

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2021

THÈSE

Présentée par

SAIDI Samira

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité : MICROBIOLOGIE

THÈME

**Amélioration de la symbiose *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa* après co-inoculation par des Actinobacteria.
Effets bénéfiques sur les paramètres de croissance sous stress
salin**

Soutenue publiquement le/...../ 2021

DEVANT LE JURY

Président
Directeur
Examineurs

ROUAG Nouredine
CHERIF Hafsa
BENHIZIA Yacine
BOUDEMAGH Allaoueddine
HAMIDECHI M^d Abdelhafid
SILINI Allaoua

Pr UFA Sétif 1
MCA UFA Sétif 1
Pr UM Constantine 1
Pr UM Constantine 1
Pr UM Constantine 1
MCA UFA Sétif 1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

DEDICACES

A mes très chers parents

A mon mari

A mes enfants

REMERCIEMENTS

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à ma directrice de thèse **Madame Hafsa CHERIF SILINI**. Je lui suis redevable pour l'aide et les conseils qu'elle m'a prodigués et les qualités pédagogiques et scientifiques dont elle a fait preuve à mon égard tout le long de ce travail. Un grand merci pour sa patience, sa disponibilité, sa compréhension et ses intérêts portés à ce sujet de recherche.*

*Mes plus vifs remerciements vont à **Monsieur ROUAG Noureddine**, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches administratives, d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération.*

*Je tiens à remercier également **Monsieur Mohamed Abdelhafid HAMIDECHI**, d'avoir accepté de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Que **Monsieur Yacine BENHIZIA** trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour juger ce travail.*

*Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude et mes vifs remerciements à **Monsieur Allaoueddine BOUDEMAGH** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à remercier également **Monsieur Allaoua SILINI** pour sa disponibilité et l'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de ce jury. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Ma profonde reconnaissance à **mon mari et mes enfants** pour leur soutien sans faille, leur grande indulgence, leur compréhension et surtout leur contribution dans le partage de stress de la recherche. Je les remercie pour leur patience et leurs sacrifices.*

Production scientifique

Publications :

Saidi, S., H. Cherif-Silini, A. C. Bouket, A. Silini, M. Eshelli, L. Luptakova, F. N. Alenezi et L. Belbahri (2021). Improvement of *Medicago sativa* Crops Productivity by the Co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*–Actinobacteria Under Salt Stress. *Current Microbiology*, **78**:1344-1357. doi.org/10.1007/s00284-021-02394-z.

Daba¹, H. et **S. Saidi**¹ (2015). Detection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from milk in various farms in north-east Algeria by a new procedure. *Agronomy Research*, **13**(4): 907–918.

Communications internationales :

Saidi, S. et M. Ghoul (2013). Isolement de bactéricines produites par des bactéries lactiques par la méthode d'adsorption-désorption. 1^{er} Congrès de biotechnologie & valorisation des bio-ressources (BVBR). Tabarka, Tunisie. 05- 07 Mars.

Daba, H. et **S. Saidi** (2015). Detection of bactericin producing lactic acid bacteria from milk in various farms in north-east Algeria by a new procedure. 6th international conference “Biosystems Engineering”. Tartu, Estonia. 07-08 Mai.

ملخص

تعتبر البقوليات من الأطعمة المغذية للإنسان وتوفر العناصر الغذائية الأساسية للنظم البيئية، وهي جزء أساسي للزراعة المستدامة. يمكن للبقوليات استعادة صحة التربة من خلال قدرتها على تثبيت النيتروجين في تفاعل تكافلي مع الريزوبيا. لكن يحد الإجهاد المالح بشدة من الإنتاجية والقدرة على تثبيت النيتروجين عند هذه النباتات. ومن أجل تحسين استجابة البقوليات للتلقيح بـ *Rhizobium*، فإن التلقيح المشترك مع PGPR (البكتيريا المعززة للنمو) أخرى، هي استراتيجية فعالة وتأزرية لإنتاجية أفضل مقارنة بالتلقيح البسيط.

في هذه الدراسة تم استخدام *Actinobacteria* المعزولة من بيئات مختلفة وذات أنشطة PGP في تجارب التلقيح المشترك مع *Rhizobium* في محيط النبات *Medicago sativa* تحت تأثير إجهاد الملح. وكان التلقيح المشترك باستخدام سلالات (*Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) و *meliloti* 2011(R2).S كل واحدة من سلالات *Actinobacteria* المحددة (ذات الصلة بـ (*Arthrobacter* sp (MS1, MS2) و (*Nocardiopsis* (Ag1)) القادرة على تحمل الجفاف والملوحة وذات خصائص PGP متنوعة. بينت النتائج تحسن في كمية العقد الجذرية عند *Medicago sativa* وزيادة ملحوظة في خصائص النمو وكميات أصباغ التركيب الضوئي عند النبات المضيف. كما أن التلقيح المشترك يوفر استجابة أفضل للإجهاد المالح من خلال تحسين استراتيجيات التكيف ولذلك يمكن أن تكون *Actinobacteria* المكتشفة في هذه الدراسة أسمدة حيوية مناسبة في تركيب المنتجات الزراعية التي تحسن تنمية وصحة وإنتاجية النباتات في التربة المالحة، وهي بديل ضروري للزراعة الحديثة والتنمية المستدامة.

الكلمات المفتاحية: تكافل، تلقيح مشترك، *Rhizobium*، PGPR، *Medicago sativa*، *Actinobacteria*

Résumé

Les légumineuses, considérées comme des aliments très nutritifs pour les humains et fournissant des nutriments essentiels aux écosystèmes, sont un élément fondamental de l'agriculture durable. Ils peuvent restaurer la santé du sol par leur capacité à fixer l'azote dans une interaction symbiotique avec les Rhizobia du sol. Cependant, le stress salin limite sévèrement la productivité et la capacité de fixation de l'azote chez les légumineuses. Afin, d'améliorer la réponse des légumineuses à l'inoculation de *Rhizobium*, la co-inoculation avec d'autres PGPR est une stratégie efficace et synergique pour une meilleure productivité par rapport à une simple inoculation. Dans cette étude, des Actinobacteria isolées de différentes niches et ayant des activités PGP ont été utilisées dans des expériences de co-inoculation avec des Rhizobia dans la rhizosphère de plantes *Medicago sativa* soumises à un stress salin. La co-inoculation a été suivie par l'utilisation des souches de *Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) et *S. meliloti* 2011(R2) avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées (apparentées à *Arthrobacter* sp (MS1, MS2) et *Nocardiopsis* (Ag1)) tolérantes à la sécheresse et à la salinité et ayant de multiples caractères PGP. Les résultats montrent une meilleure nodulation sur les racines de *Medicago sativa* et une augmentation significative des paramètres de croissance et des teneurs en pigments chlorophylliens de la plante hôte. La co-inoculation a permis également d'avoir une meilleure réponse au stress salin en améliorant les stratégies d'adaptation. Les actinobactéries découvertes dans cette étude peuvent donc être des biofertilisants appropriés dans la formulation de produits agricoles améliorant le développement, la santé et la productivité des plantes dans les sols salins, une alternative nécessaire à l'agriculture moderne et au développement durable.

Mots-clé: *Rhizobium*, symbiose, Actinobacteria, co- inoculation, salinité, PGPR, *Medicago sativa*.

Abstract

Legumes, considered very nutritious foods for people and providing essential nutrients for ecosystems are a fundamental element of sustainable agriculture. They can restore soil health by their ability to fix nitrogen in a symbiotic interaction with the Rhizobia of the soil. However, salt stress is severely limiting productivity and nitrogen fixation ability in legumes. In order to improve the response of legumes to inoculation of *Rhizobium*, co-inoculation with other PGPR is an effective and synergistic strategy for better productivity compared to a simple inoculation.

In this study, Actinobacteria isolated from different niches and having PGP activities were used in co-inoculation experiments with Rhizobia in *Medicago sativa* plants rhizosphere submitted to salt stress. Co-inoculation was followed by the use of *Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) and *S. meliloti* 2011(R2) strains with each of the selected Actinobacteria strains (related to *Arthrobacter* sp (MS1, MS2) and *Nocardiopsis* (Ag1)) tolerant to drought and salinity and having multiple PGP characteristics.

The results show better nodulation on *Medicago sativa* roots and a significant increase in growth parameters and the chlorophyll pigment content of the host plant. Co-inoculation also allowed for a better response to saline stress improving coping strategies. Actinobacteria discovered in this study can, therefore, be suitable biofertilizers in the formulation of agricultural products improving plant development, health and productivity in saline soils, a necessary alternative for modern agriculture and sustainable development.

Key words: *Rhizobium*, symbiosis, Actinobacteria, co- inoculation, salinity, PGPR, *Medicago sativa*.

Liste des principales abréviations

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

C_E: Conductivité électrique

EDTA: Acide éthylène diamine tétra-acétique

FN : Facteur Nod

PCR: Polymerase Chain Reaction

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

ROS: Reactive Oxygen Species

TE: Tris-EDTA

Liste des figures

Fig. 1 :	<i>Medicago sativa</i>.....	6
Fig.2 :	Signalisation de la symbiose et immunité des plantes impliquées dans la spécificité de reconnaissance dans les interactions légumineuses-rhizobiennes.....	12
Fig 3:	Morphologies nodulaires à travers les légumineuses.....	17
Fig. 4 :	Différentes stratégies améliorant la symbiose légumineuse-<i>Rhizobium</i>	23
Fig.5 :	Mécanismes directs et indirects médiés par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR).....	29
Fig.6 :	Modalités de l'atténuation du stress osmotique par les PGPR.....	32
Fig. 7 :	Aspect des colonies sur milieu YEMA.....	46
Fig. 8 :	Observation microscopique de bacilles courts à Gram négatif (Gx100)...	46
Fig. 9 :	Aspect des colonies sur milieu YEMA+ RC.....	47
Fig. 10 :	Aspect des colonies sur milieu YEMA+ BBT (acidification).....	47
Fig. 11 :	Aspect des colonies sur milieu yeast-lactose-agar.....	48
Fig. 12 :	Activités PGP des souches <i>Rhizobium</i>.....	49
Fig. 13 :	Effet de l'inoculation par <i>Rhizobium</i> sur la croissance végétale de la Luzerne.	50
Fig. 14:	Effet de l'inoculation par les souches de <i>Rhizobium</i> sur les paramètres morphologiques de croissance végétale.....	51
Fig. 15 :	Effet de l'inoculation par les souches de <i>Rhizobium</i> sur le contenu foliaire en chlorophylles a, b, totale et caroténoïdes (mg /g MF) de Luzerne.....	53
Fig. 16:	Localisation géographique de la Sebkhah Melghir.....	60
Fig. 17:	Sebkhah Melghir.....	61
Fig. 18:	Localisation géographique de la station de Guerbes-Senhadja.....	61
Fig. 19 :	Station de Guerbes-Senhadja.....	62
Fig.20 :	Examen microscopique (partie supérieure) et morphologie des colonies (partie inférieure) des souches actinobactériennes MS1, MS2, Ag1, MS3 et MS4.....	73

Fig. 21 :	Activité chitinolytique : Halo autour des colonies productrices de chitinase.....	74
Fig.22 :	Activité cellulosique : Halo autour des colonies productrices de cellulase.....	74
Fig. 23 (A) :	Activités PGP et tolérance au stress des souches rhizobiennes et actinobactériennes utilisées dans l'étude.....	77
Fig. 23 (B) :	Activités PGP des souches actinobactériennes.....	79
Fig. 24 :	Arbre phylogénétique des souches actinobactériennes (Ag1, MS1, MS2, MS3 et MS4).....	80
Fig. 25 :	Aspect des nodules de <i>Medicago sativa</i> inoculés ou co-inoculés.....	81
Fig. 26 (A, B) :	Effets de la co-inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques de <i>Medicago sativa</i> avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl.....	82
Fig.26 (C, D) :	Effets de la co-inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques de <i>Medicago sativa</i> avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl.....	83
Fig. 26 (E, F) :	Effets de la co-inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques de <i>Medicago sativa</i> avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl.....	84
Fig. 27 (A, B):	Effets de la co-inoculation bactérienne sur le contenu foliaire en chlorophylles a, b (mg /g de matière fraîche) de <i>Medicago sativa</i> avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl.....	86
Fig. 27 (C, D):	Effets de la co-inoculation bactérienne sur le contenu foliaire en chlorophylles a+b et caroténoïdes (mg /g de matière fraîche) de <i>Medicago sativa</i> avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl.....	87
Fig.28 (A, B) :	Effets de la co-inoculation bactérienne sur le contenu foliaire en acides aminés et proline (µg/g de matière fraîche) de <i>Medicago sativa</i> avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl.....	88

Liste des Tableaux

Tab. 1:	Taxonomie des Rhizobia	9
Tab. 2:	Inoculation rhizobienne en association avec des rhizobactéries ou des champignons mycorhiziens arbusculaires afin d'améliorer la nodulation et la biomasse des légumineuses.....	24
Tab. 3:	Origine de l'isolement des souches bactériennes utilisées.....	63
Tab.4 :	Différents traitements utilisés dans l'expérience.....	70
Tab. 5:	Différents traitements utilisés dans l'expérience sous stress salin.....	71
Tab.6:	Caractérisation biochimique des souches actinobactériennes et rhizobiennes utilisées dans l'étude.....	75
Tab.7:	Caractérisation biochimique des souches actinobactériennes et rhizobiennes utilisées dans l'étude (suite).....	76

Table de matières

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
Production scientifique	III
ملخص	IV
Résumé	VI
Abstract	VI
Liste des principales abréviations	VII
Liste des figures	VIII
Liste des Tableaux	X
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I- Symbiose <i>Rhizobium</i>-légumineuses	4
1- Les légumineuses	4
1-1- La luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	5
1-1-1- Caractères généraux	5
1-1-2- Importance de la luzerne	6
2- Les Rhizobia	7
2-1-Définition	7
2-2- Classification des Rhizobia	7
2-3-Caractéristiques des Rhizobia	10
2-3-1- Caractères morphologiques	10
2-3-2- Caractères biochimiques	10
2-3-3- Caractères physiologiques	10
2-3-4- Caractères cultureux	11
2-3-5-Caractères génétiques	11
2-4-Processus de nodulation	11
2-4-1-Echange de signal	13
2-4-1-1-Flavonoïdes	13
2-4-1-2-Facteurs Nod	13
2-4-2-Infection	14

2-4-3-Organogenèse nodulaire	15
2-4-4-Maturation des bactéroïdes	15
2-4-5- Morphologie des nodules	15
2-5-Génétique de la nodulation.....	17
2-5-1-Gènes de nodulation des Rhizobia (Gènes <i>nod</i>).....	17
2-5-1-1- Gènes <i>nod</i> communs	17
2-5-1-2- Gènes <i>nod</i> spécifiques	18
2-5-1-3- Gènes <i>nodD</i>	18
2-5-2-Gènes <i>nif</i> et <i>fix</i>	18
2-6-Biochimie de la nodulation	19
2-6-1-Nitrogénase	19
2-6-2-La léghémoglobine.....	19
II- Facteurs influençant la fixation symbiotique	19
1- Salinité.....	20
2- Sécheresse	20
3- Température.....	20
4- pH	21
5- Autres facteurs	21
III-Interaction synergique des Rhizobia avec des micro-organismes	
bénéfiques	21
1-Azospirillum.....	25
2-Azotobacter	25
3- Bacillus	25
4 Pseudomonas	25
5-Champignons mycorhiziens arbusculaires.....	26
6- Actinobacteria	26
6-1- Caractéristiques générales des Actinobacteria	27
IV- Caractéristiques PGP des Actinobacteria et des Rhizobia	28
1- Biofertilisation	29
1- 1- Fixation d'azote.....	29
1-2 -Solubilisation du Phosphate	30
1-3 -Solubilisation du potassium	31
2 -Phyostimulation	32

2-1- Production d'hormones de croissance	32
2-1-1-Acide indole acétique (AIA)	33
2-1-2-Cytokinines	33
2-1-3-Gibbérellines	34
2-1-4- Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase.....	34
3 - Biocontrôle	35
3-1- Compétition pour l'espace et les nutriments	35
3-2- Antibiose	36
3-3-Production d'enzymes.....	36
3-4- Compétition pour le fer et la production de sidérophores	37
3-5- Composés volatiles	38
3-6 - Résistance Systémique Induite (RSI)	39
PARTIE PRATIQUE.....	41
A- Isolement et caractérisation des Rhizobia	41
I- Matériel et Méthodes.....	41
1- Collection des isolats bactériens	41
2- Isolement des bactéries à partir des nodules	41
2-1- Stérilisation des nodules	41
2-2-Isolement.....	42
3- Caractérisation morpho-biochimique des isolats	42
3-1- Caractères morphologiques	42
3-2- Test au rouge Congo.....	42
3-3-Test au bleu de bromothymol.....	42
3-4- Test au 3-Cétolactose (Recherche de l'enzyme 3-cétoglucosidase)	42
3-5-Test au bleu de Méthylène et au violet de Gentiane	43
4- Activités PGP des souches <i>Rhizobium</i>	43
4-1- Solubilisation du phosphate sur un milieu liquide	43
4-2 Production d'Acide Indole Acétique (AIA)	43
4-3- Production de sidérophores	44
5- Inoculations bactériennes, croissance végétale et test de nodulation	44
5-1- Germination aseptique des graines	44
5-2- Culture et inoculation des plantules	44
6- Analyse des paramètres morpho- biochimiques des plantes	45
6-1-Paramètres morphologiques	45

6-2-Paramètres biochimiques	45
7- Analyses statistiques	45
II- Résultats	46
1- Caractérisation morpho-biochimique des isolats	46
1-1- Caractérisation des isolats.....	46
1-2- Caractérisation morphologique et culturale	46
1-3-Test au rouge Congo	47
1-4-Test au bleu de Bromothymol.....	47
1-5-Test du bleu de Méthylène et du violet de Gentiane	48
1-6-Test du 3-Cétolactose.....	48
2- Activités PGP des souches <i>Rhizobium</i> isolées.....	48
3-Test de nodulation (Authentification des isolats)	49
4 - Paramètres morphologiques de croissance	50
5- Paramètres biochimiques	52
III-Discussion.....	54
B: Amélioration de la productivité des cultures de <i>Medicago sativa</i> par la co-inoculation de <i>Sinorhizobium meliloti</i>– Actinobactéria sous stress salin.....	59
I-Isolement et caractérisation des PGPR	59
1- Provenance des souches.....	59
1-1- Les souches de <i>Rhizobia</i>	59
1-2- Les souches d'Actinobacteria.....	60
1-3- Isolement et culture des Actinobacteria.....	62
2- Caractérisation biochimique des souches d'Actinobacteria et de <i>Rhizobia</i>	63
2-1-Sources de carbone.....	63
2-2- Activités enzymatiques.....	64
2-2-1- Production de protéase	64
2-2-2- Production d'amylase.....	64
2-2-3- Production de chitinase	64
2-2-4 - Production de cellulase.....	64
2-2-5- Production de gélatinase	64
3- Étude de la tolérance au stress	65
3-1-Effet de la salinité	65

3-2-Effet du pH.....	65
3-3-Effet de l'activité d'eau (a _w).....	65
3-4-Effet de la température d'incubation	65
4-Mesure des activités PGP des souches d'Actinobacteria	65
4-1- Fixation d'azote	65
4-2- Production d'ammoniac (NH ₃).....	66
4-3- Production d'acide cyanhydrique (HCN)	66
4-4- Solubilisation des phosphates	66
4-5- Production de sidérophores	66
4-6- Production d'Acide Indole Acétique (AIA).....	66
5-Identification moléculaire des isolats d'Actinobacteria	66
5-1-Extraction de l'ADN génomique	67
5-2- Dosage de l'ADN.....	67
5-3- Amplification par PCR	67
5-4- Electrophorèse sur gel d'agarose	68
5-5- Séquençage	68
5-6- Analyse phylogénétique.....	69
II-Effets de la co-inoculation <i>Rhizobium</i>- Actinobacteria sur la	
nodulation de <i>Medicago sativa</i> L.....	69
1-Matériel végétal	69
2-Préparation des inocula bactériens	69
3-Inoculation bactérienne et conditions de croissance	69
4-Effets de la co-inoculation bactérienne sur la croissance de <i>Medicago sativa</i> sous	
stress salin	70
5- Inoculation bactérienne et condition de croissance	71
6-Mesure des paramètres morphologiques	71
7-Dosage des pigments photosynthétiques	71
8-Dosage des acides aminés solubles et de la proline	72
9-Analyse statistique.....	72
III-Résultats	73
1-Caractérisation des isolats	73
1-1- Caractérisation morphologique et culturelle	73
1-2- Caractérisation biochimique.....	73
1-3- Caractérisation physiologique	76

2-Activités PGP des Actinobacteria	78
2-1- Fixation d'azote.....	78
2-2-Production d'ammoniac (NH₃)	78
2-3- Production d'acide cyanidrique (HCN).....	78
2-4-Production des sidérophores.....	78
2-5-Solubilisation des phosphates	78
2-6- Production d'AIA	78
3-Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries	79
4-Mesure des paramètres morphologiques	81
5- Mesure des paramètres biochimiques	85
IV-Discussion	89
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	96
ANNEXES.....

INTRODUCTION

L'azote est un élément présent en grande quantité chez les êtres vivants. Dans les sols, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles, ce qui constitue souvent un des principaux facteurs limitant la croissance des végétaux. L'azote est cependant très abondant dans l'atmosphère qui contient 78% de diazote, mais les seuls organismes capables de l'utiliser sont les bactéries diazotrophes qui possèdent le complexe enzymatique nitrogénase capable de réduire le diazote moléculaire en ammonium. Cet azote fixé est acquis par les plantes par le biais d'une interaction symbiotique avec les bactéries du sol.

Les légumineuses sont un groupe de végétaux impliqué dans une relation symbiotique avec des bactéries du sol, communément appelées Rhizobia. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et le transfèrent à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie (Giraud *et al.*, 2007).

Les légumineuses sont un élément clé de l'agriculture durable et peuvent offrir de nombreux avantages économiques et environnementaux. Elles représentent en effet des aliments très nutritifs pour l'homme et l'animal et des nutriments essentiels aux écosystèmes (Prospero *et al.*, 2013). L'intégration des légumineuses dans des techniques agricoles telles que les cultures intercalaires, les cultures de couverture et la rotation des cultures peut contribuer à restaurer la santé des sols en raison de leur capacité à fixer l'azote et à pousser sur des sols pauvres en azote. Elles peuvent être utilisées efficacement pour améliorer la fertilité des sols salins et contribuer à la réintroduction de l'agriculture sur ces terres (Fernandez *et al.*, 2017). La fertilisation chimique à l'azote est extrêmement coûteuse et génère des risques écologiques tels que l'eutrophisation de l'eau et l'émission de gaz à effet de serre qui contribuent au réchauffement planétaire. La fixation biologique de l'azote est une alternative écologique sans danger (Clúa *et al.*, 2018).

Toutefois, on assiste souvent à une nodulation inefficace chez les légumineuses en raison de la concurrence de souches rhizobiennes avec la population rhizosphérique et /ou les facteurs environnementaux stressants. Les conditions défavorables dues à des stress biotiques et abiotiques sont les principaux facteurs limitant la production agricole et la productivité. La salinité est un facteur majeur affectant la fertilité des sols et limitant la

croissance et la survie des plantes dans diverses régions du monde particulièrement dans les zones arides et semi-arides (Wang *et al.*, 2019).

Chez les légumineuses, le stress salin impose une limitation importante de la productivité liée aux effets néfastes sur la croissance de la plante hôte et de la capacité de fixation de l'azote. La salinité affecte le processus d'infection en inhibant la croissance des poils absorbants, en diminuant le nombre de nodules par plante et la quantité d'azote fixée par unité de poids des nodules. Ainsi, dans les sols salins, le rendement des légumineuses est réduit en raison du manque de symbiose réussie. L'excès de sel dans le sol nuit à la survie, à la croissance, à la nodulation, à la fixation de l'azote et à la symbiose légumineuse-*Rhizobium* (Mathew *et al.*, 2020). En d'autres termes, ce processus dépend de l'efficacité et de la compétitivité de la souche rhizobienne pour la nodulation.

Les plantes font souvent face aux fluctuations rapides et l'adversité des conditions environnementales grâce à leurs capacités métaboliques intrinsèques (Simontacchi *et al.*, 2013). De nombreuses fois, les plantes ont la possibilité de réduire l'impact des stress environnementaux grâce au microbiome qu'elles abritent (Prospero *et al.*, 2013 ; Slama *et al.*, 2019b). Son interaction avec les plantes évoque divers types de réponses locales et systémiques qui améliorent la capacité métabolique des plantes à lutter contre les stress abiotiques (Prospero *et al.*, 2013 ; Mefteh *et al.*, 2018 ; Slama *et al.*, 2019a).

L'exploitation des Rhizobia en combinaison avec des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) constitue une alternative intéressante pour améliorer leur performance et leur association avec des plantes cultivées dans des conditions normales et stressantes. De plus, elle a été considérée comme un moyen prometteur d'optimiser la croissance des plantes via la gestion des interactions entre PGPR, les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) et la symbiose *Rhizobium*-légumineuse.

Les Actinobacteria sont largement présentes dans la rhizosphère des plantes et produisent divers composés agroactifs. Au cours des dernières années, ce groupe de bactéries, en raison de son potentiel antimicrobien élevé et de sa nature saprophyte dominante dans le sol, a attiré beaucoup d'attention en tant que facteurs de croissance des plantes (Frikha *et al.*, 2017). Les Actinobacteria ont longtemps été considérées simplement, comme des habitants du sol vivant librement, mais récemment, l'importance de leurs interactions complexes avec les plantes et d'autres organismes est en train d'être découverte (El-Tarabily *et al.*, 2020). Des comparaisons des profils bactériens totaux dans le sol avec ceux spécifiques aux Actinobacteria indiquent leur abondance dans la rhizosphère des légumineuses. Des études ultérieures ont montré les effets bénéfiques de ces bactéries sur

la croissance des légumineuses et ont suscité l'intérêt pour leur utilisation potentielle en tant que co inoculants avec les Rhizobia lors de l'établissement de cultures de légumineuses. Les Actinobacteria ont des effets bénéfiques sur la nodulation et la croissance des légumineuses (Liu *et al.*, 2019).

Pour concevoir une stratégie permettant de répondre à cet objectif et vérifier ces acquis, l'étude consiste dans une première partie à isoler et caractériser des souches rhizobiennes à partir des nodules de *Medicago sativa* cultivant sur divers sites arides et semi arides, puis d'évaluer leur performance et leur efficacité dans le processus de nodulation et l'amélioration de la croissance végétale.

Outre la préoccupation de réussir la colonisation et la nodulation, on préconise dans une deuxième partie la co-inoculation de la rhizosphère de la plante *Medicago sativa* par les souches de *Sinorhizobium meliloti* et des Actinobacteria symbiotiques et non symbiotiques et ayant des activités PGP. Cet effet est exprimé par l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote notamment la formation de nodules et les variations morphologiques et biochimiques de la plante hôte en présence et en absence de stress salin.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Symbiose *Rhizobium*-légumineuses

La symbiose rhizobienne est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du genre *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires (Nelson et Sadowsky, 2015 ; Clua *et al.*, 2018).

La relation symbiotique entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote est essentielle pour l'agriculture, car elle peut avoir de profondes répercussions sur la durabilité de la terre, la qualité des sols, la réduction des émissions de gaz à effet de serre et la réduction des coûts pour les agriculteurs. L'importance majeure des symbioses est généralement attribuée à la diminution de l'utilisation d'engrais coûteux à base d'azote, il convient également de souligner la réhabilitation des sols stériles soumis à des contraintes environnementales. Compte tenu de la demande mondiale croissante en matière de production alimentaire et de la nécessité de réduire les émissions de carbone, il est prévu le recours à la fixation biologique de l'azote comme solution de remplacement des engrais azotés (Black *et al.*, 2012 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2015). La plus grande exploitation de la fixation biologique de l'azote peut réduire l'utilisation de combustibles fossiles et peut être utile pour le reboisement et la restauration des terres mal exploitées afin qu'elles redeviennent productives (Reeve *et al.*, 2010).

1- Les légumineuses

Les légumineuses (Fabaceae) constituent la troisième plus grande famille d'Angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidaceae et les Asteraceae) avec environ 750 genres et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.* 2006 ; Laamari *et al.*, 2016). Elles sont groupées en trois sous familles : les Mimosoideae, les Caesalpinoideae et les Papillioideae (Guignard et Dupont, 2005).

Cette famille présente une importance économique majeure ; de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo). Les légumineuses sont cultivées à travers le monde dans presque tous les pays. La culture des légumineuses occupe une place primordiale au niveau des agrosystèmes vu leurs intérêts agronomiques, économiques et nutritionnels. La

présence de légumineuses dans les systèmes de production agricoles concourt à l'augmentation de la diversité fonctionnelle des agroécosystèmes. Elles contribuent, ainsi à plusieurs titres, à l'équilibre des systèmes agroécologiques (Farissi *et al.*, 2014 ; Sobti *et al.*, 2015).

Outre leur rôle dans le cycle de l'azote, la production de légumineuses interagit avec d'autres cycles biogéochimiques. En effet, cette symbiose fournit l'azote nécessaire pour la croissance et le développement des plantes et permet, à la fois d'enrichir le sol en matière organique et d'épargner les engrais azotés par l'exploitation d'un processus naturel (Farissi *et al.*, 2014 ; Sobti *et al.*, 2015).

1-1- La luzerne (*Medicago sativa*)

1-1-1- Caractères généraux

La luzerne ou Alfalfa (*Medicago sativa* L.) est une espèce cosmopolite pérenne originaire du bassin Méditerranéen, d'Arménie et de l'Asie centrale (Greene *et al.*, 2012). La luzerne est l'une des plantes fourragères les plus répandues dans nombreux pays à travers le monde (Sajkovic-Srbinovici *et al.*, 2017).

La luzerne est une plante herbacée vivace pouvant atteindre près d'un mètre de hauteur. Elle présente des tiges plus ou moins ligneuses et très ramifiées avec des feuilles ovoïdes et oblongues ayant trois folioles et finement dentées au sommet, d'une couleur verte. Cette plante se caractérise par des fleurs violettes groupées en grappes denses sur un pédoncule et des fruits sous forme de gousses plus ou moins enroulées en forme spiralee contenant plusieurs graines (Bora et Sharma, 2011). A maturité, la plante possède de longues racines pivotantes pouvant atteindre six mètres et un réseau de racines secondaires très ramifié (Quan *et al.*, 2016 ; Zhang et Shi 2018) (Fig.1).

Taxonomiquement, l'espèce *Medicago sativa* L. appartient au genre *Medicago* L. de la famille des Fabaceae (Leguminosae) (Singh, 2009). Le genre est composé de 60 espèces dont la majorité sont annuelles, mais environ un tiers est composé de plantes vivaces, dont la luzerne, quatorze espèces cultivées appartiennent au genre *Medicago*. Le complexe *Medicago sativa* se compose de trois sous-espèces *M. sativa* ssp. *sativa* ; *M. sativa* ssp. *falcata* et *M. sativa* ssp. *glutinosa* (Laamari *et al.*, 2016).



Fig. 1 : *Medicago sativa*

1-1-2- Importance de la luzerne

1-1-2-1- Importance agronomique

La luzerne est une légumineuse fourragère largement cultivée à l'échelle mondiale ayant d'excellentes caractéristiques agricoles et une valeur économique importante (Zhang et Shi, 2018). Son attrait majeur réside dans sa capacité à fixer l'azote atmosphérique via une symbiose avec l'espèce *Sinorhizobium meliloti* qui en fait une plante très utile à l'amélioration des sols (Sajkovic-Srbnovici *et al.*, 2017). Ainsi, cette plante peut jouer un rôle crucial dans la protection des sols agricoles contre l'érosion, le maintien de leur fertilité et surtout dans l'amélioration des ressources fourragères et pastorales dans les zones marginales et difficiles (Sobti *et al.*, 2015).

1-1-2-2- Importance nutritionnelle

La luzerne est la plus importante légumineuse fourragère du monde en raison d'un rendement élevé en biomasse, d'une excellente valeur nutritive, d'une digestibilité élevée et de son adaptation à un large éventail de conditions climatiques et pédologiques (Moawed, 2016). Elle fournit des fourrages de haute qualité pour le pâturage du bétail, l'ensilage et la production de foin (Lei *et al.*, 2018). De plus, la luzerne déshydratée est une bonne source de xanthophylles et de bêta-carotène pour les volailles (Radovic *et al.*, 2009).

Bien que principalement cultivée et utilisée pour l'alimentation animale, mais ces dernières années, elle a commencé à être utilisée plus souvent dans l'alimentation humaine en raison de sa richesse en protéines facilement assimilables, minéraux, vitamines, β -carotène, fibres et acides aminés essentiels (Striker et Colmer, 2017). Actuellement, la luzerne est vendue comme complément alimentaire dans les magasins de produits naturels dans certains pays particulièrement en Europe et en Amérique du Nord permettant ainsi de lutter efficacement contre la malnutrition (Apostol *et al.*, 2017).

1-1-2-3- Importance pharmaceutique

Traditionnellement, en dehors du fourrage, la luzerne était cultivée pour ses propriétés médicinales depuis longtemps. Dotée d'une excellente composition en acides aminés et riche en minéraux, vitamines et oligo-éléments, elle était utilisée pour soigner le rhume, les troubles digestifs et les abcès. Elle est appréciée aussi pour ses propriétés anti-infectieuses, antidiabétiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes (Sadeghi *et al.*, 2016).

2- Les Rhizobia

2-1-Définition

Les Rhizobia sont définis comme des bactéries capables de former des nodules sur les légumineuses. Ce terme décrit le phénotype (formation des nodules racinaires), mais n'a aucune pertinence taxonomique et ne doit pas être confondu avec le nom du genre *Rhizobium* bien que 'Rhizobia' ait été utilisé pour désigner la forme plurielle de *Rhizobium*. Le genre *Rhizobium* a fait l'objet de multiples redéfinitions et englobe à présent une variété de fixateurs d'azote à croissance rapide. Ces bactéries peuvent infecter les racines des légumineuses, entraînant la formation de grumeaux ou de nodules où la fixation de l'azote a lieu. Le système enzymatique de la bactérie fournit une source constante d'azote réduit à la plante hôte et la plante fournit les nutriments et l'énergie nécessaires aux activités de la bactérie (Black *et al.*, 2012).

2-2- Classification des Rhizobia

Les premières classifications ont été basées sur des tests d'inoculation croisée entre Rhizobia et leurs plantes hôtes. La plante hôte n'était pas le seul critère pris en compte pour la classification des Rhizobia pour lesquelles les espèces ont été séparées en deux groupes: les souches à croissance rapide (le genre *Rhizobium*) et les souches à croissance lente (le genre *Bradyrhizobium*), en fonction de leur temps de génération et de leur taux de croissance sur milieu de culture. Cependant, des observations discordantes entre la notion de vitesse de croissance bactérienne et celle de la gamme d'hôtes ont laissé beaucoup de doutes sur la validité de cette classification. Cela a fait place à des méthodes comparatives telles que : le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN/ADN ou ADN/ADN, l'analyse du gène de l'ARNr 16S, l'analyse de plasmides, etc. Cette période a marqué le début d'une nouvelle étude taxonomique basée sur les résultats de différentes analyses phénotypiques et biochimiques pour l'identification des bactéries symbiotiques. Depuis lors, l'isolement des Rhizobia d'un nombre croissant d'espèces végétales dans le monde et leur

caractérisation par la taxonomie polyphasique moderne a conduit à la description d'autres nouveaux genres et espèces (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

L'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries nodulantes de légumineuses, souvent inhabituelles, sur des plantes hôtes diversifiées ont conduit à la désignation de nombreuses nouvelles espèces rhizobiennes. Sur la base de la séquence d'ADNr 16S, les symbiotes de légumineuses actuellement décrits appartiennent à deux sous-classes phylogénétiques distinctes: les Protéobactéries α , β . 238 espèces ont été regroupées en 18 genres. Ces espèces se répartissent également en sept familles (Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae, Brucellaceae et Burkholderiaceae) et deux ordres, à savoir les Rhizobiales et les Burkholderiales. L'ordre des Rhizobiales renferme les six premières familles. Par conséquent, il apparaît clairement que la taxonomie actuelle des Rhizobia nodulants progresse rapidement en raison des dernières avancées en matière de technologie omique basée sur la biologie moléculaire, par exemple, génomique, protéomique, transcriptomique et métabolomique (Tab. 1) (Rao *et al.*, 2018).

La taxonomie des Rhizobia a changé avec le développement de nouvelles techniques d'études. Toutefois, cette taxonomie restera toujours dynamique car bien que les Rhizobia soient étudiés depuis plus de 100 ans, des symbiotes ont été identifiés pour moins de 10 % des 720 genres de légumineuses. Ainsi, il est probable qu'avec ces nouveaux outils d'étude, de nouveaux genres de Rhizobia soient découverts parmi les sous-classes α , β des Protéobactéries et peut-être même parmi d'autres taxons (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

L'innovation la plus récente dans la taxonomie rhizobienne est la génomotaxonomie basée sur le séquençage du génome entier qui modifiera à nouveau les concepts actuels de cet important groupe de bactéries. La séquence complète du génome est actuellement disponible pour les souches de plusieurs espèces rhizobiennes anciennes et récentes. Indépendamment de cela, l'augmentation des explorations de légumineuses ainsi que des études avancées sur de nouvelles espèces de légumineuses dans différentes régions géographiques offrent encore plus d'opportunités pour isoler et caractériser davantage d'espèces rhizobiennes. De plus, de nombreuses souches isolées à partir de nodules de légumineuses différentes dans différents écosystèmes sont en projet pour l'analyse du génome qui conduira à des changements dans la taxonomie des bactéries nodulantes (Velázquez *et al.*, 2017). La combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques a

permis de modifier considérablement la taxonomie des Rhizobia ces dernières années. Le tableau 1 présente la diversité des Rhizobia identifiés à partir de cette nouvelle approche.

Tab. 1 : Taxonomie des Rhizobia (Rao *et al.*, 2018)

Souches de <i>Rhizobium</i>	Plantes hôtes
Classe α-Proteobacteria	
I Ordre Rhizobiales	
I Famille Rhizobiaceae	
Genre <i>Rhizobium</i> (98)	<i>Lotus, Phaseolus, Astragalus, Sesbania, Medicago, Mimosa, Indigofera, Hedysarum, Medicago, Populus, Vicia, Lespedeza, Oryza, Albizzia, Kummerowia, Dalbergia, Caragana, Trigonella, Sphaerophysa, Oxytropis, Mung bean, Vigna, Rosa, Leucaena, Dalea, Clitoria, Siratro, Cowpea, Lemna, Calliandra, Pongamia, Arachis, Pueraria</i>
Genre <i>Ensifer</i> (anciennement <i>Sinorhizobium</i>) (18)	<i>Glycine, Sesbania, Acacia, Medicago, Prosopis, Kummerowia, Leucaena, Abrus, Lotus, Argyrolobium, Psoralea</i>
Genre <i>Allorhizobium</i> (1)	<i>Neptunia</i>
Genre <i>Shinella</i> (1)	<i>Kummerowia</i>
Genre <i>Pararhizobium</i> (1)	Tumeur des fruits (non-symbiotique)
II Famille Phyllobacteriaceae	
Genre <i>Mesorhizobium</i> (40)	<i>Lotus, Astragalus, Leucaena, Sesbania, Amorpha, Prosopis, Albizzia, Biserrula, Caragana, Anthyllis, Robinia, Alhagi, Anagyris, Acacia, Sophora</i>
Genre <i>Phyllobacterium</i> (8)	<i>Lathyrus, Argyrolobium, Astragalus, Brassica, Phaseolus, Lotus, Sophora</i>
Genre <i>Aminobacter</i> (1)	<i>Anthyllis</i>
III Famille Bradyrhizobiaceae	
Genre <i>Bradyrhizobium</i> (36)	<i>Glycine, Vigna, Lespedeza, Beta, Entada, Pachyrhizus, Lablab, Arachis, Cytisus, Retama, Aeshynomene, Acacia, Inga, Lupin, Phaesolus, Cowpea, Centrolobium, Erythrophleum, Neonotonia, Desmodium, Lupinus</i>
Genre <i>Blastobacter</i> (1)	<i>Aeschynomene</i>
Genre <i>Photrhizobium</i> (1)	<i>Aeschynomene</i>
IV Famille Hyphomicrobiaceae	
Genre <i>Devosia</i> (1)	<i>Neptunia</i>
Genre <i>Azorhizobium</i> (3)	<i>Sesbania</i>
V Famille Methylobacteriaceae	
Genre <i>Methylobacterium</i> (3)	<i>Crotalaria, Trifolium phyllosphere</i>
Genre <i>Microvirga</i> (4)	<i>Lupinus, Listia, Cowpea</i>

VI Famille Brucellaceae	
Genre <i>Ochrobacterium</i> (2)	<i>Lupinus, Cytisi</i>
II Ordre Burkholderiales	
Famille Burkholderiales	
Genre <i>Burkholderia</i> (17)	<i>Dalbergia, Machaerium, Mimosa, Lebeckia, Aspalathus, Papilionoid legumes</i>
Genre <i>Cupriavidus</i> (ancien <i>Ralstonia</i>) (2)	<i>Mimosa, Phaselous, Leucaena</i>

() : Nombre des espèces

2-3-Caractéristiques des Rhizobia

2-3-1- Caractères morphologiques

Les Rhizobia sont des bactéries capables d'établir des associations symbiotiques avec beaucoup de légumineuses et quelques espèces non légumineuses. Ayant la capacité d'envahir et de former des nodules sur les racines (ou parfois sur les tiges) de ces dernières, dans lesquelles la fixation d'azote (N_2) a lieu (Mehboob *et al.*, 2013). Les Rhizobia sont des bactéries à Gram négatif, non sporulantes (Holt *et al.*, 1994) se présentant sous deux formes :

-La forme végétative : Les bactéries apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,6 à 0,9 μm de largeur sur 1,2 à 3 μm de longueur et sont mobiles par un flagelle polaire ou un flagelle subpolaire pour les Rhizobia à croissance lente ou par deux à six flagelles péritriches pour les Rhizobia à croissance rapide (Holt *et al.*, 1994).

-La forme bactéroïde : A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les Rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez *Rhizobium trifoli*, *R. leguminosarum* et *S. meliloti*, les individus sont irréguliers ayant une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

2-3-2- Caractères biochimiques

Les Rhizobia sont des bactéries chimioorganotrophes, utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leur croissance. Les Rhizobia à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ont une croissance meilleure en présence de glucose, de mannitol ou de saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (Somasegaran et Hoben, 1994).

2-3-3- Caractères physiologiques

Les Rhizobia sont des aérobies ou microaérophiles et peuvent croître à une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de croissance se situe entre 6 et 7, plus

exactement 6,8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *R. japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Holt *et al.*, 1994), mais certaines souches tolèrent des températures de l'ordre de 40, 42 et 45° C (Ruiz-Diez *et al.*, 2009).

2-3-4- Caractères cultureux

Les Rhizobia à croissance rapide produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2 à 3 jours, cependant, ceux à croissance lente produisent une turbidité en 3 à 5 jours. Le Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture des Rhizobia. Sur ce milieu, les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanchâtres, élevées, opaques ou laiteuses, humides, translucides, mucilagineuses, de 2 à 4 mm de diamètre, à contour régulier et elles peuvent être brillantes (Holt *et al.*, 1994). Les colonies jaunes pâles sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

2-3-5- Caractères génétiques

Le génome des Rhizobia a une longueur de 6 872 702 pb avec une teneur en GC de 61,18% et comprend 5 réplicons, un chromosome circulaire de taille 4 537 948 pb et 4 plasmides circulaires de taille 4 537 948 pb. Parmi 6 643 gènes prévus, 6 581 sont des gènes codant pour des protéines et 62 gènes codent pour un ARN. La majorité (72,44%) ont reçu une fonction putative, tandis que les autres ont été annotés sous forme de protéines hypothétiques (Reeve *et al.*, 2010).

2-4-Processus de nodulation

Le processus de nodulation peut se subdiviser en plusieurs étapes. La perception du facteur Nod (FN) par la plante va déclencher un enchaînement d'événements aboutissant à la formation du nodule: (1) déformation des poils absorbants de la racine permettant d'englober la bactérie située à proximité ; (2) formation d'un cordon d'infection conduisant la bactérie jusqu'à un primordium nodulaire ; et (3) libération des bactéries par endocytose dans les cellules du primordium nodulaire. Au sein de ce primordium nodulaire, les bactéries se différencient en bactéroïdes, alors capables de convertir le N₂ en NH₃ (Giraud *et al.*, 2007) (Fig.2).

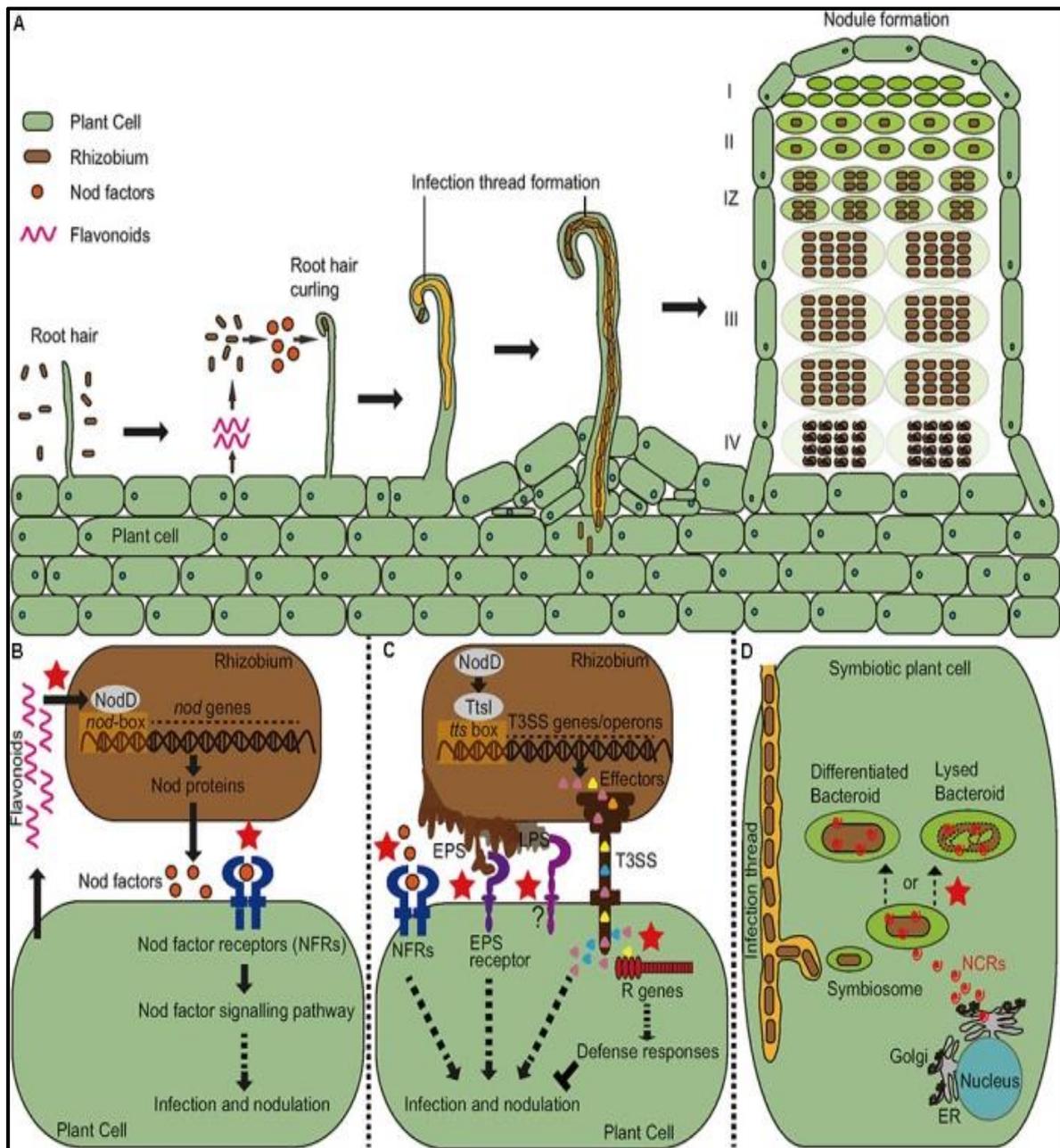


Fig.2 : Signalisation de la symbiose et immunité des plantes impliquées dans la spécificité de reconnaissance dans les interactions légumineuses-rhizobiennes (indiquées par les étoiles rouges). (A) Le processus d'infection et le développement de nodules. Un nodule mature indéterminé contient une zone de méristème (I), une zone d'infection (II), un interzone (IZ), une zone de fixation de l'azote (III) et une zone sénescence (IV). (B) L'hôte sécrète des flavonoïdes pour induire l'expression du gène de la nodulation bactérienne (*nod*) par l'activation des protéines NodD. Les enzymes codées par les gènes *nod* conduisent à la synthèse de facteurs Nod (FN) reconnus par les récepteurs de facteurs Nod hôtes (NFR). La spécificité de la reconnaissance se produit à la fois entre les flavonoïdes et les NodD et entre la NF et les NFR. (C) En plus de la signalisation NF, les bactéries produisent également des polysaccharides extracellulaires (EPS) et des effecteurs de type III pour faciliter leur infection lors d'interactions compatibles, mais ces molécules peuvent également induire des réponses immunitaires provoquant une résistance à l'infection dans des interactions incompatibles. (D) Certaines légumineuses telles que *Medicago* codent des peptides antimicrobiens riches en cystéine (NCR) spécifiques aux nodules pour amener leurs partenaires bactériens à la différenciation terminale requise pour la fixation de l'azote. Cependant, certaines souches rhizobiennes ne peuvent pas survivre à l'activité antibactérienne de certaines isoformes de peptides, ce qui entraîne la formation de nodules défectueux pour la fixation de l'azote (Wang *et al.*, 2018).

2-4-1-Echange de signal

L'établissement de la symbiose entre légumineuses et Rhizobia nécessite une reconnaissance mutuelle des deux partenaires, qui commence lorsque les flavonoïdes (métabolites secondaires de la plante) sont reconnus comme inducteurs spécifiques des gènes de nodulation (Nod) chez les Rhizobia (Skorupska *et al.*, 2017). La symbiose *Rhizobium*-légumineuses commence par un échange de signal entre la plante hôte et son microsymbiote (Wang *et al.*, 2018). Les racines des légumineuses sécrètent des composés phénoliques, principalement (iso) flavonoïdes (Montiel *et al.*, 2018). Ces flavonoïdes, synthétisés et sécrétés, agissent comme des molécules de signalisation, attirent les Rhizobia vers les plantes hôtes et induisent l'expression des gènes Nod qui déclenchent les premières étapes du développement des nodules (Menéndez *et al.*, 2017).

2-4-1-1-Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire produits par les plantes. Plus de 10 000 variants structuraux de flavonoïdes ont été décrits (Weston et Mathesius, 2013). Les flavonoïdes sécrétés sous forme d'aglycones et de glycosides constituent une grande partie des exsudats racinaires. Le squelette des flavonoïdes est synthétisé par condensation de la 4-coumaryl-CoA fournie par la chalcone synthase, mais plusieurs modifications de cette structure produisent différentes classes de flavonoïdes: flavanones, flavones, isoflavonoïdes, chalcones et anthocyanidines (Harborne et Williams, 2000). Les flavonoïdes servent de molécules de signal dans la rhizosphère pour concentrer les Rhizobia compatibles et induire la biosynthèse du FN. Ce sont des chimioattractants pour les Rhizobia (Cooper, 2007), des inducteurs de l'expression génique des Nods, des déterminants de la spécificité de l'hôte et des régulateurs du transport de l'auxine dans les racines lors de la formation de nodules (Hassan et Mathesius, 2012).

2-4-1-2-Facteurs Nod

En réponse aux flavonoïdes des plantes, les Rhizobia produisent des FN qui induisent la déformation des racines, la formation de fils d'infection, la réponse initiale dans la division cellulaire corticale des racines et la formation des primordia des nodules. Les FN sont structurellement divers et une seule souche rhizobienne peut produire une gamme de ces métabolites. Ils sont produits par des Rhizobia appartenant aux α et à la majorité des β -protéobactéries (Moulin *et al.*, 2001).

La perception des flavonoïdes attire la bactérie à la racine et active l'expression génique du *Rhizobium*, ce qui conduit à la production et à la sécrétion de lipo-chito-oligosaccharides spécifiques à la souche, également appelés FN (Liu et Murray, 2016).

Les FN ont un squelette oligosaccharidique d'unités N-acétyl-D-glucosamine avec un groupe acyl gras attaché au sucre non réducteur. Un déterminant majeur de la spécificité hôte-symbiose est attribué aux différents substituants FN liés au squelette de l'oligosaccharide (Streng *et al.*, 2011).

2-4-2-Infection

L'infection débute par l'adhésion bactérienne à l'extrémité des racines dans les couches de cellules épidermiques (Gage, 2004). Les Rhizobia ont deux voies principales pour pénétrer dans la racine de la plante : par les poils radiculaires ou par des fissures dans le tissu épidermique des racines. L'infection des poils absorbants est la plus courante (Kondorosi *et al.*, 2013).

La pointe des poils radiculaires émergents est la principale cible d'infection par *Rhizobium*, probablement parce que leurs parois cellulaires plus minces et moins réticulées permettent de réorganiser les microtubules sous-jacents, modifiant ainsi le trafic vésiculaire vers la pointe en croissance et permettant ainsi une pénétration ultérieure des Rhizobia. La fixation des Rhizobia aux poils absorbants stimule la déformation de ces poils et favorise également la division des cellules corticales.

Les Rhizobia pénètrent par la pointe déformée du poil absorbant qui recouvre une petite proportion des bactéries qui se divisent continuellement (Gage, 2004). La microcolonie incluse a probablement une concentration enrichie en FN ainsi que des enzymes dégradant la paroi cellulaire. Des structures spécialisées, appelées fils d'infection, commencent à se former et permettent aux bactéries de pénétrer dans la racine. Ces fils d'infection sont principalement constitués de composants de la paroi des cellules végétales et permettent à la bactérie de continuer à proliférer dans la plante hôte (Clúa *et al.*, 2018). Les étapes ultérieures de l'infection sont hautement spécifiques et sont initiées après la croissance des bactéries piégées par les poils absorbants. La prolifération bactérienne dans les poils absorbants est probablement due à l'accumulation des FN dans le foyer d'infection, ce qui peut être important pour activer des événements ultérieurs. Les bactéries se divisent à l'extrémité du fil d'infection en croissance, formant une colonne de bactéries. Si plus d'un type bactérien est piégé par la boucle du poil absorbant, le processus tend à sélectionner un type bactérien, ce qui entraîne une infection clonale. L'initiation de l'infection est une étape majeure pour la discrimination des espèces bactériennes appropriées. Elle implique un taux élevé de FN et avec un degré de spécificité élevé (Oldroyd et Downie, 2008).

2-4-3-Organogenèse nodulaire

L'organogenèse des nodules est initiée dans le cortex, où les Rhizobia envahissants, stimulant des taux élevés de FN entraînent une activation mitotique des cellules corticales dans la racine. Cela aboutit finalement au développement du primordium du nodule (Xiao *et al.*, 2014). Les bactéries sont libérées près du bout du fil d'infection en croissance par un processus ressemblant à une endocytose (Ivanov *et al.*, 2012), les bactéries sont entourées d'une membrane d'origine végétale appelée membrane péri-bactéroïde (MPB), qui forme ce que l'on appelle le symbiosome (Brewin, 2004 ; Mehboob *et al.*, 2013).

L'organogenèse des nodules nécessite l'intégration du FN et la signalisation hormonale (Oldroyd *et al.*, 2011). Les hormones végétales sont des produits chimiques qui influent en petites quantités la croissance et le développement du nodule. En général, il est admis qu'il existe cinq grandes classes d'hormones végétales, nommées auxines, cytokinines, éthylène, gibbérellines et acide abscissique. Chaque hormone a des fonctions positives ou inhibitrices. Il est maintenant bien établi qu'il existe deux sources de phytohormones naturellement disponibles pour les plantes : production endogène par les tissus végétaux et production exogène par les micro-organismes associés (Giraud *et al.*, 2007). En plus de ces hormones, d'autres constituants cellulaires des bactéries semblent contribuer au processus de l'organogenèse tels que les polysaccharides excrétés par les bactéries.

2-4-4-Maturation des bactéroïdes

La formation de symbiosomes ainsi que la différenciation en bactéroïdes sont induites par les plantes. La MPB qui entoure les bactéroïdes est une interface active où se produit un échange de métabolites entre symbiotes. Les cellules végétales contenant des symbiosomes subissent également une différenciation profonde, augmentant la quantité de leurs structures membranaires (réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi), qui participent au développement des processus biosynthétiques de la MPB. De nombreuses protéines associées à la fixation de l'azote apparaissent dans ces cellules *de novo* (Sulima *et al.*, 2015).

2-4-5- Morphologie des nodules

Il existe deux types morphologiques majeurs de nodules chez les légumineuses. Le type de nodule est déterminé par la plante hôte. Ils peuvent être regroupés en nodules indéterminés et déterminés. Les différences entre les deux types de nodules sont le site des premières divisions cellulaires internes, le maintien d'une région méristématique et la forme des nodules matures. Pour les nodules indéterminés, les premiers événements de division cellulaire se produisent de manière anticlinale dans le cortex interne, suivis des divisions

périclinales dans l'endoderme et le péricycle. Collectivement, ces divisions mènent à la formation des primordia de nodule. Les nodules indéterminés ont un méristème plus persistant, ce qui donne des nodules de forme cylindrique, comme en témoignent les nodules de la luzerne (*Medicago sativa*), de trèfle (*Trifolium repens*), de pois (*Pisum sativum*) et de *Medicago truncatula*. Le méristème apical produit continuellement de nouvelles cellules infectées par des bactéries. À maturité, les nodules indéterminés contiennent une population hétérogène de bactéroïdes fixateurs d'azote en raison de la poursuite de la division cellulaire, ce qui entraîne un gradient d'état de développement au fur et à mesure de l'allongement du nodule. Ces nodules ont également un système vasculaire différent, moins ramifié que les nodules déterminés (Wang *et al.*, 2018).

Les nodules déterminés, en revanche, sont généralement sphériques, n'ont pas de méristème persistant et ne présentent pas de gradient de développement évident. Les premiers événements de division cellulaire d'un nodule déterminé se produisent généralement de manière sous-épidermique dans le cortex externe (Haag *et al.*, 2013). À maturité, les nodules déterminés contiennent une population relativement homogène de bactéroïdes fixateurs d'azote (Maróti et Kondorosi, 2014). La différenciation des cellules infectées étant synchrone, suivie d'une sénescence. Ces nodules ont une durée de vie de quelques semaines. Lorsque les vieux nodules vieillissent, de nouveaux nodules se forment sur des parties de la racine récemment développées (Puppo *et al.*, 2005). Les nodules déterminés forment également des lenticelles, qui sont des structures qui renforcent les échanges gazeux. Les légumineuses qui forment des nodules déterminés sont principalement des espèces tropicales et subtropicales, y compris le soja (*Glycine max*), la pongamia (*Pongamia pinnata*) et le haricot (*Phaseolus vulgaris*), mais comprennent également d'autres espèces plus tempérées telles que *Lotus japonicus* (Wang *et al.*, 2018).

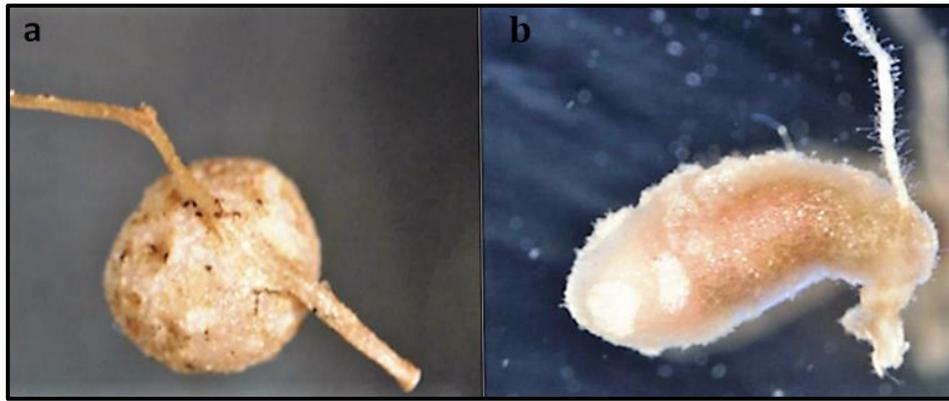


Fig 3: Morphologies nodulaires à travers les légumineuses (Sprent *et al.*, 2017).

a) Nodule déterminé, b) Nodule indéterminé

2-5-Génétiq ue de la nodulation

2-5-1-Gènes de nodulation des Rhizobia (Gènes *nod*)

Les gènes bactériens impliqués dans le processus d'infection sont appelés gènes de «nodulation» ou gènes *nod* qui contrôlent la spécificité de l'hôte, l'infection et la formation des nodosités. Ces gènes *nod* sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les partenaires symbiotiques (Dénarié *et al.*, 1996).

La capacité des Rhizobia à former des nodules repose sur la présence dans leur génome d'un ensemble de gènes de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*) indispensables à la symbiose. Les gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitoooligosaccharides (FN), agissant comme molécules signal et induisant la formation des nodules (Boivin-Masson *et al.*, 2006). Les gènes *nod* sont activés par les flavonoïdes des exsudats racinaires émis par l'hôte. Ils sont localisés sur un grand fragment d'ADN circulaire (ou plasmide) du *Rhizobium* appelé plasmide Sym (pour symbiose) (Madigan et Martinko, 2007).

2-5-1-1- Gènes *nod* communs

Les gènes communs *nodA*, *nodB* et *nodC* sont des gènes clés de la nodulation car ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des FN (Boivin-Masson *et al.*, 2006). Ces gènes sont communs à tous les Rhizobia (Duhoux, 2004) et sont réunis en un même opéron (Davet, 1996).

Ces gènes sont physiquement et fonctionnellement conservés chez toutes les espèces de Rhizobia et leurs mutations provoquent une perte complète de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes. En effet, ces gènes sont indispensables pour induire le recourbement des poils absorbant et inciter la division des cellules corticales (Werner, 1992 ; Pelmont, 1995).

2-5-1-2- Gènes *nod* spécifiques

Les gènes *hsn* (*host specific nodulation*) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter (Pelmont,1995), présents chez certaines espèces et non chez d'autres. Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet,1996).

2-5-1-3- Gènes *nodD*

Les gènes *nodD* sont des gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoïdes (Pelmont,1995). Une fois activé, le Nod D se lie aux sites régulateurs des opérons porteurs des autres gènes *nod* et active leur transcription (Geurts et Bisseling, 2002).

2-5-2-Gènes *nif* et *fix*

Gènes *nif*

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes *nif* qui contrôlent la synthèse d'un complexe enzymatique (nitrogénase) responsable de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac (Dénarié, 2008). Ce complexe enzymatique est constitué de deux métalloprotéines de tailles différentes : le site de la réduction du substrat correspondant à la MoFe-protéine ou dinitrogénase (245 KDa) et le donneur d'électrons correspondant à la Fe-protéine ou dinitrogénase réductase (64 KDa). La Fe-protéine est un dimère de deux sous unités polypeptidiques identiques codé par le gène *nif H*. Quant à la Mo-Fe-protéine, elle est un tétramère composée de deux sous unités non identiques codée par les gènes *nif D* et *nif K* (Werner, 1992 ; Hopkins, 2003).

Gènes *fix*

Les gènes *fix* sont des gènes propres aux fixateurs symbiotiques et impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules lors de la fixation symbiotique azotée (Noel, 2009). Ces gènes sont tous nécessaires pour la fixation de l'azote : les gènes *fixNOQP* codent pour une cytochrome oxydase, *fixGHIS* codent pour la pompe cationique et *fixABCX* codent pour une flavoprotéine. Dans l'environnement des nodules racinaires, cette oxydase offre l'énergie nécessaire, alors que la flavoprotéine dirige le flux d'électrons à l'oxydase (Crossman, 2005).

2-6-Biochimie de la nodulation

2-6-1-Nitrogénase

La nitrogénase est un complexe enzymatique qui réduit l'azote atmosphérique en ammonium dans l'environnement microaérophile du nodule. La nitrogénase catalyse la réduction de N₂ en ammoniac dépendante de Mg ATP.

Nitrogénase



Bien qu'il existe plusieurs types de nitrogénases, les Rhizobia ne possèdent que le type contenant du molybdène. Les nitrogénases de Mo sont formées de deux composants métalliques, la dinitrogénase [protéine de molybdène-fer (MoFe)] et la dinitrogénase réductase (protéine de Fe) (Menéndez *et al.*, 2017).

2-6-2-La léghémoglobine

La léghémoglobine est une protéine présente uniquement dans les nodosités racinaires. La synthèse de la léghémoglobine dépend d'information génétique apportée par la plante et la bactérie, aucun des deux partenaires n'étant capable de la produire indépendamment de l'autre (Perry *et al.*, 2004). La globine étant codée par le génome de la plante, l'hème étant au contraire sous le contrôle du génome de la bactérie symbiotique (Madigan *et al.*, 2007). Elle donne une coloration rouge aux nodules racinaires qui constitue un critère de l'activité des nodules des légumineuses symbiotes (Tourte *et al.*, 2005).

Il a été admis pour longtemps que la seule fonction de cette molécule était de piéger, avec une très forte affinité, toute trace d'oxygène qui aurait pu pénétrer dans le nodule, protégeant ainsi la nitrogénase bactérienne de son effet toxique. En fait, elle assure également l'apport d'oxygène aux oxydases situées enfin de la chaîne d'oxydoréduction des bactéroïdes (Wajcman et Kiger, 2002)

II- Facteurs influençant la fixation symbiotique

Un environnement favorable est vital pour la production de légumineuses, mais des conditions environnementales sévères limitent la croissance et l'activité des bactéries fixatrices de N₂ chez l'hôte (Naveed *et al.*, 2017). Plusieurs facteurs, dont le stress hydrique, la salinité, le pH défavorable du sol, la carence en éléments nutritifs, la toxicité minérale, les températures extrêmes, la photosynthèse inadéquate, les maladies des plantes, les carences en oligo-éléments, etc., inhibent la nodulation et limitent la vigueur de la légumineuse hôte (Brockwell *et al.*, 1995).

1- Salinité

La salinité élevée du sol limite la productivité des légumineuses en affectant négativement la croissance de la plante hôte, le développement de bactéries des nodules racinaires et la capacité de fixation de N₂ (El Sabagh *et al.*, 2015). Les effets du stress salin sur la nodulation et la fixation de l'azote des légumineuses ont été examinés dans plusieurs cultures (Nithyakalyani *et al.*, 2016). La salinité réduit de manière significative la hauteur des plants, la biomasse, la nodulation, en plus d'autres paramètres physiologiques, par exemple, la teneur en eau, la perméabilité de la membrane, la conductance stomatique, etc. En outre, une salinité élevée provoque la suppression de la photosynthèse, réduit le rendement en masse sèche des tiges, des racines et de nodules, diminue la survie des bactéries nodulaires dans le sol et la rhizosphère, augmente le temps de génération et perturbe l'ultrastructure cellulaire. La salinité réduit, aussi, la production du FN chez *R. etli*, *R. tropici* et *S. arboris*. La stimulation ou la suppression des FN sous les conditions de stress peuvent affecter les symbioses légumineuses-Rhizobia. En outre, il a été récemment signalé que l'inhibition des molécules à la surface des cellules comme le glucane, les LPS et EPS de certaines bactéries nodulantes, sous stress salin, affecte les performances symbiotiques des bactéries sensibles. En revanche, les bactéries tolérantes produisent, au contraire, toutes les biomolécules actives de surface et ont démontré une activité symbiotique de haute qualité même sous conditions de stress salin (Zahran *et al.*, 2017).

2- Sécheresse

Le stress hydrique modifie les cellules rhizobiennes et conduit à une réduction de l'infection et la nodulation des légumineuses. Il a des effets néfastes sur la croissance des plantes et la productivité en créant la déshydratation et le stress osmotique. La sécheresse limite les flux de CO₂ dans les tissus mésophylles, nuit à la photosynthèse en modifiant les pigments photosynthétiques et les glucides, et accélère la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Raghavendra *et al.*, 2010).

3- Température

La combinaison légumineuse-*Rhizobium* a une température optimale autour de 30 à 40°C, l'exposition des deux partenaires symbiotiques à des températures extrêmes altère l'infection, la nodulation, le développement de nodule, le fonctionnement général des nodules, la croissance et la productivité des plantes (Mohammadi *et al.*, 2012). La température élevée du sol a une influence marquée sur la survie et la persistance des souches rhizobiennes. L'influence de la température sur *Rhizobium* semble dépendre de la

souche. Par exemple, *Bradyrhizobium* sp. (Lupin) est moins sensible que *R. leguminosarum* bv. trifolii à une température élevée du sol (Triplett et Sadowsky, 1992).

4- pH

Une faible survie et une croissance médiocre des Rhizobia, ainsi que l'inhibition de l'initiation de la formation de nodules, sont les principales réponses qui conduisent à l'échec de la symbiose dans les sols acides. L'acidité affecte la croissance des légumineuses et le processus d'infection. Cet effet est dû, en partie à une perturbation de l'échange de signaux entre macro et microsymbiotes (Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

5- Autres facteurs

Les produits agrochimiques interagissent également avec les Rhizobia et réduisent le nombre de sites racinaires disponibles pour l'infection. En outre, les produits agrochimiques bloquent les mécanismes de signalisation entre Rhizobia et légumineuses, inhibent l'interaction entre eux et la transformation de l'ammoniac en nitrates. De plus, la croissance et l'activité des bactéries fixatrices d'azote endogènes ou endophytes sont également affectées.

De même, les métaux lourds ont des effets néfastes sur la nodulation et la fixation de l'azote des légumineuses (Klimek-Kopyra *et al.*, 2015).

La fertilisation azotée est nécessaire comme azote de départ pour obtenir un rendement substantiel de légumineuses au stade où la fixation symbiotique de l'azote est incapable d'en fournir suffisamment (Buttery et Dirks, 1987), mais des quantités excessives d'azote soluble dans le sol restreignent ou réduisent généralement la nodulation et la fixation d'azote chez les légumineuses (Afza *et al.*, 1987)

III-Interaction synergique des Rhizobia avec des micro-organismes bénéfiques

Récemment, l'accent a été mis sur la co-inoculation dans laquelle les microorganismes interagissent en synergie pour améliorer la performance d'autres microorganismes bénéfiques. C'est une approche efficace et plus sûre que l'inoculation simple car les formulations d'inoculant microbien contenant une seule souche ont souvent montré des résultats incohérents (Naveed *et al.*, 2015).

Les co-inoculants interagissent en synergie ou fonctionnent comme des bactéries « auxiliaires » pour améliorer la performance d'autres micro-organismes bénéfiques (Mehboob *et al.*, 2013).

La combinaison des rhizobactéries améliorant la croissance des plantes (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (PGPR) avec les espèces de *Rhizobium* constitue un outil pertinent, efficace, rentable et écologique permettant d'améliorer la fiabilité des inocula, la croissance végétale et la productivité dans des conditions diverses (Naveed *et al.*, 2015) (Fig. 4). Selon de nombreux auteurs, la co-inoculation des légumineuses avec *Rhizobium* et des PGPR pourrait également être une approche efficace pour induire la tolérance à la salinité, améliorer la nodulation, la croissance et le rendement dans des conditions de stress salin de plusieurs légumineuses, telles la luzerne, le soja, le trèfle (Younesi *et al.*, 2013), le pois chiche (Panwar *et al.*, 2016), le haricot (Egamberdieva *et al.*, 2013) et la fève (Aamir *et al.*, 2013).

La capacité des co-inoculants à favoriser la croissance peut être affectée par divers facteurs tels que la spécificité de la souche, la dose optimale de l'inoculum appliqué, l'efficacité de la souche, la composition des exsudats racinaires de la plante hôte, la variation de la température et l'interaction de l'inoculum avec la microflore rhizosphérique prédominante dans un environnement particulier. Par conséquent, diverses bactéries du sol telles que *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, les actinomycètes, etc. sont utilisées en combinaison avec les Rhizobia pour améliorer la croissance et le rendement des légumineuses (Nadeem *et al.*, 2013). Les effets synergiques du *Rhizobium* lorsqu'il est utilisé en combinaison avec des micro-organismes bénéfiques ont été démontrés dans plusieurs études (Tab. 2).

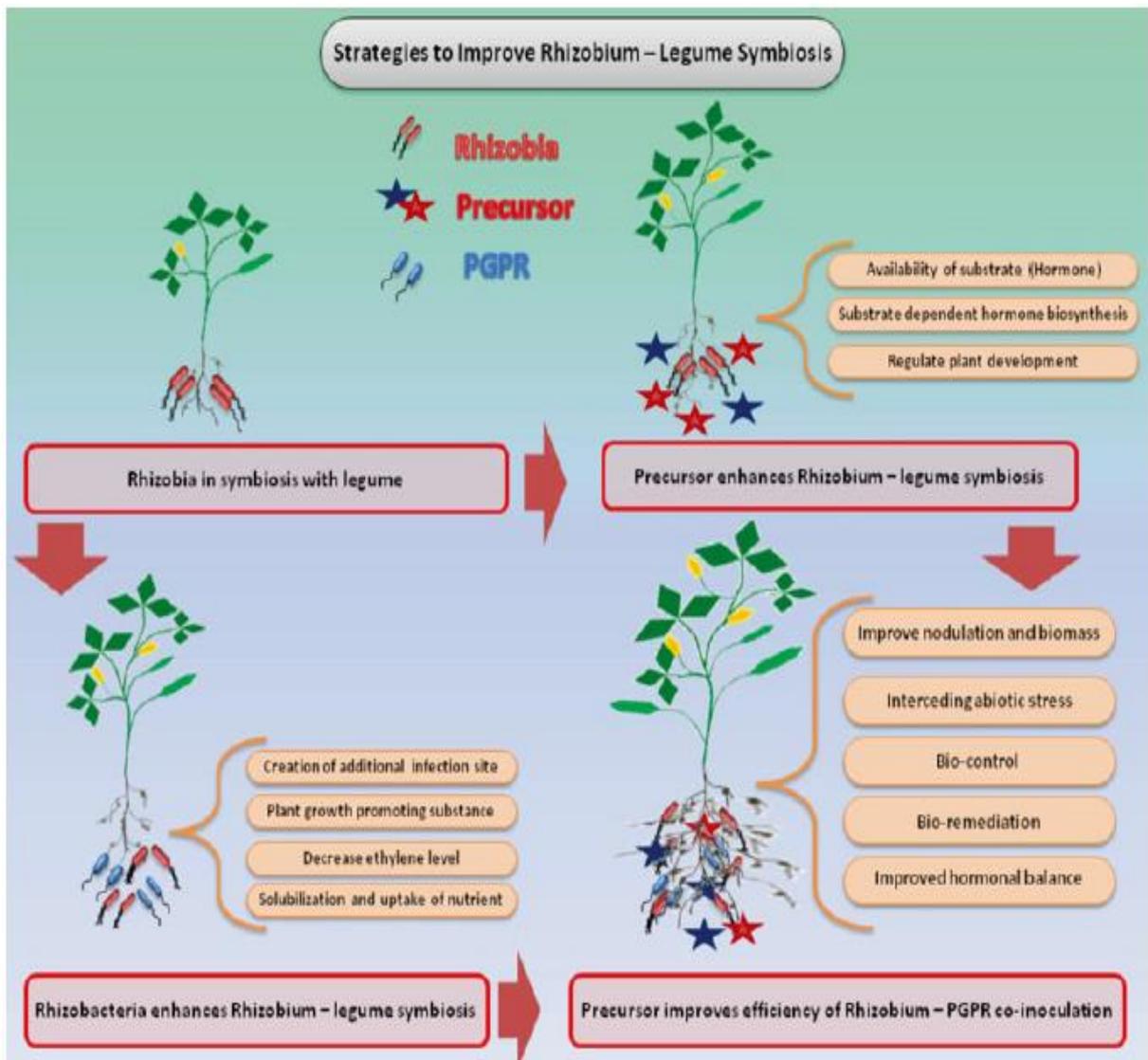


Fig. 4 : Différentes stratégies améliorant la symbiose légumineuse-*Rhizobium* (Naveed *et al.*, 2015).

Tab. 2: Inoculation rhizobienne en association avec des rhizobactéries ou des champignons mycorhiziens arbusculaires afin d'améliorer la nodulation et la biomasse des légumineuses (Naveed *et al.*, 2015).

Rhizobia	Co-inoculants	Plante hôte	Mécanisme(s)/ proposé(s) réponse de la plante
<i>Rhizobium</i> spp. Souche Mg6	Souches PGPR A1etA2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Activité ACC désaminase
<i>R. leguminosarum bv viciae</i>	Champignons mycorhiziens arbusculaires	<i>Viciae faba</i>	Mobilisation du P, Fe, K et d'autres minéraux
<i>Rhizobium</i> sp.	PGPR fertilisants riches en P	<i>Cicer arietinum</i>	Amélioration de la croissance et de la nodulation par l'ACC désaminase
<i>B. japonicum</i> souches MN-S et TAL- 102	Champignons AM <i>Glomus intraradice</i>	<i>V. radiate</i>	Amélioration significative de la biomasse végétale et la teneur en N
<i>Rhizobium</i> sp. Souche PK20	<i>Pseudomonas</i> sp. M9	-	Activité ACC désaminase de <i>Pseudomonas</i> sp. M9
<i>R. leguminosarum</i> PR1	<i>Pseudomonas</i> sp. Souche NARsl	<i>Lens culinaris</i>	augmentation de la croissance et de l'absorption des nutriments
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>V. faba</i>	Solubilisation du P et production de phytohormones et sidérophores
<i>Mesorhizobium</i> sp. BHURCO3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BHUPSB02	<i>C. arietinum</i>	Amélioration de l'absorption du P et Fe, de la nodulation et de la production de l'AIA
<i>R. leguminosarum</i>	PGPR fertilisants riches en P	<i>L. culinaris</i>	Activité ACC désaminase des PGPR et compétence symbiotique des Rhizobia
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. LG ou <i>Bacillus</i> sp.BX	<i>P. vulgaris</i>	Solubilisation du P et production d'AIA, NH ₃ et sidérophores

1-Azospirillum

Azospirillum est une PGPR reconnue pour sa capacité à améliorer la nodulation et la biomasse des légumineuses en tant que co-inoculant des Rhizobia. Elle améliore l'infection rhizobienne, la formation de nodules et la fixation de N₂ via l'amélioration de la production des hormones des plantes et des sidérophores et l'amélioration de l'absorption totale des minéraux (Cassan *et al.*, 2009). De nombreuses études ont démontré l'amélioration de la nodulation et de la croissance d'une large gamme des légumineuses en raison de l'interaction positive entre les Rhizobia et les bactéries du genre *Azospirillum*, à savoir le trèfle blanc, la féverole, les pois chiches, les pois cajan et le soja (Khan *et al.*, 2017).

2-Azotobacter

Azotobacter est une autre PGPR qui a montré une augmentation de la nodulation, de la biomasse végétale et du rendement de diverses légumineuses, à savoir, lentilles, haricot, soja, trèfle, pois chiches et arachide, à la suite de sa double inoculation avec *Rhizobium* (Akhtar *et al.*, 2012).

3- Bacillus

Le genre *Bacillus* est l'une des bactéries les plus connues du sol. Il s'est avéré efficace avec les Rhizobia en tant que promoteur de la nodulation et de la biomasse de diverses légumineuses par l'amélioration de la colonisation, l'occupation des nodules, la production de phytohormones et sidérophores, la lutte biologique contre les maladies et l'absorption efficace de nutriments (Atieno *et al.*, 2012). L'augmentation considérable de l'activité de la nitrogénase après co-inoculation peut s'expliquer par l'influence indirecte de l'endophyte *Bacillus subtilis* sur les plantes. La capacité de la bactérie à synthétiser et à sécréter des substances bioactives telles que les phytohormones a été signalée. Elles ont une influence positive sur la croissance, le développement et la ramification des poils du trèfle et de la luzerne (Niewiadomska *et al.*, 2018)

4- Pseudomonas

Plusieurs espèces de *Pseudomonas*, y compris *P. fluorescens* 2137, *Pseudomonas* sp. PGER 17, *P. striata*; *P. putida*; *P. trivialis* 3Re27; *P. maltophilia*; et *P. jessenii* PS06 se sont avérées avoir un rôle dans l'amélioration de la nodulation et la biomasse de diverses légumineuses lorsqu'elles sont utilisées en association avec les Rhizobia. La longueur racine / tige, la surface foliaire, l'activité de la nitrogénase, la fixation de N₂, la teneur totale en N et le poids de la biomasse végétale sont les caractéristiques des plantes améliorées par *Pseudomonas* en combinaison avec les Rhizobia. De plus, cette co-inoculation a significativement augmenté le taux de croissance et la tolérance au sel et a

supprimé les effets néfastes du stress dans les plantes cultivant dans les sols salins (Younesi, 2013).

5-Champignons mycorhiziens arbusculaires

Les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) forment un symbiote bénéfique en association avec la majorité des plantes et jouent un rôle central dans la croissance et le développement des plantes poussant dans des conditions environnementales variées (Navarro *et al.*, 2013). La performance symbiotique légumineuses-Rhizobia a été améliorée suite à l'application de l'AMF. La double inoculation avec *Rhizobium* augmente significativement la nodulation, l'activité de la nitrogénase et la tolérance des plantes à la salinité. Les légumineuses possédant un taux élevé de colonisation vésiculaire par l'AMF (50–70%) avaient des biomasses sèches des racines et des feuilles, une teneur en chlorophylle, un nombre de nodules significativement plus élevés et une augmentation des concentrations de P, N et Mg⁺⁺ par rapport aux plants non mycorhizés (Naveed *et al.*, 2015).

6- Actinobacteria

De nombreux genres d'Actinobacteria ont été identifiés comme «Aides» du processus symbiotique Rhizobia–légumineuses (Solans et Vobis, 2013). Les actinomycètes sont attrayants car leurs métabolites secondaires pourraient être des sources prometteuses de nouveaux antibiotiques et de régulateurs de croissance pour d'autres organismes. Plusieurs auteurs ont signalé une accumulation plus importante d'azote dans les tiges et une augmentation du poids des graines de soja en raison de la double inoculation de la souche P4 de *Streptomyces* et *B. japonicum* (Swarnalakshmi *et al.*, 2016). Plusieurs travaux ont affirmé que l'un des mécanismes probables par lequel *Streptomyces lydicus* WYEC108 augmentait la taille moyenne des nodules et améliorait la vigueur, la longévité et la capacité de fixation de l'azote des bactéroïdes dans les nodules est une amélioration de l'assimilation nodulaire du fer et éventuellement d'autres nutriments du sol (Swarnalakshmi *et al.*, 2016).

L'analyse de la cinétique de la nodulation dans les cas de la co-inoculation suggère que l'effet des Actinobacteria opérant au début du processus d'infection et de nodulation des racines maintient le taux de nodulation initial plus longtemps que lorsque les bactéries fixant le N₂ sont inoculées seules. De même, Tokala *et al.* (2002) ont émis l'hypothèse que les Rhizobia pourraient utiliser les sites de colonisation racinaire des *Streptomyces* en tant que sites d'infection préférentiels ou opportunistes, où *Streptomyces lydicus* WYEC108 colonise simplement les jeunes poils absorbants des plants de pois en germination.

La co-inoculation avec ces PGPR peut affecter indirectement le dénombrement et augmenter l'activité d'autres microorganismes du sol. Les bactéries qui favorisent la croissance peuvent exercer une influence directe sur les plantes, car elles facilitent l'absorption des nutriments dans l'environnement et la production de phytohormones. Elles peuvent également avoir une influence indirecte en réduisant les effets nocifs et en protégeant les plantes contre les organismes pathogènes (Sharma *et al.*, 2016).

6-1- Caractéristiques générales des Actinobacteria

Les Actinobacteria encore appelées actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, filamenteuses, aérobies, hétérotrophes et mésophiles. Elles ont une teneur en GC% supérieure à 55% qui les différencie des autres bactéries (Trujillo *et al.*, 2015). Les actinobactéries sont capables de former des hyphes ramifiés fragmentés ou non et des spores asexuées (Lechevalier et Lechevalier, 1981). La croissance de ces bactéries donne naissance à des colonies circulaires constituées de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination qui provient de deux substantifs grecs 'aktis' : rayon et 'mykes' : champignon, qui signifie « champignons à rayons » ou « champignons rayonnant » (Barka *et al.*, 2016). En outre, elles forment phylogénétiquement une branche à part et sont caractérisées par une très grande diversité morphologique, pouvant aller de la forme cocci à la forme mycélienne parfaite (Goodfellow *et al.*, 2012).

Les Actinobacteria sont reconnues comme l'une des plus grandes unités taxonomiques dans le domaine des bactéries (Chaudhary *et al.*, 2013). Leur taxonomie est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques, chimiotaxonomiques et génomiques (Tiwari et Gupta, 2013). Ainsi, le traitement basé essentiellement sur la phylogénie de l'ARNr 16S, a considérablement modifié tous les niveaux de leur taxonomie. Selon la deuxième édition du « Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 2012 », le phylum des Actinobacteria est ainsi divisé en six classes, 22 ordres et de nombreuses familles (Annexe 1) (Goodfellow *et al.*, 2012).

La physiologie diversifiée et la flexibilité métabolique des Actinobacteria leur permettent de survivre sous des conditions diverses. Ces espèces sont les plus grands producteurs d'enzymes extracellulaires comme les amylases, les xylanases, les lipases, les chitinases, les cellulases, les protéases... Elles sont responsables de la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose...) (Lima *et al.*, 2017). Elles sont également responsables de la biosynthèse de nombreux métabolites bioactifs ainsi que la

production de pigments et de composés volatils qui donnent au sol son odeur caractéristique (Sharma *et al.*, 2014).

Les Actinobacteria sont des microorganismes très ubiquistes, colonisant des niches écologiques très diverses et en particulier le sol (Khasabuli et Kibera, 2014). Les Actinobacteria du sol sont surtout présentes en surface, on estime qu'elles sont réparties à raison de 10^6 à 10^9 cellules par gramme de sol (Barka *et al.*, 2016). Le nombre et le type d'Actinobacteria présentes dans le sol sont fortement influencés par la température, le pH, le type de sol, la teneur en matière organique, les pratiques culturales, l'aération et la teneur en eau (Amule *et al.*, 2018a ; Amule *et al.*, 2018b)

La plupart des Actinobacteria sont des organismes saprophytes, qui passent la majeure partie de leur cycle de vie sous forme de spores semi dormantes, en particulier dans les conditions limitées en nutriments, tandis que d'autres sont des symbiotes bénéfiques (Barka *et al.*, 2016). Ces bactéries peuvent être également des épiphytes ou endophytes des tissus végétaux de nombreux hôtes, notamment l'orge, le blé, le riz, le soja, le niébé, le pois chiche, la banane, la tomate et les plantes médicinales. Parmi elles, *Streptomyces* est le genre prédominant, suivi par *Actinomadura*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Mycobacterium*, *Saccharopolyspora*, *Frankia* et *Verrucosipora* (Sathya *et al.*, 2017).

IV- Caractéristiques PGP des Actinobacteria et des Rhizobia

Dans l'écosystème rhizosphérique, l'interaction hôte-microbiote est un concept établi. Cette région est considérée comme vitale pour la vigueur et le développement des plantes. Cette relation de symbiose microbienne complexe, affinée et diversifiée est régie par des pressions sélectives réciproques. Les bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes, qualifié de PGPR colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes. Son interaction avec les plantes évoque divers types de réponses locales et systémiques qui améliorent la capacité métabolique des plantes à lutter contre les stress abiotiques

En se basant sur leurs activités fonctionnelles, les PGPR sont classées comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des nutriments pour la plante), phytostimulateurs (promotion de la croissance des plantes, généralement par la production de phytohormones), rhizoremediateurs (dégradation des polluants organiques) et

biopesticides (contrôle des maladies, principalement par la production d'antibiotiques et de métabolites antifongiques) (Somers *et al.*, 2004). En outre, dans la plupart des cas étudiés, une seule PGPR montre souvent des modes d'action multiples (Ahemad et Kibret, 2014) (Fig. 5)

Comme toutes les PGPR les Rhizobia et les Actinobacteria emploient également à la fois de mécanismes directs et indirects ayant une influence sur la croissance et la protection des plantes soit légumineuses ou non légumineuses. La diversité et l'interaction entre ces bactéries et les plantes seront discutées, en se concentrant sur leurs aspects écologiques et leurs applications potentielles en agriculture.

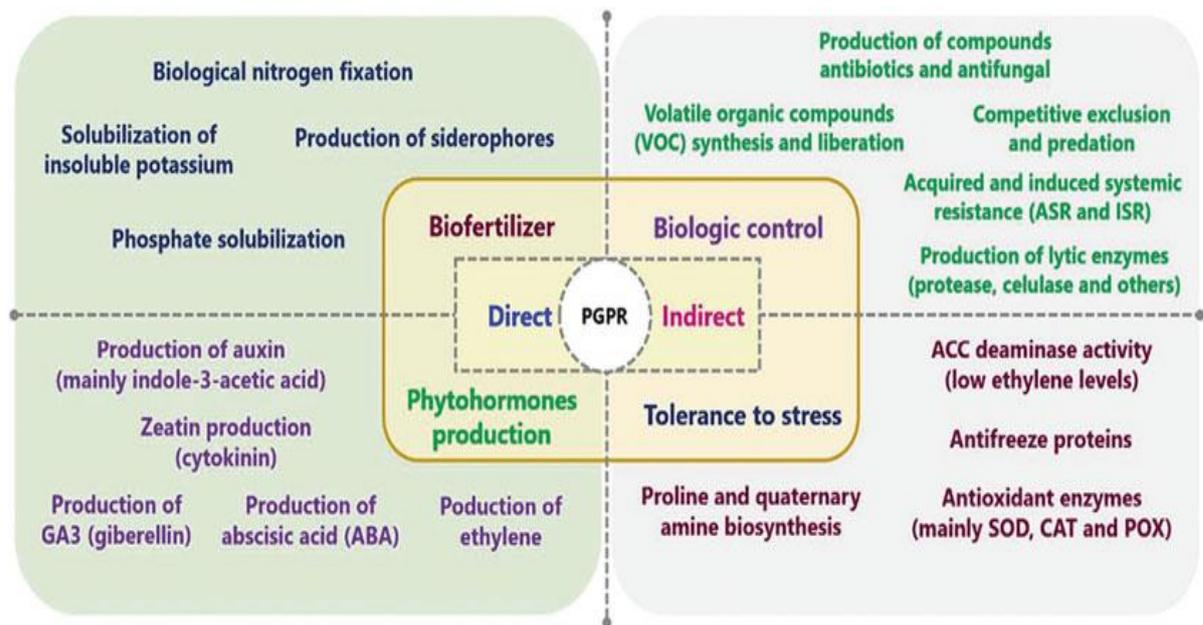


Fig.5 : Mécanismes directs et indirects médiés par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Figueiredo *et al.*, 2016).

1- Biofertilisation

1- 1- Fixation d'azote

L'azote est un nutriment vital pour la croissance et la productivité des plantes. Différents microorganismes de la rhizosphère assurent une fixation biologique de l'azote et le transforment en ammoniac, forme assimilable par la plante à l'aide d'un système enzymatique complexe connu sous le nom de nitrogénase (Sathya *et al.*, 2017).

Les PGPR ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique et le fournir aux plantes par deux mécanismes : symbiotique et non symbiotique (Gouda *et al.*, 2018). La fixation symbiotique de l'azote est une relation de mutualisme entre la plante et la bactérie (Gupta *et al.*, 2015). Les associations les plus connues sont celles des Rhizobiaceae et des Actinobacteria (Sathya *et al.*, 2017). Les Rhizobia, comme décrit précédemment, établissent des relations symbiotiques avec des légumineuses caractérisées par la formation de nodosités sur les racines hôtes. En plus des rhizobia, le genre *Frankia* appartenant aux Actinobacteria est un fixateur polyvalent d'azote, chez les non légumineuses (arbres et arbustes ligneux) dans des conditions de symbiose et de vie libre. Il infecte les cellules racinaires des plantes actinorhiziennes soit par une infection intracellulaire des poils racinaires ou par une invasion des racines intercellulaires (Nimaichand *et al.*, 2016).

La fixation de l'azote peut aussi être non symbiotique chez les non légumineuses. Elle peut être assurée par plusieurs Actinobacteria endophytes comme *Arthrobacter*, *Agromyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, et *Streptomyces* (Sathya *et al.*, 2017). En effet, la fixation non symbiotique fournit en général un flux d'azote plus faible aux plantes associées que la fixation symbiotique (Swarnalakshmi *et al.*, 2016 ; Numan *et al.*, 2018). Cependant, elle présente une grande importance agronomique (Gupta *et al.*, 2015).

1-2 -Solubilisation du Phosphate

Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance (Franco-Correa et Chavarro-Anzola, 2016). Il joue un rôle important dans pratiquement tous les processus métaboliques majeurs de la plante, y compris la photosynthèse, le transfert d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse de macromolécules et la respiration (Gouda *et al.*, 2018).

Le phosphore est présent dans le sol à la fois sous forme organique (phosphomonoesters et phosphotriesters) et inorganique (composés minéraux insolubles) (Oteino *et al.*, 2015). Malgré son abondance dans le sol, les plantes ne l'assimilent que sous deux formes solubles (les ions monobasiques et diabasiques). La capacité de certains micro-organismes à convertir le phosphate insoluble en une forme accessible est une caractéristique importante des PGPR pour augmenter leur rendement (Zaidi *et al.*, 2015). Les principaux mécanismes de la solubilisation des phosphates employés par les PGPR comprennent :

(1) la solubilisation après libération d'acides organiques de faible poids moléculaire (Gouda *et al.*, 2018), comme l'acide citrique, gluconique, lactique, malique, oxalique,

propionique, et succinique (Sathya *et al.*, 2017). La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduit à l'acidification de l'environnement des cellules microbiennes et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique (Saharan et Nehra, 2011 ; Nimaichand *et al.*, 2016).

(2) La minéralisation du phosphore organique se fait par la libération d'enzymes extracellulaires phytases et phosphatases catalysant l'hydrolyse des esters phosphoriques (Franco-Correa et Chavarro-Anzola, 2016).

(3) la libération de phosphate pendant la dégradation du substrat (minéralisation biologique des phosphates) est une autre stratégie (Gupta *et al.*, 2015).

Plusieurs genres bactériens solubilisent le phosphate comme les Rhizobia (*R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *M. mediterraneum*, *Bradyrhizobium sp.* et *B. japonicum*) (Gopalakrishnan *et al.*, 2015), *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flavobacterium* et *Serratia* (Gouda *et al.*, 2018) et les Actinobacteria comme *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Nocardia* (Sathya *et al.*, 2017). Ces bactéries pourraient donc constituer une source prometteuse comme agents biofertilisants dans l'agriculture (Oteino *et al.*, 2015 ; Zaidi *et al.*, 2015).

1-3 -Solubilisation du potassium

Le potassium (K) est un macronutriment essentiel pour la croissance des plantes. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% existe sous forme de roches insolubles et de minéraux silicatés. En plus d'augmenter la résistance des plantes aux maladies, aux parasites et aux stress abiotiques, le potassium joue également un rôle important dans l'activation enzymatique, la synthèse protéique et la photosynthèse (Amaresan *et al.*, 2018). Sans potassium adéquat, les plantes ont des racines mal développées, une faible production de graines, un taux de croissance lent et un rendement inférieur. La capacité de quelques micro-organismes à convertir le potassium insoluble en forme accessible est un trait important des PGPR (Gouda *et al.*, 2018). Le principal mécanisme de solubilisation du potassium de ces bactéries est la production d'acides organiques tels que l'oxalate, le succinate et le citrate (Figueiredo *et al.*, 2016). Les bactéries les plus impliquées dans la solubilisation du potassium sont notamment *Arthrobacter sp.*, *Streptomyces spp.* (Etesami *et al.*, 2017), *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Klebsilla*, *Erwinia* (Wang *et al.*, 2020), *Acidothiobacillus spp.*,

Bacillus edaphicus, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia* spp. et *Paenibacillus* spp. (Dos Santos *et al.*, 2020).

2 -Phyostimulation

2-1- Production d'hormones de croissance

L'un des mécanismes directs de promotion de la croissance des plantes utilisé par les PGPR est la production de phytohormones telles les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscissique. Ce sont des composés organiques naturels qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations (Vejan *et al.*, 2016 ; Vargas *et al.*, 2017). Ces phytohormones sont impliquées dans la régulation de plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaire, la différenciation tissulaire et l'augmentation de l'absorption des nutriments et de l'eau (Gouda *et al.*, 2018) (Fig. 6).

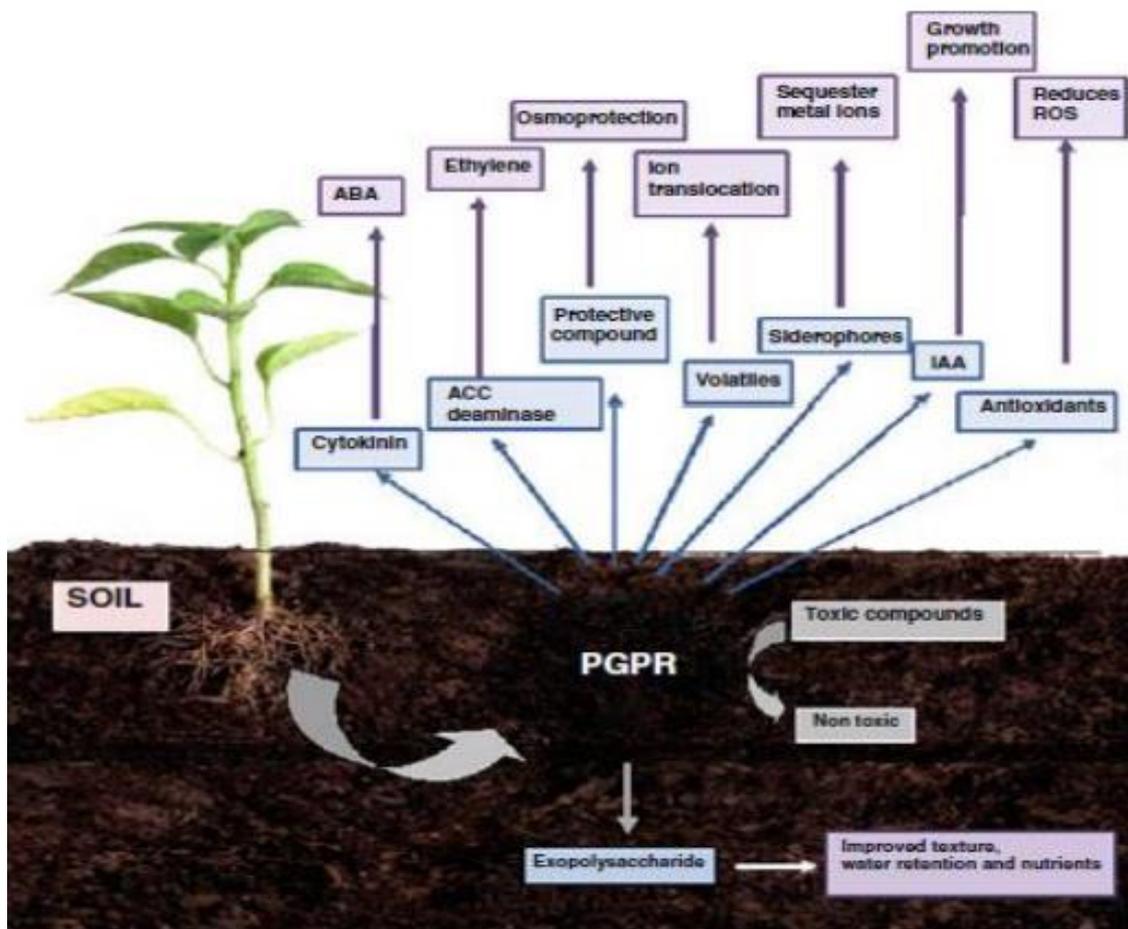


Fig.6 : Modalités de l'atténuation du stress osmotique par les PGPR (Yang *et al.*, 2009). ABA : Acide abscissique, AIA : acide indole acétique, ROS : Dérivé réactif d'oxygène

2-1-1-Acide indole acétique (AIA)

L'acide indole acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus répandue chez les plantes (Franco-Correa et Chavarro-Anzola, 2016) et quantitativement la plus produite par les PGPR (Gouda *et al.*, 2018). L'AIA fonctionne comme une molécule de signal importante dans la régulation du développement des plantes (Ruzzi et Aroca, 2015). Généralement, il affecte la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales ; stimule la germination des graines des semences et des tubercules; augmente le taux de développement du xylème et des racines; contrôle les processus de croissance végétative et initie la formation des racines latérales et adventives. Il intervient également dans les tropismes en réponse à la gravité (gravitropisme) ou à la lumière (phototropisme), affecte la photosynthèse, la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites et la résistance aux conditions de stress (Ahemad et Kibret, 2014 ; Gupta *et al.*, 2015). L'AIA est également impliqué dans la fixation d'azote (Sahasrabudhe, 2011) et l'initiation et le développement des nodules chez les légumineuses telles que *Medicago* (Martinez-Hidalgo *et al.*, 2014).

La capacité à produire cette phytohormone est rapportée chez (80%) des bactéries rhizosphériques. En effet, le tryptophane est le principal précurseur de la biosynthèse de l'AIA chez les bactéries, le récupérant à partir des exsudats racinaires (Gupta *et al.*, 2015). Selon Ahemad et Kibret (2014), au moins cinq voies ont été décrites pour la biosynthèse de l'AIA chez les microorganismes, dont la plupart présentent une similarité avec celles décrites chez les plantes, bien que certains intermédiaires puissent différer. Cependant, la formation de l'AIA via la voie de l'acide indole-3-pyruvique et la voie de l'indole-3-acétaldéhyde est le mécanisme le plus commun chez les bactéries (Gupta *et al.*, 2015). En effet, il a été rapporté que parmi les communautés bactériennes du sol, plusieurs genres tels que *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Gupta *et al.*, 2015), *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* (Ferreira *et al.*, 2019) *Streptomyces*, *Frankia*, *Nocardia* et *Kitasatospora* sont capables de produire l'AIA participant ainsi à la promotion de la croissance de plusieurs plantes économiquement importantes (Numan *et al.*, 2018).

2-1-2-Cytokinines

Les cytokinines sont des phytohormones qui jouent un rôle crucial dans pratiquement tous les aspects de la croissance et du développement des plantes tels que la division cellulaire l'activation de la germination des graines, la régulation de la différenciation vasculaire, la promotion de la ramification, la croissance des racines et le développement des fleurs et

des fruits. Cependant, l'effet physiologique le plus dominant des cytokinines est l'élongation des tiges (Vejan *et al.*, 2016) et le développement des nodules fixateurs d'azote chez les légumineuses (Davies, 2018), en particulier pour l'initiation des divisions des cellules corticales des racines et l'induction de l'expression des gènes dans la voie de signalisation des facteurs Nod (Wang *et al.*, 2018).

En effet, ce type de molécules peut être produit par plusieurs PGPR comme *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis* (Gupta *et al.*, 2015) et divers genres d'Actinobacteria (Van der Meij *et al.*, 2017) tels que *Streptomyces* (Sharma *et al.*, 2014) et *Arthrobacter* (Gouda *et al.*, 2018). Cependant, les souches de *Rhizobium* sont signalées comme les bactéries les plus productrices des cytokinines (Patil *et al.*, 2017) et en particulier *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* et *Sinorhizobium meliloti* (Goswami *et al.*, 2016).

2-1-3-Gibbérellines

Les gibbérellines sont principalement impliquées dans plusieurs processus de développement des plantes tels que la division cellulaire, la germination des graines, l'élongation des tiges, la floraison et le développement des fruits (Vejan *et al.*, 2016). Elles semblent être nécessaires à différentes étapes de la nodulation des légumineuses (Vargas *et al.*, 2017). Leur production est détectée chez diverses PGPR telles *Azotobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* (Gupta *et al.*, 2015), *Rhizobium*, *S. meliloti* (Gopalakrishnan *et al.*, 2015) et diverses Actinobacteria rhizosphériques et endophytes (Van der Meij *et al.*, 2017).

2-1-4- Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

L'éthylène est une hormone végétale synthétisée d'une manière endogène par les plantes (Aamir *et al.*, 2013). Elle est impliquée dans beaucoup de processus physiologiques, comme la croissance et l'élongation des racines, la germination des graines, la floraison, la maturation des fruits, l'abscission des feuilles, la régulation de la sénescence et la formation de nodules (Dos Santos *et al.*, 2020). Cependant, dans des conditions de stress telles que celles générées par la salinité, la sécheresse, l'exploitation de l'eau, les métaux lourds et la pathogénicité, le taux d'éthylène endogène augmente significativement, ce qui affecte négativement la croissance globale des plantes (Ahemad et Kibret, 2014). Certaines des conséquences de la surproduction de cette molécule comprennent l'induction de la défoliation et les processus cellulaires qui conduisent à l'inhibition de la croissance des

racines et des tiges en même temps que la sénescence prématurée, ce qui entraîne une plus faible performance des cultures (Vejan *et al.*, 2016). De plus, l'éthylène, à forte concentration, empêche le développement des nodules (Aamir *et al.*, 2013) et affecte la fixation de l'azote chez les légumineuses (Vejan *et al.*, 2016).

La surproduction de l'éthylène en réponse aux stress biotiques et abiotiques conduit à l'inhibition de la croissance de la plante dans son ensemble (Ahemad et Kibret, 2014). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme capable de cliver l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique), le précurseur immédiat de l'éthylène en ammoniac et en α -cétobutyrate, favorisant ainsi la croissance et le développement des plantes en diminuant les niveaux d'éthylène (Ruzzi et Aroca, 2015). Les PGPR produisant cette enzyme soulageraient ainsi la plante de plusieurs stress causés par la salinité élevée, la sécheresse, les métaux lourds et les effets des agents pathogènes (Van de Poel et Van Der Straeten, 2014).

L'ACC désaminase est synthétisée par plusieurs genres bactériens tels *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Rhizobium* (Kenneth *et al.*, 2019), *Bradyrhizobium* (Gopalakrishnan *et al.*, 2015) et de nombreuses Actinobacteria comme *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardia* et *Rhodococcus* (Sathya *et al.*, 2017).

De nombreuses 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 (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). L'inoculation par ces bactéries favorise l'élongation racinaire de la plante, stimule la croissance des tiges, facilite l'absorption de N, P et K, améliore la nodulation rhizobienne et induit la tolérance à la salinité et la sécheresse chez diverses cultures (Ahemad et Kibret, 2014). Ainsi, l'inoculation des semences avec des rhizobactéries productrices de l'ACC désaminase est l'approche la plus prometteuse afin d'améliorer la production et le rendement des cultures dans les régions touchées par la salinité (Chaudhary et Sindhu, 2017).

3 - Biocontrôle

3-1- Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans la rhizosphère, une réduction de la maladie chez les plantes, peut être associée à une colonisation importante des racines ou des sites d'infection par les rhizobactéries bénéfiques, ce qui peut se traduire par une réduction de l'espace nécessaire à la croissance du pathogène. Ainsi, la PGPR doit être présente sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique et être capable d'instaurer une compétition pour les éléments

nutritifs indispensables à la survie et au développement des organismes pathogènes (Beneduzi *et al.*, 2012).

Un autre aspect important de la compétitivité d'une PGPR est sa capacité à utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faibles concentrations et persister longtemps dans le sol (Labuschagne *et al.*, 2010). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant la colonisation racinaire sont la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme, les lipopolysaccharides (LPS) et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (Kenneth *et al.*, 2019).

3-2- Antibiose

L'antibiose est considérée comme l'un des mécanismes les plus puissants utilisés par les PGPR contre les phytopathogènes dans le sol (Gupta *et al.*, 2015). Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites ayant des propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Saharan et Nehra, 2011).

Les Actinobacteria se classent parmi les microorganismes les plus actifs en production d'antibiotiques (Agadagba, 2014) dotés d'un large spectre d'activités : antibactérienne, antifongique, antivirale et antiparasitaire (Sathya *et al.*, 2017).

L'antibiose est également l'un des mécanismes efficaces des Rhizobia pour prévenir la prolifération des phytopathogènes par le biais de la synthèse de composés antimicrobiens, en particulier des bactériocines ayant un spectre d'activité bactéricide plus ou moins large sur les germes pathogènes, par exemple : la trifolitoxine sécrétée par *R. Leguminosarum* bv. *Trifolii* et la rhizobiotoxine élaborée par *B. Japonicum* (Patil *et al.*, 2017). En effet, de nombreuses espèces rhizobiennes telles *B. japonicum*, *S. meliloti* et *R. leguminosarum* sont antagonistes aux pathogènes fongiques y compris *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* et *Fusarium solani*. (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Il a été également souligné que les Rhizobia ont également la capacité d'inhiber une variété de bactéries phytopathogènes comme *Clostridium* sp., *Vibrio* sp., *Enterobacter* sp. et *Pseudomonas savastanoi* (Vargas *et al.*, 2017).

3-3-Production d'enzymes

La production d'enzymes est un autre mécanisme de lutte biologique utilisé par les PGPR pour limiter la prolifération des agents phytopathogènes. Ces bactéries sont capables de synthétiser une grande variété d'enzymes extracellulaires (Martinez-Hidalgo *et al.*, 2014), telles que les nucléases, lipases, glucanases, xylanases, amylases, protéinases, peptidases, peroxydases, chitinases, cellulases, ligninases, pectinases, hemicellulases et kératinases

pouvant lyser les cellules des germes pathogènes (Sathya *et al.*, 2017). Grâce à l'action de ces enzymes, ces rhizobactéries jouent un rôle très important dans la promotion de la croissance des plantes, en les protégeant contre le stress biotique par la suppression des champignons pathogènes (Gupta *et al.*, 2015). En effet, il a été montré que des souches de *Pseudomonas fluorescens* LPK2, *Sinorhizobium fredii* KCC5 (Gouda *et al.*, 2018) et *Streptomyces* (Nareshkumar *et al.*, 2016) produisent la bêta-glucanase et la chitinase inhibant la croissance de *Fusarium oxysporum*, agent de la fusariose (Vejan *et al.*, 2016).

3-4- Compétition pour le fer et la production de sidérophores

Le fer est un micronutriment indispensable pour la majorité des organismes vivants, y compris les bactéries, les champignons et les plantes. Le fer participe aux réactions d'oxydo-réduction et il constitue un cofacteur fondamental dans un certain nombre d'enzymes tels les cytochromes, la catalase, la peroxydase, les ribonucléotides réductases et la nitrogénase (Paul et Dubey, 2015). Bien que le fer soit présent sur terre en grande quantité, il est inaccessible aux plantes et aux microorganismes. Dans l'environnement aérobie, le fer se présente principalement sous forme de Fe^{3+} et est susceptible de former des hydroxydes et des oxyhydroxydes insolubles, le rendant ainsi inaccessible aux plantes et aux microorganismes (Sathya *et al.*, 2017).

Sous des conditions limitantes en fer, les PGPR synthétisent des composés à faible poids moléculaire (~ 500-1000 Daltons) appelés sidérophores (Gouda *et al.*, 2018) qui se caractérisent par une très forte affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}) (Sathya *et al.*, 2017), permettant sa solubilisation et son extraction à partir de complexes minéraux ou organiques dans l'environnement (Vejan *et al.*, 2016).

Il existe une très grande diversité de sidérophores bactériens avec plus de 500 types identifiés à ce jour, de structures chimiques différentes. Ils se répartissent en trois grandes familles selon le groupe fonctionnel caractéristique : hydroxamates, catécholates et carboxylates. (Franco-Correa et Chavarro-Anzola, 2016).

Les sidérophores libérés par les PGPR chélatent le fer minéral (Fe^{3+}) par la formation d'un complexe soluble (sidérophores / Fe^{3+}) et le transportent vers la cellule microbienne où il est repris par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires spécifiques capables de le reconnaître et de le transporter par un mécanisme actif. Une fois dans la cellule, le complexe va donc se dissocier, et le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). Ainsi, Fe^{2+} va être utilisé par la cellule, tandis que le sidérophore dissocié du fer est alors recyclé vers le milieu extracellulaire (Zaidi *et al.*, 2015).

Les sidérophores peuvent aussi jouer un rôle crucial dans la protection des plantes contre les organismes phytopathogènes (surtout les champignons) en privant ces derniers du fer disponible dans la rhizosphère. Bien que les champignons phytopathogènes synthétisent également des sidérophores, ceux-ci ont généralement une plus faible affinité pour le fer par rapport à ceux produits par les PGPR (Sathya *et al.*, 2017).

Quoique les sidérophores soient principalement spécifiques du fer, ils peuvent aussi complexer d'autres métaux lourds en les rendant solubles. De ce fait, les sidérophores bactériens aident à atténuer les contraintes imposées aux plantes par des niveaux élevés de métaux lourds dans le sol (Patil *et al.*, 2017 ; Dos Santos *et al.*, 2020)

Enfin, ils ont d'autres fonctions biologiques telles que l'amélioration de la fixation d'azote et l'augmentation de la nodulation. Par conséquent, les souches PGPR productrices de sidérophores peuvent être exploitées comme co-inocula avec les Rhizobia pour apporter une amélioration de la croissance et du développement des légumineuses (Mehboob *et al.*, 2013).

Les bactéries telles *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* (Gupta *et al.*, 2015), *S. meliloti*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* (Naveed *et al.*, 2015), *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Actinomadura* et *Nocardia* produisent des sidérophores (Sathya *et al.*, 2017).

3-5- Composés volatiles

Les composés volatiles produits par les rhizobactéries sont suspectées d'inhiber la croissance de plusieurs phytopathogènes (Saharan et Nehra, 2011). L'émission de ces substances est une caractéristique commune d'une grande variété d'espèces bactériennes telles *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* (Gouda *et al.*, 2018) et *Streptomyces* (Wang *et al.*, 2013).

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire produit par certaines rhizobactéries dont la glycine est le précurseur immédiat (Kenneth *et al.*, 2019). Bien que l'HCN soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par plusieurs organismes, dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition (Saharan et Nehra, 2011). L'HCN est un inhibiteur efficace de la cytochrome c oxydase de la chaîne respiratoire (Audrain *et al.*, 2015) et d'autres métallo-enzymes (Kenneth *et al.*, 2019). En général, il n'y a pas d'effet négatif sur les plantes hôtes par inoculation avec des souches bactériennes productrices de HCN (Kundan *et al.*, 2015). L'HCN joue un rôle dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes (Saharan et Nehra, 2011). Il peut être produit par plusieurs genres bactériens tels *Rhizobium*,

Alcaligenes, Aeromonas, Bacillus, Pseudomonas (Patil *et al.*, 2017) et *Streptomyces* (Anwar *et al.*, 2016).

D'autres composés volatiles tels le 2,3-butanediol et l'acétoïne libérés par des PGPR entraînent une amélioration appréciable de la croissance de la plante en induisant sa résistance aux maladies et sa tolérance aux stress abiotiques (Gouda *et al.*, 2018).

3-6 - Résistance Systémique Induite (RSI)

La résistance systémique induite (RSI) est caractérisée par une colonisation des racines de l'hôte par des rhizobactéries non pathogènes qui sont en mesure de conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par des phytopathogènes (Zaidi *et al.*, 2015). Cette « immunité » s'initie suite à la perception par la plante de molécules dites « éliciteurs » produites par les microorganismes bénéfiques. Ce phénomène fait appel à la reconnaissance par l'hôte d'éliciteurs produits par l'agent inducteur, à la transmission d'un signal pour propager l'état induit dans tous les organes de la plante et à l'expression de mécanismes de défense *sensu stricto* qui permettent de limiter la pénétration du pathogène dans les tissus de la plante (Jourdan *et al.*, 2008). Cette étape nécessite des changements structurels comme la formation de nouveaux obstacles, l'activité accrue des enzymes lytiques, la production des métabolites secondaires et des enzymes extracellulaires (Labuschagne *et al.*, 2010). En effet, de nombreux composants bactériens (lipopolysaccharides, flagelles, sidérophores, lipopeptides cycliques, 2,4-diacétylphloroglucinol, acétoïne et 2,3-butanediol) activent les défenses de la plante contre différentes maladies (Zaidi *et al.*, 2015).

La résistance systémique induite (RSI) implique différentes voies dont la voie de l'acide jasmonique et l'éthylène jouent un rôle crucial dans la stimulation des réponses de défense de la plante hôte contre une variété de pathogènes végétaux fongiques, bactériens et viraux, et aussi vis-à-vis de maladies causées par certains insectes et nématodes (Gupta *et al.*, 2015).

Ce mécanisme se déroule en trois étapes principales (Jourdan *et al.*, 2008).

- 1- Elicitation, les PGPR interagissent avec les racines de l'hôte et produisent des éliciteurs qui sont perçus par la plante ;
- 2- après la reconnaissance des déterminants, un signal est transmis dans l'ensemble de la plante afin de l'alerter ;
- 3- enfin, l'expression des mécanismes de défense de l'hôte. Ainsi, lors d'une éventuelle attaque par un agent phytopathogène, la plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression, elle devient résistante (Jourdan *et al.*, 2008).

Dans le royaume bactérien, la liste des espèces décrites comme inductrices de l'RSI a augmenté rapidement au cours des dernières années. Elle inclut plusieurs espèces bactériennes comme *P. fluorescens*, *Burkholderia phytofirmans*, *B. pumilus*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium leguminosarum*, *P. putida* et *Serratia marcescens* (Dos Santos *et al.*, 2020).

En effet, plusieurs Actinobacteria sont également intensivement étudiées dans le contexte de la lutte biologique basée sur l'induction de la résistance en particulier les espèces de *Streptomyces* qui selon de nombreuses études, se sont montrées comme inducteurs efficaces de la résistance d'une gamme de plantes hôtes, y compris les cultures fourragères, les cultures maraîchères et les espèces ligneuses économiquement importantes telles que l'*Arabidopsis*, la pomme de terre, le chêne et l'eucalyptus (Sathya *et al.*, 2017).

PARTIE PRATIQUE

A- Isolement et caractérisation des Rhizobia

L'objectif de ce travail est d'isoler des Rhizobia à partir des nodules racinaires de la Luzerne (*Medicago sativa*) et caractériser les isolats sélectionnés du point de vue morphologique, biochimique. Leurs effets bénéfiques sur la croissance végétale et leur capacité nodulante sont également effectués.

I- Matériel et Méthodes

1- Collection des isolats bactériens

La collecte des nodules des racines de luzerne est effectuée à partir de trois sites d'échantillonnage localisés à :

Site 1 : ITGC (Institut Technologique des Grandes Cultures) Sétif.

Site 2 : Ferme pilote de Béni Fouda (Sétif)

Site 3 : Ain Oulmene

La collecte des nodules est réalisée au stade de floraison-début gousses. La récolte est effectuée au printemps pendant les mois de Mars et Avril. A cette période de l'année, les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines et de couleur rougeâtre indiquant la présence de la légghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont placées dans des sacs en plastique stériles et transportées immédiatement au laboratoire.

Au laboratoire, les racines sont lavées délicatement à l'eau de robinet, puis à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachés et séchés dans du papier filtre. Ainsi, les nodules frais sont traités immédiatement ou bien conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h pour une utilisation ultérieure.

2- Isolement des bactéries à partir des nodules

2-1- Stérilisation des nodules

Les nodules sont hydratés avec l'eau distillée dans des tubes Eppendorf. Après élimination de l'eau, les nodules sont stérilisés par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium 2% pendant 10 mn puis dans l'éthanol 75 % pendant 5 mn, ensuite, rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile.

2-2-Isolement

Les nodules sont enfin écrasés dans 20µl d'eau distillée stérile. Le jus nodulaire obtenu ou ses dilutions sont ensemencés sur boîte de Pétri contenant le milieu Yeast-Extract-Mannitol-Agar (YEMA) (Annexe 2) (Vincent, 1970) et incubées à 28±2°C pendant 24 à 48h. Les colonies sont repiquées jusqu'à obtention de cultures pures.

Un total de 29 souches est recueilli et réparti comme suit : 11 souches du site 1, 9 souches du site 2, 9 souches du site 3. Les isolats sont conservés à 4°C sur milieu YEMA en gélose inclinée pour une courte durée (6 mois). Pour une conservation de longue durée, les isolats sont conservés dans du bouillon YEM additionné de glycérol à 30% puis gardés à -20°C.

3- Caractérisation morpho-biochimique des isolats

3-1- Caractères morphologiques

L'aspect des colonies est observé sur milieu YEMA. Une description macroscopique selon Somasegaran et Hoben (1994) est faite, relative à la forme, la taille, la couleur et la texture des colonies. L'observation microscopique des bactéries est réalisée après une coloration de Gram.

3-2- Test au rouge Congo

Afin de différencier les Rhizobia des contaminants, les isolats sont ensemencés par spot sur le milieu YEMA contenant le rouge Congo (0,0025%) incubé à 28±2°C pendant 24 à 48h. Les colonies typiques aux Rhizobia n'absorbent pas le rouge Congo ou l'absorbent faiblement par rapport aux contaminants (Somasegaran et Hoben, 1994).

3-3-Test au bleu de Bromothymol

Ce test permet de mettre en évidence la vitesse de croissance des Rhizobia. Un milieu YEMA additionné de 1% (p / v) de bleu de Bromothymol est ensemencé, par spot à partir de cultures bactériennes, incubé pendant 48 h à 28°C (Vincent., 1970). Ce colorant étant un indicateur de pH, il met en évidence l'acidification du milieu par un virage au jaune qui permet de distinguer les souches à croissance rapide (notamment les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, etc.) en 24h d'incubation des autres souches à croissance lente (notamment *Bradyrhizobium*) dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6jours) (Pagano, 2008).

3-4- Test au 3-Cétolactose (Recherche de l'enzyme 3-cétoglucosidase)

Le test du 3-Cétolactose permet de distinguer entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Bernaerts et De Ley, 1963). Ce dernier est le seul genre capable de produire l'enzyme 3-cétoglucosidase. Les souches sont mises en culture à 28°C pendant trois jours sur le milieu yeast-lactose-agar (Annexe 3). La révélation est mise en évidence par l'inondation des

boîtes avec le réactif de Benedict (Annexe 4) à température ambiante. La présence de l'enzyme 3-cétoglucosidase se manifeste par la formation d'un halo jaune de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu dû au réactif de Benedict, alors que l'absence d'un halo jaune signifie un résultat négatif.

3-5-Test au bleu de Méthylène et au violet de Gentiane

Le test consiste à cultiver les souches isolées sur le milieu YEMA contenant le bleu de Méthylène (0,1%) ou le violet de Gentiane (0,1%). Après incubation à 28°C pendant 2 à 7 jour, l'absence de croissance traduit leur appartenance aux Rhizobia qui sont incapables de croître sur ces milieux (Wei *et al.*,2003).

4- Activités PGP des souches *Rhizobium*

Les souches sélectionnées (n=6) se rapportant aux Rhizobia selon les caractéristiques phénotypiques sont testées pour leurs potentialités PGP.

4-1- Solubilisation du phosphate sur un milieu liquide

La capacité de solubilisation des phosphates est testée sur milieu Pikovskaya (PVK) contenant du phosphate tricalcique (Ca_3HPO_4) (Annexe 5) comme seule source de phosphate. Ce milieu estensemencé par un volume (1% v/v) de chaque culture bactérienne et incubé à 28 ± 2 °C/7jours. Les cultures sont ensuite centrifugées à 12000 rpm / 5mn. La quantité du phosphate soluble est mesuré par un dosage colorimétrique.

Dans un tube à essai contenant 0.5 ml du surnageant sont ajoutés 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% et 4ml du réactif coloré (rapport 1 :1 :1 :2 de H_2SO_4 3M, molybdate d'ammonium à 2.5%, acide ascorbique à 10% et eau distillée stérile). Le mélange est incubé à une température ambiante pendant 15 mn. La production du phosphate soluble se traduit par une couleur bleue plus ou moins intense selon le taux du phosphate produit. La concentration du phosphate est déterminé par la mesure de la densité optique à 630 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée pour déterminer la concentration du phosphate (Olsen et Sommers, 1982).

4-2 Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production de l'acide indole acétique (AIA) est testée sur milieu (DF) Dworkin et Foster (Annexe 6) additionné de tryptophane (1g /l) (Dworkin et Foster, 1958). Le milieu estensemencé par 100 µl des cultures bactériennes. Après incubation à 28 ± 2 °C/7jours, les cultures sont centrifugées à 12000 rpm/ 5mn et l'estimation de la quantité d'AIA dans le surnageant est réalisée par dosage colorimétrique selon la méthode de Loper et Scroth (1986). Un volume de 1ml du surnageant est mélangé à 2ml du réactif de Salkowski (50ml d'acide perchlorhydrique 35% et 1ml de FeCl_3 0.5 M). La DO est mesurée à 530 nm. Les

concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue dans un intervalle de 0 à 10^{-5} M d'AIA (Sigma).

4-3- Production de sidérophores

Le milieu King B liquide (Annexe 7), étant donné sa composition exempte de fer, est préconisé pour mettre en évidence la production de sidérophores. Ce milieu estensemencé par 100 μ l de chaque culture et incubé à $28\pm 2^\circ\text{C}$ /72 h. Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm pendant 30mn. 500 μ l du surnageant sont mélangés à 500 μ l de la solution CAS (Shwyn et Neilands, 1987) (Annexe 8) et la DO est mesurée à 630nm après 20mn d'incubation.

Le pourcentage des sidérophores est calculé selon la formule suivante :

$$\text{St-Se/St} \times 100$$

St : DO de la solution CAS de couleur bleue intense (témoin).

Se :DO de la solution de l'échantillon de couleur moins bleue à orange selon l'intensité de production.

5- Inoculations bactériennes, croissance végétale et test de nodulation

La capacité d'induire la formation de nodosités sur les racines de la légumineuse hôte est un critère de base pour la caractérisation des Rhizobia (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1985). De ce fait, des essais de nodulation sont effectués afin d'évaluer la capacité symbiotique des isolats et de déterminer leur infectivité et leur efficacité. L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodules formés sur la racine de chaque plante et l'efficacité est estimée par l'observation de la couleur des nodules et la détermination de gain en matière sèche (partie aérienne) des plantes inoculées.

5-1- Germination aseptique des graines

Les graines de luzerne sont désinfectées à l'éthanol absolu pendant 5 à 10 s puis à l'hypochlorite de sodium (12°) pendant 3 mn. Ensuite, elles sont rincées abondamment à l'eau distillée stérile et mises à germer dans des boîtes de Pétri stériles contenant de l'eau gélosée (0,8%) et placées à l'obscurité à $28\pm 2^\circ\text{C}$ / 48h.

5-2- Culture et inoculation des plantules

Les bactéries sont cultivées sur milieu YEM incubées à $28\pm 2^\circ\text{C}$ / 48h, centrifugées à (12000rpm/10mn) et rincées deux fois avec l'eau distillée stérile puis ajustées à une densité voisine de 10^8 bactéries/ml. Les graines bien germées sont transférées dans des pots contenant 200g de sable tamisé et préalablement lavé puis stérilisé une heure à 121°C en trois cycles séparés par 24h. Trois graines sont semées aseptiquement dans chaque pot,

puis inoculées avec 1 ml de la suspension bactérienne de chaque isolat. Cette opération est répétée deux fois durant l'expérimentation. Trois pots sont utilisés pour chaque souche. Les plantes non inoculées sont utilisées comme témoins négatif (non azoté) et témoins positif (ayant reçu de l'azote : KNO_3 0,5g/L). Enfin, les pots sont placés dans une chambre de croissance à température ambiante avec une photopériode lumière (16h)/obscurité (8h). Les plantules sont arrosées deux fois par semaine avec la solution nutritive dépourvue d'azote (solution de Fährus) (Annexes 9) et de l'eau distillée stérile pour éviter toute contamination extérieure. Après 45 jours de culture, les plantes sont déterrées et inspectées pour la présence ou l'absence de nodules.

6- Analyse des paramètres morpo- biochimiques des plantes

6-1-Paramètres morphologiques

Les racines et les feuilles sont séparées. Leurs tailles et leurs poids frais et secs (après 72h à 65°C) sont déterminés.

6-2-Paramètres biochimiques

Les teneurs en chlorophylle sont déterminées selon la méthode de Arnon (Arnon, 1949). Pour cela, 0.5g de feuilles de chaque échantillon sont découpées en petits segments (1mm^2), homogénéisées dans 10 ml d'acétone à 80% et conservées à -10°C pendant une nuit. L'extrait est ensuite centrifugé à 14000rpm/5mn et l'absorbance du surnageant est lue à 663, 645 et 470 nm. Les teneurs en chlorophylle a (Ch a), b (Ch b), totale (Ch t) et caroténoïdes exprimées en mg/g sont déterminées selon les équations suivantes :

$$\text{Ch a (mg/g)} = 12,41 \text{ DO (663)} - 2,59 \text{ DO (645)}$$

$$\text{Ch b (mg/g)} = 22,9 \text{ DO (645)} - 4,68 \text{ DO (663)}$$

$$\text{Ch t} = \text{Ch a} + \text{Ch b}$$

$$\text{Caroténoïdes (mg/g)} = [(1000 \times \text{DO (470)}) - 1,82 \text{ Ch a} - 85,02 \text{ Ch b}] / 198$$

7- Analyses statistiques

Les résultats sont réalisés en duplicate et exprimés en moyennes \pm écart type (SD). L'analyse statistique des données est réalisée à l'aide du GraphPadPrism 8, une ANOVA unidirectionnelle est utilisée pour identifier la variance entre les différents traitements. Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque les valeurs de $p < 0,05$.

II- Résultats

1- Caractérisation morpho-biochimique des isolats

1-1- Caractérisation des isolats

Les souches isolées à partir des nodules de la luzerne provenant des trois sites sont au nombre de 29 et sont désignées comme suit :

- 11 souches du site 1
- 9 souches du site 2
- 9 souches du site 3

1-2- Caractérisation morphologique et culturale

Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur milieu YEMA. Les colonies sont d'une couleur blanchâtre, d'un diamètre qui varie entre 2 et 4 mm, sous forme ronde avec un contour régulier, une surface semi bombée et lisse. Elles sont translucides, visqueuses et brillantes, avec une texture homogène (Fig. 7). L'observation microscopique de tous les isolats révèle des bâtonnets courts à Gram négatif (Fig. 8).

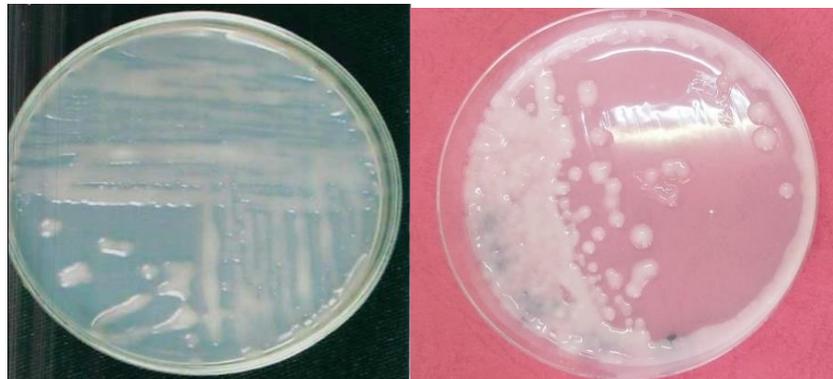


Fig. 7 : Aspect des colonies sur milieu YEMA.



Fig. 8: Observation microscopique de bacilles courts à Gram négatif (Gx100)

1-3-Test au rouge Congo

Tous les isolats n'absorbent pas le rouge Congo et apparaissent de couleur roses à blanchâtres. En général, les *Rhizobium* produisent des colonies blanches ou absorbent faiblement le rouge Congo. Ce dernier est souvent rajouté au milieu de culture pour isoler les *Rhizobium* ou pour tester la purification des cultures rhizobiales, (Fig. 9).

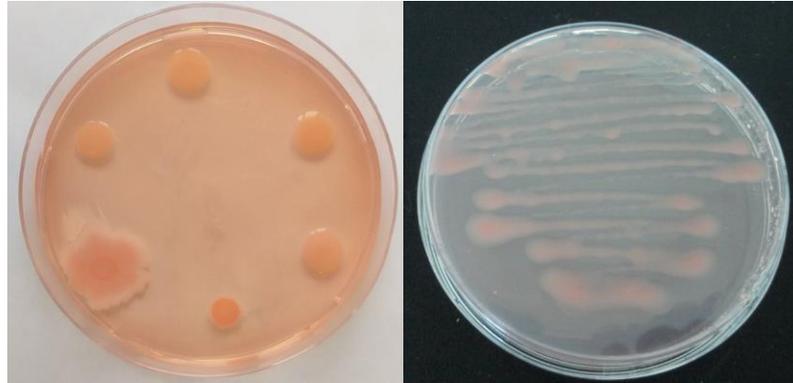


Fig. 9 : Aspect des colonies sur milieu YEMA+ RC

1-4-Test au bleu de Bromothymol

Le Bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BBT vers le jaune) (Fig. 10), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu. Pratiquement tous les isolats modifient le pH sur milieu YEMA+BBT après 48 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes, ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide.



Fig. 10: Aspect des colonies sur milieu YEMA+ BBT (acidification)

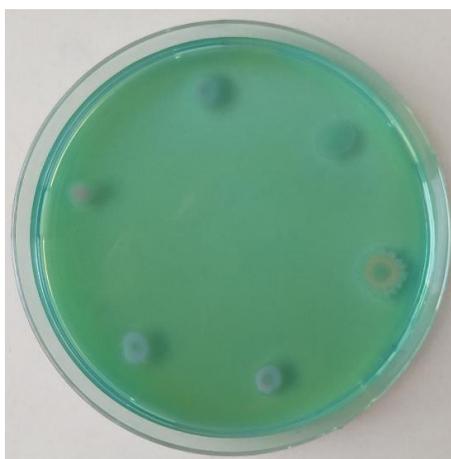
1-5-Test du bleu de Méthylène et du violet de Gentiane

La croissance de tous les isolats sur milieu YEMA supplémenté du bleu de Méthylène ou du violet de Gentiane a été inhibée par ces deux colorants.

1-6-Test du 3-Cétolactose

Après incubation, toutes les souches isolées ont montré un résultat négatif après l'addition du réactif de Benedict (aucun halo n'est observé autour des colonies). De ce fait les isolats ne produisent pas l'enzyme 3- céto-glucosidase (Fig. 11).

Le test céto-lactose est largement utilisé pour différencier les *Rhizobium* des autres bactéries contaminantes. L'absence de zones jaunâtres autour des colonies de *Rhizobium* indique que l'enzyme 3-cétoglucosidase n'existe pas et que les souches sont probablement des *Rhizobium* et non des *Agrobacterium*



**Fig. 11 : Aspect des colonies sur milieu yeast-lactose-agar :
Absence d'halo autour des colonies**

2. Activités PGP des souches *Rhizobium* isolées

Les souches rhizobiennes sélectionnées en plus de leur faculté endogène fixatrice d'azote, elles produisent des sidérophores, de l'AIA et solubilisent les phosphates (Figures 12 A, B, C).

La majorité des souches produisent des sidérophores à des taux relativement bas, seule la souche C2 libère un pourcentage supérieur à 20%. La production d'AIA varie de 9.75 à 26.31 $\mu\text{g/ml}$. Les souches C1 et C3 sont les meilleures productrices et libèrent 26.31 et 21.02 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Les autres souches (A1, B1, et C2) produisent des quantités appréciables d'AIA et supérieures à 13 $\mu\text{g/ml}$. La solubilisation du phosphate a été observée pour l'ensemble des souches, les meilleurs taux sont obtenus pour les souches A1, B1 et C3, qui solubilisent une quantité supérieure à 60 $\mu\text{g/ml}$.

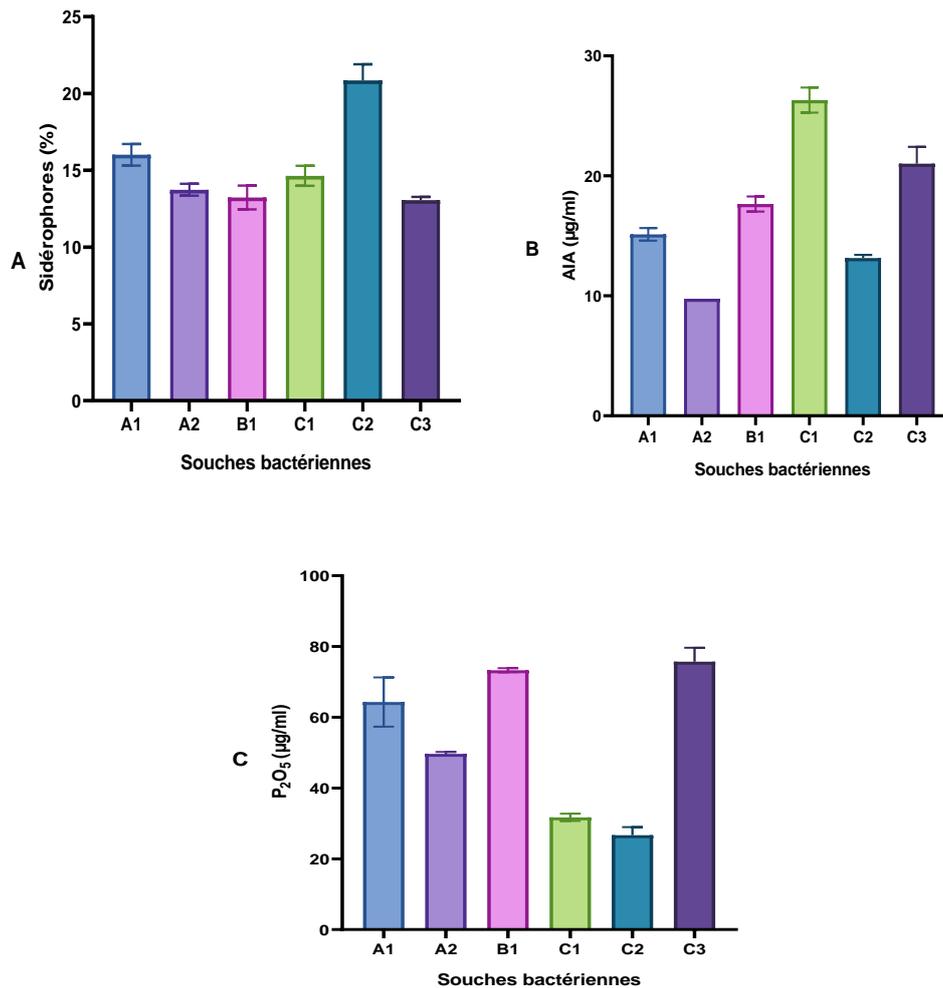


Figure 12 : Activités PGP des souches *Rhizobium*

A : production de sidérophores ; B : production de AIA ; C : solubilisation de phosphate

3-Test de nodulation (Authentification des isolats)

La capacité des souches isolées à former des nodules sur les racines de luzerne demeure le critère de base pour les caractériser comme étant des Rhizobia. Ainsi, le pouvoir infectieux a été examiné pour leur capacité à induire la formation de nodules sur les racines des plantes hôtes cultivées sur sable stérile sous conditions contrôlées. Après 45 jours de culture, aucun nodule n'a été observé sur les racines de la luzerne (Fig. 13).

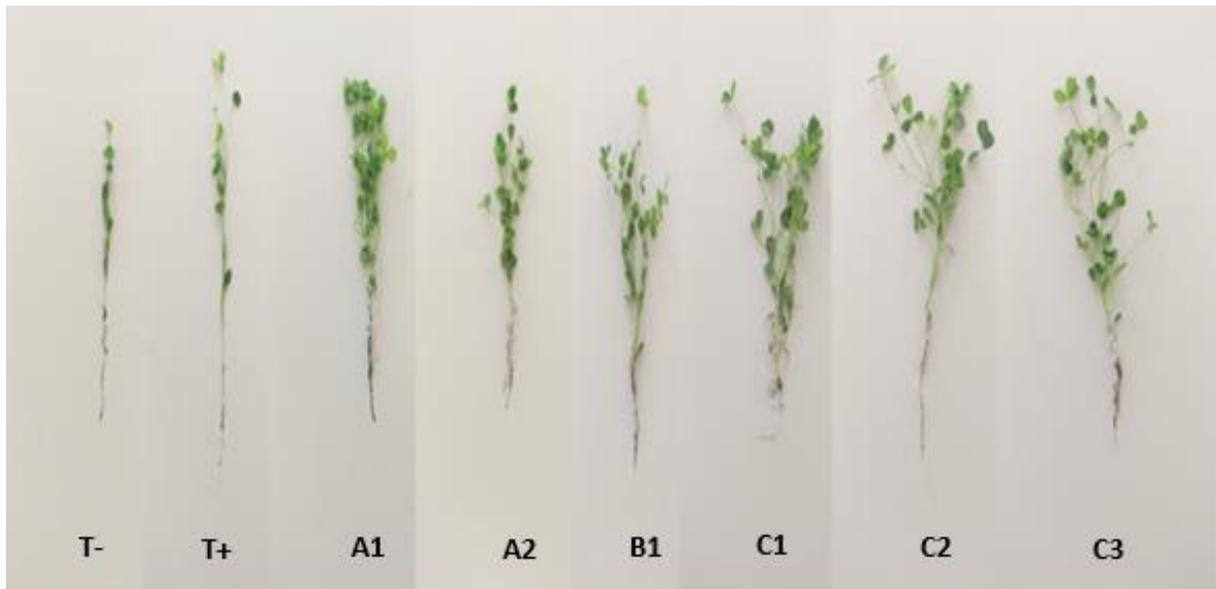
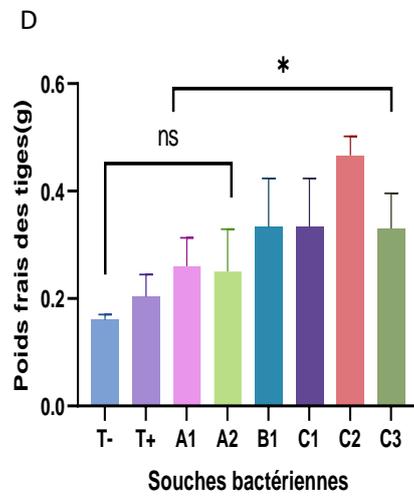
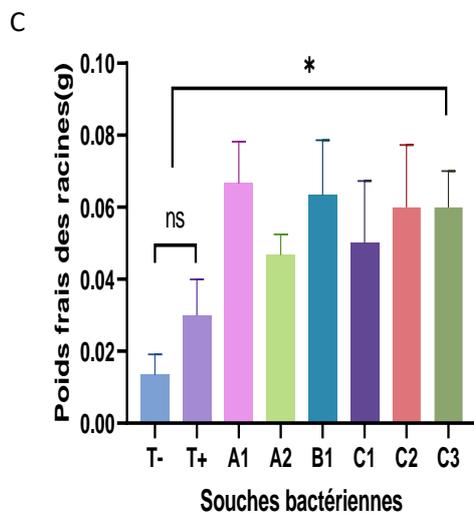
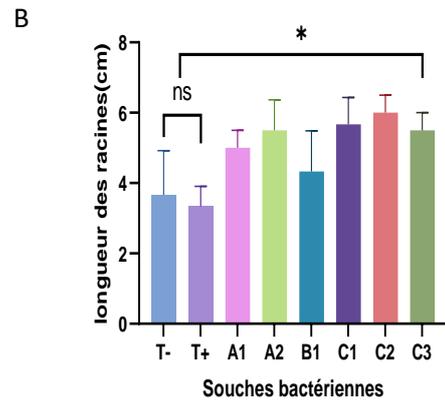
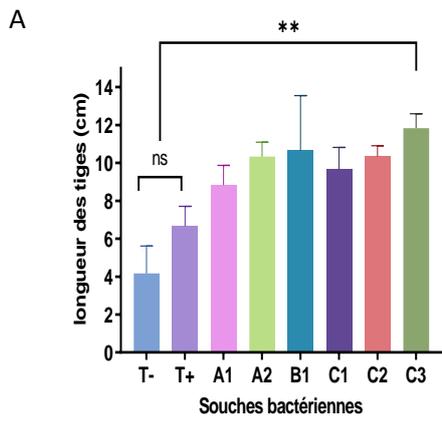


Figure 13 : Effet de l'inoculation par *Rhizobium* sur la croissance végétale de la luzerne.

4 - Paramètres morphologiques de croissance

L'analyse de la variance de l'effet de l'inoculation sur les paramètres morphologiques de croissance de la luzerne par les six souches de Rhizobia (Fig. 13) révèle une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de l'allongement racinaire, de la hauteur de la plante ainsi que du poids frais et sec (Fig. 14 A, B, C, D, E et F). Toutefois, cet effet bénéfique sur les poids frais et sec des tiges est constaté seulement avec les souches B1, C1, C2 et C3 (Fig. 14 D et F).



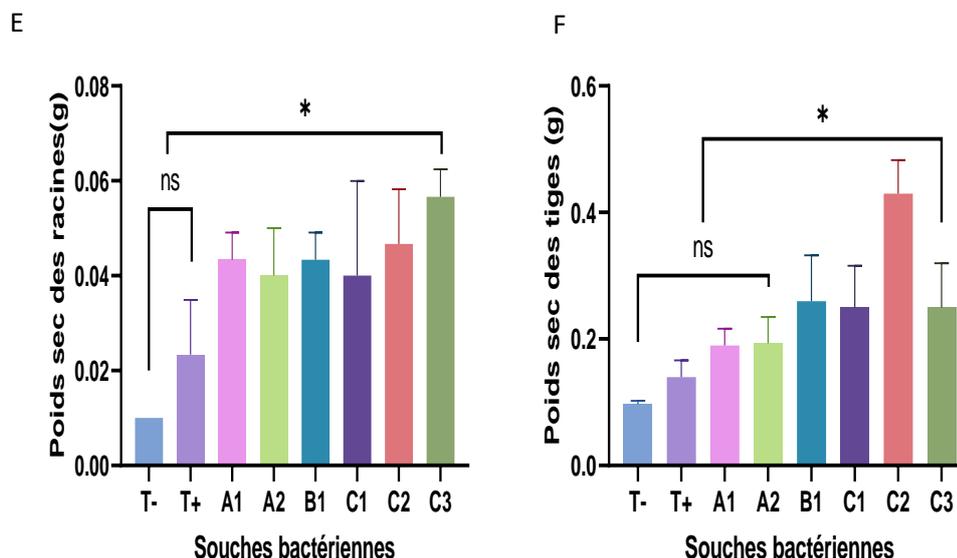


Figure 14 : Effet de l'inoculation par les souches de *Rhizobium* sur les paramètres morphologiques de croissance végétale.

(A) longueur des tiges, (B) longueur des racines, (C) Poids frais des racines, (D) Poids frais des tiges, (E) Poids sec des racines, (F) Poids sec des tiges.

Les données présentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes parmi les traitements à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

5- Paramètres biochimiques

L'analyse de la variance des chlorophylles a, b, (a+b) et les caroténoïdes montre que l'inoculation par les différentes souches de *Rhizobium* augmente significativement ces différents paramètres biochimiques ($p \leq 0,0001$) et que l'effet de l'inoculation par l'ensemble des souches utilisées est bénéfique (Fig. 15 A, B, C et D). Ceci confirme que les Rhizobia ont, en plus de leur pouvoir de fixer l'azote, la capacité d'améliorer la croissance végétale.

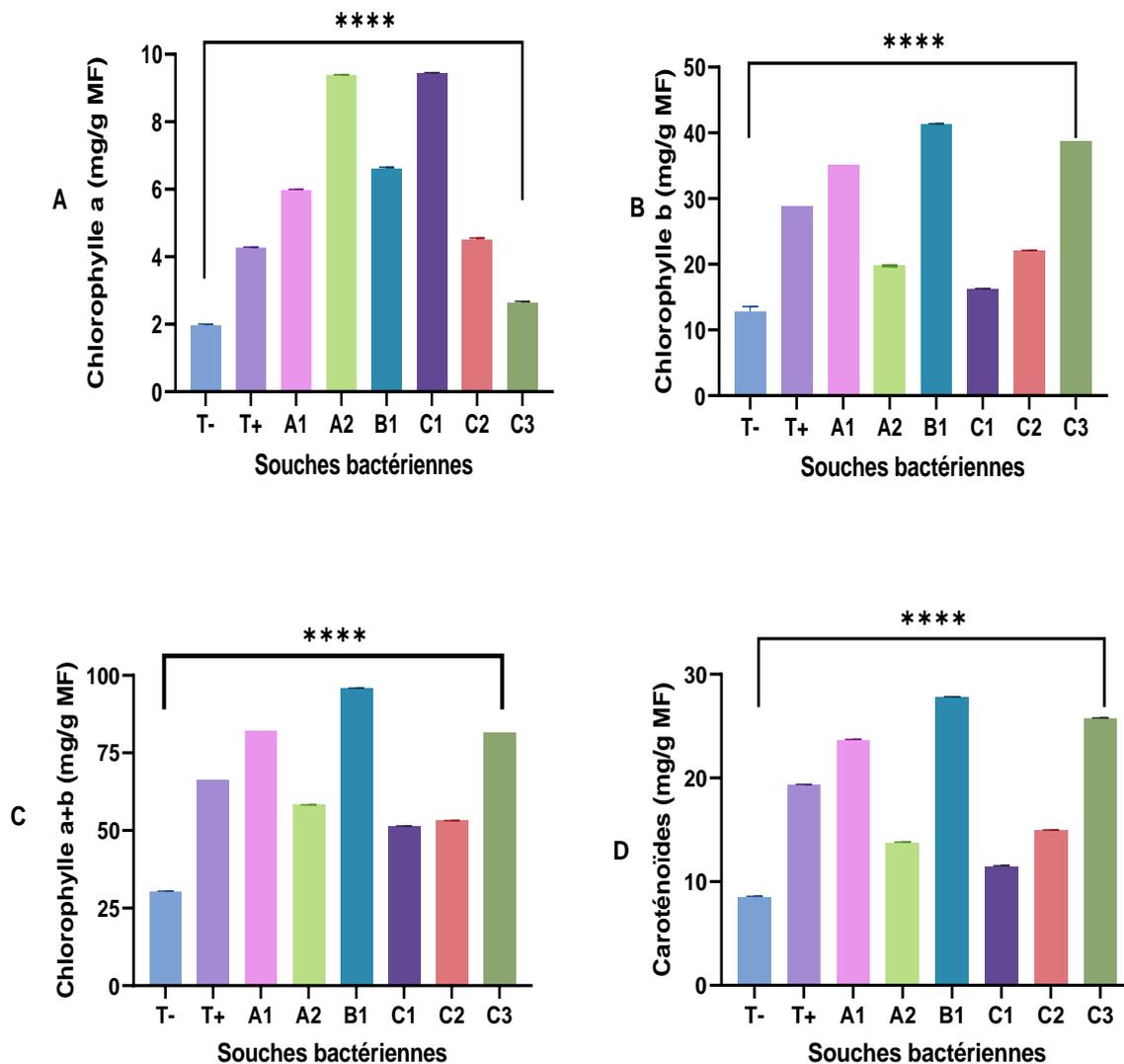


Fig. 15 : Effet de l'inoculation par les souches de *Rhizobium* sur le contenu foliaire en chlorophylles a, b, totale et caroténoïdes (mg /g MF) de Luzerne.

A : chl a, **B** : chl b, **C** : chl (a+b), **D** : caroténoïde.

Les données présentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes parmi les traitements à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

III-Discussion

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les Rhizobia les mieux étudiés, la base de la description formelle de taxon, depuis les espèces et les sous-espèces jusqu'aux genres et familles (Vandamme *et al.*, 1996). Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (Baldani et Baldani, 2005). En dehors de ces informations utiles et utilisables dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, notamment polyphasique, les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches efficaces et compétentes.

Dans le cadre de cette étude, la totalité des isolats cultivés sur gélose YEMA ont présenté au bout de 2 à 3 jours des colonies dont la morphologie, la taille, l'aspect et la texture sont comparables aux caractéristiques morphologiques et culturelles des Rhizobia décrites par Vincent (1970) et Holt *et al.* (1994). Selon Holt *et al.* (1994), la viscosité des colonies est due à la production massive d'exopolysaccharides caractéristique importante chez les Rhizobia. L'observation microscopique de tous les isolats a permis la visualisation de bâtonnets courts à Gram négatif. Il ressort que les résultats obtenus pour l'ensemble des isolats répondent aux caractéristiques des Rhizobia (Vincent, 1970 ; Holt *et al.*, 1994 ; Duhoux et Nicole, 2004).

Par ailleurs, les souches isolées absorbent très peu ou pas le rouge Congo et les colonies restent ainsi roses claires à blanchâtre. Selon Vincent (1970) et Jordan (1984), ceci est observé chez la majorité des *Rhizobium* et cette propriété est aussi commune pour le genre *Bradyrhizobium*. Par contre, le genre *Agrobacterium* et les formes contaminantes absorbent fortement ce colorant et apparaissent rouges. Cultivés sur milieu YEMA supplémenté du bleu de Bromothymol, tous les isolats ont acidifié le milieu, certains ont produit une acidification nette (6 isolats), les autres souches ont donné une légère modification. Selon Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994), les souches à croissance rapide sont généralement des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du bleu de Bromothymol vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisant le milieu de culture, de ce fait, les 6 isolats sont considérés comme des bactéries à croissance rapide. Cependant, le reste des isolats pourraient être des souches *Bradyrhizobium* ou bien des contaminants. Ces résultats concordent aussi avec ceux trouvés par Menna *et al.* (2006) ayant rapporté dans

une étude faite sur des Rhizobia que les souches testées de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* ont acidifié le milieu YEMA + BBT après 24h d'incubation, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives sur le même milieu. D'après les résultats obtenus, il y a eu absence totale de la croissance de tous les isolats ensemencés sur milieu YEMA contenant le bleu de Méthylène (0,1%) ou le violet de Gentiane (0,1%). Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans plusieurs travaux où les Rhizobia isolés ne peuvent pas croître sur le milieu YEMA contenant le bleu de Méthylène ou le violet de Gentiane (Wei *et al.*, 2003). Des résultats qui vont dans le même sens font état de l'isolement de souches de Rhizobia dont la croissance a été inhibée par ces deux colorants (Singh *et al.*, 2008 ; Gauri *et al.*, 2013).

La recherche de l'enzyme 3- céto-glucosidase est un test spécifique pour la distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*. La présence de cette enzyme (résultat positif) est indiquée par l'apparition d'un halo jaune autour de la colonie bactérienne après l'addition du réactif de Benedict, alors que l'absence d'un halo jaune signifie un résultat négatif. Les résultats ont révélé l'absence d'un halo jaune autour des colonies de tous les isolats. De ce fait ces isolats n'oxydent pas le C3 du glycosyl du lactose et ne produisent pas l'enzyme 3- céto-glucosidase (Bernaerts et De Ley, 1963), ce qui les distingue du genre *Agrobacterium* ayant la capacité de produire cette enzyme (Kerstens et Deley., 1984) qui se manifeste par la formation d'un halo jaune autour des colonies (Lindström et Lehtomaki., 1988).

Le criblage des souches isolées pour leur activités PGP montre que la synthèse des hormones de croissance des plantes, dont l'AIA, est une faculté très commune chez les Rhizobia. Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2010). L'AIA est synthétisé par les souches sélectionnées à des taux variables. Les bactéries secrétant une grande quantité d'auxine (soit l'AIA) dans le sol causent une augmentation maximale de la croissance et le rendement des récoltes (Khalid *et al.*, 2004). La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Miraza *et al.*, 2001).

La production des sidérophores influence la croissance des plantes en liant le fer sous sa forme disponible : Fe³⁺ (Whipps, 2001). Par ces fonctions les sidérophores procurent une

protection des plantes contre plusieurs maladies fongiques ou bactériennes (Siddiqui, 2006). Ces composés inhibent la croissance des champignons phytopathogènes (Ramette *et al.*, 2003). Toutes les souches isolées produisent les sidérophores avec des taux relativement faibles à cause de leurs potentialités intrinsèques ou des conditions environnementales (Valdebinito *et al.*, 2006).

La solubilisation du phosphate a été observée pour l'ensemble des souches. Les meilleurs taux sont obtenus pour les souches A1, B1 et C3, qui solubilisent une quantité supérieure à 60µg/ml. Ces espèces améliorent la croissance des plantes en augmentant la disponibilité en phosphore assimilable. Plusieurs espèces du genre *Rhizobium* solubilisent les phosphates et pourraient constituer une source prometteuse comme biofertilisant en plus de leur capacité endogène de la fixation d'azote (Li *et al.*, 2020).

Un des caractères importants pour identifier les isolats nodulaires comme étant des Rhizobia est de prouver leur capacité à réinfecter et former des nodosités sur leur plante hôte en conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994). De ce fait, l'inoculation par les isolats en pots sous conditions contrôlées a échoué. Aucun nodule n'a été observé sur les racines des plantes cultivées. Des résultats comparables ont été obtenus par Muresu *et al.* (2008) dont le travail a porté sur des bactéries isolées des nodules de huit légumineuses qui n'ont pas pu réinfecter leur plante hôte sur plusieurs supports. Ces résultats sont similaires également avec ceux rapportés par Zakhia *et al.* (2006) sur des légumineuses sauvages en Tunisie. Ces résultats concordent aussi avec ceux trouvés par Brundu *et al.* (2004) ayant rapporté que parmi 125 souches isolées à partir des nodules de 15 espèces de *Medicago*, 29 isolats seulement ont pu renoduler leur plante hôte.

Cette incapacité des souches isolées à réinfecter leur plante hôte peut avoir plusieurs explications. Elle peut être due à une insuffisance dans leur compétence d'invasion, la spécificité entre les deux partenaires (bactérie- hôte), la dose optimale de la densité cellulaire de l'inoculum appliqué et la composition des exsudats racinaires de la plante hôte (Nadeem *et al.*, 2013). En effet, il est rapporté dans de nombreux travaux que la symbiose légumineuse-Rhizobia exige la présence de souches bactériennes rhizosphériques compatibles, compétitives et infectives. Ces souches doivent être en nombre suffisant pour maximiser la nodulation et présenter une forte effectivité pour la fixation d'azote (Tian *et al.*, 2010 ; Saidi *et al.*, 2014). En outre, la relation symbiotique Rhizobia-légumineuse peut également être limitée par l'acidité du sol qui peut affecter tous les aspects de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et

de fixation d'azote. L'acidité perturbe également l'adhésion bactérienne à la surface des poils racinaires, lors de la phase d'infection (Richardson *et al.*, 2009). De plus, selon Zahran (2001), les Rhizobia qui survivent dans des conditions défavorables peuvent perdre leur infectivité, à la suite de la perte du plasmide (qui porte les gènes responsables de la symbiose) ou à une modification dans la composition des polysaccharides cellulaires nécessaires pour l'infection. Donc, les facteurs environnementaux affectant la plante hôte ainsi que les Rhizobia doivent être optimaux pour l'établissement d'une symbiose effective (Somasegaran et Hoben., 1994). La nature du substrat utilisé (sable) est un autre facteur qui peut expliquer la faible infectivité observée chez nos isolats. En effet, des recherches ont montré que dans la culture en sols sablonneux, la productivité des plantes et l'efficacité symbiotique étaient de 5 à 8 fois inférieures que dans la culture hydroaéroponique. De ce fait, la culture en sable ne peut être adéquate pour sélectionner les partenaires symbiotiques les plus efficaces (Jebara *et al.*, 2001). D'après Slattery et Pearce (2002), l'inoculation des plantes avec des Rhizobia sélectionnés ne donne pas toujours l'effet positif sur les légumineuses fixatrices d'azote sur lesquelles elle a été appliquée. La réponse positive ou l'absence de réponse à l'inoculation peuvent dépendre soit de la qualité de l'inoculum lui-même, soit des caractéristiques symbiotiques de la plante ou des propriétés du sol, soit encore d'une ou de plusieurs composantes du système sol-plante-microorganismes.

En dépit d'une nodulation défectueuse, l'effet PGP est largement visible sur la croissance végétale de la luzerne. Les résultats de l'analyse statistique montrent que l'effet de l'inoculation a amélioré significativement tous les paramètres de la croissance de la luzerne (la hauteur et le poids sec et frais des parties aériennes et racinaires). Les analyses de la variance montrent des effets très significatifs sur le poids sec et frais de la partie aérienne des plantes inoculées. Ce qui montre que les plantes inoculées sont significativement plus développées par rapport aux témoins (Li *et al.*, 2020).

La chlorophylle est le principal pigment photosynthétique des plantes et sa teneur affecte directement la capacité de photosynthèse des plantes (Su *et al.*, 2017). Il est bien connu que la croissance des plantes nécessite l'accumulation de produits photochimiques et que la croissance des plantes est étroitement liée au taux de photosynthèse. Une diminution de la teneur en chlorophylle entraîne une réduction de la capacité d'absorption et d'utilisation de l'énergie lumineuse des plantes, ce qui entraîne une diminution de la photosynthèse (Ansari et Ahmad, 2019, Del Rosario Cappellari *et al.*, 2015). Les résultats montrent que l'effet de l'inoculation a amélioré significativement tous les paramètres biochimiques de la luzerne, (chl a, chl b , (chla+chlb), caroténoïdes). L'effet de l'inoculation sur les

teneurs de la chl a, chlb et la (chla+chlb) est hautement significatif ($P < 0,05$), ce qui signifie que les plantes inoculées ont un meilleur résultat que les plantes non inoculées. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Li *et al.* (2020).

B: Amélioration de la productivité des cultures de *Medicago sativa* par la co-inoculation de *Sinorhizobium meliloti*–Actinobactéria sous stress salin

Divers facteurs environnementaux limitent la fixation de l'azote, tels que le manque d'humidité du sol, le stress osmotique, les températures extrêmes, la salinité du sol, la carence en éléments nutritifs. Tous ces facteurs pédologiques et environnementaux affectent la survie et le taux d'infectiosité des Rhizobia, un facteur important pour la fixation biologique de l'azote. Les recherches récentes visent à identifier des souches rhizobiennes résistantes à ces stress et à explorer leur potentiel dans des conditions de terrain.

Les PGPR constituent une approche prometteuse et respectueuse de l'environnement pour accroître les rendements des cultures et réduisent ainsi les stress biotiques et abiotiques car elles présentent des potentialités particulières comme la compétence, la colonisation des racines et/ou la sécrétion de phytohormones, pour stimuler la croissance des cultures.

Les Actinobacteria peuvent coloniser activement les systèmes racinaires des plantes, dégrader un large éventail de biopolymères en sécrétant plusieurs enzymes hydrolytiques et tolérer des conditions hostiles en formant des spores. De plus les Actinobacteria ont également des effets bénéfiques sur la nodulation et la croissance des légumineuses.

Selon les résultats obtenus dans la première partie, la stratégie de recherche consiste à fournir la meilleure façon d'améliorer la performance des bactéries symbiotiques sous différentes conditions environnementales, en cherchant un signal, ou une molécule effectrice existant dans la rhizosphère qu'elle soit symbiotique ou non.

Ainsi, l'objectif de cette partie est de réussir la colonisation de la rhizosphère de la plante hôte *Medicago sativa* par les souches de *Sinorhizobium meliloti* sous stress salin après co-inoculation par des Actinobacteria symbiotiques et non symbiotiques et ayant des activités PGP. Cet effet est exprimé par l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote notamment la formation de nodules et les variations morphologiques et biochimiques de la plante hôte.

I-Isolement et caractérisation des PGPR

1- Provenance des souches

1-1- Les souches de Rhizobia

Les souches rhizobiennes utilisées dans cette étude sont *Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) et *S. meliloti* 2011(R2) (Galibert *et al.*, 2001). Elles ont été fournies par le professeur Boncompagni Eric, Université Nice Sophia Antipolis-France. *Sinorhizobium meliloti* 1021

et son association au symbiote la luzerne *Medicago sativa* est un système modèle mondial leader pour les études de symbiose et de fixation d'azote. Les Rhizobia ont été cultivées sur milieu YEMA et incubées à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 48h. Les cultures ont été stockées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

1-2- Les souches d'Actinobacteria

Les souches d'Actinobacteria (n=5) sont collectées à partir de deux sites géographiquement distincts :

Site 1 : La Sebkhia Melghir située au Sud-Est de la ville de Biskra aux coordonnées $34^{\circ} 17' 56.6''$ Nord, $6^{\circ} 21' 54.56''$ Est, ayant une superficie de 551.500 ha. Elle est limitée au Nord par la Daïra de Zeribet El Oued et Sidi Okba, à l'Est par les Wilaya d'El Oued et de Khenchela et à l'Ouest par la Commune d'El Haouch. Au point de vue administratif, elle fait partie de la wilaya d'El Oued. La Sebkhia Melghir constitue le point le plus bas du Sahara (moins 35m d'altitude) et représente une zone saline et aride. Le sol de cette Sebkhia se caractérise par un pH 7.56 ± 0.35 et une conductivité électrique (C_E)= 54.2 ± 2.7 mS/cm (Fig. 16 et 17) (Anonyme, 2005).



Fig. 16: Localisation géographique de la Sebkhia Melghir



Fig. 17: Sebkhia Melghir

Site 2 : Le complexe de zones humides de la plaine de Guerbes-Senhadja se situe au Nord-Est de l'Algérie, dans la Wilaya de Skikda aux coordonnées 36° 55' Nord et 7° 16' Est, avec une superficie de 42100 ha. Il est limité au Nord-Est par le massif de l'Edough, au Nord-Ouest par le massif du Filfila, au Sud-Ouest par le massif de Boumaïza et il s'étend au Sud-Est jusqu'à proximité du lac Fetzara (Fig. 18 et 19) (Anonyme, 2019).

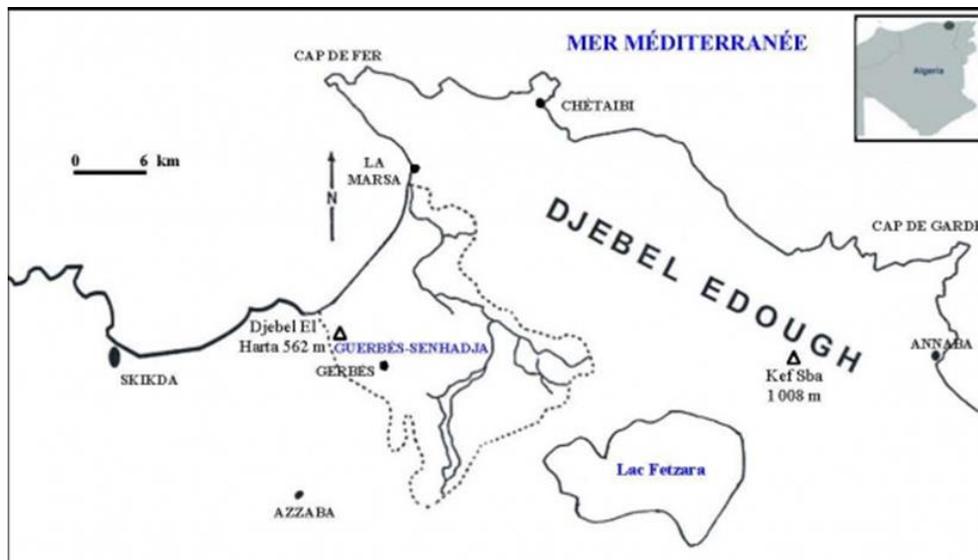


Fig. 18: Localisation géographique de la station de Guerbes-Senhadja



Fig. 19 : Station de Guerbes-Senhadja

1-3- Isolement et culture des Actinobacteria

Deux méthodes sont employées pour l'isolement de ces bactéries :

-L'isolement des Actinobacteria à partir du sol de la Sebkha Melghir est effectué en diluant 10 g de sol dans 90 ml d'eau physiologique stérile. L'ensemble est agité vigoureusement pendant 1h. Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-5}) sont réalisées à partir de cette suspension dans une solution d'eau physiologique. 100 μ l de chaque dilution serviront à ensemencher deux milieux de culture différents, le milieu International *Streptomyces* Program 2 (ISP2) (Shirling et Gottlieb, 1966) (Annexe 10) et le milieu Luedemann (Luedemann, 1968) (Annexe 11), supplémentés de cycloheximide (50 μ g/ml). L'incubation est effectuée à 28 ± 2 °C pendant deux semaines. De chaque boîte incubée, des colonies bien isolées ayant des aspects différents sont repiquées sur de nouvelles géloses en boîtes de Pétri. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de cultures pures.

Vingt souches ont été collectées et testées pour l'évaluation de leur potentiel PGP par la détermination de différentes activités améliorant la croissance des végétaux en vue de sélectionner les souches les plus performantes. Parmi cette collection bactérienne, 4 souches désignées MS1, MS2, MS3 et MS4 ont été sélectionnées pour les expériences ultérieures de caractérisation et d'inoculation des plantes.

-Le second isolement est réalisé à partir des nodules d'*Alnus glutinosa* provenant de la région de Guerbes-Senhadja. Les racines avec leurs nodules ont subi une série de lavage à l'eau distillée stérile afin d'éliminer le sol rhizosphérique, puis à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachés, stérilisés en surface par immersion dans H₂O₂ (30% v/v) pendant 10 mn ensuite, rincés à l'eau distillée stérile.

Chaque lobe nodulaire stérilisé est ensemencé dans un tube à essai contenant 5 ml du milieu BAP (Annexe 12) et incubé à 28 ± 2 °C pendant plusieurs semaines en éliminant à chaque fois les tubes de culture contaminés généralement par des bactéries à croissance rapide (Louati *et al.*, 2019). Après incubation, 13 cultures bactériennes sont obtenues et repiquées sur milieu ISP2 solide puis incubées à 28 ± 2 °C pendant 2 semaines. Ainsi, toutes les cultures bactériennes sont examinées pour leurs activités PGP et la souche Ag-1 est sélectionnée pour les expériences ultérieures de caractérisation et d'inoculation des plantes (Tab. 3). Tous les isolats ont été maintenus sur des géloses inclinées pour le stockage à court terme et dans le milieu additionné de glycérol 30% (v/v) à -20 °C pour une conservation plus longue.

Tab. 3: Origine de l'isolement des souches bactériennes utilisées

Groupes bactériens	Code	Méthode d'isolement	Type d'échantillon	Nombre d'isolats sélectionnés/ Isolats totaux	Localisation géographique
Groupe Actinobacteria	MS1	Milieu ISP2($28\pm 2^\circ\text{C}/$ 2à15J)	Sable	4/20	Sebkha Melghir de la région Biskra ($34^\circ 17' 56.6''\text{N}$ $6^\circ 21' 54.56''\text{E}$) Zone saline et aride $C_E=54.2\pm 2.7$ mS/cm, pH 7.56 ± 0.35
	MS2				
MS3	Nodules d' <i>Alnus glutinosa</i>		1/13	Guerbes Senhadja de la région de Skikda ($36^\circ 55' \text{N } 7^\circ 16' \text{E}$) Zone humide	
MS4					
Groupe de Rhizobia	R1	Milieu YEM ($28\pm 2^\circ\text{C}/2$ j)	Symbiote de Alfalfa	2	-
	R2				

2- Caractérisation biochimique des souches d'Actinobacteria et de Rhizobia

Outre les études micro et macroscopique, l'identification des isolats a porté sur la détermination de certains caractères biochimiques.

2-1-Sources de carbone

Pour réaliser un screening phénotypique de l'ensemble des souches bactériennes, plusieurs sources de carbone sont utilisées selon les méthodes standards (Cappucinno and Sherman,

1992). Ainsi la dégradation des sucres et des acides aminés utilisés au cours de l'étude est évaluée sur milieu minimum au sel (Annexe 13) (Brown et Dilworth, 1975).

2-2- Activités enzymatiques

2-2-1- Production de protéase

La capacité des isolats à produire une protéase est évaluée sur gélose au lait écrémé (25%) (Annexe 14). Après inoculation du milieu avec 10µl de chaque isolat, les boîtes de Pétri sont incubées à 28±2 °C / 7 jours. L'activité protéolytique est détectée par la présence d'une zone claire autour des colonies bactériennes (Mohanasrinivasan *et al.*, 2012).

2-2-2- Production d'amylase

La mise en évidence de la production de l'amylase est réalisée sur la gélose GYP (Glucose Yeast extract Peptone) additionnée de 1% d'amidon soluble (Annexe 15). Les boîtes de Pétri sontensemencées par des spots (10µl) de chaque culture bactérienne. Après incubation à 28±2 °C/7 jours. L'activité amylolytique est détectée par la révélation d'un halo clair autour de la colonie après inondation du milieu avec une solution d'iode (1% d'iode dans 2% d'iodure de potassium) (Mefteh *et al.*, 2017).

2-2-3- Production de chitinase

La production de la chitinase est effectuée sur un milieu gélosé à base de chitine (Annexe 16). Le milieu est inoculé par des spots (10µl) de cultures fraîches de chaque isolat puis incubé à 28±2 °C /7 jours. L'activité chitinasique est détectée par la révélation d'un halo clair autour de la colonie (Slama *et al.*, 2019a).

2-2-4 - Production de cellulase

La capacité des isolats à dégrader la cellulose est effectuée sur la gélose contenant 1% de carboxyméthylcellulose (CMC) (Annexe 17). Un volume de 10µl de la culture de chaque isolat est déposé à la surface du milieu sous forme de spot. Après incubation à 28±2 °C /7 jours, la surface de la gélose est recouverte d'une solution du rouge Congo (0,1%), puis rincée par une solution de NaCl (1M). La présence d'une zone claire autour des colonies indique la production de l'enzyme (Slama *et al.*, 2019b).

2-2-5- Production de gélatinase

La production de la gélatinase est mise en évidence sur le milieu gélatine (Annexe 18). Les tubes de gélatine solidifiée (en culot) ayant séjourné préalablement dans l'eau froide, sontensemencés par piqûre centrale avec les souches bactériennes et incubés à 28±2 °C /7 jours. La gélatine étant une protéine liquide à la température d'incubation, il est donc nécessaire de mettre les tubes au froid (4°C/24 h) avant de les observer. Ainsi, les tubes où

la gélatine n'est pas dégradée se solidifient, alors que ceux qui restent liquides révèlent une activité hydrolytique des souches (Ekpenyong *et al.*, 2016).

3- Étude de la tolérance au stress

L'étude de l'effet de la salinité, du pH, de l'activité d'eau (a_w) et de la température sur la croissance de toutes les souches est évaluée sur le bouillon ISP2 pour les Actinobacteria et le bouillon YEM pour les Rhizobia répartis dans des microplaques stériles de 96 puits. Les milieux sont répartis à raison de 180 μ l par puits en triplicata. Ces derniers sont inoculés par 20 μ l de chaque suspension bactérienne.

3-1-Effet de la salinité

L'effet du stress salin sur la croissance bactérienne est déterminé dans le milieu ISP2 ou YEM supplémenté de NaCl (0, 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 mM). L'incubation est effectuée à 28 ± 2 °C pendant 7 jours.

3-2-Effet du pH

La réponse des souches bactériennes testées à la variation du pH du milieu de culture est évaluée aux différentes valeurs du pH (4, 7, 9 et 11). Les microplaques sont incubées à 28 ± 2 °C/7jours.

3-3-Effet de l'activité d'eau (a_w)

L'effet de l' a_w est évalué en ajoutant au milieu de culture du polyéthylène glycérol (PEG 8000) à des concentration de 10, 20, 30 et 40%. L'incubation des microplaques est effectuée à 28 ± 2 °C/7jours.

3-4-Effet de la température d'incubation

L'étude de l'effet des stress hypothermique et hyperthermique sur la croissance des souches examinées a pour but de déterminer et évaluer la température optimale de chaque souche. L'incubation des microplaques est réalisée à 4, 30, 37, 45 et 55 °C pendant 7 jours. La lecture des microplaques est réalisée en utilisant le lecteur des microplaques (Bio Tek ELx800) pour mesurer l'absorbance à 600 nm.

4-Mesure des activités PGP des souches d'Actinobacteria

4-1- Fixation d'azote

La fixation d'azote moléculaire est testée sur milieu solide exempt d'azote. Le milieu au sel de Winogradsky (WS) (Annexe 19) (Holt *et al.*, 1994) estensemencé par stries à partir des cultures bactériennes et incubé à 28 ± 2 °C /7 jours. Toute croissance sur ce milieu traduit la capacité des bactéries à fixer l'azote.

4-2- Production d'ammoniac (NH₃)

La production d'ammoniac (NH₃) par les souches isolées est testée sur eau peptonée selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992) (Annexe 20). Ce test consiste à inoculer 100µl de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau peptonée. Après incubation à 28±2 °C /7 jours, l'addition de 500µl du réactif de Nessler donnant une couleur jaune à marron indique la production de NH₃.

4-3- Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La production d'acide cyanhydrique (HCN) est évaluée sur gélose nutritive additionnée de glycine (4,4g/l) (Lorck, 1948). Les cultures bactériennes sont ensemencées par stries sur la gélose en boîtes de Pétri. Du papier Whatman imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) est déposé à l'intérieur du couvercle de la boîte. Celle-ci est scellée avec du papier parafilm et incubée à 28±2°C /7 jours. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production d'HCN.

4-4- Solubilisation des phosphates

La capacité de solubilisation des phosphates est testée sur milieu Pikovskaya (PVK) contenant du phosphate tricalcique (Ca₃HPO₄) (Annexe 5) comme seule source de phosphate. Un volume de 10µl de chaque culture bactérienne est déposé en spot à la surface de la gélose PVK selon la méthode décrite par Gaur (1990).

Après incubation à 28±2 °C/7 jours, un halo transparent apparaît autour des colonies ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates. Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre de la zone transparente autour de la colonie (diamètre total moins le diamètre de la colonie) permettant ainsi d'évaluer l'intensité de la solubilisation.

4-5- Production de sidérophores

La production de sidérophores des souches d'Actinobacteria est effectuée comme décrit précédemment. (Chapitre I).

4-6- Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production d'AIA des souches d'Actinobacteria est suivie selon la méthode décrite au chapitre I.

5-Identification moléculaire des isolats d'Actinobacteria

L'identification moléculaire des souches a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie et Molécules Bioactives, Université El-Manar Tunis-Tunisie. Elle se base sur l'amplification et le séquençage des gènes de l'ARNr 16S.

Avant toute manipulation, les isolats sont purifiés sur milieu ISP2. Les cultures pures et jeunes feront l'objet des étapes d'identification moléculaire suivantes :

5-1-Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN bactérien est une étape primordiale avant toute manipulation génétique. L'ADN bactérien chromosomique est extrait par chauffage à 100°C dans un tampon Tris-EDTA (TE) (1mM de Tris-HCl et EDTA 10mM pH 7,4). Quelques colonies d'une culture pure sont introduites dans un tube Eppendorf stérile contenant 180 µl de tampon TE stérile. La suspension est agitée puis chauffée à 100°C dans un bain sec pendant 10mn, elle est ensuite placée dans un bain de glace pendant 10mn ; le choc thermique permet la lyse cellulaire. La suspension est centrifugée à 12000 rpm à 4°C/10mn. Le surnageant est récupéré stérilement dans un autre tube Eppendorf. Les surnageants sont gardés à 4°C pendant une nuit pour permettre l'élimination de l'ARN par lyse.

5-2- Dosage de l'ADN

Un dosage est nécessaire pour déterminer la qualité, la quantité et la pureté de l'ADN dans les échantillons. Il est effectué à l'aide d'un Spectrophotomètre UV (Nanodrop Thermoscientifique Applied Biosystem). 1µl de chaque surnageant est déposé dans une cellule de l'appareil et la lecture de la DO se fait par un balayage de 230 à 280nm. Le rapport 260/280 (indiquant la contamination par les protéines) doit être compris entre 1,7 et 1,9 et le rapport 260/230 (indiquant la contamination par les ARN) doit être ≤ 1 . La quantité d'ADN doit être supérieure ou égale à 300 ng / µl.

5-3- Amplification par PCR

La PCR permet l'amplification spécifique d'un fragment de l'ADN cible en présence d'oligonucléotides codant cette région d'intérêt. Le principe de la PCR consiste en la répétition d'un cycle triphasique :

-dénaturation de l'ADN à amplifier, hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible et enfin, élongation des amorces par l'activité d'une ADN polymérase en présence de dNTP. La *Taq* ADN polymérase possède une activité terminal-transférase qui a pour effet l'ajout d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. La PCR est réalisée dans un thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) dans un mélange réactionnel de 25µl (volume final par échantillon) de H₂O (eau ultra pure stérile), contenant les réactifs suivants : 0,25µl de dNTP (Fermentas), 4µl de tampon MgCl₂ tampon (Fermentas), 0,22µl de la *Taq*-polymérase (Fermentas), 1µl de l'ADN de l'échantillon et les amorces spécifiques (0,3µl chacune) du gène de l'ARNr 16S

à amplifier ; dont les séquences sont comme suit: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 1496R (5' CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') (In vitro Gen).

L'amplification de l'ADN se déroule après une première phase de dénaturation (5mn à 94°C) selon 35 cycles comprenant chacun trois étapes de variation de température :

- dénaturation de 45 s à 94°C
- hybridation de 1mn à 55°C
- élongation de 2mn à 72°C.

A la fin du dernier cycle, une incubation de 7 mn à 72°C permet d'achever les synthèses de l'ADN en cours. Un refroidissement de 10 mn est réalisé à 14°C. La réaction PCR nécessite un témoin positif (ADN d'une souche de collection de référence amplifiée selon le même protocole), un témoin négatif (réactifs sans ADN).

5-4- Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose à 1.5% (p/v) coloré au bromure d'éthidium (0,5 mg/l). La migration se fait pendant 20mn à 100V. Le gel est visualisé sous lumière UV et photographié avec un système de capture digital (Gel Doc, Bio-Rad).

5-5- Séquençage

Le produit de l'amplification du gène de l'ARNr 16S est séquencé. Une purification des fragments d'ADN amplifiés est effectuée au préalable par un traitement enzymatique (exonuclease I et Shrimp phosphatase alcaline SAP) dégradant les amorces et les dNTP restants. Par la suite, les échantillons sont réamplifiés et marqués en utilisant un kit de marquage «Big Dye Terminator Cycle Sequencing » (Applied Biosystems). Le milieu réactionnel est composé : de Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués par un composé fluorescent « dye », d'une amorce reverse fraîchement préparée à une concentration de 25µM, d'un tampon de dilution (200mM Tris pH9, 5mM MgCl₂) et de l'eau ultrapure. L'amplification s'effectue dans un thermocycleur selon le programme suivant : 1mn à 96°C, puis 25 cycles de: 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 4 mn à 60°C (amplification) et un cycle à 4°C (refroidissement). L'ADN obtenu est ensuite précipité par 1µl de l'acétate de sodium 3M pH 5.2 dans 50µl d'éthanol à 95%, centrifugé 4000 rpm/40min, puis lavé dans l'éthanol à 70% et centrifugé une deuxième fois à 4000 rpm/ 30°C. Le culot est séché par centrifugation à 1000 rpm dans une centrifugeuse plaque inversée (Soft Start). Le culot sec est suspendu dans une solution de formamide, puis introduit dans un séquenceur (ABI Prism 3130 DNA séquenceur, Applied Biosystems).

5-6- Analyse phylogénétique

Les séquences partielles de l'ARNr 16S des souches sont comparées avec les séquences des ARNr 16S disponibles, par la recherche des BLAST (Saitou and Nei, 1987), dans le National Center of Biotechnology Information- USA (NCBI) data-base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'alignement de la séquence de l'ADNr 16S actinobactérien et l'analyse phylogénétique sont effectués selon la procédure standard détaillée dans Mlaik *et al.*, (2015).

II-Effets de la co-inoculation *Rhizobium*-Actinobacteria sur la nodulation de *Medicago sativa* L.

1-Matériel végétal

Les graines de *Medicago sativa* L. sont obtenues auprès de l'Institut Technique des Grandes Cultures (I.T.G.C.) de Sétif. Les graines sont désinfectées à l'éthanol à 70% pendant 30 secondes puis à l'hypochlorite de sodium à 4% pendant 3 mn (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994). Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée stérile et mises à germer à l'obscurité dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (Agar 0,8%) à 28°C pendant 48 h.

2-Préparation des inocula bactériens

Les Actinobacteria sont cultivés sur le milieu ISP2 liquide alors que celles des Rhizobia sont cultivés sur le milieu YEM liquide incubés à 28±2°C pendant 2 à 7 jours. Une relation entre le nombre de cellules et la DO 600 nm a été développée pour chaque souche afin de permettre l'application d'un nombre standard de 10⁸cellules / ml à toutes les expériences (Cherif-Silini *et al.*, 2019).

3-Inoculation bactérienne et conditions de croissance

Les graines stérilisées et germées sont semées dans des pots en plastique dont la surface interne est désinfectée avec de l'éthanol à 70% et sont remplis de quantités égales de sable lavé abondamment à l'eau et stérilisé (121°C/ 1h en 3 cycles séparés par 24h). Les graines sont semées aseptiquement à une profondeur de 1cm de la surface à raison de trois graines par pot. Après une semaine, les plantes ont été inoculées avec 1ml de la suspension bactérienne de chaque isolat en phase exponentielle de croissance à une concentration de 10⁸ cellules/ml.

L'inoculation et la co-inoculation ont été suivies par l'utilisation des souches de Rhizobia R1 et R2 séparément ou conjointement avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées (Tab.4). Les pots sont ensuite placés dans une chambre de croissance avec

une photopériode lumière/ obscurité de 16h/8h et un cycle de température jour et nuit de 26°C/ 18°C. Les pots ont été arrosés deux fois par semaine avec de la solution nutritive dépourvue d'azote (Fahraeus, 1957) (Annexe 9) et de l'eau distillée stérile au besoin. L'expérience est répétée 6 fois. Après 2 mois de culture, les plantules de *M. sativa* sont récoltées. Leur croissance est appréciée par la présence ou absence de nodules.

Tab.4 : Différents traitements utilisés dans l'expérience

Traitement	Souches bactériennes
T-	non inoculé (contrôle négatif)
T+	non inoculé additionné de KNO ₃ (0,5M) (contrôle positif)
R1	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R1)
R1+MS	R1+MS1, R1+MS2, R1+ MS3, R1+MS4, R1+Ag1
R2	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R2)
R2+MS	R2+MS1, R2+MS2, R2+ MS3, R2+MS4, R2+Ag1

4-Effets de la co-inoculation bactérienne sur la croissance de *Medicago sativa* sous stress salin

Sur la base des résultats obtenus précédemment, trois souches d'Actinobacteria (MS1, MS2 et Ag1) co-inoculées avec les rhizobia ayant amélioré la nodulation sur les racines de *Medicago sativa* sont choisies pour évaluer l'efficacité de leur co-inoculation avec les souches de *Sinorhizobium meliloti* (R1 et R2) sous stress salin.

L'expérience est réalisée comme décrit précédemment, les plantes sont inoculées par les souches R1 et R2 séparément ou co-inoculées avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées ou inoculées avec les Actinobacteria seules, en présence et en absence de sel (Tab. 5).

Tab. 5: Différents traitements utilisés dans l'expérience sous stress salin

Traitement sans NaCl	Traitement avec 100mM de NaCl	Souches bactériennes
T-	T-	non inoculé (Control négatif)
T+	T+	non inoculé additionné de KNO ₃ (0,5M) (control positif)
R1	R1	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R1)
R1+MS	R1+MS	R1+MS1, R1+MS2, R1+ Ag1
R2	R2	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (R2)
R2+MS	R2+MS	R2+MS1, R2+MS2, R2+ Ag1
Act	Act	MS1, MS2, Ag1

5- Inoculation bactérienne et condition de croissance

Les conditions de croissance et les suspensions bactériennes sont préparées comme décrit précédemment. Après une semaine, les plantules sont inoculées avec 1 ml de la suspension bactérienne de chaque isolat à 10^8 cellules/ml. L'inoculation est répétée 3 fois / 3 semaines et les pots ont été irrigués deux fois par semaine avec la solution nutritive dépourvue d'azote (Fahraeus, 1957) (Annexe 9) et de l'eau distillée stérile au besoin. Deux semaines après la co-inoculation, les pots du deuxième groupe (100mM NaCl) sont arrosés avec la solution saline une fois par semaine durant un mois (4 fois).

6-Mesure des paramètres morphologiques

Après 2 mois de culture, les plantules de *M. sativa* sont récoltées. Leur croissance est appréciée par la mesure des paramètres morphologiques. Les poids frais (g) des tiges et des racines des plantes, la hauteur (cm) de la partie aérienne, la longueur des racines, le nombre de feuilles et de nodules par plante sont estimés.

7-Dosage des pigments photosynthétiques

La teneur en pigments photosynthétiques est déterminée selon la méthode de Arnon (Arnon, 1949). Pour cela, 0.5g de feuilles de chaque échantillon sont découpées en petits segments (1mm^2), homogénéisées dans 10 ml d'acétone à 80% et conservées à -10°C pendant une nuit. L'extrait est ensuite centrifugé à 14000rpm/5mn et l'absorbance du

surnageant est lue à 663, 645 et 470 nm. Les teneurs en chlorophylle a (Ch a), b (Ch b), totale (Ch t) et caroténoïdes exprimées en mg/g sont déterminées selon les équations suivantes :

$$\text{Ch a (mg/g)} = 12,41 \text{ DO (663)} - 2,59 \text{ DO (645)}$$

$$\text{Ch b (mg/g)} = 22,9 \text{ DO (645)} - 4,68 \text{ DO (663)}$$

$$\text{Ch t} = \text{Ch a} + \text{Ch b}$$

$$\text{Caroténoïdes (mg/g)} = [(1000 \times \text{DO (470)}) - 1,82 \text{ Ch a} - 85,02 \text{ Ch b}] / 198$$

8-Dosage des acides aminés solubles et de la proline

Les échantillons des feuilles et des racines fraîches sont conservés au dessous de -15°C avant analyse. L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par Naidu (1998) : 500mg de feuilles sont placés dans des tubes de centrifugation contenant 5ml d'un mélange méthanol: chloroforme : eau (60:25: 15). Les tubes scellés sont chauffés dans un bain marie (60°C) pendant 2 h et centrifugés à 10000 rpm/10 mn. Le surnageant servira ensuite aux dosages des acides aminés solubles et de la proline.

Acides aminés solubles

Un ml de tampon acide acétique /acétate de sodium (pH= 4, 3) et 1ml de réactif de ninhydrine (5% dans l'éthanol) sont additionnés à 1ml de surnageant. Les échantillons sont agités puis chauffés au bain marie (95°C) pendant 15mn. L'absorbance des échantillons est déterminée à 570nm. La concentration en acides aminés solubles est obtenue en utilisant la glycine comme étalon.

Proline

La proline est déterminée par une méthode rapide développée par Singh *et al.*, (1973) : 1ml de surnageant, 4ml de solution de ninhydrine, 4ml d'acide acétique glacial et 1ml d'eau distillée sont mis dans des tubes de centrifugation de 10 ml. Ce mélange est chauffé au bain marie (90°C) pendant 45mn et refroidi à la température ambiante. L'absorbance est lue à 520 nm et la concentration de proline est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

9-Analyse statistique

Toutes les expériences sont réalisées en triplicata et les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm écart type (SD). L'analyse statistique des données est effectuée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 8. Toutes les données sont soumises à l'analyse de la variance (ANOVA) one-way et two-way. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque les valeurs de P sont inférieures à 0,05. Le test de Tukey (post hoc HSD) est utilisé pour

comparer les moyennes pour ces expériences lorsqu'une différence significative est rencontrée.

III-Résultats

1- Caractérisation des isolats

1-1- Caractérisation morphologique et culturale

La croissance des souches de *S. meliloti* R1 et R2 sur milieu YEMA à 28°C/ 48h révèle de petites colonies (1mm de diamètre) et les cellules se présentent sous forme de bacilles courts. Les Actinobacteria sélectionnées isolées sur milieu ISP2 à 28°C/ 2à 7 jours présentent des colonies lisses ayant un pigment non diffusible de couleur orange pour MS1 et rouge pour MS2 par contre les colonies des souches Ag1, MS3 et MS4 sont rugueuses et présentent un mycélium aérien et un mycélium de substrat de couleur blanche ou grise. La morphologie microscopique de ces souches est filamenteuse (Fig. 20, Tab 6).

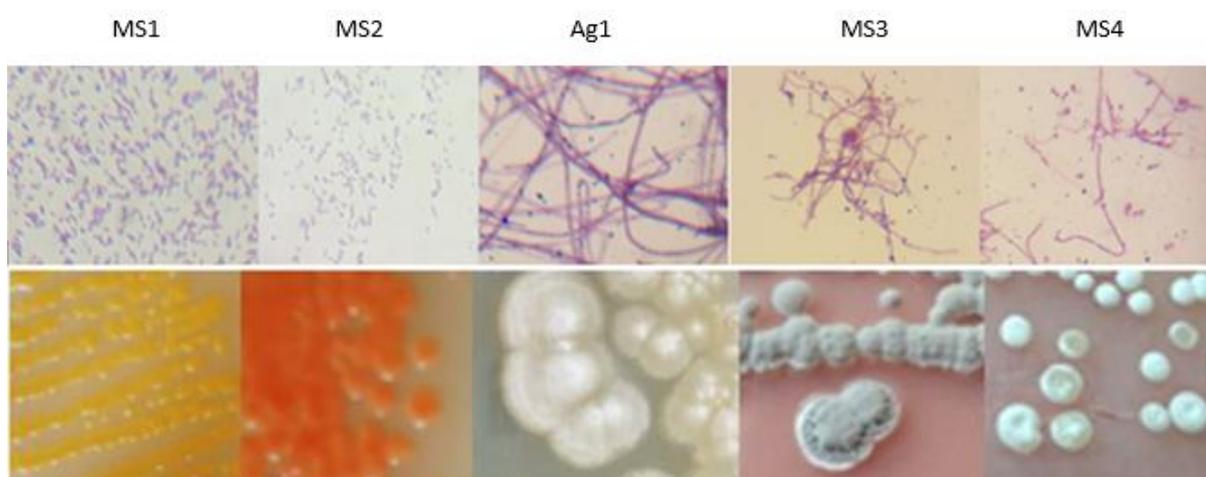


Fig. 20 : Examen microscopique (partie supérieure) et morphologie des colonies (partie inférieure) des souches actinobactériennes MS1, MS2, Ag1, MS3 et MS4.

1-2- Caractérisation biochimique

- Sources de carbone

La majorité des souches catabolisent plusieurs sources de carbone et les résultats sont répertoriés au niveau des tableaux 6 et 7 (Tab.6 et 7).

- Activités enzymatiques

Les activités enzymatiques sont détectées par l'apparition d'une zone claire autour des colonies révélées avec une solution d'iode pour la chitinase (Fig.21) et le rouge de Congo

pour la cellulase (Fig. 22). Après 7 jours d'incubation sur un milieu spécifique pour chaque enzyme, l'ensemble de souches rhizobiennes ou actinobacteriennes produisent différentes enzymes telles que : amylase, protéase, chitinase et cellulase. Alors que la gélatinase, n'est présente que chez cinq souches (MS1, MS2, MS3, MS4 et R1), les deux autres souches (Ag1 et R2) sont incapables de produire la gélatinase (Tab. 7).

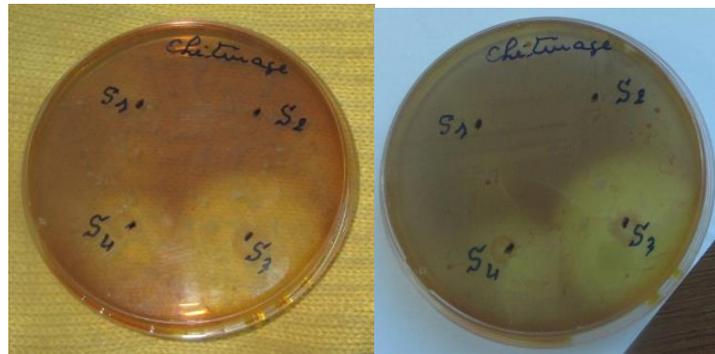


Fig. 21 : Activité chitinolytique : Halo autour des colonies productrices de chitinase

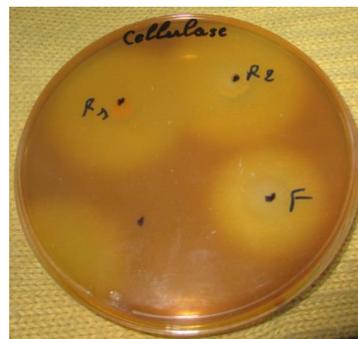


Fig.22: Activité cellulosique : Halo autour des colonies productrices de cellulase

Tab.6: Caractérisation biochimique des souches actinobactériennes et rhizobiales utilisées dans l'étude.

	MS1	MS2	Ag1	MS3	MS4	R1	R2
Diamètre des Colonies (mm)	3	4	5	3	4	1	1
Couleur des colonies ou mycélium aérien	Orange	Rouge	Grise	Blanche	Grise	Blanche	Blanche
Couleur du mycélium du substrat	-	-	Blanche	Beige	Blanche	-	-
Morphologie microscopique	Coco-bacille	Coco-bacille	filamenteuse	filamenteuse	filamenteuse	Coco-bacille	Coco-bacille
Coloration de Gram	+	+	+	+	+	-	-
Pigments diffusibles	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	+	-	-	+	-
Amygdaline	+	-	+	+	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	+	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	-	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	-	-	+	+
Mannose	+	+	+	+	-	+	+
Melibiose	-	-	-	+	-	-	-
Raffinose	-	-	+	-	-	+	+
Rhamnose	+	+	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	+	-	-	-
Sorbose	-	-	+	-	-	-	-
Sucrose	+	-	-	+	-	+	+
Xylose	-	-	-	+	-	+	-

Tab.7: Caractérisation biochimique des souches actinobactériennes et rhizobiales utilisées dans l'étude (suite).

	MS1	MS2	Ag1	MS3	MS4	R1	R2
Citrate	+	+	+	+	+	+	+
β-galactosidase	+	-	+	+	+	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+
Butanediol	+	+	-	+	+	-	-
Urease	+	-	+	+	+	+	+
Amylase	+	+	+	+	+	+	+
Protéase	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	+	+	+	+	+	+	+
Cellulase	+	+	+	+	+	+	+
Gélatinase	+	+	-	+	+	+	-

1-3- Caractérisation physiologique

Toutes les souches ont été caractérisées du point de vue physiologique afin de déterminer les conditions optimales de leur croissance (Fig. 23A).

-Effet du pH

L'ensemble des souches se développe à pH 7 et ne tolère pas les valeurs extrêmes à l'exception de MS2 et MS3 qui sont capables de se développer à pH 9.

-Effet du PEG

Parmi les souches testées pour leur tolérance à différentes concentrations de PEG, les souches rhizobiennes sont sensibles au stress hydrique où *S. meliloti* R1 ne peut pas croître à une concentration supérieure à 10% de PEG par rapport à la souche *S. meliloti* R2 qui tolère jusqu'à 20%. Les actinobactéries semblent plus adaptées au stress hydrique ce qui est montré par leur capacité de croissance à des concentrations élevées de PEG. Les souches MS2 et MS3 tolèrent jusqu'à 60%.

-Effet de la température

Toutes les bactéries testées sont sensibles aux températures extrêmes (4 et 55°C). La température optimale de croissance des souches actinobactériennes est 30°C. Toutefois, les souches Ag1 et MS3 sont capables de croître jusqu'à 45°C.

-Effet du sel

La croissance des souches à des concentrations de sel allant de 0 à 1200 mM révèle une bonne capacité de tolérance des souches MS2 et MS4 se développant à des taux élevés jusqu'à 800mM de NaCl. Une sensibilité au sel est notée pour la souche *S. meliloti* R1 qui ne tolère aucune concentration de sel. Cependant, les souches *S. meliloti* R2 et MS1 sont capables de croître à 400 mM et la souche Ag1 peut tolérer une concentration de sel de 600 mM, par contre la souche MS3 ne tolère que 200mM de NaCl.

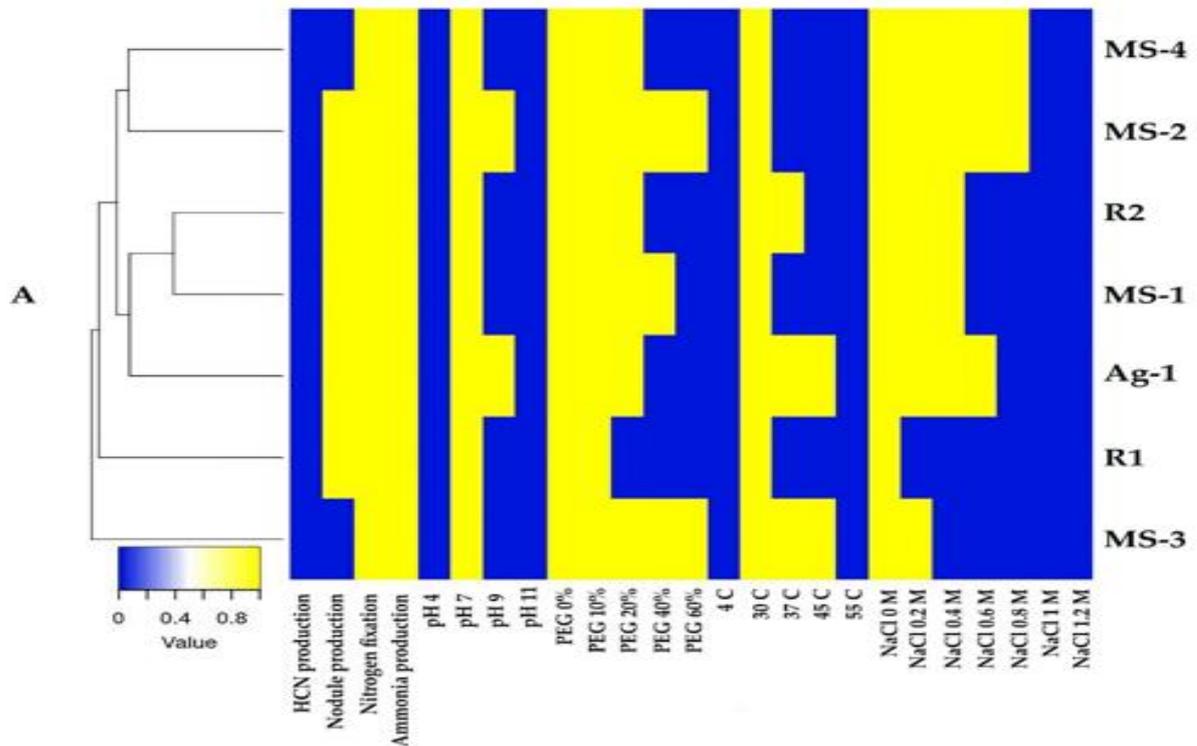


Fig. 23 (A) : Activités PGP et tolérance au stress des souches rhizobiennes et actinobactériennes utilisées dans l'étude.

Les données représentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

2-Activités PGP des Actinobacteria

Les réponses des actinobactéries sélectionnées aux différents tests PGP permettent la mise en évidence des potentialités de chaque souche (Fig.23A et B).

2-1- Fixation d'azote

La fixation d'azote est évaluée qualitativement par la croissance des bactéries sur milieu minimum au sel (DF) exempt d'azote à 28 ± 2 °C /7 jours. Cette capacité est trouvée chez toutes les souches (Fig.23A).

2-2-Production d'ammoniac (NH₃)

Après incubation à 28 ± 2 °C /7 jours de l'eau peptonée inoculée avec les suspensions bactériennes des isolats, la production d'ammoniac est mise en évidence par addition du réactif de Nessler. L'apparition d'une couleur jaune-marron traduit une production intense du NH₃. Toutes les souches testées ont la capacité de produire du NH₃ à des taux variables (Fig.23A).

2-3- Production d'acide cyanidrique (HCN)

Après 7 jours d'incubation à 28 ± 2 °C, aucune souche n'est capable de produire l'HCN, la couleur jaune du papier Whatman reste inchangée(Fig.23A).

2-4-Production des sidérophores

La production de sidérophores est effectuée sur milieu King B connu par sa composition exempte de fer permettant ainsi la libération des sidérophores dans le milieu. L'estimation quantitative de la production des sidérophores (après addition de la solution CAS) déterminée après 7 jours d'incubation à 28°C existe chez toutes les souches mais à des taux variables. Elle atteint des taux élevés notamment pour les souches MS2, MS3 et MS4 produisant respectivement 63.13, 80.9 et 74.62% (Fig.23B).

2-5-Solubilisation des phosphates

La solubilisation des phosphates sur milieu gélosé PVK, révélée par un halo de transparence autour de la colonie est appréciable pour seulement deux souches MS1 et MS4 où les diamètres atteignent 18mm et 13mm respectivement. Par contre, les autres souches solubilisent faiblement les phosphates (Fig.23B).

2-6- Production d'AIA

La capacité des souches à produire l'AIA est testée sur milieu (DF) Dworkin et Foster additionné de tryptophane (1g /l). Après incubation 7jours à 28°C, il ressort que l'activité de production de l'AIA est présente chez toutes les souches mais à des taux variables. Le

taux de production de l'AIA varie de 7.3 à 31.18 µg/ml. Les souches les plus productrices sont MS1 et MS4 produisant des taux de 20.15 et 31.18µg/ml respectivement.

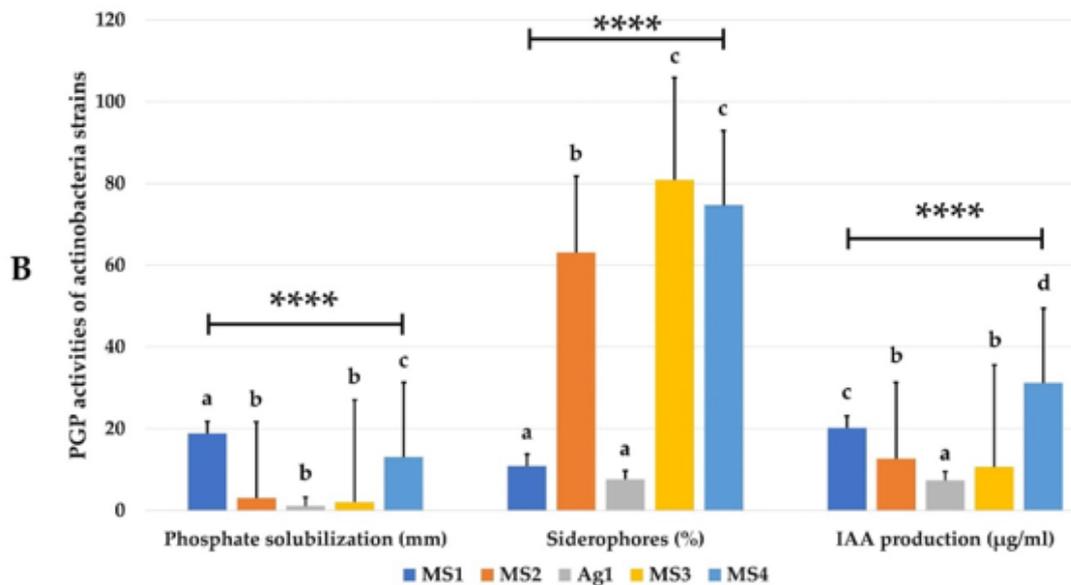


Fig. 23 (B) : Activités PGP des souches actinobactériennes.

Les données représentent une moyenne ± erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

3-Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries

Selon l'analyse de la séquence partielle de l'ADNr 16S, les souches MS1 et MS2 appartiennent au genre *Arthrobacter* : MS1 (MK894856) et MS2 (MK894855). Par contre, les souches MS3 et MS4 sont apparentées au genre *Streptomyces* (MN005930) et *Umezawaea* (MK894857), respectivement. Tandis que, la souche Ag1 appartient au genre *Nocardioopsis* (MN420819) (Fig. 24).

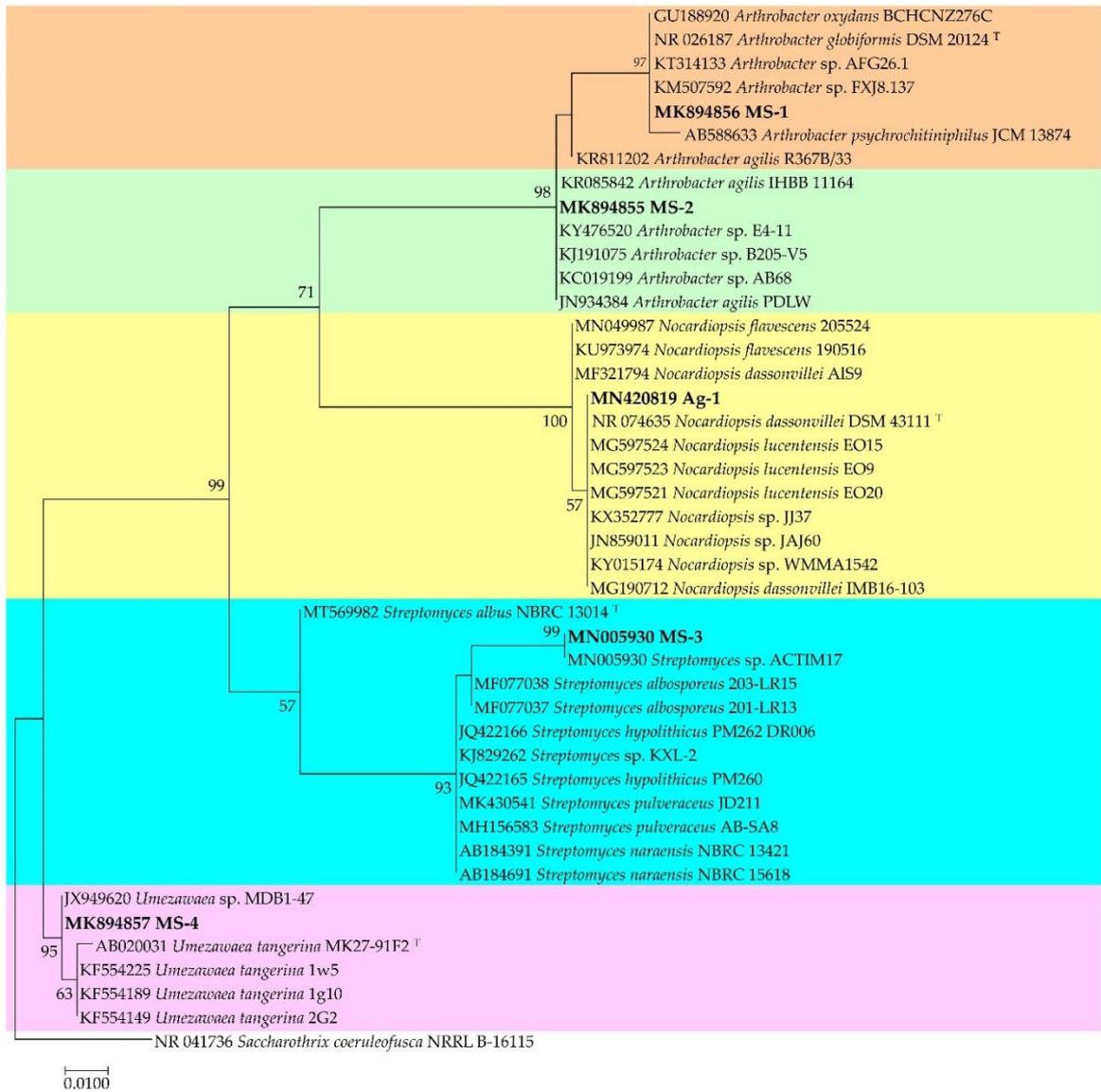


Fig. 24 : Arbre phylogénétique des souches actinobactériennes (Ag1, MS1, MS2, MS3 et MS4).

4-Mesure des paramètres morphologiques

La capacité de nodulation des actinobactéries testées en co-inoculation avec les souches de *S. meliloti* montrent que trois souches MS1, MS2 et Ag1 ont amélioré la nodulation sur les racines de *Medicago sativa* (Fig. 23A), (Fig. 25).

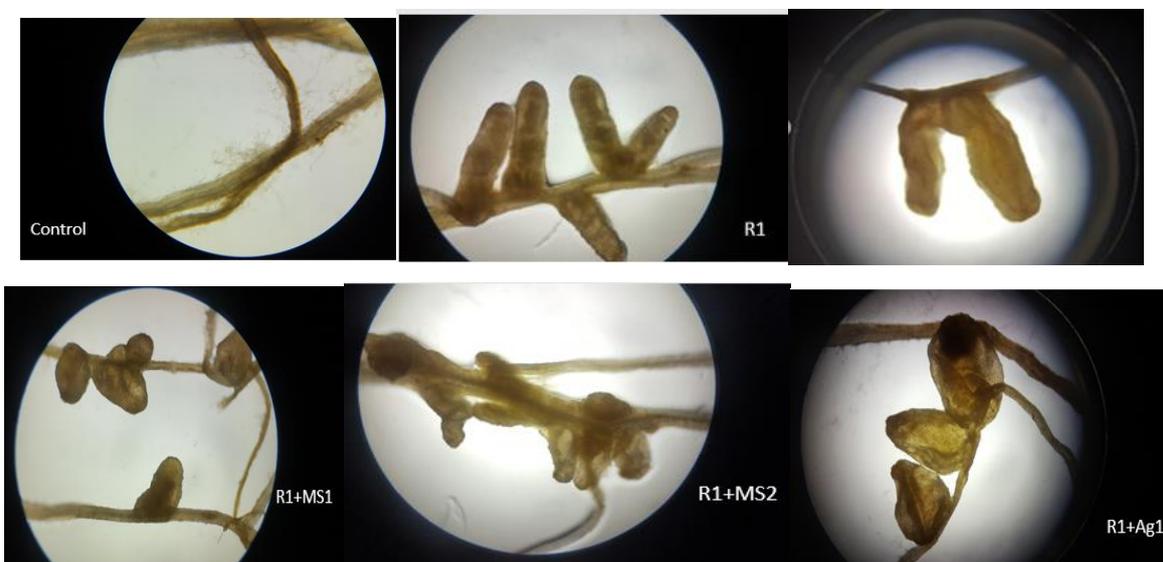


Fig. 25 : Aspect des nodules de *Medicago sativa* inoculés ou co-inoculés.

L'analyse de la variance des poids frais des racines et des feuilles, de l'allongement racinaire et de la hauteur de la plante, du nombre de nodules et de feuilles montre que l'inoculation est bénéfique et que la salinité réduit significativement ces différents paramètres de croissance ($P < 0.05$). Dans les deux conditions de traitements sans sel et en présence de sel, les paramètres morphologiques des plantes de *M. sativa* inoculées avec les Rhizobia seuls et en présence d'Actinobacteria montrent une augmentation significative de ces paramètres lorsqu'il s'agit de la co-inoculation des souches *S. meliloti* R1 et R2 avec MS1, MS2 et Ag1 (Fig. 26)

Les résultats montrent que la salinité affecte tous les paramètres morphologiques des plantes. Cependant, la co-inoculation montre une amélioration significative ($P < 0,0001$) de la longueur des tiges (131-256%) et des racines (56-135%) des plantes inoculées par *S. meliloti* R1 ou R2 associées aux actinobactéries par rapport au contrôle négatif. En effet, la longueur optimale est atteinte dans le cas de la co-inoculation des souches *S. meliloti* R1 et R2 avec MS1, MS2 et Ag1 (Fig. 26 A, B).

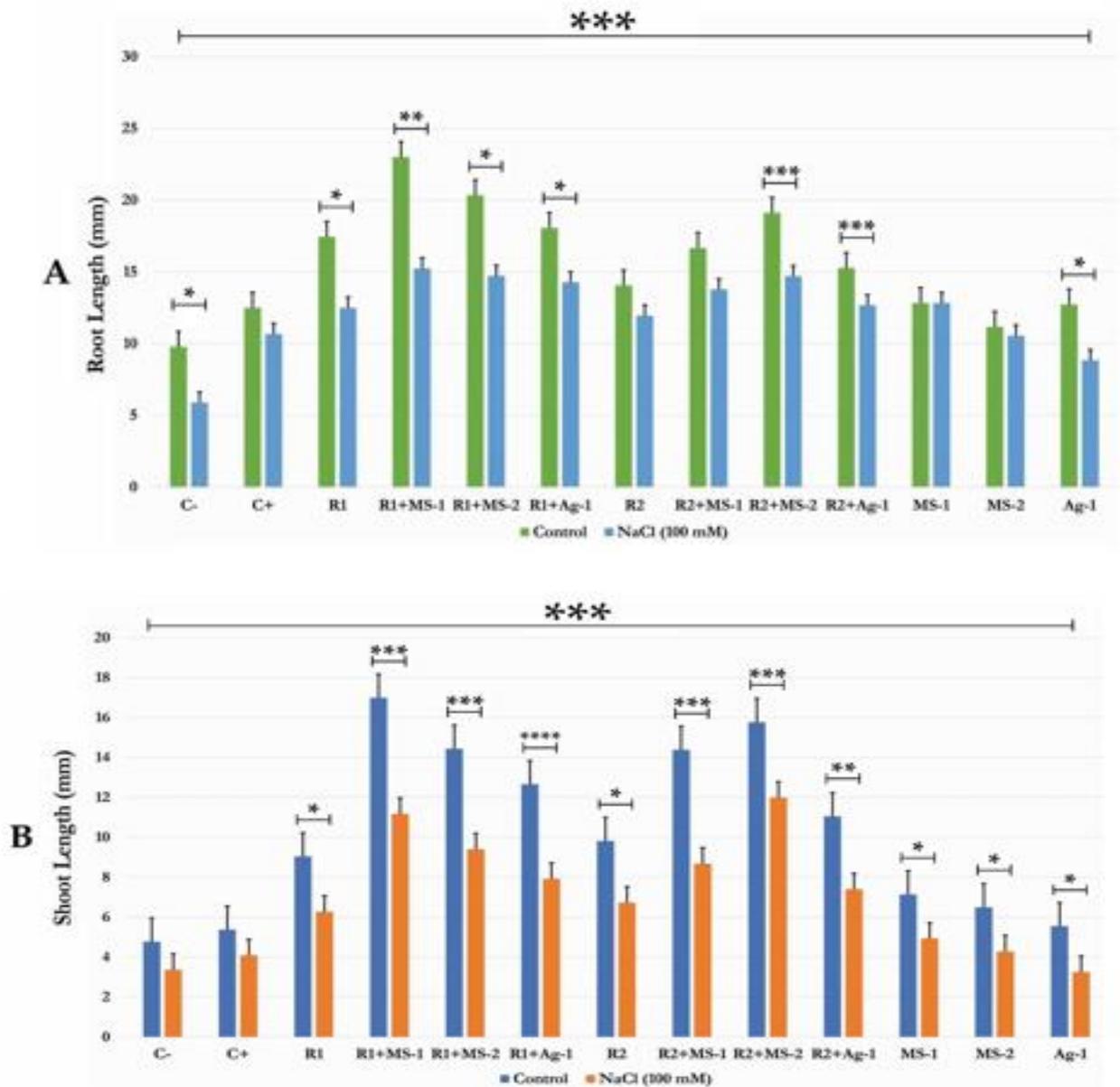


Fig. 26 (A, B) : Effets de la co-inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques de *Medicago sativa* avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl. Les données représentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

Les parties aériennes des plantes et le poids frais des racines sont considérablement améliorés chez les plantes de luzerne co-inoculées avec les souches *S. meliloti* R1 et R2. Les souches actinobactériennes MS1, MS2 et Ag1 ont montré une augmentation significative de 2 à 3 fois du poids frais des tiges et des racines en l'absence et en présence de stress salin par rapport au contrôle négatif (Fig. 26 C, D).

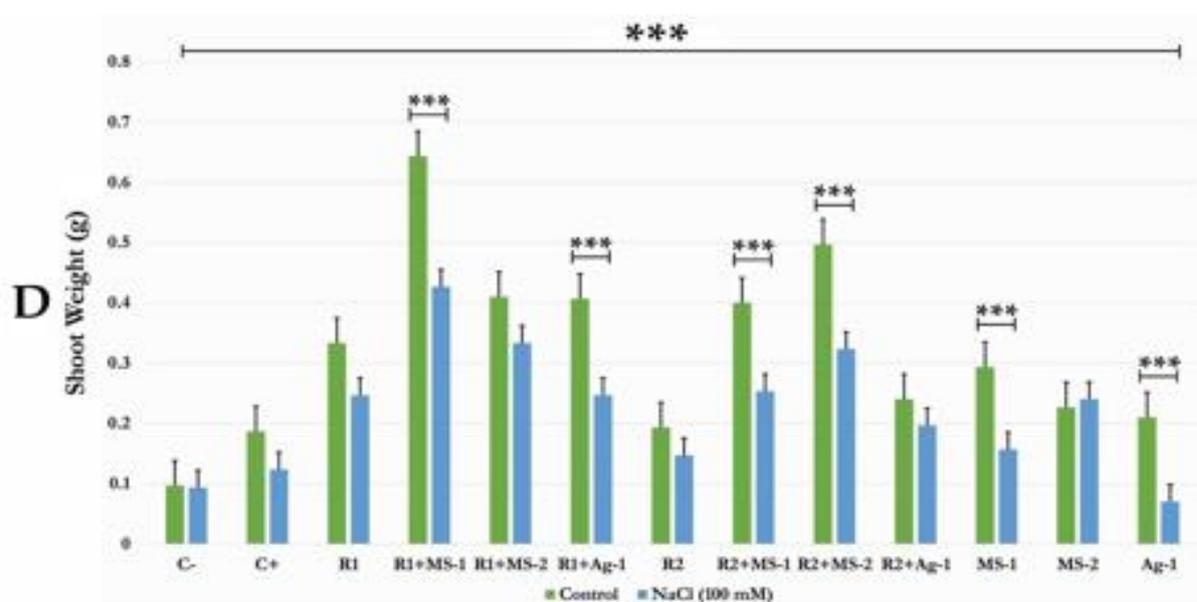
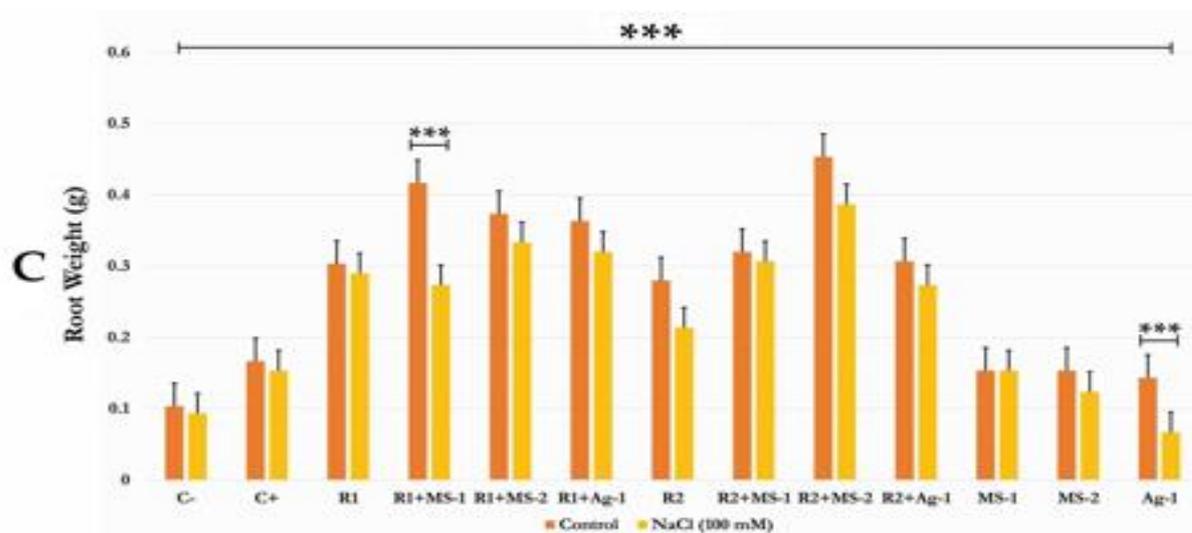


Fig. 26(C, D) : Effets de la co-inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques de *Medicago sativa* avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl. Les données représentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

L'aspect positif de cette coinoculation se manifeste également par l'augmentation des nombres de feuilles et de nodules. En effet, le nombre de nodules a augmenté de 61 et 51% pour les souches *S.meliloti* R1 et R2 associées aux actinobactéries, respectivement par rapport aux plantes inoculées avec les souches *S.meliloti* R1 et R2 seules.

Cependant, en présence de sel, le nombre de nodules est sensiblement plus élevé avec les souches *S.meliloti* R1 (36%) et R2 (80%) que les inoculations de contrôle sous stress salin (Fig. 26 E,F).

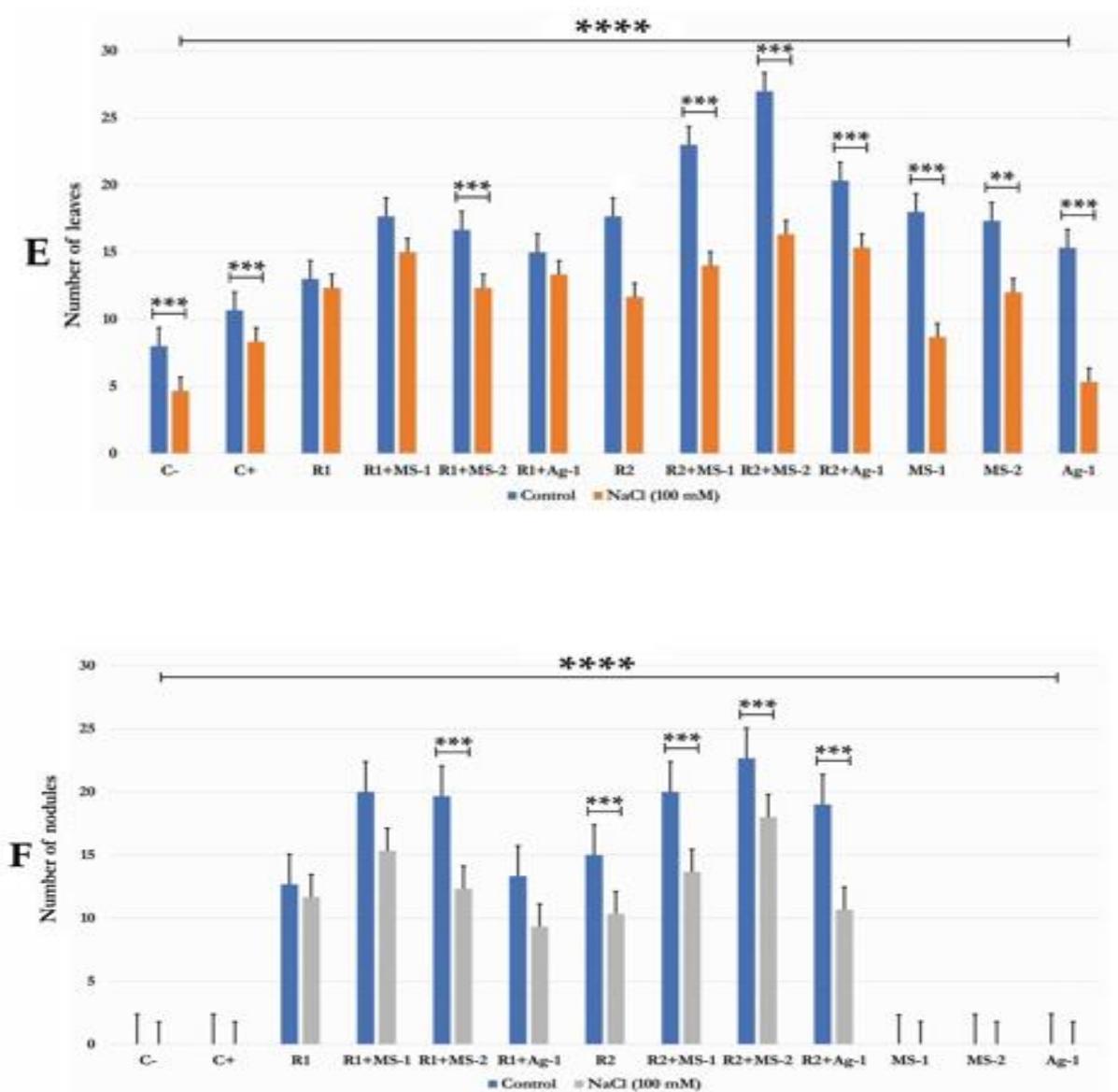


Fig. 26(E, F) : Effets de la co-inoculation bactérienne sur les paramètres morphologiques de *Medicago sativa* avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl. Les données représentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

La capacité de nodulation des souches actinobactériennes dans les expériences de co-inoculation avec *S. meliloti* R1 et R2, a clairement montré que trois souches MS1, MS2 et Ag1 étaient capables de permettre la formation de nodules sur les racines de *M. sativa*.

5- Mesure des paramètres biochimiques

Les teneurs en chlorophylles a, b (Fig. 27A, B), totale (Fig. 27 C) et caroténoïdes (Fig. 27D) sont significativement élevées chez les plantes coinoculées en absence et en présence de sel.

Pour ce qui est des autres paramètres biochimiques, l'accumulation de proline et d'acides aminés dans les feuilles de *M. sativa* co-inoculées est nettement inférieure ce qui signifie que les actinobactéries atténuent le stress salin se traduisant par une diminution du taux de la proline et des acides aminés dans les feuilles des plantes inoculées et coinoculées (Fig.28 A, B).

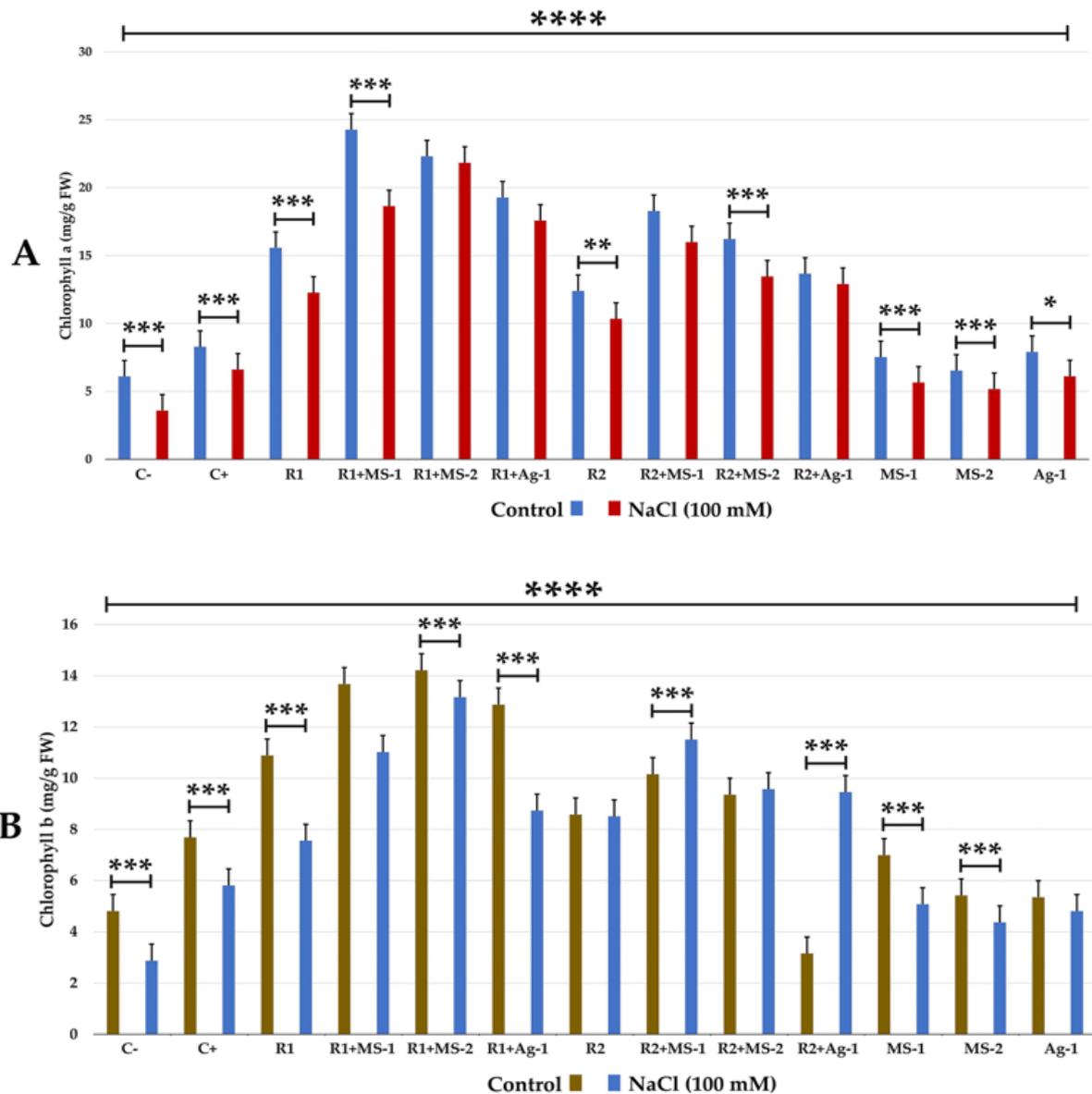


Fig. 27 (A, B): Effets de la co-inoculation bactérienne sur le contenu foliaire en chlorophylles a, b (mg /g de matière fraîche) de *Medicago sativa* avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl. (A) Chlorophylle a, (B) Chlorophylle b.

Les données représentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

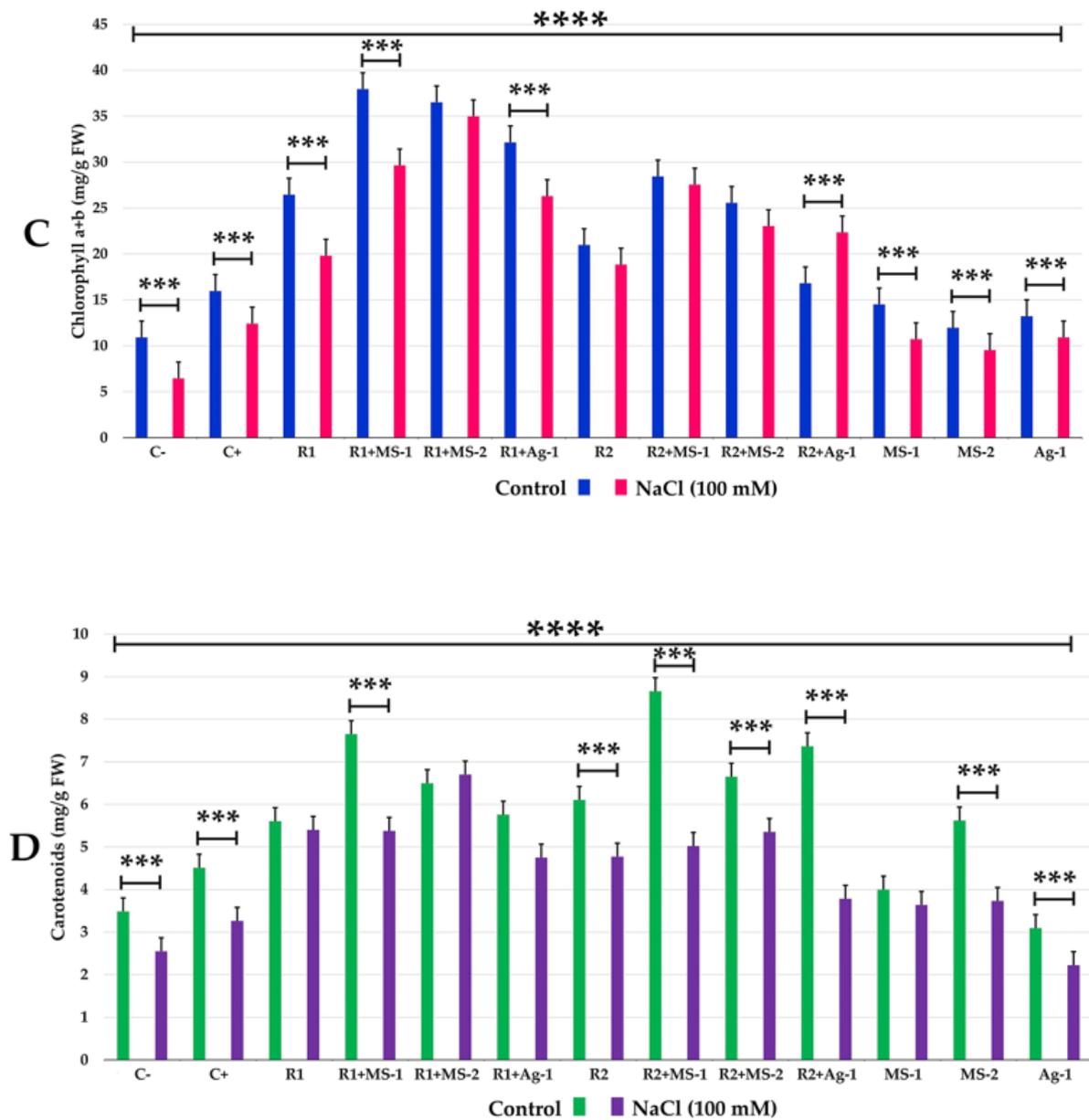


Fig. 27 (C, D): Effets de la co-inoculation bactérienne sur le contenu foliaire en chlorophylles a+b et caroténoïdes (mg /g de matière fraîche) de *Medicago sativa* avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl. (C) Chlorophylle a+b, (D) Carotenoides.

Les données représentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

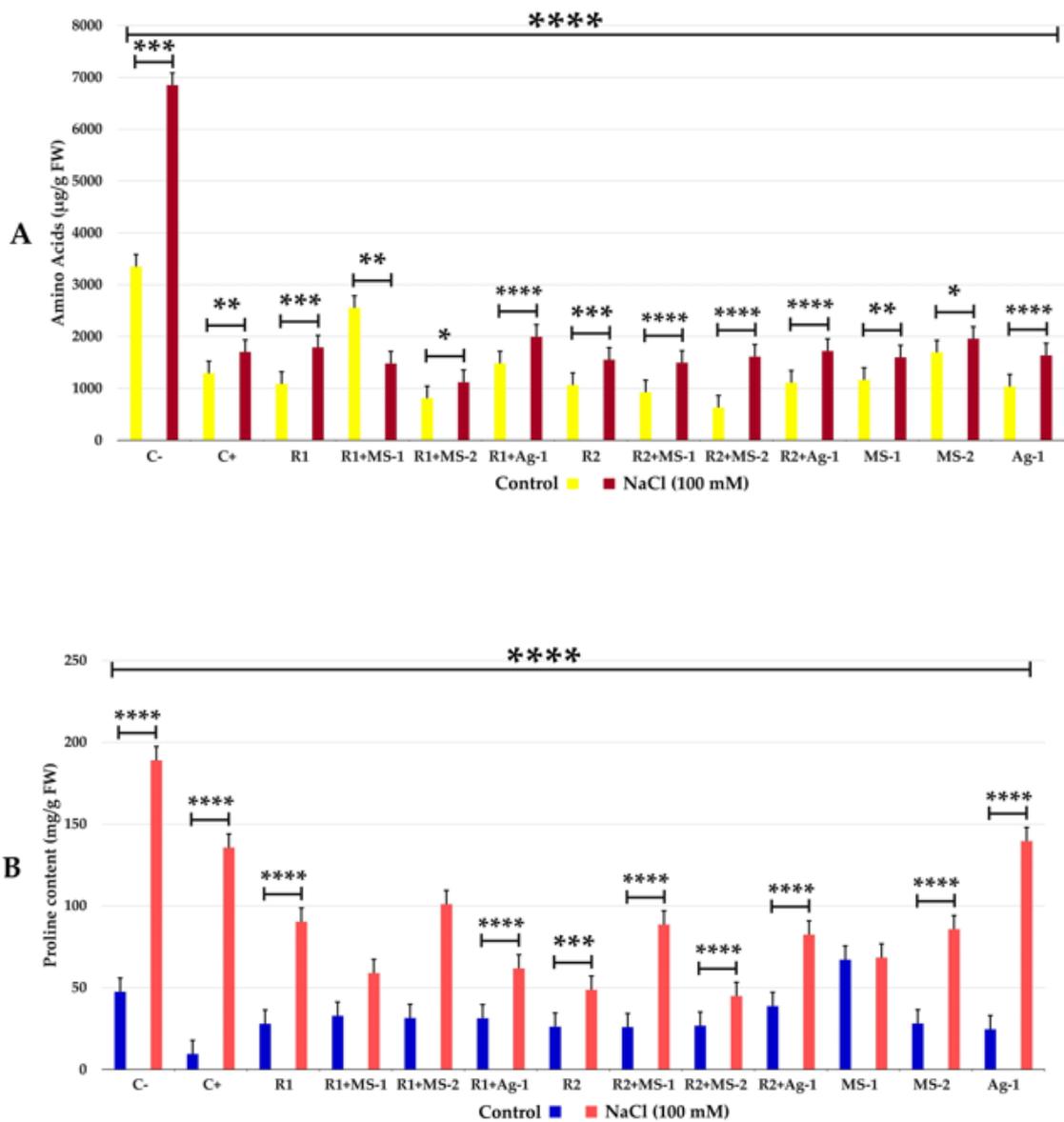


Fig.28 (A, B) : Effets de la co-inoculation bactérienne sur le contenu foliaire en acides aminés et proline ($\mu\text{g/g}$ de matière fraîche) de *Medicago sativa* avant et après exposition à 0 et 100 mM de NaCl. (A): Contenu en acides aminés et (B) : Contenu en proline. Les données représentent une moyenne \pm erreur standard. Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différentes à $P < 0,05$ en utilisant l'analyse ANOVA.

IV-Discussion

La fixation biologique de l'azote joue un rôle important dans l'amélioration de la productivité des sols (Thilakarathna *et al.*, 2019). Par conséquent, la carence en azote limite fortement la croissance des plantes (Wang *et al.*, 2019). La symbiose légumineuses – Rhizobia est une source d'azote peu coûteuse et une pratique agronomique efficace fournissant un apport suffisant d'azote par rapport à l'application d'engrais chimiques (Cherrad *et al.*, 2018 ; Sachs *et al.*, 2019). Cependant, divers facteurs environnementaux limitent la fixation de l'azote, affectent la survie et le taux d'infectivité des Rhizobia (Andrews et Andrews, 2019 ; Ferguson *et al.*, 2019). La meilleure option pour développer des cultures tolérantes au stress peut être l'utilisation de microorganismes PGP en tant que moyens d'améliorer la fixation biologique de l'azote (Htwe *et al.*, 2019).

Dans cette étude, trois souches bactériennes sélectionnées affiliées au phylum des actinobactéries sont capables d'établir une relation améliorant l'association symbiotique de *S. meliloti* et la légumineuse *M. sativa*. La promotion de la symbiose fixatrice d'azote par les actinobactéries a été largement documentée (Solans *et al.*, 2015). Les études récentes se concentrent plutôt sur les actinobactéries PGP par rapport aux autres bactéries en raison de leur abondance relative dans le sol et de leur capacité à produire une variété de métabolites. Ceci est le cas des souches sélectionnées qui dégradent diverses substances carbonées. Ces caractéristiques permettent non seulement d'étudier leur profil métabolique mais également de comprendre leur capacité de compétition et de survie (Goodfellow et Williams, 1983). De plus, il a été rapporté qu'une grande partie de leur génome (~ 5-10%) est consacrée à la production de métabolites secondaires. Ceux-ci les aident à croître même dans des conditions extrêmes. Les actinobactéries sont largement répandues dans les habitats aquatiques et terrestres, y compris les habitats extrêmes et les sols désertiques hyperarides (Fernandez, *et al.*, 2017). Ce qui est clairement montré par la tolérance de ces souches aux stress abiotiques notamment l'aridité et la salinité. Etant donné l'origine de leur isolement, certaines souches peuvent tolérer des concentrations de sel allant jusqu'à 800mM, un pH alcalin de 9, une température de 45°C et une pression osmotique de PEG de 60%. Les caractéristiques des sols jouent un rôle prééminent dans le processus de sélection microbienne. Les bactéries isolées des environnements extrêmes sont capables de survivre à des paramètres inhibiteurs par rapport à celles isolées d'habitats non stressants (Okoro *et al.*, 2009).

Comme les autres PGPR, les actinobactéries utilisent également des mécanismes directs et indirects pour améliorer la croissance et la protection des plantes. Dans le cadre de cette étude, tous les isolats produisent l'AIA à des taux variables. La capacité de production de phytohormones de plusieurs actinobactéries rhizosphériques et endophytes a été démontrée par divers chercheurs sur l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006 ; El-Tarabily *et al.*, 2020). L'AIA est la phytohormone principale qui accélère la croissance et le développement des plantes en améliorant la croissance des racines, des tiges et la vigueur des plantules. L'AIA est impliqué dans la division cellulaire, la différenciation et la formation de faisceaux vasculaires et est une hormone essentielle à la formation de nodules (Choudhury *et al.*, 2019).

Il ressort des résultats obtenus dans cette étude que toutes les souches testées présentent l'activité de solubilisation du phosphate. En effet, la disponibilité du phosphate dans les plantes par le biais de divers mécanismes des PGPR est soulignée par divers chercheurs dans diverses conditions de sol. Dans ce contexte, des actinobactéries : *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Streptomyces* et *Micromonospora* ont été décrites dans des conditions de solubilisation du P *in vitro* et dans des conditions sous serre (Hamdali *et al.*, 2008; Jog *et al.*, 2014). Aussi, Fernandez *et al.* (2007) ont signalé des effets favorables des bactéries solubilisant les phosphates sur la croissance du soja, ce qui a permis d'améliorer l'apport en nutriments des symbiotes de *Rhizobium* et la réduction de la nodulation.

De plus, de nombreuses études ont montré que les souches d'actinobactéries sont productrices de sidérophores (Wang *et al.*, 2014). Le genre *Streptomyces* est bien connu pour ses sidérophores, de types caractéristiques, tels que les desferrioxamines et coelicheline (Barona-Gomez *et al.*, 2006) ainsi que d'autres sidérophores des autres membres des actinobactéries: l'hétérobactine, un sidérophore de *Rhodococcus* et *Nocardia* (Lee *et al.*, 2012). Outre le contexte de la nutrition des plantes, les sidérophores offrent également une protection des plantes grâce au contrôle des phytopathogènes. *Streptomyces* produisant des sidérophores s'est également avéré efficace contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* dans des conditions de champ sur du pois chiche infecté (Gopalakrishnan *et al.*, 2011).

En outre, plusieurs Actinobacteria ont démontré une capacité de fixation de l'azote, notamment *Arthrobacter*, *Agromyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Propionibacteria* et *Streptomyces*. Cela a été démontré par leur capacité

à se développer sur un milieu sans azote et une activité de réduction de l'acétylène (Sellstedt et Richau, 2013). Des études utilisant l'identification de gènes *nif* confirment ce phénomène (Valdes *et al.*, 2005).

Les PGP Actinobacteria influencent indirectement la croissance de la plante en contrôlant et en minimisant les effets néfastes des stress externes de sources biotiques ou abiotiques via les modes suivants: compétition pour les nutriments, production de substances inhibitrices de faible masse moléculaire telles que l'ammoniac, les enzymes dégradant les parois cellulaires (chitinase, cellulase, protéase) et d'autres métabolites secondaires, propriétés que devrait posséder un fertilisant efficace (Jog *et al.*, 2016 ; Mathew *et al.*, 2020). Dans la présente étude, toutes les souches sélectionnées ont montré plusieurs traits de PGP, indépendamment de leur origine d'isolement. À l'exception de la souche Ag1, toutes les autres souches étaient des bactéries non rhizosphériques ou endophytiques et à notre connaissance, c'est la première étude montrant que ce type de bactéries peut être utilisé comme promoteur de la croissance végétale.

Dans le cadre de cette expérience, nos résultats ont clairement montré l'importance des inoculants actinobactériens dans la stimulation de la croissance des plantes de *M. sativa*. L'amélioration de la nodulation et de la fixation de l'azote chez les cultivars de luzerne était liée au traitement de co-inoculation. Il a été noté que les plantes co-inoculées avec des actinobactéries et *Sinorhizobium* présentaient une nodulation et une croissance de plantes accrues par rapport aux plantes avec une seule inoculation. Conformément à ce résultat, la combinaison de *Streptomyces kanamyceticus* et *Bradyrhizobium japonicum* a augmenté la nodulation et la composition en azote des tiges de soja de 55% et 41% respectivement (Gregor *et al.*, 2003). Soe et Yamakawa (2013) ont examiné l'effet de la co-inoculation de *Bradyrhizobium yuanmingense* MAS34 et de *Streptomyces griseoflavus* P4 sur l'amélioration de la nodulation, la fixation d'azote et le rendement en semences de différentes variétés de soja. La preuve d'un effet plus direct sur la nodulation a été décrite par Volpin *et al.*, (1996). Ils ont montré qu'*Azospirillum brasilense* augmentait l'exsudation de flavonoïdes, molécules de signalisation végétales essentielles à l'établissement de la symbiose Rhizobia-légumineuses, dans la rhizosphère de la luzerne et du haricot commun. Les nodules de légumineuses sont souvent occupés par un microbiome bactérien phylogénétiquement divers. Ces bactéries peuvent avoir un impact sur la croissance et la santé des plantes, voire sur la formation de nodules et la fixation d'azote, mais leurs rôles écologiques restent inconnus (Peix *et al.*, 2015). Cependant, des études récentes ont montré que les bactéries non rhizobiennes dans les nodules ne sont pas des acteurs passifs. Elles

peuvent même contrôler dans une certaine mesure la plante hôte (Gano-Cohen *et al.*, 2016). En outre, certaines bactéries non rhizobiennes aident *Rhizobium* à élargir sa gamme d'hôtes (Martinez-Hidalgo *et al.*, 2014) et améliorent la nodulation et la fixation d'azote des symbiotes légumineuses – Rhizobia. Elles régulent sélectivement l'entrée et la survie des bactéries dans cette niche spécifique, le nodule racinaire (Mus *et al.*, 2016).

Des études moléculaires ont montré que de nombreuses actinobactéries peuvent se présenter sous forme d'endophytes dans diverses plantes légumineuses (Slama *et al.*, 2019b). L'application d'inoculants de *Streptomyces* améliorant la nodulation et le contenu en azote du sol indique leur effet promotionnel et l'influence de la symbiose Rhizobia-légumineuse de manière non spécifique (Mlaik *et al.*, 2015). Toutefois, contrairement à ce qui a été rapporté, dans notre cas *Streptomyces* ne semble pas contribuer à la nodulation par rapport au genre *Arthrobacter* qui améliore la nodulation ainsi que tous les paramètres de la croissance végétale, en présence de souches *S. meliloti* R1 ou R2 (Aragunde *et al.*, 2018).

L'analyse de la variance indique que les paramètres de croissance de la luzerne étudiés sont négativement affectés par la salinité. Il a été rapporté que l'inoculation bactérienne a atténué les effets indésirables du stress sur la croissance des plantes (Prospero *et al.*, 2013).

Nos résultats sont en concordance de conclusions antérieures selon lesquelles les plantes inoculées poussaient mieux et avaient une biomasse plus élevée que les plantes non inoculées dans des conditions de stress salin (Al-Karaki, 2001; Cantrell et Linderman, 2001; Diouf *et al.*, 2005; Lukiwatid et Simanungalid, 2002). Ainsi, sur la base des résultats obtenus, la symbiose légumineuse-Rhizobia et le processus d'initiation des nodules sur les légumineuses sont tous deux sensibles au stress salin (Elsheikh et Wood, 1990). Le stress salin inhibe les premières étapes de la symbiose Rhizobia-légumineuses. Les effets néfastes de la salinité sur la symbiose peuvent également résulter de la suppression de la fonction des nodules et de la réduction de la capacité des plantes à la croissance (Elsheikh et Wood, 1990).

L'augmentation de la croissance des plantes inoculées avec des souches non rhizobiennes comparés à celles des plantes inoculées avec la souche rhizobienne *S. meliloti* peuvent être attribués à la tolérance plus élevée des souches d'actinobactéries à la salinité et à la sécheresse et à leur plus grande capacité à produire l'hormone AIA.

Le stress salin a aussi un effet délétère sur les paramètres biochimiques se traduisant par une diminution de la concentration en chlorophylle suite à l'affaiblissement des complexes protéines-lipides (Rosa-Ibarra et Maiti, 1995) et par conséquent à la réduction de

l'interception de la lumière, à une augmentation de l'activité de la chlorophyllase et à la synthèse de composés azotés qui consomme une grande quantité d'azote (Levitt, 1980).

On sait également que des concentrations plus élevées d'ions dans les sols salins s'accumulent dans les cellules végétales, inactivent les enzymes et inhibent la synthèse des protéines et la photosynthèse (Rekik *et al.*, 2017).

L'analyse de la teneur en proline foliaire révèle que la salinité stimule sa synthèse intracellulaire. Celle-ci est maximale à 100 mM de NaCl. L'inoculation entraîne une diminution de sa teneur foliaire sous l'effet du stress salin. La proline est évidemment l'acide aminé le plus largement accumulé par les plantes dans un sol salin (Prospero *et al.*, 2013). Les plantes inoculées peuvent améliorer leur taux de croissance et leur tolérance au sel et supprimer les effets néfastes du stress permettant ainsi leur adaptation aux conditions salines (Prospero *et al.*, 2013).

Les résultats de cette étude indiquent clairement que les bactéries tolérantes à la sécheresse et à la salinité présentant de multiples traits PGP peuvent potentiellement augmenter la croissance de la luzerne dans des conditions de salinité, en présence ou en absence de bactéries rhizobiennes symbiotiques. Ces connaissances seront utiles pour définir des stratégies d'application de ces bactéries en tant que bio-inoculants, seules ou associées à des bactéries rhizobiennes. Une telle approche améliorera les performances ou la persistance des Rhizobia et diminuera l'utilisation des engrais chimiques (Sachs *et al.*, 2019).

Selon les résultats de cette étude, les bactéries MS1 et MS2 peuvent être des biofertilisants appropriés dans la formulation de produits agricoles améliorant le développement des plantes, la santé et la productivité dans des sols salins, alternative nécessaire pour l'agriculture moderne et le développement durable.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La symbiose *Rhizobium*–légumineuse est une source importante d'azote fixé sous forme d'ammoniac dans la biosphère. Elle est par conséquent un mécanisme alternative utilisé pour réduire l'application d'engrais azoté chimique, coûteux en production agricole. Le *Rhizobium* ayant la capacité de noduler les légumineuses, peut être utilisé en toute sécurité dans les pratiques agricoles pour augmenter la productivité des plantes.

Dans cette étude, la stratégie visant l'isolement des Rhizobia à partir de nodules de la luzerne a permis de sélectionner six souches présentant les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques confirmant le genre *Rhizobium*. Ces souches testées pour leur capacité de production d'AIA, de sidérophores et de solubilisation des phosphates confirme leurs potentialités d'amélioration de la croissance des plantes.

Les expériences en pots ont montré que l'inoculation bactérienne de la plante hôte *Medicago sativa* pouvait favoriser la croissance des plantes et augmenter leurs paramètres morphologiques et biochimiques. Quoique la nodulation était défectueuse, l'effet PGP est visiblement clair supporté par la capacité phytostimulatrice et fertilisante des isolats.

Dans un souci d'améliorer la réponse des légumineuses à l'inoculation de *Rhizobium* notamment en conditions stressantes, la co-inoculation avec d'autres PGPR est une stratégie efficace qui aurait de meilleures chances d'agir en synergie avec *Rhizobium* pour une meilleure productivité par rapport à une simple inoculation.

La co-inoculation a été suivie par l'utilisation des souches de *S. meliloti* R1 et R2 avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées (MS1, MS2 et Ag1). Les résultats montrent une meilleure nodulation sur les racines de *Medicago sativa* et une augmentation significative des paramètres de croissance et des teneurs en pigments chlorophylliens de la plante hôte. La co-inoculation a permis également d'avoir une meilleure réponse au stress salin en améliorant les stratégies d'adaptation.

En effet, ces bactéries recherchées et caractérisées ont montré des aptitudes intéressantes pour rétablir la symbiose en augmentant le nombre de nodules et rééquilibrer les perturbations physiologiques des plantes engendrées par le stress salin. De ce fait ces bactéries peuvent être associées aux Rhizobia pour l'application dans la bioinoculation des légumineuses des sols affectés par la salinité.

Pour compléter ce travail, il est nécessaire d'optimiser les conditions de croissance pour améliorer le processus de nodulation et considérer comme un moyen prometteur les interactions entre PGPR, les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) et la symbiose *Rhizobium*-légumineuse. Les effets interactifs des *Rhizobia* avec d'autres PGPR dans des conditions normales et stressantes pourraient améliorer la production agricole.

Des études moléculaires des génomes entiers ou de gènes particuliers notamment ceux responsables de la nodulation seraient sans doute utiles dans la compréhension de l'établissement de la symbiose rhizobienne.

De nombreux travaux sur l'amélioration des propriétés symbiotiques de divers groupes de *Rhizobium* ont été publiés ces dernières années. Des efforts considérables ont été déployés pour comprendre l'efficacité de la régulation de l'endosymbiose hôte-microorganismes. La variabilité de la nodulation et de la fixation d'azote a suggéré que l'isolat prédominant pourrait être le plus efficace pour un hôte particulier. Certains déterminants génétiques de *Rhizobium* impliqués dans l'infectiosité pourraient être élaborés et conduiront à l'extension de leur infectiosité et de leur efficacité en termes de fixation d'azote chez une large gamme d'hôte. Par ce processus la disponibilité de biofertilisants multilégumineuses efficaces pourrait éviter le problème de compétitivité et fournir les meilleurs inoculants pour améliorer la croissance et la fixation de l'azote des légumineuses en zones arides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aamir, M., A. Aslam, M. Y. Khan, M. Usman Jamshaid, M. Ahmad, H. N. Asghar et Z. A. Zahir (2013).** Co-inoculation with *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under field condition of semi-arid climate. *Asian J. Agri. Biol.*, **1** (1): 1-7.
- Afza, R., G. Hardarson et F. Zapata (1987).** Effect of delayed soil and foliar N fertilization on yield and N₂ fixation of soybean. *Plant and soil*, **97**: 361-368.
- Agadagba, S. K. (2014).** Isolation of Actinomycetes from Soil. *J. Microbiol. Res.*, **4**(3): 136-140.
- Ahemad, M. et M. Kibret (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting Rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud. University - Science*, **26**: 1–20.
- Akhtar, N., M. A. Qureshi, A. Iqbal, M. J. Ahmad, et K. H. Khan (2012).** Influence of *Azotobacter* and IAA on symbiotic performance of *Rhizobium* and yield parameters of lentil. *J. Agric. Res.* **50**:361-372.
- Al-Karaki, G. N. (2001).** Germination, sodium, and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity. *J. Plant Nutr.*, **24**(3), 511–522.
- Amaresan, N., K. Kumar, J. H. Naik, K. G. Bapatla et R. K. Mihra (2018).** *Streptomyces* in Plant Growth Promotion: Mechanisms and role. pp: 125-135. *In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Actinobacteria: Diversity and biotechnological applications.* Singh, B.P., A. K. Passari et V. K. Gupta (Eds.).
- Amule, F. C., P. Sirothiya, A. K. Rawat et U. S. Mishra (2018a).** Efficacy of Actinomycetes, *Rhizobium* and plant growth promoting Rhizobacteria consortium inoculants on symbiotic traits, nodule leghemoglobin and yield of soybean in central India. *Int. J. Chem. Stud.*, **6**(1): 593-596.
- Amule, F. C., P. Sirothiya, A. K. Rawat et U. S. Mishra (2018b).** Effect of actinobacterial, *Rhizobium* and plant growth promoting Rhizobacteria consortium inoculation on rhizosphere soil properties in soybean in Jabalpur district of Madhya Pradesh. *Int. J. Chem. Stud.*, **6**(1): 583-586.
- Andrews, M. et M. E. Andrews (2019).** Specificity in legume–Rhizobia symbioses. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(4):26.
- Anonyme (2005).** Fiche descriptive sur les zones humides RAMSAR. Ministère de l’agriculture et du développement rural direction générale des forêts. Algérie.
- Anonyme (2019).** Complexe de zones humides de la plaine de Guerbes-Sanhadja. Fiche descriptive sur les zones humides RAMSAR. Ministère de l’agriculture et du développement rural direction générale des forêts. Algérie.
- Ansari, F. A., et I. Ahmad (2019).** Fluorescent *Pseudomonas* -FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Scientific Reports*, **9**(4547): 1-12.
- Anwar, S., B. Ali et I. Sajid (2016).** Screening of rhizospheric Actinomycetes for various *In vitro* and *In-vivo* plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds.

Front. Microbiol., **7**(1334): 1-11.

Apostol, L., S. Iorga, C. Mosoiu, R. C. Racovita, O. M. Niculae et G. Vlasceanu (2017). Alfalfa concentrate-A rich source of nutrients for use in food products. *Agric. Food*, **5**: 66-73.

Aragunde, H. X. Biarnés et A. Planas (2018). Substrate Recognition and Specificity of Chitin Deacetylases and Related Family 4 Carbohydrate. *Esterases. Int. J. Mol. Sci.*, **19** (2): 412.

Arnon, D.T. (1949). Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**: 1-15.

Atieno, M., L. Herrmann, R. Okalebo et D. Lesueur (2012). Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**(7): 2541–2550.

Audrain, B., M. A. Farag, C. M. Ryu et J. M. Ghigo (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**: 222–233.

Baldani, J. I. et V. L. D. Baldani (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, **77**(3), 549–579.

Barka E. A., P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-Vaillant, C. Jacquard, H. P. Klenk, C. Clément, Y. Ouhdouch et G. P. Van Wezel (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80** (1): 1-44.

Barona-Gomez, F., S. Lautru, F. X. Francou, P. Leblond, J. L. Pernodet et G. L. Challis (2006). Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology*, **152**(Pt 11):3355–3366.

Beneduzi, A., A. Ambrosini et L. M.P. Passaglia (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Gen. Mol. Biol.*, **35** (4): 1044-1051.

Bernaerts, M. J. et J. Deley (1963). A Biochemical Test for Crown Gall Bacteria. *Nature*, **197**: 406–407.

Berrada, H. et K. Fikri-Benbrahim (2014). Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *British Microbiol., Res. J.*, **4**(6): 616-639.

Black, M., M. Paula, C. Brett, B. Roberto, H. John Howieson, H. Mariangela et B. Matthew (2012). The genetics of symbiotic nitrogen fixation: Comparative genomics of 14 Rhizobia strains by resolution of protein clusters. *Genes*, **3**: 138-166.

Bora, S. K. et A. Sharma (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharm. Biol.*, **49**(2): 211–220.

Brewin, N.J., (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **23**: 293-316.

Brockwell, J., P. J. Bottomley et J. E. Thies (2005). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant and Soil*, **174**: 143-180.

Brown, C. M., et M. J. Dilworth (1975). Ammonia Assimilation by *Rhizobium* Cultures and Bacteroids. *J. General Microbiol.*, **86**(1): 39–48.

- Brundu, G., I. Camarda, M. Caredda, G. Garau, S. Maltoni et P. Deiana. (2004).** A contribution to the study of the distribution of *Medicago-Sinorhizobium* symbiosis in Sardinia, Italy. *Agr. Med.*, **134**: 33-48.
- Buttery, B. R. et V. A. Dirks (1987).** The effect of soybean cultivar, Rhizobium strain and nitrate on plant growth, nodule mass and acetylene reduction rate. *Plant and soil*, **98**:285-293.
- Cantrell, I. C. et R. G. Linderman (2001).** Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil*, **233**(2): 269-281.
- Cappuccino, J. C. et N. Sherman (1992).** Microbiology: A Laboratory Manual, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.
- Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna et V. Luna (2009).** *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.*, **45**(1), 28–35.
- Chaudhary, H. S., B. Soni, A. R. Shrivastava et S. Shrivastava (2013).** Diversity and versatility of Actinomycetes and its role in antibiotic production. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **3** (8): S83-S94.
- Chaudhary, D. et S. S. Sindhu (2017).** Amelioration of salt stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by co-inoculation of ACC deaminase-containing rhizospheric bacteria with *Mesorhizobium* strains. *Legume Res.*, **40** (1): 80-86.
- Cherif-Silini H., B. Thissera, A. C Bouket, N. Saadaoui, A. Silini, M. Eshelli, F. N. Alenezi, A. Vallat, L. Luptakova, B. Yahiaoui, S. Cherrad, S. Vacher, M. E. Rateb et L. Belbahri (2019).** Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and secondary metabolite arsenal. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**:3989.
- Cherrad, S., A. Charnay, C. Hernandez, H. Steva, L. Belbahri et S. Vacher (2018).** Emergence of boscalid-resistant strains of Erysiphe necator in French vineyards. *Microbiol. Res.*, **216**:79–84.
- Choudhury, S. R., S.M. Johns et S. Pandey S (2019).** A convenient, soil-free method for the production of root nodules in soybean to study the effects of exogenous additives. *Plant Direct*, **3**(4): 1-11.
- Clúa, J., C. Roda, M. E. Zanetti et F. A. Blanco (2018).** Compatibility between legumes and Rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*, **9**(125):1-21
- Cooper, J.E. (2007).** Early interactions between legumes and Rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.*, **103**: 1355-1365.
- Crossman, L. C. (2005).** Plasmid replicons of *Rhizobium*. *Biochemical Society Transactions*, **33**(1): 157–158.
- Dastager, S. G., C. K. Deepa et A. Pandey (2010).** Isolation and characterization of novel plant growth promoting Micrococcus sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiol. Biochem.*, **48**(12) : 987–992.
- Davet, P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Edition INRA, Paris. France. 384 p.

- Davies, P. J. (2018).** Reflections from the Janus face of gibberellin in legume nodulation. *J. Exp. Botany*, **69**: 1824–1828.
- Del Rosario, C., L., Santoro, M. V., Reinoso, H., Travaglia, C., Giordano, W. et E. Banchio (2015).** Anatomical, Morphological, and Phytochemical Effects of Inoculation with Plant Growth- Promoting Rhizobacteria on Peppermint (*Mentha piperita*). *J. Chem. Ecol.*, **41**(2) : 149–158.
- Dénarié, J., F. Debelle, J. C. Prome. (1996).** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**: 503-535.
- Diouf, D., R. Duponnois, A. Tidiane Ba, M. Neyra et D. Lesueur (2005).** Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. *Functional Plant Biology.*, **32**: 1143-1152.
- Dos Santos, R. M., P. A. E. Diaz, L. L. B. Lobo et E. C. Rigobelo (2020).** Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in maize and sugarcane: Characteristics and applications. *Front. Sustainable Food Syst.*, **4** (136) :1-15.
- Duhoux, E. et M. Nicole (2004).** Biologie végétale. Association et interaction chez les plantes. p. 166. DUNOD. Paris.
- Dworkin, M. et J. Foster (1958).** Experiments with some microorganisms, which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.*, **75**: 592–601.
- Egamberdieva, D., D. Jabborova et S. Wirth (2013).** Alleviation of salt stress in legumes by co-inoculation with *Pseudomonas* and *Rhizobium*. pp: 291-303. *In: Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances.* Arora, N. K. (Ed.). Springer India.
- Ekpenyong, M., A. Atim, O. Abraham et A. Sylvester. (2016).** Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia* sp. SLO3. *Nigerian J. Biopesticides*, **1** (1): 70-82.
- El Sheikh, E. A. E. et M. Wood (1990).** Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.*, **41**:1263–1269.
- El Sabagh, A., A. Omar, H. Saneoka et C. Barutçular (2015).** Comparative physiological study of soybean (*Glycine max* L.) Cultivars under salt stress. *YYU J. Agr. Sci.*, **25**(3): 269-284.
- El-Tarabily, K. A. et K. Sivasithamparam (2006).** Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* **34**:1–16.
- El-Tarabily, K. A., K. Z. El-Baghdady, A. S. AlKhajeh, M. M. Ayyash, R. S. Aljneibi, A. El-Keblawy et S. F. AbuQamar (2020).** Polyamine producing Actinobacteria enhance biomass production and seed yield in *Salicornia bigelovii*. *Biol. Fertil. Soils*, **56**:499–519.
- Etesami, H., S. Emami, H. A. Alikhani (2017).** Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - A review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **17** (4) : 897-911.
- Farissi, M., F. Aziz, A. Bouizgaren et C. Ghouiam (2014).** La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *Int. J. Innov. Sci. Res.*, **11** (1): 97-99.

- Ferguson, B. J., C. Mens, A. H. Hastwell, M. Zhang, H. Su, C. H. Jones, ... P. M. Gresshoff. (2019).** Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell. Environ.* **42**:41-51.
- Fernandez, L. A., P. Zalba, M. A. Gomez et M. A. Sagordoy (2007).** Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Boil. Fertil. Soil*, **43**:805–810.
- Fernandez, A. L., K. P. Fabrizzi, N. E. Tautges, J. A. Lamb et C. C. Sheaffer (2017).** Cutting management and alfalfa stand age effects on organically grown corn grain yield and soil N availability. *Rev. Agric. Food Syst.*, **34**(2):1–11.
- Ferreira, C. M. H., H. M.V.M. Soares et E. V. Soares (2019).** Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Sci. Environ.*, **682**: 779–799.
- Figueiredo, M.V. B., A. Bonifacio, A. C. Rodrigues et F. F. de Araujo (2016).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key mechanisms of action. pp: 23-37. *In: Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants.* Choudhary, D.K. et A. Varma (Eds.). Springer. Singapore.
- Franco-Correa, M. et V. Chavarro-Anzola (2016).** Actinobacteria as plant growth-promoting Rhizobacteria. pp: 249-270. *In: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.* Dhanasekaran, D. et Y. Jiang (Eds.). Intech.
- Frikha, D. D., Z. Zarai, S. Najah, R. Abdennabi, L. Belbahri, M. E. Rateb, H. Mejdoub et S. Maalej (2017).** Antagonistic properties of some halophilic Thermoactinomycetes isolated from superficial sediment of a solar saltern and production of cyclic antimicrobial peptides by the novel isolate Paludiflum halophilum. *Biomed. Res. Int.*, **2017** (4):1-13.
- Gage D. J., (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**(2): 280-300.
- Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard et al. (2001).** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, **293** (5530): 668–672.
- Gano-Cohen, K. A., P. J. Stokes, M. A. Blanton, C. E. Wendlandt, A. C. Hollowell, J. U. Regus, D. Kim, S. Patel, V. J. Pahlua et J. L. Sachs (2016).** Non-nodulating *Bradyrhizobium* spp. modulate the benefits of legume-rhizobium mutualism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**(17):5259– 5268.
- Gaur, A.C., (1990).** Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers. 1st Edn., Omega Scientific Publishers, New Delhi, India, ISBN: 81-85399-09-3.
- Gauri, S., A. k. Singh, R. P. Bhatt, S. Pant, M. K. Bedi et A. Naglot (2011).** Characterization of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum*. *J. Agric. Technol.*, **7**(6): 1705-1723.
- Geurts R. et T. Bisseling T., (2002).** *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. *Plant Cell*, **14**: 239-249.
- Giraud, E., L. Moulin, D. Vallenet, V. Barbe, E. Cytryn et al. (2007).** Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic Bradyrhizobia. *Science*, **316** (5829):1307–1312.

- Goodfellow, M. et S. T. Williams (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **37**:189–216.
- Goodfellow, M., P. Kämpfer, H. J. Busse, M. E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig et W. B. Whitman (2012).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. Vol. 5. Part A and B. The Actinobacteria. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
- Gopalakrishnan, S., S. Pande, M. Sharma, P. Humayun, B. K. Kiran, D. Sandeep, M. S. Vidya, K. Deepthi et O. Rupela (2011).** Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Protection*, **30**(8): 1070–1078.
- Gopalakrishnan, S., A. Sathya, R. Vijayabharathi, R.K. Varshney, C. L. L. Gowda et L. Krishnamurthy (2015).** Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotech.*, **5**:355–377.
- Goswami, D., J. N. Thakker et P. C. Dhandhukia (2016).** Portraying mechanics of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric.*, **2**(1): 1-19.
- Gouda, S., R. G. Kerry, G. Das, S. Paramithiotis, H. S. Shin et J. K. Patra (2018).** Revitalization of plant growth promoting Rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.*, **206**: 131–140.
- Greene, S. L., A. A. Afonin, E. Dzyubenko et N. Dzyubenko (2012).** Effective conservation of *Medicago* crop wild relatives in Russia and neighbouring countries: Gap analysis points the way forward. p: 82-90. *In: Agrobiodiversity conservation: Securing the diversity of crop wild relatives and landraces.* Maxted *et al.*, (Eds.). Pondicherry. India.
- Gregor, A. K., B. Klubek et E.C. Varsa EC (2003).** Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.*, **49**:483–491.
- Guignard J.L. et F. Dupont (2005).** Botanique. p: 164-179. 13^{ème} Edition Masson.Sprent.
- Gupta G., S. S. Parihar, N. K. Ahirwar, S. K. Snehi et V. Singh (2015).** Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.*, **7**(2): 96-102.
- Haag, A. F., M. F. Arnold, K. K. Myka, B. Kerscher, S. Dall'Angelo, M. Zanda *et al.* (2013).** Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis. *FEMS Microbial. Rev.*, **37**: 364–383.
- Hamdali, H., B. Bouizgarne, M. Hafidi, A. Lebrihi, M. J. Virolle et Y. Ouhdouch (2008).** Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.*, 1-25.
- Harborne, J. B. et C. A. Williams (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**(6): 481–504.
- Hassan, S. et U. Mathesius (2012).** The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J. experimental botany*, **63**(9): 3429-3444.
- Holt, J.G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley et S. T. Williams (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. pp: 95-97. 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. 1^{ère} Ed. Edition de boeck. 514p.

- Htwe, A. Z., S. M. Moh, K. M. Soe, K. Moe et T. Yamakawa (2019).** Effects of biofertilizer produced from *Bradyrhizobium* and *Streptomyces griseofavus* on plant growth, nodulation, nitrogen fixation, nutrient uptake, and seed yield of mung bean, cowpea, and soybean. *Agronomy*, **9**(2):77.
- Ivanov, S., E. E. Fedorova, E. Limpens, S. De Mita, A. Genre, P. Bonfante et T. Bisseling (2012).** *Rhizobium*–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(21), 8316–8321.
- Jebara, M., J. J. Drevon et M. Aouani (2001).** Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native Rhizobia from Tunisian soils. *Agr.*, **21**: 601–605.
- Jog, R., M. Pandya, G. Nareshkumar et S. Rajkumar (2014).** Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiol.*, **160**(4): 778–788.
- Jog, R., G. Nareshkumar et S. Rajkumar (2016).** Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. pp 33–45. *In: Plant growth promoting Actinobacteria.* Gopalakrishnan S, A. Sathya et R. Vijayabharathi (Eds.). Springer, Singapore.
- Jourdan, E., M. Ongena et P. Thonart (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **12**(4) : 437-449.
- Kerstens, K. et J. De Ley (1984).** Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919. pp: 361-373; *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Vol. 1. Krieg, N. R. et J. R. Holt (Eds.). Williams and Wilkins Baltimore.
- Kenneth, O. C., E. C. Nwadike, A. U. Kalu et U. V. Unah (2019).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Novel Agent for Sustainable Food Production. *Am. J. Agri. Biol. Sci.*, **14**: 35.54.
- Khalid, A., M. Arshad et Z. A. Zahir (2004).** Screening plant-growth Rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, **96**(3):473-480.
- Khan, M. S., A. Zaidi, A. Rizvi et S. Saif (2017).** Inoculation Effects of Associative Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Performance of Legumes. pp: 261–276. *In: Microbes for Legume Improvement.* Almas Zaidi, A., M. S. Khan et J. Musarrat (Eds.). India.
- Khasabuli, O. Y. et A. N. Kibera (2014).** Isolation, characterization and primary screening of soil Actinomycetes from Kenyatta University arboretum grounds for antibacterial activities. *J. Appl. Biosci.*, **74**:6072– 6079.
- Klimek-Kopyra, A., A. Baran, T. Zajac et B. Kulig (2015).** Effects of heavy metals from polluted soils on the roots and nodules formation. *Bulgarian J. Agr. Sci.*, **21**(2): 295–299.
- Kondorosi, E., P. Mergaret et A. Kereszt (2013).** A paradigm for endosymbiotic life: Cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Ann. Rev. Microbiol.*, **67**(1):611-28.
- Kundan, R., G. Pant, N. Jadon et P. K. Agrawal (2015).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *J. Fertil. Pestic.*, **6**(2): 2: 1-9.
- Labuschagne, N., T. Pretorius et A.H. Idris (2010).** Plant growth promoting Rhizobacteria as biocontrol agents against soil-borne plant diseases. pp: 211-3-230. *In:*

Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Maheshwari, D. K. (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Laamari, R., M. Mars, M. P. S. Fevereiro et A. Ferchichi (2016). In vitro micro propagation of local alfalfa *Medicago sativa* L. Gabsi. *J. new sci., Agric. Biotech.*, **33**(1): 1885-1891.

Lechevalier, H. et M. P. Lechevalier (1981). Introduction to the order Actinomycetales. pp: 1915-1922. *In: The Prokaryotes. vol. 2.* Starr, M. P., H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows et H. G. Schlegel (Eds.). Germany. Springer-Verlag Berlin,

Lee, J., A. Postmaster, H. P. Soon, D. Keast, et K. C. Carson (2012). Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *BioMetals*, **25** (2) : 285–296.

Lei Y., Y. Xu, C. Hettenhausen, C. Lu, G. Shen, C. Zhang, J. Li, J. Song, H. Lin et J. Wu (2018). *Medicago sativa* L. leaf transcriptomes reveals genotype-specific salt tolerance mechanisms. *Plant Biol.*, **18** (35): 1-14.

Levitt, J (1980). Chilling, freezing, and high temperature stresses. *In: Responses of plants to environmental stress*, 2nd ed., vol 1.

Li, H., Y. Qiu, T. Yao, Y. Ma, H. Zhang et X. Yang (2020). Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil and Tillage Res.*, **199**: 104577.

Lima, J.V. L., S. C. S. Martins, K. A. de Siqueira, M. A. Soares et C. M. Martins (2017). Characterization of Actinobacteria from the semi-arid region, and their antagonistic effect on strains of Rhizobia. *African J. Biotech.*, **16**(11): 499-507.

Lindström, K. et S. Lehtomäki (1988). Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**: 277–287.

Liu, C. W. et J. Murray, (2016). The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An Update. *Plants*, **5**(3): 33.

Liu, C., X. Zhuang, Z. Yu, Z. Wang, Y. Wang, X. Guo, W. Xiang et S. Huang (2019). Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic Actinobacteria of healthy and diseased soybean. *Microorganisms*, **7**:243.

Loper, J.E et M.N. Scroth (1986). Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, **76**: 386-389.

Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant*: 142-146.

Louati, M, N. J. Ennis, F. Ghodhbane-Gtari, K. Hezbri, J. L. Sevigny, M. F. Fahnestock, H. Cherif-Silini, J. G. Bryce, L. S. Tisa et M. Gtari (2019). Elucidating the ecological networks in stone-dwelling microbiomes. *Environ. Microbiol.*, **22**(4):1467-1480.

Lukiwatid, R. et R. D. M. Simanungalid (2002). Dry matter yield, N and P uptake of soybean with *Glomus manihitis* and *Bradyrhizobium japonicum*. 17th WCSS. Thailand. 1190-1-1190-8.

Madigan M. et J. Martinko (2007). Brock, Biologie des microorganismes. 11e Edition. Person Education France. pp. 599-601, 676-681.

- Maróti, G. et É. Kondorosi (2014).** Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis. *Front. Microbiol.*, **5** (326) :1-6.
- Martinez-Hidalgo, P., P. Galindo-Villardón, J. M. Igual et E. Martínez-Molina (2014).** *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.): A new promising plant probiotic bacteria. *Sci. Rep.*, **4**:1–9.
- Mathew, B. T., Y. Torkey, A. Amin, A. H. I. Mourad, M. M. Ayyash, A. El-Keblawy, S. F. AbuQamar et K. A. El-Tarabily (2020).** Halotolerant marine rhizosphere-competent Actinobacteria promote *Salicornia bigelovii* growth and seed production using seawater irrigation. *Front. Microbiol.*, **11** (552): 1-21.
- Mavingui, P., T. Laeremans, M. Flores, D. Romero, E. Martínez-Romero et R. Palacios (1998).** Genes essential for Nod Factor production and nodulation are located on a symbiotic amplicon (AMPRtrCFN299pc60) in *Rhizobium tropici*. *J. Bacteriol.*, **180**(11) :2866–2874.
- Mefteh, F.B., A. Daoud, A. C. Bouket, F. N. Alenezi, L. Luptakova, M. E. Rateb, A. Kadri, N. Gharsallah et L. Belbahri (2017).** Fungal root microbiome from healthy and brittle leaf diseased date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.) reveals a hidden untapped arsenal of antibacterial and broad spectrum antifungal secondary metabolites. *Front. Microbiol.*, **8**(307) :1-18.
- Mefteh, F. B., A. Daoud, A. Chenari Bouket, B. Thissera, Y. Kadri, H. Cherif-Silini, M. Eshelli, F. Alenezi, A. Vallat, T. Oszako, A. Kadri, J. M. Ros-Garcia, M. Rateb, N. Gharsallah et L. Belbahri (2018.)** Date palm trees root-derived endophytes as fungal cell factories for diverse bioactive metabolites. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(7):1986.
- Mehboob, I., M. Naveed, Z. A. Zahir et A. Sessitsch (2013).** Potential of Rhizosphere bacteria for improving *Rhizobium* -legume symbiosis. pp: 305-349. *In: Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances.* Arora, N.K. (Ed.). Springer India.
- Menéndez, E., P. Martínez-Hidalgo, L. R. Silva, E. Velazquez, P. F. Mateos et A. Peix (2017).** Recent advances in the active biomolecules involved in rhizobia-legume symbiosis. pp: 45–74. *In: Microbes for Legume Improvement.* Zaidi, A. *et al.* (Eds.). Springer International Publishing.
- Menna, P., M. Hungria, F. Barcellos, E. V. Bangel, P. N. Hess et E. Martinrz-Romero (2006).** Molecular phylogeny based on the 16S RNA gene of elite rhizobial strain used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.*, **29**:315-332.
- Mirza, M. S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand et K. A. Malik (2001).** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, **237**(1), 47-54
- Mlaik, N., J. Bakonyi, A. Borsodi, S. Woodward, L. Belbahri et T. Mechichi (2015).** Microbial diversity in tanning wastewaters treatment reactors. *Environ Prog. Sustain. Energy*, **34**(2):401–410.
- Moawed, M. M. (2016).** Evaluation of morphological and anatomical characters for discrimination and verification of some *Medicago sativa* (L.) cultivars. *Indian J. Agric. Res.*, **50** (2): 183-192.
- Mohammadi, A., M. Sahrakar et H. R. Yazdani (2012).** *African Journal of Business Management*, **6**(3):933-945.

- Mohanasrinivasan, V., V. Shankar, R. Elizabeth, A. R. Soumya et C. S. Devi (2012).** Isolation, screening and identification of protease producing fungi from rhizosphere soil and optimization of pH, incubation time and inducer concentration for enhanced protease production. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, **3**: 784–793.
- Montiel, J., C. Fonseca-Garcia et C. Quinto (2018).** Phylogeny and expression of NADPH oxidases during symbiotic nodule formation. *Agriculture*, **8**: 179.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus et C. Boivin-Masson (2001).** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, **411**(6840):948-50.
- Muresu, R., E. Polone, L. Sulas, B. Baldan, A. Tondello, G. Delogu, P. Cappuccinelli, S. Alberghini, Y. Benhizia, H. Benhizia, A. Benguedouar, B. Mori, R. Calamassi, F. B Dazzo, A. Squartini (2008).** Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**(3), 383–400.
- Mus, F., M. B. Crook, K. Garcia, A. G. Costas, B. A. Geddes, E. D. Kouri ED et al. (2016).** Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**:3698–3710.
- Nadeem, S. M., Z. A. Zahir, M. Naveed et S. Nawaz (2013).** Mitigation of salinity induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting Rhizobacteria in naturally saline conditions. *Ann. Microbiol.*, **63**(1):225–32.
- Naidu, B.P., D.F. Cameron et S.V. Konduri (1998).** Improving drought tolerance of cotton by glycine betaine application and selection. Proceedings of the Australian Agronomy Conference. p:20-23. The Australian Society of Agronomy, Australia.
- Nareshkumar, R. J.G. et S. Rajkumar (2016).** Enhancing soil health and plant growthPromotion by Actinomycetes. pp: 33-44. *In: Plant Growth Promoting Actinobacteria*. Subramaniam et al. (Eds.). Springer. Singapore.
- Navarro J. M., O. Perez-Tornero, A. Morte (2013).** Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi depends on the rootstock salt tolerance. *J. Plant Physiol.* **171**: 76–85.
- Naveed, M., I. Mehboob, M. B. Hussain et Z. A. Zahir (2015).** Perspectives of Rhizobial Inoculation for Sustainable Crop Production. pp: 209-239. *In: Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Arora, N. K. (Ed.). Springer. India
- Naveed, M., M. B. Hussain, I. Mehboob et Z. A. Zahir (2017).** Rhizobial amelioration of drought stress in legumes. pp: 341-365. *In: Microbes for legumes improvement*. Zaidi, A., M. S. Khan et J. Musarrat (Eds.). Springer. India.
- Nelson, M. S. et M. J. Sadowsky (2015).** Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing Rhizobia and legumes. *Front. Plant Sci.*, **6** (491): 1-11.
- Niewiadomska, A., H. Sulewska, A. Wolna-Maruwka, K. Ratajczak, K. Gluchowska, Z. Waraczewska et A. Budka (2018).** An Assessment of the Influence of co-inoculation with endophytic bacteria and Rhizobia, and the Influence of PRP SOL and PRP EBV fertilisers on the microbial parameters of soil and nitrogenase activity in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) cultivation. *Pol. J. Environ. Stud.*, **27**(6) :2687-2702.
- Nimaichand, S., A. M. Devi, et W. J. Li (2016).** **Direct Plant Growth-Promoting Ability of Actinobacteria in Grain Legumes.** pp: 1-16. *Plant Growth Promoting Actinobacteria*. Subramaniam et al. (Eds.). Springer. Singapore.

- Nithyakalyani, V., M. Kannan et R. Anandan (2016).** Insecticide and salt tolerance of plant growth promoting root nodule bacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **5**(4): 942-956.
- Noel, K. D. (2009).** Rhizobia. pp: 261-277. *In: Schaechter, M. (Ed.). Encyclopedia of Microbiology.* 3rd edition. Oxford: Elsevier.
- Numan, M., S. Bashir, Y. Khan, R. Mumtaz, Z. K. Shinwari, A. L. Khan, A. Khan, A. AL-Harrasi (2018).** Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiol. Res.*, **209**: 21–32.
- Okoro, C. K., R. Brown, A. L. Jones et al (2009).** Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **95**:121.
- Oldroyd, G. E. D. et J. A. Downie, (2008).** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**: 519–546.
- Oldroyd, G. E. D., J. D. Murray, P. S. Poole et J. A. Downie (2011).** The rules of engagement in the legume-Rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.*, **45**(1) :119–44
- Oteino, N., R.D. Lally, S. Kiwanuka, A. loyd, D. Ryan, K. J. Germaine et D. N. Dowling (2015).** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.*, **6** (745): 1-9.
- Ott t., J. T. Van Dongen., C. Gunther, L. Krusell, G. Desbrosses, H. Vigeolas, V. Bock, T. Czechowski, P. Geigenberger et M. K. Udvardi (2005).** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.*, **15**: 531–535.
- Pagano, M. C. (2008).** Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration. *Plant Soil Environ.*, **54**: 498-508.
- Panwar, M., R. Tewari et H. Nayyar (2016).** Native halo-tolerant 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 Plants*, **22**(4):445–459.
- Paul, A. et R. Dubey (2015).** Characterization of protein involved in nitrogen fixation and estimation of co-factor. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.*, **2**(1): 89-97.
- Patil, A., A. Kale, G. Ajane, R. Sheikh et S. Pati (2017).** pp: 105-134. *In: Rhizobium Biology and Biotechnology, Soil Biology.* Hansen *et al.* (Eds.). Springer International Publishing.
- Pelmont, J., (1995).** Bactérie et environnement : adaptation physiologique. Vol 2. Edition Office des Publications Universitaires. 897 p.
- Perry, J., J. Staley et S. Lory (2004).** Microbiologie. Ed. Dunod. 889 pages
- Peix, A., M. H. Ramírez-Bahena, E. Velázquez et E. J. Bedmar (2015).** Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **34**:17–42.
- Prospero, S, A. Vercauteren, K. Heungens, L. Belbahri et D. Rigling (2013).** Phytophthora diversity and the population structure of *Phytophthora ramorum* in Swiss ornamental nurseries. *Plant Pathol.*, **62**:1063–1071.
- Puppo, A., K. Groten, F. Bastian, R. Carzaniga, M. Soussi, M. M. Lucas, M. R. de Felipe, J. Harrison, H. Vanacker et C. H. Foyer (2005).** Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.*, **165** (3) : 683-701.

- Quan, W., L. Xun, W. Haiqing et C. Zhulong (2016).** Comparative physiological and transcriptional analyses of two contrasting drought tolerant alfalfa varieties. *Front. Plant Sci.*, **6**(1256): 1-16.
- Radovic, J., D. Sokolovic et J. Markovic (2009).** Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, **25** (5-6): 465-475.
- Raghavendra, A. S., V. K. Gonugunta, A. Christmann et E. Grill (2010).** ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.*, **15**(7):395-401.
- Ramette, A., M. Frapolli, G. Défago et Y. Moëgne-Loccoz (2003).** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC Genes in biocontrol fluorescent Pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **16**(6), 525–535.
- Rao, D. L. N., S. R. Mohanty, C. Acharya et N. Atoliya (2018).** Rhizobial Taxonomy - Current Status. *IUNFC Newsletter*, **3**: 1-4.
- Reeve, W., P. Chain, G. O'Hara, J. Ardley, K. Nandesena, L. Bräu, ... J. Howieson (2010).** Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* strain WSM419. *Standards in Genomic Sci.*, **2**(1): 77–86.
- Rekik, I., Z. Chaabane, A. Missaoui, A. Chenari Bouket, L. Luptakova, A. Elleuch et L. Belbahri (2017.)** Effects of untreated and treated wastewater at the morphological, physiological and biochemical levels on seed germination and development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), alfalfa (*Medicago sativa* L.) and fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *J. Hazard Mater.*, **326**:164-176.
- Richardson, A. E., P. J. Hocking, R. J. Simpson et T. S. George. (2009).** Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. *Crop and Pasture Science*, **60**(2): 124-143.
- Rosa-Ibarra, M. D. L. et R. K. Maiti (1995).** Biochemical mechanism in glossy sorghum lines for resistance to salinity stress. *J. Plant. Physiol.*, **146**(4):515–519.
- Ruiz-Diez, B., S. Fajardo, M. A. Puertas-Mejia, M. del Rosario de Felipe et M. Fernandez-Pascual (2009).** Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch. Microbiol.*, **191**: 35-46.
- Ruzzi, M. et R. Aroca (2015).** Plant growth-promoting Rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, **196**: 124–134.
- Sachs, J. L., K. W. Quides et C. E. Wendlandt (2019)** Legumes versus rhizobia: a model for ongoing conflict in symbiosis. *New Phytol.*, **219**(4):1199–1206.
- Sadeghi, L., F. Tanwir et V. Yousefi Babadi (2016).** Antioxidant effects of alfalfa can improve iron oxide nanoparticle damage: *In vivo* and *in vitro* studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **81**: 39-46.
- Saharan, B.S. et V. Nehra (2011).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sci. Med. Res.*, **2011**: 1-30.
- Sahasrabudhe, M. M. (2011).** Screening of Rhizobia for indole acetic acid production. *Ann. Biol. Res.*, **2** (4):460-468.
- Saidi, S., M. H. Ramirez-Bahena, N. Santillana, D. Zuniga, E. Alvarez-Martinez, A. Peix, R. Mhamdi et E. Velazquez (2014).** *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**: 242–247.

- Saitou, N. et M. Nei M (1987).** The Neighbor-joining Method: A New method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**: 406–425.
- Sajkovic-Srbnovici, O., D. Delici, B. Nerandzic, S. Andjelovic, B. Sikiric, D. Kuzmanovic et N. Rasulic (2017).** Alfalfa yield and nutrient uptake as influenced by co-inoculation with *Rhizobium* and rhizobacteria. *Romanian Biotechnol., Lett.*, **22** (4): 12834-12841.
- Sathya, A., R. Vijayabharathi et S. Gopalakrishnan (2017).** Plant growth-promoting Actinobacteria: A new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *Biotech.*, **7**(102): 1-10.
- Sellstedt, A. et K. H. Richau (2013).** Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **342**:179–186.
- Sharma, M., P. Dangi et M. Choudhary (2014).** Actinomycetes: Source, Identification, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **3**(2): 801-832.
- Sharma, V., A. Kumar, G. Archana et N. K. Gattupalli (2016).** *Ensifer meliloti* overexpressing *Escherichia coli* phytase gene (AppA) improves phosphorus (P) acquisition in maize plants. *Sci. Nat.*, **103**: s00114–s00116.
- Shirling, E. B. et D. Gottlieb (1966).** Internatinal journal of systematic bacteriology. Methods for characterization of *Streptomyces* species, **16** (3): 313-340.
- Shwyn, B. et J.B. Neilands (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* **160**: 47-56.
- Siddiqui, Z. A. (2006).** PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. pp: 111-142. *In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* Siddiqui, Zi A. (Ed.). Springer Netherlands.
- Simontacchi, M., A. Galatro, F. Ramos-Artuso et G. E. Santa-María (2013).** Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Front. Plant Sci.*, **6**:977.
- Singh, T.N., D. Aspinall, L.G. Paleg et S.F. Bogges (1973).** Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.*, **26**: 57-63.
- Singh, B., R. Kaur et K. Singh (2008).** Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). *African J. Biotech.*, **7** (20): 3671-3676.
- Singh, R.J., (2009).** Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. *In: Banchan* (Ed.). Alfalfa (*Medicago sativa ssp.sativa(L.)*). Vol. 5, 1^{ère} Ed. CRC. 320p.
- Skorupska, A., D. Kidaj et J. Wielbo (2017).** Flavonoids and Nod Factors: Importance in legume-microbe interactions and legume improvement. pp: 75–94. *In: Microbes for Legume Improvement.* Zaidi *et al.* (Eds.). Springer International Publishing.
- Slama, B. H., H. Cherif-Silini, A. Chenari Bouket, M. Qader, A. Silini, B. Yahiaoui, F. N. Alenezi, L. Luptakova, M. A. Triki, A. Vallat, T. Oszako, M. E. Rateb et L. Belbahri. (2019a).** Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Front. Microbiol.*, **9** (3236):1-24.
- Slama, B. H., M. A. Triki, A. Chenari Bouket, F. B. Mefteh, F. N. Alenezi, L. Luptakova, H. Cherif-Silini, A. Vallat, T. Oszako, H. Gharsallah et L. Belbahri. (2019b).** Screening of the high-rhizosphere competent *Limoniastrum monopetalum*

culturable endophyte microbiota allows the recovery of multifaceted and versatile biocontrol agents. *Microorganisms*, **7**(8): 249.

Slattery, J. O. et D. Pearce (2002). The impact of background Rhizobial populations on inoculation response. pp: 37-45. *In: Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam*. Herridge, D. (Ed.). ACIAR Proceedings. Brisbane, Australia.

Sobti, S., H. A. Belhadj et A. Djaghoubi (2015). Isolation and characterization of the native Rhizobia under hyper-salt edaphic conditions in Ouargla (South Algeria). *Energy Procedia*, **74**: 1434-1439.

Soe, K. M. et T. Yamakawa T (2013). Evaluation of effective Myanmar *Bradyrhizobium* strains isolated from Myanmar soybean and effects of co-inoculation with *Streptomyces griseofavus* P4 for nitrogen fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**:361–370.

Solans, M. et G. Vobis (2013). Biology of actinomycetes in the rhizosphere of nitrogen-fixing plants. pp: 1-25. *In: Actinobacteria: Application in bioremediation and production of industrial enzymes*. Amoroso *et al.*, (Eds.). CRC Press, Boca Raton.

Solans, M., O. A. Ruiz et L. G. Wall (2015.) Effect of Actinobacteria on Lotus tenuis–*Mesorhizobium loti* symbiosis: preliminary study. *Symbiosis*, **65**:33–37.

Somasegaran, P. et H. Hoben (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer-Verlag, Berlin. 511p.

Somers, E., J. Vanderleyden et M. Srinivasan (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, **304**:205–240.

Sprent, J. I., J. Ardley et E. K. James (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol.*, **215**: 40–56.

Streng, A., R. Op Den Camp, T. Bisseling et R. Geurts (2011). Evolutionary origin of *Rhizobium* Nod factor signaling. *Plant Signaling and Behavior*, **6**(10): 1510–1514.

Striker, G. G. et T. D. Colmer (2017). Flooding tolerance of forage legumes. *J. Experiment. Botany*, **68** (8): 1851–1872.

Su, X., J. Ma, X. Wei, P. Cao, D. Zhu, W. Chang, Z. Liu, X. Zhang, et M. Li (2017). Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex. *Science*, **357**(6353): 815–820.

Sulima, A. S., V. A. Zhukov, O. Y. Shtark, A. Y. Borisov et I. A. Tikhonovich (2015). Nod-Factor Signaling in Legume-Rhizobial Symbiosis. *Plants for the Future*, 135-160.

Swarnalakshmi, K., M. Senthilkumar, et B. Ramakrishnan (2016). Endophytic Actinobacteria: nitrogen fixation, phytohormone production, and antibiosis. pp: 123-148. *Plant Growth Promoting Actinobacteria*. Subramaniam *et al.* (Eds.). Springer. Singapore

Thilakarathna, M.S., T. Chapagain, B. Ghimire, R. Pudasaini, B. B. Tamang, K. Gurung, K. Choi, L. Rai, S. Magar, B. Bk, S. Gaire et M. N. Raizada (2019). Evaluating the effectiveness of *Rhizobium* inoculants and micronutrients as technologies for nepalese common bean smallholder farmers in the real-world context of highly variable hillside environments and indigenous farming practices. *Agriculture*, **9**:20

Tian, Z., X. Wang, R. Leec, Y. Lib, J. E. Spechtd, R. L. Nelson, P. E. McCleanc, L. Qiub, et J. Maa (2010). Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proceedings of the National Acad. Sci.*, **107**(19): 8563–8568.

- Tiwari, K. et R. K. Gupta (2013).** Diversity and isolation of rare Actinomycetes: An overview. *Crit. Rev. Microbiol.*, **39**(3): 256–294.
- Tokala, R. K., J. L. Strap, C. M. Jung, D.L. Crawford, M. H. Salove, L. A. Deobald, J. F. Bailey et M. J. Morra (2002).** Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**:2161–2171.
- Tourte, Y., M. Bordonneau et M. Henry (2005).** Le monde des végétaux - Organisation, physiologie et génomique. Edition DUNOD. Paris. France
- Triplett, E. W. et M. J. Sadowsky (1992).** Genetics of Competition for Nodulation of Legumes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **46**(1), 399–422.
- Trujillo, M. E., R. Riesco, P. Benito et L. Carro (2015).** Endophytic Actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Front. Microbiol.*, **6** (1341): 1-15.
- Valdebenito, M., A. L. Crumbliss, G. Winkelmann et Hantke (2006).** Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.*, **296**: 513-520.
- Valdes, M., N. O. Perez, P. Estrada-de los Santos, J. Caballero-Mellado, J. J. Pena-Cabriales, P. Normand et A. M. Hirsch (2005).** Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(1), 460–466.
- Vandamme P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K.B Kersters et J. Swings (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, **60**(2):407-38.
- Van der Meij, A., S. F. Worsley, M. I. Hutchings et G. P. Van Wezel (2017).** Chemical ecology of antibiotic production by Actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **41**: 392–416.
- Van de Poel, B. V. et D. Van Der Straeten (2014).** 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene. *Front. Plant Sci.*, **5** (640): 1-11.
- Vargas, L. K., G. V. Camila, B. L. Bruno, G. Adriana, B. Anelise et M. P. P. Luciane (2017).** Potential of Rhizobia as Plant Growth Promoting Rhizobacteria. pp: 153–174. *In: Microbes for legume improvement. Zaidi et al. (Eds.). Springer International Publishing.*
- Vejan, P., R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail et A. N. Boyce (2016).** Role of plant growth promoting Rhizobacteria in agricultural sustainability. A review. *Molecules*, **21** (573): 1-17.
- Velazquez, E., L. Carro, J. D. Flores-Félix, P. Martínez-Hidalgo, E. Menéndez, M. H. Ramirez-Bahena, R. Mulas, F. Gonzalez-Andrés, E. Martínez-Molina et A. Peix (2017).** pp : 41-70. Kumar *et al.*, (Eds.). Probiotics and Plant Health. Springer Nature Singapore.
- Vincent, J.M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. pp: 73-97. *In: International Biological Programme. Handbook No15. Blackwell Scientific Publications, Ltd. Oxford.*
- Volpin, H., S. Burdman, S. Castro-Sowinski, Y. Kapulnik et Y. Okon (1996).** Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial nod-gene inducers by alfalfa roots. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **9**(5):388–394.

- Wajcman, H. et L. Kiger (2002).** L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme: un motif structural unique, des fonctions multiples. 325(12) :1159-1174. Edition Scientifique et médicale Elsevier SAS.
- Wang, C., Z. Wang, X. Qiao, Z. Li, F. Li, M. Chen, Y. Wang, Y. Huang et H. Cui (2013).** Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiol. Lett.* : **341** : 45–51.
- Wang, W., Z. Qiu, H. Tan et L. Cao (2014).** Siderophore production by Actinobacteria. *Bio. Metals.*, **27**(4): 623–631.
- Wang, Q., J. Liu et H. Zhu. (2018).** Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-*Rhizobium* Interaction. *Front. Plant Sci.*, **9** (313) :1-8.
- Wang, C., J. Wu, W. Zeng, Y. Zhu et J. Huang (2019).** Five-year experimental study on effectiveness and sustainability of a dry drainage system for controlling soil salinity. *Water*, **11**(1):111.
- Wang, J., R. Li, H. Zhang, G. Wei et Z. Li (2020).** Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC Microbiol.*, **20** (38): 1-12.
- Wei, G. H., Z. Y. Tan, M. E. Zhu, E. T. Wang, S. Z. Han et W. X. Chen (2003).** Characterization of Rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**:1575–1583.
- Werner D., (1992).** Symbiosis of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.
- Weston, L. A. et U. Mathesius (2013).** Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J. Chem. Ecol.*, **39**(2): 283–297.
- Whipps, J. M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. exp. Botany*, **52**(suppl 1): 487-511.
- Xiao, T. T., S. Schilderink, S. Moling, E. E. Deinum, E. Kondorosi, H. Franssen, O. Kulikova, A. Niebe et T. Bisseling (2014).** Fate map of *Medicago truncatula* root nodules *Development*, **141**: 3517-3528.
- Yang, J., J. W. Kloepper et C. M. Ryu. (2009).** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.*, **14**:1- 4.
- Young, T.P., 1991.** Diversity overrated. *Nature* **352**, 10.
- Younesi. O., A. Baghbani et A. Namdari (2013).** The effects of *Pseudomonas fluorescence* and *Rhizobium meliloti* co-inoculation on nodulation and mineral nutrient contents in alfalfa (*Medicago sativa*) under salinity stress. *Int. J. Agric. Crop. Sci.*, **5**(14): 1500-1507.
- Zahran, H. (2001).** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.*, **91**(2-3), 143–153.
- Zahran, H. H. (2017).** Plasmids impact on Rhizobia-legumes symbiosis in diverse environments. *Symbiosis*, **73**: 75–91.
- Zaidi, A., E. Ahmad, M. S. Khan, S. Saif et A. Rizvi (2015).** Role of plant growth promoting Rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. *Scientia horticulturae*, **193**: 231-239.

Zakhia, F., H. Jeder, A. Willems, M. Gillis, B. Dreyfus et p ; de Lajudie (2006). Diverse Bacteria Associated with Root Nodules of Spontaneous Legumes in Tunisia and First Report for nifH-like Gene within the Genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial. Ecol.*, **51**(3), 375–393.

Zhang, C. et S. Shi (2018). Physiological and proteomic responses of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties to PEG-induced osmotic stress. *Front. Plant Sci.*, **9** (242): 1-21.

ANNEXES

Annexe 1:

Tab. 2 : Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries (Goodfellow *et al.*, 2012)

Classes	Ordres	Familles
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
	<i>Actinopolysporales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>
	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	<i>Catenulisporales</i>	<i>Catenulisporaceae, Actinospicaceae</i>
	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Segniliparaceae, Tsukamerullaceae</i>
	<i>Frankiales</i>	<i>Frankiaceae, Acidothermaceae, Cryptosporangiaceae, Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae</i>
	<i>Glycomycetales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
	<i>Jiangellales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
	<i>Kineosporales</i>	<i>Kineosporaceae</i>
	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Jonesiaceae, Microbacteriaceae, Promicomonosporaceae, Rarobacteriaceae, Ruaniaceae, Sanguibacteraceae</i>
	<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae, Nocardioidaceae</i>
	<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
	<i>Streptosporangiales</i>	<i>Streptosporangiaceae, Nocardiopticaceae, Thermomonosporaceae</i>
<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinomicrobiaceae</i>
<i>Coriobacteriia</i>	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>
<i>Thermoleophilia</i>	<i>Thermoleophilales</i>	<i>Thermoleophilaceae</i>
	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Solirubrobacteraceae, Conexibacteraceae, Patulibacteraceae</i>

<i>Rubrobacteria</i>	<i>Rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>
<i>Nitriliruptoria</i>	<i>Nitriliruptorales</i>	<i>Nitriliruptoraceae</i>
	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>

Annexe 2: Milieu YEMA (Yeast-Extract-Mannitol) (g /l)

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
Agar	15
pH 6.8	

Annexe 3: Milieu Yeast-Lactose-Agar (g /l)

Extrait de levure	1
Lactose	10
Agar	15
Eau distillée	1000ml

Annexe 4 : Réactif de Benedict (g /l)

Citrate de sodium	173
Carbonate de sodium anhydre	100
CuSO ₄ 5H ₂ O	17.3
Eau distillée	1000 ml

Annexe 5 : Milieu Pikovskaya (PVK) (g /l)

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

Annexe 6 : Milieu Dworkin et Foster (DF)

KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	6 g

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 mg
H ₃ BO ₃	10 µg
MnSO ₄	10 µg
ZnSO ₄	70 µg
CuSO ₄	50 µg
MoO ₃	10 µg
Glucose	2 g
Acide gluconique	2 g
Acide citrique	2 g
Eau distillée	1000ml

Annexe 7 : Milieu King B (g /l)

Peptone de caséine	10
Peptone de viande	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5
K ₂ HPO ₄	1,5
Eau distillée	1000 ml

Annexe 8 : Solution Chrome Azurol S (CAS)

- Mettre 6 ml de HDTMA (Hexamethylammoniumbromure) 10mM dans une éprouvette de 100 ml et diluer à 50 ml avec de l'eau désionisée. **(1)**
- Mélanger 1,5 ml de FeCL₃+ (1mM FeCL₃+ .6 H₂O;10 mM HCL) et 7,5 ml de CAS 2mM. **(2)**
- Ajouter **(2)** à **(1)**.
- Dissoudre 4,307 g de piperazine anhydre dans de 1 'eau et ajouter 6,25 ml de HCL 12 M (Solution tampon pH = pKa = 5.6).
- Ajouter la solution tampon et continuer avec de l'eau jusqu'à 100 ml.

Annexe 9 : Solution nutritive (g /l) (Fähreus, 1957)

-Macro éléments

CaCl ₂	0.10
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12
KH ₂ PO ₄	0.10
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0.15
Citrate de fer	0.005
Solution stock de Micro éléments	1 ml

-Micro éléments (g /l)

H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03
ZnSO ₄ 5H ₂ O	0.22
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.14
Eau distillée	1000ml

Annexe 10 : Milieu International *Streptomyces* Program (ISP2) (g /l)

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH7,3

Annexe11 : Milieu Luedemann (g /l)

Extrait de levure	5 g
Extrait de malt	15 g
Amidon soluble	10 g
Glucose	10 g
CaCO ₃	2 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe 12 : Milieu BAP (g /l)

Propionate de sodium	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.95 g
K ₂ HPO ₄	0.60 g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0.025 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.003 g
Biotine	4.50 g
Solution stock Fe SO ₄ . 7H ₂ O/EDTA	1.0 ml
Solution stock de Hoagland	1.0 ml
Eau distillée	1000 ml

pH =6.7

Solution stock de Hoagland's micro éléments (g /l)

H3 B04	2.8
Mn Cl ₂ .4H ₂ O	1.8
Zn SO ₄ .7H ₂ O	0.2
Cu SO ₄ .5H ₂ O	0.1
NaMoO ₄ ·H ₂ O	0.025
Eau distillée	1000 ml

Annexe 13 : Milieu minimum au sel

Glucose	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.36 g
K ₂ HPO ₄	1.4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.02 g

NaCl	0.2 g
FeCl ₃	6.6 mg
EDTA	15 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.16 mg
Na ₂ MoO ₄	0.2 mg
H ₃ BO ₃	0.25 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	1 µg
thiamine-HCl	1 mg
Calcium pantothenate	2 mg
Biotin	1 µg
Eau distillée	1000 ml

Annexe 14 : Gélose au lait écrémé (25%) (g /l)

Peptone de caséine	5
Extrait de levure	3
Agar	15
Eau distillée	1000ml
Autoclavage 120°C/20 mn	
Ajouter 250 ml de lait écrémé stérile	

Annexe 15 : Gélose GYP (Glucose Yeast Extract Peptone) additionnée de 1% d'amidon soluble (g /l)

Glucose	1
Yeast extract	0.5
Peptone	0.5
Agar	15
Amidon soluble	1%
Eau distillée	1000ml

Annexe 16 : Gélose à base de chitine (g /l)

Chitine colloïdale	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
KH ₂ PO ₄	0.7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
Agar	15
Eau distillée	1000ml

Annexe 17 : Milieu Luria Bertani (LB) additionnée de 1% de Carboxymethylcellulose (CMC) (g /l)

Tryptone	10
Extrait de levure	5

NaCl	5
Agar	15
Carboxymethylcellulose (CMC)	1%
Eau distillée	1000 ml

Annexe 18 : Milieu gélatine nutritive (g /l)

Peptone	4
Yeast extract	1
Gélatine	15
Agar	15
Eau distillée	1000 ml

Annexe 19 : Milieu de Winogradsky exempté d'azote (g /l)

-Solution stock (g /l)

KH_2PO_4	50,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25,0
NaCl	25,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,0
Eau distillée	1000ml

pH: 7,2 ajusté avec du NaOH

-Milieu Winogradsky exempté d'azote

Solution stock	5ml
D Glucose	0,5g
CaCO_3	0,1g
Eau distillée qsp :	1000ml

Annexe 20 : Eau peptonée (g /l)

Peptones	10
NaCl	5
Na_2HPO_4	3.5
K_2HPO_4	1000ml
pH : 7.2	

تعتبر البقوليات من الأطعمة المغذية للإنسان وتوفر العناصر الغذائية الأساسية للنظم البيئية، وهي جزء أساسي للزراعة المستدامة. يمكن للبقوليات استعادة صحة التربة من خلال قدرتها على تثبيت النيتروجين في تفاعل تكافلي مع الريزوبيا. لكن يحد الإجهاد المالح بشدة من الإنتاجية والقدرة على تثبيت النيتروجين عند هذه النباتات. ومن أجل تحسين استجابة البقوليات للتلقيح بـ *Rhizobium*، فإن التلقيح المشترك مع PGPR (البكتيريا المعززة للنمو) أخرى، هي استراتيجية فعالة وتآزرية لإنتاجية أفضل مقارنة بالتلقيح البسيط.

في هذه الدراسة تم استخدام Actinobacteria المعزولة من بيئات مختلفة وذات أنشطة PGP في تجارب التلقيح المشترك مع *Rhizobium* في محيط النبات *Medicago sativa* تحت تأثير إجهاد الملح.

وكان التلقيح المشترك باستخدام سلالات *Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) و *meliloti* 2011(R2).S مع كل واحدة من سلالات Actinobacteria المحددة (ذات الصلة بـ *Arthrobacter* sp (MS1, MS2) و *Nocardiopsis* (Ag1)) القادرة على تحمل الجفاف والملوحة وذات خصائص PGP متنوعة.

بينت النتائج تحسن في كمية العقد الجذرية عند *Medicago sativa* وزيادة ملحوظة في خصائص النمو وكميات أصباغ التركيب الضوئي عند النبات المضيف. كما أن التلقيح المشترك يوفر استجابة أفضل للإجهاد المالح من خلال تحسين استراتيجيات التكيف ولذلك يمكن أن تكون Actinobacteria المكتشفة في هذه الدراسة أسمدة حيوية مناسبة في تركيب المنتجات الزراعية التي تحسن تنمية وصحة وإنتاجية النباتات في التربة المالحة، وهي بديل ضروري للزراعة الحديثة والتنمية المستدامة.

الكلمات المفتاحية: تكافل، تلقيح مشترك، *Rhizobium*، PGPR، *Medicago sativa*، Actinobacteria.

Résumé

Les légumineuses, considérées comme des aliments très nutritifs pour les humains et fournissant des nutriments essentiels aux écosystèmes, sont un élément fondamental de l'agriculture durable. Ils peuvent restaurer la santé du sol par leur capacité à fixer l'azote dans une interaction symbiotique avec les Rhizobia du sol. Cependant, le stress salin limite sévèrement la productivité et la capacité de fixation de l'azote chez les légumineuses. Afin, d'améliorer la réponse des légumineuses à l'inoculation de *Rhizobium*, la co-inoculation avec d'autres PGPR est une stratégie efficace et synergique pour une meilleure productivité par rapport à une simple inoculation. Dans cette étude, des Actinobacteria isolées de différentes niches et ayant des activités PGP ont été utilisées dans des expériences de co-inoculation avec des Rhizobia dans la rhizosphère de plantes *Medicago sativa* soumises à un stress salin. La co-inoculation a été suivie par l'utilisation des souches de *Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) et *S. meliloti* 2011(R2) avec chacune des souches d'Actinobacteria sélectionnées (apparentées à *Arthrobacter* sp (MS1, MS2) et *Nocardiopsis* (Ag1)) tolérantes à la sécheresse et à la salinité et ayant de multiples caractères PGP. Les résultats montrent une meilleure nodulation sur les racines de *Medicago sativa* et une augmentation significative des paramètres de croissance et des teneurs en pigments chlorophylliens de la plante hôte. La co-inoculation a permis également d'avoir une meilleure réponse au stress salin en améliorant les stratégies d'adaptation. Les actinobactéries découvertes dans cette étude peuvent donc être des biofertilisants appropriés dans la formulation de produits agricoles améliorant le développement, la santé et la productivité des plantes dans les sols salins, une alternative nécessaire à l'agriculture moderne et au développement durable.

Mots-clé: *Rhizobium*, symbiose, Actinobacteria, co- inoculation, salinité, PGPR, *Medicago sativa*.

Abstract

Legumes, considered very nutritious foods for people and providing essential nutrients for ecosystems are a fundamental element of sustainable agriculture. They can restore soil health by their ability to fix nitrogen in a symbiotic interaction with the Rhizobia of the soil. However, salt stress is severely limiting productivity and nitrogen fixation ability in legumes. In order to improve the response of legumes to inoculation of *Rhizobium*, co-inoculation with other PGPR is an effective and synergistic strategy for better productivity compared to a simple inoculation.

In this study, Actinobacteria isolated from different niches and having PGP activities were used in co-inoculation experiments with Rhizobia in *Medicago sativa* plants rhizosphere submitted to salt stress. Co-inoculation was followed by the use of *Sinorhizobium meliloti* 1021 (R1) and *S. meliloti* 2011(R2) strains with each of the selected Actinobacteria strains (related to *Arthrobacter* sp (MS1, MS2) and *Nocardiopsis* (Ag1)) tolerant to drought and salinity and having multiple PGP characteristics.

The results show better nodulation on *Medicago sativa* roots and a significant increase in growth parameters and the chlorophyll pigment content of the host plant. Co-inoculation also allowed for a better response to saline stress improving coping strategies. Actinobacteria discovered in this study can, therefore, be suitable biofertilizers in the formulation of agricultural products improving plant development, health and productivity in saline soils, a necessary alternative for modern agriculture and sustainable development.

Key words: *Rhizobium*, symbiosis, Actinobacteria, co- inoculation, salinity, PGPR, *Medicago sativa*.