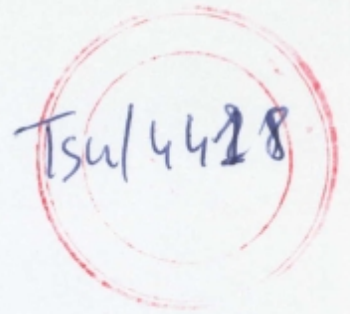


UNIVERSITE FERHAT ABBAS
SETIF

M E M O I R E



présenté à

l'Institut de Biologie

pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Option : MICROBIOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT
par

Akila LARGUET

Thème :
EFFET OSMOPROTECTEUR D'EXTRAITS
D'HALOPHYTES SUR
Rhizobium meliloti

Date de soutenance : 25/05/1998

Devant le Jury :

<u>Président :</u>	M.KAABECHE	M.C. U.F.A. Sétif
<u>Rapporteur :</u>	M. GHOUL	M.C. U.F.A. Sétif
<u>Examineurs :</u>	A.BEKKI	M.C.U. ORAN
	A.BENGUEDOUAR	M.C. U. Constantine
	N.NANCIB	M.C. U. F. A. Sétif

**A mes parents
très reconnaissante**

Remerciements

Ce travail à été réalisé sous la direction de Monsieur M. GHOUL à qui j'exprime ma profonde gratitude pour l'aide et les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail.

Sa compétence m'a été très utile.

Toute ma reconnaissance à Monsieur M.KAABECHE pour avoir généreusement déterminé les espèces halophytes et accepté de présider ce jury.

Messieurs A.BEKKI et A.BENGUEDOUAR m'ont fait l'honneur de participer à ce jury. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde considération .

Je suis reconnaissante à Monsieur N. NANCIB pour le soutien qu'il m'a toujours apporté et pour avoir accepté de juger ce travail .

Ma profonde gratitude à Monsieur A.BOUFEDJI chef de circonscription des forêts à Ain-Oulmèn pour m'avoir facilité les sorties sur terrain et le prélèvement des plantes . Son aide m'a été précieuse .

Mes remerciements à Monsieur le professeur M.CORMIER pour m'avoir généreusement accueillie dans son laboratoire et à toute l'équipe du laboratoire de microbiologie pharmaceutique de l'université de Rennes I (france) . Sans leur aide certains aspects de mon travail n'auraient pu être réalisés .

Je remercie également Madame le professeur A.SOULEAU et travers elle toute l'équipe du laboratoire de chimie organique de l'université de Rennes I pour leur aide et leur gentillesse.

Monsieur S.HABI m'a été d'une grande aide au laboratoire . Je le remercie pour sa disponibilité .

Monsieur D.HARZALLAH a toujours été coopératif. Qu'il trouve ici l'expression de ma considération .

Je tiens à remercier ma soeur Fadila pour le soutien qu'elle m'a apporté, mes amies Thoraya et Nora également .



Sommaire

Remerciements	I
Sommaire	III
Principales abréviations utilisées	VII
Introduction	VIII
Revue bibliographique	1
I- L'halotolérance chez les bactéries	2
1- Halophilie et halotolérance	3
2- Osmorégulation	4
3- Solutés compatibles	5
4- Mode d'action des osmoprotecteurs	6
5- Mécanismes osmoadaptatifs endogènes	6
6- Les osmoprotecteurs	10
II- Adaptation des halophytes à la salinité	17
1- Généralités	17
2- Réponses des végétaux à la salinité	18
2-1- Accumulation des ions inorganiques	18
2-2- Compartimentation des ions	18
2-3- Régulation de la teneur ionique des cellules	19
2-4- Accumulation des solutés compatibles	20
III- Réponses de <i>Rhizobium</i> au stress osmotique	23
1- Accumulation du potassium et des solutés compatibles endogènes	24
2- Réponses de <i>Rhizobium</i> aux osmoprotecteurs exogènes	25
3- Effet du stress osmotique sur l'interaction <i>Rhizobium</i> -plantes	28
Matériel et méthodes	30
I- Halophytes et osmoprotecteurs	31
1- Espèces végétales	31

2- Composés Dragendorff-positifs	32
2-1- Détection	32
2-1-1- Extraction	32
2-1-2- Chromatographie sur couche mince	32
2-1-3- Electrophorèse en haute tension	33
2-2- Purification	33
2-2-1- Préparation des extraits	33
2-2-2- Chromatographie sur couche mince	34
2-2-3- Chromatographie échangeuse d'ions	34
2-2-4- Chromatographie sur papier	35
2-2-5- Chromatographie sur couche mince	36
2-3- Identification	36
2-3-1- Chromatographie sur couche mince	36
2-3-2- Electrophorèse en haute tension	37
2-3-3- Méthodes spectroscopiques	37
3- Cas de la proline	39
3-1- Mise en évidence	39
3-2- Dosage	39
II- Effet d'extraits d'halophytes sur l'halotolérance bactérienne	40
1- Souches bactériennes	40
2- Milieux de culture	41
3- Cultures bactériennes et détermination de l'halotolérance	42
Résultats et discussion	44
I- Halophytes et osmoprotecteurs	46
1- Résultats	46
1-1- Détection des composés Dragendorff-positifs	46
1-2- Purification	51
1-3- Identification	56
1-3-1- Chromatographie sur couche mince	56
1-3-2- Electrophorèse en haute tension	56
1-3-3- Spectroscopie de RMN- ¹ H	56
1-3-4- Spectroscopie d'IR	62

1-4- La proline	62
2- Discussion	65
II- Effet d'extraits d'halophytes sur l'halotolérance bactérienne	69
1- Appréciation de l'halotolérance de <i>Rhizobium</i>	69
1-1- En milieux LAS, LAS + G.B et MSY	69
1-1-1- Résultats	69
1-1-2- Discussion	70
1-2- Effet osmoprotecteur d'extraits d'halophytes sur <i>Rhizobium</i>	74
1-2-1- Résultats	74
1-2-2- Discussion	80
2- Appréciation de l'halotolérance de <i>E. coli</i> et <i>Pseudomonas</i>	83
2-1- Résultats	83
2-2- Discussion	84
Conclusion	86
Résumé	90
Références bibliographiques	93
Communications	107
Annexes	109

Principales abréviations utilisées

BTS: Bouillon Trypticase Soja

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

E.H.T: Electrophorèse en Haute Tension

G.B: Glycine Bétaïne

I.R: Infra-Rouge

NAGGN: N-acetylglutaminyglutamine.

MSY: Mannitol-Salts-Yeast extract (mannitol-sels-extrait de levure)

RMN-¹H: Résonance Magnétique Nucléaire-Proton

Introduction

L'agriculture connaît de sérieux problèmes de rendement dans les régions salées dûs aux effets délétères du sel sur le végétal ainsi que sur la microflore tellurique dont l'activité est d'une extrême importance dans la fertilisation du sol. En Algérie, ces sols couvrent de grandes superficies et constituent une entrave aux cultures agricoles .

Cependant, certaines plantes (halophytes) se développent au niveau des sebkhas en dépit du haut degré de salinité de ces zones. Les halophytes constituent une vaste classe de plantes adaptées au sel. Elle comprend 500 genres environ (Flowers et coll.,1986) dont 360 espèces répertoriées en Algérie (10,3% de la flore totale) (Le Houérou, 1993).

L'adaptation au stress salin présente une grande similarité chez tous les organismes vivants: animaux, plantes et micro-organismes. Elle est assurée par l'accumulation d'osmoprotecteurs : osmolytes organiques à faible poids moléculaire compatibles avec les processus métaboliques. Il s'agit d'ammoniums quaternaires , de sulfoniums tertiaires, d'acides aminés et de polyols. Ces molécules permettent de maintenir un équilibre entre la pression osmotique intracellulaire et celle du milieu extérieur et stabilisent les membranes et les enzymes. Elles sont aussi retrouvées en cas de stress hydrique et thermique .

Les halophytes sont connus pour accumuler des molécules osmoprotectrices. C'est le cas par exemple de la glycine bêtaïne chez de nombreuses espèces dont *Halosarcia halocnemoides* et *Wilsonia humilis* (Poljakoff-Mayber et coll., 1987), du diméthylsulfoniopropionate chez *Spartina* et *Wedelia* (Rhodes et Hanson , 1993), de la proline chez *Mesembryanthemum Crystalinum* (Bohnert et coll.,1994) et le sorbitol chez *Plantago* (Popp, 1995).

De telles molécules sont elles à l'origine de l'adaptation des espèces halophytes prélevées de différentes ceintures de végétation au niveau de sebkhas ? Si tel est le cas, ces plantes peuvent-elles être exploitées pour la restauration de la croissance de *Rhizobium* - bactérie du sol à intérêt agricole - en milieux salés, et par extrapolation, de l'ensemble de la microflore tellurique?

Pour répondre à de telles questions, nous nous proposons dans un premier temps la mise au point d'une méthodologie spécifique de détection, de purification et d'identification d'osmoprotecteurs appartenant aux composés -oniums (ammoniums quaternaires et sulfoniums tertiaires) à partir d'extrait d'halophytes riches en sel .

Dans un second temps, l'effet osmoprotecteur éventuel d'extrait d'halophytes sera testé et apprécié sur la croissance de souches de *Rhizobium meliloti* en présence de concentrations croissantes en sel .

Revue bibliographique

I- L'Halotolérance chez les bactéries

La membrane cytoplasmique de la cellule bactérienne est perméable à l'eau mais non à la plupart des métabolites (Csonka, 1989). Un environnement hyper- ou hypotonique provoque un efflux ou un influx d'eau accompagné d'une diminution (plasmolyse) ou d'une augmentation (turgescence) du volume cytoplasmique (Neidhardt et coll., 1994).

Des conditions hypotoniques créent généralement de faibles augmentations du volume cellulaire vu la rigidité de la paroi bactérienne. La cellule peut supporter une pression interne importante. Au contraire, des conditions hypertoniques peuvent provoquer une contraction considérable du cytoplasme dont le degré dépend de l'importance de l'osmolarité (Csonka, 1989). Une augmentation brutale de l'osmolarité extérieure provoque un efflux rapide de l'eau et une déshydratation du cytoplasme (Herbst et coll., 1994) ayant pour conséquence l'inhibition de la croissance sans que la viabilité ne soit affectée (Csonka et Epstein, 1996).

Les protéines et d'autres macromolécules biologiques ont une activité optimale entre certaines limites de valeurs de l'activité de l'eau (a_w), en dehors desquelles celle-ci est perturbée. La plasmolyse entraîne la dénaturation des enzymes (Yancey et coll., 1982; Cayley et coll., 1992) et donc l'inhibition de processus physiologiques tels l'accumulation de nutriments (Roth et coll., 1985) et la réplication de l'ADN (Meury, 1988). Ohwada et Sagisaka (1988) ont constaté une augmentation de l'ATP intracellulaire probablement due à l'inhibition de la biosynthèse des macromolécules. Chez *Escherichia coli*, la formation de l'ATP induite par le stress osmotique contribue à son osmorégulation (Ohwada et coll., 1994).

Pour équilibrer sa pression osmotique interne, la cellule fait appel dans un premier temps à des mécanismes endogènes, à savoir l'accumulation ou l'excrétion d'osmolytes. Lorsque le stress devient plus important elle accumule des substances dites osmoprotectrices à partir du milieu extérieur.

1- Halophilie et halotolérance:

Les bactéries survivent et prolifèrent dans des environnements de différentes salinités (Pocard et coll., 1994) et selon qu'elles exigent le sel pour leur croissance ou le tolèrent, elles sont classées en bactéries halophiles ou bactéries halotolérantes (Ollivier et coll., 1994).

La première classification fut proposée par Larsen (1962) et complétée par Kushner (1978) qui classifia les microorganismes selon la meilleure croissance obtenue en présence de concentrations connues en sel:

-Les non-halophiles: croissance optimale à moins de 0,2 M NaCl. la plupart des eubactéries et les microorganismes d'eau douce.

- Les halophiles faibles: croissance optimale entre 0,2 et 0,5 M NaCl. Plusieurs microorganismes marins.

- Les halophiles modérés: croissance optimale entre 0,5 et 2,5 M NaCl. Bactéries et quelques algues.

-Les halophiles extrêmes: croissance optimale entre 2,5 et 5,2 M NaCl. Les halobactéries et les halococci.

-Les halotolérants: ce sont les non-halophiles qui peuvent tolérer le sel.

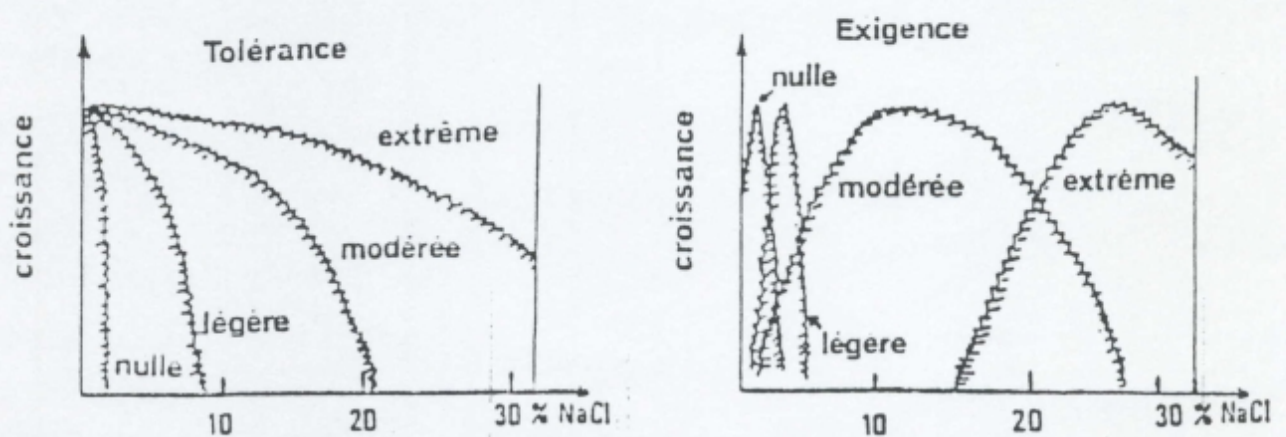


Fig. A.: Microorganismes regroupés selon leurs réponses au sel (Larsen, 1986)

Imhoff (1986) classifia les bactéries halophiles selon la concentration optimale en sel nécessaire à leur croissance et les halotolérantes selon leur "limites supérieures de croissance", c'est-à-dire la concentration maximale en sel pouvant être supportée par la bactérie. Ainsi, les bactéries non-halophiles ont une croissance optimale à 0,2 M, les halophiles faibles entre 1,0 et 1,2 M, les halophiles modérées entre 2,0 et 2,5 M et les halophiles extrêmes pour des valeurs supérieures à 2,5 M. NaCl.

Actuellement, cependant, la classification établie par Larsen (1986) semble la plus adoptée. La distinction est faite entre "tolérance au sel" et "exigence en sel".

Afin d'éviter toute confusion, il serait bon de préciser que les bactéries non-halophiles sont souvent stimulées par une faible quantité en sel (environ 1%) et que l'effet stimulateur de la croissance est obtenu avec différents sels (Larsen, 1986).

2- Osmorégulation:

La cellule bactérienne maintient une osmolarité interne supérieure à celle de son milieu (Herbst et coll., 1994; Pocard et coll., 1994). Il en résulte, suite à l'influx d'eau, une pression exercée par la membrane cytoplasmique sur la paroi. C'est la pression de turgescence (Csonka, 1989). L'osmorégulation est la restauration de cette turgescence suite à un stress hypo- ou hyperosmotique (Neidhardt et coll., 1994).

La pression de turgescence est plus élevée chez les bactéries à Gram positif (5-22 atm) que chez celles à Gram négatif (0,8-5 atm). Elle est maintenue constante en dépit de conditions changeantes (Neidhardt et coll., 1994). La turgescence est supposée accomplir deux fonctions cellulaires:

- Elle évite la nécessité d'un contrôle précis du mécanisme compliqué qui serait exigé pour faire correspondre exactement et rapidement la pression osmotique interne à la pression externe (Neidhardt et coll., 1994) et
- fournit la force qui entraîne l'expansion de la paroi cellulaire associée à la croissance (Jebbar et coll., 1992; Lucht et Bremer, 1994; Neidhardt et coll., 1994).

La réponse d'un microorganisme à un stress osmotique peut être résumé en trois phases: d'abord, il se produit une contraction ou une dilatation du cytoplasme due à un efflux ou à un influx d'eau, ensuite, un réajustement biochimique de la cellule s'établit afin de restaurer la

d'énergie (Canovas et coll., 1996) et convient donc moins à la survie dans les conditions extrêmes (Pocard et coll., 1994).

Deux classes de solutés compatibles sont à distinguer:

- Les uns n'ont aucun effet détectable sur la croissance à de fortes osmolarités (Csonka, 1981; 1989).

- Les autres, par contre, ont un effet de stimulation considérable sur le taux de croissance lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de culture. Ce sont **les osmoprotecteurs** (Le Rudulier et coll., 1984 b; Csonka et Hanson, 1991; Le Rudulier, 1993).

Les osmoprotecteurs sont des molécules dipolaires agissant à des concentrations extérieures aussi faibles que 1 mM, ils ne sont pas métabolisés par les cellules stressées et durant un stress osmotique sévère, leur concentration intracellulaire peut atteindre 1 M sans qu'il y ait interférence avec les réactions biochimiques. Ils représentent une alternative aux solutés chargés (ioniques) accumulés en cas de faibles osmolarités externes. L'effet inhibiteur d'une concentration ionique élevée est ainsi évitée. (Csonka et Epstein, 1996).

4- Mode d'action des osmoprotecteurs:

En dépit de leurs effets spectaculaires, le mode d'action des osmoprotecteurs est loin d'être clair. Ils pourraient n'être simplement que des solutés compatibles particulièrement inoffensifs ou, au contraire, ils pourraient jouer un rôle protecteur actif interagissant avec les protéines et les protégeant de cette façon de l'action destructive de l'osmolarité élevée (Neidhardt et coll., 1994). Si Schobert (1977) préconise l'interaction des osmoprotecteurs avec les protéines, Potts (1994) et Randall et coll. (1996) appuient l'hypothèse de leur exclusion. L'effet des osmoprotecteurs pourrait s'expliquer aussi par leur capacité d'augmenter le contenu d'eau des cellules (Cayley et coll., 1992).

5- Accumulation du potassium et de solutés compatibles endogènes:

5-1- Le potassium:

Le potassium, élément essentiel dans tous les environnements, est le cation prédominant dans le cytoplasme chez les bactéries (Csonka, 1989).

Le mouvement de K^+ (influx et efflux) est régulé par la pression de turgescence de la cellule. Celle-ci constitue le signal primaire pour l'osmoadaptation. L'absorption de ce cation est

suggérée être le second signal pour toute autre réponse osmorégulatrice (Csonka et Hanson, 1991; Csonka et Epstein, 1996; Malin et Lapidot, 1996).

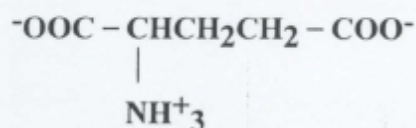
La concentration intracellulaire de K^+ s'accroît de telle façon qu'elle puisse maintenir la pression de turgescence jusqu'à une valeur de l'osmolarité externe de 1,2 osM (Neidhardt et coll., 1994). Elle est proportionnelle à l'osmolarité du milieu (Csonka, 1989) et peut atteindre 0,9 M (Lucht et Bremer, 1994).

L'accumulation du potassium en réponse à un stress osmotique est transitoire. *Escherichia coli* soumis à un choc hyperosmotique excrète des ions K^+ après 30 minutes pour les remplacer par des solutés compatibles organiques (Lucht et Bremer, 1994). A l'état stationnaire, K^+ est présent à une concentration suffisante pour l'accumulation des solutés compatibles (Csonka et Epstein, 1996).

Au fait, l'électroneutralité du cytoplasme est maintenue par l'accumulation du glutamate (contre-ion de K^+) (Csonka, 1989) et l'excrétion de cations tels la putrescine (Munro et coll. 1972) et les protons (Csonka, 1989; Csonka et Epstein, 1996).

5-2- Le glutamate:

Le glutamate joue un rôle majeur dans le maintien de la pression de turgescence de la cellule particulièrement chez les bactéries à Gram négatif (Neidhardt et coll., 1994). Chez *E. coli*, sa concentration est directement liée à l'osmolarité du milieu. Elle peut atteindre des valeurs qui représentent jusqu'à 90% de la réserve des acides aminés libres (Csonka, 1989). Le rôle essentiel du glutamate est de contre-balancer les charges positives des ions K^+ (Csonka, 1989). Le glutamate possède, en effet, une charge négative nette à pH neutre.



Structure du glutamate

L'apport exogène en glutamate ne confère aucune osmotolérance à la bactérie (Larsen et coll., 1987; Csonka et Hanson, 1991). Son accumulation endogène résulte de l'inhibition de son

utilisation dans l'anabolisme plutôt que la stimulation de sa biosynthèse (Csonka et Epstein, 1996). Cette accumulation serait stimulée par l'alcanisation momentanée du cytoplasme due à l'excrétion des protons (Ogahara et coll., 1995) ou par l'influx de K^+ (Csonka et Epstein, 1996).

Chez les mutants de *Salmonella typhimurium* caractérisés par une production abondante de proline, une hyperosmolarité du milieu ne provoque aucune augmentation du taux du glutamate. Ces mutants sont, néanmoins, plus halotolérants que les souches du type sauvage. L'accumulation du glutamate *per se* n'est donc pas exigée pour l'osmotolérance (Csonka, 1989).

La concentration de la glutamine augmente également en réponse au stress hyperosmotique chez les bactéries à Gram négatif. Cependant, sa contribution au maintien de l'osmolarité du cytoplasme n'est pas importante et son accumulation n'est que la conséquence à la demande croissante en glutamate; la glutamine est le précurseur du glutamate chez la plupart des bactéries (Csonka, 1989).

De façon générale, chez les bactéries à Gram positif, la réserve d'acide glutamique répond moins au stress osmotique; c'est-à-dire que la réponse est plus lente et de moindre amplitude. Chez ces organismes, ce sont la glutamine et/ou l'alanine qui jouent un rôle équivalent (Neidhardt et coll. 1994). D'autres anions organiques tels le β -glutamate (Le Rudulier, 1993), le glutathion et la γ -glutaminyglutamine (Lucht et Bremer, 1994; Csonka et Epstein, 1996) contribuent également à la balance du pool intracellulaire de K^+ .

5-3- La putrescine:

La putrescine est le cation organique divalent majeur chez les bactéries. Cependant, sa contribution à l'osmolarité du cytoplasme est très faible, la majorité de ce diamine est liée aux acides nucléiques (Csonka et Epstein, 1996). Son rôle dans l'osmorégulation a été décrit par Munro et coll (1972).



Structure de la putrescine.

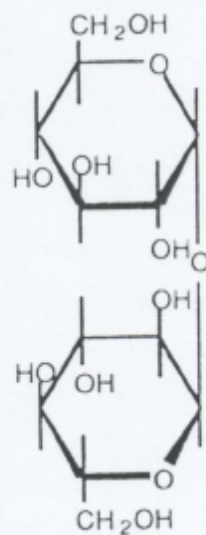
La teneur intracellulaire en putrescine varie inversement avec la force osmotique du milieu. Elle est de 50 mM environ en milieu à faible osmolarité et chute jusqu'à 5 mM à

osmolarité élevée (Munro et coll., 1972) suite à une excrétion rapide dans le milieu extérieur (Csonka et Epstein, 1996). Celle-ci est K^+ -dépendante, son taux diminue sévèrement en absence de K^+ (Munro et coll., 1972).

L'excrétion de la putrescine sous forme de cations divalents (putrescine²⁺) constitue pour la cellule un moyen d'équilibrer sa charge positive interne suite à l'accumulation des ions K^+ (Munro et coll. 1972).

5-4- Le tréhalose:

Le tréhalose est un disaccharide non-réducteur formé de deux molécules de glucose. Il semble jouer un rôle important dans la protection des différents organismes contre plusieurs types de stress: chaleur, produits chimiques, dessiccation, hyperosmolarités (Kaasen et coll., 1992) et froid (Strøm et Kaasen, 1993) en maintenant la fonction et l'intégrité des membranes (Kaasen et coll., 1992; Potts, 1994) et des enzymes (Potts, 1994).



Structure du tréhalose

Chez *E. coli*, la teneur en tréhalose augmente avec la concentration en sel du milieu extérieur (Strøm et coll., 1986; Larsen et coll., 1987). Sa contribution à l'osmolarité de la cellule peut atteindre 20% à un stress osmotique sévère en absence d'osmoprotecteurs exogènes (Csonka et Epstein, 1996).

Les mutants de *E. coli* déficients en synthèse de tréhalose montrent une osmotolérance très faible en milieu minimum dépourvu de bétaines ou d'autres osmoprotecteurs (Larsen et coll.,

1987). La synthèse du tréhalose représente ainsi un mécanisme endogène d'osmoadaptation important.

La synthèse du tréhalose en réponse au stress osmotique externe est régulée par l'accumulation du glutamate de potassium. Ce dernier active la tréhalose phosphosynthétase. En effet l'accumulation du glutamate de potassium précède celle du tréhalose suite à un choc osmotique (Strøm et Kaasen, 1993).

Il est intéressant de noter que le tréhalose exogène n'apporte aucune osmoprotection. Cependant, il peut être utilisé comme seule source de carbone et d'énergie (Styvold et Strøm, 1991; Strøm et Kaasen, 1993; Csonka et Epstein, 1996) à faibles et à fortes osmolarités (Jebbar et coll., 1992; Strøm et Kaasen, 1993).

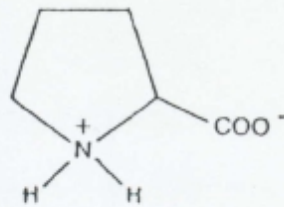
5-5- Les polyols:

Bien que les polyols (glucides et leurs dérivés polyalcools) soient des solutés compatibles répandus chez les algues et les champignons (Kets et coll., 1996; Chaturvedi et coll., 1997), leur accumulation chez les bactéries est limitée à quelques exceptions. C'est le cas du sorbitol chez *Zymomonas mobilis* et du mannitol chez *Pseudomonas putida* (Kets et coll., 1996). Chez les cyanobactéries, le saccharose et le glucosylglycérol sont synthétisés en milieu salin (Le Rudulier, 1993). En outre, Le glucosylglycérol joue un rôle important dans l'osmoadaptation chez *Pseudomonas mendocina* (Pocard et coll., 1994).

6- Les osmoprotecteurs:

6-1- La proline:

Parmi les acides aminés communs, la proline est unique par son pouvoir de stimuler la croissance bactérienne à osmolarité élevée (Le Rudulier et coll., 1982). Son rôle dans l'osmorégulation a été initialement décrit par Christian (1955) (In Lucht et Bremer, 1994) en démontrant son effet osmoprotecteur chez *Salmonella oranienburg* lorsqu'elle est additionnée au milieu de culture. Des travaux ultérieurs ont mis en évidence le rôle osmoprotecteur de la proline exogène chez de nombreuses espèces bactériennes (Druger-Liotta et coll., 1986; Csonka et coll., 1994).



Structure de la proline

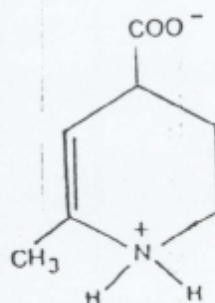
La synthèse intracellulaire de la proline n'est pas stimulée par le stress osmotique. Chez *E. coli* cultivé en milieu minimum, la proline n'est pas accumulée face au stress salin (Ghoul, 1990). Son accumulation s'effectue à partir du milieu extérieur par augmentation de l'activité du transport. Elle est proportionnelle à la force osmotique du milieu (Csonka, 1989) et peut atteindre des concentrations intracellulaires importantes (Larsen et coll., 1987).

Toutefois, plusieurs espèces bactériennes à Gram positif sont capables d'augmenter leurs teneurs en proline face au stress osmotique en absence de tout apport exogène de cet acide aminé (Csonka, 1989). Il en est de même chez les mutants de *Salmonella typhimurium* caractérisés par une production abondante de proline (Le Rudulier et Bouillard, 1983; Csonka, 1988). La synthèse étant inhibée par *feed-back* (Csonka et coll., 1988), ces mutants excrètent la proline dans le milieu extérieur. Celle-ci sera ensuite accumulée par transport en réponse au stress osmotique (Csonka, 1981; Csonka, 1988).

Bien que la proline ait un effet osmoprotecteur certain, son efficacité se limite aux stress osmotiques modérés (Le Rudulier, 1993).

6-2- L'ectoïne:

L'ectoïne (acide tetrahydrométhylpyrimidine carboxylique) est un acide aminé cyclique n'entrant pas dans la synthèse des protéines. Les études sur cet acide aminé sont relativement récentes et s'intensifient de plus en plus.



Structure de l'ectoïne

L'ectoïne a été identifiée pour la première fois comme soluté compatible endogène chez *Ectothiorodospira halochloris*, bactérie phototrophe extrêmement halophile (Galinski et coll., 1985) (In Jebbar et coll. 1992). Elle a été ensuite détectée comme osmolyte majeur chez de nombreuses bactéries comme *Pseudomonas* (Kets et coll., 1996), les streptomycètes (Malin et Lapidot, 1996), *Brevibacterium linens*, *Vibrio costicola* et *Micrococcus* (Ciula et coll., 1997)

L'ectoïne et son dérivé l'hydroxyectoïne sont des molécules dipolaires à faible poids moléculaire, très solubles dans l'eau et neutres à pH physiologique (Malin et Lapidot, 1996). Ils ont des propriétés protectives contre le stress osmotique, la chaleur, la congélation et la dessiccation (Malin et Lapidot, 1996; Ciula et coll., 1997). Ces deux molécules sont accumulées à des concentrations importantes chez les *Halomonadaceae* en milieu minéral additionné de glucose (Canovas et coll., 1996) atteignant 11 M à 3,4 M NaCl. Une concentration intracellulaire aussi élevée peut être expliquée par un faible coefficient d'activité de l'ectoïne dans la cellule (Ciula et coll., 1997).

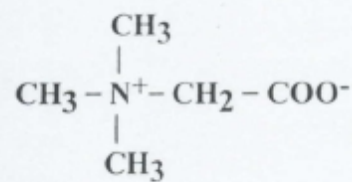
L'ectoïne et l'hydroxyectoïne sont simultanément synthétisés à partir de l'asparagine ou du glutamate (Malin et Lapidot, 1996). Cette biosynthèse est inhibée en présence d'osmoprotecteurs exogènes telles les bétaines (Ciula et coll., 1997).

Bien que cet acide aminé soit un soluté compatible endogène chez plusieurs bactéries, il peut être accumulé par transport à partir du milieu extérieur chez certaines autres. Chez *E. coli*, l'ectoïne exogène est aussi efficace que la glycine bétaine et agit à de faibles concentrations (1 mM). Chez cet organisme, l'ectoïne n'est pas métabolisée. Son accumulation régulée par les systèmes d'influx et d'efflux est proportionnelle à l'osmolarité du milieu (Jebbar et coll., 1992). Son rôle osmoprotecteur a été également observé chez *Salmonella typhimurium* (Csonka et Epstein, 1996).

6-3- Les ammoniums quaternaires:

Les ammoniums quaternaires naturels constituent une classe de molécules très vastes renfermant plus de 100 substances (Anthoni et coll., 1991). Leur rôle comme osmolytes compatibles permettant l'adaptation aux stress salin et hydrique est reconnu chez différents organismes vivants: animaux, algues, plantes et bactéries (Rhodes et Hanson, 1993).

Les ammoniums quaternaires sont essentiellement représentés par les bétaines. Ceux-ci sont des dérivés méthylés d'acides aminés. La **glycine bétaine (G.B)** est l'osmoprotecteur le plus efficace (Herbst et coll., 1994). Son pouvoir osmoprotecteur a été observé chez bon nombre de bactéries halophiles et non-halophiles (Le Rudulier et Bouillard, 1983; Hutkins et coll., 1987) essentiellement chez les entérobactéries. Cependant, elle s'est avérée sans effet chez certaines autres (Csonka, 1989).



Structure de la G.B

Chez les cellules stressées, la G.B n'est pas métabolisée, elle s'accumule (Hutkins et coll., 1987; Csonka, 1989). Elle est très hygroscopique permettant l'attraction et la rétention d'eau dans la cellule (Le Rudulier et coll., 1984 a). Elle stabiliserait les macromolécules biologiques contre l'effet dénaturant de la chaleur et la congélation (Ko et coll., 1994; Randall et coll., 1996) et préviendrait l'aggrégation des protéines cellulaires (Ko et coll., 1994).

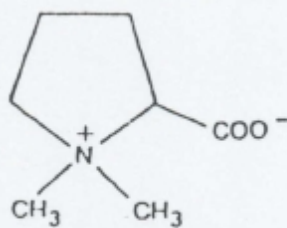
La G.B est accumulée par transport actif à partir du milieu extérieur (Kets et coll., 1996). Son accumulation intracellulaire inhibe tout autre mécanisme susceptible d'être adopté par la cellule contre le stress osmotique (Cayley et coll., 1992). Elle est préférée à tous les autres solutés compatibles (Csonka et Hanson, 1991; Kets et coll., 1996; Ciula et coll., 1997)

Le transport de la glycine bétaine est déclenché par la seule élévation de la pression osmotique du milieu extérieur (May et coll., 1986). Celle-ci peut être induite par des électrolytes (NaCl) ou par des composés non-électrolytes (saccharose) (Csonka et Epstein, 1996; Le Rudulier, 1993). Les teneurs intracellulaires en G.B sont proportionnelles à l'osmolarité du milieu (Le Rudulier et Bouillard, 1983; Csonka, 1989; Le Rudulier, 1993) et peuvent dépasser 800 mM (Lucht et Bremer, 1994).

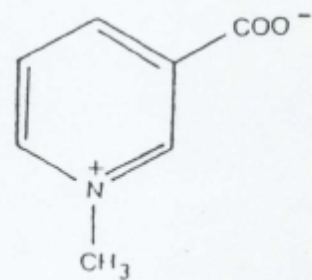
Bien que la plupart des bactéries dépende de la G.B exogène (Csonka, 1989; Jebbar et coll., 1992) ou de la choline (son précurseur) (Lamark et coll., 1992; Lucht et Bremer, 1994), les

cyanobactéries et certains autres procaryotes fixant le CO₂ sont capables de la synthétiser *de novo*.

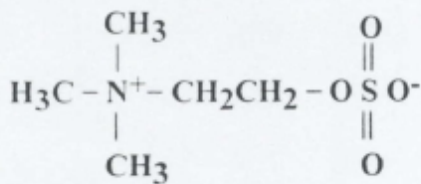
La **proline bétaine** (stachydrine) est aussi active que la G.B chez *E. coli* (Haardt et coll. 1995; Larsen et coll., 1987). La **choline-o-sulfate** (Canovas et coll., 1996) et les autres bétaines, la **γ-butyrobétaine** (Haardt et coll., 1995), la **glutamine-bétaine** (Csonka, 1989; Le Rudulier, 1993), la **β-alanine-bétaine**, la **carnitine** (Csonka et Epstein, 1996) et la **trigonelline** (Bernard et coll., 1986), montrent une activité osmoprotectrice moins prononcée.



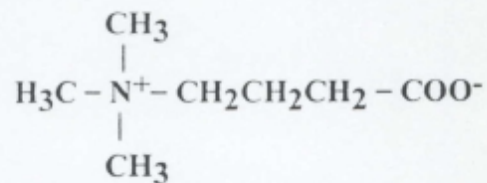
Proline bétaine



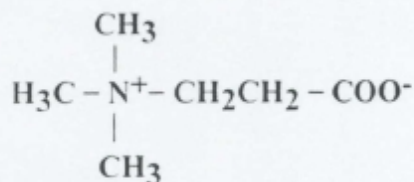
Trigonelline



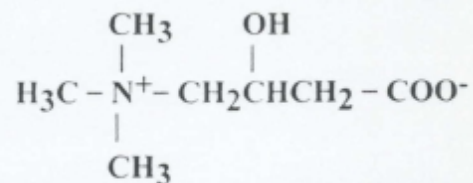
Choline-O-Sulfate



γ-Butyrobétaine



β-Alanine bétaine

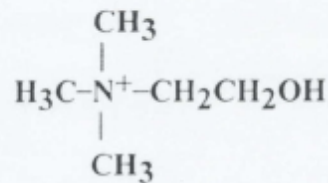


L-Carnitine

Structures de quelques bétaines

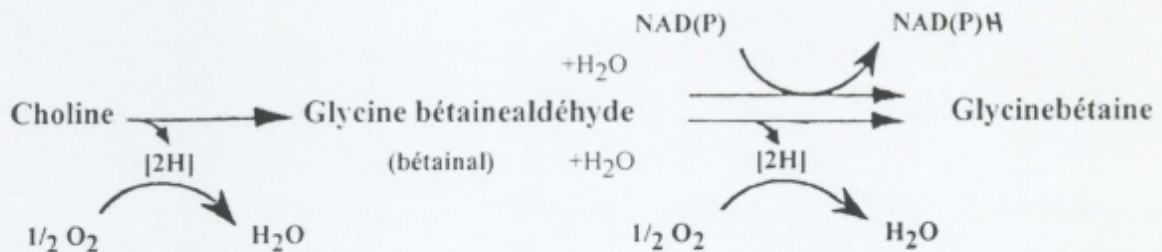
6-4- La choline:

La choline n'est pas un osmoprotecteur *per se* (Le Rudulier et coll., 1984 b; Le Rudulier, 1993). Elle est rapidement et automatiquement convertie en glycine bétaine (Landfald et strøm, 1986). Cette voie métabolique existe chez plusieurs bactéries telles *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Csonka et Epstein, 1996), *Bacillus subtilis*, *Rhizobium meliloti* (Canovas et coll., 1996) et *Pseudomonas aeruginosa* (Landfald et strøm, 1986; Falkenberg et strøm, 1990).



Structure de la choline

La conversion de la choline en G.B s'accomplit en deux étapes catalysées par deux enzymes (Lucht et Bremer, 1994):



- La choline déshydrogénase (O_2 -dépendante) catalyse l'oxydation de la choline en bétainal et ce dernier en G.B.

- La glycine bétainealdéhyde déshydrogénase (NADP-dépendante) catalyse l'oxydation du bétainal en G.B.

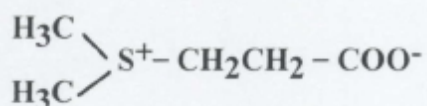
La conversion de la choline est osmotiquement régulée et n'est exprimée qu'en aérobiose (Landfald et strøm, 1986). En outre, l'absorption de la G.B provoque un efflux net de la choline (Lamark et coll., 1992).

6-5- Les sulfoniums tertiaires:

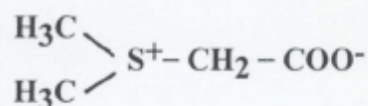
Les composés sulfoniums tertiaires ont une structure analogue à celle des ammoniums quaternaires (N est substitué par S). Ce sont également des osmolytes compatibles permettant l'adaptation à la salinité et à la déshydratation chez différents organismes vivants: animaux, algues, plantes et bactéries (Rhodes et Hanson, 1993).

Le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) est assez répandu dans la nature. Il est synthétisé chez les plantes et les algues. Cependant, il n'a jamais été détecté chez les procaryotes comme substance synthétisée *de novo* (Ciula et coll., 1997). C'est une molécule à effet osmoprotecteur chez les bactéries (Chambers et coll., 1987). Son accumulation n'a été constatée qu'en milieu carencé en azote (Ghoul, 1990; Ciula et coll., 1997).

Le diméthylsulfonioacétate (DMSA), aussi appelé diméthylthétine, a un pouvoir osmoprotecteur aussi efficace que la G.B et plus prononcé que celui du DMSP (Chambers et coll., 1987).



Structure du DMSP



Structure du DMSA

Il existe une hiérarchie des solutés compatibles quant à leur efficacité dans la stimulation de la croissance à osmolatrités inhibitrices et leur utilisation lorsque plusieurs sont disponibles. *E. coli* et *S. typhimurium*, par exemple, préfèrent la G.B à la proline bétaine et cette dernière à la proline (Csonka et Epstein, 1996). Cette hiérarchie pourrait être liée à la capacité d'accumulation intracellulaire des solutés (Larsen et coll., 1987).

Randall et coll. (1996) ont constaté que plus le nombre de carbone séparant les groupes chargés est grand, moins est le pouvoir osmoprotecteur du soluté. En effet, l'arsénobétaine (analogue de la G.B dont l'atome d'azote est substitué par un atome d'arsenic) et le DMSA sont aussi efficaces que la G.B. Par contre, le DMSP apporte une osmoprotection similaire à celle de la propionobétaine mais moins prononcée que celle de la G.B.

En outre, les bétaines hydroxylées sont significativement moins efficaces que leurs analogues non-hydroxylés, celles renfermant un groupement phényl, bien qu'elles soient

accumulées, n'apportent aucune osmoprotection. Les groupements fonctionnels aromatiques sont connus pour leur effet déstabilisant (Randall et coll., 1996).

II- Le stress osmotique chez les halophytes

1- Généralités:

Les halophytes sont les plantes naturelles des milieux salés (Le Houérou, 1993). Ces derniers, normalement dominés par la présence du chlorure de sodium (Greenway, 1973; Flowers et coll., 1986), peuvent contenir d'autres sels tels les chlorures de magnésium et de potassium, les carbonates de sodium et le sulfate de magnésium. La concentration du sel dans ces milieux est d'au moins 0,1 M et peut atteindre 1 M dans les zones salées maritimes (Flowers et coll, 1986).

Du point de vue écologique, trois catégories d'halophytes peuvent être considérées (Le Houérou, 1993):

- Les hypohalophytes: tolèrent des taux de salinité relativement faibles; de 40 à 100 mM dans la solution du sol.

- Les euhalophytes: peuvent supporter des concentrations salines de l'ordre de 100 à 500 mM. C'est le cas de *Tamarix* spp., *Atriplex* spp. et *Spartina* spp.

- Les hyperhalophytes: croissent à des concentrations salines excédant celle de l'eau de mer, tels *Halocnemum strobilaceum*, *Halopeplis* spp., *Salicornia* spp., *Suaeda* spp., *Parapholis* spp., *Plantago crassifolia* et *Cressa* spp.

Les halophytes peuvent également être classés en "obligatoires" et en "facultatifs" selon qu'ils exigent le sel pour leur croissance ou qu'ils le tolèrent seulement. Les premiers appartiennent aux hyperhalophytes et en partie aux euhalophytes (Le Houérou, 1993).

Il convient de noter que le degré de l'halotolérance semble être influencé par l'âge de la plante (Flowers et coll., 1977; Balsamo et Thomson, 1995), le stade physiologique (Boucaud et Ungar, 1978; Mahmood et Malik, 1986; Balsamo et Thomson, 1995) et les conditions environnementales (Flowers et coll., 1977).

2- Réponses des végétaux à la salinité:

L'effet immédiat d'une augmentation de la salinité chez les plantes supérieures est la déshydratation et la perte de turgescence. Un ajustement osmotique peut, cependant, être réalisé par accumulation des sels absorbés et de substances organiques (Hamza, 1980; Robinson, 1985; Robinson et Jones, 1986). Celui-ci se produit au niveau des organes en expansion tels les racines, les feuilles et les hypocotyles ainsi qu'au niveau des organes de reproduction (Turner et Jones, 1980; Morgan, 1984) permettant le rétablissement total ou partiel de la turgescence (Turner et Jones, 1980). Cette dernière est considérée comme le transmetteur de stress (Turner, 1986) et la force motrice nécessaire à l'expansion cellulaire (Morgan, 1984). La restauration du gradient du potentiel hydrique, à la fin de l'ajustement osmotique, restitue à la plante sa capacité d'absorber l'eau (Hamza, 1980; Kefu et coll., 1991).

2-1- Accumulation des ions inorganiques:

L'accumulation des sels semble être plus favorable à la vie en milieux salés que leur exclusion (Binet, 1978). La sensibilité au sel chez certaines espèces non-halophytes (glycophytes) serait probablement due à une absorption insuffisante de sel (Greenway et Munns, 1980).

Les sels absorbés sont accumulés au niveau des feuilles de façon à maintenir un gradient de potentiel osmotique entre la feuille et le milieu extérieur (Berger, 1978; Binet, 1978; Clipson et coll. 1985; Flowers et coll., 1986; Mahmood et Malik, 1987). Celui-ci est responsable du mouvement de la sève brute (Binet, 1978). L'absorption des ions inorganiques est en effet à l'origine de l'augmentation du poids sec du végétal (50% et exceptionnellement 80% du poids sec) (Flowers et coll., 1977). Une culture dense de *Suaeda fruticosa*, par exemple, peut accumuler environ 2,5 tonnes/héctar/an (Sheikh et Mahmood, 1986). Les espèces halophytes accumulatrices de sel sont en fait proposées pour diminuer le taux de sel dans les sols salés permettant ainsi leur mise en valeur (Kleinkopf et coll., 1975) (In Mahmood et Malik, 1987).

2-2- Compartimentation des ions:

Par analogie avec les résultats obtenus chez les bactéries halophiles, de nombreux auteurs ont pensé que l'halophilie pourrait se traduire chez les plantes supérieures par activation de certaines enzymes à de fortes salinités (Boucaud et Ungar, 1978). Mais à partir de 1972, une

série de travaux a montré que les enzymes des halophytes sont aussi sensibles au sel que celles des plantes peu résistantes (Greenway, 1973; Hamza; 1980). Récemment, Thiyagarajah et coll. (1996) ont constaté que les enzymes cytoplasmiques sont plus sensibles au sel que celles provenant des parois cellulaires aussi bien chez les halophytes que chez les glycophytes (non-halophytes).

Afin d'éviter les effets délétères des sels absorbés sur le métabolisme, une compartimentation de ceux-ci doit donc s'établir au niveau de la cellule (Robinson et Downton, 1985; Solomon et coll, 1994).

Un modèle de régulation osmotique et ionique par les cellules chez les plantes supérieures exposées à une forte salinité a été proposé par Flowers et coll. (1979) et Wyn Jones et coll. (1977) (*In* Jeschke et coll., 1986). Selon ce modèle, la cellule accumule les ions inorganiques, essentiellement Na^+ et Cl^- , dans la vacuole et les solutés compatibles dans le cytoplasme. Un équilibre osmotique est ainsi maintenu entre ces deux compartiments.

2-3- Régulation de la teneur ionique des cellules:

L'accumulation de sel doit être contrôlée afin d'éviter un abaissement excessif du potentiel osmotique. Ceci fait intervenir l'exclusion, l'excrétion (Binet, 1978; Hamza, 1980; Andolfatto et coll., 1994; Popp, 1995) et la dilution (Binet, 1978; Hamza, 1980, Popp, 1995) processus adaptatifs additionnels à la compartimentation.

- L'exclusion: elle peut intervenir au niveau de l'absorption en diminuant l'entrée des ions Na^+ et Cl^- (Binet, 1978; Hamza, 1980).

- L'excrétion: c'est un mécanisme actif de transport contre un gradient de concentration propre aux halophytes (Hamza, 1980). Elle implique les glandes salines et les poils vésiculeux au niveau des feuilles (Greenway et Munns, 1980; Hamza, 1980; Jeschke et coll., 1986).

- La dilution: l'augmentation de la succulence et la forte croissance sont considérées comme mécanismes régulateurs de la concentration de sel par dilution (Flowers et coll., 1977).

Parfois, cependant, aucun de ces mécanismes n'entre en jeu et les sels se concentrent progressivement dans les organes (les feuilles en particulier) ou dans certains tissus (tels ceux entourant les tiges et les racines) qui meurent par la suite en éliminant des quantités importantes de minéraux (Binet, 1978).

2-4- Accumulation des solutés compatibles:

L'accumulation des solutés compatibles n'est pas exclusivement liée aux halophytes et à la salinité (Flowers et coll., 1977; Poljacoff-Mayber et coll., 1987). Elle est observée chez les non-halophytes en réponse au déficit hydrique et au stress thermique (chaleur et froid) (Flowers et coll., 1977).

Les solutés compatibles organiques les plus communs chez les halophytes sont: la proline, les ammoniums quaternaires (Thomas et coll., 1992; Popp, 1995), les sulfoniums tertiaires (Rhodes et Hanson, 1993), les polyamines (Flores, 1990) et les polyols (Flowers et coll., 1986; Naidu et coll., 1992; Thomas et coll., 1992; Popp, 1995). Un ou plusieurs de ces solutés peuvent être concernés simultanément.

En plus des solutés compatibles organiques, des ions inorganiques, tels le potassium (Morgan, 1984) et le magnésium (McNulty, 1985) peuvent jouer un rôle important dans l'osmorégulation chez les plantes.

2-4-1- La proline:

Elle est accumulée chez les plantes supérieures en réponse à différents stress environnementaux (Chrominski et coll., 1988; Batanouny, 1993) bien qu'elle soit spécifiquement liée au stress hydrique (Parameshwara et coll., 1988). Des taux élevés de cet iminoacide ont été détectés chez les halophytes en réponse au stress salin (Binet, 1978; Chrominski et coll., 1988; Parameshwara, 1988; Garcia-Rios et coll., 1994), au froid (Parameshwara et coll., 1988) et au déficits nutritionnel (Greenway et Munns, 1980) et hydrique (Garcia-Rios et coll., 1994). Chez *Mesembryanthemum crystallinum*, par exemple, le NaCl entraîne une augmentation de la concentration de la proline de 5 à 50 % de la totalité des acides aminés (Bohnert et coll., 1994).

La proline est surtout accumulée chez les espèces végétales sensibles au sel que les halotolérantes. Elle n'atteint des concentrations importantes ($>2 \mu\text{moles/g M.F.}$) que si la croissance est sévèrement réduite (Greenway et Munns, 1980; Jones et coll., 1980). Cette molécule stabilise le métabolisme et permet une croissance lente mais continue chez les halophytes et les glycophytes adaptés au sel (Thomas et coll., 1992). Son rôle adaptatif est plutôt lié à la survie qu'au maintien de la croissance (Greenway et Munns, 1980).

Chez certaines espèces où la proline n'est pas en corrélation avec la concentration en sel dans le milieu extérieur, la glycine bétaine, la choline ou autres ammoniums quaternaires sont accumulés (Flowers et coll., 1977).

2-4-2- Ammoniums quaternaires:

La **glycine bétaine (G.B.)** est l'ammonium quaternaire le plus répandu chez les plantes supérieures (Speed et Richardson, 1968; Anthoni et coll., 1991), son accumulation est essentiellement liée à la salinité (Parameshwara et coll., 1988). Elle est retrouvée en réponse à d'autres types de stress comme le stress hydrique, le froid (Parameshwara et coll., 1988; Rhodes et Hanson, 1993) et la chaleur (Rhodes et Hanson, 1993). Le blé et l'orge (Grieve et Maas, 1984) l'accumulent en réponse à la salinité et à la sécheresse.

La G.B est synthétisée par oxydation de la choline (Robinson et Jones, 1986; Parameshwara et coll., 1988; Shrestha et Bisset, 1991) au niveau des chloroplastes (Robinson et Jones, 1986). La capacité de biosynthèse et d'accumulation de la G.B. peut être très importante en taxonomie chez certaines familles comme celle des *Gramineae*. Elle est, par contre, universellement rencontrée chez les *Chenopodiaceae* où elle constitue un caractère chimique consistant (Grieve et Maas, 1984).

D'autres ammoniums quaternaires, tels la **proline bétaine**, l'**hydroxyproline bétaine**, la **β -alanine bétaine** et la **choline-O-sulfate**, sont impliqués chez les plantes supérieures comme solutés compatibles (Rhodes et Hanson, 1993). Par contre, la **trigonelline**, quoique très répandue et accumulée à des taux importants (Tramontano et coll., 1986), a un rôle d'osmolyte compatible incertain (Rhodes et Hanson, 1993) et sa concentration n'est pas en corrélation avec le stress osmotique (Anthoni et coll., 1991). Elle est plutôt considérée comme hormone végétale particulièrement chez les légumineuses (Evans et Tramontano, 1984).

2-4-3- Sulfoniums tertiaires:

Le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) joue un rôle important dans l'ajustement osmotique chez les algues marines (Blunden et coll., 1982; Sciuto et coll., 1989; Colmer et coll., 1996) et les algues d'eau douce (Larher et coll., 1977). Un rôle similaire est suggéré pour le DMSP chez certaines plantes vasculaires (Colmer et coll., 1996) comme *Spartina* et *Wedelia* (Rhodes et Hanson, 1993). Cependant, Colmer et coll. (1996) ont constaté que le taux du DMSP

ne change pas avec la salinité du milieu chez *Spartina alterniflora*. Il fonctionnerait comme osmolyte constitutif contribuant à l'osmolarité du cytoplasme puisqu'il est constamment présent à des concentrations relativement élevées.

Le DMSP constitue une alternative à la G.B dans les milieux salés carencés en azote (Rhodes et Hanson, 1993).

2-4-4- Polyamines:

Les polyamines et particulièrement les diamines sont accumulées en réponse au déficit nutritionnel et aux stress acide et osmotique (Flores, 1990).

L'accumulation de la putrescine (diamine) en cas de stress osmotique résulte de l'induction de sa biosynthèse (Tiburcio et coll., 1986; Flores et coll., 1989; Flores, 1990) ainsi que de l'inhibition de sa transformation en spermidine (Tiburcio et coll., 1986). Toutefois, l'augmentation de la concentration de la putrescine peut avoir un effet délétère sur la cellule végétale (Tiburcio et coll., 1986; Flores et coll., 1989; Flores, 1990) et serait un symptôme de toxicité plutôt qu'une réponse protectrice (Flores, 1990).

2-4-5 Polyols:

Les sucres solubles contribuent à l'ajustement osmotique chez plusieurs espèces de plantes (Morgan, 1984) et de champignons et chez de nombreuses algues marines (Flowers et coll., 1977) et algues d'eau douce (Flowers et coll., 1977; Greenway et coll., 1982).

Le saccharose, le sucre le plus commun chez les plantes, est impliqué dans l'ajustement osmotique (Spyropoulos, 1986). Sa concentration peut atteindre 500 mM sans que l'activité enzymatique ne soit affectée (Greenway et Munns, 1980).

Les polyalcools dérivés des sucres sont très répandus chez les organismes vivants sous stress osmotique (Vernon et coll., 1993). Les polyols aliphatiques (mannitol et sorbitol) ainsi que les polyols cycliques (pinitol) s'accumulent à des taux élevés chez les bactéries, les champignons, les algues (Vernon et Bohnert, 1992) et les plantes supérieures (Vernon et Bohnert, 1992; Popp, 1995) en réponse à la dessiccation (Vernon et Bohnert, 1992) et au stress salin (Vernon et Bohnert, 1992; Popp, 1995). Ils stabilisent les membranes et les macromolécules en présence de fortes concentrations ioniques (Vernon et coll., 1993).

III- Le stress osmotique chez *Rhizobium*

Les *Rhizobiaceae* sont connus pour leur interaction symbiotique avec les légumineuses en formant des nodules sur les racines et parfois sur les tiges. Dans les nodules, les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de réduire l'azote moléculaire en ammonium. L'azote fixé par le microorganisme est fourni à la plante et lui permet de croître sans apport exogène d'autres sources azotés (engrais) d'où l'importance économique de ces bactéries.

Différents stress environnementaux dont la salinité affectent considérablement la viabilité de *Rhizobium* dans le sol, la nodulation (Le Rudulier et Bernard, 1986) et la fixation symbiotique de l'azote (Tu, 1981; Yap et Lim, 1983; Douka et coll., 1984). Un stress salin de l'ordre de 50 à 200 mM NaCl provoque chez les légumineuses une diminution significative de la productivité due aux effets délétères du sel sur la plante-hôte, la bactérie et le développement de la symbiose (Fougère et coll., 1991).

L'osmolarité au niveau de la rhizosphère peut également augmenter suite à l'exclusion des solutés lors de l'absorption de l'eau par la plante et aux activités des racines et des rhizobactéries (Miller et Wood, 1996). En outre, dans la majorité des terres irriguées, les solutés hydrosolubles tendent à s'accumuler au niveau de la rhizosphère (Tu, 1981). Dans ces cas, la flore bactérienne est inhibée.

La survie et la croissance des rhizobactéries ainsi que leurs interactions avec les plantes-hôtes dépendent des mécanismes d'osmorégulation adoptés par les bactéries. Ainsi, les souches halotolérantes de *Rhizobium* sont très utiles pour maximiser le potentiel de fixation de l'azote dans les sols salés et dans les régions arides et semi-arides (Al-Rachidi et coll., 1982); l'halotolérance chez ces bactéries est liée à la résistance à la dessiccation (Hua et coll., 1982).

Parmi les *Rhizobiaceae*, *Rhizobium meliloti*, microsymbiont de *Medicago sativa* (fourrage très important à l'échelle mondiale), est le plus halotolérant (Tu, 1981; Hua et coll., 1982) et le plus étudié quant à ses mécanismes d'osmoadaptation.

1- Accumulation du potassium et des solutés compatibles endogènes:

1-1- Le potassium:

L'analyse des teneurs intracellulaires des ions K^+ chez plusieurs souches de *Rhizobium* en réponse à différentes concentrations de NaCl a montré que l'accumulation de K^+ est un mécanisme qui accroît la tolérance au sel (Le Rudulier et Bernard, 1986). Ce cation semble jouer, comme chez les entérobactéries, le rôle d'un signal secondaire pour toute réponse osmorégulatrice ultérieure (Miller et Wood, 1996).

1-2- Le glutamate:

L'accumulation du glutamate observée chez différentes souches de *Rhizobium* en réponse au stress salin (Le Rudulier et Bernard, 1986; Botsford et Lewis, 1990) se produit parallèlement à celle des ions K^+ (Le Rudulier et Bernard, 1986). Chez *Rhizobium* sp W1001, la concentration du glutamate libre augmente de façon concomitante avec la salinité du milieu et peut constituer jusqu'à 80% de la totalité des acides aminés à 500 mM NaCl en milieu minimum (Hua et coll., 82). Yap et Lim (1983) ont également rapporté que *Rhizobium* sp UMKL 20 augmente sa concentration intercellulaire en glutamate de 22,8 à 596 mM/mg de poids sec en présence de 0,2 M NaCl.

L'accumulation du glutamate en réponse au stress osmotique résulterait de la dégradation d'autres acides aminés et la transamination de l' α -2-cétoglutarate. L'addition d'isoleucine, de glutamine, de proline ou d'arginine stimule l'accumulation du glutamate chez des mutants de *Rhizobium meliloti* déficients en glutamate synthase. Lorsque l'osmolarité du milieu chute, le glutamate endogène est utilisé par la cellule comme source d'azote et de carbone (Botsford et Lewis, 1990).

L'inhibition de la croissance de *Rhizobium* en milieu hypertonique n'est pas levée par le glutamate exogène (Botsford, 1984)

1-3- Le tréhalose:

Le tréhalose, l'osmolyte le moins abondant chez *Rhizobium meliloti*, atteint des teneurs importantes à osmolarité élevée (Smith et coll., 1994 a). Il est le premier soluté compatible dont la teneur intracellulaire augmente suite à un stress osmotique sévère (Smith et coll., 1994 b). Le tréhalose est biosynthétisé chez *Rhizobium* et peut être aussi transporté à partir du milieu

extérieur à osmolarité élevée (Smith et coll., 1994 b). El-Sheikh et Wood (1990) ont montré que le tréhalose exogène stimule légèrement la croissance chez *Bradyrhizobium* à des concentrations inhibitrices de NaCl. C'est le seul osmolyte compatible accumulé par synthèse endogène et par transport (Smith et coll., 1994 b).

1-4- Le N-acetylglutaminylglutamine:

Smith et Smith (1989) ont mis en évidence la présence de l'amide N-acetylglutaminylglutamine (NAGGN) en condition de stress osmotique chez des souches de *Rhizobium meliloti*. Ce fût le premier exemple d'un peptide ayant un rôle dans l'osmorégulation. Le NAGGN est accumulé à des concentrations plus élevées que celles du tréhalose chez *Rhizobium meliloti* (Smith et coll. 1994 b) et devient l'osmolyte majeur à un stress osmotique sévère (> 0,5 M NaCl). Cependant, son rôle de soluté compatible n'a pas été observé chez d'autres espèces de *Rhizobium* telles *R. fredii* et *R. leguminosarum* (Miller et Wood, 1996).

2- Réponse de *Rhizobium* aux osmoprotecteurs exogènes:

2-1- L'ectoïne:

L'ectoïne stimule la croissance de plusieurs espèces de *Rhizobium* à de fortes osmolarités. Elle est aussi efficace que la G.B chez *Rhizobium meliloti*. La stimulation de la croissance des souches insensibles à la G.B a été également observée. En outre, le transport de l'ectoïne n'est pas affecté par la présence de la G.B; les systèmes de transport des deux molécules sont distincts (Talibart et coll. 1994).

Bien que l'ectoïne agisse comme osmoprotecteur chez différentes souches de *Rhizobium*, elle n'est curieusement pas accumulée dans les cellules. Le mécanisme osmoprotecteur de l'ectoïne n'est pas clair. Cette molécule jouerait le rôle d'activateur des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des solutés compatibles endogènes, ou bien, son effet osmoprotecteur serait similaire à celui de la choline (précurseur de la G.B) (Talibart et coll., 1994). La synthèse des solutés compatibles endogènes (glutamate, tréhalose et NAGGN) n'est pas réprimée par l'absorption de cette molécule (Talibart et coll., 1994)

2-2- Les bétaines:

La **glycine bétaine** est un osmoprotecteur très efficace chez certaines souches de *Rhizobium meliloti* (Sauvage et coll., 1983; Bernard et coll., 1986; Le Rudulier et coll., 1991) et *Rhizobium sp (Hedysarum)* (Bernard et coll., 1986). Elle est cependant sans effet chez d'autres espèces de *Rhizobium* telles *R. leguminosarum*, *R. fredii* et *R. japonicum* (Bernard et coll., 1986). Celle-ci sont incapables de l'absorber (Le Rudulier et coll., 1983).

Comme chez *E. coli* et *S. typhimurium*, le transport de la G.B est, fortement stimulé par l'osmolarité du milieu (Le Rudulier et coll., 1991). Lorsque cette dernière chute, la G.B. est rapidement catabolisée (Bernard et coll., 1986). Cette molécule est dégradée par déméthylation chez *R. meliloti* et peut alors servir comme seule source d'azote et de carbone (Smith et coll. 1988). L'utilisation de la G.B. comme osmoprotecteur ou comme source d'azote et de carbone est donc régulée par l'osmolarité du milieu.

La **proline bétaine** est très efficace comme osmoprotecteur chez *Rhizobium meliloti* (Sauvage et coll., 1983). Elle est cependant sans effet en présence de G.B. (Miller et Wood, 1996). A faibles osmolarités, cette molécule peut être utilisée par la bactérie comme source de carbone et d'azote (Le Rudulier et coll., 1983).

La **γ -butyrobétaine**, la **carnitine**, la **β -homobétaine**, l'**homostachydrine** (Sauvage et coll., 1983) et la **pipécolate bétaine** (Bernard et coll., 1986) protègent également *R. meliloti* contre le stress salin. Par contre l'**homosérine** et la **trigonelline** montrent une faible stimulation de la croissance à osmolarité inhibitrice (Bernard et coll., 1986). D'autre part la trigonelline peut servir comme seule source d'azote et de carbone pour *Rhizobium* et pour différentes bactéries du sol connues pour leurs interactions avec les plantes (Goldmann et coll., 1991).

Il convient de noter que l'accroissement de l'osmotolérance par addition de bétaines a été obtenu chez plusieurs souches de *R. meliloti*, il n'est néanmoins pas possible de généraliser ces résultats à l'ensemble des *Rhizobium*, ceci est sans doute la conséquence de différences structurales importantes au niveau des membranes, en particulier l'absence de(s) perméase(s) spécifique(s) (Le Rudulier et coll., 1983).

2-3- La choline:

Il est bien établi que la choline a un effet osmoprotecteur chez *R. meliloti* (Bernard et coll., 1986; Le Rudulier et Pocard, 1991). Elle est transportée par trois différents systèmes: deux systèmes constitutifs à faible et à grande affinité et un troisième à grande affinité induit par la choline (Pocard et coll., 1989).

La choline est rapidement convertie par oxydation en G.B à faible et à forte osmolarité (Bernard et coll., 1986; Botsford et Lewis, 1990; Le Rudulier et Pocard, 1991). La G.B est accumulée à osmolarité élevée suite à la diminution de l'activité des enzymes impliquées dans sa dégradation (Smith et coll., 1988) (Figure B).

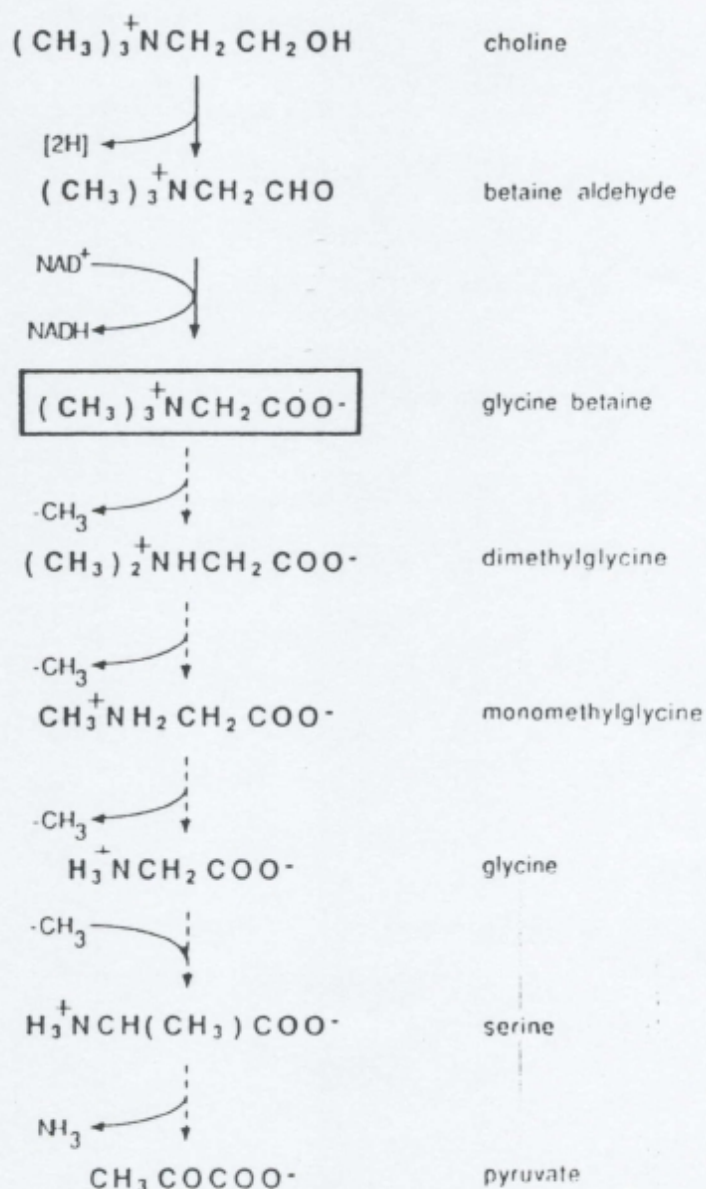


Fig. B : Voie métabolique de la choline proposée chez *R. meliloti* (Smith et coll., 1988).

3- Effet du stress osmotique sur l'interaction *Rhizobium*-plantes:

Le stress osmotique affecte considérablement la viabilité des microorganismes dans le sol (Polonenko et coll., 1986; Ragab, 1993) ainsi que l'interaction des rhizobactéries avec leurs plantes-hôtes (Miller et Wood, 1996). Le développement de la symbiose entre *Rhizobium* et les légumineuses dépend donc, en partie, de la capacité de la bactérie de s'adapter avec l'osmolarité de son milieu aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur de l'hôte.

Au niveau de la rhizosphère, les exsudats des racines (source riche en carbone et azote) favorisent la synthèse endogène des solutés compatibles chez les rhizobactéries (Miller et Wood., 1996) comme ils peuvent constituer une source importante d'osmoprotecteurs. C'est le cas, par exemple, de la proline bétaine dans les exsudats des graines de la luzerne (Philips et coll., 1992) et la trigonelline dans ceux des racines des légumineuses (Goldmann et coll., 1991). Le taux de cette exsudation augmente chez les racines osmotiquement stressées (Polonenko et coll. 1986).

Au sein de la plante hôte soumise au stress salin, les bactéroïdes de *R. meliloti* accumulent la proline bien que sa concentration ne semble pas contribuer substantiellement à la pression osmotique intracellulaire (Fougère et coll., 1991). Cet iminoacide exerçant une fonction anti-stress chez de nombreuses bactéries est sans effet chez différentes espèces de *Rhizobium* libres cultivées à de fortes osmolarités (Le Rudulier et coll. 1983; Bernard et coll., 1986).

Le tréhalose a un rôle d'osmolyte compatible incertain chez les bactéroïdes de *Rhizobium meliloti* (Fougère et coll., 1991) bien que sa biosynthèse soit considérée comme stratégie osmoadaptative chez les bactéroïdes des *Rhizobiaceae* (Mellor, 1992) (In Miller et Wood, 1996). Chez ce microorganisme, c'est plutôt le lactate qui devient l'acide organique prédominant et contribue partiellement à l'ajustement osmotique des bactéroïdes.

Les mécanismes d'osmorégulation chez *Rhizobium* impliquent également la relation symbiotique avec la plante-hôte. *Medicago sativa*, par exemple, accumule simultanément la glycine bétaine, la choline, la stachydrine (la proline bétaine), l'homostachydrine et la trigonelline (Parameshwara et coll., 1988). Ces molécules sont absorbées par les bactéroïdes (Fougère et Le Rudulier, 1990) et leur apportent osmoprotection.

Il est intéressant de noter que certaines légumineuses sont capables d'absorber la G.B. par leur systèmes radicalaires et montrent par la suite une osmotolérance remarquable (Sauvage et coll., 1983). De même, l'activité fixatrice d'azote de jeunes plantes de *Medicago sativa* osmotiquement stressées est partiellement restaurée par l'addition de la G.B ou la proline-bétaine dans le milieu de culture (Pocard et coll., 1984).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I- Halophytes et osmoprotecteurs:

1- Espèces végétales:

Les halophytes ont été prélevés de différentes ceintures de végétation autour de 5 sebkhas de la région de Sétif (durant la période mai-juin) (Tab. 1). La végétation constitue des ceintures épacentriques autour d'une zone centrale hypersalée (la sebkha proprement dite) dépourvue de plantes. La salinité au niveau de la 1^{ère} ceinture est considérée très élevée, elle est de moins en moins importante en allant vers l'extérieur.

Les espèces retenues comptent parmi les plus rencontrées dans ces zones.

Espèce	Famille	Site de prélèvement (sebkhas I à V)	Ceinture de végétation
1- <i>Atriplex glauca</i> (a)	<i>Chenopodiaceae</i>	(I)	1 ^{ère}
" (b)	"	(II)	3 ^{ème}
2- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	"	(III)	1 ^{ère}
3- <i>Salicornia arabicum</i>	"	(III)	1 ^{ère}
4- <i>Suaeda mollis</i>	"	(III)	1 ^{ère}
5- <i>Chenopodium</i> sp.	"	(III)	1 ^{ère}
6- <i>Salsola vermiculata</i>	"	(III)	2 ^{ème}
7- <i>Oryzopsis miliacea</i>	<i>Gramineae</i>	(II)	1 ^{ère}
8- <i>Parapholis incurva</i>	"	(III)	1 ^{ère}
9- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	"	(I)	1 ^{ère}
" (b)	"	(I)	2 ^{ème}
10- <i>Plantago coronopus</i> (a)	<i>Plantaginaceae</i>	(II)	2 ^{ème}
" (b)	"	(IV)	2 ^{ème}
11- <i>Cressa cretica</i>	<i>Convolvulaceae</i>	(IV)	1 ^{ère}
12- <i>Limonium delicatulum</i>	<i>Plumbaginaceae</i>	(V)	1 ^{ère}
13- <i>Spergularia marginata</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	(II)	1 ^{ère}
14- <i>Polygonum balansae</i>	<i>Polygonaceae</i>	(II)	1 ^{ère}
15- <i>Frankenia leavis</i>	<i>Frankeniaceae</i>	(II)	1 ^{ère}
16- <i>Aizoon hispanicum</i>	<i>Aizoaceae</i>	(III)	1 ^{ère}

Tab. 1: Espèces halophytes prélevées des sebkhas: Hammam El Soukhna (I), Melloul (II), El Hemiet (III), El Bazer (IV) et Baidha Bordj (V) de la région de Sétif

2- Composés Dragendorff-positifs:

Nous tenterons, dans un premier temps de détecter les molécules osmotectrices (présence ou absence) chez les espèces halophytes prélevées. Dans un second temps, il s'agira pour nous de mettre au point une méthodologie de purification des substances Dragendorff-positives principalement accumulées et de les obtenir en quantités considérables en vue de les identifier.

2-1- Détection:

2-1-1 Extraction:

L'extraction des composés -oniums est effectuée par l'éthanol 70° (degré Gay-Lussac) (Sciuto et coll., 1989; Ghoul et coll., 1995). D'autres auteurs proposent le système méthanol-chloroforme-eau (12:5:3) (Robinson et Jones, 1986; Jones et coll. 1986; Poljakoff-Mayber et coll., 1987) ou l'eau (Grieve et Grattan, 1983).

Avant de procéder à l'extraction, la chlorophylle est éliminée par l'acétone. C'est un solvant qui épargne les bétaines et la proline. Pour ceci, 10 g de plante bien séchée et finement broyée sont additionnés de 100 ml d'acétone, vigoureusement agités puis filtrés sur préfiltre (absorbent pad) Millipore.

Le matériel végétal est ensuite récupéré dans 200 ml d'éthanol 70°. Après agitation vigoureuse pendant 30 mn, les résidus solides sont éliminés par filtration. L'extrait hydroalcoolique obtenu est évaporé à sec, sous vide, à 45°C puis récupéré dans 10 ml d'eau distillée. Cet extrait servira à la mise en évidence des composés -oniums (composés Dragendorff-positifs) et de la proline.

2-1-2- Chromatographie sur couche mince:

Des plaques de gel de silice (Merck) (20x20 cm) prêtes à l'emploi (épaisseur 0,2 mm) sont utilisées pour la séparation des composés -oniums dans les systèmes de développement:

I-) isopropanol-eau (3: 1),

II-) méthanol- NH₄OH (3: 1) (Hutkins et coll., 1987) et

III-) chloroforme-méthanol-eau (6: 3: 1) (Parameshwara et coll., 1988).

Une solution standard de G.B (100 mM) et les extraits hydroalcooliques d'halophytes sont déposés sous des volumes respectifs de 5 µl et 50 µl sur plaques de gel de silice préalablement

activées (30 mn/110°C). La migration est réalisée sur un parcours de 15 cm. Elle est effectuée une fois pour les systèmes (I) et (II) alors qu'elle est répétée une deuxième fois pour le système (III) après séchage intermédiaire.

Les plaques sont révélées par pulvérisation du réactif de Dragendorff (Annexe 8) suivie d'un séchage doux (sèche-cheveux). Les bétaines donnent des colorations jaune-orangé caractéristiques.

2-1-3- Electrophorèse en haute tension:

Les composés -oniums sont des molécules chargées et peuvent donc être séparés dans un champ électrique par électrophorèse.

L'électrophorèse en haute tension (EHT) (40 V/cm) a concerné les seules plantes accumulatrices de substances Dragendorff-positives. Elle est réalisée sur papier Whatman 3MM imprégné d'une solution d'acide formique 0,75 N (pH 2,0). A ce pH, les composés -oniums portent des charges positives nettes et migrent vers la cathode (Perroud et Le Rudulier, 1985).

Des solutions standards de choline (25 mg/ml) et de G.B (100 mM) (Sigma) ou accessoirement d'autres molécules osmoprotectrices serviront comme témoins de migration. Le volume du dépôt est de 5 µl pour les témoins et de 50 µl pour les échantillons. La migration est réalisée à 4°C pendant 2 h.

Après séchage dans une étuve à circulation d'air (80°C), les électrophorégrammes sont révélés au réactif de Dragendorff. Contrairement aux bétaines, la choline donne une coloration pourpre et migre loin.

2-2- Purification:

2-2-1- Préparation des extraits:

Les extraits sont préparés à partir de 25 g de poudre de plante additionnés de 250 ml d'éthanol 70°. Après agitation (1 h) et filtration, l'extrait est évaporé à sec, sous vide, à 45°C puis récupéré dans 5ml d'eau distillée. 2 ml de cet extrait seront utilisés pour la purification des composés Dragendorff-positif. Le volume restant (3 ml) est lyophilisé. Il servira ultérieurement à l'étude de l'halotolérance bactérienne.

2-2-2- Chromatographie sur couche mince:

Lors de la mise au point de la méthodologie, le passage préliminaire sur gel de silice (CCM) de l'extrait destiné à la chromatographie échangeuse d'ions s'est avéré utile car améliore la rétention des composés -oniums par la résine.

L'extrait hydroalcoolique est additionné de 15 ml de chloroforme et vigoureusement agité afin d'éliminer la chlorophylle et d'autres substances indésirables telles les lipides (Tramontano et coll., 1986). Ce mélange est laissé à décanter pendant une nuit à 4°C.

La phase supérieure aqueuse est ensuite récupérée et déposée en bande sur plaque de gel de silice (épaisseur 2 mm). La migration est effectuée dans le système isopropanol-eau (3: 1) sur un parcours de 15 cm. Ce système est efficace pour la séparation des pigments.

La révélation au réactif de Dragendorff est effectuée uniquement sur quelques centimètres du côté de la plaque. Une bande exempte de réactif est alors récupérée par grattage au niveau de la substance Dragendorff-positive et éluée dans 40 ml d'eau. Après agitation et centrifugation, le surnageant est récupéré. Il servira à la chromatographie échangeuse d'ions.

2-2-3- Chromatographie échangeuse d'ions:

Les composés -oniums sont positivement chargés et peuvent donc être séparés sur résine échangeuse de cations (Jones et coll., 1986; Paprameshwara et coll., 1988; Sciuto et coll., 1989).

Une colonne de résine échangeuse de cations Dowex 50W X 2 (Sigma) (1,2 x 16 cm) est activée (rendue sous forme H⁺) par le passage alterné de solutions de HCl et NaOH comme suit:

-HCl 2 N (20 ml)

-H₂O (100 ml)

-NaOH 2 N (20 ml)

-H₂O (100 ml)

- HCl 2 N (20ml)

Cette opération est effectuée à deux reprises. Finalement, la résine est bien lavée avec l'eau jusqu'à ce que l'eau récupérée à la sortie de la colonne ne donne plus de précipité blanchâtre en ajoutant quelque gouttes de AgNO₃ 21%. La résine ainsi activée est conservée dans l'eau jusqu'à usage.

L'éluat obtenu après CCM est ajusté à pH 6,5-7. Selon Jones et coll. (1986), le pH doit être compris entre 5 et 7 (une valeur de pH inférieure à 5 affectera l'échange des ions). Cette solution est percolée à faible débit (1ml/ mn) à travers la colonne de résine activée.

Après passage de l'ensemble du volume de l'éluat, les molécules neutres et anioniques sont éliminées par lavage à l'eau (150 ml). Quant aux cations, ils sont élués par une solution de HCl 3 N (60 ml) (Parameshwara et coll., 1988)- l'éluat par NH₄OH est à éviter car certains composés -oniums sont labiles dans les conditions alcalines (Rhodes et Hanson, 1993)- l'éluat est ensuite évaporé à sec, sous vide, à 50°C (Parameshwara et coll., 1988) puis repris dans 0,5 ml d'eau distillée. Cette solution subira les étapes ultérieures de la purification.

2-2-4- Chromatographie sur papier:

Elle constitue une étape nécessaire dans la purification des composés -oniums. Les acides aminés interférant avec les bétaines sont partiellement éliminés dans un mélange de solvant: phénol 80%-éthanol 95° (1: 1). Les bétaines migrent au front alors que les acides aminés occupent la partie médiane. Ce système est également très efficace pour le dessalage. En effet, le sel, se trouvant à des concentration importante dans les échantillons, ne migre pas.

La chromatographie descendante est réalisée sur papier filtre. Les cations récupérés après la chromatographie échangeuse d'ions (0,5 ml) sont soigneusement déposés en bande.

Après migration (parcours de 25 cm), le papier est laissé à sécher sous ventilation pendant 3 h afin d'éliminer le phénol. La révélation à la ninhydrine (Sigma) puis au réactif de Dragendorff est effectuée sur une bande latérale de 2 cm préalablement découpée pour ne pas exposer la substance destinée à l'identification à une température élevée risquant de l'altérer (lors de la révélation des acides aminés). La partie du chromatogramme correspondant au niveau de la substance Dragendorff-positive et alors découpée et éluée dans l'éthanol 70°. Après évaporation à sec, l'extrait est dissous dans un faible volume d'eau et servira à la chromatographie sur couche mince.

2-2-5- Chromatographie sur couche mince :

C'est l'étape ultime de la purification des composés -oniums, elle sert à éliminer les traces résiduelles d'acides aminés et de pigments.

Les composés -oniums séparés par chromatographie sur papier sont passés en chromatographie sur couche mince de gel de silice (épaisseur 0,2 mm) dans le système isopropanol-eau (3: 1). Après révélation à la ninhydrine puis au réactif de Dragendorff, la bande correspondant à la substance Dragendorff-positive est scindée en deux parties:

- inférieure non contaminée et considérée comme pure, elle sera complètement identifiée par méthodes spectroscopiques .

- supérieure renfermant des traces visibles d'acides aminés, elle subira l'EHT et la CCM.

Les deux sont séparément éluées dans l'eau et lyophilisées.

N.B: les 2 substances accumulées chez *L. delicatulum* ont été purifiées uniquement par plusieurs CCM successives sur gel de silice dans le système isopropanol-eau (3:1) après élimination de la chlorophylle par le chloroforme. L'extrait de cette plante forme un film étanche sur la couche de gel de silice. Ceci rend impossible le dépôt d'un volume important et l'obtention de ces substances en quantités considérables nécessaires aux autres étapes de la purification (chromatographie échangeuses d'ions et chromatographie sur papier) •

2-3- Identification:

2-3-1- Chromatographie sur couche mince:

Plusieurs auteurs (Hori et coll., 1979; Muller et coll., 1981; Blunden et coll., 1981; Hutkins et coll., 1987; Parameshwara et coll., 1988) ont utilisé la chromatographie sur couche mince dans l'identification des bétaines.

La CCM est réalisée sur plaques de gel de silice (Merck) (épaisseur 0,2 mm). La formation de traînées est évitée en plongeant préalablement les plaques dans un tampon phosphate (0,2 M, pH 7) dilué à 50% dans l'eau. Les plaques sont ensuite séchées et activées. Le développement est effectué dans les systèmes:

I-) isopropanol-eau (3: 1)

II-) méthanol-NH₄OH (3: 1)

III-) chloroforme-méthanol-eau (6: 3: 1).

La migration est réalisée sur un parcours de 15 cm. Elle est effectuée une fois pour les systèmes (I) et (II) alors qu'elle est répétée une deuxième fois pour le système (III) après séchage intermédiaire.

Les lyophilisats des substances Dragendorff-positives purifiées sont dissous dans l'eau (100 μ l) et déposés sous un volume de 50 μ l. Des solutions standards de G.B, trigonelline, carnitine (Sigma), γ -butyrobétaine (Aldrich) et DMSP (100 mM) (synthétisé selon Chambers et coll., [1987] par le Laboratoire de Chimie Organique, Université de Rennes I, France) (Annexe 9) sont utilisés comme témoins de migration (5 μ l).

Après migration (15 cm), les plaques sont séchées puis révélées au réactif de Dragendorff. Les rapports frontaux (R_f = distance de migration de la substance/distance de migration du solvant) sont calculés pour chaque substance.

Les R_f sont très importants dans l'identification d'une substance préalablement purifiée. L'identification est presque acquise si pour les différents systèmes employés, le R_f d'une substance correspond à celui d'un standard donné.

2-3-2- Electrophorèse en haute tension:

Elle est réalisée comme précédemment décrit (paragraphe 2-1-3). Les échantillons et les standards sont préparés et déposés comme en chromatographie sur couche mince.

Après migration (2 h), les électrophorégrammes sont séchés et révélés au réactif de Dragendorff. Les R_c (distance de migration de la substance/distance de migration de la choline) sont calculés pour chaque substance.

Les R_c ont un intérêt certain dans l'identification d'une substance préalablement purifiée.

2-3-3- Méthodes spectroscopiques:

L'étape ultime dans l'identification des molécules Dragendorff-positives purifiées à partir d'halophytes consiste en l'établissement de leur formule chimique par spectroscopies de résonance magnétique et infra-rouge.

*** Spectrométrie de RMN-¹H:**

- Appareillage: spectromètre Bruker DM X 500

- Conditions expérimentales:

Fréquence: 500,13 MHz

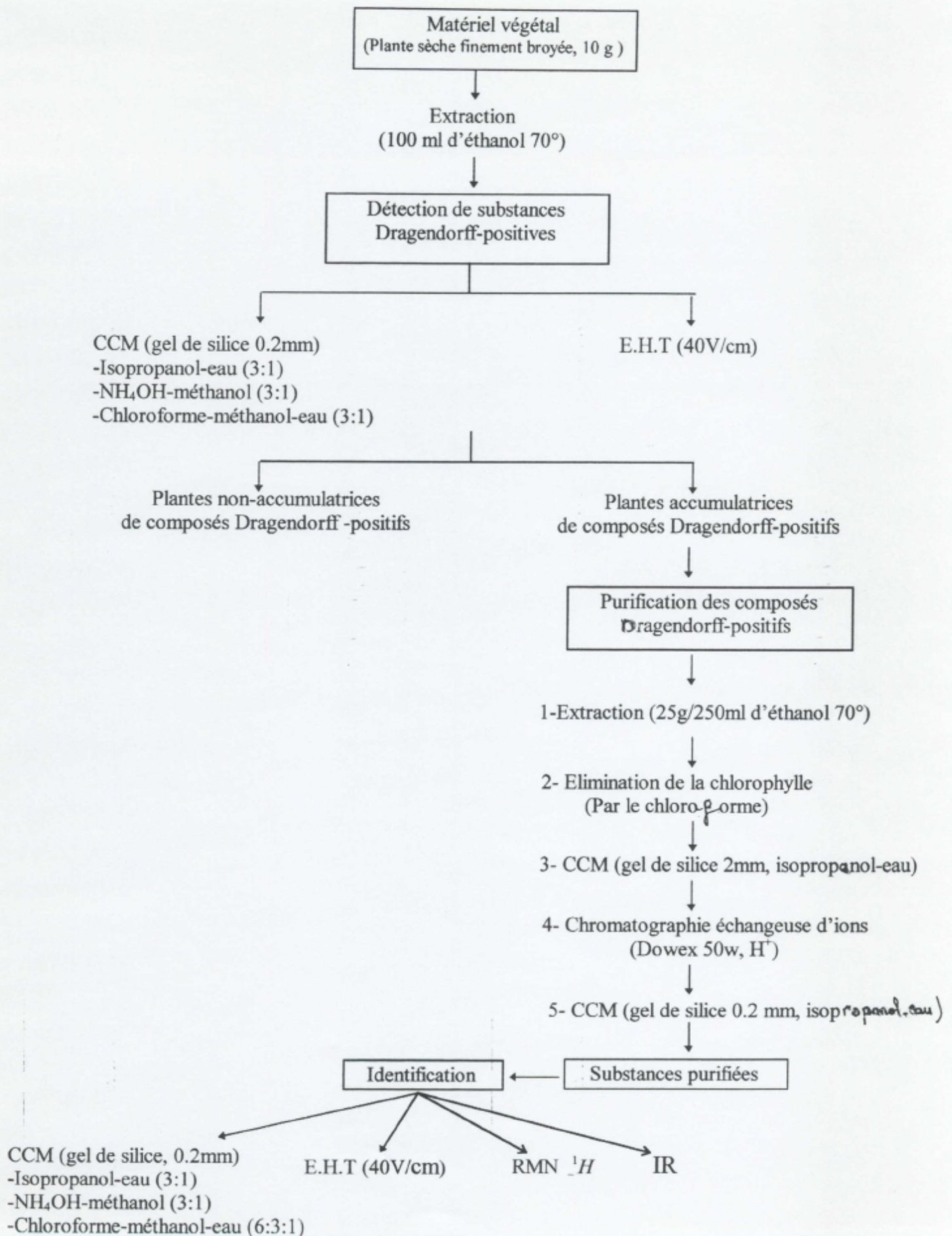


Fig. C: Protocole expérimental de la détection, la purification et l'identification de composés Dragendorff-positifs à partir d'halophytes

Echantillons dissous dans D₂O.

D₂O fournit le signal interne.

Référence interne: sodium 3-(triméthylsilyl)propane sulfonate (DSS).

* Spectroscopie d'IR:

C'est une technique qui exige des substances extrêmement pures. A notre connaissance, elle est utilisée pour la première fois dans l'identification de composés -oniums naturels.

- Appareillage: spectromètre IR-FT 16PC Perkin Elmer.

- Conditions expérimentales: les spectres sont réalisés par réflexion diffuse dans une matrice de KBr contenant 1% de la substance lyophilisée.

L'électrophorèse en haute tension et les spectroscopies ont été réalisées au Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique et au Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Rennes I (France).

3- Cas de la proline:

3- 1-Mise en évidence:

La proline est détectée dans les extraits hydroalcooliques d'halophytes par chromatographie sur couche mince de gel de silice (0,2 mm) dans le système solvant: n-butanol-acide acétique-eau (6: 2: 2, p/p) (Kurt, 1971).

Les échantillons sont déposés sous un volume de 50 µl sur plaques préalablement activées. Un dépôt de 5 µl est effectué pour la solution standard de proline (Merck) (100 mM). Après migration (15 cm), les plaques sont séchées et révélées par pulvérisation de ninhydrine (réactif Sigma) puis chauffage à 110°C jusqu'à développement de la coloration. La proline se distingue des autres acides aminés par sa coloration jaune caractéristique.

3-2- Dosage:

L'extraction de la proline est réalisée dans l'éthanol selon la méthode préconisée par l'A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) modifiée par Nguyen et Paquin (1971). C'est une méthode rapide et rentable.

Le matériel végétal est séché à 80°C pendant 24 h puis finement broyé. 400 mg de cette poudre sont additionnés de 5 ml d'éthanol 95° et vigoureusement agités au Vortex. Après centrifugation, le surnageant est récupéré. Cette opération est répétée trois fois avec l'éthanol 70° (5 ml). 5 ml des surnageants combinés sont ensuite mis dans un tube contenant 2 ml de chloroforme et 3 ml d'eau, agités puis laissés à décanter à 0°C pendant une nuit. Le surnageant aqueux servira au dosage de la proline.

Bien que la ninhydrine ne soit pas un réactif spécifique de la proline, la réaction colorée qu'elle donne avec cet acide aminé en milieu très acide est souvent utilisée pour le dosage (Paquin et le Chasseur, 1979).

5 ml du surnageant précédent sont additionnés de 10 ml d'une solution de NaCl 5 M et 25 ml d'eau. Après homogénéisation, 1 ml de cette solution est mis dans un tube contenant 1 ml d'un tampon phosphate (H_3PO_4 5,2 M + NaH_2PO_4 3,8 M) et 2 ml d'une solution de ninhydrine à 3% préparée dans l'éthanol absolu. Les tubes sont ensuite homogénéisés et incubés au bain-marie bouillant pendant 1 h 40 mn pour le développement de la coloration. Le produit rouge formé est indéfiniment stable à l'obscurité (Elliot et Gardner, 1976). Une gamme étalon de 100 à 450 µg/ml de proline (Merck) est réalisée à partir d'une solution-mère à 0,125% préparée dans du HCl 0,3 N. Les différentes dilutions se font dans l'acide acétique glacial.

La lecture est effectuée au spectrophotomètre (Pharmacia LKB) à 512 nm dans les 15 mn qui suivent la dilution.

II- Effet d'extraits d'halophytes sur l'halotolérance bactérienne:

1- Souches bactériennes:

Les souches de *Rhizobium meliloti* U45 et SU47, de *Rhizobium* sp (*Hedysarum*) CC1335 et CC1337 et de *Rhizobium meliloti* 102F34 ont été aimablement fournies par les professeurs J. Brockwell (CSIRO Plant Industry, Canberra, Australia) et T. Bernard (Laboratoire de Génétique et Physiologie Microbiennes, Université de Rennes I, France). Des souches locales de *Rhizobium meliloti* (6 souches) ont été isolées et identifiées par M^{elle} N. Baha (Laboratoire de Biologie des Sols, USTHB d'Alger).

Parallèlement, des souches de *Pseudomonas* (4souches) et de *Escherichia coli* (4 souches) isolées d'eau de mer (Béjaïa) et d'eau douce (Oued Boussellem, Sétif) au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (Université de Sétif), ont complété l'étude de l'halotolérance des bactéries de l'environnement.

Les souches de *Rhizobium* sont conservées à 4°C sur le milieu MSY (mannitol-sels-extrait de levure) additionné de 15 g/l de gélose (Dalton, 1980; Weaver et Graham, 1994), celles de *Pseudomonas* et d'*Escherichia coli* sur gélose nutritive.

2- Milieux de culture:

L'halotolérance bactérienne en présence de concentrations croissantes de chlorure de sodium (0,50 -0,68 -0,85 -1,02 et 1,20 M) est étudiée dans les milieux suivants (des témoins sans apport en NaCl sont réalisés à chaque fois):

- **Le milieu MSY** (mannitol-sels-extrait de levure) décrit par Fred et Waksman (1928):

.K ₂ HPO ₄	0,5 g
.MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
.NaCl	0,1 g
.CaCO ₃	0,01 g
.Mannitol	10 g
.Extrait de levure	0,5 g
.Eau distillée	1000 ml

Il est ajusté à pH 7,0 et stérilisé à 121°C pendant 15 mn. C'est le milieu le plus utilisé pour la croissance de *Rhizobium* (Weaver et Graham, 1994).

- **Le bouillon trypticase-soja (BTS):** Milieu complexe et hautement nutritif, il permet une croissance abondante de la plupart des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies. Il est stérilisé à 120°C pendant 20 mn. Ce milieu est utilisé pour la croissance des souches de *Pseudomonas* et *E. coli*.

- **Le milieu minimum LAS:** Il contient en plus des constituants minéraux du milieu MSY. 1 g/l d'acide aspartique et 1 g/l d'acide lactique. Il est ajusté à pH 7,0 et stérilisé à 120°C pendant 20 mn (Le Rudulier et coll., 1983).

- **Le milieu LAS additionné de glycine bétaine (G.B):** La G.B (Sigma) est additionnée au milieu LAS à une concentration finale de 1 mM à partir d'une solution-mère (100 mM) stérilisée par passage à travers une membrane Millipore (0,2 µm). C'est la concentration minimale rétablissant la croissance maximale chez les *Enterobactériaceae* (Le Rudulier et Bouillard, 1983) et *Rhizobium* (Le Rudulier et coll., 1983).

N.B. L'addition de la biotine (20 µg/l) au milieu LAS pour *R. meliloti* (Le Rudulier et coll., 1991) et la substitution de l'aspartate par le glutamate de potassium (0,2%) [pour *R. sp. (Hedysarum)*] (Bernard et coll., 1986) sont parfois recommandées. Pour ce fait, la croissance des différentes souches de *Rhizobium* est testée dans le milieu LAS additionné ou non de biotine et/ou de glutamate. La croissance (appréciation du trouble) est identique dans tous les cas après 4 jours d'incubation. Le milieu LAS (sans biotine ou glutamate) a été donc retenu pour la culture bactérienne.

- Milieux préparés à partir d'halophytes:

* **A partir d'extraits aqueux:** les plantes séchées sont finement broyées de façon à faciliter un meilleur relargage ultérieur des substances intracellulaires. 1 g de cette poudre est additionné de 50 ml de milieu LAS. Après autoclavage à 110°C, le surnageant est récupéré dans des tubes stériles.

* **A partir d'extraits hydroalcooliques:** 50 mg des lyophilisats d'extraits hydroalcooliques, précédemment préparés (voir purification des composés -oniums), sont dissous dans 1 ml d'eau. Des dilutions au 1/100^{ème} et au 1/200^{ème} dans le milieu LAS sont effectuées à partir de cet extrait. Les milieux obtenus sont stérilisés à 110°C pendant 30 mn.

Les différents milieux serviront au remplissage des puits à fond rond de plaques de microtitration sous un volume de 200 µl.

3- Cultures bactériennes et détermination de l'halotolérance:

Les inocula sont préparés par ensemencement de 5 ml du milieu MSY (pour les souches de *Rhizobium*) ou de BTS (pour les souches de *Pseudomonas* et *E. coli*) à partir d'une culture fraîche. Après incubation à 30°C (*Rhizobium* et *Pseudomonas*) ou à 37°C (*E. coli*) en aéroboise

(agitation) pendant 18 h, la suspension bactérienne est centrifugée à 3000 xg. Le culot est alors lavé à trois reprises par 5 ml d'eau physiologique puis repris finalement par 5 ml.

Les milieux de cultures répartis dans les puits des microplaques sont inoculés par 10 μ l (*Rhizobium*) ou 5 μ l (*Pseudomonas* et *E. coli*) de la suspension bactérienne. Après homogénéisation, les plaques sont incubées à 30°C pendant 5 jours, 12 jours ou 24 h pour les souches de *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium* sp. (*Hedysarum*) et *Pseudomonas*, respectivement et à 37°C pendant 24 h pour *E. coli*.

La croissance bactérienne dans les différents puits est déterminée par appréciation visuelle du trouble. La concentration saline maximale ayant permis la croissance bactérienne est notée à chaque fois dans les différents milieux.

Résultats et discussion

Espèce végétale:

Abréviation:

<i>Atriplex glauca</i>	<i>At.</i>
<i>Halocnemum strobilaceum</i>	<i>Hal.</i>
<i>Salicornia arabicum</i>	<i>Sali.</i>
<i>Suaeda mollis</i>	<i>Su.</i>
<i>Chenopodium</i> sp.	<i>Ch.</i>
<i>Salsola vermiculata</i>	<i>Sals.</i>
<i>Oryzopsis miliacea</i>	<i>Ory.</i>
<i>Parapholis incurva</i>	<i>Par..</i>
<i>Aeluropus littoralis</i>	<i>Ael.</i>
<i>Plantago coronopus</i>	<i>Pl.</i>
<i>Cressa cretica</i>	<i>Cr.</i>
<i>Limonium delicatulum</i>	<i>Lim.</i>
<i>Spergularia marginata</i>	<i>Sp.</i>
<i>Polygonum balansae</i>	<i>Pol.</i>
<i>Frankenia leavis</i>	<i>Fr.</i>
<i>Aizoon hispanicum</i>	<i>Aiz.</i>

I- Halophytes et osmoprotecteurs:

1- Résultats:

1-1- Détection des composés Dragendorff-positifs:

La chromatographie sur couche mince d'extraits hydroalcooliques d'halophytes révèle la richesse de la majorité des espèces analysées en composés Dragendorff-positifs. Selon la vitesse relative de leur apparition, l'intensité de leur coloration et les dimensions de leurs spots, ces composés existent à des teneurs variables dans les extraits.

Les composés-oniums ont été détectés chez toutes les espèces végétales appartenant aux *Chenopodiaceae* et aux *Gramineae* et chez *Limonium delicatulum* (*Plumbaginaceae*) et *Cressa cretica* (*Convolvulaceae*) (Fig. 1, 2, 3). Ces plantes sont considérées comme accumulatrices de composés Dragendorff-positifs.

Plusieurs spots à peine détectables sont présents chez toutes les espèces dans les trois systèmes de développement et seraient des substances Dragendorff-positives (ou des pigments).

Le système solvant isopropanol-eau (3:1) a permis une bonne séparation des composés Dragendorff-positifs, son pouvoir de résolution s'est avéré le meilleur, le seul ayant permis la séparation de deux composés -oniums principaux (1 et 2) dans l'extrait de *L. delicatulum* (Fig. 1) (un troisième n'ayant pas migré). Chez les autres espèces accumulatrices, un seul spot important a été observé près du niveau de la G.B dans les trois systèmes de développement.

Ces résultats sont confirmés par électrophorèse en haute tension effectuée sur les extraits des plantes accumulatrices. Un second composé Dragendorff-positif faiblement coloré est visualisé près du niveau de la choline chez toutes les espèces excepté *L. delicatulum* (Fig. 4). Les nombreuses substances visibles en CCM ne sont plus détectées en E. H. T; cependant, à notre avis elles apparaissent au niveau des dépôts sous une coloration brune verdâtre. Elles ne sont pas positivement chargées et ne peuvent donc appartenir aux composés -oniums, mais correspondent plutôt aux différents pigments présents dans les extraits végétaux.

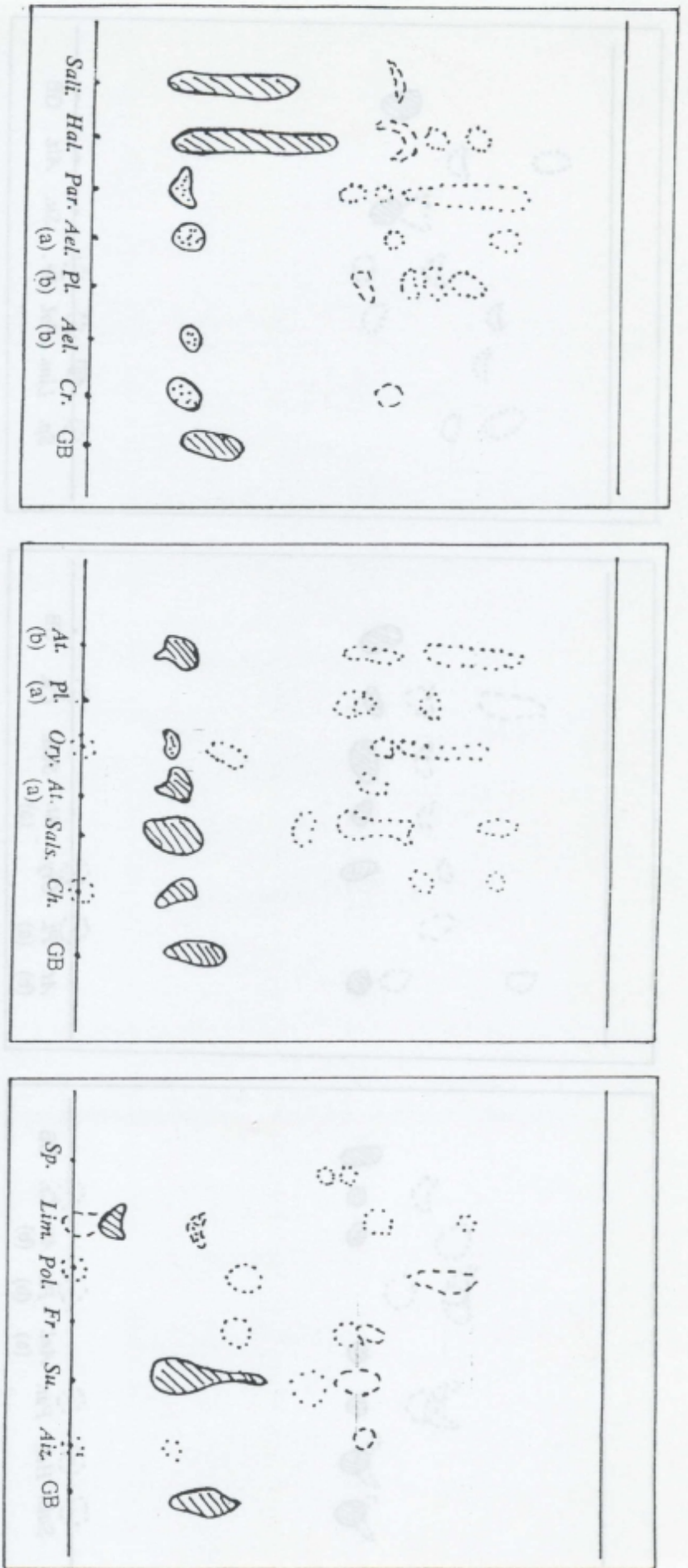


Fig. 1: CCM (gel de silice-isopropanol/eau, 3:1) de substances Dragendorff-positives d'extraits hydroalcooliques bruts d'halophytes.
 G.B: glycine bétaïne (témoin).

Apparition instantanée (—), après quelques jours (---), après des semaines (.....). Coloration intense ⊗, moins intense ⊙, faible ○.

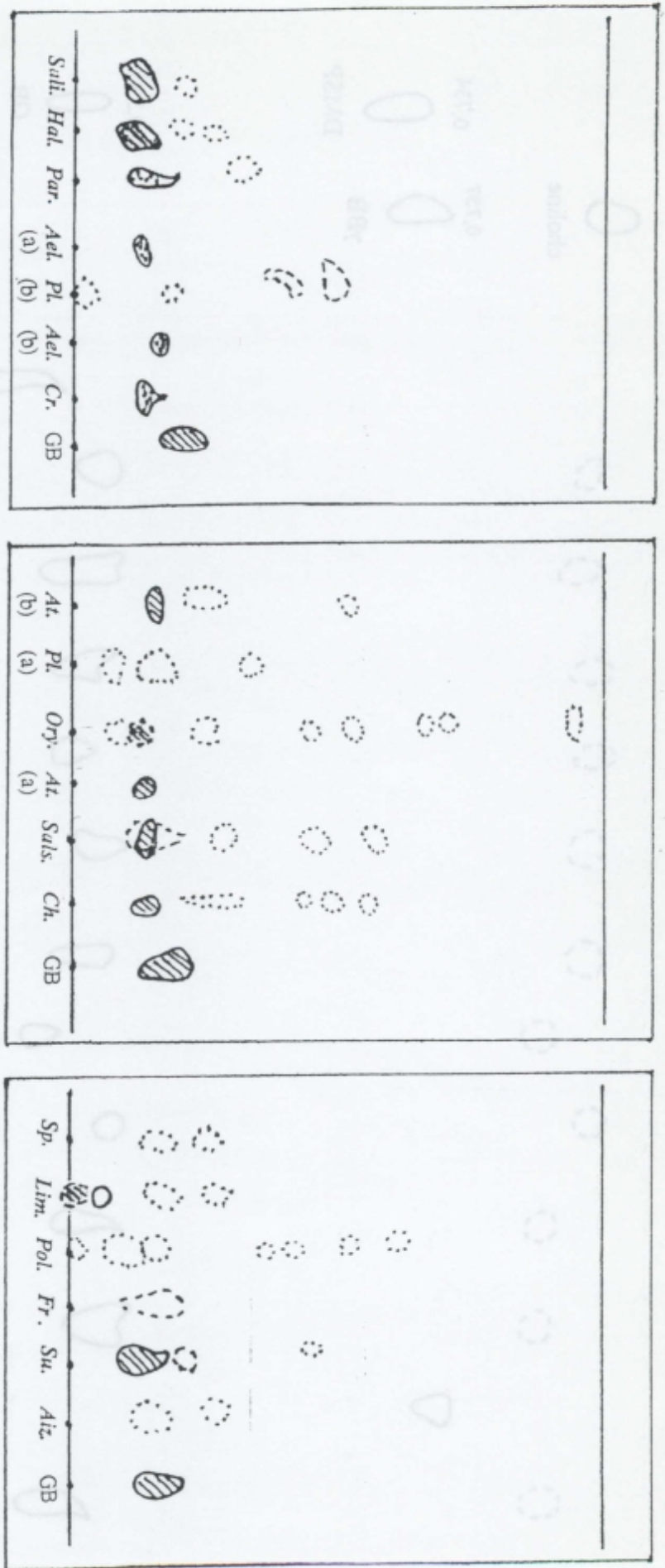


Fig. 3: CCM (gel de silice-chloroforme/méthanol/eau, 6:3:1) de substances Dragendorff-positives d'extraits hydroalcoliques bruts d'halophytes.

G.B.: glycine bêtaïne (témoin).

.Apparition instantanée (—), après quelques jours (-----), après des semaines (.....) Coloration intense ⊗, moins intense ⊙, faible ○.

1-2- Purification:

La purification de substances à partir de matériel végétal est toujours délicate car il s'agit tout d'abord de se débarrasser des molécules indésirables et ensuite d'obtenir par techniques appropriées celles considérées comme pures. Dans notre cas, il a fallu se débarrasser du NaCl, des pigments et des acides aminés et ne retenir que les composés -oniums à partir de plantes halophytes. Les différentes techniques utilisées se sont avérées complémentaires.

L'élimination préalable de la chlorophylle et d'autres substances indésirables, telles les lipides par le chloroforme, ainsi que la CCM se sont avérées très utiles pour la purification préliminaire. En outre, la CCM s'est avérée indispensable car favorise la rétention ultérieure des composés -oniums par la résine échangeuse de cations en diminuant la teneur en sel. Ceci est sans doute dû à la forte teneur en sel dans les extraits puisque les plantes adaptées à la salinité accumulent de grandes quantités de NaCl dans leurs cellules (Flowers et coll., 1977); les cations inorganiques plutôt que les composés -oniums seraient échangés avec H^+ sur la résine activée.

Les acides aminés existant à des concentrations élevées dans les extraits sont partiellement éliminés lors du passage des échantillons à travers la colonne de Dowex 50 W, H^+ puis lavage à l'eau. Ceux positivement chargés à pH 6,5-7 sont retenus par la résine puis élués parmi les composés -oniums.

La chromatographie sur papier s'est avérée d'un grand intérêt dans la purification. Elle a permis la séparation des acides aminés des composés Dragendorff-positifs et complété l'élimination totale du sel présent à des taux élevés dans les éluats de la chromatographie échangeuse d'ions; les cations inorganiques retenus par la résine forment des sels de chlorure lors de l'éluion par HCl.

Enfin, le système solvant isopropanol-eau (3:1) utilisé en CCM s'est révélé d'une grande efficacité pour l'élimination des acides aminés et les pigments résiduels.

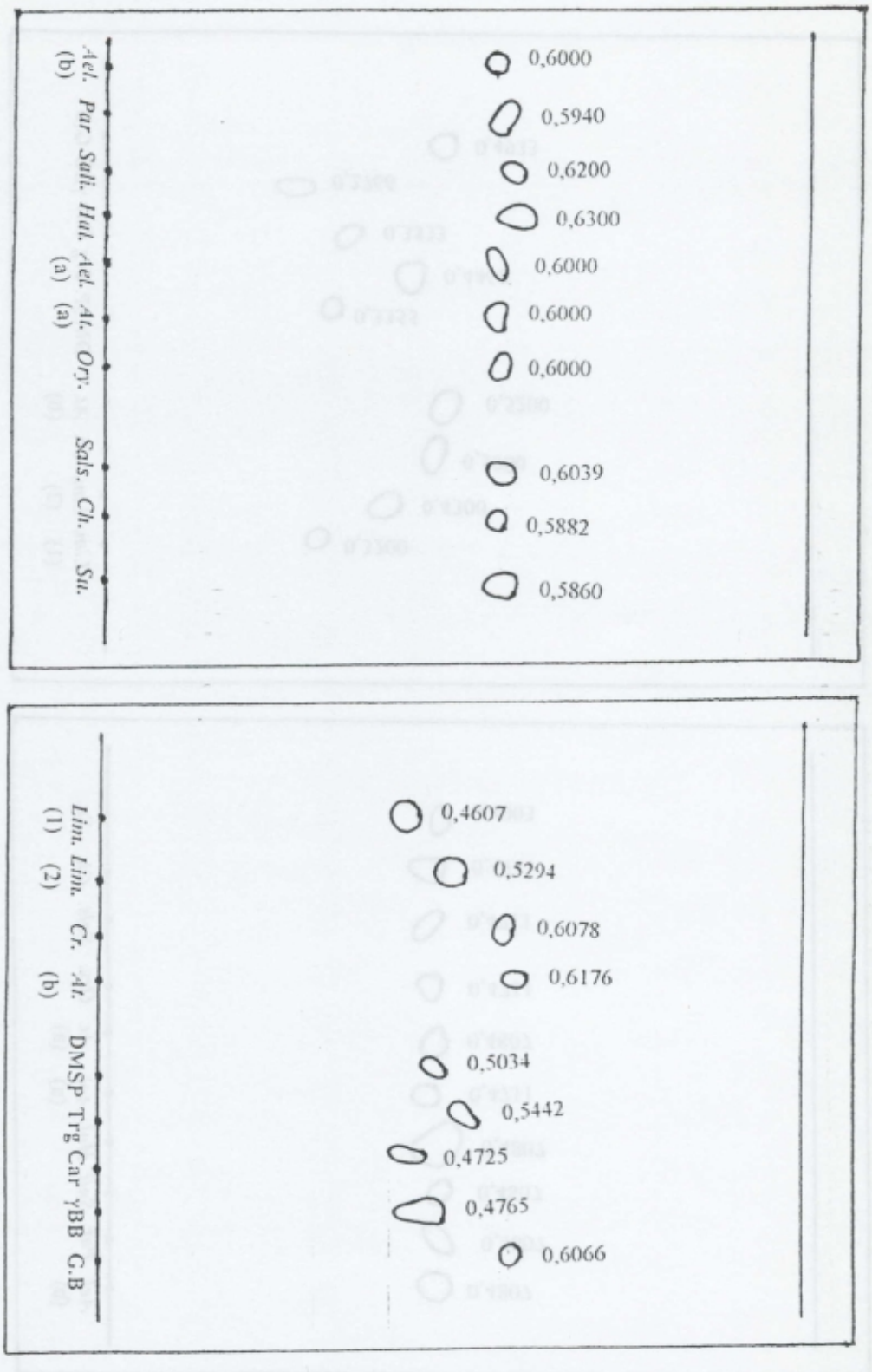


Fig. 6: CCM (gel de silice-méthanol/NH₄OH, 3:1) de substances Dragendorff-positives purifiées à partir d'halophytes.
 G.B: glycine bêtaïne, γBB: γ-butYRObêtaine, Car: carnitine, Trg: trigonelline, DMSP: diméthylsulfoniopropionate (témoins).

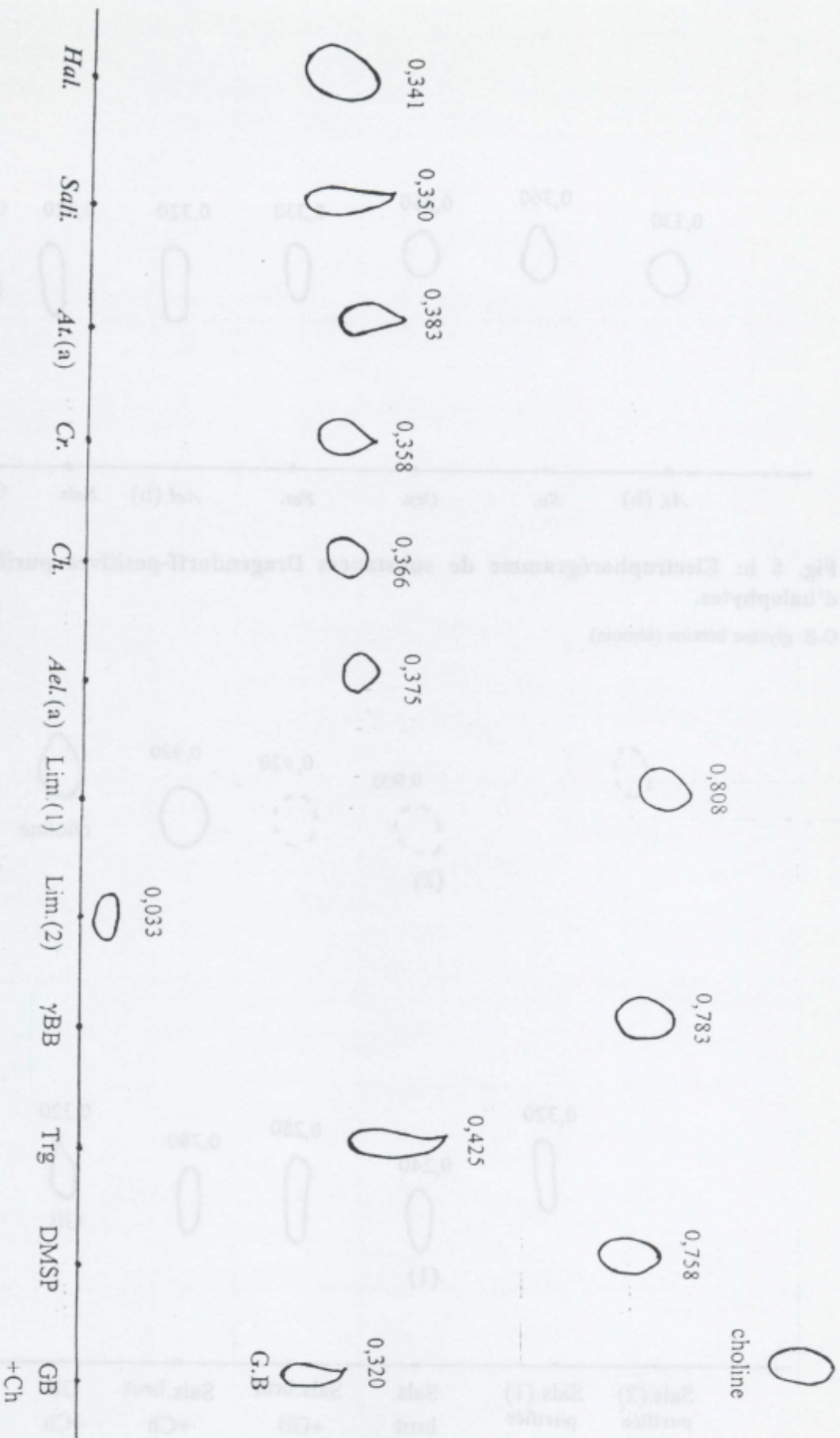


Fig. 8 a: Electrophorégramme de substances Dragendorff-positives purifiées à partir d'halophytes.

G.B: glycine bêtaïne, Ch: choline, DMSP: diméthylsulfoniopropionate, Trg: trigonelline, γ BB: γ -butyrobêtaïne (têmoins).

1-3- Identification:

1-3-1- Chromatographie sur couche mince:

Les R_f constituent un paramètre important dans l'identification d'une substance préalablement purifiée, celle-ci est presque acquise si pour les différents systèmes de développement utilisés, le R_f d'une substance correspond à celui d'un standard donné.

Pour toutes les substances purifiées, exceptées celles accumulées chez *L. delicatulum*, les R_f sont très proches les uns des autres dans les trois systèmes. Ils varient de 0,180 à 0,198 dans l'isopropanol-eau (3:1), de 0,586 à 0,630 dans le méthanol-NH₄OH (3:1) et de 0,471 à 0,520 dans le chloroforme-méthanol-eau (6:3:1) et correspondent approximativement à ceux de la G.B (0,206, 0,606 et 0,493 dans les trois systèmes, respectivement) (Fig. 5, 6, 7).

Les substances (1) et (2) accumulées chez *L. delicatulum* ne correspondent à aucun des standards utilisés.

1-3-2- Electrophorèse en haute tension:

Les substances principalement accumulées purifiées à partir de toutes les espèces, excepté *L. delicatulum*, présentent, entre elles, des valeurs de R_c assez proches (0,320 à 0,383) et correspondent approximativement à celui de la G.B (0,320) (Fig. 8a, 8b). La substance (1) accumulée chez *L. delicatulum* a un R_c (0,808) voisin de celui de la γ -butyrobétaine (0,783) alors que la substance (2) ne correspond à aucun des standards utilisés.

Le composé Dragendorff-positif secondairement mis en évidence chez l'ensemble des halophytes a été purifié par une deuxième E.H.T uniquement chez *Salsola vermiculata* (prise comme modèle). Ce composé possède un R_c et une coloration comparables à ceux de la choline (Fig. 9). La choline serait-elle-secondairement accumulée par les halophytes (sauf *L. delicatulum*)?

1-3-3- Spectroscopie de R.M.N-¹H:

Cette technique a été largement utilisée pour la caractérisation de composés -oniums à partir d'algues (Bluden et Gordan, 1986; Ghoul, 1990). En ce qui nous concerne, elle a abouti à la mise en évidence de la pureté des substances et à la confirmation de la présence de la G.B chez les *Chenopodiaceae*, *Gramineae* et *Cressa cretica*. Les spectres des substances purifiées

coïncident exactement avec celui de la G.B (monohydrate) pure commercialisée (Sigma).
L'ensemble de ces spectres présente les deux pics caractéristiques de la bétaine (Fig. 10):

Leurs déplacements chimiques δ (ppm):

$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$: 3.27

CH_2 : 3.91

correspondent à ceux indiquées par Ghoul (1990) pour la substance Dragendorff-positive présente chez les deux algues marines *Rhodymenia palmata* et *Enteromorpha ramulosa*.

Les deux substances de *Limonium delicatulum* dont la purification a été conduite uniquement par CCM (Matériel et méthode, p. 36) ont donné des spectres révélant la présence d'impuretés.

Le spectre de la substance (1) présente trois pics (Fig. 11) correspondant à ceux de la β -alanine bétaine indiqués par Blunden et Gordon (1986):

Les déplacements chimiques δ (ppm) sont:

Pour β -alanine bétaine $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\alpha\text{CH}_2\beta\text{CH}_2\text{COOH.Cl}^-$:

$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$: 3,09

$-\alpha\text{CH}_2-$: 3,57

$-\beta\text{CH}_2-$: 2,85

Pour la substance (1):

* ($\cong 9\text{H}$) : 3,14 (a)

* (2H) : 3,6 (b)

* (2H) : 2,7 (c)

Les différences entre les déplacements chimiques de la molécule standard et la substance (1) sont minimales. Ceci est probablement dû à l'anion lié à la molécule. A titre d'exemple, les spectres de la G.B pure commercialisée monohydrate et chlorhydrate montrent certaines différences dans les déplacements chimiques (Fig. 12):

	G.B.H ₂ O	G.B.HCl
$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$:	3,27	3,31
$-\text{CH}_2-$:	3,91	4,23

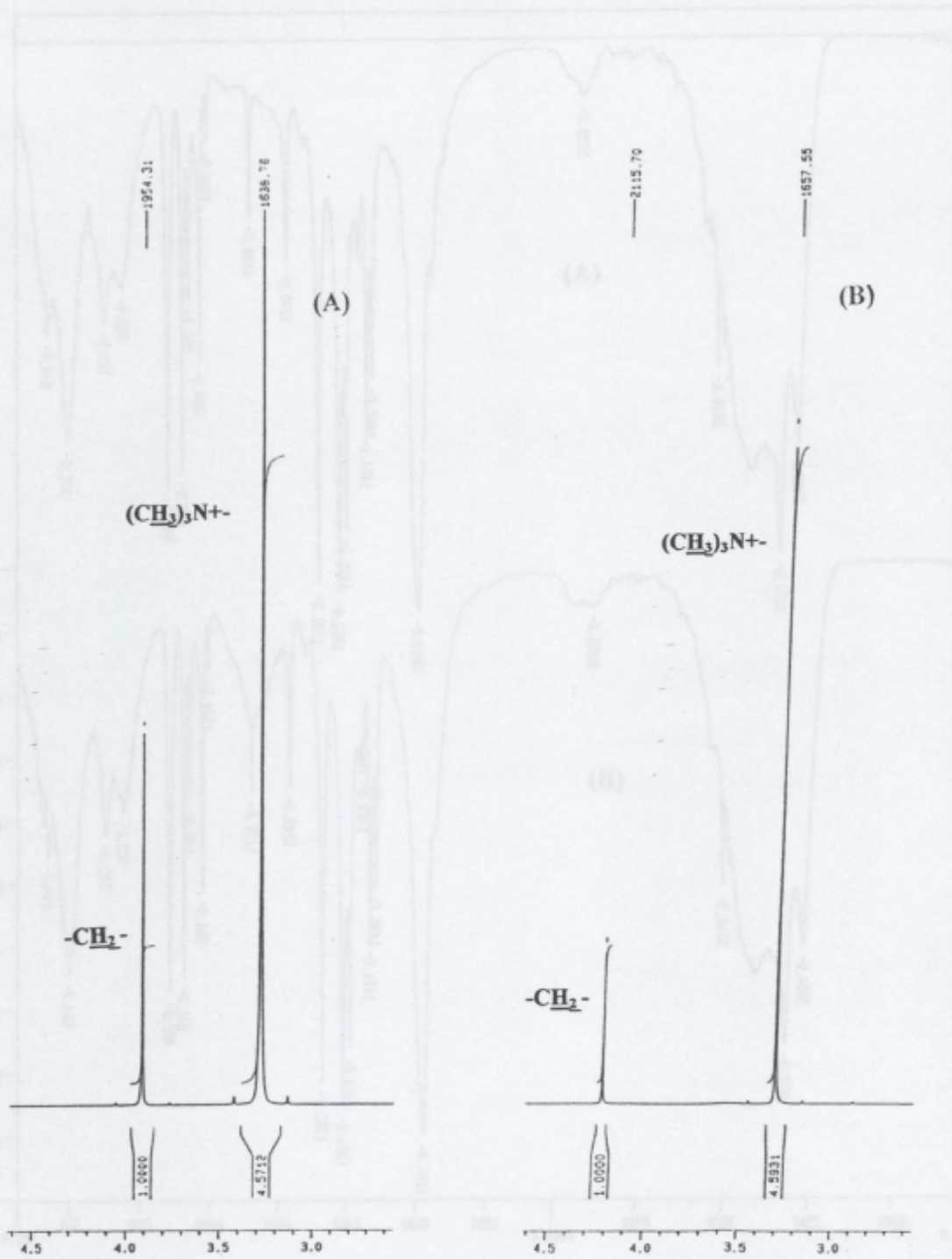


Fig. 12: Spectres de RMN- ^1H de la G.B monohydrate (A) et chlorhydrate (B).

Selon Hanson et coll. (1991) (*In* Rhodes et Hanson, 1993), l'accumulation de la β -alanine bétaine s'accompagne par celle de la choline-O-sulfate chez les espèces de *Limonium*. Toutefois, dans notre cas, les données du spectre de la substance (2) ne correspondent pas à celles citées en littérature pour la choline-O-sulfate (Blunden et Gordon, 1986):

Les déplacements chimiques pour la choline-O-sulfate $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\alpha\text{CH}_2\beta\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$

$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$: 3,16
$-\alpha\text{CH}_2-$: 3,67
$-\beta\text{CH}_2-$: 4,37

Le spectre de la substance 2 n'est pas concluant vu l'importance des impuretés. Dans ce cas, ce composé Dragendorff-positif est-il à rapprocher de la choline-O-sulfate? ou encore, est-ce une nouvelle molécule non décrite et spécifique de cette espèce locale?

1-3-4- Spectroscopie d'IR:

Cette technique d'identification confirme encore une fois l'accumulation de la G.B chez toutes les espèces halophytes étudiées à l'exception de *L. delicatulum*. En effet, L'ensemble des spectres des substances purifiées correspond exactement à celui de la bétaine (Sigma). En outre l'analyse des spectres reflète le haut degré de pureté des substances et donc l'efficacité de la méthodologie de purification (Fig. 13).

1-4- La proline:

La proline détectée par CCM ($R_f = 0,20$, coloration jaune caractéristique) est présente chez certaine halophytes (15 plantes) et absente chez certaines d'autres (4 plantes). Selon l'intensité de la coloration et les dimensions des spots, elle existe à des teneurs variables (Fig.14). Bien que la sensibilité de la CCM soit limitée, ces résultats sont comparables à ceux déterminés quantitativement (Tab. 2). La proline n'est pas détectée ou donne de petits spots faiblement colorés en CCM chez les plantes renfermant des concentrations inférieures à $10 \mu \text{ moles/g M.S.}$ Les espèces présentant des taux supérieurs à cette valeur sont considérés comme accumulatrices. En effet, Greenway et Munns (1980) considèrent les concentrations inférieures à $2 \mu \text{ moles/g}$ de matière fraîche ($\cong 10 \mu \text{ moles/g M.S., M.S} \cong 20\%$ du poids frais) accumulées chez les plantes comme importantes. Parmi ces halophytes, *Frankenia leavis* se distingue par sa teneur remarquablement élevée en proline ($126,67 \mu \text{ moles/g M.S.}$). Cette espèce

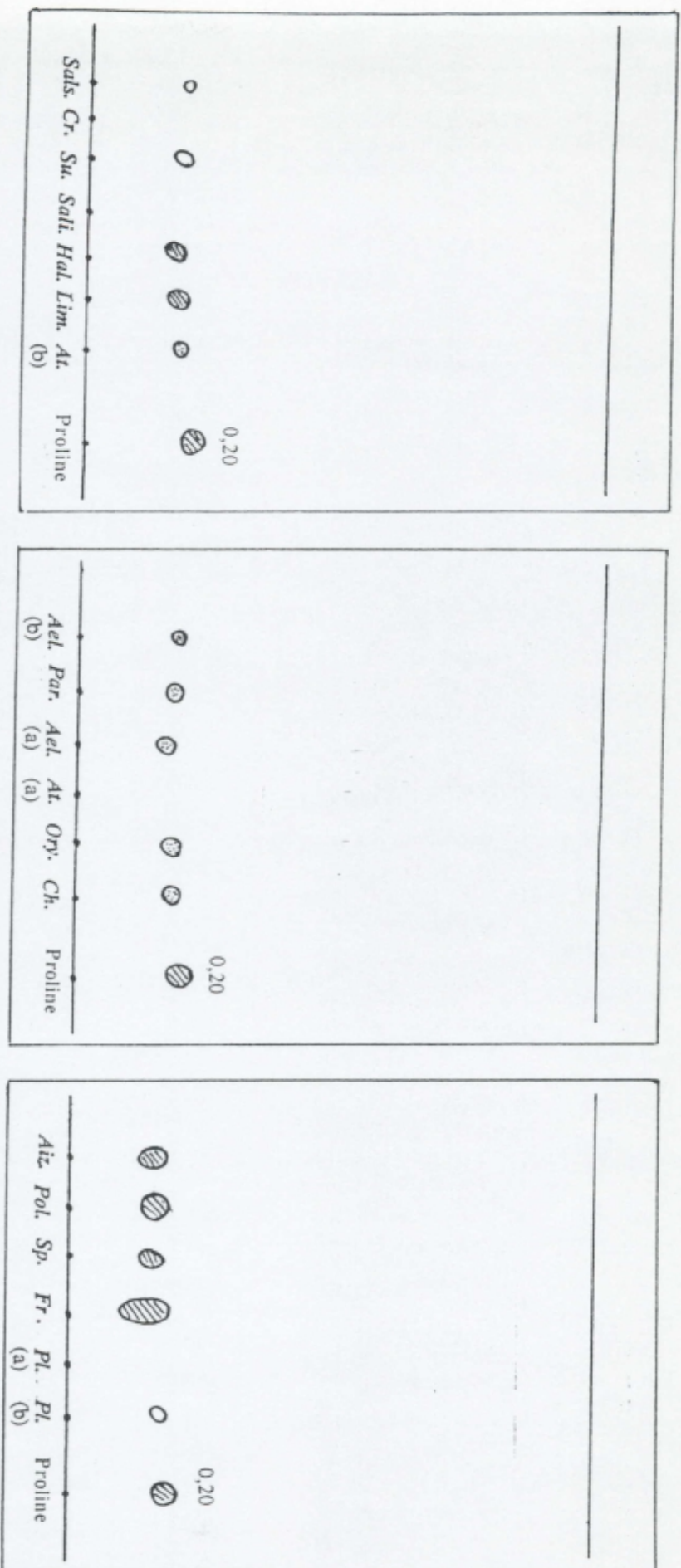


Fig. 14: Mise en évidence de la proline (CCM: gel de silice-n-butanol/acide acétique/eau, 6:2:2, p/p) dans les extraits hydroalcooliques bruts d'halophytes. Coloration intense ⊙, moins intense ⊗, faible O.

est d'ailleurs connue pour accumuler de fortes teneurs en proline (Poljakoff-Mayber et coll., 1986).

Il ne semble pas y avoir de corrélation entre la teneur de la proline du végétal ou la présence de composés -oniums et le taux de salinité du sol (ceinture de végétation). Cependant, chez *Atriplex glauca*, la concentration de la proline est faible quand la salinité est élevée.

2- Discussion:

Les techniques spectroscopiques confirment l'efficacité de la méthodologie de purification de composés -oniums, mis au point par nos soins, à partir d'halophytes. L'IR, en particulier, a attesté de l'extrême pureté des substances.

Parmi les halophytes étudiés, les *Chenopodiaceae*, les *Gramineae* ainsi que *Cressa Cretica* (*Convolvulaceae*) accumulent la G.B comme composé -onium majeur. C'est une molécule connue pour son rôle osmoprotecteur chez les plantes supérieures (Flowers et coll., 1977; Greenway et Munns, 1980; Popp, 1995) où elle est spécifiquement liée à la salinité (Parameshwara et coll., 1988). Elle constitue aussi une réponse à d'autres types de stress environnementaux tels les stress hydrique et thermique (Rhodes et Hanson, 1993). Ce composé -onium est universellement rencontré chez les *Chenopodiaceae* où il demeure un caractère chimique consistant. Par contre, il est très important en taxonomie chez les *Gramineae* (Grieve et Maas, 1984).

Différents taux de G.B ont été rapportés chez de nombreux autres halophytes adaptés à la salinité, citons *Wilsonia humilis* (*Convolvulaceae*), *Halosarcia halocnemoides* (*Chenopodiaceae*) et *Avicennia marina* (*Avicenniaceae*). Cette dernière accumule jusqu'à 110 μ moles de G.B/g de matière fraîche (Poljakoff-Mayber et coll., 1987). Les résultats concernant les halophytes non-accumulateurs de G.B appartenant aux genres *Frankenia*, *Spergularia* et *Plantago* concordent avec ceux rapportés par Poljakoff-Mayber et coll. (1987) d'une part et par Popp (1995) d'autre part.

La β -alanine bétaine et la choline-O-sulfate sont connues pour leur rôle d'osmolytes compatibles chez les espèces de *Limonium* et d'autres genres appartenant à la famille des *Plumbaginaceae* tels *Plumbago* et *Aegialitis* (Rhodes et Hanson, 1993).

Chez les plantes, la choline ne sert pas de soluté compatible et ne s'accumule pas (Poljakoff-Mayber et coll., 1987); elle est oxydée et transformée en G.B (Shrestha et Bisset, 1991). Ceci explique donc sa présence à de faibles taux chez l'ensemble des plantes étudiées accumulant la G.B. Cependant, Poljakoff-Mayber et coll. (1987) ont trouvé surprenant et difficile à interpréter l'accumulation de la choline, chez *Olearia rudis* (*Asteraceae*), à une concentration importante (150,3 $\mu\text{moles/g}$ de matière fraîche) excédant largement celle de la G.B (72,3 $\mu\text{moles/g}$ de matière fraîche). Toujours selon ces mêmes auteurs, la G.B et la choline sont également présentes chez les plantes non-accumulatrices mais à de faibles taux.

La proline est accumulée par la majorité des espèces analysées. Elle permet aux plantes de lutter contre le stress salin (Chrominski et coll., 1988; Garcia-Rios et coll., 1994).

Les plantes non-accumulatrices de composés -oniums présentent en général des taux élevés de proline qui peuvent atteindre 126,67 $\mu\text{M/g}$ M.S. (*Frankenia leavis*) et concurrencent celles à G.B dans les sites à fortes salinités.

La proline est suggérée être le précurseur pour d'autres solutés compatibles tels le MHP (trans-4-hydroxy-N-méthyl-L-proline) et le DHP (N,N'-diméthyl-trans-4-hydroxy-L-proline) dont les teneurs augmentent considérablement en réponse au stress hydrique ou salin chez les espèces de *Melaleuca* (*Myrtaceae*) (Naidu et coll., 1987). Ceci expliquerait-il la présence de la proline à de faibles concentrations chez certaines plantes analysées?

Il n'est pas surprenant de constater l'absence de corrélation entre la teneur des solutés compatibles (composés Dragendorff-positifs et proline) et la salinité du sol (ceintures de végétations) car cette teneur dépend de l'espèce végétale, de sa phase de croissance (Poljakoff-Mayber et coll., 1987) ainsi que des facteurs environnementaux. Par exemple, l'accumulation de la G.B (Hodson et coll., 1985) est plutôt liée à la disponibilité de l'azote qu'au taux de la salinité, celle de la proline (Joyce et coll., 1984) dépend étroitement de l'intensité de la lumière et de la réserve en carbohydrates (Poljakoff-Mayber et coll., 1987).

En considérant l'accumulation de composés Dragendorff-positifs et/ou de la proline, 4 classes de plantes sont à distinguer:

1- Plantes à composés Dragendorff-positifs: *Cressa cretica*, *Atriplex glauca* (a), *Salicornia arabicum*, *Salsola vermiculata* et *Suaeda mollis*.

2- Plantes à proline: *Frankenia leavis*, *Polygonum balansae*, *Aizoon hispanicum* et *Spergularia marginata*.

3- Plantes à composés Dragendorff-positifs et à proline: *Limonium delicatulum*, *Halocnemum strobilaceum*, *Parapholis incurva*, *Oryzopsis miliacea*, *Chenopodium* sp., *Aeluropus littoralis* et *Atriplex glauca* (b).

4- Plantes n'accumulant ni composés Dragendorff-positifs ni proline: *Plantago coronopus*. Les espèces de *Plantago* sont en effet connues pour leurs fortes teneurs en sorbitol face au stress osmotique (Popp, 1995).

Les mêmes classes de plantes sont constatées par Poljakoff-Mayber et coll. (1987) qui se sont intéressés aux végétaux des zones arides et salines. Les plantes adoptent donc diverses stratégies face à la salinité. Cette idée est soutenue par plusieurs auteurs (Singh et coll., 1972; Gorham et coll., 1980; Guy et coll., 1984) (*In* Poljakoff-Mayber, 1987). La synergie entre les différents osmolytes compatibles accumulés en même temps serait-elle l'une de ces stratégies?

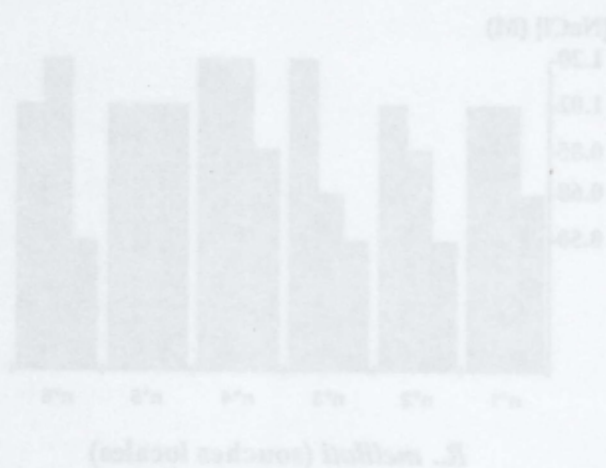


Fig. 15 : Appréhension de la coexistence de différents osmolytes compatibles en présence de NaCl dans les végétaux LAS, LAS+G.B.B. et MAYB.

II- Effet d'extraits d'halophytes sur l'halotolérance bactérienne:

Si les microplaques se sont avérées un outil indispensable dans l'étude simultanée de l'halotolérance de plusieurs souches bactérienne en présence d'extraits de nombreux halophytes, leur utilisation demeure, dans certains cas, délicate. En effet, l'appréciation visuelle du trouble dans un puits peut varier d'un observateur à un autre. Toutefois ces cas restent rares et limités à quelques concentrations salines maximales tolérées par les bactéries.

L'appréciation du trouble a été retenu comme unique critère de la croissance bactérienne; la seule présence d'un culot, qui est plus le résultats d'un agrégat cellulaire que d'une véritable culture, n'a pas été considérée. Sa densité peut cependant être faible, moyenne ou forte, cette différence n'est pas mentionnée dans nos résultats.

1- Appréciation de l'halotolérance de *Rhizobium*:

1-1- En milieux LAS, LAS + G.B et MSY:

1-1-1 Résultats: (Fig. 15)

a- En milieu minimum LAS :

Les souches de *R. meliloti* U45 et SU47 tolèrent dans ce milieu minimum une concentration saline de 0,50 M. Par contre, dans les mêmes conditions les souches de *R. meliloti* 102F34 et de *R. sp. (Hedysarum)* CC1335 et CC1337 n'est observée qu'en absence de NaCl.

Les souches locales de *R. meliloti* s'adaptent mieux à la salinité, toutes se développent à 0,50 M. Pour certaines souches, cette tolérance peut atteindre 0,68 M (souche n° 1 et 6), 0,85 M (n°4) ou même 1,02 M (n°5).

b- En milieu LAS +G.B:

La G.B se révèle sans effet chez quatre souches de référence, chez la cinquième (U45), elle augmente le seuil d'halotolérance de 0,50 à 0,68 M.

La réponse des souches locales à la G.B est bien meilleure. Cette molécule améliore la croissance en présence de sel pour l'ensemble des souches; l'halotolérance peut atteindre 1,20 M NaCl chez les souches n°4 et 6. Aucune amélioration visible de la croissance n'est constatée chez la souche n°5 caractérisée déjà par une haloadaptation remarquable (1,02 M) en milieu minimum.

c- En milieu riche MSY:

Dans ce milieu, les souches de référence dont la croissance en milieu salé n'est pas restaurée par l'addition de G.B ont manifesté une meilleure halotolérance (0,50 M NaCl pour 102F34 et CC1335; 0,85 M pour CC1337). Le milieu MSY est plus efficace que la G.B chez U45: la concentration maximale de NaCl tolérée passe de 0,68 à 0,85 M. Il n'améliore pas la croissance chez SU47.

Concernant les souches locales, le milieu MSY permet une halotolérance au moins équivalente à 1,02 M. Son efficacité peut être inférieure (n°6), égale (n°1, 4, 5) ou supérieure (n°2 et 3) à celle de la G.B.

En somme, les souches de référence s'adaptent moins à la salinité. Leur halotolérance en milieu minimum ne dépasse pas 0,50 M et leur croissance n'est pas restaurée par addition de G.B (sauf pour la U45). En milieu riche (MSY), toutes les souches se développent à 0,50 M et peuvent tolérer jusqu'à 0,85 M NaCl.

Les souches isolées de sols algériens montrent une meilleure haloadaptation. La concentration saline maximale tolérée déjà importante en milieu minimum (de 0,50 à 1,02 M) peut atteindre 1,20 M en présence de G.B ou en milieu MSY.

1-1-2- Discussion:

La quasi-totalité des souches de *R. meliloti* manifeste une halotolérance en absence d'osmoprotecteurs exogènes (en LAS). Les ions K^+ présents dans le milieu contribuent à la restauration de la pression de turgescence des cellules. La capacité d'accumuler le potassium est considérée comme mécanisme d'halotolérance chez *Rhizobium* (Le Rudulier et Bernard, 1986). En même temps le glutamate est synthétisé, celui-ci joue également un rôle essentiel dans l'osmoadaptation de *Rhizobium* (Botsford et Lewis., 1990). Sa concentration intracellulaire augmente jusqu'à 34,4 fois en présence de 0,50 M NaCl chez *Rhizobium* sp. WR101 (Hua et coll., 1982). Cependant, le potassium et le glutamate ne servent d'osmorégulateurs du cytoplasme qu'à faibles osmolarités. Lorsque le stress devient important, la cellule accumule, par biosynthèse, des solutés compatibles non chargés tels le tréhalose (Smith et coll., 1994 a) et le N-acétylglutaminyglutamine (NAGGN) (Smith et Smith, 1989).

La présente étude a révélé l'existence d'une halotolérance intrinsèque due à des mécanismes endogènes d'osmorégulation. Cette réaction primaire peut permettre la croissance à des teneurs salines aussi élevées que 1,02 M (cas de la souche locale n°5). Une halotolérance intrinsèque importante existe chez d'autres bactéries telles *Pseudomonas mendocina* SKB70 (Pocard et coll.,1994) et la bactérie halophile *Halomonas elongata* (Canovas et coll.,1996) qui tolèrent 1,20 et 3 M NaCl respectivement.

Une concentration de 0,50 M NaCl est inhibitrice pour *R. meliloti* 102F34 et *R. sp.(Hedysarum)* CC1335 et CC1337. Le Rudulier et coll. (1983) ont rapporté pour la 102F34 une valeur supérieure (0,68 M). S'agissant de la U45, nos résultats correspondent à ceux cités par les mêmes auteurs.

La G.B apporte une osmoprotection à la majorité des souches. Celles-ci ont par conséquent la capacité de la transporter et de l'accumuler. Toutefois, ce phénomène n'est pas ubiquitaire chez *Rhizobium*. Cette molécule est sans effet chez certaines souches de *R. meliloti* (Botsford, 1984) (In Bernard et coll., 1986) et chez *R. leguminosarum*, *R. fredii* et *R. japonicum* (Bernard et coll., 1986). Ces bactéries sont incapables d'absorber la G.B (Le Rudulier et coll., 1983). C'est le cas des *R. sp. (Hedysarum)* CC1335 et CC1337 et *R. meliloti* 102F34 testés quoique le pouvoir osmoprotecteur de la G.B ait été rapporté chez *R. sp. (Hedysarum)* et *R. meliloti* 102F34 (Bernard et coll., 1986). La souche 102F34, expérimentée par nos soins, aurait-elle perdu la capacité de son accumulation par mutation?

Les différences d'halotolérance constatées entre nos résultats et ceux rapportés en littérature pourraient provenir de la méthode d'appréciation de la croissance.

L'halotolérance manifestée en milieu minimum LAS pour certaines souches n'est pas améliorée par l'addition de G.B. Deux possibilités d'interprétation peuvent être évoquées:

- La G.B est transportée, son efficacité est comparable à celle des mécanismes endogènes. Par exemple, le NAGGN et le glucosylglycérol endogènes apportent ensemble une osmoprotection similaire à celle de la G.B chez *Pseudomonas* (Pocard et coll., 1994).

- Ou bien elle n'est pas transportée par déficience de l'équipement enzymatique.

Les propriétés osmoprotectrices du milieu MSY sont certaines et dépassent celles de la G.B dans de nombreux cas. Ce pouvoir est remarquable chez les souches où la G.B s'avère sans

effet. En effet, des osmoprotecteurs ont été détectés dans plusieurs milieux de culture complexes (Lucht et Bremer, 1994). La G.B, par exemple, est présente dans l'extrait de levure (Wohlfarth et coll., 1990). Le milieu nutritif MSY constitue, par conséquent, une source d'osmoprotecteurs et permet la croissance de *Rhizobium* en présence de sel. L'apport énergétique que présente ce milieu favoriserait le transport et l'accumulation des molécules osmoprotectrices. Une synergie entre ces dernières serait possible. En outre, les éléments nutritifs du milieu riche pourrait stimuler la synthèse d'osmolytes compatibles endogènes. Par exemple, la proline, la glutamine et l'arginine stimulent la synthèse et l'accumulation du glutamate chez *R meliloti* (Botsford et Lewis, 1990).

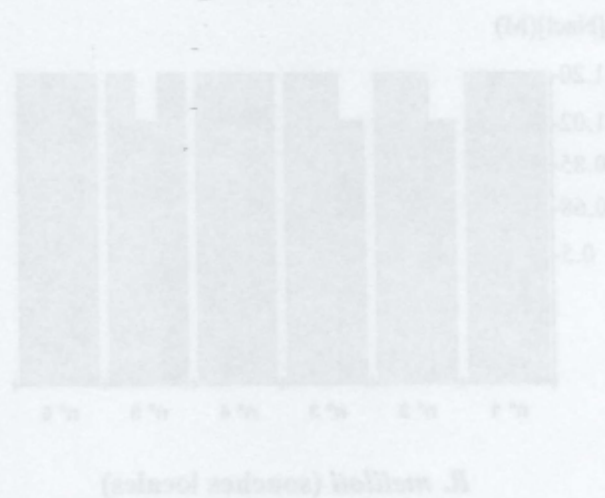


Fig. 16 : Concentrations maximales de NaCl tolérées par *Rhizobium meliloti* en présence d'extrait de levure et d'hydroxyéthylamine à 1.00 mg/l.

1-2- Effet osmoprotecteur d'extraits d'halophytes sur *Rhizobium*:

1-2-1- Résultats:

Les capacités osmoprotectrices des extraits d'halophytes sont très importantes et dépassent en général celles de la G.B et dans de nombreux cas celle du milieu riche.

Les extraits d'halophytes stimulent l'halotolérance qui atteint 1,20 M chez toutes les souches locales de *R. meliloti*. Ils permettent la croissance des souches de référence à 0,85 M NaCl à l'exception de *R. meliloti* 102F34. Celle-ci ne tolère guère une salinité supérieure à 0,68 M

Les souches U45 et CC1337 s'adaptent mieux à la salinité en présence des extraits et peuvent croître à 1,20 M NaCl (Fig. 16).

Toutefois, certaines remarques peuvent être formulées quant à la réponse individuelle aux extraits en présence de sel. L'osmoadaptation en présence d'extraits d'halophytes semble très hétérogène, elle varie selon la souche bactérienne, l'espèce végétale et le type d'extrait. L'effet osmoprotecteur des extraits aqueux peut être équivalent à celui des extraits hydroalcooliques (42% des cas) ou le dépasser (27,5% des cas). De plus, les extraits aqueux contiennent au départ du sel à des teneurs différant d'une plante à une autre, leurs pressions osmotiques varient de 91 (*Aeluropus littoralis* [b]) à 432 mOsm (*Halocnemum strobilaceum*) (Annexe 7), ce qui pourrait influencer les seuils d'halotolérance. Les deux dilutions des extraits hydroalcooliques (aux 1/100^{ème} et 1/200^{ème}) ont apporté la même osmoprotection dans 67,6% des cas, ceci signifie qu'à 1/200^{ème} les teneurs en osmoprotecteurs sont déjà efficaces.

Les extraits d'halophytes sont très efficaces chez les souches locales de *R. meliloti*. Les 19 halophytes testés ont permis leur croissance à une salinité élevée du milieu (de 1,02 à 1,20 M dans 94,7% des cas). Le seuil d'halotolérance le plus bas est de 0,68 M, il est observé en présence de *Plantago coronopus* (a) chez la souche n°5 (Fig. 17 a, b).

Les souches 102F34 et CC1335, les moins halotolérantes, présentent en présence de certains extraits d'halophytes une haloadaptation à 0,68 et à 0,85 M NaCl, respectivement. Faut-il rappeler que ces mêmes souches ne tolèrent que 0,50 M NaCl (en MSY). Concernant les autres souches de référence, les extraits leur apportent une osmoprotection jusqu'à une concentration saline de 1,02 à 1,20 M. La meilleure réponse est observée chez CC1337 en présence d'extraits de 18 halophytes (Fig. 18 a, b).



Fig. 17 b : Appréciation de l'osmoprotection chez *Rhizobium* (souches locales) en présence d'extraits d'halophytes aquatiques et hydralcooliques aux 1/100^{ème} et 1/200^{ème} et croissance inhibée, croissance non déterminée.

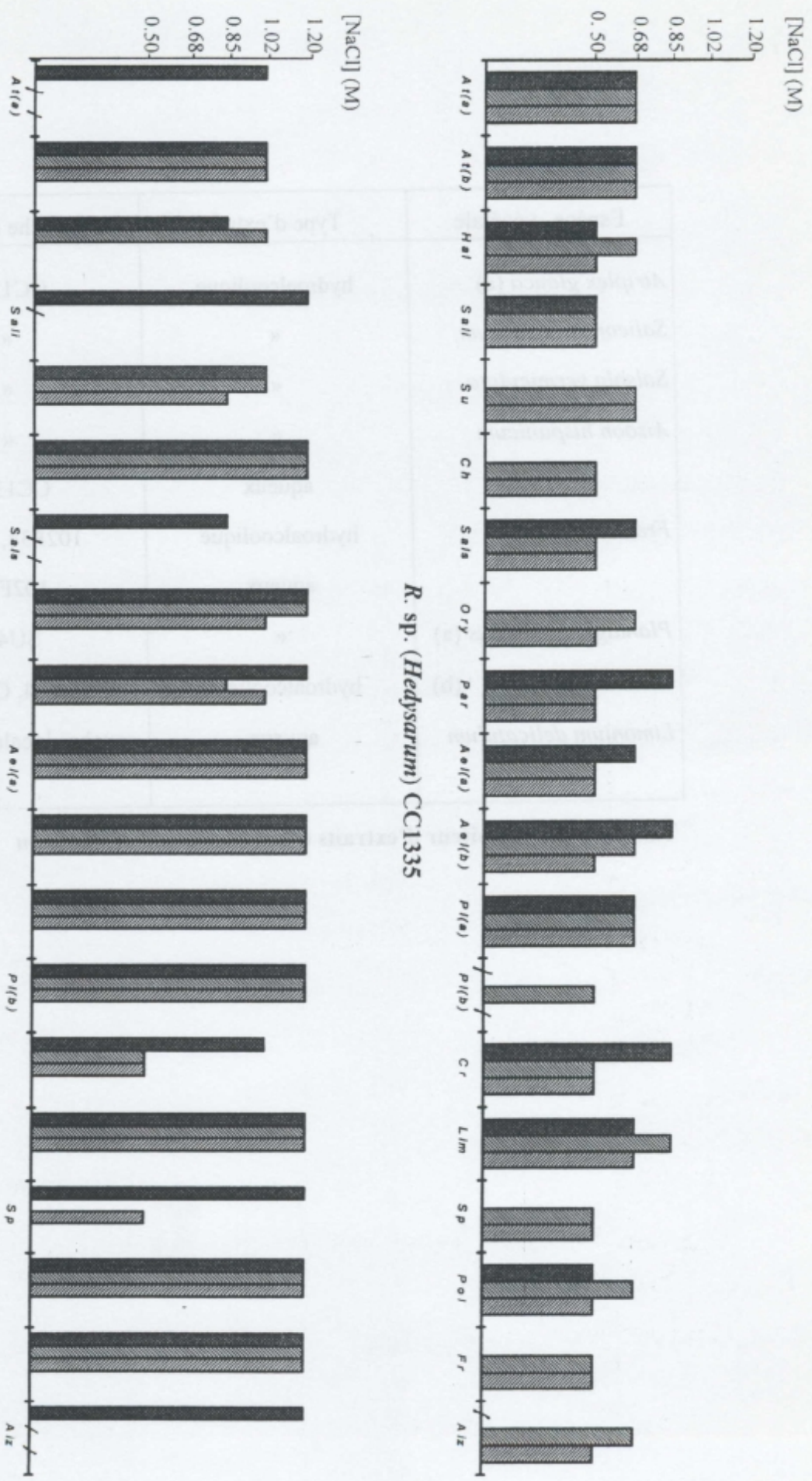


Fig. 18 b : Appréciation de l'osmoprotection chez *R. meliloti* (souches de référence) en présence d'extraits d'halophytes aqueux et hydroalcooliques aux 1/100^{ème} et 1/200^{ème} et croissance inhibée.

Toutefois, il est à souligner que la souche SU47 perd son halotolérance intrinsèque en présence de certains extraits tels ceux de *Chenopodium* sp., *Plantago coronopus* et *Spergularia marginata*.

Globalement (64%), les extraits des 19 halophytes ont permis la croissance des souches de *Rhizobium* (locales et de référence) à une salinité de 1,02 à 1,20 M. L'intensité de l'halotolérance bactérienne ne semble pas être liée à la qualité ou à la quantité d'osmoprotecteurs accumulés chez le végétal. En outre, les halophytes ont le même effet osmoprotecteur sur *Rhizobium* quelques soient la ceinture de végétation (*Atriplex glauca*, *Aeluropus littoralis*) ou le site de prélèvement (*Plantago coronopus*).

L'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne peut se présenter, il concerne 8 halophytes sur les 19 testés. Lorsqu'il se manifeste, cet effet est total, en absence ou en présence de sel. toutefois les souches de *Rhizobium* testées répondent différemment à ces 8 halophytes: un extrait peut inhiber une souche de *Rhizobium* mais pas l'autre. De plus, le facteur inhibiteur peut être véhiculé par l'extrait aqueux et/ou hydroalcoolique (Tab. 3).

1-2-2- Discussion:

Les extraits d'halophytes restaurent la croissance de *Rhizobium* en milieux à fortes salinités. Ils sont en général plus efficaces que la G.B et assurent (dans de nombreux cas) une osmoprotection dépassant celle du milieu riche. Leur effet est plus accentué chez les souches locales que chez celles de référence.

Par conséquent, les halophytes constituent une source d'osmoprotection pour *Rhizobium*. La G.B et la choline ont été, en effet, détectées chez les *Chenopodiaceae* et les *Gramineae* testés ainsi que chez *Cressa cretica*. La β -alaninebétaine et probablement la choline-O-sulfate sont accumulées par *Limonium delicatulum*. Ces molécules sont connues pour leur pouvoir osmoprotecteur chez les bactéries (Rhodes et Hanson, 1993) dont *Rhizobium* (Bernard et coll., 1986). La proline synthétisée à des taux importants chez la majorité des plantes analysées est également considérée comme molécule osmoprotectrice chez de nombreuses bactéries (Le Rudulier et coll., 1982). Cependant, Bernard et coll. (1986) ont rapporté que cet iminoacide est sans effet sur l'halotolérance des *Rhizobium* libres, ceux-ci l'utilisent plutôt comme source de carbone et d'azote (Miller et Wood, 1996).

Un fait important doit être souligné. Dans nos conditions expérimentales, certaines espèces végétales n'accumulant naturellement pas de composés -oniums permettent, toutefois une haloadaptation plus importante que celle manifestée en présence de G.B ou en milieu riche. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées:

- des molécules osmoprotectrices (connues ou non) n'ont pu être extraites ou détectées par la méthodologie suivie.

- *Rhizobium* développe-t-il une stratégie d'haloadaptation à partir de l'effet combiné (ou non) de substances diverses telles le saccharose, le mannitol, le pinitol et le sorbitol provenant de la plante?

- Sommes-nous en face d'un phénomène d'osmoprotection plus complexe mis en oeuvre par *Rhizobium*?

En outre, les extraits sont riches en acides aminés et éventuellement en autres éléments nutritifs qui favorisent la croissance bactérienne et stimuleraient la synthèse d'osmolytes compatibles endogènes comme ils pourraient constituer l'apport énergétique nécessaire au transport des molécules osmoprotectrices à partir du milieu.

La perte de l'halotolérance intrinsèque (SU47) en présence d'extraits de certains halophytes serait due à une répression des réponses osmorégulatrices au niveau enzymatique ou au niveau des gènes codant pour ces enzymes ou à la présence d'une substance devenant inhibitrice en présence de sel. L'indisponibilité du potassium qui constitue le second signal (après la turgescence) pour toute réponse osmorégulatrice est une autre hypothèse.

D'autre part, il est fort probable que certains extraits d'halophytes véhiculeraient des substances inhibant la croissance de *Rhizobium*. Des alcaloïdes cytotoxiques (Wu et coll., 1997), des isoflavanones à activité anti-bactérienne (Delle Monache et coll., 1996) ainsi que les tanins (polyphénols) connus pour leur pouvoir de précipiter les protéines (Zhu et coll., 1997) et d'inhiber la respiration bactérienne (Schimel et coll., 1996) ont été décrits chez les plantes. De plus, la synthèse de composés phénoliques constitue une réponse importante aux stress biotique et abiotique (Kraus et Spiteller, 1997).

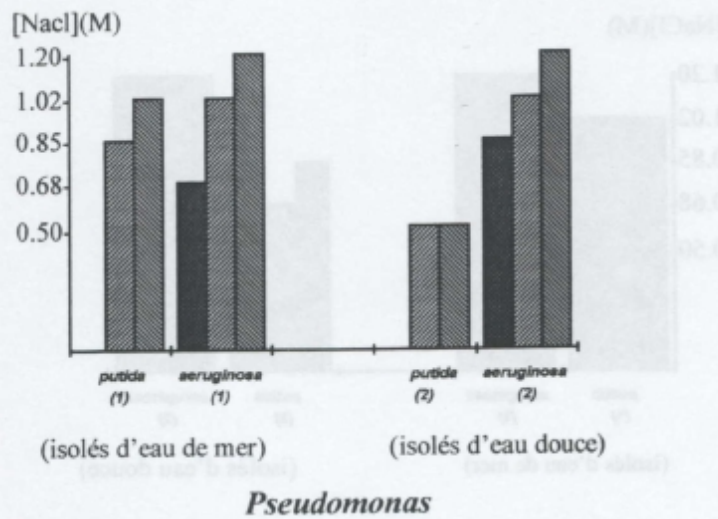
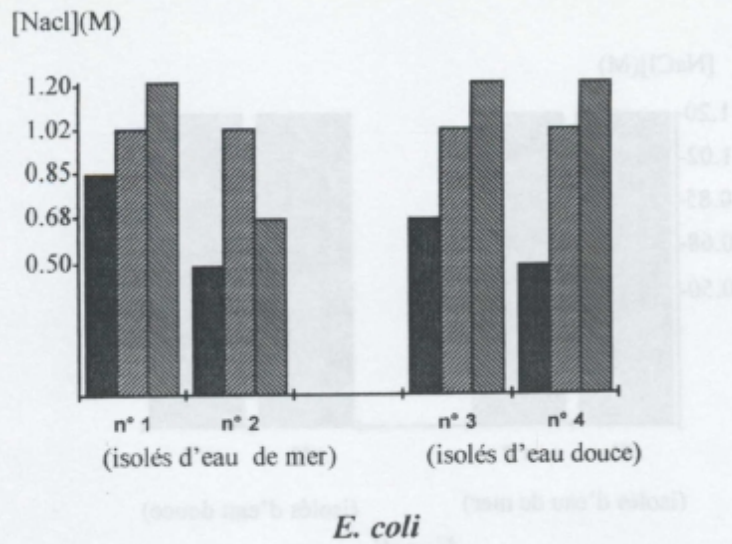


Fig. 19: Appréciation de la croissance de quelques souches de *E. coli* et de *Pseudomonas* en présence de NaCl dans les milieux LAS ■ LAS + GB ▨ et BTS ▩

2- Appréciation de l'halotolérance de *E. coli* et de *Pseudomonas*:

Parallèlement à l'étude de l'halotolérance de *Rhizobium*, des souches de *E. coli* et de *Pseudomonas* sont testées pour leur halotolérance en présence et en absence d'extraits d'halophytes. Les premières constituent l'indicateur de contamination fécale, les secondes sont ubiquitaires et connues pour leur pouvoir métabolique universel, leur importance dans le recyclage de la matière organique et la détoxification des polluants.

2-1- Résultats: (Fig. 19,20)

a- *E. coli*: (Annexes 1, 2, 3)

Toutes les souches testées de *E. coli* se développent en milieu minimum (LAS) à 0,50 M NaCl. Le seuil maximal d'halotolérance (0,85 M) est constaté chez la souche n°1 isolée d'eau de mer. L'addition de G.B améliore remarquablement cette halotolérance, elle permet la croissance des souches à une salinité plus élevée (1,02 M), qu'elles soient isolées d'eau de mer ou d'eau douce. Le milieu riche (BTS) est plus efficace que la G.B chez les trois souches (1,20 M), la quatrième (n°2) croît à une teneur saline moins élevée (0,68 M).

En se référant aux limites maximales d'halotolérance atteintes pour les deux types d'extraits, ceux-ci permettent la croissance des souches de *E. coli* à une concentration saline de 1,02 à 1,20 M dans la majorité des cas (90% des cas) avec un seuil minimal d'halotolérance de 0,85 M. Leur pouvoir osmoprotecteur est, en général, supérieur ou équivalent à celui de la G.B ou du milieu riche (BTS).

b- *Pseudomonas*: (Annexes 4, 5, 6)

En milieu minimum, une concentration saline de 0,50 M s'avère inhibitrice pour les souches de *P. putida* qu'elles soient isolées d'eau de mer ou d'eau douce. Celles de *P. aeruginosa* s'adaptent mieux à la salinité en ce milieu. En présence de G.B, la concentration maximale de NaCl tolérée augmente jusqu'à 0,85 (*P. putida* isolée d'eau de mer) et 1,02 M (*P. aeruginosa* n°1 et 2). Le pouvoir osmoprotecteur du BTS est plus accentué (*P. aeruginosa* et *P. putida* n°1) ou similaire à celui de la G.B (*P. putida* n°2).

Les souches de *P. aeruginosa* (d'origine marine ou d'eau douce) croissent en présence d'extraits d'halophytes à une salinité de 1,02 à 1,20 M. Celles de *P. putida* s'adaptent moins au sel en présence de ces extraits: l'halotolérance de la souche n°1 (isolée d'eau de mer)

est de 0,85 M NaCl en réponse à l'ensemble des extraits et atteint 1,02 M dans la majorité des cas (en présence de 12 halophytes sur 19), celle de la souche n°2 (isolée d'eau douce), son halotolérance est de 0,68 M (en présence de 15 halophytes) et peut atteindre 0,85 M dans certains cas.

Il est à remarquer que l'intensité de l'effet osmoprotecteur des extraits d'halophytes sur les souches de *E. coli* et *Pseudomonas* varie, comme pour *Rhizobium*, selon la souche bactérienne, l'espèce végétale et le type d'extrait (les effets osmoprotecteurs des extraits aqueux et des extraits hydroalcooliques ne sont pas toujours équivalents). Les deux dilutions des extraits hydroalcooliques (1/100^{ème} et 1/200^{ème}) ont apporté dans la majorité des cas la même osmoprotection. En outre, l'effet inhibiteur des extraits sur la croissance bactérienne observé chez *Rhizobium* est absent chez les souches de *E. coli* et *Pseudomonas*.

Toutefois, le nombre de souches testées permet juste de constater l'efficacité des extraits d'halophytes, les résultats ne peuvent être extrapolés quant à la réponse de telle ou telle espèce à ces extraits.

2-2- Discussion:

Les souches de *E. coli* et de *P. aeruginosa* s'adaptent aux conditions salines en absence d'apport exogène d'osmoprotecteurs (en milieu LAS): cette osmoadaptation est assurée par l'accumulation du potassium et de solutés compatibles endogènes. En plus de K⁺ et du glutamate, osmolytes bactériens ubiquitaires, *E. coli* synthétise le tréhalose (Ghoul, 1990 ; Strøm et Kaasen, 1993) et *Pseudomonas* accumule le dipeptide NAGGN (Pocard et coll., 1994) en réponse au stress osmotique. Le glucosylglycérol a été également rapporté comme soluté compatible endogène chez des espèces de *Pseudomonas* dont *aeruginosa* et *putida*. En outre, le mannitol, considéré comme osmolyte compatible uniquement chez les eukaryotes (champignons, levures, algues et plantes), a été récemment détecté chez *P. putida* S12 (Kets et coll., 1996).

Les souches de *P. putida* testées ne croissent pas à 0,50 M NaCl: leurs mécanismes endogènes d'osmorégulation sont inefficaces à cette salinité.

La G.B est un osmoprotecteur pour de nombreuses bactéries dont *E. coli* (Le Rudulier et Bouillard, 1983; Ghoul, 1990; Lucht et Bremer, 1994). Elle rétablit la croissance des souches testées en présence de sel (*E. coli* et *Pseudomonas*) mais d'une manière moins prononcée qu'en

BTS. Ce milieu complexe renferme en plus de la G.B d'autres molécules osmoprotectrices Dragendorff-positives (Ghoul, 1990) et constitue ainsi un apport important d'osmoprotecteurs et de nutriments.

L'effet osmoprotecteur des halophytes est également présent chez *E. coli* et *Pseudomonas*, les extraits permettent à ces souches une haloadaptation équivalente ou supérieure à celle apportée par la G.B ou le milieu riche. Ceci s'explique en partie par la présence d'osmoprotecteurs -oniums et la proline chez ces plantes. La G.B est en effet connue pour son pouvoir osmoprotecteur aussi bien chez *E. coli* (Csonka, 1989; Ghoul et coll., 1995; Kets et coll., 1996) que chez *P. aeruginosa* et *P. putida* (Ghoul, 1990). La proline stimule également mais moyennement la croissance de ces bactéries en présence de sel (Csonka, 1989; Pocard et coll., 1994; Le Rudulier, 1993; Le Rudulier et Bernard, 1986). Quant à la choline (précurseur de la G.B), elle n'est pas transportée en présence de la G.B dans le milieu de culture (Lamark et coll., 1992) et ne serait donc pas impliquée. Comme pour *Rhizobium*, les extraits de plantes constituent probablement un milieu complexe riche en nutriments divers (acides aminés, sucres, lipides...) favorisant la croissance des souches de *E. coli* et de *Pseudomonas* et éventuellement le transport des molécules osmoprotectrices à des quantités intracellulaires importantes et/ou la synthèse d'osmolytes compatibles endogènes. En effet, la synthèse de telles substances dépend de la composition du milieu de culture, le saccharose, par exemple, stimule l'accumulation du mannitol et de NAGGN chez *Pseudomonas putida* (Kets et coll., 1996). La synergie entre les différents solutés compatibles (exogènes et endogènes) serait également possible.

Les halophytes (débris et exsudats) libèrent des molécules osmoprotectrices qui peuvent être véhiculées par l'eau et permettent l'osmoprotection aux *Rhizobium* (bactérie du sol), *E. coli* (bactérie entérique) et *Pseudomonas* (bactérie ubiquitaire). A titre d'exemple, les eaux brutes de l'oued Bousselem assurent une remarquable osmoprotection à *E. coli* (Haichour, 1996).

Conclusion

Les plantes supérieures s'adaptent au stress osmotique du milieu extérieur par l'accumulation d'osmolytes organiques tels les composés -oniums (ammoniums quaternaires et leurs analogues sulfoniums tertiaires), la proline et les polyols.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux halophytes. Notre recherche a concerné, tout d'abord, la détection de composés -oniums et la proline chez 19 halophytes (plantes naturelles des zones salées) et la purification et l'identification des différents composés-oniums chez ces plantes. Ensuite, les extraits d'halophytes ont été testés pour leur effet osmoprotecteur sur des bactéries.

Les diverses étapes de purification des composés-oniums à partir d'extraits végétaux complexes et spécifiquement riches en sel se sont avérées complémentaires; elles ont assuré efficacement l'élimination de la chlorophylle, des acides aminés et surtout du sel.

Les substances purifiées sont identifiées par des techniques fiables, précises et sophistiquées, à savoir la spectrométrie de la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H) et la spectroscopie d'infra-rouge (IR) et ont attesté de l'extrême pureté des substances.

La glycine bétaine -l'ammonium quaternaire le plus répandu chez les plantes supérieures- est omniprésente chez les halophytes analysées (*Chenopodiaceae*, *Gramineae* et *Convolvulaceae*). Cette molécule est toujours accompagnée de faibles taux de choline (précurseur de la G.B). *Limonium delicatulum* (*Plumbaginaceae*) accumule deux composés Dragendorff-positifs: l'un est β -alaninebétarine, l'autre serait la choline-O-sulfate ou une nouvelle molécule non décrite et spécifique à cette espèce locale. Quant à la proline, elle existe chez toutes les espèces végétales mais à des teneurs variables.

Les halophytes apporteraient-ils de l'osmoprotection à *Rhizobium*, bactérie fixatrice d'azote prise comme modèle vu son importance économique?

Des extraits aqueux et hydroalcooliques (dilués aux $1/100^{\text{ème}}$ et $1/200^{\text{ème}}$) d'halophytes testés sur des souches de *R. meliloti* et de *R. sp. (Hedysarum)* ont restauré la croissance bactérienne en milieux à forte salinité. Leur effet osmoprotecteur est évident. Ils sont en général plus efficaces que la G.B et assurent, dans de nombreux cas, une osmoprotection dépassant celle du milieu riche (MSY). Leur efficacité est plus accentuée chez les souches locales que chez celles de référence et varie selon l'espèce végétale, la souche bactérienne et le type d'extrait. En outre, les osmoprotecteurs seraient présents dans les extraits à des concentrations importantes, au $1/200^{\text{ème}}$, celles-ci sont déjà efficaces.

Curieusement, certaines espèces végétales n'accumulent pas de composés -oniums

permettent, toutefois, une haloadaptation plus importante que celle manifestée en présence de

G.B ou de milieu riche. Des molécules stimulatrices des mécanismes endogènes

d'osmorégulation ou osmoprotectrices (connues ou non) seraient-elles à l'origine de cette

osmoprotection?

L'effet inhibiteur sur la croissance de *Rhizobium* est présent chez certaines plantes. Cet effet est spécifique vis-à-vis des souches et peut être véhiculé par l'extrait aqueux et /ou

Les halophytes apporteraient-ils de l'osmoprotection à *Rhizobium*, bactérie fixatrice d'azote prise comme modèle vu son importance économique?

Des extraits aqueux et hydroalcooliques (dilués aux 1/100^{ème} et 1/200^{ème}) d'allophytes testés sur des souches de *R. meliloti* et de *R. sp. (Hedysarum)* ont restauré la croissance bactérienne en milieux à forte salinité. Leur effet osmoprotecteur est évident. Ils sont en général plus efficaces que la G.B et assurent, dans de nombreux cas, une osmoprotection dépassant celle du milieu riche (MSY). Leur efficacité est plus accentuée chez les souches locales que chez celles de référence et varie selon l'espèce végétale, la souche bactérienne et le type d'extrait. En outre, les osmoprotecteurs seraient présents dans les extraits à des concentrations importantes, au 1/200^{ème}, celles-ci sont déjà efficaces.

Curieusement, certaines espèces végétales n'accumulant pas de composés -oniums permettent, toutefois, une haloadaptation plus importante que celle manifestée en présence de G.B ou de milieu riche. Des molécules stimulatrices des mécanismes endogènes d'osmorégulation ou osmoprotectrices (connues ou non) seraient-elles à l'origine de cette osmoprotection?

L'effet inhibiteur sur la croissance de *Rhizobium* est présent chez certaines plantes. Cet effet est spécifique *vis-à-vis* des souches et peut être véhiculé par l'extrait aqueux et /ou hydroalcoolique.

Le pouvoir osmoprotecteur des extraits d'allophytes est aussi observé chez *E. Coli* (indicateur de contamination fécale) et *Pseudomonas* (bactérie ubiquitaire). Les débris d'allophytes peuvent être disséminés dans l'environnement et favoriser la croissance de telles bactéries.

Les halophytes sont donc, une source d'osmoprotection pour *Rhizobium*. Ces résultats méritent d'être exploités en agriculture pour l'accroissement de l'halotolérance de *Rhizobium* dans les sols où la salinité constitue un facteur limitant de la microflore tellurique. L'étude préalable au laboratoire reste indispensable pour le choix du végétal et le type d'extrait.



Résumé

Les osmoprotecteurs -ammoniums quaternaires et sulfoniums tertiaires - sont isolés à partir d'halophytes appartenant à diverses familles végétales (*Chenopodiaceae*, *Gramineae*, *Plantaginaceae*, *Convolvulaceae*, *Plumbaginaceae*, *Caryophyllaceae*, *Polygonaceae*, *Frankeniaceae* et *Aizoaceae*) prélevées de différentes ceintures de végétation autour de sebkhas. La méthodologie de purification mise au point fait appel à diverses techniques chromatographiques: CCM, Chromatographie échangeuse de cations et chromatographie sur papier. La RMN-¹H et l'I.R. ont attesté de la pureté de telles molécules et ont permis leur identification. Il s'agit de la glycine bétaine chez les *Chenopodiaceae*, les *Graminae* et *Cressa cretica* (*Convolvulaceae*), la β -alanine bétaine et probablement la choline-O-sulfate chez *Limonium delicatulum* (*Plumbaginaceae*).

La proline est présente à des teneurs variables chez l'ensemble des plantes.

Des extraits aqueux et hydroalcooliques d'halophytes testés sur des souches de *Rhizobium meliloti* et *R. sp. (Hedysarum)* ont restauré la croissance bactérienne en milieux à fortes salinités. Leur effet osmoprotecteur est évident et dépasse, en général, celui de la glycine bétaine. L'efficacité des extraits varie selon l'espèce végétale, la souche bactérienne et le type d'extrait.

Accessoirement, l'effet osmoprotecteur de tels extraits sur *E. coli.* et *Pseudomonas* a été démontré.

الملخص:

تم عزل الجزئيات الواقية من الضغط الأسموزي (مركبات الأونيوم - oniums) من نباتات ملحية تنتمي إلى عدة

عائلات (*Plumbaginaceae* و *Convovulaceae* و *Plantaginaceae* و *Gramineae* و *Chenopodiaceae*)

و (*Caryophyllaceae* و *Polygonaceae* و *Frankeniaceae* و *Aizoaceae*) جمعت من السبخات، وذلك بواسطة

تقنيات كروماتوغرافية عديدة تتمثل في كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة و كروماتوغرافيا التبادل الأيوني و الكروماتوغرافيا

الورقية . أعطت طريقة الفصل المعتمدة جزئيات على درجة عالية من النقاوة ، هذا ما أثبتت بالأشعة تحت الحمراء و بالتردد

المغناطيسي النووي للهيدروجين . الأمر يتعلق ب glycine bétaine عند *Gramineae* و *Chenopodiaceae*

و *Cressa cretica* (*Convovulaceae*) و ب β -alanine bétaine و ربما choline-O-sulfate عند

• (*Plumbaginaceae*) *Limonium delicatulum*

أما فيما يخص الـ proline، فهذا الحمض الأميني موجود بتراكيز متفاوتة عند كل النباتات المدروسة .

اكتبرت المستخلصات المائية و الكحولية لهذه النباتات على عدة سلالات من بكتيريا *Rhizobium meliloti*

و (*Hedysarum*) *R. sp.* في وجود تراكيز ملحية عالية فكان دورها في الوقاية من الضغط الأسموزي أكيدا و أكثر فعالية من

glycine bétaine على وجه العموم، و تجدر الإشارة إلى أن فعالية المستخلصات تختلف حسب النوع النباتي و السلالة البكتيرية

و كذلك طبيعة المستخلص . و قد أثبت أيضا مفعول هذه المستخلصات على بكتيريا *E. coli* و *Pseudomonas*.

Références bibliographiques

- Al-Rashidi, R. K., T. E. Loynachan et L. R. Frederick.** 1982. Dessication tolerance of four strains of *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.* **14**: 489-493.
- Andolfatto, P., A. Bornhouser, H. J. Bohnert et J. C. Thomas.** 1994. Transformed hairy roots of *Mesembryanthemum crystallinum*: gene expression patterns upon salt stress. *Physiologia Plantarum* **90**: 708-714.
- Anthoni, U., C. Christophersen, L. Hougaard et P. H. Nielson.** 1991. Quaternary ammonium compounds in the biosphere- an example of a versatile adaptive strategy. *Comp. Biochem. Physiol.* **99B**:1-18.
- Balsamo, R. A. et W. W. Thomson.** 1995. salt effects on membranes of the hypodermis cells of *Avicennia germinans* (*Avicenniaceae*): a freeze-fracture study. *Amer. J. Bot.* **82**: 435-440.
- Batanouny, K. H.** 1993. Adaptation of plants to saline conditions in arid regions, p. 387-401. *In* H. Lieth and A. Al Masoom (ed.), *Towards the rational use of high salinity tolerant plants*, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Berger, A.** 1978. L'alimentation en eau en milieu salé. *Soc. Bot. Fr. Actualités Botaniques N°3-4*: 159-176.
- Bernard, T., J.-A. Pocard, B. Perroud et D. Le Rudulier.** 1986. Variation in the response of salt stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.* **143**: 359-364.
- Binet, P.** 1978. Introduction: caractéristiques physiologiques liés à l'halophilie et à la résistance aux sels. *Soc. Bot. Fr. Actualités Botaniques N°3-4*: 73-93.
- Blunden, G., M. M. El-Barouni, S. M. Gordon, W. F. H. McLean et D. J. Rogers.** 1981. Extraction, purification and characterization of Dragendorff-positive compounds from some british marine algae. *Bot. Mar.* **24**: 451- 456.
- Blunden, G. et S. M. Gordon.** 1986. Betaines and their sulfonio analogues in marine algae. *Prog. Physiol. Res.* **4**: 39-80.
- Blunden, G., S. M. Gordon, W. F. H. McLean et M. D. Guiry.** 1982. The distribution and possible taxonomic significance of quaternary ammonium and other Dragendorff-positive compounds in some genera of marine algae. *Bot. Mar.* **25**: 563-567.
- Bohnert, H. J., J. C. Thomas, E. J. De Rocher, C. B. Michalowski, H. Breiteneder, D. M. Vernon, W. Deng, S. Yamada et R. G. Jensen.** 1994. Responses to salt stress in the halophyte *Mesembryanthemum cristallinum*, p. 415-428. *In* J. H. Cherry (ed.), *Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants*, NATO ASI Series, Vol. H86. Springer-Verlag, Berlin, Hedelberg.
- Botsford, J. L.** 1984. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. *Arch. Microbiol.* **137**: 124-127.
- Botsford, J. L. et T. A. Lewis.** 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response of osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 488-494.

- Boucaud, J. et I. A. Ungar.** 1978. Halophilie et résistance au sel dans le genre *Suaeda* Forsk. Soc. Bot. Fr. Actualités Botaniques. N°3-4: 23-35.
- Canovas, D., C. Vargas, L. N. Csonka, A. Ventosa et J. J. Nieto.** 1996. Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. J. Bacteriol. 178: 7221-7226.
- Cayley, S., B. A. Lewis et M. T. Record.** 1992. Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 174: 1586-1595.
- Chambers, S. T., C. M. Kunin, D. Miller et A. Hamada.** 1987. Dimethylthetin can substitute for glycine betaine as an osmoprotectant molecule for *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 4845-4847.
- Chaturvedi, V., A. Bartiss et B. Wong.** 1997. Expression of *mtd* in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. J. Bacteriol. 179: 157-162.
- Christian, J. H. B.** 1955. The water relation of growth and respiration of *Salmonella oranienburg* at 30°C. Aust. J. Biol. Sci. 8: 75-82.
- Chrominski, A., S. Halls, D. J. Weber et B. N. Smith.** 1988. Proline affects ACC ethylene conversion under salt and water stresses in the halophyte *Allenrolfea occidentalis*, p. 213-214. Proceeding of the 15th Annual Meeting of Plant Growth Regulator. Society of America. San Antonio, Texas.
- Ciula, R. A., M. R. Diaz, B. F. Taylor et M. F. Roberts.** 1997. Organic osmolytes in aerobic bacteria from Monolake, an alkaline, moderately hypersaline environment. Appl. Environ. Microbiol. 63: 220-226.
- Clipson, N. J. W., A. D. Tomos, T. J. Flowers et R. G. Win Jones.** 1985. Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* L. Durum.: the maintenance of turgor pressure and water-potential gradients in plants growing at different salinities. Planta 165: 392-396.
- Colmer, T. D., T. W. M. Fan, A. Läuchli et R. M. Higashi.** 1996. Interactive effects of salinity, nitrogen and sulphur on the organic solutes in *Spartina alterniflora* leaf blads. J. Exp. Bot. 47: 369-375.
- Csonka, L. N.** 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 182: 82-86.
- Csonka, L. N.** 1988. Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: effect of osmotic stress on synthesis, degradation and cellular retention of proline. J. Bacteriol. 170: 2374-2378.
- Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. 53: 121-147.

- Csonka, L. N. et W. Epstein.** 1996. Osmoregulation, p. 1210-1223. *In* F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magsanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Csonka, L. N., S. B. Gelvin; B. W. Goodner, C. S. Orser, D. Siemieniak et J. L. Slightom.** 1988. Nucleotide sequence of a mutation in the *proB* gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene* **64**: 199-205.
- Csonka, L. N. et A. D. Hanson.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**: 569--606.
- Csonka, L. N., T. P. Ikeda, S. A. Fletcher et S. Kustu.** 1994. The accumulation of glutamate is necessary of optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolality but not induction of the *proU* operon. *J. Bacteriol.* **176**: 6324-6333.
- Dalton, H.** 1980. The cultivation of diazotrophic microorganisms, p. 14-64. *In* F. J. Bergersen (ed.), *Methods of evaluating biological fixation*. John Wiley & Sons Ltd.
- Delle Monache, G., B. Botta, V. Vinciguerra, J. F. De Mello et A. A. Chiapetta.** 1996. Antimicrobial isoflavanones from *Desmodium canum*. *Phytochemistry* **41**: 537-544.
- Douka, O. E., A. C. Xenoulis et T. Paradellis.** 1984. Salinity tolerance of a *Rhizobium meliloti* strain isolated from salt affected soils. *Folia Microbiol.* **29**: 316-324.
- Druger-Liotta, J., V. J. Parange, D. G. Overdier et L. N. Csonka.** 1986. Selection of mutations that alter the osmotic control of transcription of the *Salmonella typhimurium proU* operon. *J. Bacteriol.* **169**: 2449-2459.
- Elliot, R. S. et D. L. Gardner.** 1976. A comparison of acid ninhydrin and isatin methods for measurement of proline in collagen hydrolysates. *Biochem. Soc. Trans.*, 2. p. 741-743.
- El-Sheikh, E. A. E. et M. Wood.** 1990. Rhizobia and bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. *Lett. appl. Microbiol.* **10**: 127-129.
- Evans, L. S. et W. A. Tramontano.** 1984. Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes. *Phytochemistry* **23**: 1837-1840.
- Falkenberg, P. et A. Strøm.** 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**: 253-259.
- Flores, H. E.** 1990. Polyamines and plant stress, p. 217-238. *In* *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. Wiley-Liss, Inc.
- Flores, H. E., C. M. Protatio et M. W. Signs.** 1989. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants, p. 329-391. *In* J. E. Poulton, J. T. Romeo and E. E. Conn (ed.), *Recent advances in phytochemistry*, Vol. 23. Plenum press, New York & London.

- Flowers, T. J., M. A. Hajibagueri et N. J. W. Clipson.** 1986. Halophytes. *Quarterly Rev. Biol.* **61**: 167-171.
- Flowers, T. J., P. F. Troke et A. R. Yeo.** 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. plant Physiol.* **28**: 89-121.
- Fougère, F. et D. Le Rudulier.** 1990. Uptake of glycine betaine and its analogues by bacteroids of *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 157-163.
- Fougère, F., D. Le Rudulier et J. G. Streeter.** 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **96**: 1228-1236.
- Fred, E. B. et S. A. Waksman.** 1928. Laboratory manual of général microbiology, with spécial reference to the microorganisms of the soil. McGraw-Hill, New York.
- Galinski, E. A., H. P. Pfeiffer et H. G. Truper.** 1985. 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid, a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem.* **149**: 135-139.
- Garcia-Rios, M. G., L. N. Csonka, R. A. Bressan, P. C. Larosa et J. Hanquier.** 1994. Cloning of DNA fragment encoding γ -glutamyl kinase and γ -glutamyl phosphate reductase from a tomato cDNA library, p. 245-254. In J. H. Cherry (ed.), *Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants*. NATO ASI Series. Vol. H86. Springer, Berlin, Hedelberg.
- Ghoul, M.** 1990. Halotolerance de *Escherichia coli*: effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de Doctorat. Université de Rennes I, France.
- Ghoul, M., J. Minet, T. Bernard, E. Dupray et M. Cormier.** 1995. Marine macroalgae as a source for osmoprotection for *Escherichia coli*. *Microb. Ecol.* **30**: 171-181.
- Goldmann, A., C. Bovin, V. Fleury, B. Message, L. Lecoeur, M. Maille et D. Trepfer.** 1991. Betaine use by rhizosphere bacteria: genes essential for trigonelline, stachydrine and carnitine catabolisme in *Rhizobium meliloti* on pSym in the symbiotic region. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **4**: 571-578.
- Gorham, J., L. L. Hugles et R.G. Wyn Jones.** 1980. Chemical composition of salt marsh plants from Ynys Mon (Anglesey): the concept of physiotypes. *Plant cell Environn.* **3**: 309-318.
- Greenwy, H.** 1973. Salinity, plant growth and metabolism. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* March: 24-34.
- Greenwy, H. et R. Munns.** 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.

- Greenwy, H. et R. Munns et J. Gibbs.** 1982. Effects of accumulation of 3-O-methylglucose on levels of endogenous osmotic solutes in *Chlorella emersonii*. *Plant Cell Environ.* **5**: 405-412.
- Grieve, C. M. et S. R. Grattan.** 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant soil* **70**: 303-307.
- Grieve, C. M. et E. V. Maas.** 1984. Betaine accumulation in salt-stressed sorghum. *Physiol. Plant* **61**: 167-171.
- Guy, R. D., P. G. Wasuc et D. M. Reid.** 1984. Glycine bétaine content of halophytes: improved analysis by liquid chromatography and interpretation of results. *Physiol. Plant* **61**: 195-202.
- Haardt, M., B. Kempf, E. Faatz et E. Bremer.** 1995. The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependant transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 783-786.
- Haichour, N.** 1996. Effet du sel sur la sélection de la flore bactérienne totale et des coliformes des eaux de rivières de la région de Sétif. Thèse de Magister. Université de Sétif.
- Hamza, M.** 1980. Réponses des végétaux à la salinité. *Physiol. vég.* **18**: 69-81.
- Hanson, A. D., B. Rathinasabapathi, B. Chamberlin et D. A. Gage.** 1991. Comparative physiological evidence that β -alanine betaine and choline-O-sulfate act as compatible osmolytes in halophytic *Limonium* species. *Plant Physiol.* **97**: 1199-1205.
- Herbst, B., S. Kneip et E. Bremer.** 1994. pOSEX: vectors of osmotically controlled and finely turned gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **151**: 137-142.
- Hodson, M. J., M. M. Smith, S. T. Wainwright et H. Opik.** 1985. The effect of the interaction between salinity and nitrogen limitation in *Agrostis stolonifera* L. *Vegetatio* **61**: 255-263.
- Hori, k., T. Yamamoto, K. Miyazawa et K. Ito.** 1979. Distribution of quaternary ammonium bases in seven species of marine algae. *J. Fac. Appl. Biol. Sci.* **18**: 65-73.
- Hua, S.-S., V. Y. Tsai, G. M. Lichens et A. T. Noma.** 1982. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 135-140.
- Hutkins, R. W., W. L. Ellefson et E. R. Kashket.** 1987. Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2275-2281.
- Imhoff, J. F.** 1986. Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 57-66.

- Jebbar, M., R. Talibart, K. Gloux, T. Bernard et C. Blanco.** 1992. Osmoregulation of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J. Bacteriol.* **174**: 5027-5035.
- Jeschke, W. D., Z. Aslam et H. Greenway.** 1986. Effects of NaCl on ion relations and carbohydrate status of roots and on osmotic regulation of roots and shoots of *Atriplex amnicola*. *Plant Cell Environ.* **9**: 559-569.
- Joyce, P. S., L. G. Paleg et A. D. Aspinall.** 1984. The requirement for low intensity light in the accumulation of proline as a response to water deficit. *J. Exp. Bot.* **35**: 209-219.
- Jones, G. P., B. P. Naidu, R. K. Starr et L. G. Paleg.** 1986. Estimates of solutes in plants by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**: 649-658.
- Jones, M. M., C. B. Osmond et N. C. Turner.** 1980. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Aust. J. Plant Physiol.* **7**: 193-205.
- Kaasen, I., P. Falkenberg, O. B. Styrvold et A. R. Strøm.** 1992. Molecular cloning and mapping of the *otsBA* genes which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *J. Bacteriol.* **174**: 889-898.
- Kefu, Z., R. Munns et R. W. King.** 1991. Abscisic acid levels in NaCl-treated barley, cotton and saltbush. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**: 17-24.
- Kets, E. P. W., E. A. Galinski, M. Dewit, J. A. M. De Bont et H. J. Heipieper.** 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* **178**: 6665-6670.
- Kleinkopf, G. E., A. Wallace et J. W. Cha.** 1975. Sodium relation in desert plants: 4- Some physiological responses of *Atriplex confertifolia* to different levels of sodium chloride. *Soil Sci.* **120**: 45-48.
- Ko, R., L. T. Smith et G. M. Smith.** 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **176**: 426-431.
- Kraus, C. et G. Spiteller.** 1997. Comparison of phenolic compounds from galls and shoots of *Picea glauca*. *Phytochemistry* **44**: 59-67.
- Kurt, R.** 1971. Chromatographie sur couche mince. p. 398. Gauthier-Villars, paris.
- Kushner, D. G.** 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, p. 317-368. *In* D. G. Kushner (ed.), *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London.
- Lamark, T., O. B. Styrvold et A. R. Strøm.** 1992: Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 149-154

Landfald, B. et A. R. Strøm. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.

Larher, F., J. Hamelin et P. Stewart. 1977. L'acide diméthyl-sulfonio-3-propionique de *Spartina anglica*. *Phytochemistry* **16**: 2019-2020.

Larsen, H. 1962. Halophilism, p. 297-342. *In* I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (ed.), *The bacteria*. Academic Press, N. W.

Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 3-7.

Larsen, P. I., L. K. Sydnes, B. Landfald et A. R. Strøm. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic solutes: betaines, glutamic acid and trehalose. *Arch. Microbiol.* **147**: 1-7.

Le Houérou, H. N. 1993. Salt tolerant plant for the arid regions of the mediterranean isoclimatic zones, p. 403-422. *In* H. Lieth and A. Al Masoom (ed.), *Toward the rational use of high salinity tolerant plants*, Vol. 1. Kluwer Publishers, Netherlands.

Le Rudulier, D. 1993. Elucidation of the role of osmoprotective compounds and osmoregulatory genes: the key role of bacteria, p. 313-322. *In* H. Lieth and A. Al Masoom (ed.), *Towards the rational use of high salinity tolerant plants*, Vol. 1. Kulwer Academic Publishers, Netherlands.

Le Rudulier, D. et T. Bernard. 1986. Salt tolerance in *Rhizobium*: a possible role for betaines. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 67-72.

Le Rudulier, D., T. Bernard et G. Goas. 1984 a. Osmoregulation in *Klebsiella pneumoniae*: enhancement of anaerobic growth and nitrogen fixation under stress by proline betaine, γ -butyrobetaine and other compounds. *Can. J. Microbiol.* **30**: 299-305.

Le Rudulier, D., T. Bernard, J.-A. Pocard et G. Goas. 1983. Accroissement de l'osmotolérance chez *Rhizobium meliloti* par la glycine betaine et la proline betaine. *C. R. Acad. sci. Paris* **297**: 155-160.

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

Le Rudulier, D., K. Gloux et N. Riou. 1991. Identification of an osmotically induced periplasmic glycine betaine binding protein from *Rhizobium meliloti*. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**: 197-205.

Le Rudulier, D. et J.-A. Pocard. 1991. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: control of glycine betaine synthesis and catabolism, p. 98-96. *In* F. Rodriguez-Valera (ed.), *General and applied aspects of halophilic microorganisms*. Plenum press, New York.

- Le Rudulier, D., A. R. Strøm, A. M. Dandekar, L.T. Smith et R. C. Valentine.** 1984b. Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.
- Le Rudulier, D., S.-S. Yang et L. N. Csonka.** 1982. Nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* during osmotic stress: effect of exogenous proline or overproducing plasmid. *Biochim. Biophys. Acta* **719**: 273-283.
- Lucht, J. M. et E. Bremer.** 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 3-20.
- Mahmood, K. et K. A. Malik.** 1986. Studies on salt tolerance of *Atriplex undulata*, p. 149-155. In R. Ahmed and A. San Pietro (ed.), *Prospects for biosaline Research*. Karachi Univ. ,Pakistan.
- Mahmood, K. et K. A. Malik.** 1987. salt tolerance studies on *Atriplex rhagodioides* F. Muell. *Environ. Exp. Bot.* **27**: 119-125.
- Malin, G. et A. Lapidot.** 1996. Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J. Bacteriol.* **178**: 385-395.
- May G., E. Faatz, M. Villagero et E. Bremer.** 1986. Binding protein dependant transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 225-233.
- McNulty, I. B.** 1985. Rapid osmotic adjustment by a succulent halophyte to saline shock. *Plant Physiol.* **78**: 100-103.
- Mellor, R. B.** 1992; Is trehalose a symbiotic determinant in symbioses between higher plants and microorganisms? *Symbiosis* **12**: 113-129;
- Meury, J.**1988. Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **149**: 232-239.
- Miller, K. J. et J. M. Wood.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136.
- Morgan, J. M.** 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 299-319.
- Muller, E. K., Fahlbush, R. Walther et G. Gottschalk.** 1981. formation of N-, N-dimethylglycine, acetic acid and butyric acid from betaine by *Eubacterium limosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 724-730.
- Munro, G. F., K. Hercules, J. Morgan et W. S. Sauerbier.** 1972. Dependence of the putrescine content of *Escherichia coli* on the osmotic strength of the medium. *J. Biol. Chem.* **247**: 1272-1280.

- Naidu, B. P., L. G. Paleg, G. P. Jones. et A. Poljakoff-Mayber.** 1987. Proline analogues in *Melaleuca species*: response of *Melaleuca lanceolata* and *M. uncinata* to water stress and salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 669-677.
- Naidu, B. P., L. G. Paleg et G. P. Jones.**1992. Nitrogenous compatible solutes in drought-stressed *Medicago* spp. *Phytochemistry* **31**: 1195-1197.
- Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham et M. Schaechter.** 1994. Les effets de la temperature, de la pression et du pH, p. 209-225. *In* *Physiologie de la cellule bacterienne: une approche moleculaire.* Masson, Paris, Milan, Barcelone.
- Nguyen, S. T. et R. Paquin.** 1971. Méthodes d'extraction et de purification des acides aminés libres et des protéines de tissus végétaux. *J. Chromatog. Stress in Problem Soils.* Cornell Univ. Agric. Exp. Stn.
- Ogahara, T., M. Ohno, M. Takayama, K. Igarashi et H. Kobayashi.** 1995. Accumulation of glutamate by osmotically stressed *Escherichia coli* is dependant on pH. *J. Bacteriol.* **177**: 5978-5990.
- Ohwada, T. et S. Sagisaka.** 1988. The differential roles of potassium, proline and betaine in osmoregulation of *Escherichia coli*. *B. Agric. Biol. Chem.* **52**: 313-320.
- Ohwada, T., S. Sagisaka et T. Sato.** 1994. An exclusive increase in the concentration of ATP as a result of osmotic stress in *Escherichia coli* B. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1512-1513.
- Ollivier, B., P. Caumette, J. L. Garcia et R. A. Mah.** 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**: 17-38.
- Overdier, D. G. et L. N. Csonka.** 1992. A transcriptional silencer downstream of the promoter in the osmotically controlled *proU* operon of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 3140-3144.
- Paquin, R. et P. Le Chasseur.** 1979. Observation sur une méthodes de dosage de la proline dans les extraits de plantes. *Can. J. Bot.* **57**: 1851-1854.
- Parameshwara, G., L. G. Paleg, D. Aspinal et G. P. Jones.**1988. Solute accumulation in alfalfa in response to environmental stress, p. 1014-1021. *In* S. K. Sinha, P. V. Sane, S. C. Bhargava and P. K. Agrawal (ed.), *Proceedings of the International Congress of Plant Physiology*, Vol. 2. New Delhi, India.
- Perroud, B. et D. Le Rudulier.** 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**: 393-401.
- Philips, O. A., C. M. Joseph et C. A. Maxwell.** 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **99**: 1526-1531.

Pocard, J.-A., T. Bernard, G. Goas et D. Le Rudulier. 1984. Restauration partielle, par la glycine betaine et la proline betaine, de l'activité fixatrice d'azote de jeunes plantes de *Medicago sativa* L. soumises à un stress osmotique. C. R. Acad. Sci. Paris **298**: 4770-4780.

Pocard, J.-A., T. Bernard, L. T. Smith et D. Le Rudulier. 1989. Characterization of the choline transport activities in *Rhizobium meliloti*: modulation of choline and osmotic stress. **171**: 531-537.

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

Poljacoff-Mayber, A. D., E. Symon, G. P. Jones, B. P. Naidu et L. G. Paleg. 1987. Nitrogenous compatible solutes in native south Australian plants. Aust. J. Plant Physiol. **14**: 341-350.

Polonenko, O. R., C. I. May-Field et E. B. Dumbroff. 1986. Microbial responses to salt-induced osmotic stress. V. Effects of salinity on growth displacement of soil bacteria. Plant Soil. **92**: 417-425.

Popp, M. 1995. II- Salt resistance in herbaceous halophytes and mangroves. Pro. Bot. **56**: 416-429.

Potts, M. 1994. Dessication tolerance of prokaryotes. Microbiol. Rev. **58**: 759-805.

Ragab, M. 1993. Distribution pattern of soil microbial population in salt affected soils, p. 467-472. In H. Lieth and A. Al Masoom (ed.), Toward the rational use of high salinity tolerant plants, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Randall, K., M. Lever, B. A. Peddie et S. T. Chambers. 1996. Natural and synthetic betaines counter the effects of high NaCl and urea concentrations. Biochim. Biophys. Acta **1291**: 189-194.

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

Robinson, S. P. 1985. Osmotic adjustment by intact isolated chloroplasts in response to osmotic stress and its effect on photosynthesis and chloroplast volume. Plant Physiol. **79**: 996-1002.

Robinson, S. P. et W. J. S. Downton. 1985. potassium, sodium and chloride ion concentrations in leaves and isolated chloroplasts of the halophyte *Suaeda australis* R. Br. Aust. J. Plant Physiol. **12**: 471-479.

Robinson, S. P. et G. P. Jones. 1986. Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. Aust. J. Plant Physiol. **13**: 659-668.

Roth, W. G., M. P. Leckie et D. N. Dietzler. 1985. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 434-41.

Sauvage, D., J. Hamelin et F. Larher. 1983. Glycine betaine and other structurally related compounds improve salt tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant Sci. Lett.* **31**: 291-302.

Schimel, J., P. K. V. Cleve, R. G. Cates, T. P. Chausen et B. P. Reichard. 1996. Effects of balsam poplar (*Populus balsamifera*) tannins and low molecular weight phenolics on microbial activity in taiga floodplain soil: implication for changes in N cycling succession. *Can. J. Bot.* **74**: 84-90.

Schobert, B. 1977. Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *J. Theor. Biol.* **68**: 17-26.

Sciuto, S., R. Chillemi, R. Morrone, A. Patti et M. Piattelli. 1989. Dragendorff-positive compounds in some Mediterranean red algae. *Biochem. Systematic Ecol.* **17**: 5-10.

Sheikh, K. M. et K. Mahmood. 1986. Some studies on field distribution and seed germination of *Suaeda fruticosa* and *Sporobolus arabicus* with reference to salinity and sodicity of the medium. *Plant Soil* **94**: 333-340.

Shrestha, T. et N. Bisset. 1991. Quaternary nitrogen compounds from south American *Moracea*. *Phytochemistry* **30**: 3285-3287.

Singh, T. N., D. Aspinall et L. G. Paleg. 1972. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature (London)* **236**: 188-190.

Smith, L. T., A. A. Allaith et G. M. Smith. 1994 a. Mechanisms of osmotically regulated N-acetylglutaminylglutamine amide production in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil* **161**: 103-108.

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

Smith, L. T. et G. M. Smith. 1989. An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **171**: 4714-4717.

Smith, L. T., G. M. Smith, M. D'ssouza, J.-A. Pocard, D. Le Rudulier et M. A. Madkour. 1994 b. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: mechanism and control by other environmental signals. *J. Exp. Zool.* **268**: 162-165.

Solomon, A., S. Beer, Y. Waisel, G. P. Jones et L. G. Paleg. 1994. Effects of NaCl on the carboxylating activity of rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. *Physiologia Plantarum* **90**: 198-204.

Speed, D. et M. Richardson. 1968. Chromatographic methods for the isolation and identification of the products of choline oxidation. *J. Chromatog.* **35**: 497-505.

Spyropoulos, C. 1986. Osmoregulation, growth and sucrose accumulation in germinated *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds treated with polyethylene glycol. *Physiol. Plant* **68**: 129-135.

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

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

Styrvoid, O. B. et A. R. Strøm. 1992. Synthesis, accumulation and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppression and function of the periplasmic trehalase. *J. Bacteriol.* **173**: 1187-1192.

Talibart, R., M. Jebbar, G. Gousbet, S. Himdi-Kabbab, H. Wroblewski, C. Blanco et T. Bernard. 1994. Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J. Bacteriol.* **176**: 5210-5217.

Thiyagarajah, M., S. C. Fry et A. R. Yeo. 1996. In vitro salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. *J. Exp. Bot.* **47**: 1717-1724.

Thomas, J. C., R. L. De Armond et H. J. Bohnert. 1992. Influence of NaCl on growth, proline and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol.* **98**: 626-631.

Tiburcio, A. F., R. Kaur-Sawhney et A. W. Galston. 1986. Polyamines metabolism and osmotic stress. II- Improvement of oat protoplasts by an inhibitor of arginine decarboxylase. *Plant Physiol.* **82**: 375-378.

Tramontano, W. A., P. A. McGinley, E. F. Ciancaglini et L. S. Evans. 1986. A survey of trigonelline concentrations in dry seeds of the *Dicotyledoneae*. *Environ. Exp. Bot.* **26**: 197-205.

Tu, J. C. 1981. Effect of salinity on *Rhizobium*-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* **61**: 231-139.

Turner, N. C. 1986. Adaptation to water stress: a changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**: 175-190.

Turner, N. C. et M. M. Jones. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation, p. 87-103. In N. Turner and P. J. Kramer (ed.), *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Wiley, New York.

Vernon, D. M. et H. J. Bohnert. 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* **11**: 2077-2085.

Vernon, D. M., M. C. Tarczynski, R. G. Jensen et H. J. Bohnert. 1993. Cyclitol production in transgenic tobacco. *Plant J.* **4**: 199-205.

Weaver, R. W. et P.H. Graham. 1994. Legume nodule symbionts, p. 199-221. *In* Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. Soil Science Society of America, USA.

Wohlfarth, A., J. Servin et E. A Galinski. 1990. The spectrum of compatible solutes heterotrophic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 705-712.

Wu, Q.-L., S.-P. Wang, G.-Z. Tu, Y.-X. Feng et J.-S. Yang. 1997. Alkaloids from *Piper purberullum*. *Phytochemistry* **44**: 727-730.

Wyn Jones, R. G., R. Storey, R. A. Leith, N. Ahmed et A. Pollard. 1977. A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation, p.121-136. *In* E. Marre and O. Ciferri (ed.), Regulation of cell membrane activities in plants. Elsevier, North Holland, Amesterdam.

Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus et G. N. Somero. 1982. Living in water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1227.

Yap, S. F. et S. T. Lim. 1983. Response of *Rhizobium* sp. UMKL20 to sodium chloride stress. *Arch. Microbiol.* **135**: 224-228.

Zhu, M., J. D. Phillipson, P. M. Greengrass, N. E. Bower et Y. Cai. 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein? *Phytochemistry* **44**: 441-447.

Communications

LARGUET, A. et M. GHOU. 1997. Molécules osmoprotectrices chez les halophytes. Second Colloque Maghrébin sur la Biologie Végétale et l'Environnement. Annaba 28-29 Octobre.

LARGUET, A. et M. GHOU. 1997. L'effet osmoprotecteur d'extraits d'halophytes sur *Rhizobium* spp. en milieux salés. X^{èmes} journées Nationales de Microbiologie. Sétif 25-26 Novembre.

LARGUET, A. et M. GHOU. 1998. Effet osmoprotecteur d'extraits d'halophytes sur *Rhizobium* spp. 1^{er} Séminaire National sur les Légumineuses Alimentaires. Ain-Témouchent 10-12 Mai.

Annexes

Espèces halophytes	Souches de <i>E. coli</i>			
	isolées d'eau de mer		isolées d'eau douce	
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
- <i>Atriplex glauca</i> (a)	1,20	1,02	1,20	1,20
- <i>Artiplex glauca</i> (b)	1,20	1,02	1,20	1,02
- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	1,02	1,20	1,20	1,02
- <i>Salicornia arabicum</i>	1,02	1,02	0,85	1,02
- <i>Suaeda mollis</i>	1,20	1,02	0,85	1,20
- <i>Chenopodium sp.</i>	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Salsola vermiculata</i>	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Oryzopsis miliacea</i>	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Parapholis incurva</i>	1,20	0,50	1,02	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (b)	1,02	1,02	1,02	1,20
- <i>Plantago coronopus</i> (a)	1,20	0,85	0,68	0,85
- <i>Plantago coronopus</i> (b)	1,20	0,85	1,02	0,85
- <i>Cressa cretica</i>	1,20	1,02	1,20	1,02
- <i>Limonium delicatulum</i>	0,68	0,68	N. D.	0
- <i>Spergularia marginata</i>	1,20	0,85	0,68	0,85
- <i>Polygonum balansae</i>	0,85	1,20	1,02	1,02
- <i>Frankenia leavis</i>	1,20	1,02	0,85	1,20
- <i>Aizoon hispanicum</i>	1,02	1,02	1,02	1,02

Annexe 1: Appréciation de l'halotolérance de souches de *E. coli* en présence d'extraits aqueux d'halophytes [Concentration maximale de NaCl (M) tolérée].

Espèces halophytes	Souches de <i>E. coli</i>			
	isolées d'eau de mer		isolées d'eau douce	
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
- <i>Atriplex glauca</i> (a)	0,85	1,02	0,85	1,02
- <i>Artiplex glauca</i> (b)	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	1,20	1,02	1,20	1,02
- <i>Salicornia arabicum</i>	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Suaeda mollis</i>	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Chenopodium</i> sp.	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Salsola vermiculata</i>	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Oryzopsis miliacea</i>	1,20	1,20	1,02	1,02
- <i>Parapholis incurva</i>	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (b)	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Plantago coronopus</i> (a)	0,85	0,85	1,20	1,02
- <i>Plantago coronopus</i> (b)	0,68	0,85	0,85	1,02
- <i>Cressa cretica</i>	1,02	1,02	1,20	1,02
- <i>Limonium delicatulum</i>	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Spergularia marginata</i>	0,85	0,50	1,02	0,85
- <i>Polygonum balansae</i>	0,85	0,85	1,02	1,20
- <i>Frankenia leavis</i>	1,02	0,85	0,85	1,02
- <i>Aizoon hispanicum</i>	0,50	1,02	1,02	1,02

Annexe 2: Appréciation de l'halotolérance de souches de *E. coli* en présence d'extraits hydroalcooliques d'halophytes dilués au 1/100^{ème} [Concentration maximale de NaCl (M) tolérée]

Espèces halophytes	Souches de <i>E. coli</i>			
	isolées d'eau de mer		isolées d'eau douce	
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
- <i>Atriplex glauca</i> (a)	0,85	1,02	1,02	1,02
- <i>Artiplex glauca</i> (b)	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	1,20	1,20	1,20	1,20
- <i>Salicornia arabicum</i>	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Suaeda mollis</i>	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Chenopodium sp.</i>	1,20	1,02	1,20	1,20
- <i>Salsola vermiculata</i>	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Oryzopsis miliacea</i>	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Parapholis incurva</i>	1,20	1,02	1,02	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (b)	1,02	1,02	1,02	1,02
- <i>Plantago coronopus</i> (a)	0,50	0,68	1,02	0,68
- <i>Plantago coronopus</i> (b)	0,85	0,68	0,68	1,02
- <i>Cressa cretica</i>	1,02	1,02	1,20	1,02
- <i>Limonium delicatulum</i>	0,85	0,85	1,20	0,85
- <i>Spergularia marginata</i>	0,85	0,50	0,85	0,85
- <i>Polygonum balansae</i>	0,85	0,85	1,02	1,20
- <i>Frankenia leavis</i>	1,02	0,85	1,02	1,02
- <i>Aizoon hispanicum</i>	0,50	0,85	1,02	1,02

Annexe 3: Appréciation de l'halotolérance de souches de *E. coli* en présence d'extraits hydroalcooliques d'halophytes dilués au 1/200^{ème} [Concentration maximale de NaCl (M) tolérée].

Espèces halophytes	Souches de <i>Pseudomonas</i>			
	isolées d'eau de mer		isolées d'eau douce	
	<i>P. putida</i> (1)	<i>P. aeruginosa</i> (1)	<i>P. putida</i> (2)	<i>P. aeruginosa</i> (2)
- <i>Atriplex glauca</i> (a)	0,85	1,02	0,68	1,20
- <i>Artiplex glauca</i> (b)	1,02	1,02	0,50	1,20
- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	0,68	1,20	0,50	1,20
- <i>Salicornia arabicum</i>	0,68	1,20	0,50	1,20
- <i>Suaeda mollis</i>	0,68	1,02	0,50	1,02
- <i>Chenopodium sp.</i>	0,85	1,02	0,50	1,20
- <i>Salsola vermiculata</i>	0,85	1,20	0,50	1,20
- <i>Oryzopsis miliacea</i>	0,85	1,20	0,68	1,20
- <i>Parapholis incurva</i>	1,02	1,02	0,50	1,20
- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	0,85	1,20	0,68	1,20
- <i>Aeluropus littoralis</i> (b)	0,85	1,20	0,68	1,20
- <i>Plantago coronopus</i> (a)	0,68	1,02	0,50	1,20
- <i>Plantago coronopus</i> (b)	0,68	0,85	0,50	1,02
- <i>Cressa cretica</i>	0,85	1,20	0,85	1,20
- <i>Limonium delicatulum</i>	N. D.	0,85	0	1,02
- <i>Spergularia marginata</i>	0,68	1,02	0,50	1,02
- <i>Polygonum balansae</i>	0,68	0,85	0	1,20
- <i>Frankenia leavis</i>	0,85	1,02	0	1,20
- <i>Aizoon hispanicum</i>	0,85	1,20	0,50	1,02

Annexe 4: Appréciation de l'halotolérance de souches de *Pseudomonas* en présence d'extraits aqueux d'halophytes [Concentration maximale de NaCl (M) tolérée]

Espèces halophytes	Souches de <i>Pseudomonas</i>			
	isolées d'eau de mer		isolées d'eau douce	
	<i>P. putida</i> (1)	<i>P. aeruginosa</i> (1)	<i>P. putida</i> (2)	<i>P. aeruginosa</i> (2)
- <i>Atriplex glauca</i> (a)	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Artiplex glauca</i> (b).	1,02	1,02	0,68	1,20
- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Salicornia arabicum</i> .	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Suaeda mollis</i>	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Chenopodium sp.</i>	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Salsola vermiculata</i>	0,85	1,02	0,50	1,20
- <i>Oryzopsis miliacea</i>	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Parapholis incurva</i>	1,02	1,20	0,68	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (b)	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Plantago coronopus</i> (a)	0,85	1,02	0,68	0,85
- <i>Plantago coronopus</i> (b)	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Cressa cretica</i>	0,85	1,02	0,68	0,85
- <i>Limonium delicatulum</i>	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Spergularia marginata</i>	0,85	0,85	0,68	0,85
- <i>Polygonum balansae</i>	1,02	1,02	0,68	1,20
- <i>Frankenia leavis</i>	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Aizoon hispanicum</i>	1,02	1,02	0,50	1,02

Annexe 5: Appréciation de l'halotolérance de souches de *Pseudomonas* en présence d'extraits hydroalcooliques d'halophytes dilués 1/100^{ème} [Concentration maximale de NaCl (M) tolérée]

Espèces halophytes	Souches de <i>Pseudomonas</i>			
	isolées d'eau de mer		isolées d'eau douce	
	<i>P. putida</i> (1)	<i>P. aeruginosa</i> (1)	<i>P. putida</i> (2)	<i>P. aeruginosa</i> (2)
- <i>Atriplex glauca</i> (a)	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Artiplex glauca</i> (b)	1,02	1,02	0,68	1,20
- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	1,02	1,20	0,86	1,02
- <i>Salicornia arabicum</i>	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Suaeda mollis</i>	0,85	1,02	0,85	1,02
- <i>Chenopodium sp.</i>	1,02	1,20	0,68	1,20
- <i>Salsola vermiculata</i>	0,85	1,02	0,50	1,20
- <i>Oryzopsis miliacea</i>	1,02	1,02	0,85	1,02
- <i>Parapholis incurva</i>	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Aeluropus littoralis</i> (b)	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Plantago coronopus</i> (a)	0,85	1,02	0,68	1,20
- <i>Plantago coronopus</i> (b)	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Cressa cretica</i>	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Limonium delicatulum</i>	0,85	1,02	0,68	1,02
- <i>Spergularia marginata</i>	0,85	1,02	0,68	0,85
- <i>Polygonum balansae</i>	1,02	0,85	0,68	1,20
- <i>Frankenia leavis</i>	1,02	1,02	0,68	1,02
- <i>Aizoon hispanicum</i>	1,02	1,02	0,68	1,02

Annexe 6: Appréciation de l'halotolérance de souches de *Pseudomonas* en présence d'extraitshydroalcooliques d'halophytes dilués au 1/200^{ème} [Concentration maximale de NaCl (M) tolérée]

Annexe 7:

Détermination des pressions osmotiques:

La pression osmotique des milieux de culture additionnés de sel (LAS, MSY, BTS, et extraits aqueux d'allophytes) est déterminée à l'aide d'un micro-osmomètre cryoscopique (OSMOMAT 030).

Milieux de culture	osmolarité (mOsm/Kg)
- LAS.	99
- MSY.	111
- BTS.	291
Extraits aqueux de:	
- <i>Atriplex glauca</i> (a)	149
- <i>Atriplex glauca</i> (b)	140
- <i>Halocnemum strobilaceum</i>	432
- <i>Salicornia arabicum</i>	316
- <i>Suaeda mollis</i>	244
- <i>Chenopodium sp.</i>	164
- <i>Salsola vermiculata</i>	154
- <i>Oryzopsis miliacea</i>	106
- <i>Parapholis incurva</i>	101
- <i>Aeluropus littoralis</i> (a)	140
- <i>Aeluropus littoralis</i> (b)	91
- <i>Plantago coronopus</i> (a)	145
- <i>Plantago coronopus</i> (b)	98
- <i>Cressa cretica</i>	156
- <i>Limonium delicatulum</i>	222
- <i>Spergularia marginata</i>	153
- <i>Polygonum balansae</i>	101
- <i>Frankenia leavis</i>	200
- <i>Aizoon hispanicum</i>	231

Annexe 8:

Réactif de Dragendorff:

- Solution A: Iodure de potassium à 30 % dans l'eau.
- Solution B: Carbonate de Bismuth à 8 % dans HCl 2 N

Prélever 10 ml de A, les introduire dans une fiole de 200 ml.

Ajouter goutte 10 ml de B ajuster à 200 ml avec HCL 1 N.

Annexe 9:

Synthèse du DMSP (diméthylsulfoniopropionate) selon Chambers et coll. (1987):

A 30 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 5 ml de diméthylsulfure. A 0°C, on introduit 2 ml d'acide acrylique dans ce mélange.

Dans cette solution maintenue à 0°C, sous agitation, on fait barboter pendant 20mn du chlorure d'hydrogène.

Le solide formé est filtré et cristallisé dans le mélange méthanol / éther: 50/50 ; son point de fusion est de 125°C.

Annexe 10:

Composition du bouillon trypticase- soja (BTS):

- Hydrolysate tryptique de caséine	17g.
- Peptone papainique de soja	5g.
- NaCl	5g.
- Phosphate biphosphate	2,5g.
- Glucose	5g.

Dissoudre 30 g dans 1000 ml d'eau distillée, pH final: 7,3 (environ)

Remarque: Les produits chimiques utilisés sont de qualité pure.