackmussi</i> strain B13 (99%)
H2-SR1	R	SS	KU577950	<i>Pseudomonas marginalis</i> strain ICMP 3553 (99%)
H3- ME1	E	MS	KU577949	<i>Providencia vermicola</i> strain OPI (99%)
H4- BR5	R	BS	KU577954	<i>Providencia rettgeri</i> strain DSM 4542 (98%)
H5- CR6	R	CE	KU577968	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> strain KMM 1447 (94%)
H6- MR1	R	MS	KU577960	<i>Pseudomonas putida</i> strain F1 (99%)
H7- BE1	E	BS	KU577955	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC 13047 (98%)
H8- FLR3	R	FLS	KU577963	<i>Acinetobacter schindleri</i> strain LUH5832 (98%)
H9- MN8	NR	MS	KU577945	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> strain NBRC 16634 (99%)
H10- BR4	R	BS	KU577953	<i>Pseudomonas baetica</i> strain NFM9 (95%)
H11- CR5	R	CE	KX611491	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> strain MRC33
H12- ON6	NR	OS	KU577957	<i>Pseudomonas fragi</i> strain NBRC 3458 (98%)
H13- SN5	NR	SS	KU577964	<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9-14 (96%)
H14- SE1	E	SS	KU577951	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain DSM 13022 (97%)
H15- MN6	NR	MS	KU577959	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909 (99%)
H16-MR2	R	MS	KU577961	<i>Pseudomonas punonensis</i> strain LMT03 (94%)
H17-SR8	R	SS	KX611495	<i>Pseudomonas azotoformans</i> strain STM60 (99%)

^a compartiment : R, rhizosphérique ; NR, non-rhizosphérique ; E, Endophytique

^b origine : Sebkhet Soukhna (SS);, sebkhet Baniou (BS); sebkhet Mcif (MS) ; Sebkha d' Oran (OS) ; Sebkhet Melghir (MLS); Sebkhet Felghir (FLS) ; Chott Echerguie (CE)

III- Discussion

Un total de 17 profils de bactéries à Gram négatif sont détectés par l'amplification des régions ITS. Le plus grand nombre de profils est retrouvé dans la partie rhizosphérique. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Shi *et al.* (2015) où une grande biodiversité bactérienne est détectée dans la rhizosphère de *Salicornia europaea*. Celle-ci est influencée par une amélioration de la disponibilité du carbone par les exsudats racinaires dans leur rhizosphère (Chaudhary *et al.* 2016). Toutefois, la diversité des bactéries endophytes est faible. Cette observation concorde avec celle rapportée par Szymańska *et al.* (2014) qui attribuent la faible diversité des bactéries endophytes à leur utilisation d'une gamme étroite de source de carbone en comparaison avec les bactéries rhizosphériques.

Dans cette étude, les haplotypes sont obtenus par l'amplification des régions ITS. Cet outil moléculaire basé sur l'hétérogénéité des bandes ITS de l'opéron d'ARNr 16S-23S bactérien, fournit une haute résolution phylogénétique (Hidri *et al.*, 2013). Le gène ribosomique 16S des isolats représentant des haplotypes est partiellement séquencé. L'analyse phylogénétique a permis de classer les 17 haplotypes dans un groupe taxonomique principal. Il s'agit de Proteobacteria. Ce groupe est détecté comme le phylum le plus dominant. Ces résultats sont en accord avec les constatations précédentes où Proteobacteria présente la plus grande proportion de la communauté bactérienne (Hu *et al.*, 2014; Ai *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). L'abondance des espèces de *Pseudomonas* est similaire à celle rapportée dans

plusieurs autres travaux sur des échantillons de sol et de racines (Rangarajan *et al.*, 2002). Hu *et al.* (2014) ont noté que la majorité des espèces bactériennes détectées dans les sols salins appartiennent à des bactéries à Gram négatif et, en particulier, au genre de *Pseudomonas* spp. L'abondance des bactéries à Gram-négatif revient probablement à la composition de leur paroi cellulaire qui protège la membrane cellulaire contre les contraintes du stress osmotique ou mécanique.

L'analyse phylogénétique basée sur le séquençage de l'ADNr 16s indique que parmi les 4 genres obtenus le genre *Pseudomonas* est dominant avec 12 espèces. Tous les autres genres obtenus sont représentés par 2 espèces ou plus. Le genre *Pseudomonas* est répandu dans les sols salins avec les espèces : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. mallei*, et *P. diminuta* (Rangarajan *et al.* 2002). Ces dernières sont capables de tolérer divers stress abiotiques. Les Pseudomonads sont connus pour être largement répandus dans différents environnements tels que les milieux aquatiques ou les sols.

Le genre *Acinetobacter* regroupe des espèces susceptibles de se comporter comme PGPR favorisant la croissance des plantes, en particulier, dans des conditions environnementales stressées où les apports de fer et le phosphate sont limités (Farokh *et al.*, 2011). Hussain *et al.*, (2015) ont identifié la souche *Providencia vermicola* comme souche solubilisatrice des phosphates et productrice des auxines, en plus, de sa capacité à réduire l'acétylène. La souche *Enterobacter* sp. EJ01 isolée de *Dianthus japonicus* Thunb (China Sea rose) est qualifiée comme PGPR capable de favoriser la croissance de la tomate et de *Arabidopsis* en atténuant l'effet de stress salin (Kang *et al.*, 2014).

Il est important de signaler que les conditions de cultures choisies ont conditionné cette biodiversité et nous pouvons supposer que dans d'autres conditions (milieux de culture et des températures variées), la diversité aurait été encore plus grande (Peeters *et al.*, 2011). Le séquençage de l'ADNr 16s nous a permis d'identifier les isolats à Gram négatif. Néanmoins, ces souches nécessitent une caractérisation physiologique, ce qui nous a mené à étudier l'impact de NaCl, du pH et du PEG sur la croissance et l'impact de NaCl sur les activités PGPR.

La diminution de la diversité et de la charge bactérienne est liée à l'augmentation de la concentration en sel dans les écosystèmes salins (Ventousa *et al.*, 1998). D'après Xiao *et al.* (2016), la diversité microbienne est faible dans les environnements hypersalins et elle diminue si la salinité augmente. Une forte salinité dans le sol induit différents degrés d'inhibition des populations microbiennes présentes ainsi que leurs activités (Cao *et al.*,

2014). La diversité phylogénétique est affectée donc par la salinité (Taniguchi *et al.*, 2015). Ces données sont en accord avec nos résultats.

Les travaux de Cong *et al.* (2014) ont signalé que la biomasse bactérienne et fongique augmente avec le déclin de la salinité. La différence de la diversité bactérienne entre les régions pourrait être expliquée par la disponibilité d'oxygène, la minéralisation, et la teneur en hydrocarbures (Marasco *et al.*, 2016). Plusieurs données ont supposé que la combinaison de facteurs environnementaux, y compris le climat chaud et sec, pourrait influencer la différence entre les communautés bactériennes des fractions du sol associées au système racinaire des palmiers dattiers cultivées dans les oasis tunisiennes (Ferjani *et al.* 2015). L'abondance de certains groupes taxonomiques par rapport à d'autres reviendrait à leur capacité de tolérance à la salinité. De même, ils pourraient être moins dépendant des autres facteurs déterminant leur abondance, tels le présence de matière organique, etc. (Canfora *et al.*, 2014).

Chapitre IV : Effet du stress salin sur la croissance et les traits PGP des souches sélectionnées

Le séquençage de l'ADNr 16s nous a permis d'identifier les isolats à Gram négatif (Chapitre III). Néanmoins, ces souches nécessitent une caractérisation physiologique, ce qui nous a mené à étudier l'impact de NaCl, de pH et de PEG₈₀₀₀ sur leur croissance. Nous avons étudié, aussi, la capacité de ces souches à manifester les principales activités PGP, y compris, la production de sidérophores, de l'AIA et la solubilisation du phosphate en conditions de stress salin.

I- Matériel et méthodes

I-1- Tolérance au NaCl au PEG₈₀₀₀ et au pH

La tolérance de 17 souches à Gram négatif à la salinité, au stress hydrique et au pH (acide et basique) est évaluée sur des microplaques de 96 puits ensemencées avec 200µl de milieu TSB additionné de NaCl (0 à 2,2M) et /ou de PEG₈₀₀₀ (de 0 à 70%) ; le pH du milieu est ajusté avec du KOH pour les valeurs comprises entre 7 et 11 et par du HCl pour les pHs de 4 et 6. Les puits de microplaques sont inoculés avec 10µl de chaque préculture bactérienne préparée sur milieu TSB sans sel. Les tests sont réalisés en duplicata. La croissance des bactéries est estimée après 48 h d'incubation à 30°C avec un lecteur de microplaque (Multiskan GO, version 1.00.40).

I-2- Effet du NaCl sur les traits PGPR

Cinq isolats *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia vermicola* ME1, *Pseudomonas knackmussi* MLR6, *Providencia rettgeri* BR5 et *Pseudomonas frederiksbergensis* SE1 tolérant divers stress abiotiques testés ont été choisis pour évaluer leurs activités PGP sous stress salin.

a- Effet du NaCl sur la solubilisation du phosphate en milieu liquide

Les cinq souches sélectionnées sont testées qualitativement pour la solubilisation du phosphate selon la méthode de Nautiyal (1999) modifiée par l'ajout des concentrations de NaCl (0- 0,1- 0,15- 0,2- 0,25- 0,3M de NaCl). 10 ml de milieu liquide PVK sont inoculés (1%) avec une culture fraîche de 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 Fiske et Subbarow (1925) (Annexe15). La lecture spectrophotométrique est réalisée à 660 nm contre un blanc et la quantité de phosphate soluble est déterminée d'après la courbe d'étalonnage (Annexe 16). Ce test est réalisé en triplicata.

b- Effet du NaCl sur la production des siderophores en milieu liquide

Les souches sélectionnées sont testées pour la production de siderophores sur un milieu liquide King B avec 0- 0,1- 0,15- 0,2- 0,25 et 0,3M de NaCl. 10ml du milieu sont inoculés avec 100 µl d'une culture fraîche de la bactérie. Après 48h d'incubation à 28°C, les cultures sont centrifugées (4000 rpm/20min). 2 ml de milieu liquide Chrom Azurol S (CAS) (Schwyn et Neilands, 1987) sont ajoutés à 2 ml de surnageant et incubés 30 min à l'obscurité. Le développement d'une couleur orange indique la production des siderophores. La DO est mesurée à 630 nm et les unités de siderophores sont calculées comme suit:

$$\% \text{ siderophore} = (A_r) - (A_s) / (A_r) \times 100$$

où A_r est l'absorbance de la solution de CAS; A_s est l'absorbance des l'échantillons.

c- Effet du NaCl sur la production de l'AIA

La quantité d'AIA produite par les souches est déterminée selon la méthode décrite précédemment mais, cette fois ci, en présence des concentrations croissantes de NaCl (0- 0,1- 0,15- 0,2- 0,25- 0,3M de NaCl). Les cultures sont incubées pendant 6 jours. La présence de l'AIA est révélée par l'addition du réactif de Salkowsky. L'intensité de la couleur est mesurée à 530 nm selon la méthode décrite plus haut.

I-3- Analyses multivariées

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée afin de mettre en évidence les souches les plus performantes. Cette première ACP a porté sur l'ensemble des résultats de la production des siderophores, de l'AIA et la solubilisation des phosphates d'un coté et le comportement des souches en présence de stress d'un autre coté.

Une deuxième ACP a été réalisée pour mettre en évidence les souches les plus actives en se basant sur l'effet du NaCl sur les activités PGP pour procéder au choix des souches

candidates à l'inoculation. L'ACP est effectuée par le logiciel SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

II- Résultats

II-1- Effet de NaCl, PEG₈₀₀₀ et de pH sur la croissance bactérienne

Le comportement de 17 souches à Gram négatif cultivée dans un milieu LB avec des concentrations croissantes de NaCl, PEG₈₀₀₀ et pH est étudié (Tab.5). Après 48h d'incubation à 28°C, la croissance des souches est déterminée par mesure de la DO_{λ600nm}. La majorité des souches conservent une capacité de croissance jusqu'à 1,8M. Néanmoins, les souches *P. knackmussii* MLR6, *P. marginalis* SR1 et *E. cloacae* BE1 tolèrent jusqu'à 2M elles semblent les plus tolérantes. Aucune croissance n'est observée au-delà de cette concentration. Les souches étudiées ont une forte capacité de tolérance au PEG₈₀₀₀. Leur croissance est observée jusqu'à 60%. Par contre, la tolérance des souches *P. koreensis* SN5, *P. frederiksbergensis* SE1 et *P. azotoformans* SR8 ne dépasse guère 30%. Toutes les souches étudiées ont montré une bonne capacité de croissance à des valeurs élevées de pH (pH9 et 11). Parmi elles *P. marginalis* SR1 et *E. cloacae strain* BE1 sont capables de croître à un pH 4.

Tab. 5 : Effet de NaCl, PEG₈₀₀₀ et pH sur la croissance des souches bactériennes

Souches	NaCl (M)	PEG ₈₀₀₀ (%)	pH			
			4	7	9	11
<i>Pseudomonas knackmussii</i> MLR6	0-2	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas marginalis</i> SR1	0-2	0-60	+	+	+	+
<i>Providencia vermicola</i> ME1	0-1.6	0-60	-	+	+	+
<i>Providencia rettgeri</i> BR5	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas xanthomarina</i> CR6	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i> MR1	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> BE1	0-2	0-60	+	+	+	+
<i>Acinetobacter schindleri</i> FLR3	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> MN8	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas baetica</i> BR4	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> CR5	0-1.2	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas fragi</i> ON6	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas koreensis</i> SN5	0-1.8	0-30	-	+	+	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> SE1	0-1.2	0-30	-	+	+	+
<i>Acinetobacter johnsonii</i> MN6	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas punonensis</i> MR2	0-1.8	0-60	-	+	+	+
<i>Pseudomonas azotoformans</i> SR8	0-1.8	0-30	-	+	+	+

II-2- ACP des activités PGP et l'effet du stress sur les souches sélectionnées

Les 17 souches ont fait l'objet d'une analyse de l'ACP pour comparer leurs propriétés PGP et leur capacité de tolérance aux différents stress testés. Une corrélation positive est observée entre la production des sidérophores et la solubilisation des phosphates, par contre, elle est négative avec la production de l'AIA. En revanche, une corrélation positive est observée entre le NaCl et le pH et négative avec le PEG₈₀₀₀ (Fig. 28). Concernant le comportement des souches vis-à-vis des activités et du stress appliqués, 3 groupes sont ressortis : le premier est composé des souches (BE1 et SR1) qui ont une forte capacité de tolérances au stress. Au fait, leur position est proche de NaCl, PEG et pH. Le deuxième groupe est composé des souches solubilisatrices des phosphates et productrices des sidérophores et tolérantes aux concentrations élevées de PEG (BR5, SN5, ON6, SR8, CR6, FLR3 et SE1). Le troisième groupe est composé des souches productrices de l'AIA et qui ont manifesté une bonne capacité de tolérance au stress salin (BR5, MN6, MR1, MN8, ME1, MLR6, CR5 et MR2). Parmi les 17 souches testées, 5 souches (BE1, ME1, MLR6, BR5 et SE1) ont été retenues d'une façon de choisir une souche représentative de chaque groupe obtenu. La souche SE1 est solubilisatrice du phosphate et productrice de sidérophores. BR5 et ME sont productrice de l'AIA. BE1 est productrice de l'AIA et tolérante au NaCl et au pH acide. MLR6 semble posséder les trois activités et elle est tolérante à tous les stress testés (Fig. 29).

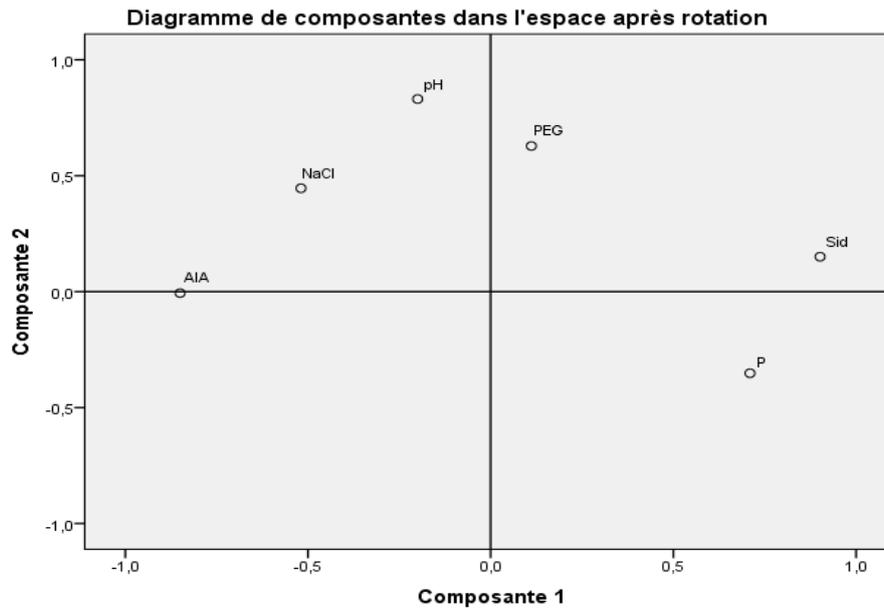


Fig. 28 : ACP des activités PGP et du stress appliqué

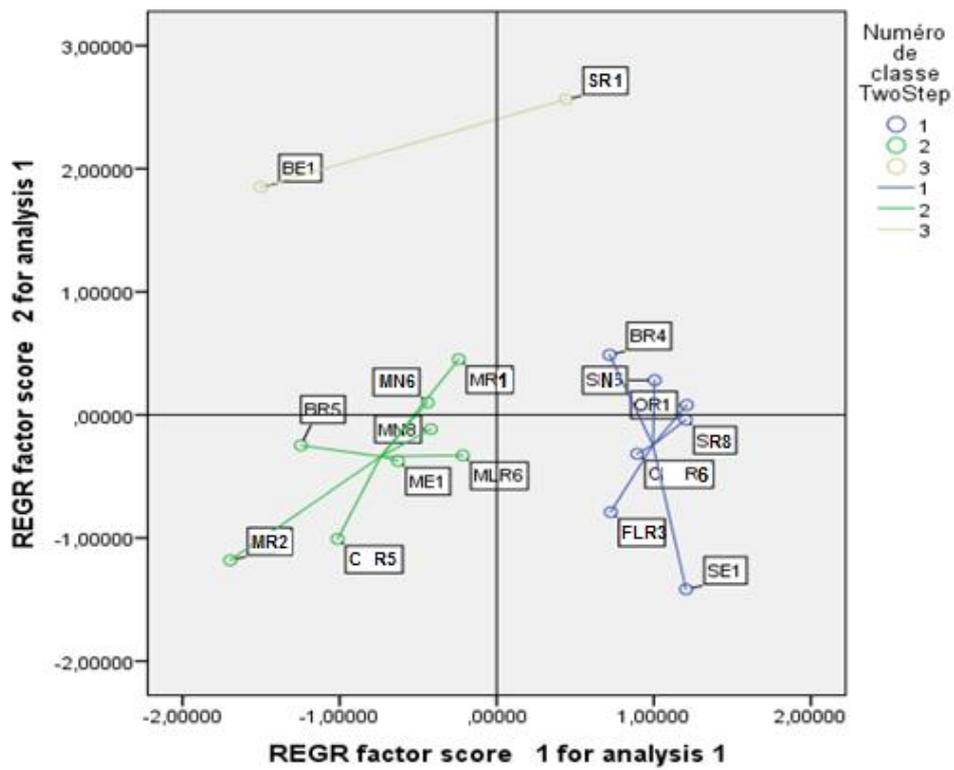


Fig. 29 : ACP de l'effet du stress et les activités PGP des souches

II-3- Effet du NaCl sur les activités promotrices de la croissance végétale

Les souches *E. cloacae* BE1, *P. vermicola* ME1, *P. knackmussii* MLR6, *P. rettgeri* BR5 et *P. frederiksbergensis* SE1 sont sélectionnées en raison de leurs caractéristiques physiologiques et de leurs propriétés PGPR.

Toutes les souches sélectionnées sont capables de produire l'AIA, les sidérophores et de solubiliser le phosphate inorganique en absence ainsi qu'en présence de stress salin. Les données du Tab. 6 montrent que l'augmentation de la concentration en NaCl n'a pas d'effet sur l'AIA et les sidérophores, cependant la solubilisation du phosphate est significativement affectée (Tab. 7). La production de l'AIA par les cinq souches étudiées est mesurée après 48h d'incubation à 28°C. Toutes les souches sélectionnées produisent de l'AIA à des quantités importantes dans toute la gamme de NaCl testés 0-0,3M NaCl. La quantité moyenne produite par BR5 (73,88µg/ml) est la plus élevée suivie par ME1 (30,15µg/ml) et MLR6 (23,12 µg/ml) (Fig. 30). Les souches BE1 (17,01 µg/ml) et SE1 (8,42 µg/ml) produisent une quantité un peu moindre. En présence de stress salin, le taux de production n'a pas été modifié chez toutes les souches comparées aux témoins sans sel. Après 7 jours d'incubation à 28 °C sur milieu PVK liquide additionné de Ca₃(PO₄)₂, la solubilisation du phosphate est testée. L'indication de la production de phosphates solubles se traduit par l'apparition d'une couleur bleue par rapport au témoin après l'ajout de réactif de molybdate d'ammonium [(NH₄)₆ MoO₂₄. 4H₂O)]. La couleur des milieux présente une intensité différente selon la souche et la concentration de NaCl ajouté (Fig. 32). La quantité de Ca₃(PO₄)₂ solubilisée par les souches s'étend de 52,00 ±3,50 à 193,90 ± 21,16 avec un optimum de production à 0,1M. Les souches BE1, MLR6, ME1, BR5 semblent solubilisatrices avec une quantité moyenne de 162,52 - 149,61 - 164,66 - 143,99 - 141,64µg/ml, respectivement. La plus faible activité est observée chez SE1 où la concentration moyenne de phosphate soluble ne dépasse guère 53,62 µg/ml.

Tab.6 : Production de l'AIA, de sidérophores et la solubilisation du phosphate par les souches sélectionnées sous stress salin

	NaCl/M	SE1	BE1	ME1	BR5	MLR6
AIA (µg/ml)	0	11.75 ±2.07	23.02 ± 3.68	46.90 ± 2.26	77.11 ± 5.03	24.58 ± 1.85
	0.1	11.96 ±2.10	19.64 0.97	29.18 ±1.25	68.00± 3.81	23.04 ± 2.32
	0.15	9.48 ± 1.42	14.28 1.65	29.44 ± 1.36	85.66± 7.24	23.75 ± 2.87
	0.2	10.60 ±1.52	14.76 1.29	31.78 ± 0.23	10.90± 0.63	24.26 ± 1.98
	0.25	10.44 ±1.66	14.78 1.28	24.03 ± 2.06	6.05± 0.57	20.98 ± 0.13
	0.3	9.82 ±2.17	15.64 1.77	19.61 ± 1.65	7.02 ± 0.59	22.16 ± 0.72
Sidérophores (%)	0	83.15 ± 3.27	38.46 ± 2.67	84.91 ± 0.98	43.26 ± 3.56	93.93 ± 1.08
	0.1	84.85 ±3.39	69.58 ±1.51	88.26 ± 3.10	83.24 ± 0.91	49.44 ± 0.92
	0.15	84.00 ±2.26	73.36 ± 1.01	48.81 ± 2.25	84.34 ± 1.42	50.31 ± 1.53
	0.2	83.53 ±1.46	51.90 ±2.68	50.74 ± 3.01	73.81± 0.51	86.53 ± 1.28
	0.25	82.83 ±0.32	52.50 ±2.88	48.63 ± 2.90	72.57± 0.10	79.02 ± 2.52
	0.3	82.75 ±0.50	34.14 ±2.45	49.98± 3.96	74.45 ± 0.21	63.22 ± 1.59
Phosphate (µg/ml)	0	52.00 ±3.50	141.17 ±14.59	113.84 ± 11.19	103.36 ± 9.89	117.87 ± 11.69
	0.1	56.76 ±4.09	203.90 ± 22.40	186.08 ± 20.18	179.15 ± 19.32	193.90 ± 21.16
	0.15	50.95 ±3.37	165.52 ± 17.62	158.43 ± 16.74	169.47 ± 18.12	161.65 ± 17.14
	0.2	50.79 ±3.35	152.54 ±16.01	116.98 ± 11.58	141.25 ± 14.60	145.28 ± 15.11
	0.25	55.79 ±3.97	150.12 ± 15.71	131.17 ± 13.35	136.42 ± 14.00	145.36 ± 15.12
	0.3	55.47 ±3.93	161.89 ± 17.17	143.35 ± 14.86	134.32 ± 13.74	133.59 ± 13.65

La production de sidérophores par les souches étudiées est déterminée après 48h d'incubation à 28°C après l'ajout d'une solution de CAS (Fig. 31). La présence de sidérophores dans le milieu vire sa couleur à l'orange. La capacité des souches à produire les sidérophores est affectée en présence de NaCl. Les souches étudiées sont réparties en trois groupes en fonction de leur production sous stress salin. Le premier groupe est représenté par SE1 qui semble la plus productrice avec une moyenne de 83,51%. Le deuxième groupe contient les souches BR5 (71,94%) et MLR6 (70,41%) synthétisant une quantité moindre. Les souches ME1 et BE1 ont présenté les concentrations les plus faibles avec une moyenne de 61,88 % et 53,32% respectivement.

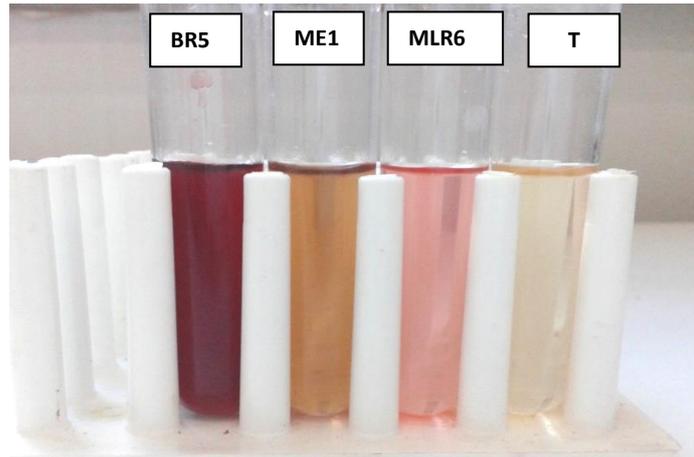


Fig. 30 : Production de l'AIA en présence de 0,3M NaCl par trois souches représentatives (BR5, ME1 et MLR6). L'intensité de couleur correspond à la quantité d'AIA produite dans le milieu.

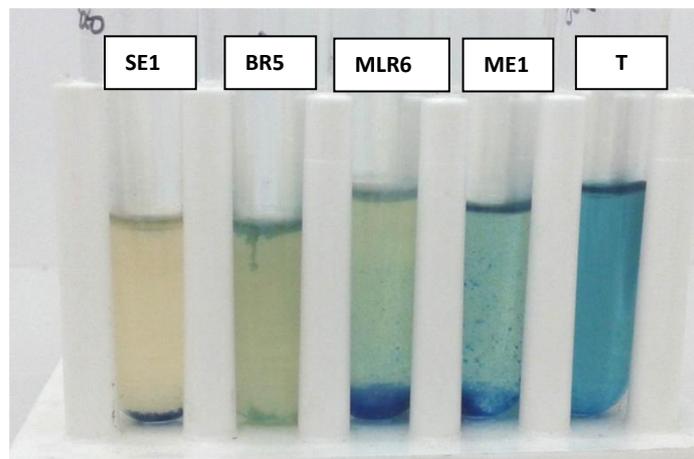


Fig. 31 : Production de sidérophores en présence de 0,3M NaCl par trois souches représentatives (SE1, BR5, MLR6 et ME1). Le virage de la couleur du milieu vers le jaune indique la production de sidérophores

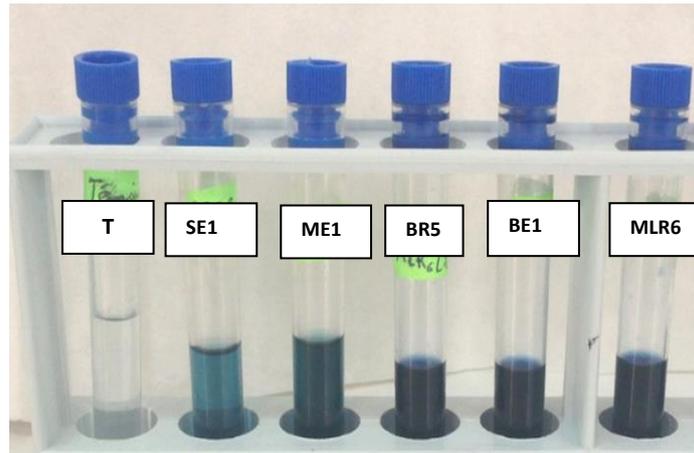


Fig. 32 : Solubilisation du phosphate en présence de 0,3M NaCl par les souches SE1, BR5, MLR6 et ME1. La couleur bleu indique la présence des phosphates solubles dans le milieu.

Tab. 7: Analyse de la variance de l'effet de NaCl sur la solubilisation du phosphate, la production de l'AIA et de sidérophores.

	P	AIA	SID
Khi-deux	19,318	2,879	5,629
Ddl	5	5	5
Signification asymptotique	,002	,719	,344

a. Test de Kruskal Wallis

b. Critère de regroupement : Stress

II-4- ACP de l'effet du NaCl sur les activités PGP des souches retenues

L'analyse des données permet de mettre en évidence une corrélation positive entre la production d'AIA et la solubilisation du phosphate (Fig. 33). Cependant, il ya une corrélation négative avec la production de sidérophores. La souche BR5 a le meilleur taux de production de l'AIA. La souche BE1, par contre, produit une quantité moindre de l'AIA mais, elle solubilise efficacement le phosphate. La souche SE1 est performante dans la production des sidérophores. Tandis que, la souche MLR6 possède les trois activités PGP étudiées. La souche MLR6 semble la plus performante et elle a été retenue pour les tests d'inoculation.

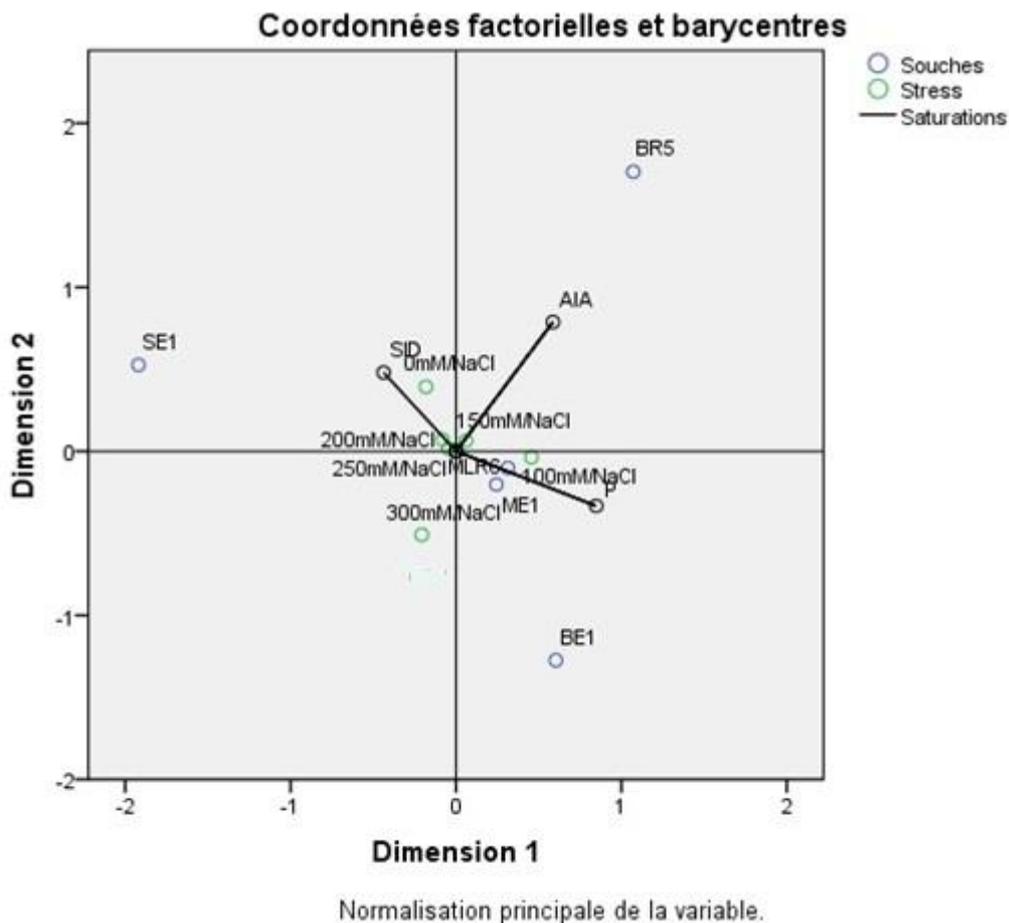


Fig. 33: ACP de l'effet de NaCl sur les activités PGP des souches sélectionnées.

III- Discussion

Afin de sélectionner des souches tolérantes à diverses contraintes, ces dernières sont mises dans des milieux de culture avec différentes concentrations de NaCl, de PEG₈₀₀₀ et de pH. La majorité des souches peuvent croître dans une large gamme de stress testés. Ces constatations confirment donc le lien étroit entre la tolérance des souches et leur origine. Les écosystèmes fluctuants favorisent le développement de bactéries présentant une bonne tolérance au stress, ceci suppose l'existence d'une pression de sélection exercée par le milieu naturel. Les souches *E. cloacae* BE1, *P. vermicola* ME1, *P. knackmussii* MLR6, *P. rettgeri* BR5 et *P. frederiksbergensis* SE1 ont une forte capacité d'adaptation au sel, pour cette raison elles ont été retenues pour étudier l'effet de la salinité sur leurs activités PGP. Les cinq souches sélectionnées peuvent produire l'AIA, des sidérophores et solubilisent le phosphate en absence qu'en présence de stress salin. Le taux d'AIA produit en absence du sel n'a pas été modifié en présence de NaCl chez les souches. Ce comportement semble être lié à leur capacité à résister au stress osmotique. Ces constatations correspondent à celles indiqués par Sandhya *et al.* (2010). La production de l'AIA est bénéfique pour la croissance et le développement végétal. Il 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.*, 2010 ; Sandhya *et al.*, 2010). De ce fait, maintenir une croissance racinaire constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau tel le milieu salin et/ou aride. 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 l'acide lactique, gluconique, isobutyrique, acétique, glycolique, oxalique, malonique et succinique (Nautiyal, 1999). La fluctuation dans la production de sidérophores constatée chez les souches de *Pseudomonas* serait due à leur exigence en fer ou au degré d'affinité du système d'assimilation du fer existant. Ce dernier peut-être de faible ou de haute affinité. D'après Upadhyay *et al.* (2009) les bactéries isolées à partir d'un milieu salin sont plus susceptibles de survivre à des concentrations de sel inhibitrices mieux que les autres bactéries habitants des régions non salines. La croissance de ces isolats avec une forte tolérance au stress salin peut s'expliquer par leur machinerie cellulaire qui est adapté à de telles conditions.

Vu la faculté de la souche *Pseudomonas knackmussii* MLR6 à présenter les meilleures activités PGP sous stress salin selon l'analyse de l'ACP, il serait envisageable de l'utiliser comme biofertilisants.

Chapitre V : Effet de Pseudomonas knackmussii MLR6 sur l'amélioration la croissance de Arabidopsis thaliana et de blé dur (WAHA) sous stress salin

Dans cette partie, nous avons étudié quelques traits physiologiques de la souche *P. knackmussii* MLR6 en présence de stress salin. Ensuite, nous avons essayé d'évaluer le rôle que peut jouer cette souche sur la croissance de *A. thaliana* et de blé dur. Différents paramètres physiologiques ont été mesurés : la croissance, la photosynthèse, les échanges gazeux et la teneur en pigments photosynthétiques. En parallèle, la production de H₂O₂ et O₂⁻, la colonisation racinaire et la persistance de la souche sous conditions stressantes ont été aussi menés.

I- Matériel et méthodes

I-1- Matériel végétal

a- Arabidopsis thaliana

Les tests sont effectués sur la plante modèle : *A. thaliana*. C'est une plante de la famille des Brassicaceae (Crucifères) découverte au 16ème siècle par Johannes Thal. Elle est nommée aussi Arabette des dames, Arabette de Thalius. Elle est désignée comme organisme modèle en 1998. À l'heure actuelle *A. thaliana* est un organisme de référence, aussi bien, pour la recherche végétale que pour l'évolution, la génétique ou encore la recherche fondamentale (Coelho *et al.*, 2007). La séquence complète de son génome est désormais disponible ("*A. thaliana* genome" 2000; Initiative 2000).

b- Blé dur

Les graines d'une variété locale de blé dur Waha (*Triticum durum* L.c.v Waha) sont utilisées. Elles ont été fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) de Sétif – Algérie (Tab.8).

I-2- Souche bactérienne

Une souche bactérienne qualifiée de PGPR est utilisée pour les tests d'inoculation. Elle est identifiée comme *P. knackmussii* MLR6. Elle a été isolée de la rhizosphère de l'halophyte *Salsola tetrandra* de la région de Melghir (Fig. 34).

Tab. 8 : Caractéristiques de la variété WAHA (ITGC, 2006)

Caractéristiques morphologiques	<ul style="list-style-type: none"> ● Compacité de l'épi : demi -lâche a compact ● Couleur de l'épi : claire ambré a roux ● Hauteur de la plante a la maturité : 80-90 Cm
Caractéristiques culturelles	<ul style="list-style-type: none"> ● Alternativité : hiver ● Cycle végétatif: précoce ● Tallage : moyen a fort ● Résistance : <ul style="list-style-type: none"> ● Au froid : tolérante ● A la verse : résistante ● A la sécheresse : sensible ● Egrenage : résistante ● Sensible aux gelées printanières ● Sensible aux maladies : <ul style="list-style-type: none"> ● Rouille jaune : tolérante ● Rouille brune : tolérante ● Rouille noire : tolérante ● Piétin verse : résistante ● Piétin échaudage : sensible ● Oidium : résistante ● Septorise : moyennement résistante ● Fusariose : moyennement résistante
Conditions techniques	<ul style="list-style-type: none"> ● Date de semis : novembre- décembre ● Dose de semis (kg/ha) : 100-120 ● Fertilisation (u/ha) : <ul style="list-style-type: none"> ● Azotée : 46- 90 ● Phosphatée : 46- 90 ● Potassique : 46
Caractéristiques qualitatives	<ul style="list-style-type: none"> ● Poids de mille grains (PMG) : moyen ● Qualité semoulière : assez bonne ● Mitadinage : résistante ● Moucheure : résistante
Productivité	<ul style="list-style-type: none"> ● Rendement en grain optimal : 45 qx/ha

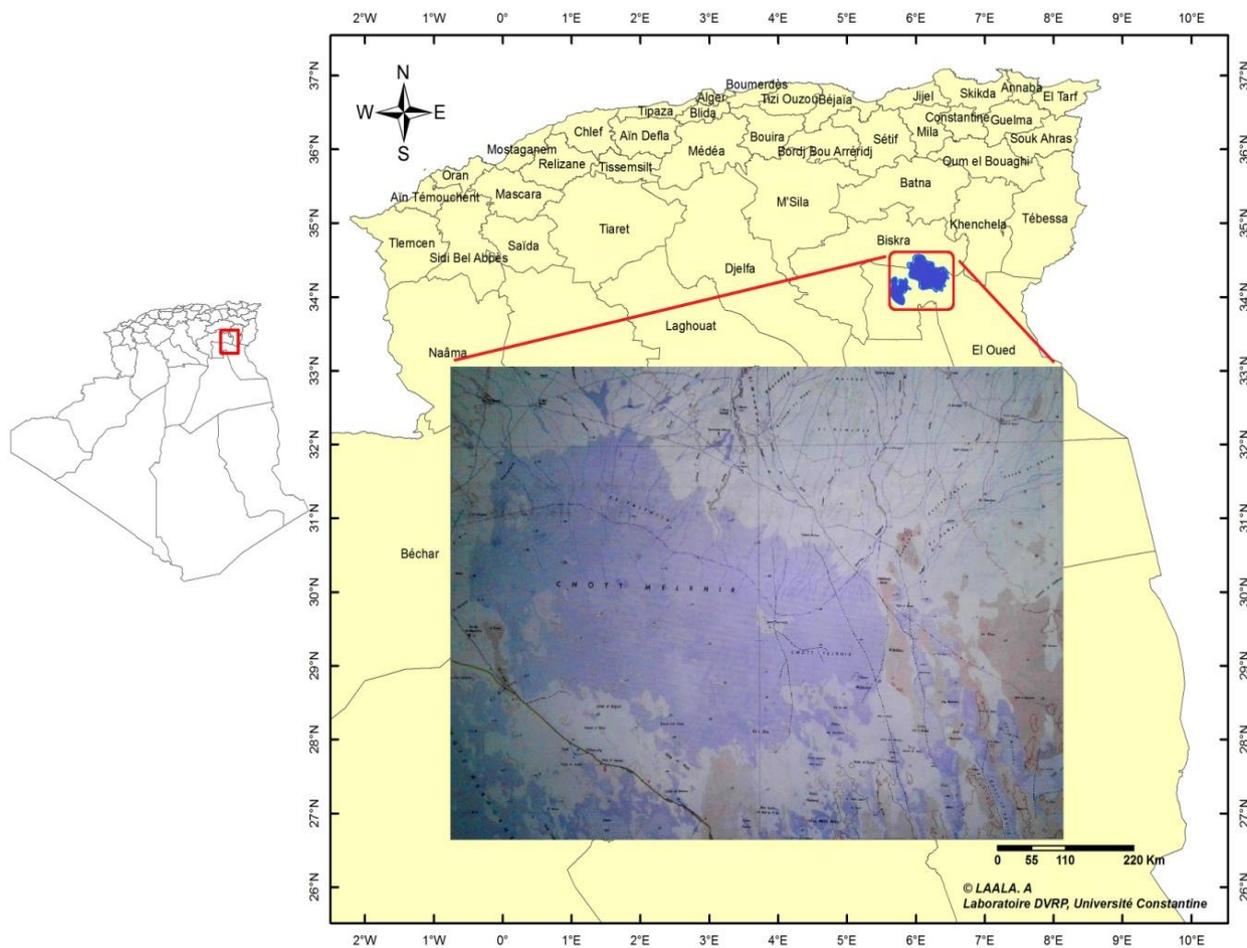


Fig. 34 : Localisation géographique du lieu de prélèvement. Chott Melghir, El Oued

I-3- Vecteur

a- Plasmide pIN 301

Le plasmide pIN301 possède un gène GFP et une cassette de résistance au chloramphénicol. Ce plasmide nous a été aimablement donné par Annette Vergunst (Université de Montpellier, Institut de Santé et de Recherche Médicale, France).

I-4- Activités PGP de la souche MLR6

La souche MLR6 est testée pour les différentes activités telle que la production de NH₃, de l'HCN, de la cellulase, de la chitinase, de la protéase et de l'activité antifongique. Elle est testée ainsi pour sa production de l'AIA, de sidérophore et la solubilisation des phosphates sous stress salin (0- 0,1- 0,2- et 0,3M NaCl) selon les méthodes décrites auparavant (Chapitre IV).

I-5- Préparation de bactéries électrocompétentes

Une culture bactérienne est réalisée sous agitation rotative dans 100 ml de milieu LB inoculé par 1 ml d'une préculture de 5 ml de MLR6. Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance ($D.O_{600nm} = 0,5$), les bactéries sont centrifugées (4000 g, 10 min, 4°C) et le culot obtenu est repris dans 100 ml d'eau distillée stérile froide. Le lavage est répété 2 fois et la 3^{ème} fois avec 10% de glycérol à 4°C. Le culot est repris dans 100µl de glycérol (10%). Les bactéries sont, ensuite, aliquotées en microtubes par 50 µl et stockées à -80°C avant utilisation.

I-6- Transformation de la bactérie par électroporation

Le plasmide pin 301 GFP qui doit servir à la transformation est introduit dans la souche MLR6 par électroporation. Dans une cuve à électroporation de 1 ml, 2 µl de plasmide sont mélangés à 50 µl de bactéries électrocompétentes. La cuve est, ensuite, placée dans un électroporateur (Gene Pulser II System, Bio-Rad) où une tension de 5,14 kV lui est appliquée. Après ajout de 950 µl de milieu LB, la culture est transférée dans un eppendorf de 1.5 ml puis incubée, sous agitation rotative, pendant 45 à 60 min à 28°C. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur milieu LB gélosé contenant le chloramphénicol (25µl/ml) l'antibiotique de sélection spécifique du plasmide. Après 24h de croissance à

28°C, les colonies apparues vertes sous UV (365nm) sont repiquées et conservées dans le glycérol à 50%.

I-7- Préparation de l'inoculum bactérien

Un volume de 5 ml de bouillon LB estensemencé par une culture fraîche (24h) de la souche MLR6 marquée à la GFP. Après incubation à 28°C/24h, les cultures sont centrifugées à 3000 rpm/10 min. Le culot obtenu est lavé trois fois par PBS (10mM) puis repris finalement dans 5ml et ajusté à une $DO_{\lambda 600}$ nm de 1 (10^7 UFC / ml). La suspension bactérienne préparée servira à inoculer les semis des plantes par la suite.

I-8- Stérilisation des semis et test de colonisation d' *A. thaliana* avec MLR6 marquée

Les graines de *A. thaliana* Columbia (Col-0/Rédei-L211-497) (LEHLE seeds Round Rock, TX 78680-2366 USA) sont stérilisées en surface avec une solution préparée avec 9 ml d'éthanol à 95% (v/v), 1 ml d'hypochlorite de sodium (2%) et 6µl de Tween (1%). 1 ml de cette solution est ajouté aux graines qui sont réparties dans des tubes eppendorf de 1.5 ml. Ces derniers sont mis sous agitation pendant 2 min. Finalement les semis sont lavés 3 fois avec l'éthanol 90% puis ils sont semées en boîte de Pétri carrée 120mm*120mm sur 60 ml de milieu MS au ½ (milieu au sel de Murashige et Skoog) (Annexe 14) à pH 5,7. Les boîtes sont placées en position verticale dans une chambre de culture à 22°C, 50% d'humidité avec un cycle 16/8h jour/nuit pendant 4 jours. Après 4 jours de germination, 5µl de la suspension bactérienne (10^7 UFC/ ml) marquée à la GFP est déposé sur les racines des plantules (Khan *et al.*, 2016). Les plantules témoins sont inoculées avec le même volume du tampon PBS (10 mM). Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 3 jours dans une chambre de culture à 20 ° C (jour / nuit), avec 60% d'humidité relative et une intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (photopériode de 16/8 h). La colonisation racinaire est observée sous microscope à fluorescence.

I-9- Inoculation des plantules de *A. thaliana*

Afin de déterminer l'effet de la souche sélectionnée MLR6 sur *A. thaliana*, l'inoculum préparé est utilisé pour bactériser des jeunes plantules de 4 semaines issues de la germination des semis d'Arabett. Après leur transfert dans des pots en plastique contenant le terreau, les plantules sont inoculées par versement d'un volume de 10 ml de la suspension

bactérienne préparée (10^7 UFC/ml) à la surface du terreau. Le stress salin (0,2M NaCl) est appliqué 15 jours après la bactérisation en trois fois avec un intervalle de 03 jours pour chaque traitement. Le même volume d'eau distillée stérile est utilisé pour irriguer les plantes témoins inoculées et non inoculées. Les pots sont divisés en 4 groupes avec 24 pots par traitement :

Groupe 1 : Contrôle, (C)

Groupe 2 : Contrôle +NaCl, (C+ NaCl)

Groupe 3 : Bactérisé, (B)

Groupe 4 : Bactérisé + NaCl, (B+ NaCl)

Les plantes sont cultivées dans une chambre de culture à 20 ° C (jour / nuit), avec 60% d'humidité relative et une intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (photopériode de 16/8 h). Les paramètres physiologiques de croissance sont pris après 15 jours d'application de la troisième dose de NaCl. Trois réplifications biologiques indépendantes sont réalisées.

- La concentration de NaCl (0,2M) ajoutée à été choisie suite à des essais préliminaires qui avaient pour but de déterminer une gamme de concentrations affectant la croissance de *A. thaliana* sans l'inhiber complètement.

I-10- Mesure de la teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle est mesurée à la fin de l'expérience. Cinq feuilles de chaque traitement étudié sont choisies au hasard et broyées dans de l'azote liquide. La chlorophylle est extraite en homogénéisant 100 mg de la poudre obtenu dans l'acétone à 80%. L'extrait est centrifugé à $3000 \times g / 5 \text{mn}$ et l'absorbance du surnageant est lue à 663 nm, 646 nm et 470 nm en utilisant un spectrophotomètre. La quantité de chlorophylle présente (mg g⁻¹dw) dans l'extrait est calculée selon les équations d'Arnon (1949) :

$$\text{Chla (mg / g)} = 12,7 (\text{Abs}663) - 2,69 (\text{Abs } 646) \times V / 1000 W;$$

$$\text{Chlb (mg / g)} = 22,9 (\text{Abs } 646) - 4,68 (\text{Abs } 663) \times V / 1000 W;$$

$$\text{Chl (mg / g)} = 8,02 (\text{Abs } 663) + 20,21 (\text{Abs } 646) \times V / 1000 W;$$

$$\text{Cart (mg/g)} = [(100 \times \text{Abs}470) - (3.27 \times \text{Chla}) - (104 \times \text{chlb})] / 198 \times V / 1000W$$

"V" représente le volume de la solution d'extrait; "W" représente le poids des feuilles

I-11- Paramètres photosynthétiques

Les propriétés photosynthétiques de *A. thaliana*, y compris le rendement quantique de la photosynthèse I (Φ PSI) et II (Φ PSII), le taux de transport d'électrons ETRI et ETRII ainsi que le rendement quantique photochimique maximal du PSII (F_v / F_m) et le rendement du quenching non-photochimique $Y(QNP)$ sont mesurés à l'aide d'un Dual-PAM-100 (Walz). Il permet de détecter les changements d'absorbance du P700 + et de fluorescence de la chlorophylle par la méthode des impulsions de saturation après 30min d'adaptation à l'obscurité (Pfündel *et al.*, 2008). Des mesures de PAM sont effectuées 24 heures après application de chaque stress sur 6 plantes de chaque traitement puis 15 jours après l'application du 3^{ème} stress salin. Les données sont stockées dans l'appareil de mesure et ensuite transférées vers un ordinateur pour leur traitement. Trois réplications biologiques indépendantes sont réalisées.

I-12- Échanges gazeux

La conductance stomatique (g_s), la photosynthèse nette (photo), la transpiration (E) et la concentration de CO_2 intercellulaire (c_i) sont mesurées en utilisant LI-COR LI-6400-XT (Lincoln, NE, USA). La concentration de CO_2 est maintenue à un niveau constant de 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ en utilisant un injecteur de CO_2 avec une source de cartouche de CO_2 liquide à haute pression. La lecture se fait par l'insertion de la feuille entre deux pinces. Les données sont stockées dans l'appareil de mesure et, ensuite, transférées vers un ordinateur pour leur traitement. La température de l'air et l'humidité relative sont maintenues à 20 ° C et 60%, respectivement. Le rayonnement actif photosynthétique est fixé à 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Su *et al.*, 2015). Les mesures d'échange de gaz sont effectuées 15 jours après l'application du 3^{ème} stress salin sur 6 plantes de chaque traitement. Trois répétitions biologiques indépendantes sont réalisées.

I-13- Persistance de la souche bactérienne et colonisation endophytique

Après 30 jours d'inoculation de *A. thaliana* avec la souche marquée à la GFP, les racines de la plante sont prélevées et mises dans 9 ml de PBS. Pour libérer les particules des sols adhérentes aux racines, ces dernières sont agitées pendant 5 min à 240 tr / min.

Afin de déterminer la colonisation endophytique, 1 g de racines sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% (1min) et d'éthanol à 70% (2 min), puis lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Les racines sont, ensuite, macérées dans 9 ml de

PBS (10mM) et broyées à l'aide d'un mortier. Des dilutions décimales (10^{-1} - 10^{-8}) sont effectuées des deux échantillons préparées. 100µl de chaque échantillon sont étalés à la surface du milieu LB additionné de chloramphénicol (25 ug / ml). La présence des colonies bactériennes fluorescentes est détectée sous lumière UV (365) après 2 jours incubation à 28 ° C.

I-14- Détection de H₂O₂ et les radicaux O₂⁻

La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les ions superoxydes (O₂⁻) est évaluée, après 24 h de traitement des plantes avec 0,2M de NaCl. Pour détecter la production de H₂O₂, des feuilles des plantes de quatre semaines issues de chaque traitement sont mises dans une solution de 3, 30 - iaminobenzidine (DAB) (1 mg/ml) puis incubées à une température ambiante pendant 5 heures. Par la suite, les échantillons sont décolorés avec l'éthanol absolu (95%) (Ren *et al.*, 2016). La production de H₂O₂ est observée sous forme d'une couleur brune à cause de la polymérisation de la solution de DAB.

Pour la détection des ions O₂⁻, les feuilles issues de chaque traitement sont homogénéisées dans une solution de nitro blue tetrazolium (NBT) (1 mg/ml) puis laissées 1 h à la température ambiante dans un tampon phosphate de 10 mM (pH 7,8). Les feuilles sont éclairées pendant 1-2 h jusqu'à l'apparition de taches noires foncées caractéristiques des précipités de formazan bleu (Shi *et al.*, 2010). Les tests sont réalisés en triplicata.

I-15- Mesure de la fuite d'électrolytes (EL%)

La fuite d'électrolyte est déterminée selon le protocole de Mahmood *et al* (2016). Après 30 jours de l'application du 3^{ème} stress, les feuilles de *A. thaliana* sont coupées en petits segments et homogénéisées dans 25 ml d'eau désionisée afin de mesurer la conductivité électrique initiale (EC0). Les échantillons sont, ensuite, mis au frais (4°C) pendant 24h pour obtenir la conductivité électrique primaire (EC1). Les échantillons sont finalement autoclavés à 121 ° C pendant 20 minutes pour déterminer la conductivité électrique secondaire (EC2). Le pourcentage de la fuite d'électrolytes est calculé avec la formule décrite par Yang *et al.* (1996). $EL (\%) = (EC1-EC0) / (EC2-EC0) \times 100$

I-16- Stérilisation et inoculation des graines de blé dur Waha

Les graines de blé sont désinfectées par immersion dans l'éthanol à 70% pendant 5min puis trempées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2,5% pendant 15 min. Ensuite, elles sont lavées 10 fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines désinfectées sont imbibées dans l'eau distillée stérile et mises sous agitation pendant 24h. Les graines sont inoculées par immersion dans un tampon phosphate (contrôle) et/ou l'inoculum bactérien (10^8 UFC/ml) de MLR6 pendant 4 h. Cinq graines de blé inoculées (10^7 UFC/graine) sont semées dans des pots en plastique. Après 10 jours de croissance, un stress salin est appliqué en ajoutant 100ml d'une solution saline contenant 0,05M de NaCl. Cette concentration est augmentée graduellement jusqu'à ce que la concentration finale (0.2M) soit atteinte. Les plantes sont irriguées avec et sans stress tout les 3 jours jusqu'à la récolte.

Les pots sont divisés en 4 groupes avec 12 pots par traitement :

Groupe 1 : Contrôle, (C)

Groupe 2 : Contrôle + stress, (C+NaCl)

Groupe 3 : Bactérisé, (B)

Groupe4 : Bactérisé + stress, (B+NaCl)

L'expérience est réalisée en duplicata. Elle a été conduite pendant 30 jours dans une chambre de croissance avec une moyenne de températures diurnes/ nocturnes de 21° C et 18° C, respectivement, et une photopériode 16 h d'éclairage et une humidité relative de 60% environ.

I-17- Effet de *P. knakmussii* MLR6 sur la promotion de la croissance de blé dur

a- Analyse des paramètres morphologiques

Après 30 jours de croissance, les plantes sont récoltées. Leurs tailles et leurs poids frais et sec (après 72h de séchage à 65°C) sont déterminés.

b- Dosage de la chlorophylle

Les chlorophylles a et b sont déterminées selon la méthode de Arnon (Arnon, 1949). Comme décrite auparavant. Deux réplifications biologiques indépendantes sont réalisées (n = 6).

I-18- Analyses statistiques

L'ensemble des résultats a été analysés à l'aide d'un programme statistique, R 3.4.4 par l'utilisation du test HSD de Tukey dont le seuil d'erreur alpha est $\leq 0,05$.

II- Résultats

II-1- Isolement et identification moléculaire

La bactérie de la rhizosphère de l'halophyte *Salsola tetrandra* a été identifiée par séquençage de l'ADNr 16S comme *Pseudomonas knackmussii* MLR6. La séquence partielle de la souche bactérienne a été soumise à GenBank sous le numéro d'accès : KU577948.

II-2- Propriétés physiologiques et PGPR

Après 48h d'incubation à 28°C, la souche MLR6 présente une bonne capacité de croissance jusqu'à 0,8 M NaCl avec un optimum à 0,3 M NaCl. A des concentrations supérieures à 1M de NaCl, les valeurs de DO_{600} nm diminuent progressivement. Cette souche est capable de croître dans une large gamme de PEG₈₀₀₀ de 0 à 60% avec un optimum à 30%. Son pH optimal est de 7 (Fig. 35). La bactérie est testée pour des activités PGP *in vitro*. Les résultats montrent qu'elle est capable de produire le NH_3 et la chitinase (Fig. 36). Par contre, elle est incapable de fixer le N_2 , de produire l'HCN, la protéase et de dégrader la cellulose (Tab. 9). Pour déterminer l'effet du NaCl sur les activités PGP, la bactérie est testée pour sa capacité à produire les sidérophores et l'AIA et à solubiliser le phosphate sur des milieux liquides additionnés ou non de NaCl. La souche MLR6 présente la même aptitude pour la production de l'AIA en absence qu'en présence de stress salin. Par contre, la solubilisation du phosphate est positivement affectée. La souche atteint son maximum de solubilisation à 0,1M NaCl avec 193,90 μ g/ml. Le NaCl a un effet négatif sur la production de sidérophores (Tab. 10). La concentration la plus élevée de sidérophore (92,40%) est notée en absence de stress salin. A la concentration la plus extrême de NaCl (0,3 M), la concentration de phosphate soluble, de l'AIA et celle de sidérophores restent élevées, elles sont de 133,59 μ g / ml, 21,65 μ g / ml et de 60,97% respectivement (Tab.10). Quant à l'activité antifongique, l'effet inhibiteur optimal est observé envers PI avec 70%. Une activité modérée est notée envers le reste des champignons phytopathogènes FO, AA et AN, leur pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 50% (Fig. 37).

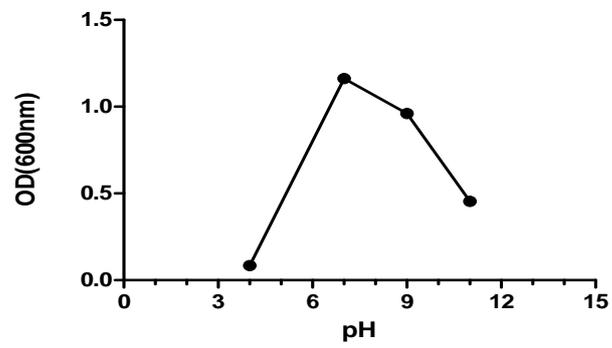
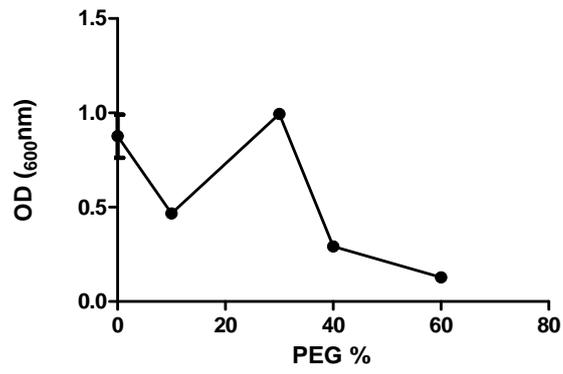
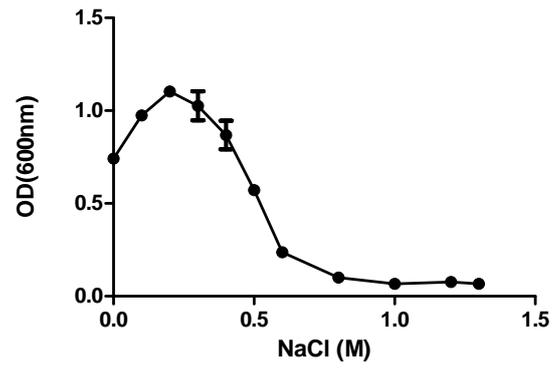


Fig. 35 : Effet de NaCl, PEG₈₀₀₀ et pH sur la croissance de MLR6

Tab. 9: Fixation de N₂ et production des biomolécules actives par MLR6

Propriétés de la bacteria MLR6	
Fixation de N ₂	-
HCN	-
NH ₃	+
Chitinase	+
Cellulase	-
Protease	-

Tab. 10 : Activités PGP de MLR6 sous stress salin

NaCl(M)	Production de l'AIA (µg/ml)	Solubilisation du phosphate (µg/ml P ₂ O ₅)	Production de sidérophores %
0	23.27 ± 1.85 a	117.87 ± 11.69 c	92.40 ± 1.08 a
0.1	21.40 ± 2.32 a	193.90 ± 21.16 a	48.14 ± 0.92 d
0.2	22.86 ± 1.98 a	145.28 ± 15.11b	84.72 ± 1.28 b
0.3	21.65 ± 0.72 a	133.59 ± 13.65 bc	60.97 ± 1.59 c

Les valeurs présentent la moyenne ± SE de trios répétitions. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements (P <0,05) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

**Fig. 36 : Activité chitinolytique de MLR6**

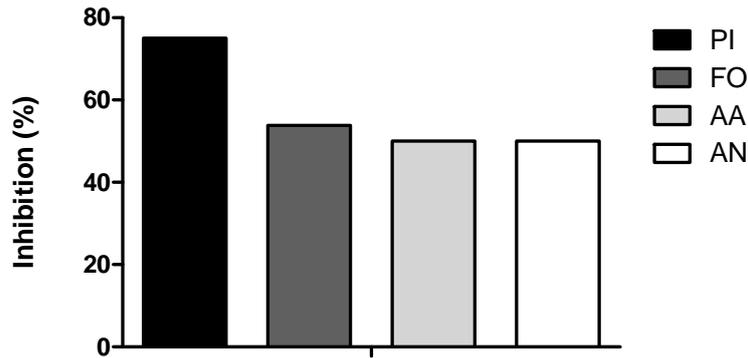


Fig. 37 : Effet inhibiteur (%) de MLR6 sur la croissance des champignons phytopathogènes. *F. oxysporium* (FO), *A. alternata* (AA), *Aspergillus niger* (AN), *Phytophthora infestans* (PI).

II-3- Colonisation racinaire

Après 3 jours de croissance des graines de *A. thaliana* cultivées sur un milieu gélosé MS, les racines inoculées avec la souche MLR6 marquée à la GFP sont observées sous microscopie fluorescente pour évaluer la capacité de la souche à coloniser le système racinaire. Aucun signal GFP n'a été détecté au niveau des racines des plantes témoins. Cependant, les racines inoculées avec la souche MLR6 marquée ont émis un signal fluorescent sous UV 365nm. La souche est distribuée sur tout le système racinaire (Fig. 38). Elle colonise efficacement la surface des racines latérales et primaires.

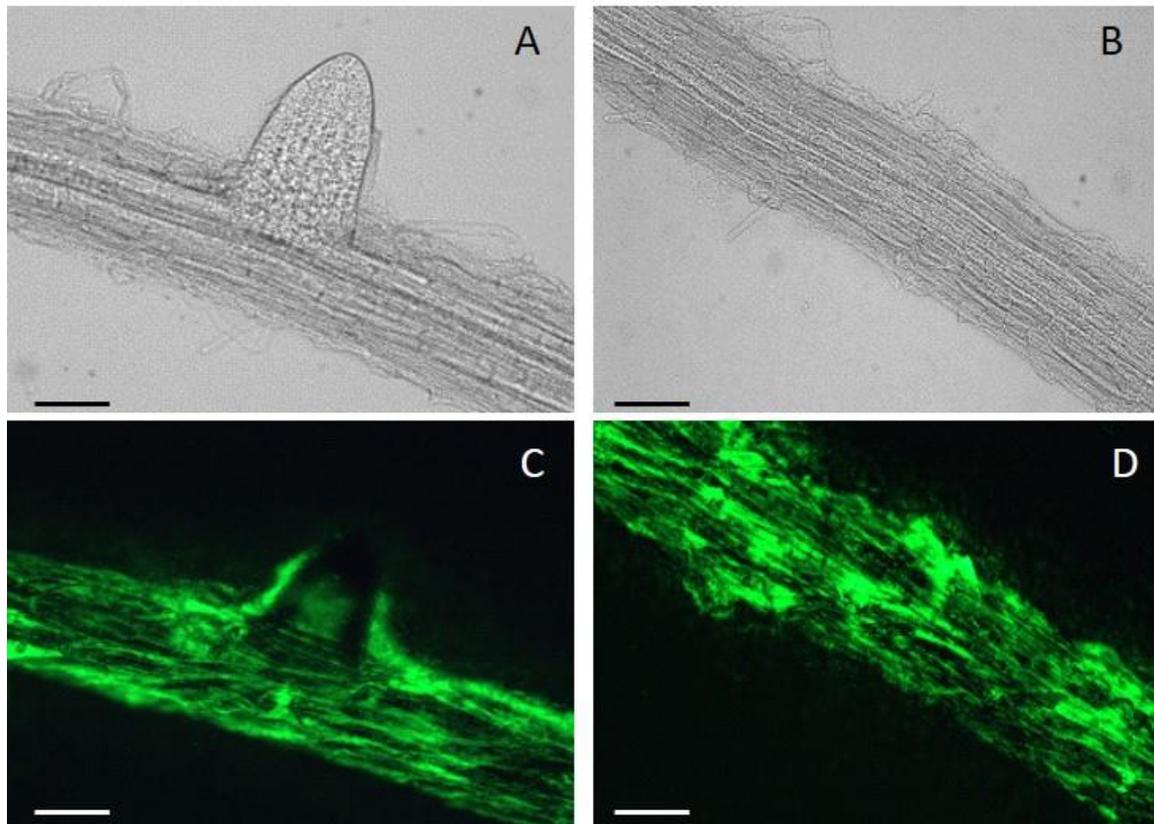


Fig. 38: Colonisation racinaire de *A. thaliana* par la souche MLR 6 marquée à la GFP. Surface racinaire 3 jours après inoculation avec MLR6 :: GFP sous lumière visible (A, B) et sous lumière UV (365nm) (C, D). Barre d'échelle =50µm

II-4- Paramètres morphologiques

La hauteur des plantes et le poids frais et sec sont mesurés à la fin de l'expérience, 15 jours après l'application du dernier stress (Fig. 39, 40, 41). L'analyse de la variance des résultats des poids frais et secs des racines et la hauteur des plantes montre que la salinité a un effet négatif sur ces différents paramètres ($P \leq 0,05$). En présence de stress salin, tous les paramètres morphologiques diminuent significativement, chez les plantes non inoculées ($p < 0,05$). Cependant, l'inoculation des plantes avec MLR6 conduit à une augmentation significative de la longueur de la plante ainsi que le poids frais et sec en comparaison avec les plantes non inoculées (Annexe 20). L'observation quotidienne des plantes a indiqué que l'effet de MLR6 sur les paramètres morphologiques commence à apparaître, une semaine après l'application du troisième stress salin.

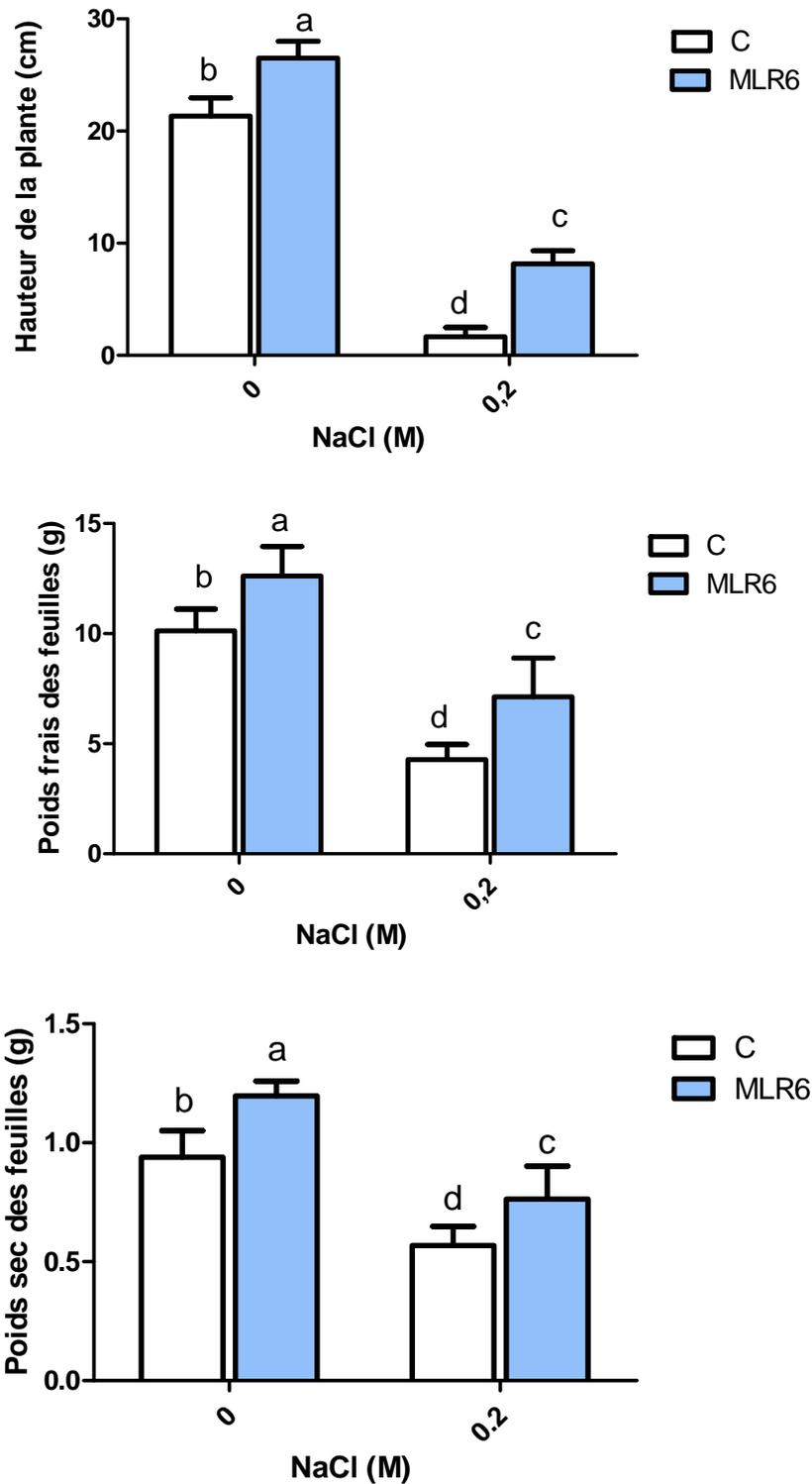


Fig. 39: Effet de MLR6 et du stress salin (NaCl 0,2 M) sur la hauteur, le poids sec et frais de *A. thaliana*. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

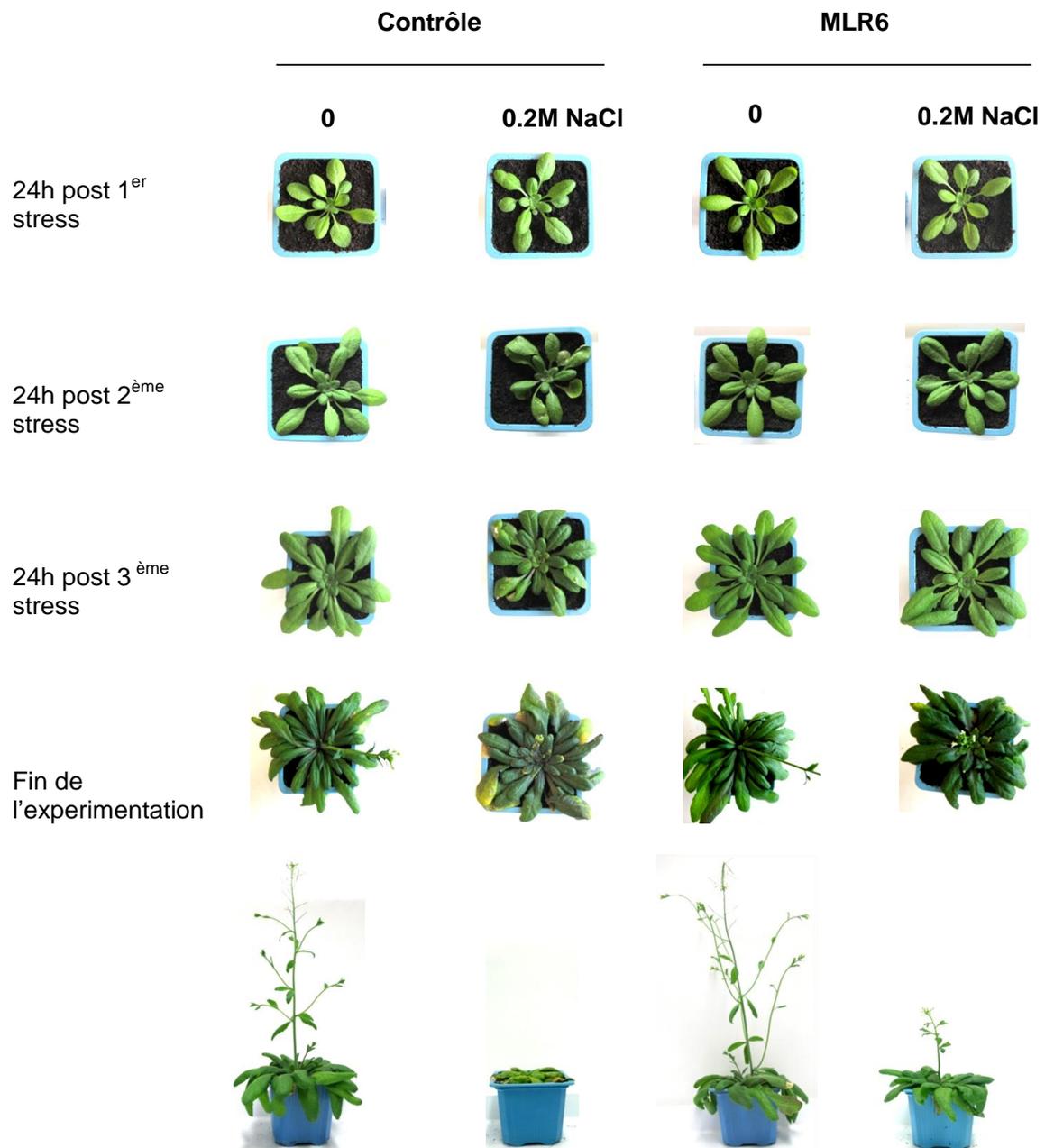


Fig. 40: Phénotype des plantes de *A. thaliana* inoculées ou non par MLR6 en absence et en présence de 0,2M NaCl.

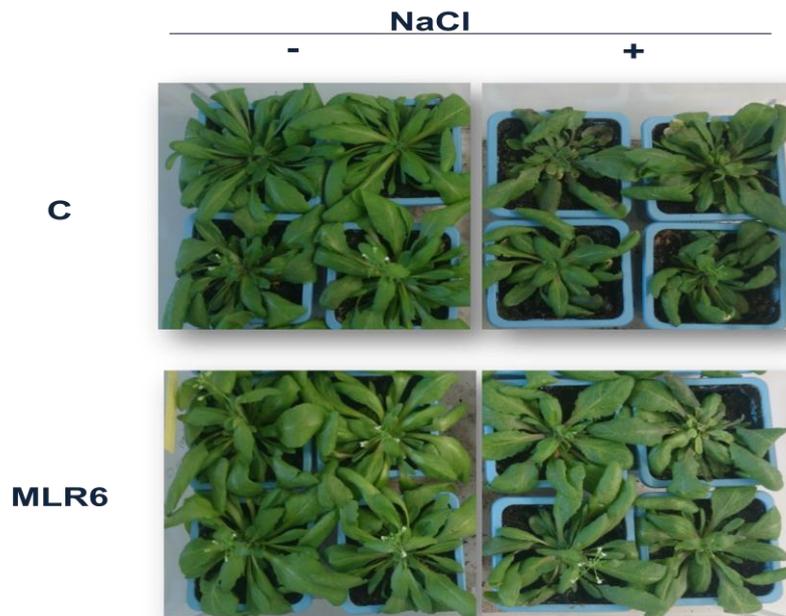


Fig. 41: Effet de MLR6 sur la biomasse de la plante en présence et en absence de NaCl (0,2M)

II-5- Teneur en chlorophylle

Les taux des pigments photosynthétiques Chla, Chlb, Chl totale et les caroténoïdes des plantes traitées avec la bactérie et/ou le NaCl sont déterminés à la fin de l'expérimentation. Les résultats obtenus sont mentionnés dans la Figure 42. Dans les conditions normales, les taux de chla et chlb et chl totale chez les plantes inoculées sont meilleurs que celles non inoculées. Après l'application du stress salin, leurs niveaux augmentent significativement chez les plantes inoculées ($p < 0,05$) (Annexe 20) par rapport à leurs témoins. Aucun effet de la souche n'a été observé sur la teneur en caroténoïdes en présence et en absence de stress salin (Fig.42)

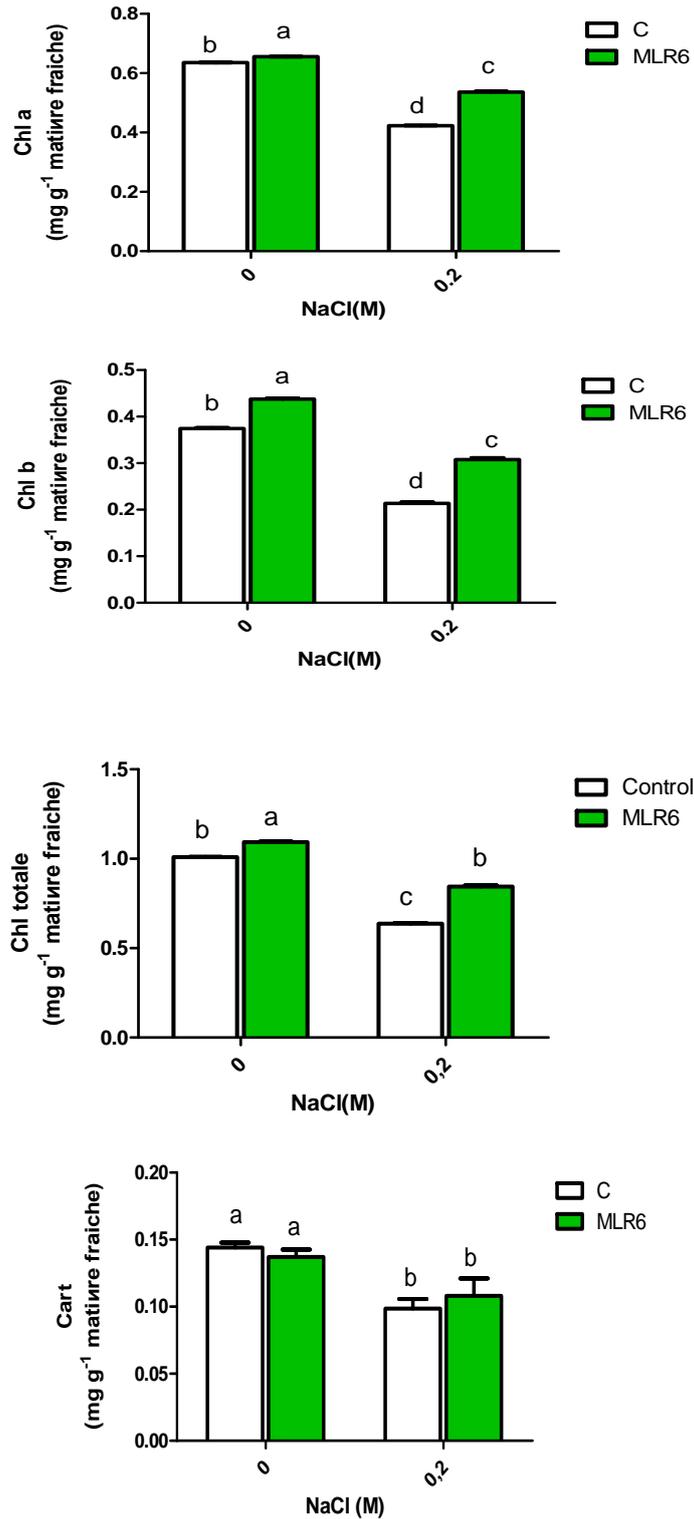
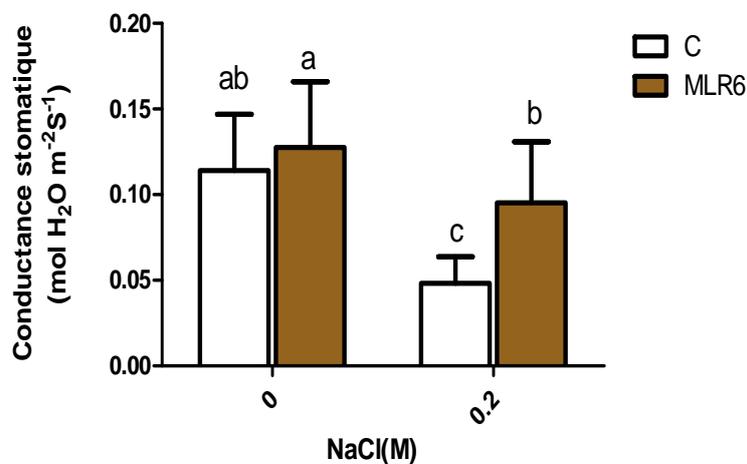
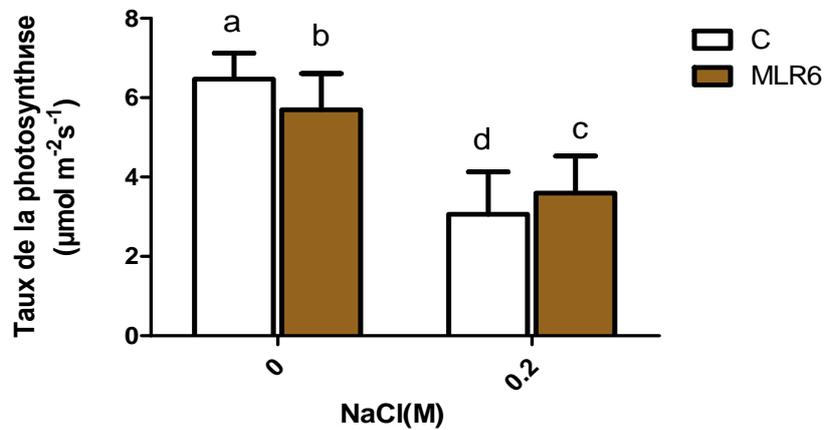


Fig. 42: Effet de MLR6 et du stress salin (0,2M NaCl) sur la chlorophylle a, la chlorophylle b, la chlorophylle totale et les caroténoïdes de *A. thaliana*. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

II-6- Échanges gazeux

Les mesures des échanges gazeux sont déterminées après 15 jours de l'application du 3^{ème} stress. En absence du stress, l'inoculation de MLR6 détermine le taux de la photosynthèse et augmente la concentration interne en CO₂. Par contre, la conductance stomatique (gs), le taux de transpiration (E) restent stable (Fig. 43). En présence de NaCl (0,2M), la conductance stomatique, le taux de transpiration et le taux de photosynthèse diminuent significativement chez les plantes non inocuées. Cependant, la concentration interne en CO₂ a présenté le même profil observé en absence de stress. L'inoculation par la souche MLR6 améliore significativement ($p < 0.05$) l'ensemble de ces paramètres sous stress salin (Annexe 20).



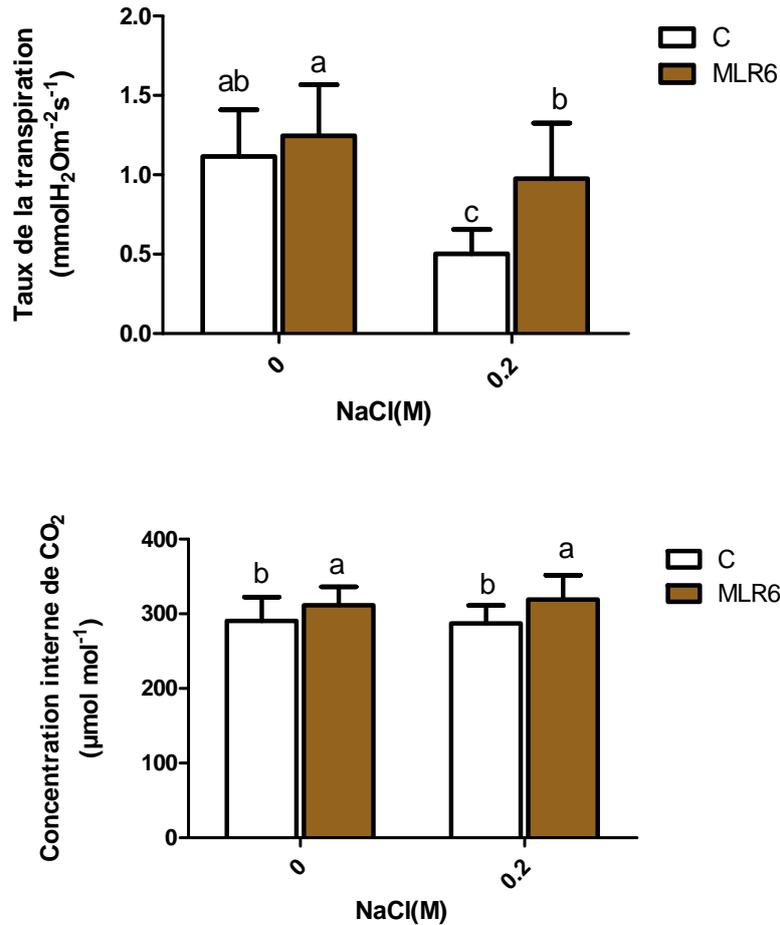


Fig. 43: Effet MLR6 et du stress salin (0.2M NaCl) sur le taux de photosynthèse, la conductance stomatique, le taux de transpiration et le CO₂ intercellulaire, deux semaines après le 3^{ème} stress. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

II-7- Paramètres photosynthétiques

L'analyse des paramètres photosynthétique est révéler après 24h du premier stress. Une diminution significative est notée chez les plantes témoins pour le rendement quantique de la photosynthèse II (Φ_{PSII}), le taux de transport d'électrons II (ETR_{II}), le rendement quantique de la photosynthèse I (Φ_{PSI}) et le taux de transport d'électrons I, (ETR_I). Par contre, aucune différence significative n'a été observée dans le rendement quantique photochimique maximal du PSII (F_v / F_m) et le rendement du quenching non-photochimique $Y(QNP)$ (Fig. 44). Chez les plantes inoculées, les niveaux de Φ_{PSI} , Φ_{PSII} , ETR_I et ETR_{II} mesurés dans des conditions de stress sont similaires à ceux dans des conditions normales (Fig.44). Aucune différence significative sur les paramètres photosynthétiques n'a été détectée, après 24h de l'application du 2^{ème} et 3^{ème} stress salin (Annexe 18, 19). 15 jours après le troisième stress, les profils notés sont similaires à ceux observés après le premier stress (Fig.45).

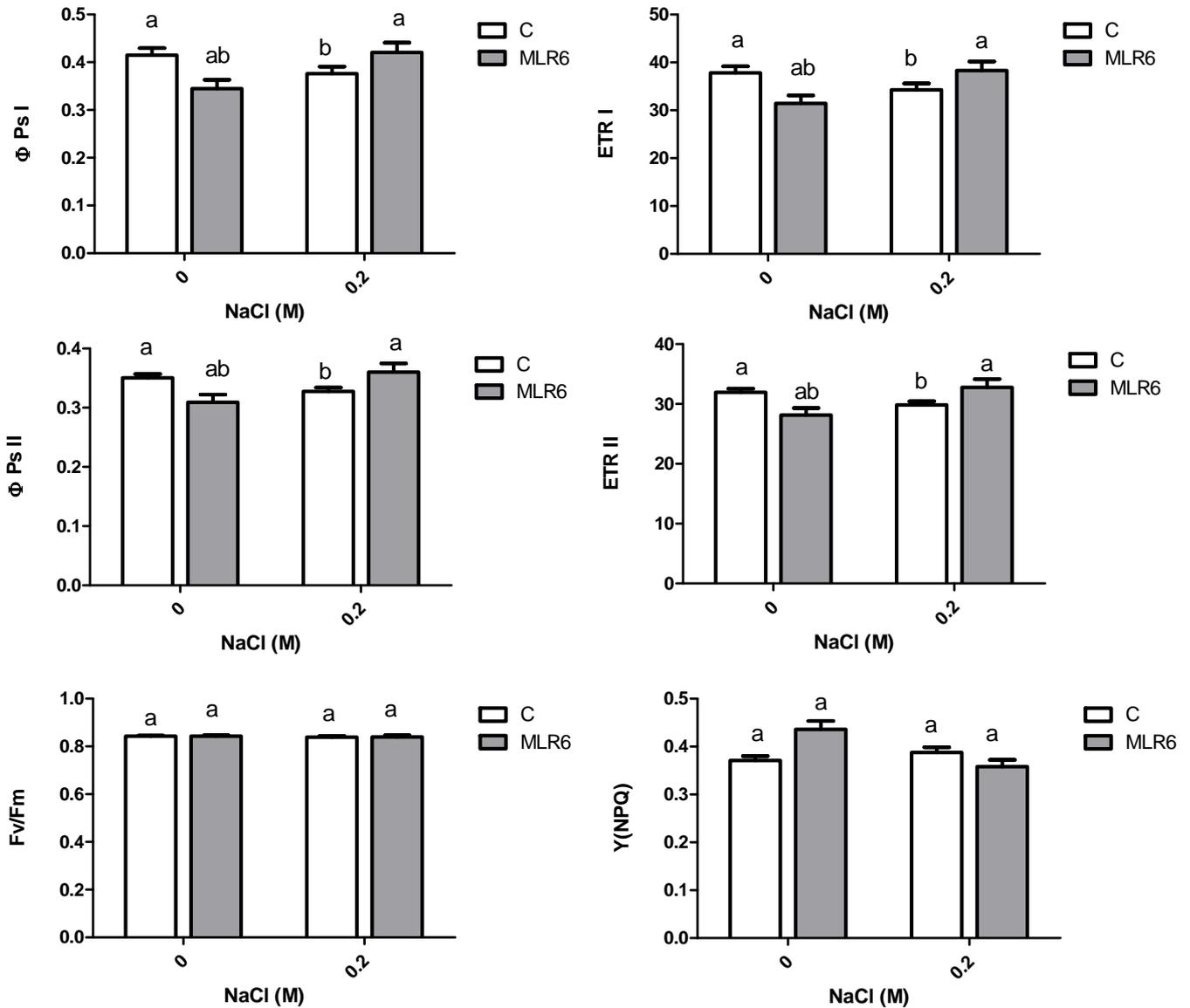


Fig. 44: Effet de MLR6 et du stress salin (0,2M NaCl) sur Φ PSI, ETR I, Φ PSII, ETR II, F_v / F_m et Y (NPQ) chez *A. thaliana* 24h après le 1^{er} stress. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

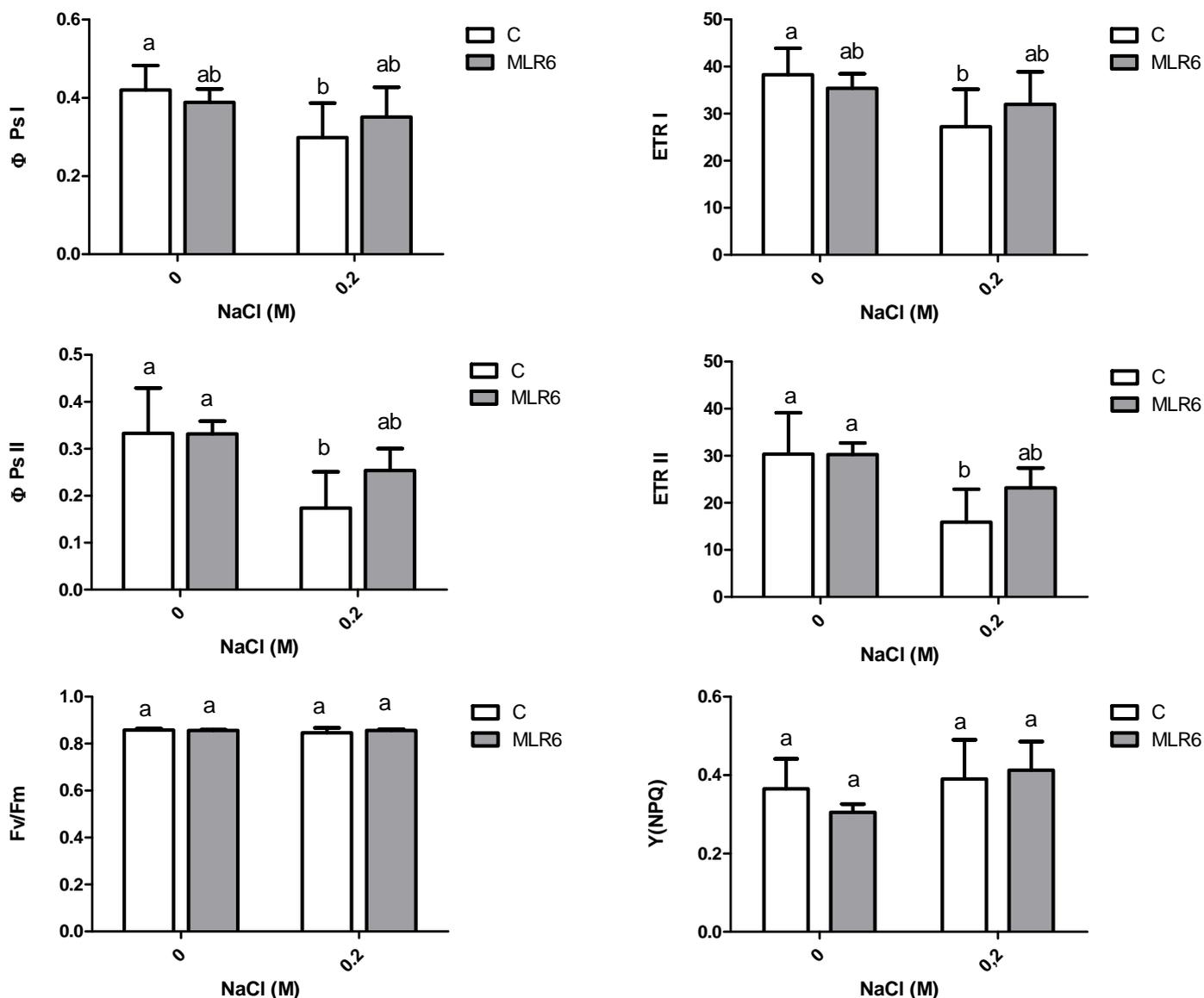


Fig. 45: Effet de MLR6 et du stress salin (0.2M NaCl) sur Φ PSI, ETR I, Φ PSII, ETR II, Fv / Fm et Y (NPQ) chez *A. thaliana* deux semaines après le 3^{ème} stress. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

II-8- Persistance de MLR6

La capacité de colonisation intraracinaire de MLR6 après 48 h d'incubation sur des boîtes LB inoculées avec des échantillons dilués fait apparaître l'absence des colonies fluorescentes. Ceci indique que cette souche n'est pas endophytique. En revanche, des colonies fluorescentes ont été retrouvées dans les géloses ensemencées avec du sol rhizosphérique indiquant que MLR6 est épiphytique et capable de persister sous un stress salin jusqu'à 30 jours post- inoculation (Fig 46, 47).

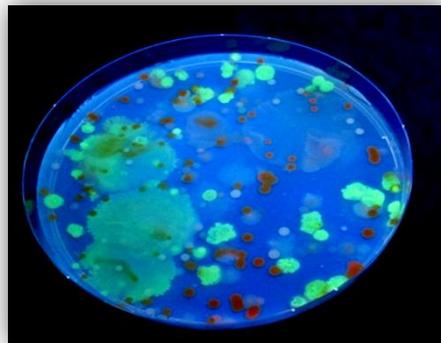


Fig. 46: Colonies bactériennes après étalement sur milieu LB au chloramphénicol (25µg/ml). Les colonies vertes représentent la souche MLR6 marquée. A partir de ces étalements, une colonie verte a été isolée et purifiée (Fig. 47).

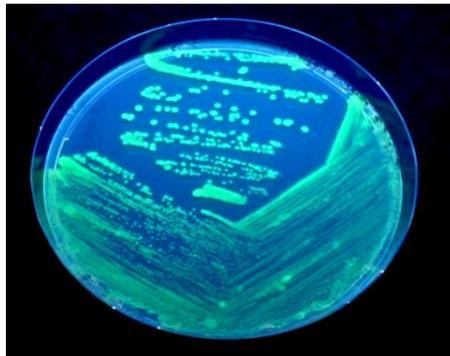


Fig. 47 : Exemple de purification d'une colonie verte représentant la souche MLR6 marquée à la GFP. La souche est purifiée des racines d' *Arabidopsis* après 30 jours d'application du 3^{ème} stress

II-9- Production de ROS

La présence de H_2O_2 et O_2^- est détectée chez les plantes inoculées et/ou non après 24 h d'application du stress salin (Fig. 48). Des taches brunes foncées sont apparues sur les feuilles d'*Arabidopsis* résultant de la polymérisation du DAB en présence de H_2O_2 (Fig.48A). L'inoculation par la souche MLR6 entraîne la génération d' H_2O_2 augmentant avec le temps. La révélation de la présence de l'anion superoxyde (O_2^-) a été effectuée, *in planta*, par l'utilisation de NBT. Une coloration légère en bleu et en brun est détectée au niveau des feuilles en absence du stress salin. Cependant, cette coloration s'intensifie au niveau des feuilles des plantes inoculées (Fig.48B).

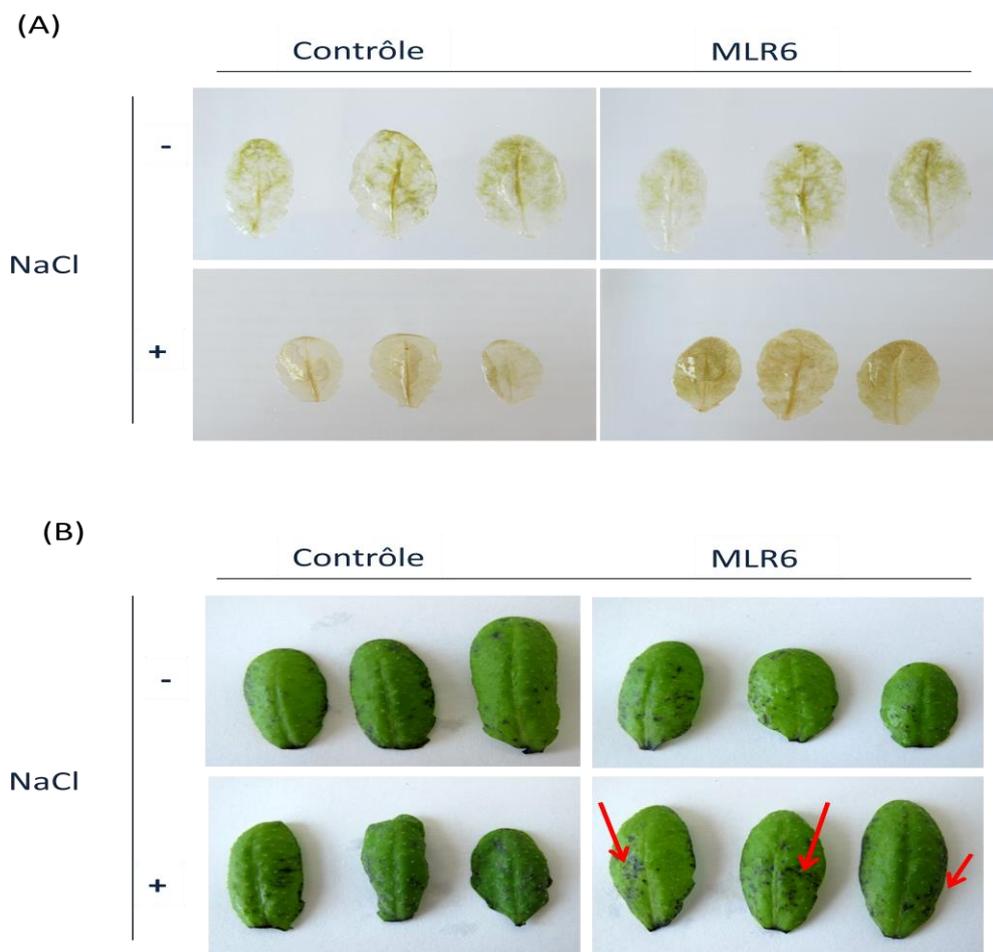


Fig. 48: Production d' H_2O_2 (A) et O_2^- (B) sur les feuilles de *A. thaliana* après 24h du stress salin. H_2O_2 est détecté par une coloration histochimique avec 3, 30 - iaminobenzidine (DAB) (1 mg/ml). O_2^- est détecté par une coloration histochimique avec le nitro blue tetrazolium (NBT) (1 mg/ml). Le test est fait sur 3 répétitions biologiques avec entre 3 et 5 plantes prélevées pour chaque condition.

II-10- Fuite d'électrolytes

Le taux de fuite est mesuré à la fin de l'expérience. En absence du stress salin, le taux de fuite chez les plantes inoculées avec MLR6 est légèrement inférieur à celui des plantes non inoculées. L'application du NaCl est corrélée avec une augmentation significative de la fuite d'électrolyte chez les plantes non inoculées. Par contre, en présence du stress salin, les plantes inoculées ont présentés un taux de fuite similaire à celui des plantes témoins (Fig. 49).

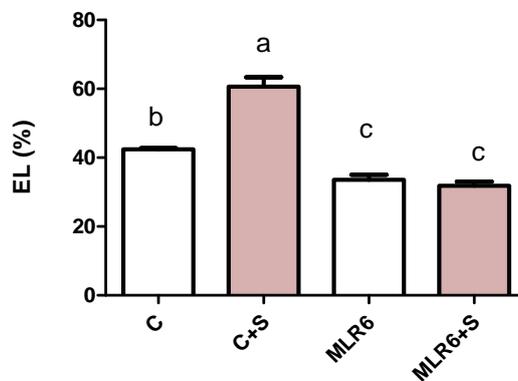


Fig. 49 : Fuite d'électrolytes dans les feuilles de *A. thaliana* traitée ou non avec MLR6 et de NaCl (0,2 M). Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

II-11- Effet de MLR6 sur les paramètres morphologiques de blé

Les résultats correspondants à l'analyse de différents paramètres de croissance morphologique (tige et racines) qui ont été mesurés à la fin de l'expérimentation sont présentés dans les figures 50, 51, 52 et 53. L'analyse de la variance a fait ressortir un effet négatif de la salinité sur les paramètres morphologiques de la croissance néanmoins, l'impact de la bactérie sur ces paramètres est positif. En effet, la présence de MLR6 a permis d'améliorer significativement ($P < 0.05$) la hauteur, le poids frais et sec de la partie foliaire du blé en présence qu'en absence du stress salin. Une amélioration de la longueur des racines de leur poids sec et frais est aussi notée (Fig. 53) (Annexe 20).

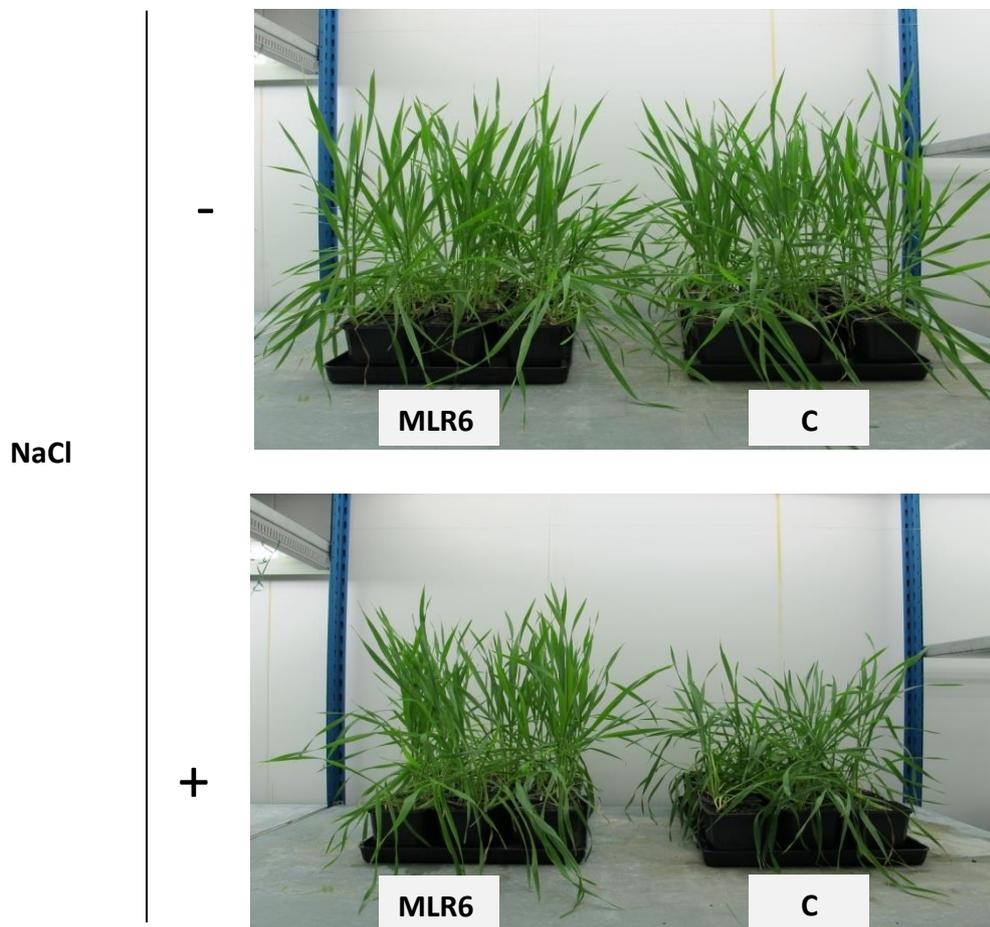


Fig. 50 : Dispositif expérimental des essais d'inoculation de blé par MLR6 en présence et en absence de 0,2M de NaCl

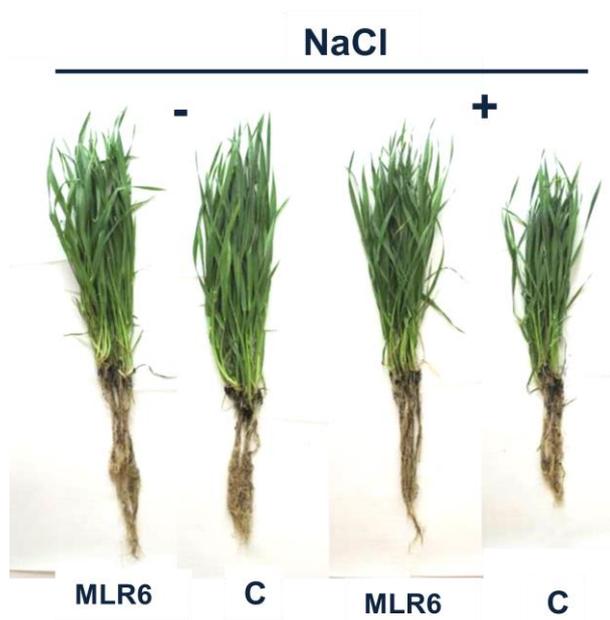


Fig. 51: Effet de MLR6 et de stress salin (0,2M NaCl) sur la longueur racinaire et sur la hauteur de blé.

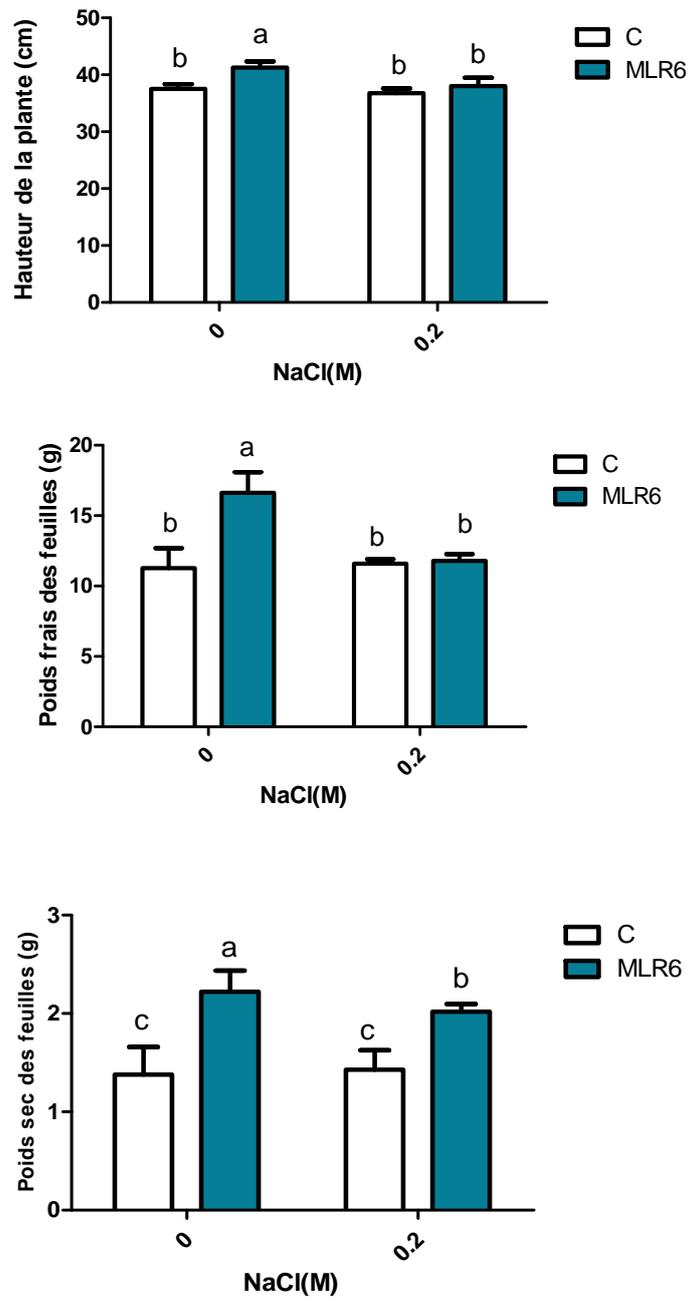


Fig. 52: Effet de MLR6 et du stress salin (NaCl 0,2 M) sur la hauteur, poids frais et sec de la partie foliaire du blé dur. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de deux répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

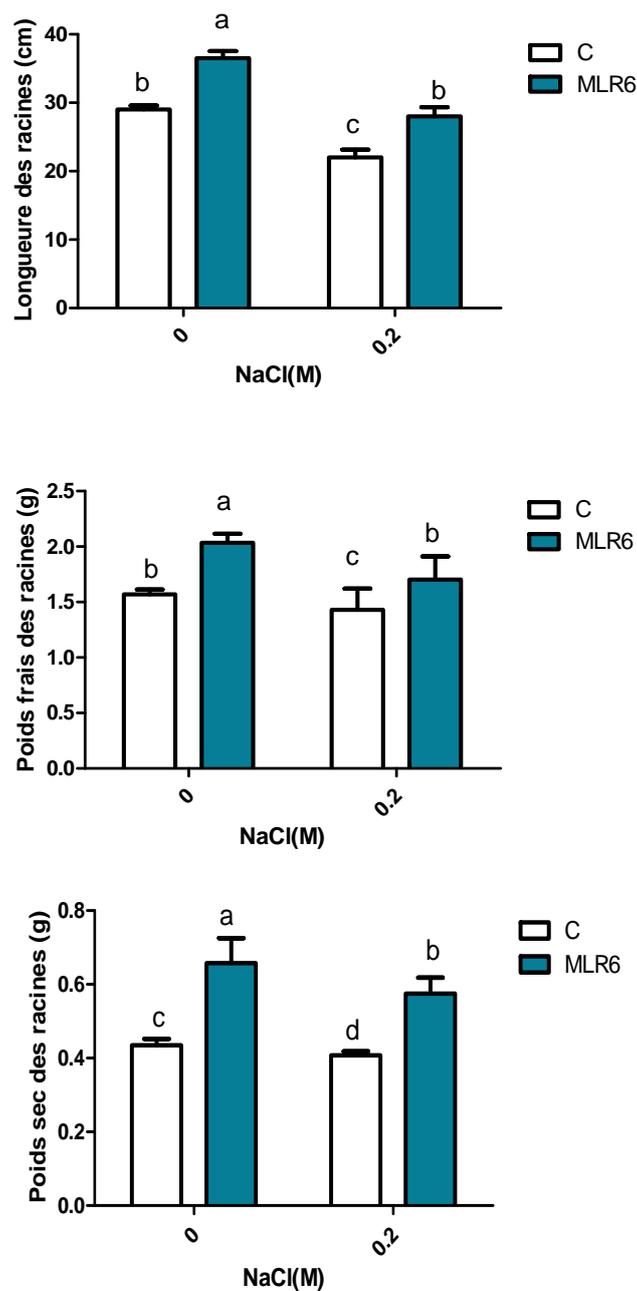
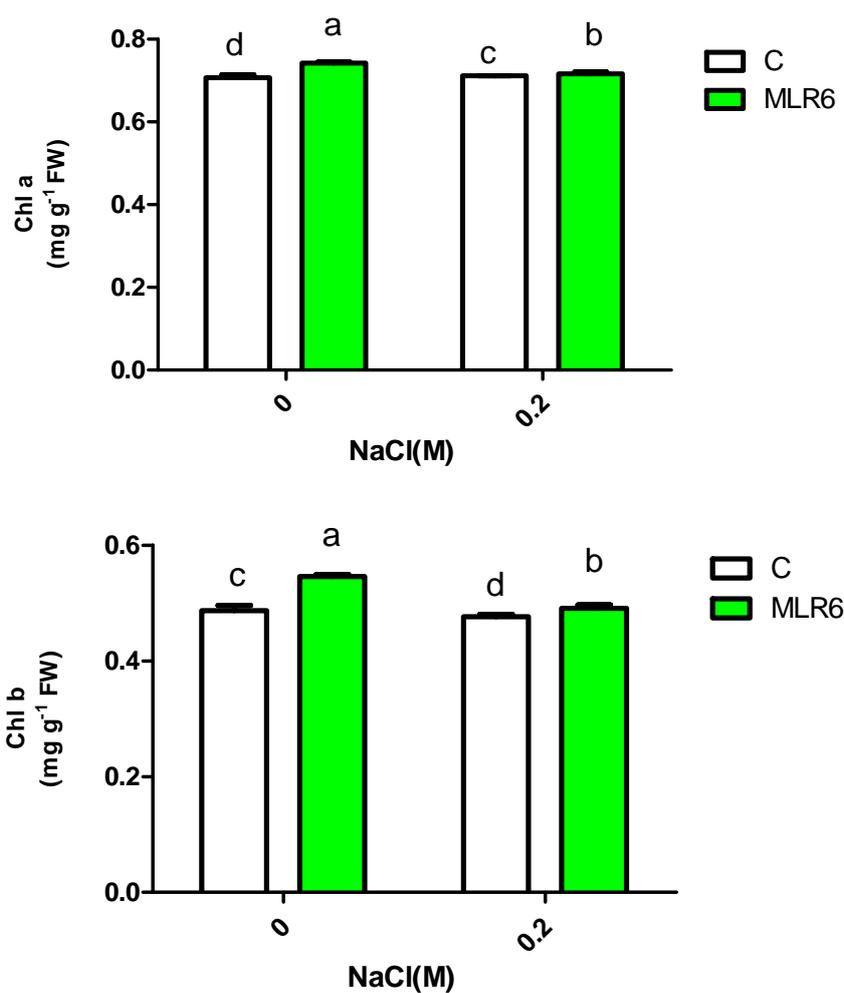


Fig. 53 : Effet de MLR6 et du stress salin (NaCl 0,2 M) sur la longueur, poids sec et frais des racines du blé dur. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de deux répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

II-12- Effet de MLR6 sur la chlorophylle des feuilles de blé

La salinité entraîne des réductions significatives des teneurs en chlorophylle a, b et totale ($p < 0,05$) l'inoculation des plantes par la souche MLR6 améliore significativement la teneur des feuilles en pigments photosynthétiques en présence et en absence du stress salin. Aucun effet de NaCl et de la souche n'a été observé sur la teneur en caroténoïdes (Fig. 54).



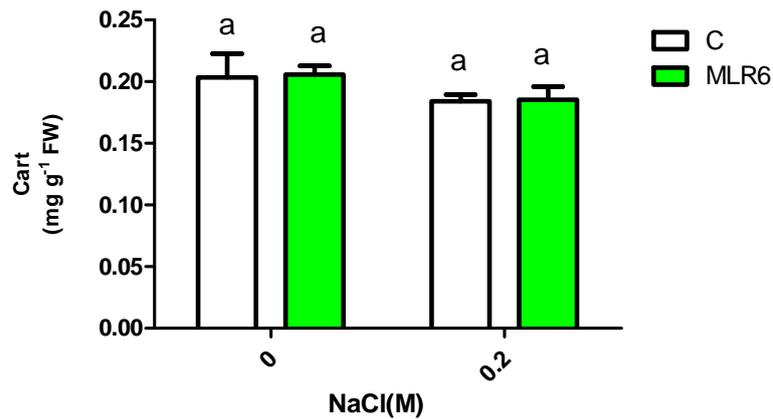
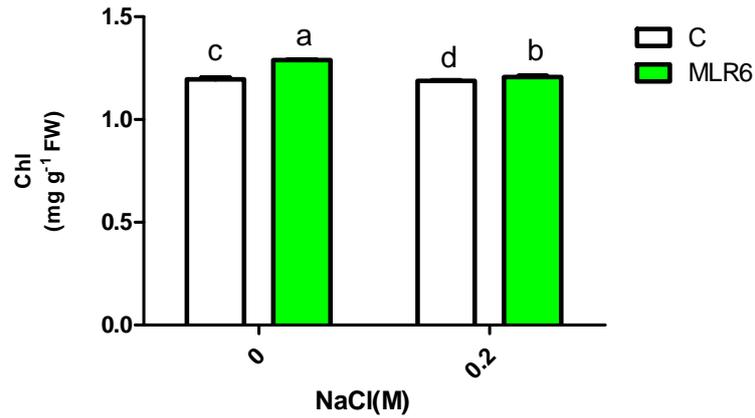


Fig. 54: Effet de MLR6 et du stress salin (0,2M NaCl) sur la chlorophylle a, la chlorophylle b, la chlorophylle totale et les caroténoïdes des feuilles de blé dur. Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SE de deux répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

III- Discussion

La rhizosphère des halophytes est appropriée pour trouver des bactéries ayant des capacités à stimuler la croissance végétale (Sáenz-Mata *et al.*, 2016). Dans cette étude, la bactérie halotolérante rhizosphérique *P.knackmussii* MLR6 a été utilisée comme inoculant pour évaluer son efficacité en tant que PGPR à améliorer l'halotolérance de *A. thaliana* ; et également pour comprendre la réponse physiologique et moléculaire de la plante, suite à l'inoculation de cette souche. Cette plante est attirante comme modèle d'étude pour plusieurs raisons, les plus importants est sa durée de vie courte (de 6 à 8 semaines) et la disponibilité des informations sur son génome (Khan *et al.*, 2016). Un facteur important à prendre en compte lors de la sélection de nouveaux isolats est de tester leurs activités dans les mêmes conditions où ils seront appliqués. Au fait, la souche MLR6 a montré une bonne capacité de tolérance aux différents stress testés. Elle tolère jusqu'à 0,8 M de NaCl et 60% de PEG₈₀₀₀. Elle manifeste les principales activités de fertilisation et de phytostimulation telles la solubilisation de phosphate, la production de l'acide indole acétique (IAA) et de sidérophores même, sous l'effet du stress salin. Egalement, elle a montré des activités PGP indirectes intervenant dans de la promotion des plantes telles que la production de NH₃ et de la chitinase. Aussi, elle semble antagoniste envers des champignons phytopathogènes comme *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* et *Aspergillus niger*. Le stress salin a un effet négatif sur la hauteur de la plante et le poids frais et sec des racines chez les plantes témoins de *A. thaliana* non inoculées. Ces résultats expérimentaux sur la croissance végétale obtenus en conditions contrôlées révèlent que la salinité a un effet néfaste sur les paramètres morphologiques de *A. thaliana* et de blé dur. Les résultats sont similaires à ceux obtenus par de nombreux auteurs travaillant sur différentes plantes. (Al-Mutawa 2003 ; Demir et Arif ; 2003, Ashraf, 2004 ; Mensah *et al.*, 2006 ; Razmjoo *et al.*, 2008, Egamberdieva et Lugtenberg 2014). Cependant, l'inoculation des graines confère une diminution de la sensibilité vis-à-vis du sel. La souche MLR6 améliore significativement les paramètres de croissance chez *A. thaliana* et le blé dur. Il est probable que ces effets positifs observés peuvent être attribués à la capacité de MLR6 à présenter des traits PGP, principalement, la production de l'AIA sous stress salin. Au fait, les auxines jouent un rôle important dans l'élongation des racines latérales. Elles contribuent ainsi à la division cellulaire et à la promotion de la croissance végétale (Dodd et Pérez-Alfocea, 2012). Il a été rapporté par Albacete *et al.* (2008) que l'inoculation des plantes avec des souches bactériennes productrices de l'AIA sous stress salin conduit à une amélioration notable de la

croissance des racines et des feuilles. Ceci est considéré comme une réponse adaptative de la plante à la salinité. Tiwari *et al.* (2011) ont supposé que la tolérance des halophytes et des glycophytes au sel pourrait être due à l'effet de l'auxine produite par leurs bactéries rhizosphériques. Toutes ces activités jouent un rôle important dans le contrôle physiologique de la plante face aux stress environnementaux. Ces résultats de l'amélioration de la croissance sous stress salin, suite à l'inoculation des PGPR ont été, déjà, signalés par plusieurs auteurs (Mayak *et al.*, 2004 ; Panwar *et al.*, 2016; Paul et Lade, 2014). Nous avons constaté aussi que MLR6 est capable de coloniser le système racinaire entier de *A. thaliana* après 72h d'inoculation et elle persiste jusqu'à la fin de l'expérimentation sous conditions stressées. Cette colonisation lui permet de s'établir dans la rhizosphère à des densités suffisantes pour manifester ses effets bénéfiques (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Selon Mayak *et al.* (2004) les souches PGPR tolérantes au sel sont capables de survivre dans la rhizosphère des plantes des sols salins et arides grâce à leur persistance et compétitivité. Cette capacité de colonisation pourrait avoir un effet sur l'architecture des racines en renforçant leur capacité à absorber l'eau et les nutriments (López-Bucio *et al.*, 2007).

La capacité de MLR6 à tolérer des niveaux élevés de NaCl pourrait être une caractéristique importante pour qu'elle puisse exposer ses activités PGP chez les plantes cultivées dans des conditions salines. Le stress causé par la salinité peut endommager la membrane cellulaire en augmentant la fuite des électrolytes (Tuna *et al.*, 2008). Dans cette étude, le pourcentage de fuite des électrolytes est plus élevé chez les plantes témoins soumises sous stress. Ce taux élevé indique un endommagement membranaire issu de l'effet osmotique. Le même résultat est rapporté par Mahmood *et al.* (2016) quand le sel est ajouté aux racines de *Mung bean*. Cependant, chez les plantes inoculées avec MLR6, une réduction significative de la fuite des électrolytes est observée permettant de déduire que l'inoculation par MLR6 a un effet positif sur la stabilité de la membrane cellulaire. Ceci est en accord avec de Marulanda *et al.* (2010) qui ont noté une réduction des altérations membranaires du maïs et du concombre cultivés sous stress salin après leur inoculation par des PGPR.

Le stress salin a aussi des effets néfastes sur productivité des plantes en endommageant la machinerie photosynthétique (Flors *et al.*, 2007). Dans notre étude, une forte réduction des teneurs des feuilles en chlorophylle est observée sous stress salin chez les plantes témoins de *A. thaliana* et du blé dur. Cette réduction peut être due à l'inactivation des enzymes spécifiques responsables de la synthèse des pigments photosynthétiques ou, également, à une altération de la membrane cellulaire (Younesi *et al.*, 2013). Par contre, le taux des pigments

photosynthétiques chez les plantes inoculées avec MLR6 est plus élevé en présence de stress salin. L'accumulation de la chlorophylle est considérée comme l'une des réponses importantes de la plante soumise au stress abiotique. Ces résultats sont en ligne avec ceux des autres auteurs qui ont confirmé que la salinité affecte négativement la teneur en chlorophylle des feuilles ainsi que sur la stabilité des membranes cellulaires (Younesi *et al.*, 2013 ; Mahmood *et al.*, 2016 ; Panwar *et al.*, 2016).

Quant aux paramètres d'échange gazeux, le traitement avec le NaCl a présenté un effet négatif sur la conductance stomatique et sur le taux de transpiration de *A. thaliana*. En effet, la salinité entraîne la fermeture des stomates par l'efflux des cations de la structure endomembranaire et des protéines de la membrane thylakoïdienne dégradée (Wang *et al.*, 2016). La réduction de la conductance stomatique peut être due à la salinité causant des dommages à la surface des stomates (Mahmood *et al.* 2016). La réduction du taux de transpiration peut être attribuée à la réduction de la conductivité stomatique qui résulte de l'incapacité des stomates à maintenir la turgescence cellulaire sous stress osmotique. La souche MLR6, par contre, augmente la conductance stomatique, le taux de transpiration et la concentration interne de CO₂ en présence de stress salin. Ces données sont similaires à celles obtenues par *Bacillus amylolyticus* GB03 qui améliore la capacité photosynthétique et la teneur des feuilles de *A. thaliana* en chlorophylle ainsi que celle de la plante médicinale *Codonopsis pilosula* (Han *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2008).

Le stress salin diminue significativement les paramètres photosynthétiques, y compris le rendement quantique de la réaction photochimique du ΦPSII, le taux de transport des électrons II, ETRII, ΦPSI et ETR I de *A. thaliana*. La diminution de la photosynthèse en réponse au stress salin conduit à diminuer la libération des sources de carbone et des exsudats racinaires ce qui limite les interactions symbiotiques microbiennes dans la rhizosphère (Wang *et al.*, 2016). L'inoculation par la souche MLR6 minimise l'effet du stress salin et une augmentation de tous les paramètres photosynthétiques étudiés est notée. Nunkaew *et al.* (2014) ont rapporté que l'amélioration de l'ETR entraînant une production rapide de l'ATP et de NADPH qui sont nécessaires à la fixation du CO₂.

Les formes actives d'oxygène, tels que le peroxyde d'oxygène (H₂O₂), les radicaux superoxydes (O₂⁻) et hydroxyl (OH), sont produites au cours des processus cellulaires aérobies et de façon plus accrue suite aux stress abiotiques, notamment la salinité (Logan 2005 ; Hanana *et al.*, 2011) . Cette dernière est connue par la génération des ROS qui sont

toxiques aux plantes. Par contre, ces radicaux peuvent agir comme des molécules de signalisation et induire ainsi l'expression des gènes de réponse et de défense cellulaires lorsqu'ils sont accumulés à des concentrations faibles à modérées (Mittler *et al.*, 2004; Ben Rejeb *et al.*, 2015). La production des O_2^- et H_2O_2 est observée sur les feuilles de *A. thaliana* inoculée avec MLR6, après 24 h d'application du stress salin. Ceci est en accord avec Ben Rejeb *et al.* (2015) où une augmentation de la concentration de H_2O_2 jusqu'à 6h de traitement de *A. thaliana* sous stress salin est observée. L'accumulation de H_2O_2 est une réponse commune précoce à divers facteurs de stress environnementaux, tels l'attaque des pathogènes (Torres *et al.*, 2002), le stress thermique (Saidi *et al.*, 2011), la sécheresse et le stress salin (Miller *et al.*, 2011). L'accumulation de ROS à une phase précoce après l'exposition au sel peut s'expliquer par l'effet « priming » de MLR6 qui pourrait activer des processus de signalisation cellulaire précoce impliqués dans la mise en place des voies de défense.

Chapitre VI : Analyse de l'expression des gènes liés au stress salin chez A. thaliana suite à son inoculation par la souche MLR6

La recherche de quelques gènes liés au stress et leur expression chez *Arabidopsis* est menée afin de mieux comprendre la réponse de la plante suite à son inoculation avec la souche MLR6.

I- Matériel et méthodes

I-1- Extraction de l'ARN, synthèse de l'ADNc et RT-PCR

L'extraction d'ARN est réalisée à partir de 50 mg d'un échantillon de *A. thaliana* broyé dans l'azote liquide auquel 1ml de TRIZOL (Extract All R- Eurobio Tm) est ajouté. Après 5 min d'incubation, 200µl de chloroforme/alcool isoamylique (24/1) sont additionés. Les tubes sont agités, incubés à température ambiante pour 3 min, puis centrifugés à 4°C, 15 min à 12000g. La phase aqueuse est récupérée et mélangée avec 500µl d'isopropanol pur. Les tubes sont mélangés par retournement. Après une incubation de 10 min, les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 10 min à 12000g. Le culot est lavé avec 1ml d'éthanol à 75% puis séché avant d'être repris dans 20µl d'eau milliQ. La qualité des ARNs est vérifiée par leur migration sur gel d'agarose (1%). Les ARNs totaux sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio Wave DNA WPA). Leur concentration est ajustée à 500 ng/µl et vérifiée sur gel d'agarose à 1%. La transcription inverse est réalisée à partir de 1µg d'ARN à l'aide du Kit enzymatique Verso cDNA synthesis Kit dans des tubes de 0.5ml. Le volume final du mélange réactionnel est fixé à 20µl. La composition du mix est présentée dans le tableau suivant:

Tab. 11 : Composition du Mix de RT

Elément de mélange	Volume de prise (µl) pour une réaction
Buffer (5X)	4
dNTP	2
OligodT primers	0.25
Random Hexamères	0.75
Reverse transcriptase	1
Enhancer	1
Eau (qsp 20µl)	9

Les échantillons sont placés dans un thermocycleur (Bio-Rad) en sélectionnant le programme suivant :

- Synthèse 37°C pendant 2 h
- Inactivation 95°C pendant 2 min

La réussite de la transcription inverse est évaluée par la réalisation d'une PCR sur le gène de référence *UBQ5* de *A. thaliana*. 1µl de l'ADNc de chaque échantillon est introduit dans des tubes de 0.2ml. Le volume final du mélange réactionnel est fixé à 25µl. Un contrôle négatif contenant l'eau milli-Q stérile au lieu de l'ADNc est inclus dans chaque réaction PCR. La composition du mix est présentée dans le tableau suivant :

Tab. 12 : Composition du Mix de la PCR

Élément de mélange	Volume de prise (µl) pour une réaction
Tampon PCR (x10)	2.5
dNTPs	0.5
Amorces	1
Taq polymérase (5U/µl)	1
Eau	19.9
Volume final	25

Les échantillons sont placés dans un thermocycleur (Bio-Rad) en sélectionnant le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 94°C/1min
 - Dénaturation : 94°C/1min
 - Hybridation : 50°C/1min
 - Elongation : 72°C/1min
 - Elongation finale 72°C/5min
 - Refroidissement 4°C/10min
- } X35

I-2- Electrophorèse sur gel d'agarose

Le gel d'agarose est utilisé à une concentration de 1%. L'agarose est dissout dans du tampon TAE 0.5X (Tris/Acétate/EDTA 10x, Eurobio) et contient du BET (Bromure d'ethyidium, Eurobio). Les acides nucléiques sont visualisés sous lumière UV en présence d'un marqueur moléculaire 100pb DNA pour l'ADN et 1Kb de Biolabs Tm pour l'ARN. La migration est réalisée dans du tampon TAE 0.5x pendant 30min à 100V.

I-3- qRT-PCR

La PCR quantitative en temps réel est réalisée à l'aide du kit SYBRGreen (Thermofisher scientific) sur l'appareil Biorad CFX 96-Real Tim system dans un volume final de 15µl. 5µl de produit RT dilué à 1/10^e est utilisé. Les 10µl de mix PCR sont composés des réactifs présentés dans le tableau suivant :

Tab. 13 : Composition du Mix de qPCR

Elément de mélange	Volume de prise (µl) pour une réaction
2 Step QPCR Syber ROX Mix	7.5
Amorces (3µM)	1.4
Eau	1.1

Les échantillons sont placés dans un thermocycleur (Bio-Rad) en sélectionnant le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 94°C/15min
 - Dénaturation : 94°C/15s
 - Hybridation : 60°C/1min
 - Elongation : 72°C/2min
 - Elongation finale 72°C/5min
 - Refroidissement 4°C/10min
- } X30

Les amorces ayant servi pour la qRT-PCR sont compilées dans le tableau ci-dessous (Tab. 14). Les réactions sont réalisées en duplicats.

Tab. 14 : Gènes analysés par la qRT-PCR

Nom du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>AtSOS1</i>	TCATCTCCCGCCGCATTATC	CTTGAGCTACGTGGTGGTGT
<i>AtSOS2</i>	GCCCCTGATGATGAATGCCT	CCCTCGAGCCTTGTCTTGAA
<i>AtSOS3</i>	AGGTGTCTTCCATCCAAGCG	TTTCCGTCGTTTTTGGCGGTC
<i>AtHKT1</i>	CTCTGGTCTCATCTGGCTCC	CCTAGCACCGTCACTCCAAG
<i>AtNHX1</i>	GGGAACATCGATCGCAGTGA	TGATTGCATTCCCGCGTACA
<i>AtPRI</i>	AACTACGCTGCGAACACGTG	TCACTTTGGCACATCCGAGTC
<i>AtSAG13</i>	GCGTGTTGGAGAAGCAAATG	CGTCAACGCAAATGGTCTGA
<i>AtUBQ5</i>	GGAAGAAGAAGACTTACACC	AGTCCACACTTACCACAGTA
<i>AtActin</i>	CCCAGGAATTGCTGACCGTA	TTTTCTCTCTGGCGGTGCA

I-4- Analyses statistiques

L'ensemble des résultats a été analysé à l'aide d'un programme statistique, SAS version 9 (SAS Institute, Cary, NC, USA), par l'utilisation du test de Tukey dont le seuil d'erreur alpha est $\leq 0,05$.

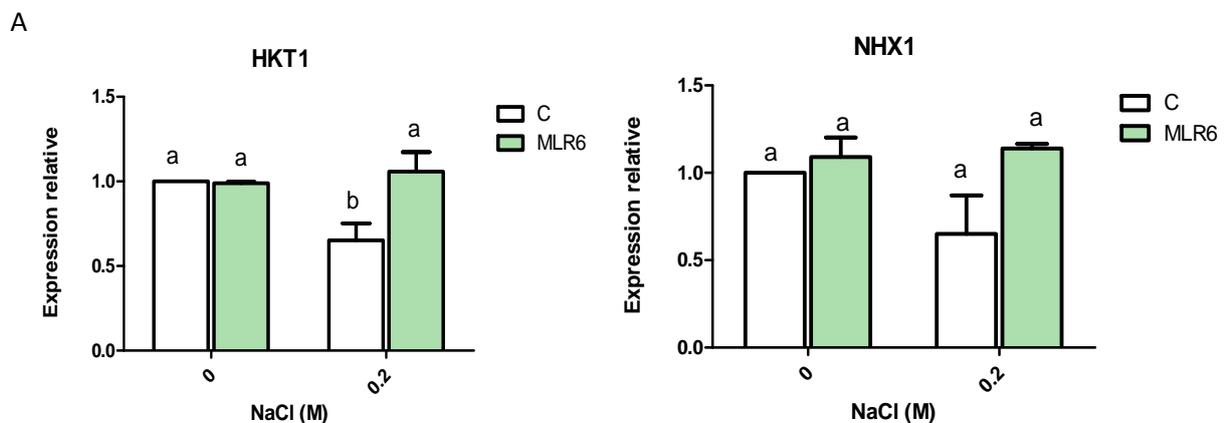
II- Résultats

II-1- Expression des gènes liés au stress

La RT-PCR est utilisée pour analyser la transcription de certains gènes liés au stress salin tels le transporteur de sodium à forte affinité pour le potassium (*AtHKT1*), l'antiport vacuolaire (*AtNHX1*) et l'antiport membranaire Na^+/H^+ (*AtSOS1*) dont l'activité est régulée par la protéine CBL (*AtSOS3*) associée à la kinase codée par *AtSOS2*. Le gène *AtPRI*, lié à la défense au stress biotique et le gène *AtSAG13* lié à la sénescence sont également étudiés. L'expression des gènes d'*A. thaliana* a été observée 24 h après application du premier stress salin chez les plantes inoculées ou non par la souche MLR6. Les profils d'expression des gènes sont présentés dans la Figure 55. En conditions stressantes, le niveau d'expression du gène *AtHKT1* chez les plantes inoculées par MLR6 est le même que celui des plantes témoins non stressées. Par contre, une diminution significative de son niveau d'expression est notée chez les plantes non inoculées en comparaison des témoins sans stress (Fig. 55A). Le profil d'expression du gène *AtNHX1* n'a pas varié dans les différentes conditions testées (Fig. 55A).

L'application du stress salin induit une augmentation significative de l'expression du gène *AtSOS1* chez les plantes inoculées stressées par rapport aux plantes inoculées non stressées. Les plantes non inoculées soumises au stress salin ont enregistré une augmentation significative de l'expression du gène *AtSOS2* (Fig. 55B), contrairement aux plantes inoculées par MLR6 chez lesquelles son niveau d'expression est le même avec ou sans stress. Contrairement aux gènes *AtSOS1* et *AtSOS2*, le gène *AtSOS3* montre un profil d'expression similaire quel que soit le traitement (Fig. 55B). En effet, aucun changement n'est constaté dans son niveau d'expression chez les plantes inoculées et non inoculées soumises au stress salin.

Les gènes *AtPRI* et *AtSAG13* ont montré des profils similaires (Fig. 55C). Suite à l'application du stress salin, leur expression est significativement augmentée chez les plantes non inoculées comparée à celles non inoculées et non stressées. En revanche, chez les plantes inoculées, le niveau d'expression des deux gènes est similaire aux conditions non stressantes et aucune différence significative n'est constatée.



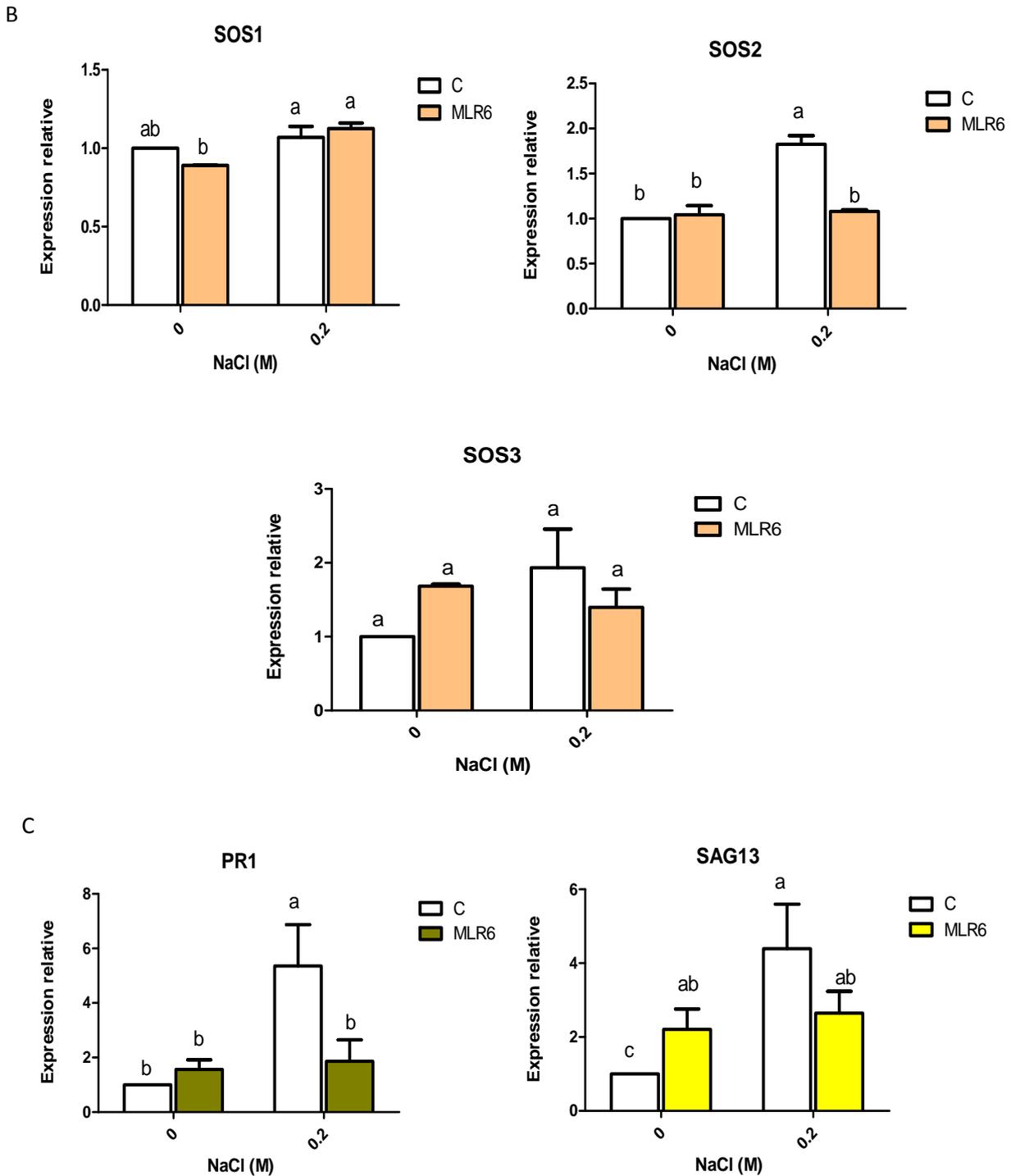


Fig. 55: Expression des gènes liés au stress dans les feuilles de *A. thaliana* inoculée ou non par MLR6, en absence et en présence de stress salin (0,2M NaCl). Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SD de deux répétitions biologiques indépendantes (chacune réalisée en duplicats). Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements ($P < 0,05$) selon le test de Tukey.

III- Discussion

Dans des conditions stressantes, l'expression du gène *AtHKT1* est augmentée chez les plantes inoculées, par contre, une diminution significative de son niveau est notée chez les plantes non inoculées comparée aux témoins sans stress. Un résultat similaire est observé par Ali *et al.* (2012) chez *A. thaliana* exposée au stress salin. La diminution enregistrée peut être due à la régulation du gène qui ne se maintient pas dans le temps. Ce gène code un transporteur situé sur la membrane plasmique qui est responsable de la recirculation du sodium des feuilles vers les racines *via* le phloème (Hauser et Horie 2010). L'expression du gène *AtNHX1* n'est pas variée quelles que soient les conditions testées. Ce gène code l'antiport vacuolaire $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{H}^+$ qui est impliqué dans la compartimentation des ions dans des vacuoles en conditions normales et stressantes (Jiang *et al.*, 2010; Leidi *et al.*, 2010, Pinedo *et al.*, 2015). Son rôle consiste à évacuer les ions Na^+ en excès du cytoplasme vers la vacuole afin d'éviter leur effet toxique et inhibiteur sur les processus enzymatiques. L'énergie de la compartimentation vacuolaire est fournie par les pompes à protons ATPases (H^+ -adénosine triphosphatases) et PPases (H^+ -pyrophosphatases) vacuolaires (Horie et Schroeder 2004). Ce mécanisme de compartimentation vacuolaire entraîne un maintien de la pression de turgescence de la cellule, ce qui diminue sa perte en eau. Chez les espèces tolérantes à la salinité c'est plutôt une alcalinisation du cytoplasme combinée à une acidification de la vacuole qui se produit suite à l'activation de l'antiport vacuolaire NHX1. Cependant l'expression de NHX1 pourrait être précoce (Zhang et Shi, 2013).

Nous avons également constaté qu'en conditions de stress salin, l'expression du gène *AtSOS1* a été augmentée de manière significative chez les plantes inoculées stressées par rapport aux plantes inoculées non stressées. De ce fait, nous concluons que le gène *AtSOS1* est régulé par l'interaction entre la bactérie et l'application du stress salin et non par l'inoculation bactérienne seule. Il a été montré que les plantes d'*Arabidopsis* transgéniques qui surexpriment le gène *AtSOS1* manifestent une forte tolérance à la salinité et accumulent moins de sodium au niveau de la sève xylémique et de la tige en comparaison des plantes sauvages. L'expression de ce gène peut (1) induire le flux de sodium du cytosol vers la rhizosphère (2) augmenter le temps disponible pour la compartimentation vacuolaire par le ralentissement de l'accumulation de Na^+ dans le cytoplasme et (3) contrôler le transport de sodium sur les longues distances entre les racines et les feuilles (Jayakannan *et al.*, 2015)

Le gène *AtSOS2* est surexprimé chez les plantes non inoculées et stressées, alors que la salinité n'a pas affecté de façon significative son expression chez les plantes inoculées par MLR6. Des résultats similaires ont été observés par Quan *et al.* (2017) où l'expression des gènes *SOS* testés a été induite d'un facteur 2 à 3 après le traitement avec 150 mM de NaCl pendant 2 heures. D'autre part, le profil d'expression du gène *AtSOS3* est assez similaire à celui de *AtNHX1*. En effet, la salinité n'a pas affecté son expression dans tous les traitements. L'augmentation du taux d'expression de *AtSOS3* n'a pas été détectée chez les plantes stressées. La voie SOS qui régule l'homéostasie ionique cellulaire débute lorsque les signaux calciques provoqués par le stress salin sont perçus par *AtSOS3* puis la fixation du calcium sur les sites spécifiques de cette protéine active une protéine kinase *SOS2* (Halfter *et al.*, 2000). Ce complexe *SOS3-SOS2* active à son tour par phosphorylation l'antiport Na^+/H^+ *SOS1* dont la fonction est d'exclure le sodium hors du cytoplasme à travers la membrane plasmique (Hanana *et al.*, 2011; Quan *et al.*, 2017). Ces constatations indiquent que *AtSOS3* s'exprimerait aux stades précoces de la réponse de la plante au stress appliqué, ce qui est en accord avec les données de la bibliographie. L'application de stress salin augmente l'expression d'*AtPRI* chez les plantes non inoculées alors que son expression n'est pas affectée chez les plantes inoculées. Les gènes PR sont exprimés en cas d'infection par un agent pathogène ou en cas de blessures ou dommages causés par des insectes. Ils sont également induits en cas de contraintes environnementales, y compris le froid et le stress osmotique (Seo *et al.*, 2008). Le gène *AtSAG13*, impliqué dans la sénescence, est surexprimé chez les plantes non inoculées, mais chez les plantes inoculées son taux n'est pas amélioré, démontrant ainsi l'effet protecteur de MLR6 à l'encontre du stress salin.

Conclusion

Ce travail se proposait pour caractériser la flore bactérienne de l'halophyte *Salsola tetrandra* obtenu à partir des régions arides d'origines géographiques diverses de l'Algérie. Une collection de 76 isolats naïfs des sols salins et de la rhizosphère et la partie interne des racines de l'halophyte est constituée.

Le dénombrement des bactéries cultivables a révélé l'abondance des endophytes suivies par des bactéries rhizosphériques et non rhizosphériques. La majorité des isolats, quels que soient leur origine, présentent des activités promotrices de la croissance végétale.

Sur les 76 isolats, 51 ont été sélectionnés en se basant sur leur réaction de Gram. La technique moléculaire ITS a révélé 17 profils différents de ces bactéries. Les résultats de l'identification bactérienne portant sur la caractérisation phylogénétique sur la base du séquençage du gène d'ADNr 16S attestent la dominance de *Pseudomonas*.

La caractérisation des 17 souches identifiées a permis de mettre en évidence leur capacité de s'adapter à des conditions extrêmes de NaCl, de PEG₈₀₀₀ et de pH.

Afin de sélectionner des isolats performants en condition de stress salin, 5 souches (*Pseudomonas frederiksbergensis* SE1, *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia vermicola* ME1, *Providencia rettgeri* BR5 et *Pseudomonas knackmussii* MLR6) sur 17 ont été choisies. Elles peuvent croître en présence de concentrations de l'ordre de 2M NaCl, 60% de PEG₈₀₀₀ et à des concentrations de pHs allant de 4 à 11. Pour tenter de valoriser les 5 souches sélectionnées nous nous sommes penchés sur l'activité PGPR en présence des concentrations croissantes de NaCl. Ce test a permis de classer les différentes souches selon leur capacité à manifester les traits PGPR.

La souche la plus représentative sélectionnée sur la base de sa performance multiple en condition de stress salin est *P. knackmussii* MLR6. Elle a manifesté une grande capacité de solubiliser le phosphate, de produire l'AIA et les sidérophores dans une large gamme de NaCl.

Cette étude révèle ainsi que la rhizosphère de l'halophyte *Salsola tetrandra* se caractérise par une diversité bactérienne ayant un potentiel d'activité PGP intéressant même à des concentrations élevées de sel.

La deuxième partie du travail a mis en évidence la capacité de *P. knackmussii* MLR6 à améliorer l'halotolérance de *A. thaliana* et du blé dur.

Le stress salin (0.2M NaCl) a affecté négativement le développement de *A. thaliana*. Cependant, l'inoculation par MLR6 minimise les effets négatifs du NaCl par stabilisation de la membrane en réduisant la fuite des électrolytes. Simultanément, il induit l'accumulation des ROS après un court temps d'exposition au NaCl. Ceci confirme l'effet « priming » de la souche.

L'inoculation de *A.thaliana* par MLR6 permet d'augmenter significativement le poids et la hauteur de la plante. Elle améliore la photosynthèse nette, la conductance stomatique, la transpiration et la concentration interne de CO₂ sous stress salin. Le test de la colonisation révèle que MLR6 est rhizosphérique et elle persiste jusqu'à 30 jours après application de NaCl.

L'expérience réalisée sur le blé dur a révélé une inhibition de sa croissance à 0,2M NaCl. Cependant, une stimulation remarquable de la croissance en présence de MLR6 est notée. La souche améliore significativement les paramètres morphologiques (taille et masse foliaire et racinaire) et la teneur en chlorophylle.

L'étude de quelques gènes liés au stress salin chez *A. thaliana* (SOS, NHX1, HKT1, PR1 et SAG13) a permis de confirmer la tolérance de la plante en présence de MLR6.

L'ensemble de ces résultats montre que l'exploitation du potentiel PGPR de la souche MLR6 est une alternative dans l'amélioration de la croissance des plantes sous stress salin. Il est possible donc de réussir l'amélioration de la croissance et l'halotolérance des plantes glycophytes sous conditions de stress salin

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

- Approfondir la caractérisation moléculaire de la bactérie *P.knackmussi* MLR6.
- Suivre la survie de la souche MLR6 et la conservation de ses activités PGPR sur terrain
- Etudier la capacité de la souche à améliorer l'halotolérance des autres plantes stratégiques

Références bibliographiques

- Ahemad, M., Khan, M.S. (2012). Evaluation of plant-growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. *Ann. Microbiol.* **62**: 1531–1540.
- Ai, C., Liang, G., Sun, J., Wang, X., He, P., Zhou, W., He, X. (2015). Reduced dependence of rhizosphere microbiome on plant-derived carbon in 32-year long-term inorganic and organic fertilized soils. *Soil Biol. Biochem.* **80**: 70–78.
- Albacete, A., Ghanem, M.E., Martinez-Andujar, C., Acosta, M., Sanchez-Bravo, J., Martinez, V., Lutts, S., Dodd, I.C., Perez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J. Exp. Bot.* **59**: 4119–4131.
- Ali, Z., Park, H.C., Ali, A., Oh, D.H., Aman, R., Kropornicka, A., Hong, H., Choi, W., Chung, W.S., Kim, W.Y., Bressan, R.A., Bohnert, H.J., Lee, S.Y., Yun, D.J. (2012). TsHKT1; 2, a HKT1 Homolog from the Extremophile *Arabidopsis* Relative *Thellungiella salsuginea*, Shows K⁺ Specificity in the Presence of NaCl. *Plant. Physiol.* **158**:1463–1474.
- Al-Mailem, D., Sorkhoh, N., Marafie, M., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., Radwan, S. (2010). Oil phytoremediation potential of hypersaline coasts of the Arabian Gulf using rhizosphere technology. *Bioresour Technol.* **101**:5786–5792.
- Al-Mutawa, M.M. (2003). Effect of salinity on germination and seedling growth of chick pea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Int. J. Agro. Biol.* **5**:227–229.
- Anand, K., Kumari, B., Mallick, M.A. (2016). Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as bio-fertilizers. *Int. J. Pharm. Sci.* **8**: 37–40.
- 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.
- Apse, M.P., Blumwald, E. 2007. Na⁺transport in plants. *FEBS Lett.* **581**: 2247–2254.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Arora, N.K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N., Maheshwari, D.K. (2012). PGPR for protection of plant health under saline conditions, p 239–258. In: Maheshwari, D.K. (ed.) *Bacteria in agrobiology: stress management*. Springer, Heidelberg, Dordrecht, London, New York,
- Arshad, M., Saleem, M., Hussain, S. (2007). Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol.* **25** : 356 – 362.
- Ashraf, M. (2004). Photosynthetic capacity and ion accumulation in a medicinal plant henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under salt stress. *J. Appl. Bot.* **78**:91–96.

- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Ismail, M.R., Hoque, A., Zahurul, M., Shahidullah SM, Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *J. Biotechnol.* **8**: 1247–1252.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M., Salekdeh, G. H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics.* **6**: 2542–2554.
- Bakker, A.W., Schippers, B. (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.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Aguilar, C.A. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**: 1761–1778.
- Barriuso, J., Solano, B.R., Fray, R.G., Camara, M., Hartmann, A., Manero, F.J.G. (2008). Transgenic tomato plants alter quorum sensing in plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant. Biotechnol. J.* **6**: 442–452.
- Bell-Perkins, L.J., Lynch, J.M. (2002). Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. *In*: Bitton, G. (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria: their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* **35**: 1044–1051.
- Ben Rejeb, K., Benzarti, M., Debez, A., Bailly, C., Savoure, A., Abdelly, C. (2015). NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant. Physiol.* **174**:5–15.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., Smalla, K. (2006). The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56** : 250–261.
- Benslimane M., Hamimed A., Khaldi A., El Zerey W. (2015). Approche methodologique d'évaluation de la politique de gestion de l'eau des zones humides Cas du chott chergui (sud-ouest algerien). *Larhyss J.* **22**: 167-181
- Beyaoui, A., Chaari, A., Ghouila, H., Ali, H.M., Ben, J.H. (2012). New antioxidant bibenzyl derivative and isoflavonoid from the Tunisian *Salsola tetrandra* Folsk. *Nat Prod Res.* **26**: 37–41.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *W. J. Microbial. Biotechnol.* **28**: 1327–1350.
- Boeuf, V., Plantureux, S., Guckert, A. (1993). Mechanical constraint and organic matter losses of young maize roots under sterile conditions, p. 325-330. *In*: Cook, H. F., Lee, H. C., (ed.), Soil management in sustainable agriculture. Wye college press, London,

- Boukhatem, Z.F., Domergue, O., Bekki, A., Merabet, C., Sekkour, S., Bouazza, F., Duponnois, R., de Lajudie, P., Galiana, A. (2012). Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semiarid regions in Algeria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **80**:534–547.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E. (1991). Rapid *in situ* assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:535–538.
- Brimecombe, M. J., De Leij, F.A., Lynch, J.M. (2007). Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. *In* : Pinto, R. Varanini, Z., Nannipierei, P. (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* : Grouzis, M., Le Floch, E. (ed.), Un arbre ou désert, *Acacia raddiana*. IRD Éditions. Paris.
- Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Papa, G. Lo, Dazzi, C., Benedetti, A. (2014). Salinity and Bacterial Diversity : To What Extent Does the Concentration of Salt Affect the Bacterial Community in a Saline Soil ? *PLoS ONE.* **9**.
- Cao, D., Shi, F., Koike, T., Lu, Z., Sun, J. (2014). Halophyte plant communities affecting enzyme activity and microbes in saline soils of the Yellow River Delta in China. *Clean - Soil, Air, Water.* **42**: 1433–1440.
- Cappuccino, J.C., Sherman, N. (1992). Microbiology; a laboratory manual, 3rd edn. Benjamin/cumming pub.Co, New York, pp 125–179.
- Chang, W.T., Hsieh, C.H., Hsieh, H.S., Chen, C. (2009). Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *W. J. Microb. Biotechnol.* **25**:375–382.
- Chaudhary, D.R., Rathore, A.P., Kumar, R., Jha, B. (2016). Spatial and halophytes associated microbial communities in intertidal coastal region of india. *Int. J. Phytoremediation.* **19** :478-489.
- Cong, M., Cao, D., Sun, J., Shi, F. (2014). Soil microbial community structure evolution along halophyte succession in Bohai Bay Wetland.. *J. Chem.* **8**.
- Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B., Kausar, R. (2016). Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev.* **37**: 130–136
- Davies, P.J. (1995). The plant hormones: their nature, occurrence and functions, p. 1–12. *In*: Davies, P.J. (ed.), Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- de Souza, J.T., Raaijmakers, J.M. (2003). Polymorphisms within the PrnD and PltC genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:21–34

- Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J. Exp. Bot.* **66**: 2827–2837
- Demir, I., Arif, I. (2003). Effect of different soil salinity levels on germination and seedling growth of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turkish J. Agric.* **27**:221–227
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. (1985). Basic plant pathology methods. CRS Press, Boca Raton, p 335.
- Diby, P., Bharathkumar, S., Sudha, N. (2005). Osmotolerance in biocontrol strain of pseudomonas pseudoalcaligenes MSP-538: a study using osmolyte, protein and gene expression profiling. *Ann. Microbiol.* **55** :243–47
- Dimkpa, C.O., Merten D., Svatoš A., Büchel G., Kothe, E. (2009). Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biol. Biochem.* **41** :154–162.
- Dobbelaere , S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003). Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci.* **22**:107–149.
- Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *J. Exp. Bot.* **63** :3415–3428.
- Duffy, B.K., De´fago, G. (2000). Controlling instability in gacS-gacA regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** :3142–3150
- Dunne, C., Moëgne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D.N., O’Gara, F. (1998). Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathol.* **47**: 299–307.
- Egamberdieva , D., Lugtenberg, B. (2014). Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Alleviate Salinity Stress in Plants, p. 73–96. *In* : Miransari M. (ed.), Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses; Springer: New York, NY, USA.
- Egamberdieva D., Wirth, S.J., Alqarawi, A.A., Abd_Allah, E.F., Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Front. Microbiol.* **8**:2104.
- El-Fouly, M.M., Zeinab, M.M., Zeinab, A.S et al. (2001). Micronutrient sprays as a tool to increase tolerance of faba bean and wheat plants to salinity, p. 422–423. *In*: Horst,W.J. (ed.) Plant nutrition, 92. Springer, Netherlands,
- El-Sayed, W.S., Akhkha, A., El-Naggar, M.Y., Elbadry, M. (2014). *In vitro* antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Front. Microbiol.* **5**: 1–11.

Etesami, H. Beattie, G.A. (2018). Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Front. Microbiol.* **9**:148.

Farokh, R.Z., Sachdev, D., Pour, N.K., Engineer, A., Pardesi, K.R., Zinjarde, S., Dhakephalkar, P.K., Chopade, B.A. (2011). Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 556–566.

Felestrino, É.B., Santiago, I.F., Freitas, L. da S., Rosa, L.H., Ribeiro, S.P., Moreira, L.M. (2017). Plant growth promoting bacteria associated with *langsdorffia hypogaea*-rhizosphere-host biological interface: a neglected model of bacterial prospecting. *Front. Microbiol.* **8**: 172.

Ferjani, R., Marasco, R., Rolli, E., Cherif, H., Cherif, A., Gtari, M., Boudabous, A., Daffonchio, D., Ouzari, H. (2015). The datepalm tree rhizosphere is a niche for plant growth promoting bacteria in the oasis ecosystem. *Biomed Res. Int.* **10**.

Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375–400.

Flors, V., Paradís, M., García-Andrade, J., Cerezo, M., González-Bosch, C., García-Agustín, P. (2007). A tolerant behavior in salt-sensitive tomato plants can be mimicked by chemical stimuli. *Plant Signal Behav.* **2**:50–57.

Flowers, T. (2006). Plants and salinity – preface. *J Ex Bot* **57**, iv

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

Forchetti G., Masciarelli O., Alemano S., Alvarez D., Abdala G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol.* **76**: 1145–1152

Frankenberger, W.T.J., Arshad, M. (1995). Photohormones in soil: microbial production and function. In : Dekker, New York Nieto KF, Frankenberger WT Jr (1990) Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the growth of *Raphanus sativus*. *Plant Soil.* **127**:147–156.

Ghassemi, F., Jakeman, A.J., Nix, H.A. (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.

Giri, B., Kapoor, R., Lata, A., Mukerji, K.G. (2003). Preinoculation with arbuscular mycorrhizae helps *Acacia auriculiformis* in a degraded Indian wasteland soil. *Commun Soil Sci Plant Anal.* **35**:193–204.

Glick B.R. (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* **21**: 383–393.

Glick, B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 1–15.

Glick, B.R., Liu, C., Ghosh, S., Dumbrof, E.B. (1997). Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil. Biol. Bioch.* **29**:1233–1239.

Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R. K., Gowda, C. L. L., Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.* **5**: 355–377

Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food Agric.* **2**: 1–19.

Goudaa, S., Kerryb, R.G., Dasc, G., Paramithiotisd, S., Shine H.S., Patra K. J. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* **206**: 131–140

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

Grover, M., Ali, S.Z., Sandhya, V., Rasul, A., Venkateswarlu, B., (2010). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27** : 1231–1240.

Gupta, B., Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J. Genomics.* 701-596.

Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V. (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microbiol. Biochem.* **7**: 96–102.

Halfter, U., Ishitani, M., Zhu, J.-K. (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3735–3740.

Hamed, A.I., Masullo, M., Sheded, M.G., Mahalel, U.A., Tawfik, M.M., Perrone, A., Piacente, S. (2011). Triterpene saponins from *Salsola imbricata*. *Phytochem. Lett.* **4**: 353–356.

Han, Q.Q., Wu, Y.N., Gao, H.J., Xu, R., Paré, P.W., Shi, H., Zhao, Q., Li, H.R., Khan, S.A., Wang, Y.Q., Wang, S.M., Zhang, J.L. (2017). Improved salt tolerance of medicinal plant *Codonopsis pilosula* by *Bacillus amyloliquefaciens* GB03. *Acta Physiol Plant.* **39**: 1–7.

Hanana, M., Hamrouni, L., Cagnac, O., Blumwald, E. (2011). Mécanismes et stratégies cellulaires de tolérance à la salinité (NaCl) chez les plantes. Presses sci. CNRC. Dossiers environ. **19** : 121–141.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **51**:463–99.

Hauser F, Horie T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K(+)/Na(+) ratio in leaves during salinity stress. *Plant Cell Environ.* **33**: 552–565

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Ann. Microbiol.* **60**: 579–598.

Henry, G., Thonart, P., Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16**:257–268.

Hidri, D.E.I, Guesmi, A., Najjari, A., Cherif, H., Ettoumi, B., Hamdi, C., Boudabous, A., Cherif, A. (2013). Cultivation-Dependant Assessment, Diversity, and Ecology of haloalkaliphilic bacteria in arid saline systems of southern Tunisia. *BioMed Res. Int.* **15**

Horie, T., Schroeder, J. I. (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant physiol.* **136**: 2457-62.

Hu, Y., Wang, L., Tang, Y., Li, Y., Chen, J., Xi, X., Zhang, Y., Fu, X., Wu, J., Sun, Y. (2014). Variability in soil microbial community and activity between coastal and riparian wetlands in the Yangtze River estuary - Potential impacts on carbon sequestration. *Soil Biol. Biochem.* **70**: 221–228.

Huang, X.S., Fan, Q.J., Liu, J.H. (2010). Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus *in vitro* plants *via* modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiol.* **30**: 914–923

Hussain, K., Hameed, S., Shahid, M., Ali, A., Iqbal, J. Hahn, D. (2015). First report of *Providencia vermicola* strains characterized for enhanced rapeseed growth attributing parameters. *Int. J. Agric. Biol.* **17**: 1110–1116.

Idris H.A., Bopape F. L., Sanger, L. K. (2016). Microbial inoculants as agents of growth promotion and abiotic stress tolerance in plants. *In: Singh D.P. et al. (ed.), Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity.* Springer India 23.

Ilangumaran, G., Smith, D.L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. *Front. Plant Sci.* **8**:1768.

Jahanian, A., Chaichi, M.R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., Khavazi, K. (2012). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynaras colymus*). *Int. J. Agric. Crop Sci.* **4**: 923–929.

Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z., Shabala, S. (2015). Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance. *Plant Growth Regul.* **76**: 25–40.

Jensen, H.L. (1942). Nitrogen fixation in leguminous plants II. Is symbiotic nitrogen fixation influenced by *Azotobacter*. *Pro. Line Soc. NSW.* **57**: 205–212.

Jesus, J. M., Danko, A. S., Fiúza, A., Borges, M.-T. (2015). Phytoremediation of salt-affected soils: a review of processes, applicability, and the impact of climate change. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 6511–6525.

Jha, B., Gontia, I., Hartmann, A., Jha, B., Gontia, I., Hartmann, A. (2012). The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant Soil.* **356**: 265–277.

Jiang, X., Leidi, E. O., Pardo, J.M. (2010). How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal.Behav.* **5**: 792–795.

Joshi, R., Mangu, V. R., Bedre, R., Sanchez, L., Pilcher, W., Zandkarimi, H., *et al.* (2015). Salt adaptation mechanisms of halophytes: improvement of salt tolerance in crop plants, p. 243–279. *In*: Pandey, G. K. (ed.), *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, New York, NY: Springer.

Kamal, R., Gusain, Y.S., Kumar, V. (2014). Interaction and symbiosis of fungi, Actinomycetes and plant growth promoting rhizobacteria with plants: strategies for the improvement of plants health and defense system. *Int. J. Curr. Microbial. Appl.Sci.* **3**: 564–585.

Kang, B.G., Kim, W.T., Yun, H.S., Chang, S.C. (2010). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnol. Rep.* **4**: 179–183.

Kang, S., Khan, A.L., Waqas, M., You, Y., Kim, H., Kim, J., Hamayun, M., Lee, I., Khan, A.L., Waqas, M. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *J. Plant interact.* **9**: 673–682.

Kataoka, R., Esra, G., Can, O., Emre, A. (2017). Sodium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria isolated from a halophyte, *Salsola grandis*, in saline-alkaline soils of Turkey. *Eurasian J. soil Sci.* **6**: 216–225.

Karnh, M., Horst, W. J., Amer, F., Mostafa, H. (1998). Pflanzenemiilung, Wurzeleistung und Exsudation, p. 238-245. *In*: Merbach, W., (ed.), *Borkheider Seminar zur Okophysiologie des Wurzelraumes*. Teubner, B. G., Stuttgart, Leipzig.

Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr. Microbiol* **57**: 503–507.

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

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

- Khan, A., Hossain, M.T., Park, H.C., Yun, D.J., Shim, S.H., Chung, Y.R. (2016). Development of root system architecture of *Arabidopsis thaliana* in response to colonization by *Martelella endophytica* YC6887 depends on auxin signaling. *Plant Soil*. **405**: 81–96
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* **7**:1–19
- Kim, B.S., Moon, S.S., Hwang, B.K. (1999). Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Can. J. Bot.* **77**:850–858.
- Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J. (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1219–1232.
- Knee E.M., Gong F.C., Gao M.S., Teplitski M., Jones A.R., Foxworthy A., Mort A.J., Baur W.D. (2001). Root mucilage from pea and its utilisation by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 315-322.
- Konate, I. (2006). Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Thèse de doctorat. Université Mohammed V-AGDAL, Rabat, p : 137
- Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I., *et al.* (2012). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32** : 289–326.
- Kumari, A., Das, P., Parida, A. K., Agarwal, P. K. (2015). Proteomics, metabolomics, and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes. *Front. Plant Sci.* **6**:537.
- Leidi, E.O., Barragan, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M.T., Cubero, B. *et al* (2010). The AtNHX1 exchange mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J.* **61**: 495–506.
- Lim, G. H., Zhang, X., Chung, M. S., Lee, D. J., Woo, Y. M., Cheong, H. S., *et al.* (2010). A putative novel transcription factor, AtSKIP, is involved in abscisic acid signalling and confers salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **185**: 103–113.
- Lim, H.S., Kim, Y.S, Kim, S.D. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 510–516
- Logan, B.A. (2005). Reactive oxygen species and photosynthesis, p. 250–267.. In : Smirnoff. N. (ed.), Antioxidants and reactive oxygen species in plants, Blackwell, Oxford.
- Logan, N.L. (2002). Applications and Systematic of *Bacillus* and Relatives, p. 123–140. In: Berkeley, R., Hendricks, M., Logan, N., De Vos P., (ed), Blackwell Science Ltd, Oxford.

López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I., Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact.* **20**: 207–217.

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

Luo, H. M., Watanabe, T., Shinano, T., Tadano, T. (1999). Comparison of aluminum tolerance and phosphate absorption between rape (*Brassica napus* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Soil Sci. Plant Nutri.* **45**:897-907.

Mahajan, S., Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**: 139–158.

Mahmood, S., Daur, I., Al-Solaimani, S.G., Ahmad, S., Madkour, M.H., Yasir, M., Hirt, H., Ali, S., Ali, Z. (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Silicon Synergistically Enhance Salinity Tolerance of *Mung Bean*. *Front. Plant Sci.* **7**:876.

Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P. (2000). *Environmental microbiology*. San Diego: Academic Press.

Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio, D., Borin, S. (2013). Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. *Biomed Res. Int.* **13**.

Marasco, R., Mapelli, F., Rolli, E., Mosqueira, M.J., Fusi, M., Bariselli, P., Reddy, M., Cherif, A., Tsiamis, G., Borin, S., Daffonchio, D. (2016). *Salicornia strobilacea* (synonym of *Halocnemum strobilaceum*) grown under different tidal regimes selects rhizosphere bacteria capable of promoting plant growth. *Front. Microbiol.* **7** : 1–11.

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A.F., El-Behairy, U.A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., and Daffonchio, D. (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS One* **7**.

Marulanda, A., Azcon, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J.M., Aroca, R. (2010). Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta* **232**: 533–543.

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

Meena, M.K., Gupta, S., Datta, S. (2016). Antifungal Potential of PGPR, their growth promoting activity on seed germination and seedling growth of winter wheat and genetic variability among bacterial isolates. *Int. J. Curr. Microbial. Appl. Sci.* **5** : 235–243.

- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ Exp Bot.* **49** :69–76.
- Mensah, J.K., Akomeah, P.A., Ikhajiagbe, B., Ekpekurede, E.O. (2006). Effects of salinity on germination, growth and yield of five groundnut genotypes. *Afr .J. Biotech.* **5**:1973–1979.
- Merino, C., Nannipier, P., Matus, F. (2015). Soil carbon controlled by plant, microorganism and mineralogy interactions. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **15**: 321–332
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2011). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* **33**: 453–67
- Miller, K.J., Wood, J.M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Microb.* **50**:101–136.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci .* **9**:490–8.
- Munns, R. 2009. Strategies for Crop improvement in Saline Soils. Chapter 11. *In: Ashraf M., Ozturk, M., Athar H.R. (ed.), Salinity and water stress, improving crop efficiency, Springer Science. Business Media B.V.*
- Murthy, N., Bleakley, B. (2012). Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase- producing microorganisms. *Int. J. Microbiol.* **10**.
- Nassar I., Horton, R. (1999). Salinity and Compaction Effects on Soil Water Evaporation and Water and Solute Distributions. *Soil Sci. Soc . Amer. J.* **63**
- Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 265–270.
- Nielsen, T.H., Sorensen, J. (2003). Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol* **69**:861–868.
- Nunkaew, T., Kantachote, D., Nitoda, T., Kanzaki, H., Ritchie, R.J. (2014). Characterization of exo-polymeric substances from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains and their ability to adsorb sodium ions. *Carbohydr Polym.* **115**: 334-341.
- Okon, Y., Labanderagonzalez, C.A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum* – an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1591–1601.
- Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y., Yan, X. (2010). Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *J. Proteome Res.* **9** : 2584–2599.
- Panwar, M., Tewari, R., Nayyar, H. (2016). Native halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria *Enterococcus* and *Pantoea* sp. improve seed yield of *Mung bean* (*Vigna radiata*

L.) under soil salinity by reducing sodium uptake and stress injury. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **22**:445–459.

Parida, A.K, Das, AB. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox. Environ. Safe.* **60** :324–49.

Parray, J. A., Jan, S., Kamili, A.N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., Ahmad, P. (2016). Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Plant Growth Regul.* **35**: 877–902.

Patten, C.L., Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **42**: 207–220.

Paul, D., Nair, S. (2008). Stress adaptations in a plant growth promoting *rhizobacterium* (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *J. Basic Microbiol* **48**: 378

Paul, D., Lade, H. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: A review. *Agron. Sustain. Dev.* **34**: 737–752.

Peeters, K., Hodgson, D.A., Convey, P., Willems, A. (2011). Culturable diversity of heterotrophic bacteria in Forlidas Pond (*Pensacola Mountains*) and Lundström Lake (*Shackleton Range*), Antarctica. *Microb. Ecol.* **62**:399- 413

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

Pérez-Montaña F., Alías-Villegas C., Bellogín R. A., del Cerro P., Espuny M. R., Jiménez- Guerrero I., *et al.* (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* **169** 325–336.

Pfündel, E., Klughammer, C., Schreiber,U. (2008). Monitoring the effects of reduced PSII antenna size on quantum yields of photosystems I and II using the Dual-PAM-100 measuring system. *PAM Appl.Notes* **1**: 21–24.

Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R., Guckert, A. (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 948–955

Pilon-Smits E. (2005). Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**: 15–39.

Pinedo, I., Ledger, T., Greve, M., Poupin, M.J. (2015). *Burkholderia phytofirmans* PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in *Arabidopsis thaliana* salt tolerance. *Front. Plant Sci.* **6**: 466.

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

- Porcel, R., Aroca, R., Ruiz-Lozano, J.M. (2012). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Agron Sustain Dev.* **32** :181–200.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (1999). Microbiologie (3ème Eds). DeBoeck Université (ed.) Bruxelles Belgique. P 1014.
- Pujic, P., Normand, P. (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur.* **298**: 26-29.
- Quan, R., Wang, J., Yang, D., Zhang, H., Zhang, Z., Huang, R. (2017). EIN3 and SOS2 synergistically modulate plant salt tolerance. *Sci Rep* **7**: 1–11.
- Rangarajan, S., Saleena, L.M., Nair, S. (2002). Diversity of *Pseudomonas* spp. isolated From rice rhizosphere populations grown along a salinity gradient. *Microb. Ecol.* **43**: 280–289.
- Rathore, P. (2015). A review on approaches to develop plant growth promoting rhizobacteria. *Int. J. Recent Sci. Res.* **5** : 403–407.
- Raza, W., Yousaf, S., Rajer, F.U. (2016). Plant growth promoting activity of volatile organic compounds produced by Bio-control strains. *Sci. Lett.* **4** : 40–43.
- Razmjoo, K., Heydarizadeh, P., Sabzalian, M.R. (2008). Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomila*. *Int. J. Agri. Biol.* **10**: 451–454.
- Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R. (2011). Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annu. Rev. Ecol. Environ. Syst.* **42** : 489–512.
- Ren, S., Lyle, C., Jiang, G., Penumala, A. (2016). Soybean Salt Tolerance 1 (GmST1) Reduces ROS Production, Enhances ABA Sensitivity, and Abiotic Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **7**: 445 .
- Romic, D., Ondrasek, G., Romic, M., Josip, B., Vranjes, M., Petosic, D. (2008). Salinity and irrigation method affect crop yield and soil quality in watermelon (*Citrullus Lanatus* L.) growing. *Irrig. Drain.* **57** :463– 9.
- Rueda-Puente, E., Castellanos-Cervantes, T., Diaz de Leon-Alvarez, J., Preciado-Rangel, P., Almaguer-Vargas, G. (2010). Bacterial community of rhizosphere associated to the annual halophyte *Salicornia bigelovii* (Torr.). *Terra Latino Americana* .**28**:345–353.
- Sáenz-Mata, J., Palacio-Rodríguez, R., Sánchez-Galván,H., Balagurusamy, N. (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria Associated to Halophytes. In: Khan, M.A. et al. (ed.), Potential Applications in Agriculture *Sabkha Ecosystems Volume V: The Americas*, Tasks for Vegetation Science.
- Saharan, B.S., Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res LSMR.* **21**:1–29

- Saidi, Y., Finka, A., Goloubinoff, P. (2011). Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *N Phytol.* **190** :556–65.
- Sanchez, D. H., Siahpoosh, M. R., Roessner, U., Udvardi, M., Kopka, J. (2008). Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. *Physiol. Plant.* **132**: 209–219.
- Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E. Ventosa, A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 295–300.
- Sandhya, V., Ali, S.K.Z., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B. (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., Ali, S.Z., Venkateswarlu, B., Reddy, G.G.M. (2010). Effect of osmotic stress on plant growth promoting *pseudomonas spp.* *Arch Microbiol.* **192**:867–876
- Santoro, M.V., Bogino, P.C., Nocelli, N., Cappellari, L.R., Giordano, W.F., Banchio, E. (2016). Analysis of plant growth promoting effects of Fluorescent pseudomonas strains isolated from *Mentha piperita* Rhizosphere and effects of their volatile organic compounds on essential oil composition. *Front. Microbiol.* **7**: 1–17.
- Schmidt, W. (1999). Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytol.* **141**:1–26.
- Schwyn, B., Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47–56.
- Senthilkumar, M., Madhaiyan, M., Sundaram, S.P., Kannaiyan, S. (2009).** Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. CvCO-43). *Microbiol. Res.* **164**: 92–104.
- Seo, P.J., Lee, A.K., Xiang, F., Park, C.M. (2008). Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: Insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiol.* **49**: 334–344.
- Sgroy, V., Cassan, F., Masciarelli, O., Del, Papa MF. Lagares, A., Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *prosopis strombulifera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 371-381.
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann. Bot.* **112**: 1209–1221.
- Shanno, M.C, Grieve, C.M. (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci Hortic.* **78**: 5–38.
- Shi, J., Fu, X.Z., Peng, T., Huang, X.S., Fan, Q.J., Liu, J.H. (2010). Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiol.* **30**:914–923

Shi, Y.W., Lou, K., Li, C., Wang, L., Zhao, Z.Y., Zhao, S., Tian, C.Y. (2015). Illumina-based analysis of bacterial diversity related to halophytes *Salicornia europaea* and *Suaeda aralocaspica*. *J. Microbiol.* **53**: 678–685.

Shrivastava, P., Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* **22** : 123–131.

Siddikee, M.A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Gwang-Hyun, H., Sa, T. (2010). Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**:1577-84.

Silini, A., Cherif-Silini, H. Yahiaoui, B. (2016). Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *African J. Microbiol. Res.* **10** : 387-399.

Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Savouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann. Bot.* **115**: 433–447.

Song, J., Wang, B. (2014). Using euhalophytes to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. *Ann. Bot.* **115**: 541–553.

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

Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E., Mapelli, F., Ouzari, H.I., Daffonchio, D., Cherif, A. (2016). Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant Soil.* **405**: 357–370.

Szymańska, S., Plociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z. Zloch, M., Ruppel, S. Hryniewicz, K. (2016). Metabolic potential and community structure of endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Aster tripolium* L. *Microbiol. Rese.* **182**: 68-79.

Szymańska, S., Piernik, A., Baum, C., Złoch, M., Hryniewicz, K. (2014). Metabolic Profiles of Microorganisms Associated with the Halophyte *Salicornia europaea* in Soils with Different Levels of Salinity. *Ecoscience.* **21** : 114–122.

Su, F., Jacquard, C., Villaume, S., Michel, J., Rabenoelina, F., Clement, C., Barka, E.A., Dhondt-Cordelier, S., Vaillant-Gaveau, N. (2015). *Burkholderia phytofirmans* PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* **6**:1–13.

Taniguchi, T., Imada, S., Acharya, K., Iwanaga, F., Yamanaka, N. (2015). Effect of soil salinity and nutrient levels on the community structure of the root-associated bacteria of the facultative halophyte, *Tamarix ramosissima*, in southwestern United States. *J. Gen. App. Microbiol.* **61**: 193–202.

Terré S., Asch F., Padham J., Sikora R.A., Becker M. (2007). Influence of root zone bacteria on root iron plaque formation in rice subjected to iron toxicity, p. 446. *In* : Tielkes, E. (ed.), *Utilisation of Diversity in Land Use Systems: Sustainable and Organic Approaches to Meet Human Needs*, Tropentag, Witzenhausen, Germany

Tester, M., Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* **91** :503–27.

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

Tiwari, S., Singh, P., Tiwari, R., Meena, K.K., Yandigeri, M., Singh, D.P., Arora D.K. (2011). Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. *Biol. Fertil. Soils.* **47**: 907–916.

Torres, M.A., Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues AtRbohD and AtRbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defence response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 517–22.

Tripathi, A.K., Verma, S.C., Ron, E.Z. (2002) . Molecular characterization of a salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. *Res. Microbiol.* **153**: 579–584.

Tuna, A., Kaya, L.C., Higgs, D., Murillo-Amador, B., Aydemir, S., Girgin, A. R. (2008). Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. *Environ. Exp. Bot.* **62**: 10–16.

Ulloa-Ogaz, A.L., Munoz-Castellanos, L.N., Nevarez-Moorillon, G.V. (2015). Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control, the battle against microbial pathogens, p. 305–309. *In*: Mendez V.A. (ed.), *Basic Science. Technological advance and educational programs*

Upadhyay, S.K., Singh, D.P., Saikia, R. (2009). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr. Microbiol.* **59**: 489–496.

Upadhyay, S.K., Singh, J.S., Singh, D.P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere.* **21**:214–222.

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

Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A. H., Yildiztugay, E., Turkan, I. (2014). Changes in the alternative electron sinks and antioxidant defence in chloroplasts of the extreme halophyte *Eutrema parvulum* (*Thellungiella parvula*) under salinity. *Ann. Bot.* **115**: 449–463.

Vaishnav, A., Varma, A., Tuteja, N., Choudhary, D.K. (2016). PGPR-mediated amelioration of crops under salt stress, p. 205-226. *In* : Choudhary, D.K (ed.), *Plant-microbe interaction: An Approach to sustainable agriculture*. Noida, Uttar Pradesh, India..

- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.F., Curie, C., Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microb Interact.* **20**: 441–447.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**: 571–586.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** : 504-544.
- Viveros, O.M., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., Mora, M.L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**: 293–319.
- Walker, T. S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* **132**: 44-5.
- Walters, D.R., Ratsep, J., Havis, N.D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* **64**:1263–1280.
- Wang, X., Chang, L., Wang, B., Wang, D., Li, P., Wang, L., *et al.* (2013). Comparative proteomics of *Thellungiella halophila* leaves from plants subjected to salinity reveals the importance of chloroplastic starch and soluble sugars in halophyte salt tolerance. *Mol. Cell. Proteomics.* **12**: 2174–2195.
- Wang, Q., Dodd, I.C., Belimov, A.A., Jiang, F. (2016). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na⁺ accumulation. *Funct. Plant Biol.* **43**:161–172.
- Wang, J., Meng, Y., Li, B., Ma, X., Lai, Y., Si, E., Yang, K., Xu, X., Shang, X., Wang, H., Wang, D. (2015). Physiological and proteomic analyses of salt stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus*. *Plant, Cell Environ.* **38**: 655–669.
- Wang, Y., Mopper, S., Hasenstein, K. H. (2001). Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *J. Chem. Ecol.* **27**: 327–342.
- Weber, A, Jung, K.(2002). Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA microarrays. **184** :5502-7.
- Weyens, N., S. Monchy, J. Vangronsveld, S. Taghavi, et D. Vander Lelie. (2010). Plant-microbe Partnerships, p. 254-2564 . *In*: Timmis K.N. (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Wheatley, R., Ritz, K., Griffiths, B. (1990). Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. *Plant Soil.* **127**:157-167.
- Whippes, J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* **52**: 487-511.
- White, P.J., Broadley, M.R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Ann Bot.* **88** : 967–88.

- Wilson, D.B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 259–263.
- Xiao, M., Sun, S.S., Zhang, Z.Z., Wang, J.M., Qiu, L.-W., Sun, H.-Y., Song, Z.-Z., Zhang, B.-Y., Gao, D.-L., Zhang, G.-Q., Wu, W.M. (2016). Analysis of bacterial diversity in two oil blocks from two low-permeability reservoirs with high salinities. *Sci. Rep.* **6**: 19600.
- Xie, J., Shi, H., Du, Z., Wang, T., Liu, X., Chen, S. (2016). Comparative genomic and functional analysis reveals conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Sci. Rep.* **6**: 21329.
- Yang, J. Kloepper, J.W., Ryu, C.M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* **4**: 1-4.
- Yildirim, E., Taylor, A.G. (2005). Effect of biological treatments on growth of bean plants under salt stress. *Ann. Rep. Bean. Improv. Coop.* **48**: 176–177.
- Younesi, O., Chaichi, M.R., Postini, K. (2013). Salt tolerance in Alfalfa following inoculation with *Pseudomonas*. *Middle-East J. Sci. Res.* **16**:101–107.
- Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Diaz, C., *et al.* (2011). Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *J. Proteome Res.* **10**: 3852–3870.
- Zahran, H.H. (1991). Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil Soils.* **12**: 73–80.
- Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., Shi, H., Paré, P. W. (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**: 737–744.
- Zhang, J.L., Shi, H. (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosyn. Res.* **115**: 1–22.
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., Zhang, R. (2014). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant Soil.* **374**: 689–700.
- Zhang, Y., Cui, B., Xie, T., Wang, Q., Yan, J. (2016). Gradient distribution patterns of rhizosphere bacteria associated with the coastal reclamation. *Wetlands.* **36**: 69–80.
- Zhu, M., Chen, G., Zhang, J., Zhang, Y., Xie, Q., Zhao, Z. *et al.* (2014). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor SINAC4 regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Rep.* **33**: 1851-1863.

Annexes

Annexe 1 : Normes internationales de la salinité selon la FAO (1984)

Sol non salin	Légèrement salin	Modérément salin	Sol salin	Sol très salin
< 2 ds/m	2-4 ds/m	4-8 ds/m	8-10 ds/m	>10ds/m

Annexe 2: Tampon phosphate salin

K ₂ HPO ₄	5,62 g
KH ₂ PO ₄	2,13g
Eau distillée	1000 ml
pH final	7

Annexe 3 : Milieu de King B (Flucka)

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

Annexe 5 : Bouillon Luria Bertani (LB)

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Chlorure de sodium	0,5g
Eau distillée	1000ml
pH final à 25°C :	7

Annexe 6 : Milieu Pikovskaya (PVK), Nautiyal, (1999)

D –Glucose :	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	0.5g
NaCl:	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0.1g
KCl :	0.2g
Extrait de levure :	0,5g
MnSO ₄ 5H ₂ O:	0.002g
FeSO ₄ .7H ₂ O :	0.002g
Ca ₃ (PO ₄) ₂ :	5g
Eau distillée :	1000ml

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 : Milieu d'eau peptonée

Peptones	10g
NaCl	5g
Na ₂ HPO ₄	3.5g
K ₂ HPO ₄	1.5g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

Annexe 9: Jensen's medium (1942)

Sucrose	2%
K ₂ HPO ₄	0.1%
MgSO ₄ H ₂ O	0.05%
NaCl	0.05%,
FeSO ₄ ,	0.01%
Na ₂ MoO ₄	0.0005%
CaCO ₃	0.2%
Agar	1.5%

Annexe 10: Milieu de carboxymethylcellulose (Kasana et al., 2008)

NaNO ₃	0.2%
K ₂ HPO ₄	0.1%
MgSO ₄	0.05%
KCl	0.05%
Carboxymethylcellulose (CMC)	0.2%
Peptone	0.02%
Agar	1.7%

Annexe 11: Murthy et Bleakley (2012)

K ₂ HPO ₄	0.7 g
KH ₂ PO ₄	0.3g
MgSO ₄ .5H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01g
ZnSO ₄	0.001g
MnCl ₂	0.001g
Chitine	0.2%
Eau distillée	q.s.p
Agar	13g

Annexe 12 : Gélose au lait

Peptone de caséine	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1,g
Lait écrémé	10%
Eau distillée	1000ml
Agar	12,5g

Annexe 13 : Milieu de PDA (potato dextrose agar)

Extrait de pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	5,2

Annexe 14 : milieu MS au ½ (Murashige et Skoog)

Milieu MS+ vitamine	4.4g
Sucrose	5g
MES hydraté	500mg
Agar	8g
Eau distillée	1000ml
pH	5.8

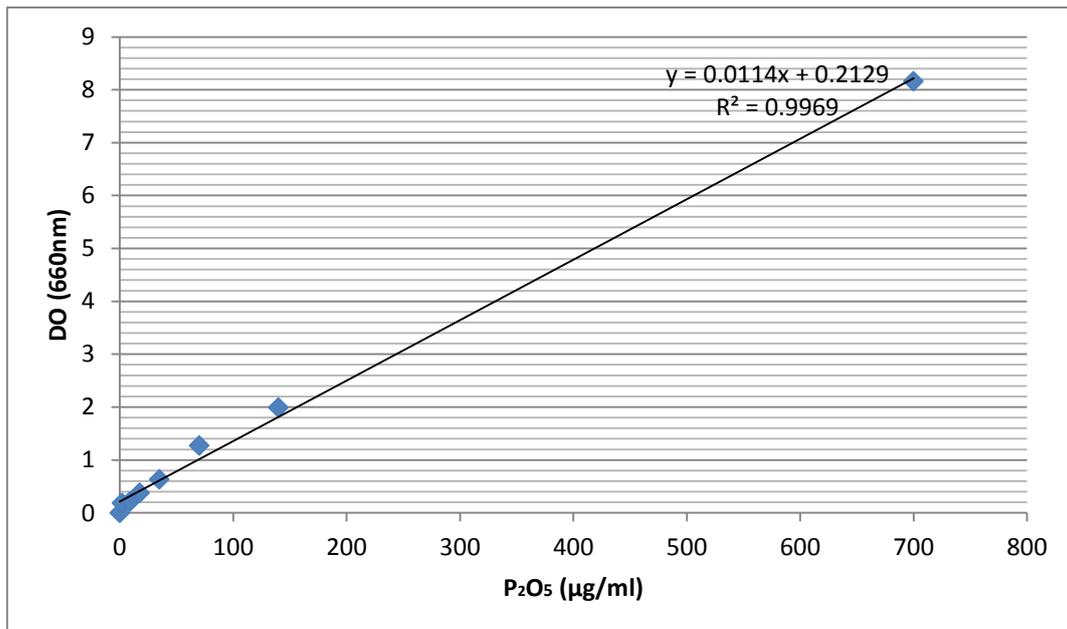
Annexe 15 : Réactif d'extraction du phosphate soluble. Méthode colorimétrique de Fiske et Subbarow (1925)

- Solution A : 500µl de molybdate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_6 \text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (1.5%) sont ajouté à 5.5ml acide sulfurique (H_2SO_4) préparé dans 100ml d'eau distillé
- Solution B : 125µl de sulfate de fer (FeSO_4) (2.7%).

Solution A et B sont mélangé puis un volume de 750µl est ajouté à 750µl de surnageant.

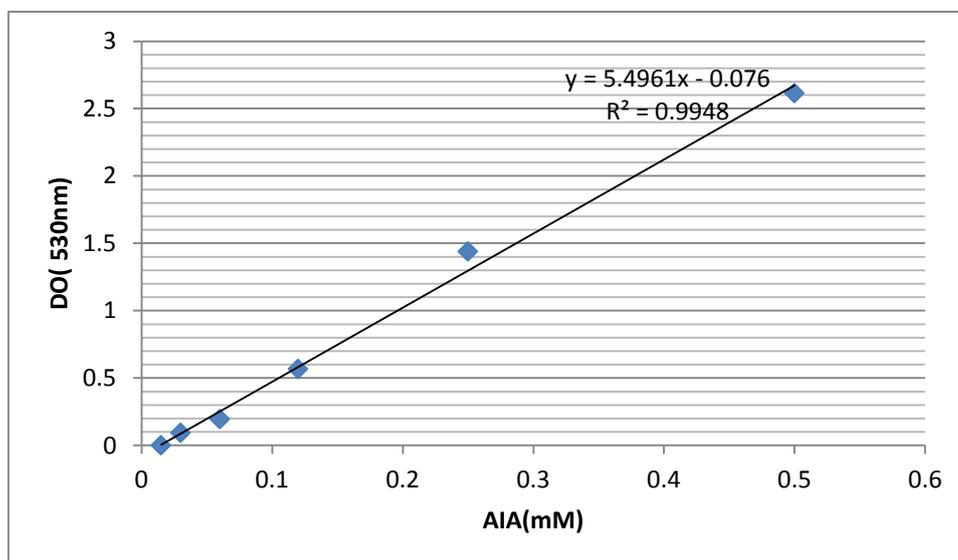
Annexe 16 : La courbe d'étalonnage de P_2O_5

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- 3.75- 7.5- 15-30- 60-300) de la solution standard du phosphore sont préparées dans des tubes de 10ml. Un volume de 3ml de cette dernière solution est ajouté à 3ml de réactif d'extraction de phosphate. Après 5min, la concentration de P_2O_5 est mesurée par spectrophotométrie à 660nm.

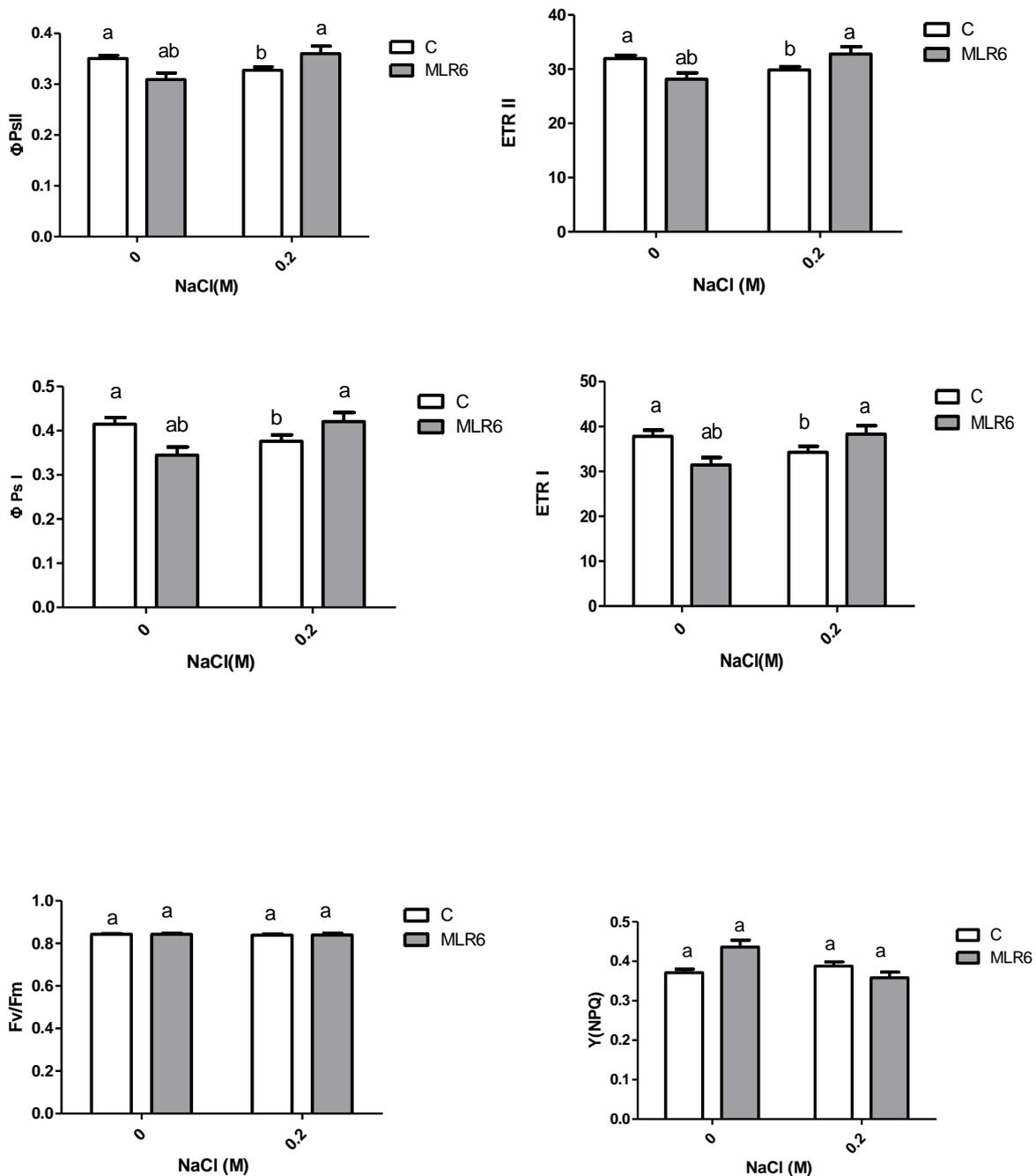


Annexe 17 : La courbe d'étalonnage de l'AIA

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.

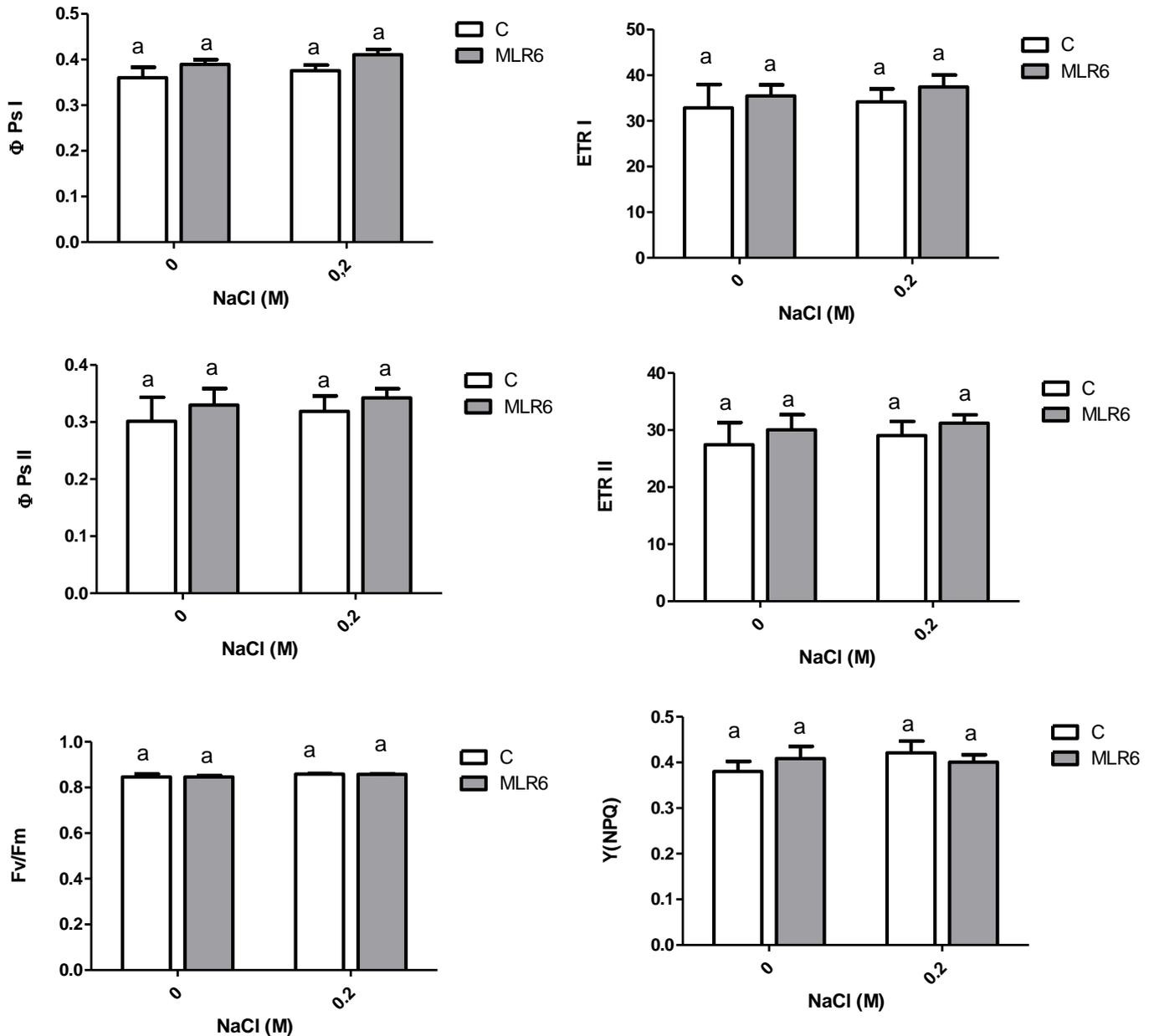


Annexe 18



Effet de MLR6 et du stress salin (0.2M NaCl) sur PSI, ETR I, ΦPSII, ETR II, Fv / Fm et Y (NPQ) chez *A. thaliana* 24h après le 2^{ème} stress. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements (P < 0,05) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

Annexe 19



Effet de MLR6 et du stress salin (0,2M NaCl) sur PSI, ETR I, ΦPSII, ETR II, Fv / Fm et Y (NPQ) chez *A. thaliana* 24h après le 3^{ème} stress. Les valeurs présentées sont les moyennes ± SE de trois répétitions indépendantes. Pour chaque répétition 6 plantes ont été prises par condition. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les traitements (P < 0,05) déterminées par ANOVA avec une comparaison de moyennes à l'aide de HSD de Tukey.

Annexe 20

ANOVA et HSD test de Tukey

A/ *Arabidopsis thaliana*

FIGURE 39

- Hauteur de la plante

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	2373	790.9	452	<2e-16 ***
Residuals	20	35	1.8		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-19.666667	-21.804389	-17.528944	0.0e+00
MLR6-C	5.166667	3.028944	7.304389	7.9e-06
MLR6+NaCl-C	-13.166667	-15.304389	-11.028944	0.0e+00
MLR6-C+NaCl	24.833333	22.695611	26.971056	0.0e+00
MLR6+NaCl-C+NaCl	6.500000	4.362277	8.637723	3.0e-07
MLR6+NaCl-MLR6	-18.333333	-20.471056	-16.195611	0.0e+00

- Poids frais des feuilles

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	235.61	78.54	50.02	1.77e-09 ***
Residuals	20	31.41	1.57		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-5.848333	-7.8733179	-3.8233488	0.0000006
MLR6-C	2.486667	0.4616821	4.5116512	0.0127966
MLR6+NaCl-C	-3.000000	-5.0249846	-0.9750154	0.0025900
MLR6-C+NaCl	8.335000	6.3100154	10.3599846	0.0000000
MLR6+NaCl-C+NaCl	2.848333	0.8233488	4.8733179	0.0041715
MLR6+NaCl-MLR6	-5.486667	-7.5116512	-3.4616821	0.0000015

- **Poids sec des feuilles**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	1.3093	0.4364	37.83	1.96e-08 ***
Residuals	20	0.2307	0.0115		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.3733333	-0.546908752	-0.19975791	0.0000384
MLR6-C	0.2566667	0.083091248	0.43024209	0.0026364
MLR6+NaCl-C	-0.1916667	-0.365242085	-0.01809125	0.0271708
MLR6-C+NaCl	0.6300000	0.456424582	0.80357542	0.0000000
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.1816667	0.008091248	0.35524209	0.0381880
MLR6+NaCl-MLR6	-0.4483333	-0.621908752	-0.27475791	0.0000030

FIGURE 42

- **Chlorophylle a**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	41.31	13.768	1587	1.95e-11 ***
Residuals	8	0.07	0.009		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-4.1766667	-4.4201999	-3.9331335	0.000000
MLR6-C	0.5366667	0.2931335	0.7801999	0.000486
MLR6+NaCl-C	-1.9900000	-2.2335332	-1.7464668	0.000000
MLR6-C+NaCl	4.7133333	4.4698001	4.9568665	0.000000
MLR6+NaCl-C+NaCl	2.1866667	1.9431335	2.4301999	0.000000
MLR6+NaCl-MLR6	-2.5266667	-2.7701999	-2.2831335	0.000000

- **Chlorophylle b**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	33.21	11.07	66427	<2e-16 ***
Residuals	8	0.00	0.00		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-3.220000	-3.253756	-3.186244	0
MLR6-C	1.273333	1.239578	1.307089	0
MLR6+NaCl-C	-1.326667	-1.360422	-1.292911	0
MLR6-C+NaCl	4.493333	4.459578	4.527089	0
MLR6+NaCl-C+NaCl	1.893333	1.859578	1.927089	0
MLR6+NaCl-MLR6	-2.600000	-2.633756	-2.566244	0

- **Chlorophylle totale**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	8.2454	2.74846	4122.7	4.296e-13 ***
Residuals	8	0.0053	0.00067		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
MLR6+NaCl-MLR6	-1.6533333	-1.7208448	-1.58582183	0.0000000
C-MLR6	-1.9166667	-1.9841782	-1.84915516	0.0000000
C+NaCl-MLR6	-2.0766667	-2.1441782	-2.00915516	0.0000000
C-MLR6+NaCl	-0.2633333	-0.3308448	-0.19582183	0.0000074
C+NaCl-MLR6+NaCl	-0.4233333	-0.4908448	-0.35582183	0.0000002
C+NaCl-C	-0.1600000	-0.2275115	-0.09248849	0.0002924

- Carotenoides

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	2.5932	0.8644	10.67	0.0036 **
Residuals	8	0.6481	0.0810		

P < 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.9100000	-1.65419764	-0.1658024	0.0186508
MLR6-C	-0.1100000	-0.85419764	0.6341976	0.9628897
MLR6+NaCl-C	-1.0433333	-1.78753097	-0.2991357	0.0087587
MLR6-C+NaCl	0.8000000	0.05580236	1.5441976	0.0357201
MLR6+NaCl-C+NaCl	-0.1333333	-0.87753097	0.6108643	0.9371977
MLR6+NaCl-MLR6	-0.9333333	-1.67753097	-0.1891357	0.0162955

FIGURE 43

- Taux de la photosynthèse

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	139.10	46.37	56.12	<2e-16 ***
Residuals	74	61.14	0.83		

P < 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-3.4058026	-4.2781713	-2.533433987	0.0000000
MLR6-C	-0.7716452	-1.5410020	-0.002288369	0.0490422
MLR6+NaCl-C	-2.8717238	-3.6793803	-2.064067425	0.0000000
MLR6-C+NaCl	2.6341574	1.8648006	3.403514251	0.0000000
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.5340788	-0.2735776	1.341735195	0.3116424
MLR6+NaCl-MLR6	-2.1000787	-2.7951986	-1.404958688	0.0000000

- **Conductance stomatique**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.06399	0.021330	19.23	2.56e-09 ***
Residuals	74	0.08210	0.001109		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.06586977	-0.09783716	-0.033902390	0.0000043
MLR6-C	0.01340146	-0.01479112	0.041594042	0.5977333
MLR6+NaCl-C	-0.01880899	-0.04840504	0.010787052	0.3465434
MLR6-C+NaCl	0.07927123	0.05107865	0.107463815	0.0000000
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.04706078	0.01746473	0.076656825	0.0004521
MLR6+NaCl-MLR6	-0.03221045	-0.05768267	-0.006738233	0.0074042

- **Transpiration**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	5.561	1.8536	20.63	8.17e-10 ***
Residuals	74	6.650	0.0899		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.6134267	-0.9011388	-0.32571449	0.0000020
MLR6-C	0.1302779	-0.1234604	0.38401620	0.5347893
MLR6+NaCl-C	-0.1399533	-0.4063230	0.12641640	0.5151660
MLR6-C+NaCl	0.7437046	0.4899663	0.99744285	0.0000000
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.4734734	0.2071037	0.73984305	0.0000760
MLR6+NaCl-MLR6	-0.2702312	-0.4994858	-0.04097669	0.0143179

- **Concentration interne de CO2**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	13441	4480	5.585	0.00165 **
Residuals	74	59360	802		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-3.337146	-30.5197371	23.84545	0.9882934
MLR6-C	21.077168	-2.8956237	45.04996	0.1047851
MLR6+NaCl-C	28.887174	3.7209845	54.05336	0.0179914
MLR6-C+NaCl	24.414314	0.4415223	48.38711	0.0443196
MLR6+NaCl-C+NaCl	32.224320	7.0581306	57.39051	0.0065255
MLR6+NaCl-MLR6	7.810005	-13.8496015	29.46961	0.7792067

FIGURE 44

- **PSI**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.02273	0.007576	4.274	0.0174 *
Residuals	20	0.03545	0.001773		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.03900000	-0.10703808	0.02903808	0.3987143
MLR6-C	-0.07016667	-0.13820474	-0.00212859	0.0417531
MLR6+NaCl-C	0.00550000	-0.06253808	0.07353808	0.9957799
MLR6-C+NaCl	-0.03116667	-0.09920474	0.03687141	0.5842809
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.04450000	-0.02353808	0.11253808	0.2888357
MLR6+NaCl-MLR6	0.07566667	0.00762859	0.14370474	0.0259178

- **PSII**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.009429	0.0031429	4.434	0.0152 *
Residuals	20	0.014176	0.0007088		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes.

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.022833333	-0.06585519	0.020188520	0.4642109
MLR6-C	-0.041166667	-0.08418852	0.001855186	0.0638119
MLR6+NaCl-C	0.009666667	-0.03335519	0.052688520	0.9215286
MLR6-C+NaCl	-0.018333333	-0.06135519	0.024688520	0.6382718
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.032500000	-0.01052185	0.075521853	0.1826251
MLR6+NaCl-MLR6	0.050833333	0.00781148	0.093855186	0.0170234

- **ETRI**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	188.6	62.86	4.251	0.0178 *
Residuals	20	295.7	14.79		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-3.5666667	-9.7805606	2.6472272	0.3975649
MLR6-C	-6.4000000	-12.6138939	-0.1861061	0.0420778
MLR6+NaCl-C	0.4833333	-5.7305606	6.6972272	0.9962343
MLR6-C+NaCl	-2.8333333	-9.0472272	3.3805606	0.5878460
MLR6+NaCl-C+NaCl	4.0500000	-2.1638939	10.2638939	0.2916363
MLR6+NaCl-MLR6	6.8833333	0.6694394	13.0972272	0.0266076

- **ETRII**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	78.42	26.14	4.476	0.0147 *
Residuals	20	116.80	5.84		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-2.0833333	-5.9885208	1.8218541	0.4598524
MLR6-C	-3.7666667	-7.6718541	0.1385208	0.0611340
MLR6+NaCl-C	0.8666667	-3.0385208	4.7718541	0.9240904
MLR6-C+NaCl	-1.6833333	-5.5885208	2.2218541	0.6299853
MLR6+NaCl-C+NaCl	2.9500000	-0.9551875	6.8551875	0.1826466
MLR6+NaCl-MLR6	4.6333333	0.7281459	8.5385208	0.0165222

- **Y(NPQ)**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.03861	0.012870	2.38	0.1 .
Residuals	20	0.10813	0.005407		

- p>0.05: Il n'y'a pas de difference significative entre les groupes

- **FV/Fm**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.0005241	0.0001747	1.332	0.292
Residuals	20	0.0026228	0.0001311		

p>0.05: Il n'y'a pas de difference significative entre les groupes

FIGURE 45

- **PSI**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.04922	0.016407	3.554	0.0328 *
Residuals	20	0.09232	0.004616		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.12150000	-0.23129201	-0.01170799	0.0267823
MLR6-C	-0.03150000	-0.14129201	0.07829201	0.8522012
MLR6+NaCl-C	-0.06933333	-0.17912535	0.04045868	0.3173179
MLR6-C+NaCl	0.09000000	-0.01979201	0.19979201	0.1329324
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.05216667	-0.05762535	0.16195868	0.5555248

- **ETRI**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	405.7	135.24	3.535	0.0334 *
Residuals	20	765.3	38.26		

P < 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-11.033333	-21.029178	-1.037488	0.0272414
MLR6-C	-2.850000	-12.845845	7.145845	0.8544868
MLR6+NaCl-C	-6.266667	-16.262512	3.729178	0.3233020
MLR6-C+NaCl	8.183333	-1.812512	18.179178	0.1336492
MLR6+NaCl-C+NaCl	4.766667	-5.229178	14.762512	0.5526311
MLR6+NaCl-MLR6	-3.416667	-13.412512	6.579178	0.7749655

- **PSII**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.1035	0.03451	7.619	0.00138 **
Residuals	20	0.0906	0.00453		

P < 0.05: il existe une difference significative entre les groups

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.159166667	-0.26793074	-0.05040259	0.0029064
MLR6-C	-0.001166667	-0.10993074	0.10759741	0.9999899
MLR6+NaCl-C	-0.079000000	-0.18776407	0.02976407	0.2094693
MLR6-C+NaCl	0.158000000	0.04923593	0.26676407	0.0031119
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.080166667	-0.02859741	0.18893074	0.1992384
MLR6+NaCl-MLR6	-0.077833333	-0.18659741	0.03093074	0.2200937

- **ETRII**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	856.8	285.61	7.593	0.0014 **
Residuals	20	752.4	37.62		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-14.46666667	-24.377892	-4.555442	0.0029774
MLR6-C	-0.08333333	-9.994558	9.827892	0.9999951
MLR6+NaCl-C	-7.18333333	-17.094558	2.727892	0.2110048
MLR6-C+NaCl	14.38333333	4.472108	24.294558	0.0031411
MLR6+NaCl-C+NaCl	7.28333333	-2.627892	17.194558	0.2013165
MLR6+NaCl-MLR6	-7.10000000	-17.011225	2.811225	0.2193447

- **Y (NPQ)**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.03861	0.012870	2.38	0.1 .
Residuals	20	0.10813	0.005407		

p>0.05: Il n'y a pas de difference significative entre les groupes

- **FV/Fm**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.0005241	0.0001747	1.332	0.292
Residuals	20	0.0026228	0.0001311		

p>0.05: Il n'y a pas de difference significative entre les groupes

FIGURE 49- **EL%**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	1648.4	549.5	49.35	1.66e-05 ***
Residuals	8	89.1	11.1		

P < 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	18.42667	9.701885	27.151448	0.0006510
MLR6-C	-10.75000	-19.474782	-2.025218	0.0179144
MLR6+NaCl-C	-9.77000	-18.494782	-1.045218	0.0292705
MLR6-C+NaCl	-29.17667	-37.901448	-20.451885	0.0000237
MLR6+NaCl-C+NaCl	-28.19667	-36.921448	-19.471885	0.0000306
MLR6+NaCl-MLR6	0.98000	-7.744782	9.704782	0.9829320

FIGURE 55- **HKT1**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.3065	0.1022	5.905	0.02 *
Residuals	8	0.1384	0.0173		

P < 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-0.348145	-0.692091277	-0.004198723	0.0473257
MLR6-C	-0.011140	-0.355086277	0.332806277	0.9995654
MLR6+NaCl-C	0.058685	-0.285261277	0.402631277	0.9449523
MLR6-C+NaCl	0.337005	-0.006941277	0.680951277	0.0547642
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.406830	0.062883723	0.750776277	0.0221870
MLR6+NaCl-MLR6	0.069825	-0.274121277	0.413771277	0.9126027

- **NHX1**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.4396	0.14652	3.184	0.0845 .
Residuals	8	0.3681	0.04601		

- **SOS1**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	0.09225	0.030750	6.538	0.0152 *
Residuals	8	0.03763	0.004704		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	0.068970	-0.11035498	0.2482949769	0.6258923
MLR6-C	-0.109980	-0.28930498	0.0693449769	0.2765775
MLR6+NaCl-C	0.125175	-0.05414998	0.3044999769	0.1933442
MLR6-C+NaCl	-0.178950	-0.35827498	0.0003749769	0.0504734
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.056205	-0.12311998	0.2355299769	0.7518711
MLR6+NaCl-MLR6	0.235155	0.05583002	0.4144799769	0.0127758

- **SOS2**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	1.3952	0.4651	30.71	9.71e-05 ***
Residuals	8	0.1212	0.0151		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	0.825650	0.5038676	1.1474324	0.0001662
MLR6-C	0.041885	-0.2798974	0.3636674	0.9740193
MLR6+NaCl-C	0.081085	-0.2406974	0.4028674	0.8495254
MLR6-C+NaCl	-0.783765	-1.1055474	-0.4619826	0.0002409
MLR6+NaCl-C+NaCl	-0.744565	-1.0663474	-0.4227826	0.0003460
MLR6+NaCl-MLR6	0.039200	-0.2825824	0.3609824	0.9784727

- **SOS3**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	1.449	0.4829	1.923	0.204
Residuals	8	2.009	0.2511		

P > 0.05: il n'ya pas de differences significatives entre les groupes

- **PRI**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	35.01	11.669	5.139	0.0286 *
Residuals	8	18.17	2.271		

P < 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	4.355040	0.4149542	8.2951258	0.0312105
MLR6-C	0.564170	-3.3759158	4.5042558	0.9660344
MLR6+NaCl-C	0.864905	-3.0751808	4.8049908	0.8931382
MLR6-C+NaCl	-3.790870	-7.7309558	0.1492158	0.0593193
MLR6+NaCl-C+NaCl	-3.490135	-7.4302208	0.4499508	0.0837803
MLR6+NaCl-MLR6	0.300735	-3.6393508	4.2408208	0.9944528

- **SAG13**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Traitements	3	17.75	5.916	3.74	0.0603 .
Residuals	8	12.66	1.582		

p > 0.05: il n'ya pas de differences significatives entre les groupes.

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	3.390090	0.1013888	6.678791	0.0435255
MLR6-C	1.205600	-2.0831012	4.494301	0.6582369
MLR6+NaCl-C	1.648655	-1.6400462	4.937356	0.4273307
MLR6-C+NaCl	-2.184490	-5.4731912	1.104211	0.2235169
MLR6+NaCl-C+NaCl	-1.741435	-5.0301362	1.547266	0.3849808
MLR6+NaCl-MLR6	0.443055	-2.8456462	3.731756	0.9713715

Blé dur (WAHA)

FIGURE 51

- Hauteur de la plante

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	138.46	46.153	8.1566	0.0009627 ***
Residuals	20	113.17	5.658		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-6.000000	-9.8439402	-2.1560598	0.0015599
MLR6-C	-1.166667	-5.0106069	2.6772736	0.8302309
MLR6+NaCl-C	-4.333333	-8.1772736	-0.4893931	0.0236588
MLR6-C+NaCl	4.833333	0.9893931	8.6772736	0.0106643
MLR6+NaCl-C+NaCl	1.666667	-2.1772736	5.5106069	0.6257075
MLR6+NaCl-MLR6	-3.166667	-7.0106069	0.6772736	0.1302016

- Longueur des racines

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	262.17	87.389	16.86	1.064e-05 ***
Residuals	20	103.67	5.183		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-1.666667	-5.345727	2.012394	0.5928396
MLR6-C	5.833333	2.154273	9.512394	0.0013325
MLR6+NaCl-C	5.500000	1.820939	9.179061	0.0023769
MLR6-C+NaCl	7.500000	3.820939	11.179061	0.0000764
MLR6+NaCl-C+NaCl	7.166667	3.487606	10.845727	0.0001341
MLR6+NaCl-MLR6	-0.333333	-4.012394	3.345727	0.9940914

FIGURE 52

- Poids frais des racines

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	4.1002	1.3667	14.251	3.371e-05 ***
Residuals	20	1.9181	0.0959		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-1.0800000	-1.58043677	-0.5795632	0.0000367
MLR6-C	-0.6433333	-1.14377011	-0.1428966	0.0089474
MLR6+NaCl-C	-0.9266667	-1.42710344	-0.4262299	0.0002452
MLR6-C+NaCl	0.4366667	-0.06377011	0.9371034	0.1010302
MLR6+NaCl-C+NaCl	0.1533333	-0.34710344	0.6537701	0.8262730
MLR6+NaCl-MLR6	-0.2833333	-0.78377011	0.2171034	0.4092401

- **Poids frais des feuilles**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	66.459	22.1531	4.609	0.01312 *
Residuals	20	96.131	4.8065		

P < 0.05: il existe des différences significatives entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
C+NaCl-C	-2.7766667	-6.3194775	0.7661442	0.1591630
MLR6-C	1.7650000	-1.7778109	5.3078109	0.5170969
MLR6+NaCl-C	0.5516667	-2.9911442	4.0944775	0.9715607
MLR6-C+NaCl	4.5416667	0.9988558	8.0844775	0.0091512
MLR6+NaCl-C+NaCl	3.3283333	-0.2144775	6.8711442	0.0703051
MLR6+NaCl-MLR6	-1.2133333	-4.7561442	2.3294775	0.7739507

FIGURE 54

- **Chlorophylle a**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	0.89350	0.297833	3574	7.602e-13 ***
Residuals	8	0.00067	0.000083		

P < 0.05: il existe une différence significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
MLR6+NaCl-MLR6	-0.5266667	-0.55053559	-0.50279774	0.0000000
C-MLR6	-0.6900000	-0.71386892	-0.66613108	0.0000000
C+NaCl-MLR6	-0.6300000	-0.65386892	-0.60613108	0.0000000
C-MLR6+NaCl	-0.1633333	-0.18720226	-0.13946441	0.0000001
C+NaCl-MLR6+NaCl	-0.1033333	-0.12720226	-0.07946441	0.0000034
C+NaCl-C	0.0600000	0.03613108	0.08386892	0.0001925

- **Chlorophylle b**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	3.6458	1.21525	10416	1.056e-14 ***
Residuals	8	0.0009	0.00012		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
MLR6+NaCl-MLR6	-1.1033333	-1.1315754	-1.07509124	0.0e+00
C-MLR6	-1.2133333	-1.2415754	-1.18509124	0.0e+00
C+NaCl-MLR6	-1.4200000	-1.4482421	-1.39175791	0.0e+00
C-MLR6+S	-0.1100000	-0.1382421	-0.08175791	7.5e-06
C+NaCl-MLR6+NaCl	-0.3166667	-0.3449088	-0.28842458	0.0e+00
C+NaCl-C	-0.2066667	-0.2349088	-0.17842458	0.0e+00

- **Chlorophylle totale**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	8.2454	2.74846	4122.7	4.296e-13 ***
Residuals	8	0.0053	0.00067		

P< 0.05: il existe une difference significative entre les groupes

Comparaisons multiples de moyenne avec le test de Tukey à 95% de confiance

	diff	lwr	upr	p adj
MLR6+NaCl-MLR6	-1.6533333	-1.7208448	-1.58582183	0.0000000
C-MLR6	-1.9166667	-1.9841782	-1.84915516	0.0000000
C+NaCl-MLR6	-2.0766667	-2.1441782	-2.00915516	0.0000000
C-MLR6+NaCl	-0.2633333	-0.3308448	-0.19582183	0.0000074
C+NaCl-MLR6+NaCl	-0.4233333	-0.4908448	-0.35582183	0.0000002
C+NaCl-C	-0.1600000	-0.2275115	-0.09248849	0.0002924

- **Caroténoïdes**

ANOVA à un facteur Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
treatments	3	0.77043	0.256811	2.9856	0.09603 .
Residuals	8	0.68813	0.086017		

P>0.05: il n'y a pas de differences significatives entre les groupes.

يهدف هذا العمل الى دراسة تأثير العزله *Pseudomonas knackmussii* MLR6 على تلقیح نبات *Arabidopsis thaliana* Col-0 و القمح الصلب في وسط مالح. عزلت هذه البكتيريا من جذور نيته *Salsola tetrandra* التي جمعت من 7 سبخات من الجزائر. اظهر تعداد البكتيريا كثرتها داخل جذور النبتة مقارنة بسطح الجذور و التربة البعيدة عن النبتة. عزلت 76 بكتيريا منها 51 سلالة بكتيرية ذات غرام سالب ودرست قابليتها على تعزيز نمو النبات. كما كشفت تقنية دراسة التنوع الجيني Internal Transcribed Spacer (ITS) polymorphism عن وجود 17 نوعا مختلفا التي تم اختبارها لدراسة قدرتها على تحمل تراكيز عالية من NaCl و PEG₈₀₀₀ و pH وقد تبين ان معظمها متسامحة. كما اظهرت السلالات الخمس *Pseudomonas frederiksbergensis* SE1, *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia rettgeri* BR5 و *Providencia rettgeri* BR5 *vermicola*, الحديدية *Acide indole acétique* (IAA) في وجود تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0-0.3مول). تلقیح *thaliana* A بالسلالة MLR6 في وجود تركيز 0.2 مول من كلوريد الصوديوم حسن من سلوك الثغور ، معدل النتج ، محتوى الكلوروفيل والكاروتينات. كما ان استعمال السلالة MLR6 ادى الى زيادة المعامل المورفولوجيه للنبات في كل من غياب ووجود الملوحة و سمح كذلك بالمحافظة على غشاء الخلية عن طريق تقليل تسرب الشوارد في النباتات المجهد. ومن جهة اخرى وجود البكتيريا سرع من تراكم ROS بعد تعرض النبتة القصير لـ كلوريد الصوديوم. زياده على ذلك ، التلقیح بالسلالة MLR6 زاد من معدل تعبير الجين At SOS1 وحافظ على تعبير كل من AtNHX1 و AtHKT1 و AtSOS2 و AtSOS3 و AtSAG و AtPR1 إلى مستويات مماثلة للنباتات الغير معرضة للملوحة. يبدو أن استخدام السلالة البكتيرية MLR6 كلقاح يمثل استراتيجية واعدة لتحسين نمو النباتات في المناطق القاحلة.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا المعززة لنمو النبات. النباتات الملحية. التربة المالحة. القمح الصلب

Résumé

L'étude de l'inoculation par une rhizobactérie *Pseudomonas knackmussii* MLR6 isolée d'une plante halophyte sur la croissance végétale de *Arabidopsis thaliana* et du blé dur en milieu salin est menée. L'isolement des bactéries est réalisé à partir de la rhizosphère de la plante halophyte *Salsola tetrandra* collectée de sept Sebkhass en Algérie. Les numérations montrent une abondance des bactéries endophytes par rapport aux bactéries rhizosphériques et non-rhizosphériques. Les activités PGP sont étudiées sur les 76 isolats dont 51 à Gram négatif sont sélectionnés et appartiennent à 17 haplotypes différents, selon les analyses du polymorphisme des espaces inter géniques transcrits (ITS). Les effets du stress abiotique (salinité, pH et PEG₈₀₀₀) sur la croissance d'une souche à Gram négatif appartenant à chaque haplotype différent révèle que la majorité des souches sont tolérantes. La solubilisation des phosphates et la production des sidérophores et de l'acide indole acétique (AIA), sous l'effet de concentrations de NaCl (0 et 0,3M), sont omniprésentes chez cinq (05) souches *Pseudomonas frederiksbergensis* SE1, *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia rettgeri* BR5 et *Providencia rettgeri* BR5 *vermicola* et *Pseudomonas knackmussi* MLR6. L'inoculation de *Arabidopsis thaliana* et du blé dur par *Pseudomonas knackmussii* MLR6, à des concentrations de 0,2M de NaCl, améliore les paramètres morphologiques et les pigments photosynthétiques. Elle stabilise la membrane cellulaire en réduisant la fuite d'électrolytes (EL%) chez *A. thaliana* stressée et accélère l'accumulation de ROS après une courte durée d'exposition au NaCl. En outre, MLR6 induit l'expression du gène AtSOS1 et maintient l'expression de AtNHX1, AtHKT1, AtSOS2 et AtSOS3 ainsi que AtSAG et AtPR1 à des niveaux similaires à ceux des plantes non stressées. L'utilisation de la souche MLR6 comme bioinoculant semble être une stratégie prometteuse pour améliorer la croissance des plantes glycophytes dans les zones arides.

Mots clés : PGP, halophytes, stress salin, *Pseudomonas knackmussii* MLR6, *Arabidopsis thaliana*, blé dur

Abstract

The impact of inoculation with rhizobacteria *Pseudomonas knackmussii* MLR6 isolated from a halophytic plant on plant growth of *Arabidopsis thaliana* and durum wheat under salt stress was studied. The isolation of the bacteria is carried out from the rhizosphere of the halophyte *Salsola tetrandra* collected from seven Sebkhass in Algeria. The bacteria numeration shows an abundance of endophytic bacteria compared to rhizospheric and non-rhizospheric bacteria. The PGP activities are studied on 76 isolates of which 51 were Gram-negative. From this later 17 different haplotypes were selected according to polymorphism analyzes of transcribed intergenic spaces (ITS). The effect of abiotic stress (salinity, pH, and aw) on the growth of a Gram - negative strains belonging to each different haplotype reveals that the majority of strains are tolerant. The solubilization of phosphates and the production of siderophores and indole acetic acid (AIA), under different NaCl concentrations (0 and 0.3M), are present in five (05) strains : *Pseudomonas frederiksbergensis* SE1, *Enterobacter cloacae* BE1, *Providencia rettgeri* BR5 and *Pseudomonas knackmussii* MLR6. Inoculation of *A. thaliana* and durum wheat with *P. knackmussii* MLR6, at 0.2M NaCl, improves morphological parameters and photosynthetic pigments. It stabilizes the cell membrane by reducing electrolyte leakage (EL%) in stressed *A. thaliana* and accelerates ROS accumulation after a short exposure to NaCl. In addition, MLR6 induces the expression of AtSOS1 gene and maintains the expression of AtNHX1, AtHKT1, AtSOS2 and AtSOS3 as well as AtSAG and AtPR1 at levels similar to those of the unstressed plants. The use of MLR6 strain as a bioinoculant appears to be a promising strategy for improving the growth of glycophyte plants in arid areas.

Key words: PGP, halophytes, salt stress, *Pseudomonas knackmussii* MLR6 *Arabidopsis thaliana*, durum wheat,

ORIGINAL ARTICLE

Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana

N.E.H. Rabhi^{1,2}, A. Silini¹, H. Cherif-Silini¹, B. Yahiaoui¹, A. Lekired³, M. Robineau², Q. Esmael², C. Jacquard², N. Vaillant-Gaveau², C. Clément², E. Aït Barka² and L. Sanchez² 

1 Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas, Sétif-1, Algeria

2 Unité de Recherche EA 4707 Résistance Induite et Bioprotection des Plantes, SFR Condorcet FR CNRS 3417, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

3 Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives LMBA, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

Keywords

Arabidopsis thaliana, defence, halophyte, PGPR, photosynthesis, salt stress.

Correspondence

Lisa Sanchez, Unité de Recherche EA 4707 Résistance Induite et Bioprotection des Plantes, SFR Condorcet FR CNRS 3417, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France. E-mail: lisa.sanchez@univ-reims.fr

Essaïd Aït Barka and Lisa Sanchez have contributed equally to this work.

2018/1090: received 29 May 2018, revised 24 July 2018 and accepted 14 August 2018

doi:10.1111/jam.14082

Abstract

Aims: The study aimed for evaluate the efficacy of *Pseudomonas knackmussii* MLR6 on growth promotion, photosynthetic responses, pigment contents and gene expression of the plant model *Arabidopsis thaliana* under NaCl stress.

Methods and Results: The strain MLR6 was isolated from the rhizosphere of the halophyte *Salsola tetrandra* collected from a natural saline Algerian soil. Results showed the ability of MLR6 to induce plant growth-promoting traits even under NaCl stress. The inoculation with MLR6 improved the stomatal conductance, the transpiration rate, the total chlorophyll and carotenoid contents under salt stress. It conferred also an increase in fresh/dry weight as well as plant height. MLR6 inoculation further provided a positive effect on cell membrane stability by reducing the electrolyte leakage and priming the ROS accumulation after the salt exposition. Additionally, the expression of *NHX1*, *HKT1*, *SOS2* and *SOS3* as well as *SAG13* and *PR1* was maintained in MLR6-bacterized plant at a similar level of controls.

Conclusions: The inoculation of *A. thaliana* with MLR6 improves plant growth and reduces damages caused by salt stress.

Significance and Impact of the Study: The use of *P. knackmussii* MLR6 appears as a promising strategy to improve the sustainable agriculture under saline conditions.

Introduction

Because of their sessile nature, plants have to develop adaptative mechanisms to deal with various biotic and abiotic stresses such as salt stress which has been described as 'a threat to agriculture in several areas worldwide for more than 3000 years' by Flowers (2006). The agricultural productivity is indeed harshly impacted by the soil salinity which affects 20% of irrigated land in the world (Sgroy *et al.* 2009), leading to an estimated annual global cost equivalent to US\$11 000 million in 2011 (FAO, 2011). Moreover, it has been assessed that

50% of the agricultural land would be salinized by 2050 (Jamil *et al.* 2011).

Salinity stress, which induces both ionic, osmotic and oxidative damages, impairs plant growth and causes severe reductions in crop yield. The osmotic stress induces solute accumulation by cells to prevent water loss, leading to morphological damages, reduced photosynthesis, nutritional imbalance and finally leading to death (Panwar *et al.* 2016). The high-salt stress disrupts homeostasis in water potential and ion distribution at both cellular and whole plant levels. All along growth and development, plants have established several physiological and

biochemical mechanisms to adapt to environmental stresses (Zhu *et al.* 2014) and a large number of physiological and metabolic reactions are induced in plants to acclimatize these fluctuations (Hirayama and Shinozaki 2010). To achieve the salt tolerance, damages must be firstly prohibited or alleviated; secondly, homeostatic conditions should be recovered in the new stressful condition; and finally, the growth must restart, although at a lower rate.

Reliable, environmentally friendly practices are needed to sustainably meet the rising global food demands. The use of efficient micro-organisms like plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) is helpful in boosting and improving sustainable agriculture and environmental stability. The abnormal physiological functions of salt-affected plants can be reprogrammed by PGPR, which enhance the rate of photosynthesis, growth regulators, antioxidants and compatible solutes and adjust the expression of stress-responsive genes and proteins (Radhakrishnan and Baek 2017). PGPR can promote growth via different mechanisms including phytohormones production (e.g. auxin, cytokinin, ethylene and gibberellins), nitrogen fixation, nutrient mobilization and siderophore production (Hayat *et al.* 2010). PGPR can induce salinity stress tolerance through the modulation of physiological and biochemical process (Ilangumaran and Smith 2017). They can also induce systemic resistance (Yang *et al.* 2009). Furthermore, compatible osmolytes induced in plants by microbial strains in response to salinity stress lead to promote plant growth. Recently, several studies demonstrated that the application of PGPR can significantly improve plant tolerance to salt stress (Egamberdieva and Lugtenberg 2014; Bharti *et al.* 2016; Habib *et al.* 2016; Sapre *et al.* 2018). In this way, micro-organisms present in the saline area or in the rhizosphere of halophytic plants may provide a valuable resource to improve crop tolerance to salinity (Vaishnav *et al.* 2016) since inoculants isolated from indigenous salt-affected soils appeared more effective in application under saline regions.

In the plant model *Arabidopsis thaliana*, salt stress causes significant stress symptoms, such as high electrolyte leakage (EL), low tissue water content or chlorosis; contrary to what can be observed in halophytes. Valuable information about the growth promoting interaction between bacteria and plants were obtained from various studies in which *Arabidopsis* was inoculated with PGPR isolated from different crop species (Schwachtje *et al.* 2011). However, only few reports have studied the promoting effect of PGPR isolated from halophytes on *Arabidopsis* under salinity stress. Hence, in this study, we are focusing on *Pseudomonas knackmussii* MLR6, a halotolerant strain isolated from *Salsola tetrandra*, an halophyte growing in a saline soil. The main objective of this

study was to evaluate the efficacy of MLR6 on growth promotion, photosynthetic responses, pigment contents and gene expression of *A. thaliana* (col 0) under NaCl stress.

Material and methods

Source of plant growth-promoting Rhizobacteria

Seventy-six isolates of endophytic, rhizospheric and non-rhizospheric bacteria associated with *S. tetrandra* halophyte collected from a saline soil (EC = 31 dS/m, pH = 8.20) in Chott Melghir, Algeria (N 34°10.631', E 6°17.322') were obtained using the KB and TSA medium. The isolated bacterial cultures were tested for their reaction towards Gram staining. Among 76 bacterial isolates, 51 were Gram-negative which were selected for further culture-independent analysis. Seventeen Gram-negative representative isolates were selected to study their growth ability under NaCl, PEG₈₀₀₀ and pH stress. In order to select efficient isolates, 5 strains out of 17 were retained to evaluate their ability of phosphate solubilization, siderophores and indole 3-acetic acid (IAA) production under salt stress. Among selected strains, the *Pseudomonas knackmussii* MLR6 strain was able to produce AIA, siderophores and solubilize phosphate in the absence as well as in the presence of salt stress; it was selected for further characterization and experimental studies.

Bacterial isolation and taxonomical identification

Pseudomonas knackmussii strain MLR6 was isolated from the rhizospheric soil of a halophyte, *S. tetrandra*, collected from saline soil (EC = 31 dS/m, pH = 8.20) in Chott Melghir, Algeria (N 34°10.631', E 6°17.322'). The 16S rRNA gene of this strain was amplified by the PCR using universal primers 16SR (5'CTACGGCTACCTTGTTAC GA3') and 16SF (5'GAGTTTGATCCTGGC TCAG3'). The amplified product has been subjected to gel extraction then submitted for sequencing. A phylogenetic tree was constructed using the software MEGA 6.0 and aligned using CLUSTAL-X. The pairwise evolutionary distance was constructed by the neighbour-joining method with the bootstrap of 500 replicates to cluster the associated taxa.

Stress tolerance

The tolerance of bacteria to salt, drought and pH (acidic and basic) stresses was evaluated by growing the bacterium strain in 96-well microplates containing 200 µl of King B (King *et al.* 1954) medium supplemented with NaCl (0–2.2 mol l⁻¹) and/or PEG₈₀₀₀ (0–70%). For pH

influence, the medium was adjusted with KOH ranging from pH 9 to 11, or with HCl ranging from 4 to 6. The microplate wells were inoculated with 10 μ l of the bacterial strain (10^8 CFU per ml) suspended in KB broth medium. The growth of bacteria was estimated 48 h after the incubation at 28°C with a microplate reader (Multiskan GO, ver. 1.00.40).

PGP attributes in the presence of salt

The isolate was tested for the IAA production as described by Brick *et al.* (1991). Briefly, 100 μ l of fresh bacteria were inoculated onto 10 ml of LB broth supplemented with L-tryptophan (5 mmol l⁻¹) in the presence of different NaCl concentrations (0, 0.1, 0.2 and 0.3 mol l⁻¹). Forty-eight hours after incubation at 28°C, 1 ml of the supernatant was added to 2 ml of Salkowsky reagent (50 ml, 35% of perchloric acid, 1 ml 0.5 FeCl₃ solution). The development of the pink colour indicates IAA production. The amount of IAA was determined spectrophotometrically at 530 nm after 30 min, and the concentration of IAA was determined as μ g ml⁻¹ according to a standard curve.

The ability of the isolated strain to dissolve tricalcium phosphate Ca₃(PO₄)₂ was monitored in PVK liquid medium according to the method used by Nautiyal (1999) modified by adding the same NaCl concentrations. The culture was incubated at 28°C for 7 days, then the supernatant was used to determine the P-solubilization through the colorimetric method of Fiske and Subbarow (1925). The isolate was also tested for siderophore production in KB liquid medium with and without salt. Hundred microlitres was inoculated in this medium and incubated at 28°C for 48 h. Two millilitres of Chrom Azurol S (CAS) liquid medium (Schwyn and Neilands 1987) was added to 2 ml of cell-free culture supernatant and the OD was recorded at 630 nm. Siderophore units were calculated as follows:

$$\begin{aligned} & \% \text{ siderophore unit} \\ &= \frac{\text{Absorbance of reference (Ar)} - \text{Absorbance of test (As)}}{\text{Absorbance of reference (Ar)}} \\ & \times 100 \end{aligned}$$

where Ar is the absorbance of uninoculated media and CAS solution, while As is the absorbance of the test sample. All tests were performed in triplicate.

Cellulase, chitinase and protease activities

The characterization of chitinase and cellulase production was carried out using the M9 medium supplemented with 2% of carboxymethyl cellulose or colloidal chitin for

cellulose and chitinase respectively. After inoculation, plates were incubated for 7 days at 28°C. Plates of the bacterial growth were stained with iodine (0.666% KI; 0.333% iodine) for the cellulase activity and by 0.1% Congo Red solution for the chitinase activity (Kasana *et al.* 2008; Murthy and Bleakley 2012). The protease production was determined in a skimmed milk agar medium (3% w/v). The isolate was spotted and then incubated for 48 h at 28°C. The proteolytic activity was identified by a clear halo around the colony (Chang *et al.* 2009). The test was performed in duplicate.

HCN production

The ability of the studied strain to produce the hydrocyanic acid was studied according to the method of Bakker and Schippers (1987). The bacterial strain was stricken on Trypticase soybean medium supplemented with glycine (4.4 g l⁻¹). A 3MM Whatman paper (\varnothing = 5 cm) soaked with a yellow solution of picric acid 5% and sodium carbonate 2% was deposited on the lid of Petri dish. The HCN production was detected 4 days after incubating at 28°C. Orange colour development indicated HCN production. The test was performed in duplicate.

Ammonium production

The bacterial isolate was tested for ammonia production on peptone water according to Cappuccino and Sherman (1992). Ten millilitres of this medium was inoculated with a fresh bacterial culture and incubated for 48 h at 28°C. After adding a drop of Nesler's reagent to the medium, the colour development from brown to yellow indicates ammonia production. The test was performed in duplicate.

Nitrogen-fixing ability

The nitrogen-fixing potential was tested on a N-free semisolid Jensen's (1942) medium. The positive result was determined by observing the ability of bacteria to grow on this medium 4 days after incubating at 28°C. The bacterial strain was re-inoculated on the medium three times to confirm its activity. The test was performed in duplicate.

Plant material and salt stress treatments

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) was used in this study. The strain MLR6 was used as an inoculant to determine its effect on *A. thaliana* salt tolerance (0.2 mol l⁻¹ NaCl supplemented soil). Bacteria were cultivated in LB broth overnight at 28°C and cell pellets

were washed three times with the PBS (10 mmol l⁻¹) and the OD adjusted at 600 nm to 1 (10⁷ CFU per ml). Four-week-old seedlings were inoculated by adding 10 ml of bacterial suspension to the soil around plants. Salt stress (0.2 mol l⁻¹ NaCl) was applied 2 weeks after bacterization at three times with an interval of 3 days between each treatment (Fig. S1). After 15 days of the third salt treatment, plants were checked for plant growth parameters. Plants were cultured at 20°C (day/night), 60% of relative humidity and a light intensity of 120 μmol m⁻² s⁻¹ (16 h/8 h photoperiod).

Fluorescent tagging of *P. knackmussii* strain MLR6

Fluorescent tagging of *P. knackmussii* wild-type was carried out by electroporation using the plasmid pIN301 carrying the GFP-encoding gene and a chloramphenicol resistance cassette (Mesureur *et al.* 2017). Transformants were selected on LB plates with chloramphenicol (25 μg ml⁻¹).

Arabidopsis thaliana root colonization by GFP-tagged strain

Four-day-old *Arabidopsis* seedlings cultivated in the 1/2 Murashige and Skoog (MS) agar medium were lined in one side and inoculated with the GFP-tagged bacterial suspension (5 μl per seedling) at a concentration of 10⁷ CFU per ml. The buffer solution (10 mmol l⁻¹ PBS) was used as the control. Plates were incubated vertically for 3 days in a growth chamber (Khan *et al.* 2016). Roots were visualized using fluorescence microscopy.

Measurement of chlorophyll contents

To estimate the chlorophyll content, leaves from five plants from each condition were collected at the end of the experiment, and ground in liquid nitrogen. The chlorophyll was extracted by mixing 100 mg of frozen leaf powder in 80% acetone, followed by centrifugation at 3000 rev min⁻¹ for 10 min. The absorbance of the supernatant was determined at 663 and 646 and 470 nm. The amount of chlorophyll (mg g⁻¹dw) was calculated according to Arnon (1949) equations as follows:

$$\begin{aligned} \text{Chla (mg g}^{-1}\text{)} &= 12.7(\text{Abs } 663) \\ &\quad - 2.69(\text{Abs } 646) \times V/1000W; \\ \text{Chlb (mg g}^{-1}\text{)} &= 22.9(\text{Abs } 646) - 4.68(\text{Abs } 663) \\ &\quad \times V/1000W; \\ \text{Cart (mg g}^{-1}\text{)} &= [(100 \times \text{Abs } 470) - (3.27 \times \text{Chla}) \\ &\quad - (104 \times \text{Chlb})]/198 \times V/1000W \end{aligned}$$

V represents the volume of the extract solution and *W* represents the weight of the sampling leaves.

Photochemistry activity

Photosynthetic properties of *A. thaliana* leaf, including photosystem (I and II) activities, and electron transport rate ETRI and ETRII were measured using a Dual-PAM-100 (Heinz Walz, Germany). The saturation pulse method was used to determine P 700 parameters following the method of Klughammer and Schreiber (1994, 2008) and the fluorescence parameters were calculated according to Genty *et al.* (1989) and Schreiber (1994) at the same time. Measurements were carried out 24 h after each salt application. Three independent biological repetitions were performed, each in duplicates (*n* = 6).

Gas exchanges

Arabidopsis stomatal conductance (gs), net photosynthesis (Pn), transpiration (E) and intercellular CO₂ concentration (ci) were measured using (LI-6400-XT, LI-COR, Lincoln, NE) using equations developed by von Caemmerer and Farquhar (1981). The CO₂ concentration was maintained at a constant level of 400 μmol l⁻¹ using a CO₂ injector with a high-pressure liquid CO₂ cartridge source (LI-6400-01, LI-COR, Lincoln, NE). Air temperature and relative humidity were maintained at 20°C and 60% respectively. The photosynthetic active radiation was fixed at 200 μmol m⁻² s⁻¹. Gas-exchange measurements were taken 24 h after each salt application. Three independent biological replicates were performed (*n* = 6).

Persistence of bacterial strain and endophytic colonization

To determine the rhizoplane colonization and the persistence of MLR6 strain, root samples of plants were removed from the soil at the end of the experiment (30 days after inoculation), then vortexed (240 g) with 9 ml of PBS for 5 min. On the other hand, to evaluate the endophytic colonization, 1 g of roots was surface sterilized with ClONa (1 min), 70% ethanol (2 min) and then washed with sterile distilled water several times. Roots were then macerated in 9 ml of PBS and ground with a mortar. Appropriate serial dilution of root and soil homogenate samples were plated on LB medium supplemented with chloramphenicol (25 μg ml⁻¹). Detection of fluorescent GFP-tagged bacterial colonies was determined under UV light 2 days after incubation at 28°C.

In situ detection of H₂O₂ and O₂⁻

Peroxide and superoxide production was detected 24 h after treatment with 0.2 mol l⁻¹ NaCl. To detect H₂O₂ production, two leaves from 4-week-old plants were

placed in 1 mg ml⁻¹ 3,3'-diaminobenzidine (DAB), and incubated at room temperature for 5 h. Samples were destained in boiling absolute ethanol, and then pictures were captured for the record. Five plants from each condition were used for H₂O₂ detection (Ren *et al.* 2016). H₂O₂ was visualized as a brown colour due to the DAB polymerization. For O₂⁻ detection, leaves of control and salt-treated plantlets were excised and immersed in a 1 mg ml⁻¹ solution of nitroblue tetrazolium (NBT) in 10 mmol l⁻¹ phosphate buffer (pH 7.8) at room temperature. Immersed leaves were illuminated for 1–2 h until appearance of dark spots, characteristic of blue formazan precipitates (Shi *et al.* 2010). Superoxide and hydrogen peroxide were indicated as blue formazan formation and red-brown precipitate under the light microscope.

Electrolyte leakage

The EL was determined according to the protocol of Mahmood *et al.* (2016). Leaves were cut from plants at the end of experiment and incubated in 25 ml of deionized water to measure the initial electrical conductivity (EC₀). Samples were then refrigerated at 4°C overnight and assayed for EC₁. Finally, they were autoclaved at 121°C for 20 min to determine EC₂, and EL was calculated using the formula described by Yang *et al.* (1996):

$$EL(\%) = ((EC_1 - EC_0)/(EC_2 - EC_0)) \times 100.$$

RNA extraction, cDNA synthesis and real time PCR

For gene expression, leaves of *A. thaliana* treated or not with 0.2 mol l⁻¹ NaCl were harvested and grounded in liquid nitrogen. The total RNA was isolated from 50 mg of each sample using Extract' All (Eurobio) and 1 µg was used for reverse transcription using the Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Transcript levels were determined by qPCR using the CFX 96TM Real Time System (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and the SYBR Green Master Mix PCR kit as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Warrington, UK). PCR reactions were carried out in duplicates in 96-well plates (15 µl per well) in a buffer containing 1×SYBRGreenI mix (including Taq polymerase, dNTPs, SYBRGreen dye), 280 nmol l⁻¹ forward and reverse primers and 1 : 10 dilution of reverse transcript RNA. PCR conditions were used as described in Miotto-Vilanova *et al.* (2016). The transcript level was calculated using the standard curve method and normalized against *AtUBQ5* and *AtActin* genes as internal controls. The specific primers used in this study were listed as supplementary material (Table S1).

Statistical analysis

The analysis of variance and *post hoc* tests (Tukey's HSD) were performed using the software R Statistics 3.4.4.

Results

Pseudomonas knackmussii MLR6, isolated from the halophyte *S. tetrandra*, shows *in vitro* PGP properties

The bacterial isolate was obtained from the rhizospheric part of the halophyte, *S. tetrandra*. The isolate was molecularly characterized by 16S rDNA sequencing and identified based on BLAST analysis as *P. knackmussii* MLR6 with 99% similarity. The partial sequence of the bacterial strain MLR6 was submitted to GenBank (accession number KU577948). Phylogenetic analysis of MLR6 strain revealed its relatedness with several other strains of *Pseudomonas* (Fig. S2). Screened from a halophytic plant, the ability of this strain to grow was tested under different NaCl concentrations. The *P. knackmussii* MLR6 strain showed a growth capacity up to 0.8 mol l⁻¹ NaCl with an optimum at 0.25 mol l⁻¹ NaCl (Fig. S3a). The bacterium was also able to grow in a wide range of PEG₈₀₀₀ concentrations from 0 to 40% (Fig. S3b). MLR6 was able to grow from pH 4 to 11, with an optimum of 7 (Fig. S3c). Furthermore, *P. knackmussii* MLR6 exhibited positive tests for NH₃⁺ and chitinase production, whereas N₂ fixation, HCN production, cellulase and protease activities were negative (data not shown).

To evaluate the effect of NaCl on PGP activities, we monitored phosphate solubilization, siderophores and IAA production on a medium supplemented with different NaCl concentrations ranging from 0 to 0.3 mol l⁻¹. The results showed that MLR6 presented the same aptitude for IAA activity independently of the applied salt stress (Table 1). However, the amount of phosphate solubilized by the strain was positively affected reaching the maximum (193.90 µg µl⁻¹) in response to 0.1 mol l⁻¹,

Table 1 Plant growth-promoting characteristics of MLR6

NaCl (mol l ⁻¹)	IAA production (µg ml ⁻¹)	Phosphate solubilization (µg ml ⁻¹ P ₂ O ₅)	Siderophore production (%)
0	23.27 ± 1.85 a	117.87 ± 11.69 c	92.40 ± 1.08 a
0.1	21.40 ± 2.32a	193.90 ± 21.16 a	48.14 ± 0.92 d
0.2	22.86 ± 1.98a	145.28 ± 15.11 b	84.72 ± 1.28 b
0.3	21.65 ± 0.72 a	133.59 ± 13.65 bc	60.97 ± 1.59 c

The values presented are the means ± SE of three independent repetitions, each realized in duplicates. Different letters indicate significant differences between treatments (*P* < 0.05) as determined by Tukey's test analysis.

while siderophore production was negatively impacted by the NaCl concentration. The highest level of siderophores produced unites (92.40%) was obtained at control conditions. At high salt concentration (0.3 mol l^{-1}), the level of PGP traits studied remains elevated. The rates of phosphate solubilization, IAA and siderophore production were $133.59 \mu\text{g ml}^{-1}$, $21.65 \mu\text{g ml}^{-1}$ and 60.97% respectively (Table 1).

MLR6 induces growth promotion of the plant model *A. thaliana* under normal and salt stress conditions

Roots inoculated with the GFP-MLR6-tagged strain were observed under UV light (Fig. 1). The strain appeared intensely distributed through whole rooting system and the bacterium successfully colonized primary and lateral root surface.

In order to determine effects induced by *P. knackmussii* MLR6 on *A. thaliana* and evaluate its impact on NaCl

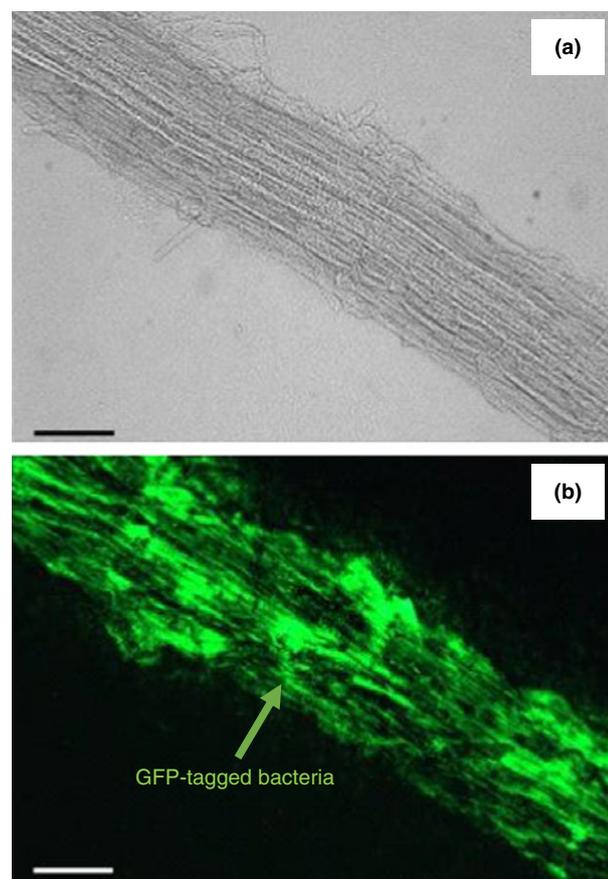


Figure 1 Colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by GFP-tagged MLR6 bacteria. Root surface 3 days after inoculation with MLR6 GFP-tagged under visible light (a) and under UV light (b). Scale bars = $50 \mu\text{m}$. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

tolerance, we monitored several PGP traits such as plant height, shoot fresh weight and dry weight in a pot experiment (30 days after inoculation) in the presence or absence of NaCl. Four weeks after bacterization, under no stress conditions, we observed a significant increase in parameters measured in the presence of MLR6 compared to control (Fig. 2a,b). Daily observations of plants indicated that the effect of MLR6 on morphological characteristics firstly appeared only 1 week after the third stress application (Fig. S4). Under NaCl stress conditions, growth parameters were severely decreased in control plants ($P < 0.01$) compared to no stressed samples. Nevertheless, MLR6-inoculated plants exhibited a significant improvement in plant height and shoot weight compared to nonbacterized plants, indicating that even under NaCl conditions, MLR6 can exert a positive effect on plant growth parameters (Fig. 2). The rhizoplane and endophytic colonizations of the MLR6 strain on the root system were evaluated at the end of the experiment (30 days after inoculation). Fluorescent colonies were found in plates inoculated with rhizospheric salted soil, which indicates the ability of MLR6 to colonize and persist on root surface under salinity stress. However, no endophytic colonization was detected.

Bacterization with MLR6 reduces EL on *Arabidopsis* leaves and primes ROS production

Salt stress may induce cell membrane damages evaluated by measuring EL. In the absence of NaCl stress, the leakage rate in MLR6-inoculated plants was significantly lower compared to nonbacterized ones (Fig. 3). A significant increase in electrical conductivity was observed in response to NaCl stress in control plants, whereas in MLR6-inoculated ones, the leakage percentage rate was similar to those measured without NaCl (Fig. 3).

The NBT and DAB stainings were monitored to detect the plant ROS production under normal and saline conditions. Without stress, no difference in H_2O_2 and O_2^- levels between bacterized and nonbacterized plants was revealed (Fig. 4). Dark brown (Fig. 4a) and blue spots (Fig. 4b) in leaves, resulting from the polymerization of DAB staining in the presence of H_2O_2 and precipitation of blue formazan in the presence of O_2^- , respectively, were intensified in leaves 24 h after salt stress in bacterized plant. This result indicates the priming effect of MLR6 on ROS production after NaCl stress.

Impact of MLR6 on *Arabidopsis* gene expression

To further elucidate mechanisms implied in MLR6-induced resistance, the expression of some salt-related genes (*HKT1*, *NHX1*, *SOS1*, *SOS2*, *SOS3*), defence-related

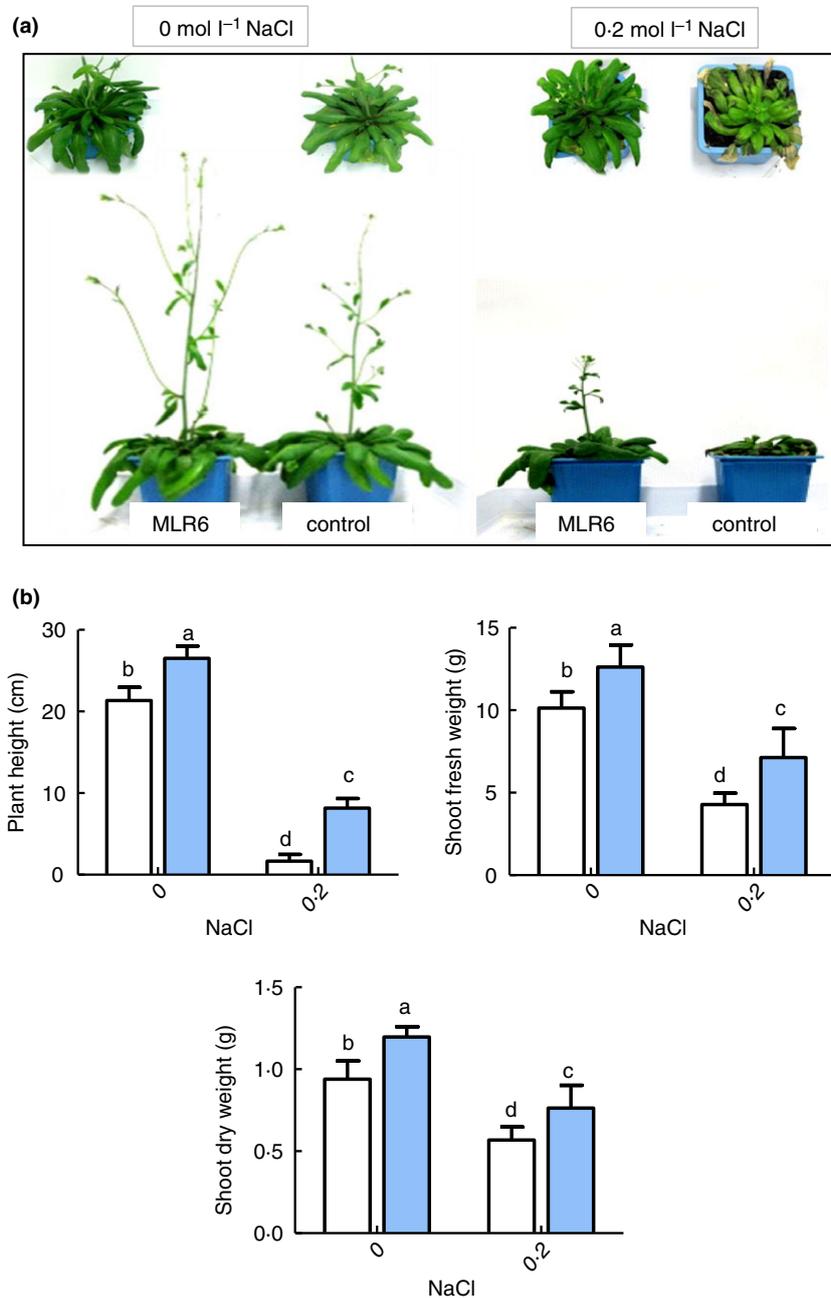


Figure 2 Impact of MLR6 on *Arabidopsis* growth parameters in response to salt stress. (a) Phenotype of control and bacterized (MLR6) *Arabidopsis thaliana* treated or not with NaCl (0.2 mol l^{-1}) 1 week after the third stress. (b) Effect of MLR6 and salt stress (0.2 mol l^{-1} NaCl) on plant height, fresh and dry biomass. The values presented are the means \pm SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (coloured bars). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

gene (*PR1*) and senescence-associated gene (*SAG13*) was monitored in *Arabidopsis* plants inoculated or not with MLR6, 24 h after application of the first saline stress. The expression of *AtNHX1* and *AtSOS3* showed no significant difference between control and MLR6-inoculated plants independently of NaCl stress (Fig. 5). Our results showed that the *AtSOS1* gene expression was enhanced significantly only in MLR6 bacterized after NaCl stress. For *AtHKT1* expression, a significant decrease was measured in control plants after NaCl stress, whereas no difference was reported in MLR6-inoculated ones under normal and

stress conditions. After NaCl stress application, the expression of *AtSOS2*, *AtPR1* and *AtSAG13* was significantly increased only in control plants, indicating a protective effect induced by MLR6 (Figs 5 and 6).

MLR6 prevents photosystem damages caused by salt stress

The chlorophyll reduction could be associated with environmental stress responses (Su *et al.* 2017). Under normal conditions, a significant increase in chlorophyll

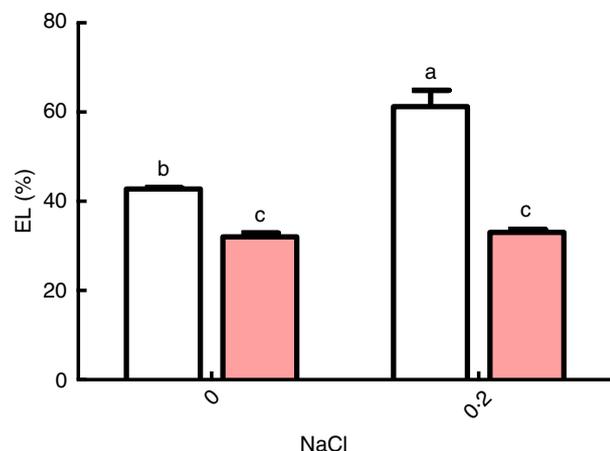


Figure 3 Electrolyte leakage in leaves of *Arabidopsis thaliana* treated or not with MLR6 and NaCl (0.2 mol l^{-1}). The values presented are the means \pm SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (coloured bars). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

contents (Chla, Chlb) was detected in MLR6-inoculated plants compared to control ones (Fig. 7a,b). In response to NaCl treatment, a decrease in chlorophyll content was observed in control plants and MLR6-inoculated ones but to a lesser extent in the latter. On the other hand, despite the significant decrease in response to salt stress, no effect of MLR6 strain was demonstrated on carotenoid content under both normal and stress conditions (Fig. 7c).

It is well known that salinity stress has a negative impact on photosynthesis (Flexas *et al.* 2004). In order to determine if MLR6 can alleviate this negative impact, different photosynthetic parameters were measured 24 h after each NaCl stress, and at the end of the experiment (2 weeks after the third stress), in control and PGPR-inoculated plants. Twenty-four hours after the first stress, a significant decrease was measured in control plants for the efficient quantum yield of PSI (Φ PSI), PSII (Φ PSII), the electron transport rate in PSI (ETRI) and PSII (ETRII), whereas no difference was observed for the maximum photochemical efficiency (Fv/Fm) and the quantum yield of regulated energy dissipation Y(NPQ) (Fig. 8). Interestingly, in MLR6-inoculated plants, the level of Φ PSI, Φ PSII, ETRI and ETRII measured under NaCl stress conditions was similar to those under normal conditions (Fig. 8), underlying a positive impact of the bacterization with MLR6. No significant difference in photosynthetic parameters was detected 24 h after the application of the second and the third stress (see Figs S5 and S6 respectively). Two weeks after the third stress,

profiles observed were similar to those observed after the first one (Fig. 9).

The gas exchanges measurements were evaluated 2 weeks after the third stress application. Under normal conditions, the presence of MLR6 led to a decrease in Pn and improved the internal CO_2 concentration significantly (Fig. 10), underlying a nonstomatal limitation of Pn. In response to NaCl treatment, a decrease was observed in the photosynthetic rate, the stomatal conductance and the transpiration rate in control without modifications of Ci. In MLR6-inoculated plants, the same profile was observed but to a lesser extent (Fig. 10).

Discussion

A current problem for crop plants worldwide, which will become more critical in the future, is salt stress imposed by salinity in soils due to poor practices in irrigation and overfertilization, among other causes. The soil salinity impairs plant growth and development, limiting the crop productivity and yield worldwide (Shukla *et al.* 2012). Salinity is detrimental to plant growth, causing nutritional constraints by decreasing the uptake of phosphorus, potassium, nitrate and calcium, ion cytotoxicity and osmotic stress. To alleviate the soil salinity stress in diverse crop plants, several studies have demonstrated the efficiency of plant inoculation with PGPRs (Singh *et al.* 2015; Bharti *et al.* 2016; Singh and Jha 2017; Sapre *et al.* 2018). An important factor to be considered when looking for new isolates is to screen them from environmental conditions for which they would be used (Príncipe *et al.* 2007). In natural ecosystems, rhizosphere of halophytes is then suitable to screen for bacteria with high capacities to support and promote plant growth (Sáenz-Mata *et al.* 2016). Some PGPR are able to protect plants against abiotic stress such as salinity. In the present study, PGPR isolated from the rhizosphere of the halophyte *S. tetrandra* was identified and characterized. After 16S gene sequencing, the strain was identified as *P. knackmussii* (99%) and nominated as MLR6. The strain showed high physiological tolerance capacities (up to 0.8 mol l^{-1} NaCl and 30% PEG₈₀₀₀) and exhibited the main PGP characteristics *in vitro* including phosphate solubilization, indole acetic acid and siderophore production even under salt stress. Additionally, the MLR6 isolate displayed also indirect plant promotion traits such as NH_3^+ and chitinase production. The above-mentioned traits were reported for their role in alleviating salt stress (Goswami *et al.* 2014; Patel *et al.* 2015; Li *et al.* 2016; Sapre *et al.* 2018) and their implication in the plant growth. In our study, plant height and shoot fresh weight decreased in control plants under NaCl stress but *A. thaliana* inoculation with MLR6 increased significantly the plant growth parameters

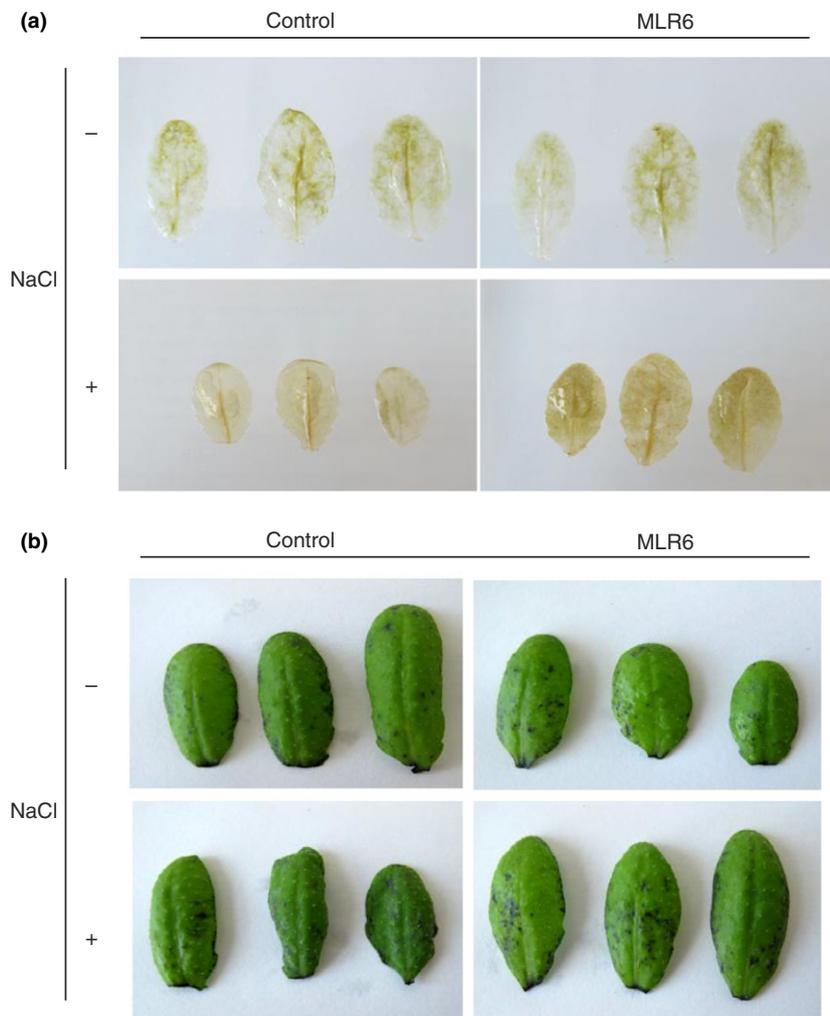


Figure 4 Effect of MLR6 and salt stress (on H_2O_2 and O_2^- accumulation after 24 h of salt treatment. (a) H_2O_2 production is detected with (DAB) (1 mg ml^{-1}) staining. (b) O_2^- production is detected by NBT (1 mg ml^{-1}) staining. Scale bar = 5 mm. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

under normal as well as under saline stress conditions. This positive effect may be correlated with the MLR6 ability to exhibit PGP traits, mainly IAA production (0.2 mol l^{-1}).

To be an effective PGPR, bacteria must be able to colonize roots because they need to establish themselves in the rhizosphere at sufficient population densities inducing beneficial effects (Ashrafuzzaman *et al.* 2009). We showed that *P. knackmussii* MLR6 was able to colonize the *A. thaliana* whole root system and persists in rhizosphere under saline stress conditions. The ability of MLR6 to tolerate high NaCl levels may be an important tool to exhibit their PGP attributes in *A. thaliana* under saline conditions.

Salinity stress increased EL, indicating cell membrane damages (Tuna *et al.* 2008; Mahmood *et al.* 2016). In this study, EL% was higher in control plants under stress conditions, indicating membrane damages due to osmotic effect. Interestingly, in MLR6-inoculated plants, we

observed a significant decrease in EL compared to the control plants. This result indicated that MLR6 inoculation has a positive effect on cell membrane stability.

The metabolic perturbation in plants exposed to salinity involves a broad spectrum of metabolic pathways in both primary and secondary metabolism. In addition to reduce plant growth, salt stress can also adversely affect the plant productivity by damaging photosynthetic machinery (Flors *et al.* 2007). Indeed, it is well known that photosynthesis may be one of the primary targets of environmental stress such as salinity (Liska *et al.* 2004; Stepień and Klobus 2006; Stepień and Johnson 2009; Çiçek *et al.* 2017). In our study, MLR6 improved the chlorophyll content in *A. thaliana*, confirming previous studies showing that PGPR-inoculated plants exhibited a higher chlorophyll content (Habib *et al.* 2016; Sapre *et al.* 2018). The great reduction reported in the chlorophyll content in control plants under the salt stress is in line with previous studies (Mahmood *et al.* 2016; Panwar

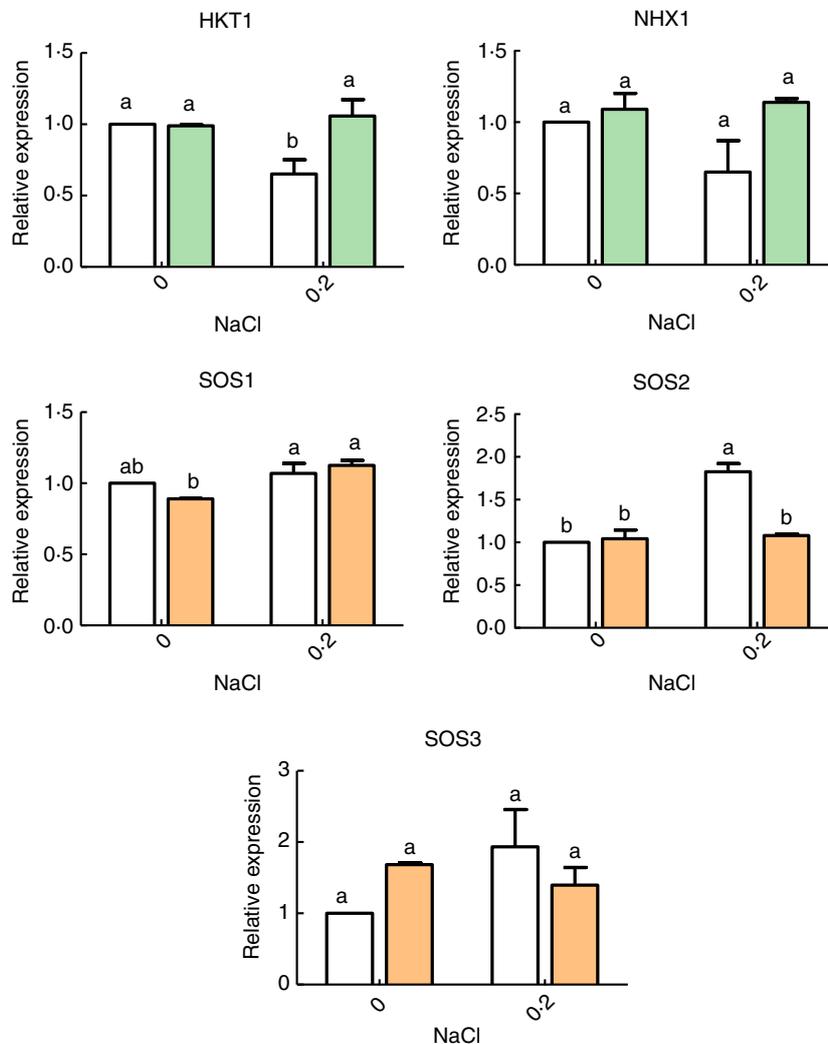


Figure 5 Salt stress-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* leaves from plants inoculated or not with MLR6 under normal (0) or stress conditions (0.2 mol l⁻¹ NaCl). The values presented are the means ± SD of two independent repetitions (each realized in duplicates). Different letters indicate statistically significant differences (P < 0.05) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (coloured bars). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

et al. 2016), stating that salinity negatively affects chlorophyll content and membrane stability of leaves. This reduction may be due to suppression of specific enzymes responsible for synthesis of photosynthetic pigments or also *via* the membrane damage. However, in MLR6-inoculated plants, the chlorophyll content was higher than in control ones, indicating a MLR6 effect even under stress conditions. A significant decrease was observed for photosynthetic parameters including ΦPSI, ΦPSII, ETRI and ETRII in *A. thaliana* in response to the first NaCl stress. Interestingly, 24 h after the second or the third stress, no significant difference was noticed neither in response to MLR6 nor in response to NaCl, indicating a putative acclimation/adaptation of *A. thaliana* to saline conditions. However, a decrease in ΦPSI, ΦPSII, ETRI and ETRII in response to NaCl was observed 15 days after the third stress. Such a decrease in photosynthetic parameters was described previously in response

to biotic stress, *Pseudomonas syringae* DC3000 in *A. thaliana* (Su *et al.* 2017).

In our work, the salt stress reduced the photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration of the leaves. It is well known that salinity induced the stomatal closure by an osmotic stress displacing essential cations from endomembrane structure and degrading thylakoid membrane proteins (Wang *et al.* 2016). As reported by Mahmood *et al.* (2016), the reduction in stomatal conductance may be due to the salinity causing the damage of the stomatal surface; while the reduction in transpiration rate may be attributed to a reduction in stomatal conductivity, which occurs because stomata close to maintain the cell turgescence under the osmotic stress. In addition, the salt stress led to a decrease in net photosynthesis without modification of intercellular CO₂. This indicates that other physiological mechanisms are involved. The loss or inactivation of both rubisco and

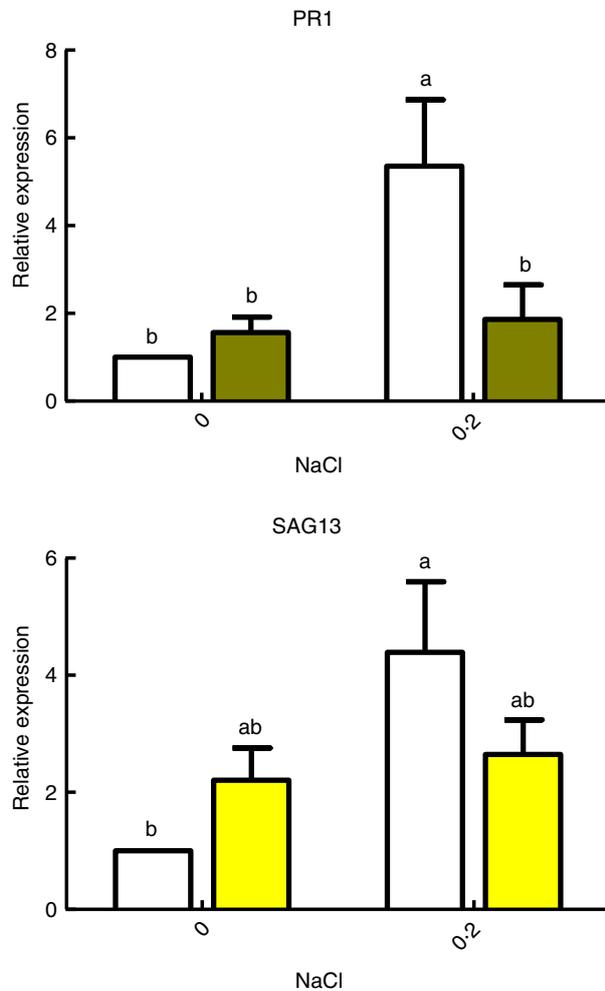


Figure 6 Defence and senescence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* leaves from plants inoculated or not with MLR6 under normal (0) or stress conditions (0.2 mol l⁻¹ NaCl). The values presented are the means \pm SD of two independent repetitions (each realized in duplicates). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (coloured bars). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

other key Calvin cycle enzymes may result in a reduction of carboxylation efficiency and RuBP regeneration rate. We also measured an inhibition of PSI and PSII activity that could explain the Pn decrease. Our study confirms that the MLR6 strain improves net photosynthesis, stomatal conductance, transpiration and internal CO₂ concentration under salt stress.

In our study, an accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ was observed 24 h after salt application. The H₂O₂ accumulation is an early common response to various environmental stress factors, such as pathogen attack (Torres *et al.* 2002), heat stress (Saidi *et al.* 2011), drought and

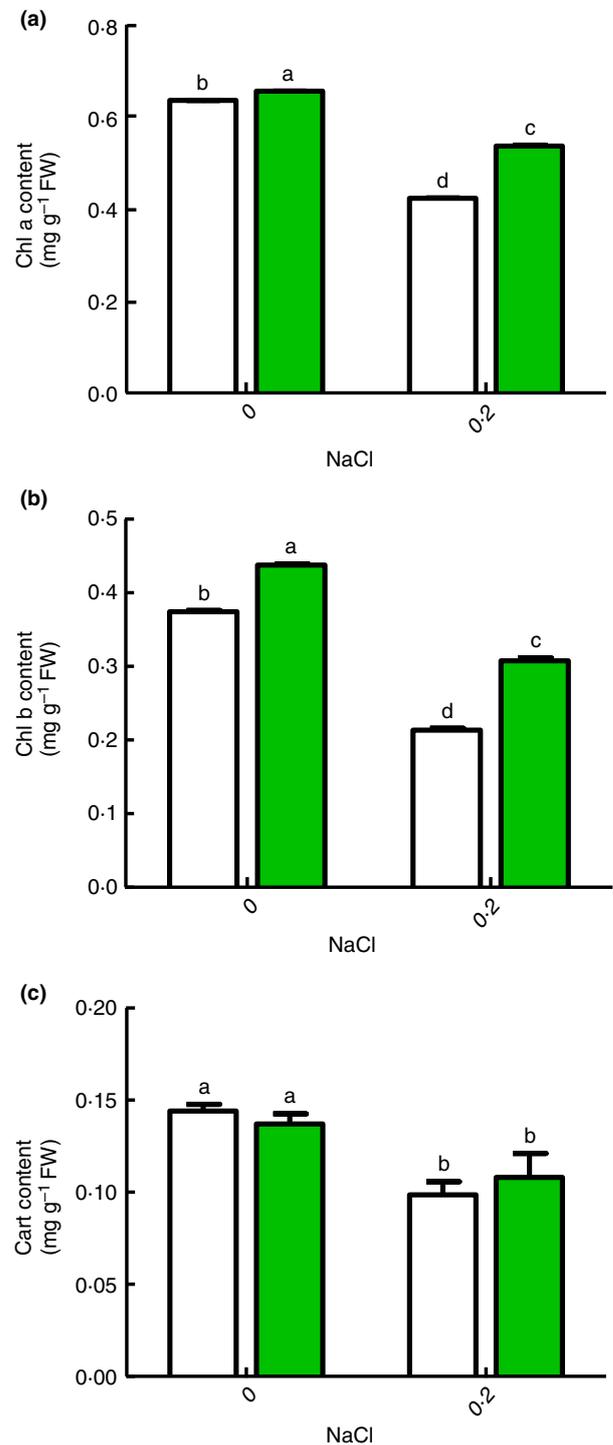


Figure 7 Effect of MLR6 and salt stress on (a) chlorophyll a, (b) chlorophyll b and (c) carotenoid contents. The values presented are the means \pm SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (coloured bars). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

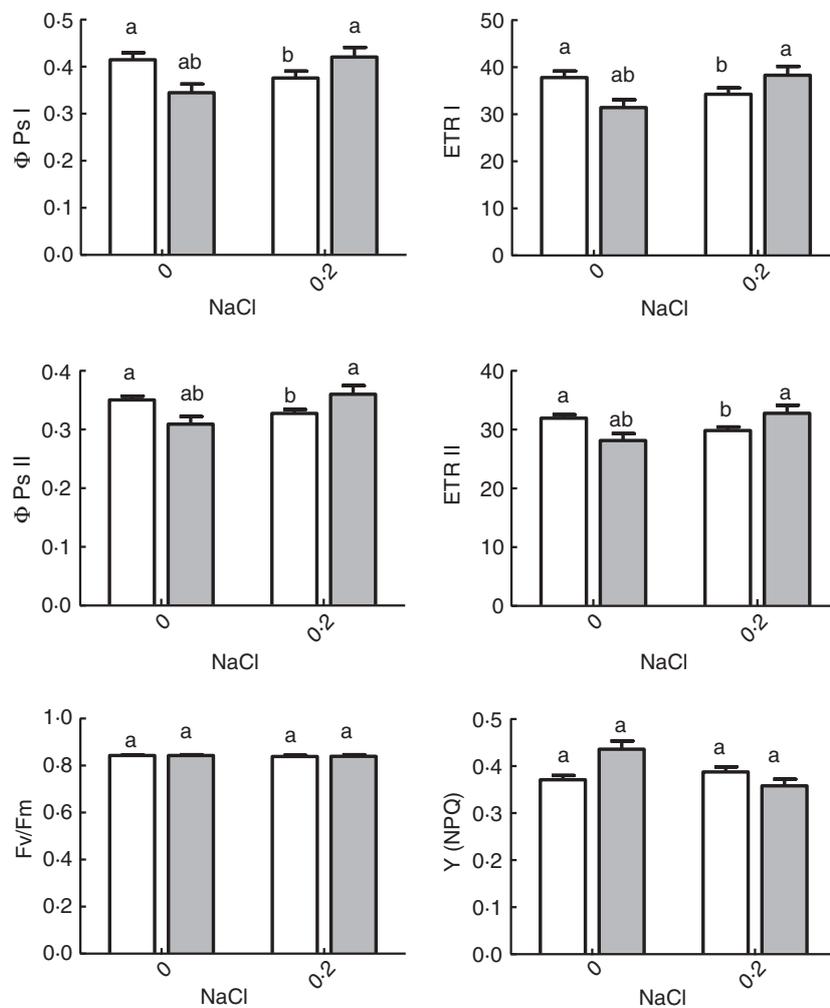


Figure 8 Effect of MLR6 and salt stress ($0.2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$) on photosynthesis parameters 24 h after the first stress. The values presented are the means \pm SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. ΦPSI , efficient quantum yield of PSI; ΦPSII , efficient quantum yield of PSII; ETRI, electron transport rate in PSI; ETRII, electron transport rate in PSII; Fv/Fm, maximum photochemical efficiency and Y (NPQ), quantum yield of regulated energy dissipation. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (grey bars).

salt stress (Miller *et al.* 2011). Interestingly, in this work, the higher O_2^- and H_2O_2 production was observed in MLR6-inoculated plants compared to nonbacterized ones after a saline stress, indicating a priming effect of MLR6. To counteract the severe effect of oxidative stress, plants activate their antioxidant defence machinery that scavenges the excess ROS and maintain the redox homeostasis (Sharma *et al.* 2016). Priming is an adaptive strategy that improves the defensive capacity of plants (Mauch-Mani *et al.* 2017) and may explain the protective effect induced by *P. knackmussii* MLR6 against salt stress in *A. thaliana*.

We also studied the effect of MLR6 on gene expression upon salt stress. Briefly, a significant decrease was measured for *AtHKT1* expression, in control plants after the NaCl stress. Such a repression of this gene in control plants was also observed in *A. thaliana* plants exposed to salt stress by Ali *et al.* (2012). We found also that under salt stress, the *AtSOS1* gene expression was

enhanced significantly only in MLR6 bacterized after NaCl stress. This priming effect of MLR6 on *SOS1* expression may explain partly the observed protective effect. In the same way, after NaCl stress application, expressions of *AtPRI* and *AtSAG13* were significantly increased only in control plants, indicating a protective effect induced by MLR6. It is well-documented that *PR* genes are regulated by pathogenic infections and damages caused by insect attacks and wounding. They are also affected by certain environmental stresses, including cold and osmotic stress (Seo *et al.* 2008). The *SAG13* expression was upregulated only in control and stressed plants, demonstrating the ability of MLR6 to protect plants from senescence effects.

The current study highlighted the ability of *P. knackmussii* MLR6, a strain isolated from the rhizosphere of a halophyte (*S. tetrandra*) growing in a saline soil, to grow and express different PGP traits even under NaCl stress conditions. When *A. thaliana* was bacterized with MLR6,

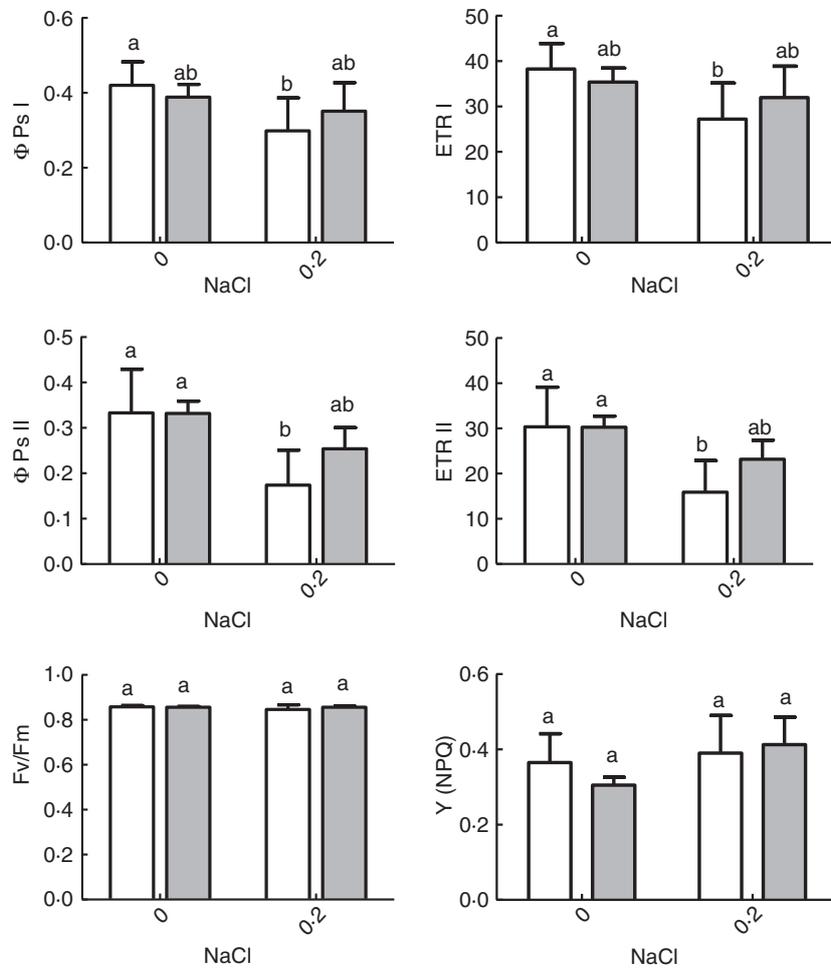


Figure 9 Effect of MLR6 and salt stress ($0.2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$) on ΦPSI , ETR I, ΦPSII , ETR II, Fv/Fm and Y(NPQ) in *Arabidopsis thaliana* 2 weeks after the third stress. The values presented are the means \pm SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (grey bars).

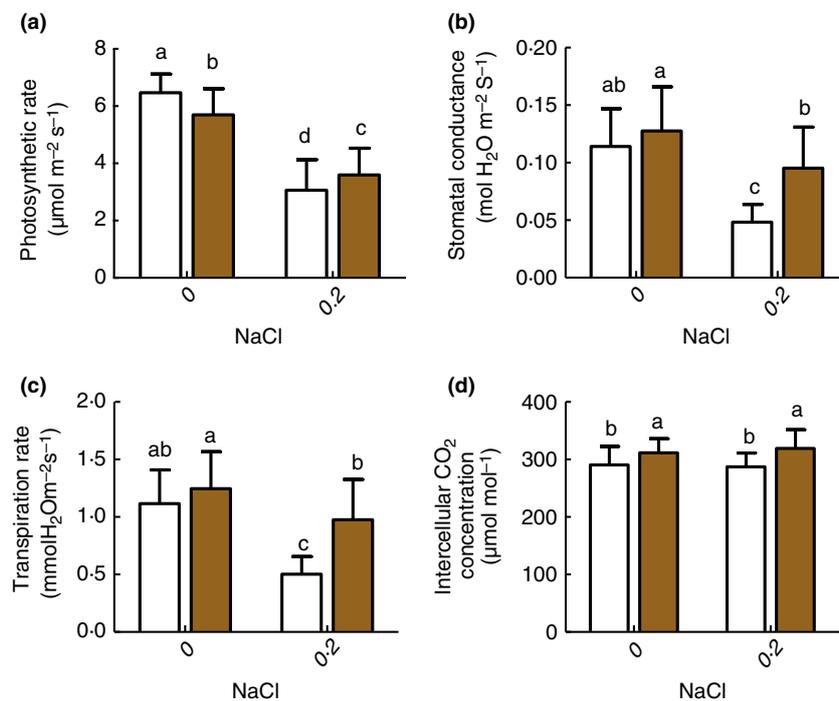


Figure 10 Effect of MLR6 and salt stress ($0.2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$) on (a) photosynthetic rate, (b) stomatal conductance, (c) transpiration rate and (d) intercellular CO_2 , 2 weeks after the third stress. The values presented are the means \pm SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with means comparisons using Tukey's HSD. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (coloured bars). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

the plant model exhibited a significant increase in weight and height. Furthermore, negative effects of NaCl were minimized by reducing the EL and priming the ROS accumulation in NaCl-stressed plants. Present results demonstrate also that the MLR6 strain improved net photosynthesis, stomatal conductance, transpiration and internal CO₂ concentration under salt stress. The use of *P. knackmussii* MLR6 appears as a promising strategy to improve the sustainable agriculture under saline conditions.

Acknowledgements

We acknowledge Annette Vergunst for kindly providing the plasmid pIN301. This work was supported by a grant provided by the Profas B⁺ program.

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

References

- Ali, Z., Park, H.C., Ali, A., Oh, D.H., Aman, R., Kropornicka, A., Hong, H., Choi, W. *et al.* (2012) TsHKT1.2, a HKT1 homolog from the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea* shows K⁺ specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiol* **158**, 1463–1474.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1–15.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Ismail, M.R., Hoque, A., Zahurul, M., Shahidullah, S.M. and Meon, S. (2009) Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *J Biotechnol* **8**, 1247–1252.
- Bakker, A.W. and Schippers, B. (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.
- Bharti, N., Pandey, S.S., Barnawal, D., Patel, V.K. and Kalra, A. (2016) Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Sci Rep* **6**, 34768.
- Brick, J.M., Bostock, R.M. and Silverstone, S.E. (1991) Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl Environ Microbiol* **57**, 535–538.
- von Caemmerer, S. and Farquhar, G. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**, 376–387.
- Cappuccino, J.C. and Sherman, N. (1992) *Microbiology: A Laboratory Manual* (3rd edn, pp. 125–179). New York, NY: Benjamin/Cumming Pub.
- Chang, W.T., Hsieh, C.H., Hsieh, H.S. and Chen, C. (2009) Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *World J Microb Biotechnol* **25**, 375–382.
- Çiçek, N., Oukarroum, A., Strasser, R.J. and Schansker, G. (2017) Salt stress effects on the photosynthetic electron transport chain in two chickpea lines differing in their salt stress tolerance. *Photosynth Res* **136**, 291–301.
- Egamberdieva, D. and Lugtenberg, B. (2014) Use of plant growth-promoting Rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses* ed. Miransari, M. Vol. 1, pp. 73–96. New York, NY: Springer.
- FAO (2011) FAO land and plant nutrition management service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**, 375–400.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. and Sharkey, T.D. (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol* **6**, 269–279.
- Flors, V., Paradis, M., Garcia-Andrade, J., Cerezo, M., Gonzalez-Bosch, C. and Pilar, G.A.P. (2007) A tolerant behaviour in salt-sensitive tomato plants can be mimicked by chemical stimuli. *Plant Signal Behav* **2**, 50–57.
- Flowers, T. (2006) Plants and salinity – preface. *J Ex Bot* **57**, iv.
- Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **990**, 87–92.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P. and Thakker, J.N. (2014) Screening of PGPR from saline desert of Kutch: growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiol Res* **169**, 66–75.
- Habib, S.H., Kausar, H. and Saud, H.M. (2016) Plant growth-promoting Rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Okra through ROS-scavenging enzymes. *Biomed Res Int* **2016**, 6284547.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. and Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* **60**, 579–598.
- Hirayama, T. and Shinozaki, K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* **61**, 1041–1052.
- Ilangumaran, G. and Smith, D.L. (2017) Plant growth promoting Rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. *Front Plant Sci* **8**, 1768.
- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2011) Gene expression profiling of plants under salt stress. *Crit Rev Plant Sci* **30**, 435–458.
- Jensen, H.L. (1942) Nitrogen fixation in leguminous plants II. Is symbiotic nitrogen fixation influenced by *Azotobacter*. *Pro Line Soc NSW* **57**, 205–212.
- Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A. (2008) A rapid and easy method for the detection of

- microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr Microbiol* **57**, 503–507.
- Khan, A., Hossain, M.T., Park, H.C., Yun, D.J., Shim, S.H. and Chung, Y.R. (2016) Development of root system architecture of *Arabidopsis thaliana* in response to colonization by *Martellella endophytica* YC6887 depends on auxin signaling. *Plant Soil* **405**, 81–96.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**, 301–307.
- Klughammer, C. and Schreiber, U. (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**, 261–268.
- Klughammer, C. and Schreiber, U. (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Appl Notes* **1**, 27–35.
- Li, X., Geng, X., Xie, R., Fu, L., Jiang, J., Gao, L. and Sun, J. (2016) The endophytic bacteria isolated from elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumacher) promote plant growth and enhance salt tolerance of hybrid Pennisetum. *Biotechnol Biofuels* **9**, 190.
- Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U. and Katz, A. (2004) Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol* **136**, 2806–2817.
- Mahmood, S., Daur, I., Al-Solaimani, S.G., Ahmad, S., Madkour, M.H., Yasir, M., Hirt, H., Ali, S. et al. (2016) Plant growth promoting Rhizobacteria and silicon synergistically enhance salinity tolerance of mung bean. *Front Plant Sci* **7**, 876.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E. and Flors, V. (2017) Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annu Rev Plant Biol* **68**, 485–512.
- Mesureur, J., Feliciano, J.R., Wagner, N., Gomes, M.C., Zhang, L., Blanco-Gonzalez, M., et al. (2017) Macrophages, but not neutrophils, are critical for proliferation of *Burkholderia cenocepacia* and ensuing host-damaging inflammation. *PLoS Pathog* **13**, e1006437.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. (2011) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ* **33**, 453–67.
- Miotto-Vilanova, L., Jacquard, C., Courteaux, B., Wortham, L., Michel, J., Clément, C., Barka, E.A. and Sanchez, L. (2016) *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial effect combined with a better resource mobilization. *Front Plant Sci* **7**, 1–15.
- Murthy, N. and Bleakley, B. (2012) Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *Int J Microbiol* **10**, 7.
- Nautiyal, C.S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **170**, 265–270.
- Panwar, M., Tewari, R. and Nayyar, H. (2016) Native halotolerant plant growth promoting rhizobacteria *Enterococcus* and *Pantoea* sp. improve seed yield of Mungbean (*Vigna radiata* L.) under soil salinity by reducing sodium uptake and stress injury. *Physiol Mol Biol Plant* **22**, 445–459.
- Patel, R.R., Patel, D.D., Thakor, P., Patel, B. and Thakkar, V.R. (2015) Alleviation of salt stress in germination of *Vigna radiata* L. by two halotolerant *Bacilli* sp. isolated from saline habitats of Gujarat. *Plant Growth Regul* **76**, 51.
- Príncipe, A., Alvarez, F., Castro, M.G., Zachi, L., Fischer, S.E., Mori, G.B. and Jofré, E. (2007) Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. *Curr Microbiol* **55**, 314–322.
- Radhakrishnan, R. and Baek, K.H. (2017) Physiological and biochemical perspectives of non-salt tolerant plants during bacterial interaction against soil salinity. *Plant Physiol Biochem* **116**, 116–126.
- Ren, S., Lyle, C., Jiang, G. and Penumaa, A. (2016) Soybean salt tolerance 1 (*GmST1*) reduces ROS production, enhances ABA sensitivity, and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **7**, 445.
- Sáenz-Mata, J., Palacio-Rodríguez, R., Sánchez-Galván, H. and Balagurusamy, N. (2016) Plant growth promoting Rhizobacteria associated to halophytes: potential Applications in agriculture. In Khan, M., Boër, B., Öztürk, M., Clüsener-Godt, M., Gul, B., Breckle, S.W. (eds) *Sabkha Ecosystems*. Tasks for Vegetation Science, vol 48. Springer, Cham.
- Saidi, Y., Finka, A. and Goloubinoff, P. (2011) Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytol* **190**, 556–565.
- Sapre, S., Gontia-Mishra, I. and Tiwari, S. (2018) *Klebsiella* sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). *Microbiol Res* **206**, 25–32.
- Schreiber, U. (1994) New emitter-detector-cuvette assembly for measuring modulated chlorophyll fluorescence of highly diluted suspensions in conjunction with the standard PAM fluorometer. *Z Naturforsch* **49c**, 646–656.
- Schwachtje, J., Karojet, S., Thormählen, I., Bernholz, C., Kunz, S., Brouwer, S., et al. (2011) A naturally associated rhizobacterium of *Arabidopsis thaliana* induces a starvation-like transcriptional response while promoting growth. *PLoS ONE* **6**, e29382.
- Schwyn, B. and Neilands, J. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47–56.
- Seo, P.J., Lee, A.K., Xiang, F. and Park, C.M. (2008) Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiol* **49**, 334–344.
- Sgroj, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M.F., Lagares, A. and Luna, V. (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress

- homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 371–381.
- Sharma, S., Kulkarni, J. and Jha, B. (2016) Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Front Microbiol* **7**, 1600.
- Shi, J., Fu, X.Z., Peng, T., Huang, X.S., Fan, Q.J. and Liu, J.H. (2010) Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus *in vitro* plants *via* modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiol* **30**, 914–922.
- Shukla, P.S., Agarwal, P.K. and Jha, B. (2012) Improved salinity tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. *J Plant Growth Regul* **31**, 195–206.
- Singh, R.P. and Jha, P.N. (2017) The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. *Front Microbiol* **8**, 1945.
- Singh, R.P., Jha, P. and Jha, P.N. (2015) The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. *J Plant Physiol* **184**, 57–67.
- Stepien, P. and Johnson, G.N. (2009) Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiol* **149**, 1154–1165.
- Stepien, P. and Klobus, G. (2006) Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biol Plant* **50**, 610–616.
- Su, F., Villaume, S., Rabenoelina, F., Crouzet, J., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N. and Dhondt-Cordelier, S. (2017) Different *Arabidopsis thaliana* photosynthetic and defense responses to hemibiotrophic pathogen induced by local or distal inoculation of *Burkholderia phytofirmans*. *Photosynth Res* **134**, 201–214.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtRbohD and AtRbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defence response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 517–522.
- Tuna, A.L., Kaya, C., Higgs, D., Murillo-Amador, B., Aydemir, S. and Girgin, A.R. (2008) Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. *Environ Exp Bot* **62**, 10–16.
- Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., Tuteja, N. and Choudhary, D.K. (2016) PGPR-mediated expression of salt tolerance gene in soybean through volatiles under sodium nitroprusside. *J Basic Microbiol* **56**, 1274–1288.
- Wang, Q., Dodd, I.C., Belimov, A.A. and Jiang, F. (2016) Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na⁺ accumulation. *Funct Plant Biol* **43**, 161–172.
- Yang, G., Rhodes, D. and Joly, R.J. (1996) Effect of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycinebetaine-containing maize lines. *Aust J Plant Physiol* **23**, 431–443.
- Yang, J., Kloepper, J.W. and Ryu, C.M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* **14**, 1–4.
- Zhu, M., Chen, G., Zhang, J., Zhang, Y., Xie, Q., Zhao, Z., *et al.* (2014) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor SINAC4 regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Rep* **33**, 1851–1863.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1. Experiment design.

Fig. S2. Phylogenetic tree showing the relationship of *Pseudomonas knackmussii* MLR6 with other phylogenetically closest members of *Pseudomonas* genus. The tree was obtained using the neighbour-joining method of the software package MEGA ver. 6.0 at the bootstrap value of ($n = 1000$).

Fig. S3. Phenotype of control and bacterized (MLR6) *Arabidopsis thaliana* under 0 and 0.2 mol l⁻¹ NaCl.

Fig. S4. Effect of salt stress (a), PEG₈₀₀₀ (b) and pH (c) on MLR6 growth.

Fig. S5. Effect of MLR6 and salt stress (0.2 mol l⁻¹ NaCl) on photosynthesis parameters 24 h after the second stress. The values presented are the means ± SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$) as determined by Tukey's test analysis. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (grey bars).

Fig. S6. Effect of MLR6 and salt stress (0.2 mol l⁻¹ NaCl) on photosynthesis parameters 24 h after the third stress. The values presented are the means ± SE of three independent repetitions. For each repetition, six plants were used per condition. Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$) as determined by Tukey's test analysis. Control plants (white bars), MLR6-treated plants (grey bars).

Table S1. List of specific primers for qRT-PCR.

Data S2. One-way ANOVA analysis and Tukey's HSD.

Supplementary material

Pseudomonas knackmussii* MLR6, a rhizospheric strain isolated from halophyte, enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana

Nour El Houda Rabhi^{1,2}, Allaoua Silini¹, Hafssa Cherif-Silini¹, Bilal Yahiaoui¹, Abdelmalek Lekired³, Mathilde Robineau², Qassim Esmaeel², Cédric Jacquard², Nathalie Vaillant-Gaveau², Christophe Clément², Essaïd Aït Barka^{2†} and Lisa Sanchez^{2†}

¹ Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas, Sétif-1, Algérie.

² Unité de Recherche EA 4707 Résistance Induite et Bioprotection des Plantes, SFR Condorcet FR CNRS 3417, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France.

³ Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives LMBA, Université de Tunis El Manar.

Corresponding author:

email : lisa.sanchez@univ-reims.fr

Phone number: +333 26 91 34 36

4 weeks-old *A. thaliana* Col-0



Soil bacterization (MLR6) with 10 mL of 10^7 CFU ml⁻¹

2 weeks (after bacterization)

1st NaCl stress in soil : 0.2 mol l⁻¹ NaCl

3 days

2nd NaCl stress in soil : 0.2 mol l⁻¹ NaCl

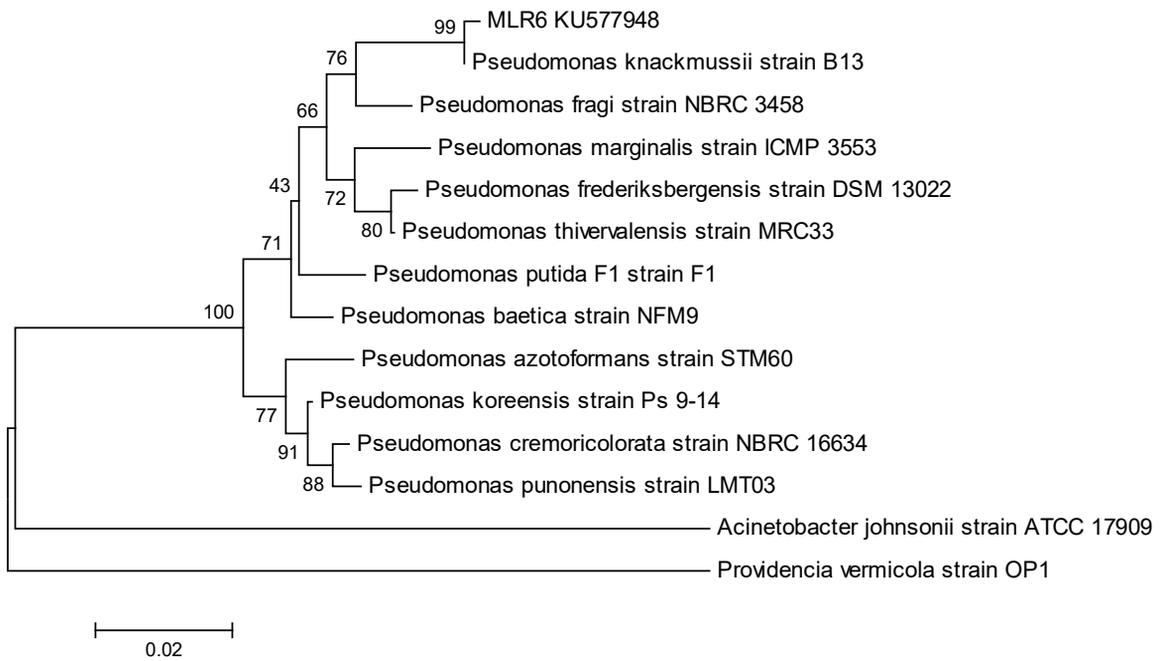
3 days

3rd NaCl stress in soil : 0.2 mol l⁻¹ NaCl

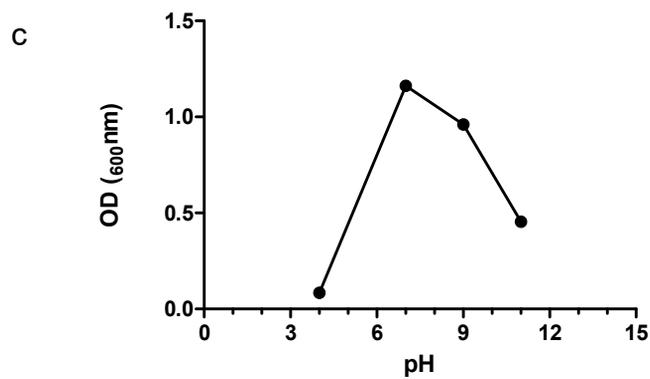
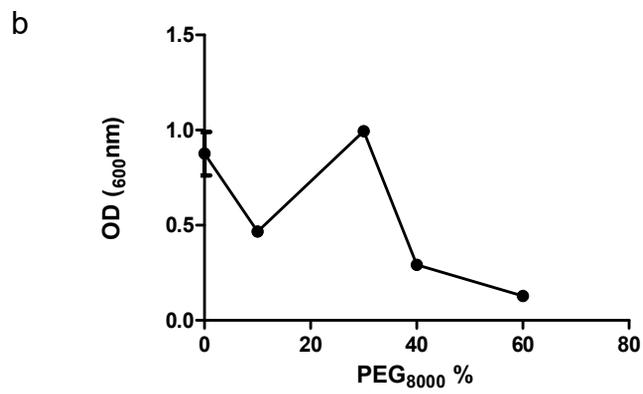
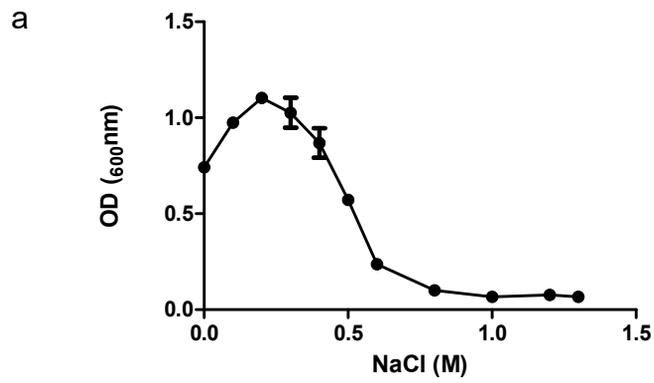
**Plant growth parameters
Chlorophyll content**

2 weeks after 3rd stress

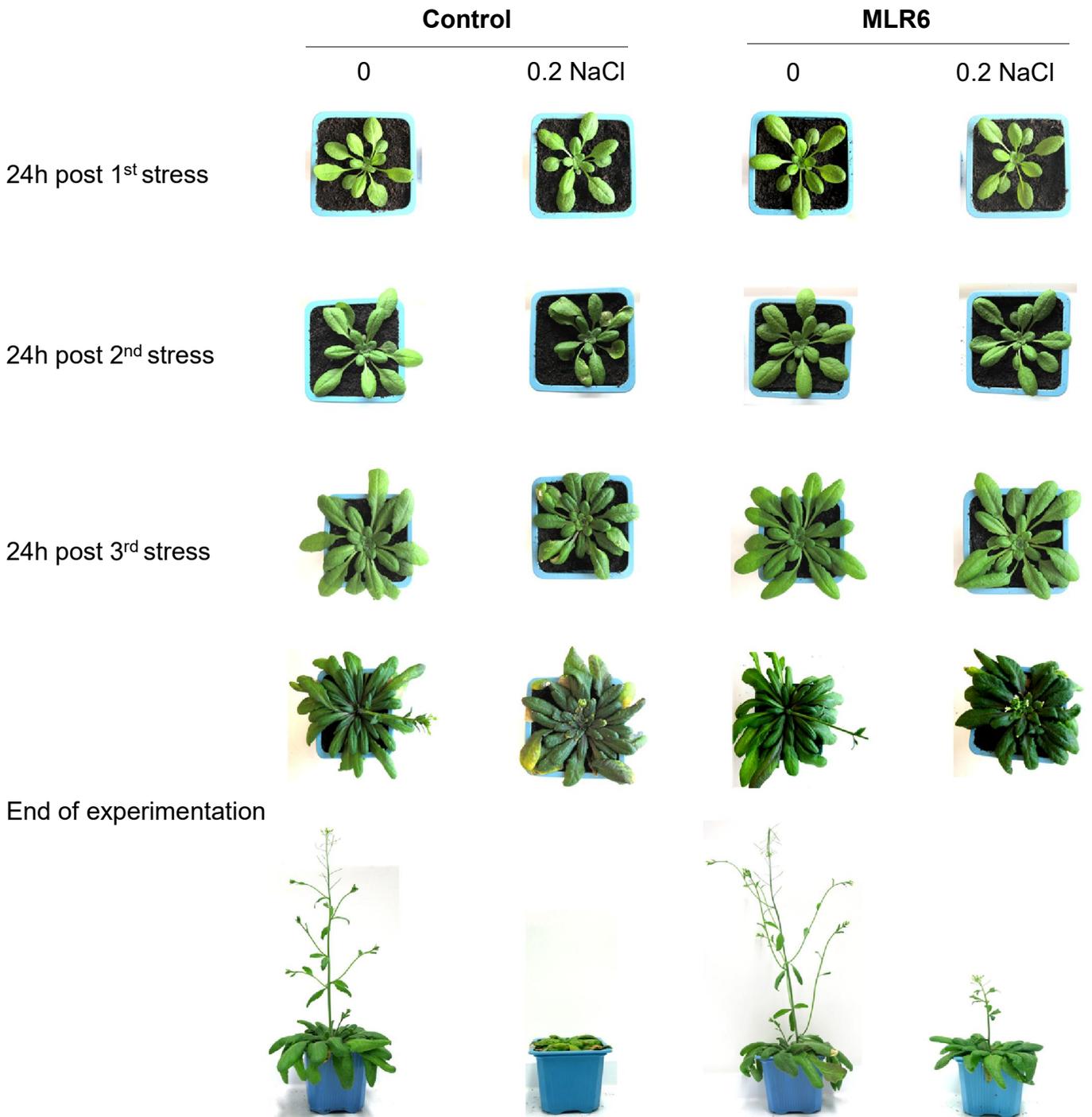
Supplemental figure S1: Experiment design



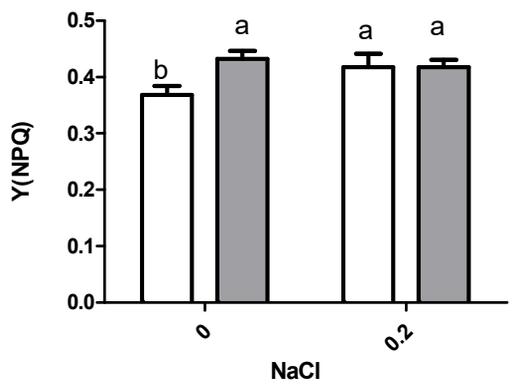
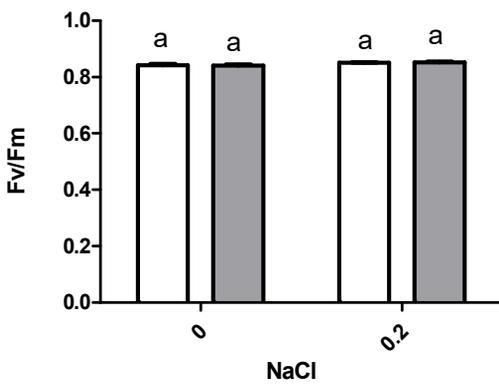
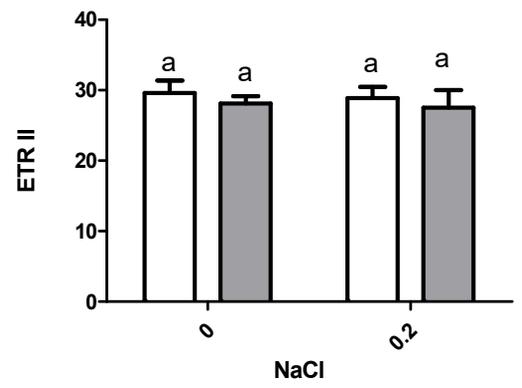
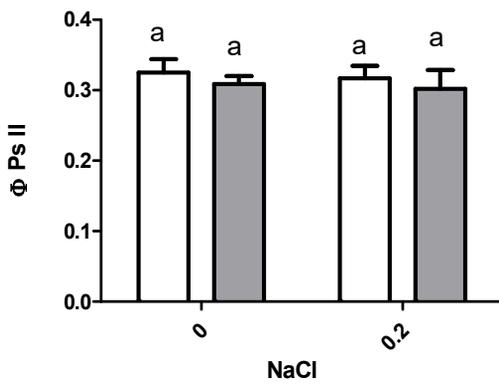
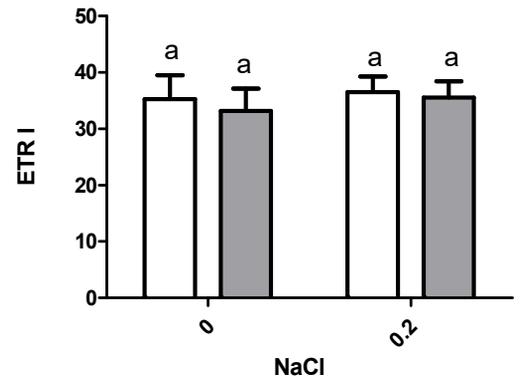
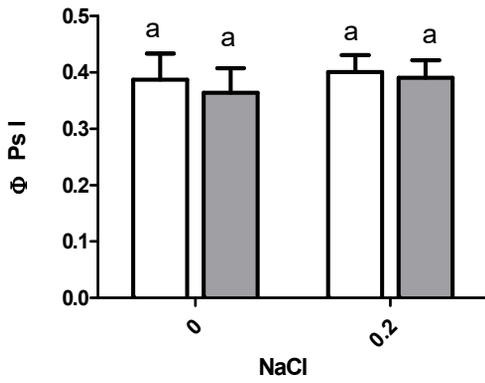
Supplemental figure S2: Phylogenetic tree showing the relationship of *Pseudomonas knackmussii* MLR6 with other phylogenetically closest members of *Pseudomonas* genus. The tree was obtained using neighbor joining method of software package Mega version 6.0 at the bootstrap value of (n= 1000).



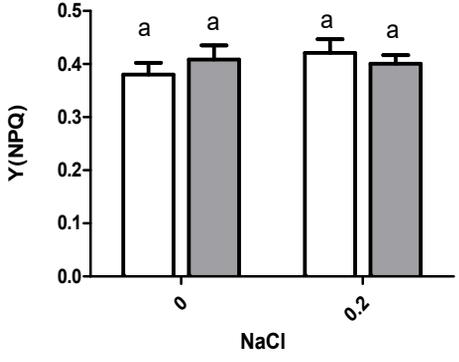
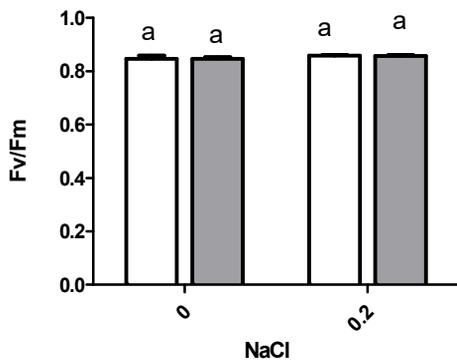
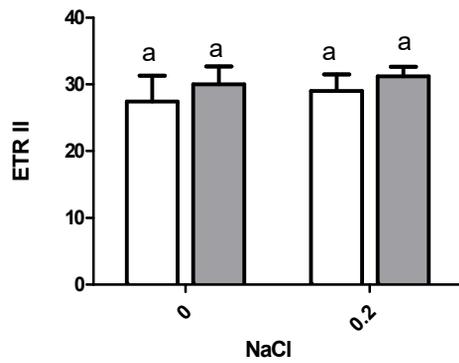
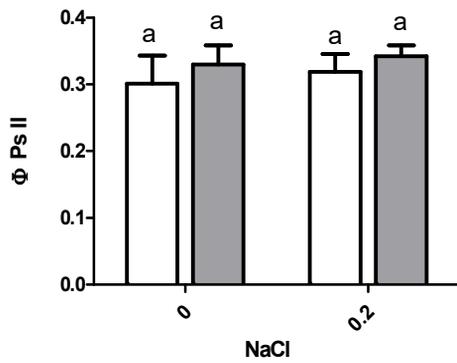
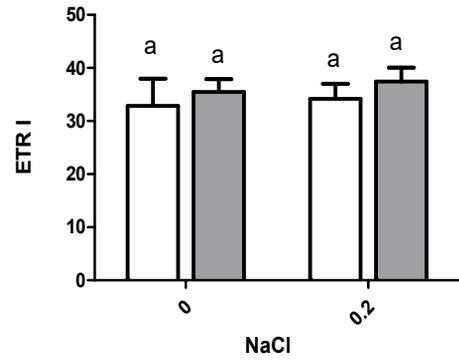
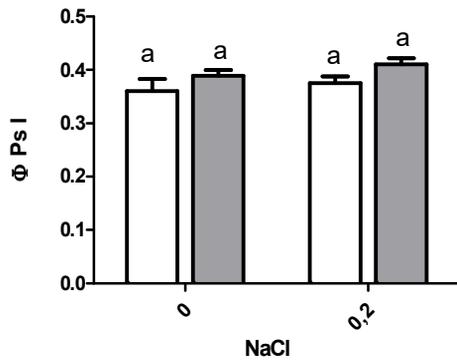
Supplemental figure S3: Effect of salt stress (a), PEG₈₀₀₀ (b) and pH (c) on MLR6 growth



Supplemental figure S4 : Phenotype of control and bacterized (MLR6) *Arabidopsis thaliana* under 0 and 0.2 M NaCl.



Supplemental figure S5: Effect of MLR6 and salt stress (0.2 M NaCl) on photosynthesis parameters 24h after the 2nd stress. The values presented are the means ± SE of three independent repetitions. For each repetition, 6 plants were used per condition. Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$) as determined by Tukey test analysis.



Supplemental figure S6: Effect of MLR6 and salt stress (0.2 M NaCl) on photosynthesis parameters 24h after the 3rd stress. The values presented are the means ± SE of three independent repetitions. For each repetition, 6 plants were used per condition. Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$) as determined by Tukey test analysis.

Supplemental table S1: List of specific primers for qRT-PCR

Primers	Sequence (5'-3')
AtHKT1 for	CTCTGGTCTCATCTGGCTCC
AtHKT1 rev	CCTAGCACCGTCACTCCAAG
AtNHX1 for	GGGAACATCGATCGCAGTGA
AtNHX1 rev	TGATTGCATTCCCGCGTACA
AtSOS1 for	TCATCTCCCGCCGCATTATC
AtSOS1 rev	CTTGAGCTACGTGGTGGTGT
AtSOS2 for	GCCCCTGATGATGAATGCCT
AtSOS2 rev	CCCTCGAGCCTTGTCTTGAA
AtSOS3 for	AGGTGTCTTCCATCCAAGCG
AtSOS3 rev	TTTCCGTCGTTTTTGCGGTC
AtPR1 for	AACTACGCTGCGAACACGTG
AtPR1 rev	TCACTTTGGCACATCCGAGTC
AtSAG13 for	GCGTGTTGGAGAAGCAAATG
AtSAG13 rev	CGTCAACGCAAATGGTCTGA
AtUBQ5 for	GGAAGAAGAAGACTTACACC
AtUBQ5 rev	AGTCCACACTTACCACAGTA
AtActin for	CCCAGGAATTGCTGACCGTA
AtActin rev	TTTTCTCTCTGGCGGTGCA