

## EFFETS DE L'INOCULATION PAR DES RHIZOBACTÉRIES ET DES MOLÉCULES OSMOPROTECTRICES SUR L'ADAPTATION DE L'ORGE (*HORDEUM VULGARE L.*) AUX CONTRAINTES SALINES

BOUCHENAK Fatima<sup>1\*</sup>, DEGAICHIA Hoceme<sup>1</sup>, ZIBOUCHE Fella<sup>1</sup> et Chaouia Chérifa<sup>1</sup>

1. Université de Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Biotechnologies, Laboratoire de Biotechnologie des Productions végétales, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie

Reçu le 28/04/2019, Révisé le 02/06/2019, Accepté le 14/06/2019

### Résumé

**Description du sujet :** L'accumulation de solutés compatibles est souvent prise comme une stratégie de base pour la protection et la survie des plantes sous stress salin et aride. Les apports exogènes de proline ou l'inoculation de bactéries rhizosphériques sont une approche possible pour surmonter les effets délétères de l'environnement sur la croissance végétale.

**Objectifs :** De comparer les effets de l'inoculation par une bactérie rhizosphérique et de l'application exogène de la proline un osmoprotecteur sur l'adaptation des plantules d'orge Saida 185 aux contraintes salines.

**Méthodes :** La mesure de l'intégrité cellulaire des cellules de plantule d'orge inoculées et traitées au NaCl et proline exogène est effectuée par la méthode d'Evans. Le dosage des sucres solubles totaux a été réalisé par la méthode de Dubois *et al.*, (1956) ; celui des acides aminées par la méthode de Naidu (1998).

**Résultats :** L'effet oxydant du sel est atténué par la présence de la bactérie à (10<sup>8</sup> UFC). L'inoculation par *Bradyrhizobium sp* (*Lotus*) ou un prétraitement avec de la proline exogène à 5 mM des plantules d'orge ont un effet positif sur l'intégrité cellulaire, les pigments chlorophylliens et les taux intracellulaires de proline et sucres solubles des plantules d'orge. L'inoculation par *Bradyrhizobium sp* (*Lotus*) protège beaucoup plus les plantules d'orge contre les effets délétères de la salinité. Elles accumulent un taux important d'osmorégulateurs et de molécules antioxydantes comme la proline et sucres solubles.

**Conclusion :** L'osmoprotection et la présence de bactéries rhizosphériques pourraient jouer un rôle pour une meilleure tolérance de l'orge variété Saida 185 au stress salin.

**Mots clés :** *Hordeum vulgare L.*, *Bradyrhizobium sp* (*Lotus*), intégrité membranaire, Pigments chlorophylliens, Proline, Sucres solubles, NaCl

## EFFECTS OF INOCULATION BY RHIZOBACTERIA AND OSMOPROTECTIVE MOLECULES ON THE ADAPTATION OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE L.*) UNDER SALINE CONSTRAINTS

### Abstract

**Description of the subject:** The accumulation of compatible solutes is often taken as a basic strategy for the protection and survival of plants under salt and arid stress. Exogenous Proline or Inoculation of Rhizospheric Bacteria is a Possible Approach to Overcoming the Deleterious Effects of the Environment on Plant Growth.

**Objective:** To compare the effects of rhizospheric bacteria inoculation and the exogenous application of proline an osmoprotector on the response of barley seedlings subjected to salt stresses.

**Methods:** Measurement of the membrane integrity of barley seedling cells inoculated and treated with exogenous NaCl and proline is carried out by the method of Evans. The determination of total soluble sugars was carried out by the method of Dubois *et al.* (1956); that of amino acids by the method of Naidu (1998).

**Results:** The oxidative effect of the salt is attenuated by the presence of the bacteria at 10<sup>8</sup>CFU. Inoculation with *Bradyrhizobium sp* (*Lotus*) or pretreatment with exogenous proline at 5mM have a positive effect on cell integrity, chlorophyll pigments and intracellular levels of proline and sugar soluble in barley seedling inoculated with *Bradyrhizobium sp* (*Lotus*) significantly protect barley seedling against the deleterious effects of salinity. They accumulate a high rate of osmoregulators and antioxidant molecules such as proline and soluble sugars.

**Conclusion:** Osmoprotection and the presence of rhizospheric bacteria could play a role in improving salt tolerance Saida 185 salt-tolerant barley.

**Keywords:** *Hordeum vulgare L.* *Bradyrhizobium sp* (*Lotus*), Membrane integrity, Chlorophyll Pigments, Proline, Soluble sugar, NaCl

\*Auteur correspondant: BOUCHENAK fatima, E-mail:bouchenakfatima@yahoo.fr

## INTRODUCTION

La croissance des plantes est fortement influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. La salinité est l'un des facteurs majeurs limitant la productivité des plantes et par conséquent la production agricole. Dans le monde, 340 millions d'ha de surfaces agricoles sont affectées par la salinité soit 23% des terres cultivées [1], dont 3,2 millions d'ha en Algérie [2]. Cette salinisation est surtout rencontrée dans les zones arides et semi-arides du pays. Elle conduit à l'appauvrissement des sols en matières organiques et à l'accumulation d'ions toxiques. Par conséquent, les terres agricoles productives sont détériorées. D'un autre côté, l'accroissement de la population a augmenté la demande pour les produits agricoles. Ceci n'a pas seulement menacé la suffisance des ressources alimentaires disponibles, mais aussi a nécessité l'exploitation de terres marginales cultivées. En Algérie, les céréales constituent la base de l'alimentation et occupent une place privilégiée dans les habitudes alimentaires des populations aussi bien dans les milieux ruraux qu'urbains [2].

La production actuelle des céréales en Algérie ne couvre que partiellement les besoins de la population. Le recours aux importations pèse lourdement sur l'économie de l'état. Les données du problème auquel la céréaliculture algérienne fait face n'ont pas fondamentalement changé. Elle est essentiellement pluviale ; elle est soumise à des régimes pluviométriques variables et bien souvent faibles qui se traduisent par de fortes contraintes hydriques et saline. Ceci explique la stagnation du rendement qui dure depuis près d'un demi-siècle [2]. L'Algérie est aujourd'hui de plus en plus confronté aux problèmes de sécheresse et de salinité (90% environ du territoire national est aride à semi-aride).

L'orge ou la production de l'orge en Algérie comme toutes les autres céréales a toujours fait face à des complications culturales, représentées par différents type de stress. Beaucoup de travaux ont été menés dans le but de réduire l'effet du stress salin sur la croissance et la productivité des plantes. La plupart ne s'intéressent qu'au développement des variétés résistantes [3]. L'application exogène de solutés compatibles tels que la proline et la glycine bêtaïne a retenu l'attention de nombreux chercheurs depuis plusieurs années [4].

Ainsi, l'application de faibles concentrations de glycine bêtaïne et de proline maintient une forte concentration de  $K^+$  et active l'exclusion des ions  $Na^+$  et  $Cl^-$  des feuilles [5] et des racines [6].

La proline exogène et la glycine bêtaïne augmentent la tolérance des plantes au stress salin [7]. Ces osmoprotecteurs peuvent atténuer les effets délétères de la salinité. Une autre approche biologique existe, elle consiste en l'inoculation des plantes par les rhizobactéries (PGPR : Plant Growth Promotion Rhizobacteria) afin de favoriser leur croissance. L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes. Les microorganismes rhizosphériques, en général, exercent sur les plantes diverse effets influençant leur développement [8]. Ils peuvent également améliorer leur compétitivité et leurs réponses aux facteurs de stress externes. Ainsi, l'inoculation des plantes stressées par des souches PGPR atténue les effets stress salin et hydrique, elles améliorent la germination des graines, la stabilisation membranaire des plantules et activent les systèmes enzymatiques antioxydantes différents paramètres sont en étroite corrélation avec la tolérance des plantes au stress abiotique [9].

Les microorganismes halotolérants accumulent des osmoprotecteurs comme la proline et glycine bêtaïne pour se protéger contre le stress oxydant [10]. Diverses espèces d'*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* ont la capacité d'osmoprotection dans des environnements salins [10]. En conséquence, la croissance des microorganismes halotolérants, associés aux racines des plantes peuvent conduire à une meilleure fertilité des sols salins [10]. Les PGPR utilisées comme biofertilisant et/ou antagoniste contre les phytopathogènes constituent une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides [11].

Les objectifs de cette étude sont donc naturellement découlés de ces acquis. Il s'agit principalement dans cette thématique d'estimer : (i) les effets de l'inoculation par une souche bactérienne *Bradyrhizobium sp* (Lotus) isolée des nodosités de *Lotus ornithopodioides* et caractérisée par les travaux de Degaichia [12].

En présence et absence d'un apport exogène d'osmoprotecteur la proline sur les paramètres biochimiques indiquant la tolérance d'une variété d'orge Saida 185 (*Hordeum vulgare* L.) aux contraintes salines, (ii) de comparer les effets de l'inoculation et de l'application exogène de la proline sur la réponse des plantules d'orge.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Les expériences ont été menées sous serre au niveau du laboratoire de Biotechnologie végétale, sur des plants de la variété d'orge Saida 185 (*Hordeum vulgare* L.). Elle a été obtenue auprès de la coopérative des céréales et des légumes secs de Blida –Algérie. Après pré-germination les plantules sont mises dans des pots en plastique de 20 cm de hauteur et 15 cm de diamètre remplis du mélange Sol-tourbe (1:1) irrigués à raison de 150 ml pour maintenir les pots à leur capacité au champ. La variété d'orge Saida 185 est une variété locale, semi tardive ; à paille moyenne et creuse, tallage moyen, bonne productivité, cultivée dans toutes les régions d'Algérie, elle est sensible aux maladies parasitaires et physiologiques [12].

### 2. Souche bactérienne

La bactérie choisit pour notre expérimentation appartient au genre *Bradyrhizobium* famille des Bradyrhizobiaceae, La bactérie *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a été isolée des nodosités de Lotus *ornithopodioides* est caractérisée par les travaux de Degaichia [13]. *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* est une bactérie à Gram négative à croissance lente sécrétant des Exo polysaccharides, mobile possédant une activité uréasique (Tableau 1). Notre choix s'est porté sur cette bactérie car cette souche qui améliore la tolérance de Lotus *ornithopodioides* au stress métallique [13], ainsi que certains paramètres de germination des graines de la variété d'orge locale Saida183 soumises à un stress thermique.[14], ainsi que leurs activités amylasiques. Elle est résistante au NaCl à 16g/l [15].

Tableau 1: Caractéristiques culturaux de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*

<i>Bradyrhizobium sp (Lotus)</i>	Caractéristiques culturaux
Gram	négative
Croissance	Lente
Eps	+
Mobilité	+
Uréase	+
YMA+RG	-
GPA+BCP	-

La bactérie est conservée sur milieu YMA (Yest Mannitol Agar) additionne de glycérol à 4°C. Elle a été mise en culture par ensemencement sut milieu de culture YMA à 20°C pendant 3jours à 37°C.

### 3. Inoculation bactérienne et conditions de croissance

La souche *Bradyrhizobium sp.* est cultivée à 28°C/48 h sur milieu de culture YMA. La culture est centrifugée (12000rpm/10mn) et rincée deux fois dans du PBS afin obtenir une densité voisine de 10<sup>8</sup> bactéries/ml. Les graines de la variété sont stérilisées en surface avec une solution d'hypochlorite de sodium (2%) pendant 30mn et rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont germées sur du papier Wathman N°42 dans des boîtes de Pétri contenant 15ml d'eau distillée stérile à 20°C.

48 h à l'obscurité. L'inoculation se fait après immersion des graines dans la suspension bactérienne pendant 30mn. Les graines non inoculées (témoin) sont immergées dans de l'eau distillée stérile [16]. Des pots en plastique de diamètre de 10cm dont la surface interne est désinfectée avec de l'éthanol à 70% sont remplis de 200g de sable ordinaire lavé abondamment à l'eau et stérilisé à l'autoclave (120°C/1h) durant 3 jours successifs. Pour l'ensemble des paramètres étudiés dans cette expérimentation, des lots inoculés et non inoculés par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* (10<sup>8</sup> UFC) ont été mis en place. Les lots inoculés ont été arrosés avec (100 ml de suspension bactérienne /pot) pendant 1 semaine au stade début thallage de la variété d'orge Saida 185. Ces derniers ont été irrigués par des solutions salines, contenant différentes concentrations de NaCl (0; 5; 10; 20 g/l ) pendant 1mois en présence et absence d'apport exogène de proline (100ml/pot) pendant 1semaine [16].

Pour cette étude, 3 facteurs ont été utilisés qui sont: le NaCl, l'inoculation au *Bradyrhizobium* et application exogène de la proline. Ces facteurs avaient des différents niveaux d'application: (i) facteur 1: concentration de NaCl, (0; 5; 10; 20g/l), (ii) facteur 2: application (+) et non application (-) du *Bradyrhizobium*, (iii) facteur 3: Application (+) et non application (-) de la proline exogène. La Proline est additionnée à raison de 5mM aux concentrations de NaCl utilisées. Les graines traitées sont semées (une graine par pot) à une profondeur de 1cm de la surface. L'expérience a été conduite pendant 45 jours dans un phytotron avec une moyenne de températures diurnes/nocturnes de 26°C et 16°C respectivement et une photopériode de 16 h d'éclairage de 2100 lux. L'humidité du sol est ajustée et maintenue constante durant l'expérience par arrosage avec de l'eau distillée stérile.

#### **4. Effets de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp (Lotus)* et de l'application de la proline exogène sur l'intégrité cellulaire et l'indice de stress physiologique**

##### **4.1. Détermination de la perméabilité cellulaire (l'intégrité cellulaire)**

La mort cellulaire indiquant la perte de l'intégrité de la membrane plasmique est mesurée par spectrophotométrie à l'aide de l'absorption de la solution de bleu Evans [17]. L'intensité de la couleur est proportionnelle au nombre de cellules mortes. Trois extrémités racinaires (1cm) sont coupées puis incubées dans une solution de 0,025% bleu Evans (m/v) pendant 30 min. Ces racines sont rincées avec de l'eau distillée pendant 15 min et broyées dans 800µL d'une solution de 50% MeOH (v/v) et 1% SDS (m/v). L'homogénat est incubé dans un bain marie pendant 15 min à 50°C puis centrifugé à 14 000g pendant 15 min. La densité optique du surnageant est lue à 600 nm.

##### **4.2. Détermination de l'indice de stress physiologique**

L'indice de stress physiologique correspond au rapport de la chlorophylle et de son produit de dégradation « la phéophytine totale » [18]. Pour chaque mesure, 230 mg de biomasse fraîche sont prélevées tous les 2 jours. Ce matériel végétal est broyé, à l'aide d'un mortier en céramique, dans 5 ml d'acétone à 90%, puis placé dans des tubes en verre de 50 ml de capacité contenant 15 ml d'acétone,

pendant 24 heures, à l'obscurité et à une température égale à 5°C. L'extrait obtenu est centrifugé à une vitesse de 3000 tours par minutes pendant 10 min à 20°C. Les absorbances à des longueurs d'onde de 665 et 750 nm ont été déterminées par un spectrophotomètre. Le réglage du spectrophotomètre est réalisé par une solution d'acétone 90% (blanc). La conversion de la chlorophylle en phéophytine est réalisée par l'ajout de 10 µl d'acide chlorhydrique concentré (37%) à 3 ml d'extrait. Après 2 minutes, une mesure de l'absorbance aux deux longueurs d'onde 665 et 750 nm est à nouveau réalisée. Le rapport étudié ( $DO_{665}/DO_{665a}$ ) qui est la densité optique de l'extrait à 665 nm acidifié et non acidifié est corrigé par une lecture de l'absorbance de l'extrait à 750 nm. Les indices de stress sont notés IS et sont calculés selon la formule:  $IS = DO_{665} - DO_{750}/DO_{665a} - DO_{750a}$ , Où:  $DO_{665}$  est l'absorbance de l'extrait non acidifié mesurée à 665 nm,  $DO_{750}$  est l'absorbance de l'extrait non acidifié mesurée à 750 nm,  $DO_{665a}$  est l'absorbance de l'extrait acidifié mesurée à 665 nm,  $DO_{750a}$  est l'absorbance de l'extrait acidifié mesurée à 750 nm.

#### **5. Effets de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* de l'application de la proline exogène sur l'accumulation de molécules antioxydantes**

##### **5.1. Dosages des sucres solubles totaux**

L'extraction des sucres est réalisée à partir des cotylédons. 1g. de feuilles, a été broyé dans un mortier, dans 3ml d'éthanol (80%). Le broyat obtenu a été incubé pendant 30 min dans le réfrigérateur à une température de 4°C puis centrifugé à 1500 g durant 15 min à 4°C. Le surnageant constitue la fraction soluble de sucres. Ce dernier est conservé dans des tubes Eppendorf et stocké à (-20°C) [19].

Les oses sont stables en milieu acide. Cependant, chauffés en milieu acide concentré, ils donnent des furfuraldéhydes par cyclisation et déshydratation. Les furfurals et leurs dérivés ont la propriété de se condenser avec le phénol pour former des complexes marron. Le dosage des sucres totaux solubles a été réalisé par la méthode de Dubois *et al.* [19]. Dans une série de tubes à essai, 25 µl d'extrait sont additionnés à 500µl de phénol (5%) et à 1,5 ml de solution d'acide sulfurique concentrée ( $H_2SO_4$ ) à 96%. Le mélange est chauffé au bain marie à 100°C pendant 5 min. Après refroidissement dans la glace fondante.

La densité optique est mesurée à 490 nm. Un blanc dans lequel 25µl d'éthanol à 80 %. L'extrait brut est remplacé. Un étalon a été construit grâce à une gamme de concentration d'une solution de glucose (0 à 20 µg/ml). Les résultats des densités optiques ont été rapportés sur un courbe étalon des sucres solubles (exprimée en glucose).

### 5.2 Dosage de la proline

Les échantillons ont été conservés en deçà de -15°C avant analyse. L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par Naidu [20]. 50mg d'échantillon ont été placés dans des tubes de centrifugation contenant 5ml d'un mélange (méthanol : chloroforme : eau) (60 : 25 : 15 ml). Les tubes scellés ont été chauffés au bain marie (60°C) durant 2 h et centrifugés à 5000 g pendant 10 mn. Le surnageant a servi ensuite aux dosages des acides aminés solubles et de la proline. La proline a été déterminée par une méthode développée par Singh [21]. 1ml de surnageant, 4ml de solution de Ninhydrine, 4ml d'acide acétique glacial et 1ml d'eau distillée sont placés dans des tubes de centrifugation de 10 ml. Ce mélange a été chauffé au bain marie (90°C) pendant 45mn et refroidi à la température ambiante. L'absorbance a été lue à 520 nm. Les résultats sont reportés sur une courbe d'étalon de référence de la Proline.

### 6. Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS© version 20.0.0 pour Windows™. Le test Manova a été réalisé au seuil de 5% afin d'apprécier l'effet de l'absence et de la présence de l'inoculum bactérien et de l'apport exogène de proline sur les différents paramètres biochimiques indicatifs de la tolérance des plantules d'orge au stress salin. Ce logiciel nous permet de comparer par paire les différents paramètres.

## RÉSULTATS

### 1. Effets de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) et l'application de la proline exogène sur perméabilité membranaire et l'indice de stress physiologique

Nous nous sommes intéressés à la recherche de l'ensemble des manifestations biochimiques qui régissent le stress oxydant induit par le NaCl. Nous avons essayé alors de voir l'effet du NaCl sur l'intégrité cellulaire des cellules des racines de l'orge et l'indice de stress physiologique qui est évalué par la dégradation de la chlorophylle.

#### 1.1. Détermination de la perméabilité membranaire (intégrité cellulaire)

Les valeurs moyennes du nombre de cellules mortes dans les extrémités racinaires des plantules d'orge soumises à différentes concentrations de NaCl en présence et absence de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) et de l'apport exogène d'un osmoprotecteur la proline sont représentés dans la figure 1.

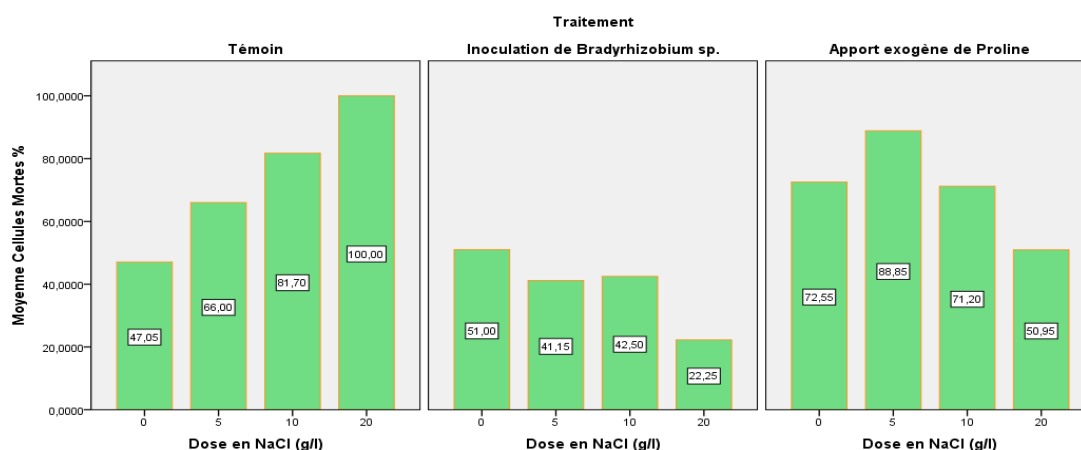


Figure 1 : Effet de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp.* et de l'apport exogène de proline sur l'intégrité cellulaire dans les extrémités racinaires des plantules d'orge (*Hordeum vulgare L.*) soumises à différentes concentrations de NaCl pendant 4 semaines

En absence de pré-inoculation bactérienne et apport exogène de proline chez les témoins nous remarquons que le nombre moyen des cellules mortes dans les extrémités racinaires des plantules d'orge sont équivalentes à celles des plantules inoculés ou prétraitées avec de la proline. Le nombre des cellules mortes chez le témoin (0g/l de NaCl) en absence d'inoculation bactérienne est de 47,05% par contre chez les plantules inoculées cette valeur de 51,00% et les plantes traitées avec un apport exogène de proline, il est de 72,55 (Fig. 1). L'analyse de la variance et le Test Manova révèle aucune différence significative n'existe entre ces valeurs chez les témoins ( $p=0,430$ ).

Chez les plantules d'orge non inoculées sans apport de proline traitées aux différentes concentrations en NaCl, nous constatons une augmentation significative du nombre de cellules mortes qui passe de 47,05% chez les témoins à 66%, 81% et 100% chez les plantules d'orges traitées respectivement avec 5g/l, 10g/l et 20g/l ( $p=0,00$ ).

Chez les plantules d'orge témoins inoculées nous remarquons une diminution significative du nombre de cellules mortes qui passe de 51,00 % pour les témoins à 22,25% chez les plantules d'orges inoculées et traitées avec 20g/l ( $p=0,00$ ). Le test de Manova indique qu'il existe une différence significative entre les plantules témoins et celles

inoculées par la bactérie et traités aux différentes concentrations de NaCl ( $p=0,00$ ). Les plantules d'orge traitées aux différentes concentrations en NaCl avec un apport exogène de Proline, on remarque qu'il y a une diminution significative du nombre de cellules mortes aux extrémités racinaires des plantules qui passe de 72,00 % pour les témoins à 50,95% chez les plantules traitées avec 20g/l avec un apport de proline exogène ( $p=0,03$ ).

Pour le Pourcentage des cellules mortes chez les plants traités avec 20g/l de NaCl, le test Manova indique qu'il n'existe pas une différence significative entre le lot des plantes témoins et celles ayant reçu un apport exogène de proline ( $p=0,00$ ). Le Pourcentage des cellules mortes chez les plants traités avec 5g/l de NaCl, le test Manova indique qu'il existe une différence significative entre les plantes inoculées par la bactérie et celles ayant reçu un apport exogène de proline. ( $p=0,03$ )

### 1.2. Mesure de l'Indice de stress physiologique

La figure 2 montre les effets du stress salin sur l'indice de stress physiologique en absence et en Présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* et l'apport exogène de proline.

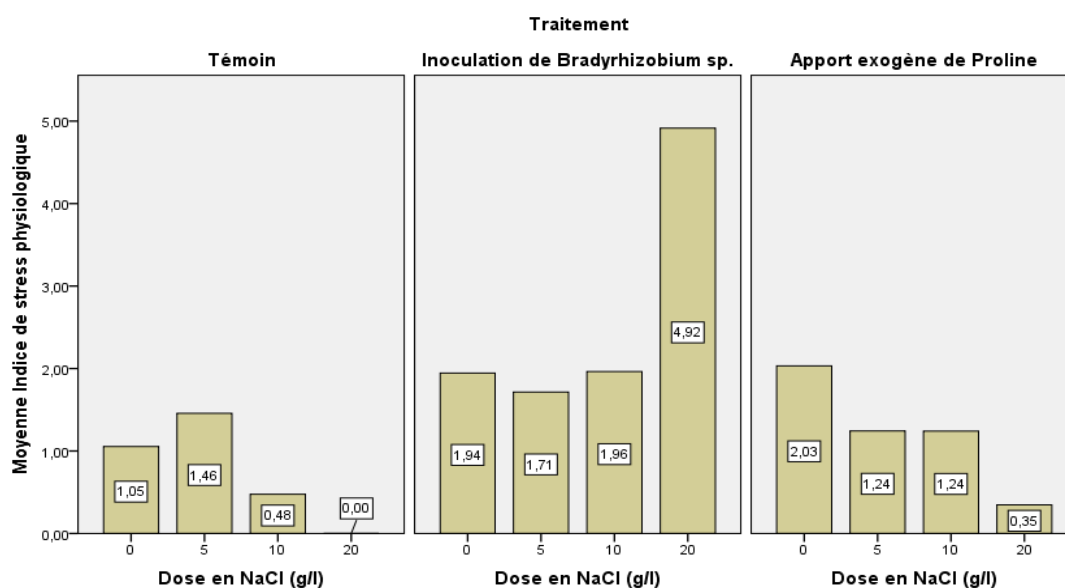


Figure 2 : Effet de stress salin sur l'indice de stress physiologique en absence et en Présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* ou l'apport exogène de proline.

En absence de l'inoculation bactérienne chez le témoin (0g/l) on note une valeur de 1,05 par contre nous remarquons une augmentation de la moyenne indice de stress physiologique chez les témoins avec une l'inoculation bactérienne où on a enregistré une valeur de 1,94, tandis qu'en présence de l'apport exogène de proline cette valeur est de 2,03. Le test de Manova indique qu'il n'existe pas une différence significative entre les plants témoins et celles inoculées par la bactérie ( $p=0,00$ ) et témoin avec apport exogène de proline. Chez les plantules d'orge non inoculées sans apport de proline et traitées aux différentes concentrations en NaCl, on constate une diminution significative de l'indice de stress physiologiques qui est de 1,05 pour les témoins et de 0,00 chez les plantules d'orges traitées avec 20g/l ( $p=0,00$ ) (Fig. 2).

En présence de l'inoculation, les plantules d'orge témoin présentent un indice de stress physiologique qui est de 1,94, ce dernier augmente pour atteindre une valeur de 4,92 chez les plantules inoculées et traitées à 20g/l. Le test de Manova indique qu'il existe une différence significative entre les plants témoins et celles inoculées par la bactérie en présence de 20g/l de NaCl ( $p=0,00$ ). Chez les plantules d'orge traitées aux différentes concentrations en NaCl et un apport exogène de Proline,

on remarque qu'il y a une diminution significative de l'indice de stress physiologique qui passe de 2,03 pour les témoins à 0,35 chez les plantules d'orges traitées avec 20g/l et un apport de proline ( $p=0,00$ ).

Concernant l'indice de stress physiologique ; le traitement avec la bactérie contribue à l'augmentation de cet indice chez les plantules d'orge donc une diminution de la dégradation des pigments chlorophylliens, la bactérie protège les pigments chlorophylliens contre les effets délétères de la salinité.

### 1.3. Effets de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* et de l'apport de la proline exogène sur l'accumulation des sucres totaux et de la proline

#### 1.3.1. Teneur en sucres solubles totaux

La figure 3 montre l'effet de NaCl sur la teneur en sucres solubles en absence et en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* ou l'apport exogène de proline. Les valeurs moyennes de la teneur en sucres solubles totaux des plantules d'orge soumises à différentes concentrations de NaCl en présence et absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* et de l'apport exogène d'un osmoprotecteur la proline sont représentés dans la figure 3.

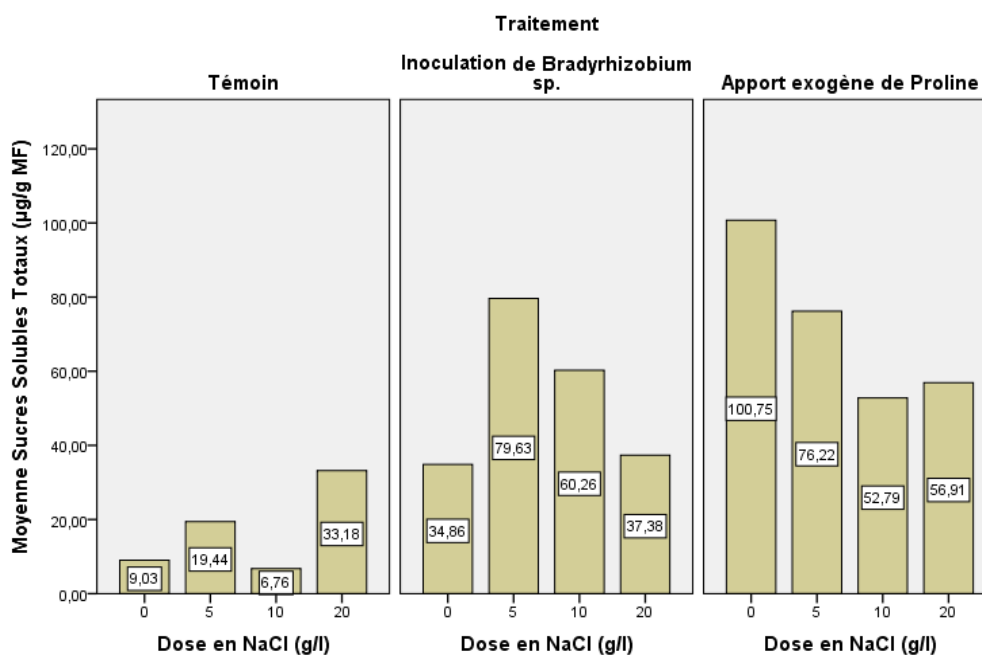


Figure 3 : Effet du NaCl sur la teneur en sucres solubles en absence et en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* ou l'apport exogène de proline

Chez les plantules d'orge non inoculées sans apport de proline et traitées aux différentes concentrations en NaCl, on constate une augmentation significative de la teneur en sucres solubles qui est de 9,03 µg/g de MF chez les témoins, elle passe à 19,44 µg/g de MF chez les plantules d'orge traitées avec 5g/l ( $p=0,00$ ) et de 33,18 µg/g de MF chez celles traitées avec 20g/l ( $p=0,00$ ) (Fig. 3).

Les plantules d'orge non inoculées sans apport de proline et traitées aux différentes concentrations en NaCl, on constate une augmentation significative de la teneur en sucres solubles qui est de 34,03 µg/g de MF chez les témoins, elle passe à 79,03 µg/g de MF chez les plantules inoculées et prétraitées avec 5g/l de NaCl ( $p=0,00$ ), puis elle diminue aux fortes concentrations en NaCl.

En absence de l'inoculation bactérienne chez le témoin (5g/l) on note une valeur de 19,44 µg/g de MF de sucres solubles par contre nous remarquons une augmentation de leur teneur chez les plantules inoculées et traitées avec 5g/l où on a enregistré une valeur de 79,63 µg/g de MF tandis qu'en présence de l'apport exogène de proline cette valeur est de 76,63 µg/g de MF. Le test de Manova indique qu'il existe une différence significative entre les plants témoin traités à 5g/l de NaCl et celles inoculées par la bactérie ( $p=0,00$ ) et un apport exogène de proline ( $p=0,03$ ).

En absence de l'inoculation bactérienne chez le témoin (10g/l) on note une valeur de 6,76 µg/g de MF de sucres solubles par contre nous remarquons une augmentation de leur teneur chez les plantules inoculées et traitées avec 10g/l où on a enregistré une valeur de 60,26µg/g de MF tandis qu'en présence de l'apport exogène de proline cette valeur est de 52,79µg/g de MF. Le test de Manova indique qu'il existe une différence significative entre les plantules témoin traitées à 10g/l de NaCl et celles inoculées par la bactérie ( $p=0,04$ ). Le test de Manova nous indique également qu'il n'existe pas de différence significative entre les plants témoin traités à 10g/l de NaCl et celles ayant reçu un apport exogène de proline ( $p=0,08$ ).

### 1.3.2. Teneur en Proline

La figure 4 montre l'effet de stress salin sur la teneur en proline en absence et en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* et l'apport exogène de proline. En absence de l'inoculation bactérienne et l'apport exogène de proline on note une valeur de 28,48mg/g de MF de la teneur en Proline), tandis que chez les plants témoins inoculées, on note une diminution de la teneur de la proline, on enregistre une valeur de 3,12mg/g.de MF et celle ayant reçu un apport exogène de proline de 3,85mg/g de MF. Le test de Manova indique qu'il existe une différence significative entre les plantes témoins et celles inoculées par *Bradyrhizobium sp.* ( $p=0,01$ ) ainsi que celles ayant reçu un apport exogène de proline ( $p=0,01$ ).

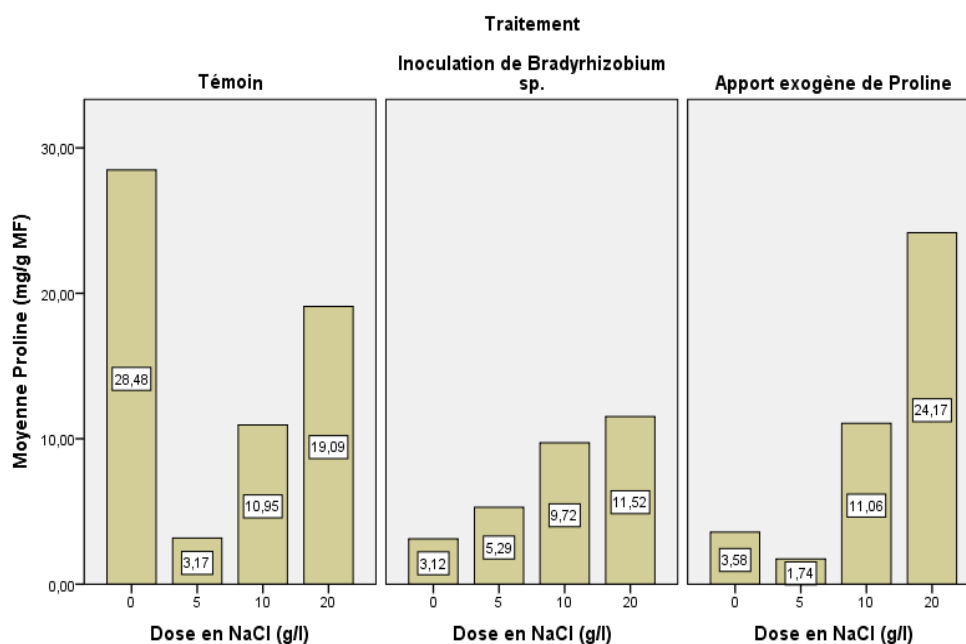


Figure 4: Effet du stress salin sur la teneur en proline en absence et en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* et l'apport exogène de proline.



En absence de pré-inoculation bactérienne et apport exogène de proline chez les témoins traités à 5g/l de NaCl, on remarque que la teneur en proline des plantules d'orge est de 3,17 mg/g de MF par contre chez les plantules ayant subi une pré-inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*, la teneur en proline augmente, elle est de 5,29 µg/g de MF. L'analyse de la variance a montré une différence significative entre ces deux valeurs ( $p=0,01$ ). Concernant l'apport exogène de proline, on note aucune différence significative entre les témoins traités avec 5g/l de NaCl et celles ayant reçu un apport exogène de proline ( $p=0,064$ ). Par contre à 10g/l et 20g/l on note une différence significative entre les témoins prétraités à 10g et 20g/l de NaCl et celles ayant reçu un apport exogène de proline ( $p=0,00$ ).

## DISCUSSION

Les plantules d'orge étudiées présentent des comportements variés vis-à-vis de traitement au NaCl en présence et absence de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* et un apport exogène de proline. Compte tenu des résultats obtenus par les expériences *in vivo*, nous nous sommes intéressés à la recherche de l'ensemble des manifestations biochimiques qu'engendre le stress oxydant induit par les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Nous avons essayé alors de déterminer l'effet de cet ion sur l'intégrité cellulaire ou membranaire ; ainsi que sur l'indice de stress physiologique, en mesurant le taux de chlorophylle dégradé par ces ions. Chez les plantules d'orge non inoculées sans apport de proline traitées aux différentes concentrations en NaCl, on constate il y a une augmentation significative du nombre de cellules mortes qui passe de 47,05% pour les témoins à 66% ,81% et 100% chez les plantules d'orges traitées respectivement avec 5g/l,10g/l et 20g/l. Le stress salin a considérablement augmenté de façon significative le nombre de cellules mortes. Les plantules d'orge traitées par le NaCl montrent une perte de leur intégrité membranaire et cellulaire qui serait dû à une accumulation de réactifs oxygènes species (R.O.S.) [22].

Les plantules d'orge inoculées et prétraitées au NaCl montrent une diminution significative du nombre de cellules mortes ; la bactérie protège ces structures cellulaires et celles de l'orge en synthétisant des molécules antioxydantes qui détoxifient les radicaux libres [22].

Le stress salin a aussi un effet sur le taux de chlorophylle. Le maintien de ce taux est un indice de tolérance des plantes au stress [23]. La diminution de la concentration en chlorophylle sous l'influence de la salinité a été reportée par de nombreux auteurs [23]. La chlorophylle est détruite en raison d'une quantité excessive de sel ou la présence d'espèces réactives de l'oxygène qui perturbe le métabolisme cellulaire et entraîne la dégénérescence des structures cellulaires. Habib *et al.* [24], constatent que les plantules de gombo stressées par du sel et inoculées présentaient un taux élevée en chlorophylle et les feuilles sont vert foncée en présence de PGPR contenant la désaminase ACC permettant de maintenir l'efficacité des plantules en réduisant la biosynthèse de l'éthylène.

Ali *et al.* [25], ont observé que l'inoculation des plantes par *Pseudomonas fluorescens* YsS6 et *P. migulae* 8R6 de type sauvage augmentait de manière significative le contenu en chlorophylle des plants de tomates par rapport à leurs mutants déficients en ACC des aminase et leur plantes témoins stressées par le sel. De plus, la salinité réduit la biosynthèse de pigments photosynthétiques et entraîne des modifications dans l'intégrité et la composition des membranes des chloroplastes [26].

Chez l'orge le stress salin induit une diminution significative de l'indice physiologique cela se traduit une augmentation de la dégradation des pigments chlorophylliens. Le traitement avec la bactérie contribue à l'augmentation de cet indice donc une diminution de la dégradation des pigments chlorophylliens chez les plantules d'orge inoculées, la bactérie protège les pigments chlorophylliens contre les effets délétères de la salinité. La bactérie pourrait contenir la désaminase ACC permettant de maintenir l'efficacité des plantules en réduisant la biosynthèse de l'éthylène. En réponse à des contraintes comme la salinité, la sécheresse et la température, les PGPR produisant une ACC désaminase qui stimule la croissance des plantes par la régulation de la production massive d'éthylène. La bactérie réduit la production d'éthylène dans les plants après exposition à des concentrations croissantes de sel. Cependant, la teneur en sodium de la plante n'a pas diminué alors que l'absorption de phosphore et de potassium a été légèrement augmentée, ce qui a contribué en partie à l'activation des processus impliqués dans la réduction de l'effet néfaste du sel.

La bactérie a également augmenté l'efficacité de l'utilisation de l'eau en milieu salin et a atténué la suppression de la photosynthèse [27]. La dégradation de ces derniers est beaucoup moins importante chez les plantules inoculées et stressées au NaCl que dans le cas d'un apport exogène de proline. Pour faire face au stress oxydant sodique les plantules d'orge inoculées vont mobiliser des systèmes antioxydants. Ceux-ci peuvent être enzymatiques et/ou non-enzymatique et la coopération entre ces antioxydants joue un rôle important dans l'élimination des ROS, le maintien du statut redox de la plante et se protéger contre le dommage oxydatif du NaCl [27]. Nous avons également recherché quelques antioxydants de nature non enzymatique comme la proline et les sucres totaux. Nos résultats sont en accord avec certains travaux où les auteurs ont constaté que la tolérance aux stress abiotique chez les plantules inoculées est en étroite corrélation avec les systèmes antioxydants [9].

Ces molécules antioxydantes jouent un rôle important dans l'ajustement osmotique qui implique l'accumulation de solutés organiques comme la proline, la glycine-bétaine, les sucres totaux, les acides organiques [28 et 11]. La salinité entraîne une augmentation significative des teneurs en sucres totaux chez les plantules traitées à 5g/l de NaCl. Les traitements par inoculation améliorent significativement les teneurs en sucres totaux chez les plantules inoculées et traitées à 5g/l et 10g/l de NaCl. Chez les plantules prétraitées au NaCl et en présence de proline exogène Il est à noter que l'effet de ces facteurs n'est pas visible sur la teneur en sucres solubles. Nos résultats sont en accord avec ceux de Silini [16].

Selon Abd El Baki *et al.* [28], l'augmentation de la salinité entraîne une accumulation des acides aminés foliaires et racinaires du maïs. Les feuilles seraient plus concernées par cette accumulation. Les acides aminés importants les plus impliqués sont l'alanine, l'arginine, la glycine, la sérine, la leucine, la valine, la proline et les acides aminés non protéiques tels que la citrulline et l'ornithine [28 et 29].

L'analyse du contenu en proline endogène dans les feuilles révèle que la variété d'orge n'accumule pas de fortes concentrations en proline sous les conditions salines. L'inoculation par *Brahyrhizobium sp.* entraîne une augmentation significative de la teneur en proline dans les feuilles sous l'effet du stress salin à 5g/l, 10g/l et 20g/l. A de fortes concentrations en NaCl 10g et 20 g/l nous

constatons aucune augmentation significative de cette proline chez les plantes inoculées et prétraitées avec de la proline exogène. En effet, la salinité du milieu constitue un environnement stressant pour les rhizobactéries. L'exposition des bactéries à une concentration élevée de 10 et 20g/l de NaCl à des conditions d'osmolarité élevée diminue l'activité de l'eau de leur cytoplasme [30] et entraîne des effets dommageables sur les protéines cellulaires et les autres macromolécules de fonction s'exprimant par une inhibition de leurs activités. Les bactéries halotolérantes ont une stratégie d'osmoprotection. Elles accumulent la proline pour protéger ses structures membranaires contre le stress osmotique et protéger la plante hôte [30].

L'apport de proline entraîne une réduction du contenu foliaire en sucres solubles totaux et une augmentation en proline endogène sous l'effet de la salinité du milieu. Ces résultats sont rapportés par Heuer [5], étudiant les effets de ces solutés compatibles et du stress salin sur la tomate. La glycine bétaine et la proline contribuent à une réduction de l'accumulation du Na<sup>+</sup> et une perte moins prononcée de K<sup>+</sup> dans les racines et les feuilles. Ce constat est la conséquence d'un transport plus faible des ions suite à une diminution de la transpiration [31 et 5]. Elles augmentent aussi la turgescence cellulaire par le biais de l'ajustement osmotique et participent à l'augmentation de la conductance stomatique au niveau des feuilles [5].

## CONCLUSION

L'accumulation de solutés compatibles est souvent prise comme une stratégie de base pour la protection et la survie des plantes sous stress salin et aride. Les apports exogènes de proline ou l'inoculation de bactéries rhizosphériques sont des approches possibles pour surmonter les effets délétères de l'environnement sur la croissance végétale. Cette étude relative au rôle des rhizobactéries et des osmoprotecteurs exogènes dans la croissance et l'amélioration des espèces végétales constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur. En effet, leur utilisation rentre dans le contexte de la fertilisation des sols salins et arides et la stimulation de la croissance et des défenses naturelles des plantes dont la finalité est de réduire l'application de produits phytosanitaires, d'atténuer les effets inhibiteurs du sel et de restaurer la productivité des cultures en zones arides.

Les résultats expérimentaux sur les paramètres biochimiques, obtenus en conditions semi-contrôlées montrent que les plantules d'orge ont des réactions différentes lorsqu'elles sont inoculées et prétraitées avec un apport exogène de proline. L'inoculation des plantules d'orge par *Bradhyrhizobium sp.* (*Lotus*) améliorent significativement certains paramètres biochimiques (pigments chlorophylliens, la perméabilité membranaire et l'accumulation de molécules antioxydantes comme la proline, les sucres totaux). *Bradhyrhizobium sp.* a une faible capacité de résistance à des concentrations salines élevées, sa présence n'a pas permis d'améliorer les paramètres biochimiques de l'orge soumis aux fortes concentrations de NaCl (20g/l). L'apport de soluté compatible exogène la proline, atténue les effets de la salinité par l'amélioration de certains de ces paramètres. Ces solutés peuvent avoir un effet direct et bénéfique aussi bien pour la survie et la croissance de *Bradhyrhizobium* et sur la tolérance de la plante au stress salin.

L'utilisation de *Bradhyrhizobium sp.* comme inoculant et l'apport de molécules osmoprotectrices pourrait être donc une solution prometteuse dans la biofertilisation des sols à faibles concentrations en sels et la protection de l'orge contre les effets de la salinité. Au terme de ce travail, les résultats auxquels nous avons aboutis sont préliminaires il serait intéressant de les approfondir afin de mieux explorer les mécanismes très complexes de tolérance et/ou résistance de l'association céréales-microorganismes en présence d'osmoregulateur exogène capable de se développer dans un environnement défavorable.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Cheverry C. (1995).** *Plant behaviour in saline environment.* Action d'eau 4, Ed. Acad. agro, Paris, France, 49 p.
- [2]. **Hamdy A. (1999).** Saline irrigation assessment for a sustainable use saline irrigation. Halophyte Production and Utilization, Project No. IC 18CT 96-0055, 152-226.
- [3]. **Rehman S., Harris PJC. and Ashraf M. (2005).** *Stress environments and their impact on crop production.* In: Ashraf M, Harris PJC (eds) Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches. Haworth Press, New York, pp 3-18.
- [4]. **Mansour M.M.F. (1998).** Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 767-772.
- [5]. **Heuer B. (2003).** Influence of exogenous application of proline and glycine betaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant, Sci.*, 165: 693-699.
- [6]. **Cuin T.A. and Shabala S. (2005).** Exogenously supplied compatible solutes rapidly ameliorate NaCl-induced potassium efflux from barley roots. *Plant Cell. Physiol.*, 46: 1924-1933.
- [7]. **Appel K. and Hirt H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55:373-399.
- [8]. **Kloepper JW. and Beauchamp C.J. (2015).** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 38:1219-1232.
- [9]. **Mouradi M., Bouizgaren A., Farissi M., Makoudi B., Kabbadj A., Very A.-A., Sentenac H., Qaddoury A. and Ghoulam C. (2016).** Biopriming improves seeds germination, growth, antioxidant responses and membrane stability during early stage of Moroccan alfalfa populations under water deficit. *Chilean Journal of Agriculture Research*, 76(3): 265-272.
- [10]. **Hallman, J., A. Quadt-Hallman, W.F. Mahaffee et J.W. Kloepper (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 43: 895-914.
- [11]. **Hamdia M.A. and Shaddad M.A.K. (2010).** Salt tolerance of crop plants. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 6(3): 64-90
- [12]. **Boungab K. (2013).** La rayure réticulée de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) dans le Nord-Ouest Algérien : Importance, morphologie et pouvoir pathogène chez *Pyrenophora teres* f. *teres* et recherche de moyens de lutte. Thèse de doctorat Es-sciences Option : Biotechnologie et phytopathologie. 178p
- [13]. **Degaichia H. (2015).** Essai de rhizodégradation des éléments de trace métallique (cas du cuivre et du cadmium) par *Bradhyrhizobium sp* prélevé sur *Lotus ornithopodioides* et analyse de son activité antifongique. Mémoire de Magister. Université de Blida.189p.
- [14]. **Lekhal R. et Aziez S.E. (2016).** *Bradhyrhizobium sp.* (*Lotus*) et son effet sur l'activité amylolytique et la mobilisation des réserves des graines de l'orge (*Hordeum vulgare* L. var. *jadida*) sous contraintes thermiques. 80p

- [15]. **Hmida C. et Saoudi A. (2010).** Etude de la variabilité des souches de Rhizobium efficaces pour l'haricot issues par radiomutagenèse. Mémoire de fin d'étude de Licence Appliquée en Biotechnologie. 70p
- [16]. **Silini A. (2013).** Effets des molécules osmoprotectrices sur la survie et l'activité d'une azotobactère et la croissance du blé dur en conditions salines. Thèse de doctorat en sciences. Université Ferhat Abbas, Sétif. 138p.
- [17]. **Baker C.J. and Mock N. M. (1994).** An improved method for monitoring cell death in a cell suspension and leaf disk assays using Evans blue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 39: 7–12.
- [18]. **Zhu JK. (2003).** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Cur. Opin. in plant biology*, 6:441-445.
- [19]. **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- [20]. **Naidu B.P., Walker M. and Munford S. (1992).** Foliar application of glycinebetaine increases grain yield of buckwheat under cold stress affected field conditions. 32<sup>nd</sup> Annual General Meeting of Australian Society of Plant Physiologists, Melbourne
- [21]. **Singh T.N., Aspinall D., Paleg L.G. et Bogges S.F. (1973).** Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 57-63.
- [22]. **Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., and Pessarakli M. (2012).** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012:1–26.
- [23]. **Bal H.B., Nayak L., Das S. and Adhya T.K. (2013).** Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and Soil*, 366 (1)2: 93–105
- [24]. **Habib SH., Kausar H., and Saud HM. (2016).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes. *Bio Med Research International*, Volume 2016, Article ID 6284547, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6284547>
- [25]. **Ali S., Charles T.C. and Glick B.R. (2014).** Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial Endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80:160–167.
- [26]. **Ashraf M. and Waheed A. (1993).** Response of some genetical lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to salt. *Plant Soil*, 154: 257-266
- [27]. **Noctor G. and Foyer C.H. (2014).** Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.*, 49: 249-279.
- [28]. **Abd-El-Baki G.K., Siefert F., Man H.M., Weiner H., Kaldenhoff R. and Kaise W.M. (2000).** Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell. Environ.*, 23: 515-521.
- [29]. **Mansour M.M.F. (2000).** Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.*, 43: 491-500.
- [30]. **Epstein W. (1986).** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39: 73-78
- [31]. **Gagnon S. and Dansereau B. (1990).** Influence of light and photoperiod on growth and development of gerbera. Symposium on Bedding and Pot Plant Culture. *Acta Horticulturae*, 272: 145-152.