UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques

Mémoire :

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**
Filière: **Sciences Biologiques**
Spécialité : **Sciences de l'Environnement**

Présenté par :

FECIH Thinhinane

Thème :

Effet des différents facteurs prédominants dans les sols sahariens sur la croissance des souches autochtones de *Sinorhizobiums meliloti*

Soutenu publiquement
Le : 31/05/2016

Devant le jury :

M.	**BRADAI Lyes**	MA (A)	Président	UKMOuargla
Mme.	**HASSAINE Amina**	MA (A)	Examinateur	UKMOuargla
M.	**AZIB Salim**	MC (A)	Promoteur	UKMOuargla

Année Universitaire : 2015/2016

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

Mes chères sœurs : Nacima, Lilia et Célia, mon cher frère Mehdi et sa femme pour leur grand amour et leur soutien qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

A mon fiancé Chams Eddine, ma belle mère et ma belle sœur Zoubida qui m'a beaucoup aidé.

Mes chères amies Boukarana Iman et Ramdan Iman sans leur aide ce travail n'aura jamais vu le jour.

Remerciement

Je tien à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire et au bon déroulement de ce stage de fin d'étude :

M^{er} AZIB Salim, pour l'encadrement, les encouragements et ses précieux conseils.

Mme KASI Safia, enseignante et responsable du laboratoire de recherche à l'UKMO

Toute l'équipe de Control de Qualité de Ouargla, l'ADE, et l'ANRH et l'ONA.

M^{er} BOUMAAKEL technicien supérieur de la santé

M^{er} BOUKHELOUA enseignant et chef de laboratoire de paramédical

Mme MAATALLAH Zoubida , Surveillante générale de Paramédical

Mer MESLEM Tahar superviseur au service de l'aboratoire d'analyse El Morchid

M^{mme} CHAOUCH Saida pour son aide.

Dr BABZIZ de l'aboratoire d'analyse Souk el Hdjar Ouargla

M^{er} Salim le Chef Personnel de la Maternité de Ouargla

Ainsi que tous les professeurs qui mon enseigné durant mon parcoure.

Liste des tableaux :

N°	Titre	page
1	Classification des espèces Rhizobiennes du genre S*inorhizobium*	7
2	Différence biologique entre *S. medicae et S.meliloti*	7
3	Différence entre nodule déterminé et indéterminé	11
5	Codes et origines des souches utilisées dans notre étude.	15
6	Liste des antibiotiques utilisés	18
7	effet des différentes températures sur la croissance des souches étudiées	22
8	Croissance des souches sur milieu solide à 4°C.	23
9	Croissance des souches sur milieu solide à 28°C.	24
10	Croissance des souches sur milieu solide à 37°C.	26
11	Croissance des souches sur milieu solide à 45°C.	27
12	Croissance des souches sur milieu solide à pH=4	28
13	Croissance des souches sur milieu solide à pH=5	30
14	Croissance des souches sur milieu solide à pH=6	32
15	Croissance des souches sur milieu solide à pH=6.8	33
16	Croissance des souches sur milieu solide à pH=8	35
17	Croissance des souches sur milieu solide à pH=9	36
18	Croissance des souches sur milieu solide à 0 mM d'NaCl	37
19	Croissance des souches sur milieu solide à 40 mM d'NaCl	40
20	Croissance des souches sur milieu solide à 80 mM d'NaCl	41
21	Croissance des souches sur milieu solide à 160 mM d'NaCl	43
22	Croissance des souches sur milieu solide à 320 mM d'NaCl	44
23	Croissance des souches sur milieu solide à 640 mM d'NaCl	45
24	Croissance des souches sur milieu solide à 1280 mM d'NaCl	47
25	représentation des souches les plus efficientes par rapport aux différents paramètres étudiés	48

Liste des figures :

N°	Titre	page
1	Section longitudinale d'un nodule de *Medicago* âgé de 10 jours.	10
2	Résumé des différentes étapes conduisant à la formation du nodule	10
3	Effet de la température 4°C sur la croissance des souches	24
4	Effet de la température 28°C sur la croissance des souches	25
5	Effet de la température 37°C sur la croissance des souches	26
6	Effet de la température45°C sur la croissance des souches	28
7	Effet du pH=4 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.	30
8	Effet du pH=5 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.	31
9	Effet du pH=6 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.	33
10	Effet du pH=6.8 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.	34
11	Effet du pH=8 sur la croissance des souches après 72h d'incubation	35
12	Effet du pH=9 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.	37
13	Effet de l'NaCl 0 mM sur la croissance des souches	39
14	Effet de l'NaCl 40 mM sur la croissance des souches	41
15	Effet de l'NaCl 80 mM sur la croissance des souches	42
16	Effet de l'NaCl 160 mM sur la croissance des souches	43
17	Effet de l'NaCl 320 mM sur la croissance des souches	44
18	Effet de l'NaCl 640 mM sur la croissance des souches	45
19	Effet de l'NaCl 1280 mM sur la croissance des souches	46
20	Résistances des souches à l'ensemble des antibiotiques	50
21	Réponses des souches aux antibiotiques utilisés	51

Liste des photos :

N°	Titre	page
1	Préparation des milieux de culture	Annexes
2	Stérilisation des milieux de cultures dans un autoclave	Annexes
3	ensemencement des souches	Annexes
4	Incubation des souches	Annexes
5	Homogénéisation des suspensions bactériennes à l'aide d'un Vortex	Annexes
6	Remplissage des cuves les suspensions bactériennes de chaque souche.	Annexes
7	Masure de la DO avec un spectrophotomètre à flamme	Annexes
8	réalisation de test de résistance aux antibiotiques sous hotte CASM type 1	Annexes

Liste des abréviations

% : pourcent
(-) : pas de croissance
(+) : Croissance
µm : micromètre
A : *Acacia*
C.A-S.F.M : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie
DO= Densité optique
E: el oued
etc : etcetera
FBA : fixation biologique d'azote
g/l : gramme par litre
h : heure
HCl : chlorure d'hydrogène
l : litres
L. : Linnée
M : *Medicago*
mM= millimolar
mn : minutes
N_2 : azote atmosphérique
N_2O : dioxyde d'azote
NaCl= Chlorure de Sodium
NaOH : L'hydroxyde de sodium
NH_4^+ : Ammonium
nm : nanomètres
NO_3^- : Nitrate
O : Ouargla
O_2 : di-oxygéne
P : *Prosopis*
pH= potentiel hydrogène
S : *Sinorhizobium*
sp : espèce
t/an : tonne par an
t/ha/an : tonne par hectare par an
T°C= température en degré Celsius
tr/mn : tour par minute
UF/kg : Unité Fondamentale par Kilogramme
YEM : Yeast Extract Mannitol
YMB : Yeast Mannitol Agar

SOMMAIRE

N°	TITRE	PAGE
/	**INTRODUCTION**	1
I.	SYNNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.	**LA FIXATION BIOLOGIQUE D'AZOTE**	3
1.1.	La fixation non symbiotique d'azote	3
1.2.	La fixation symbiotique (non libre)	4
2.	**LES PARTENAIRES DE LA SYMBIOSE**	4
2.1.	Partenaire végétal (Légumineuse)	4
2.2.	Partenaire microbien (Rhizobiacées)	6
3.	**LES NODULES RACINAIRES : SIÈGE DE LA SYMBIOSE**	8
3.1.	Infection racinaire et formation des nodules	8
3.2.	La couleur des nodules	11
3.3.	Types de nodules	11
4.	**INFLUENCE DES FACTEURS DU MILIEU SUR LA FIXATION BIOLOGIQUE D'AZOTE**	11
4.1.	Le pH du sol	12
4.2.	Salinité des sols et des eaux d'irrigations	13
4.3.	La Température	13
4.4.	Les contraintes hydriques	14
4.5.	Effet des nitrates	14
4.6.	Maladies et ravageurs	14
4.7.	Resistance aux antibiotiques	15
5.	**INTÉRÊTS DE LA SYMBIOSE**	15
5.1.	Pour les deux organismes	15
5.2.	Sur le plan agronomique	16
5.3.	Sur le plan écologique	17
5.4.	Les symbioses et développement durable	18
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	
1.	Les Souches utilisées	19
2.	Le Milieu de culture utilisé	19

3.	Méthodes d'étude de la diversité des rhizobiums	19
3.1.	Tolérance à la Salinité	20
3.2.	Tolérance au pH	20
3.3.	Tolérance à la Température	20
3.4.	Test de résistance aux antibiotiques	20
III.	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	
1.	**Lecture des resultants de l'effet de la temperature**	23
1.1.	Effet de la temperature 4°C	24
1.1.1.	Effet de la temperature 28°C	25
1.1.2.	Effet de la temperature 37°C	26
1.1.3.	Effet de la temperature 45°C	28
1.2.	**Discussion des resultants de l'effet de la temperature**	29
2.	**Lecture des resultats de l'effet du pH**	30
2.1.	Effet du pH=4	30
2.1.1.	Effet du pH=5	31
2.1.2.	Effet du pH=6	33
2.1.3.	Effet du pH=6.8	34
2.1.4.	Effet du pH=8	36
2.1.5.	Effet du pH=9	37
2.2.	**Discussion des resultats de l'effet du pH**	39
3.	**Lecture des resultats de l'effet du NaCl**	39
3.1.	Effet du NaCl 0 mM	40
3.1.1.	Effet du NaCl 40 mM	41
3.1.2.	Effet du NaCl 80 mM	43
3.1.3.	Effet du NaCl 160 mM	44
3.1.4.	Effet du NaCl 320 mM	46
3.1.5.	Effet du NaCl 640 mM	47
3.1.6.	Effet du NaCl 1280 mM	49
3.2.	**Discussion des resultants de l'effet du NaCl**	50
4.	**Lecture des resultats de l'effet des antibiotiques**	52
4.1.	**Résistances des souches à l'ensemble des antibiotiques**	52
4.1.1	**Réponses des souches aux antibiotiques utilisés**	53
4.2	**Discussion des resultats de l'effet des antibiotiques**	54

5.	**Selection des souches les plus résistantes**	54
Conclusion		55
Annexes		
References bibliographiques		

Introduction

INTRODUCTION

Les ressources en azote de la planète sont pratiquement illimitées grâce au réservoir atmosphérique (N_2). Pourtant l'azote est, après l'eau, le principal facteur limitant la croissance des végétaux. En effet, pour être utilisable par les végétaux, l'azote doit être sous forme minérale (NH_4^+ et NO_3^-), ce qui peut se réaliser par deux voies : la voie industrielle de synthèse des engrais azotés et la voie de la fixation biologique (REVELLIN, 2012).

Selon LANSING et *al*.(2003), l'utilisation d'engrais azotés a pour conséquence inévitable, l'augmentation de la teneur en nitrate des eaux, ce qui peut être la cause de problèmes respiratoires chez les nouveaux nés, de contribuer à la production de nitrites et à la formation des nitrosamines cancérigènes. En outre, les plantes qui ont grandi dans des sols à haute teneur en nitrate peuvent accumuler ce dernier jusqu'à des concentrations nuisibles pour les animaux. Les engrais peuvent affecter la structure et la fonction de la communauté microbienne.

La fixation biologique de l'azote prédomine de loin sur la planète Terre : elle produit deux fois plus d'azote que la fixation non biologique et 3 à 4 fois plus que le procédé industriel Haber Bosch qui permet notamment de fabriquer les engrais chimiques azotés, mais avec de grands coûts énergétiques et des coûts environnementaux dus aux émissions de carbone. (HO, 2013).

Elle est aussi identifiée comme une voie possible de limitation des émissions de gaz à effet de serre par les systèmes, d'une part par l'absence d'usage de carburants fossiles pour la fourniture d'azote assimilable et d'autre part par l'absence d'émissions de N_2O au cours du développement de la culture de fabaceae ; à la différence des plantes recevant une fertilisation de synthèse industrielle (GERMON, 2013).

Les micro-organismes fixateurs d'azote symbiotiques vivant dans (ou sur) les tissus ou les racines des fabaceae de certaines herbacées et céréales, contribuent de manière significative à la fixation biologique d'azote. Le meilleur exemple connu est celui de Rhizobiumqui vit en association avec des fabaceae. La plupart des sols contiennent ces bactéries, mais leurs populations ne sont pas suffisantes ou fonctionnelles pour former des associations efficaces avec les cultures. Dans de tels cas, les organismes doivent être introduits artificiellement dans le système. Cela se fait généralement par enrobage des

semences avec des bactéries ("inoculum") avant le semis (JEFFERY et *al., 2013*). Cette fixation symbiotique injecte approximativement dans les agro- systèmes 40 millions de tonnes de nitrogène par an (UDVARDI et POOLE, 2013).

Les fabaceae sont souvent utilisées dans les rotations culturales pour augmenter la teneur en azote des sols via la FBA. La fixation de l'azote par les micro-organismes symbiotiques peut atteindre 30 à 300 kg d'azote par hectare et par an (JEFFERY et *al., 2013*). En Algérie, la culture des fabaceae alimentaires a un intérêt national car leurs grains constituent une source protéique de qualité et à bas prix pour une large couche de la population (BOUDJENOUIA et *al.*,2003). La luzerne occupe une superficie très réduite parmi ces cultures ; par contre dans les régions sahariennes, elle constitue la première culture fourragère et occupe la plus importante place. Cette espèce est très utilisée dans l'alimentation du cheptel Saharien (CHAABENA et ABDELGUERFI, 2001).

L'inoculation de la Luzerne avec des souches efficaces est une approche alternative à l'amélioration de la productivité à long terme de la Luzerne. Le nombre et l'efficacité de ces souches dépendent du type de sol, du système d'utilisation des terres (peuplement de luzerne, les terres arables) et de la plante hôte. Pour cette raison, l'utilisation des inoculums rhizobiens avec des souches hautement efficaces est nécessaire pour l'élévation de la production de luzerne. Des expériences sur le terrain ont montré que le poids sec des pousses augment de 42-77% après inoculation, tandis que la quantité d'azote fixé augment de 35% (DELIC et *al*., 2016).

L'optimisation des avantages de l'inoculation des fabaceae avec les rhizobia dépend de la survie de celles-ci dans le sol. Les souches de Sinorhizobium pourraient être utilisés sur les sites stressés comme inoculum pour promouvoir la croissance des plantes fabaceae (ABOLHASANI et *al*., 2010).

L'objectif de notre étude est d'étudier la réponse adaptative des souches Rhizobiennes isolées de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*) et du mélilot (*Melilotus indica*) provenant de différentes zones agricoles des deux régions : Ouargla et El Oued, face aux conditions pédoclimatiques (températures, salinité, pH et résistance aux antibiotiques), puis sélectionner les souches qui résistent le mieux aux variations de ces facteurs afin de constituer une collection de souches utilisables comme inoculum dans le but d'améliorer les rendements de la luzerne dans les régions sahariennes.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. La fixation biologique d'azote

La majeure partie de la fixation d'azote (2,4. 10^8 t/an, 85% de la fixation totale) intervient par une voie biologique. Cette « porte d'entrée » est fournie par certains procaryotes, qui sont capables d'activer la molécule N_2 et de la réduire en ammoniaque, forme facilement assimilable par les bactéries et par leurs partenaires symbiotiques (GOBAT et *al*., 2010).

La fixation de l'azote peut se faire dans des conditions oxiques et anoxiques. Des micro-organismes comme *Azotobacter* et la cyanobactérie *Trichodesmium* fixent l'azote en aérobiose, tandis que des anaérobies en vie libre, comme les membres du genre *Clostridium*, le font en anaérobiose.

Certains micro-organismes symbiotiques participent à la partie biologique du cycle de l'azote car ils peuvent fixer l'azote dans les nodules des racines des fabaceae qui contiennent des bactéries du genre *Rhizobium, Mesorhizobium, Sinorhizobium, Bradyrhizobium et Azorhizobium…* **(**PRESCOTT et *al*., 2010).

Ces symbioses vont avoir une grande importance environnementale et agricole car elles sont responsables de la majeure partie de la fixation biologique de l'azote atmosphérique sur la terre (ZAKHIA et DE LAJUDIE, 2001).

Grace à cette fixation symbiotique d'azote, la croissance des fabaceae n'est plus dépendante de la disponibilité en azote minéralisé dans le sol : minéral le plus limitant pour la productivité des cultures (BOUSSUET et VADEZ, 2013)

La fixation biologique de l'azote concerne le sol par un ensemble de transformations microbiennes faisant intervenir des micro-organismes libres et des micro-organismes symbiotiques (CALVET, 2003).

1.1.La fixation non symbiotique d'azote

Les bactéries fixatrices libres d'azote, sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de divers animaux (HOPKINS, 2003).

La fixation libre est effectuée par les bactéries aérobies (*Azotobacter sp, Beijrinkia sp*) ou anaérobies *(Clostuduim sp),* des algues bleues (Cyanophycées) (SCHVARTZ et *al.*, 2005).

1.2.La fixation symbiotique (non libre)

Elle est la plus connue des techniques végétales pour fixer l'azote de l'air. Par exemple, des bactéries (les Rhizobium) s'installent dans les racines des plantes de la famille des fabaceae ; le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie ; celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (POUSSET, 2002).

Dans les associations symbiotiques, la plante représente « l'hôte » et le partenaire bactérien « le symbiote ». La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodule (HOPKINS, 2003).

La fixation non symbiotique apporte au sol des quantités d'azote relativement petites, de l'ordre de 10 kg d'azote $ha^{-1}an^{-1}$. Au contraire, la fixation symbiotique apporte au sol des quantités bien plus importantes, pouvant atteindre plusieurs centaines de kg d'azote $ha^{-1}an^{-1}$ (CALVET, 2003).

2. Les partenaires de la symbiose (Rhizobium-Légumineuse)

Le mot "symbiose" signifie «vie avec ». Ce dernier fut utilisé pour la première fois par l'Allemand Frank (1877) pour qualifier la coexistence d'organismes différents. DE BARY (1887) y ajouta la notion de gradation de relation entre un hôte et un parasite qui peut être destructif ou toléré (JOSE et *al.*, 2004 ; BEREAU *et al.*, 2003).

La symbiose et une association de deux organismes d'espèces différentes qui en tien tout les deux des bénéfices (DUTUIT et GORENFLOT, 2008 ; LEGAULT, 2010).

2.1. Partenaire végétal (Légumineuse)

Les fabaceae (littéralement : légume dont le fruit est une gousse), soit plus de 18 000 espèces connues dans le monde (WALIGORA et TETU.,*2008*)

Les fabaceae sont, avec les graminées, les familles botaniques les plus utiles à l'alimentation dans le monde. Les fabaceae regroupent trois familles (ou sous-familles) : les Fabaceae (ou Papilionaceae) les Mimosaceae et les Caesalpiniaceae , (KLEIN et *al* .,2014)

Leurs deux signes distinctifs majeurs sont que leurs graines se forment à l'intérieur de gousses, et qu'elles peuvent former un partenariat avec une famille des Rhizobiacées (DUC et *al*.,2010)

Chaque Fabacée s'associe à une espèce particulière de Rhizobium. Ainsi la vesce s'associe à *Rhizobium leguminosarum*, le pois à *Rhizobium phaseoli*, le mélilot à *Rhizobium meliloti*…etc. (POUSSET, 2008).

2.1.1. Description générale du mélilot *(Melilotus indicus* L.)

Le mélilot est une plante bisannuelle à racines fibreuses, fortes, blanchâtres, Les tiges de 50cm à 1m, sont cylindriques, striés, dressés, elles portent des feuilles alternes longuement pétiolés, avec des stipules lancéolées à la base composés de trois folioles oblongues et dentées. Les fleurs jaunes visibles de mai à septembre, sont disposés en grappes dressées à l'extrémité des tiges florifères. Le fruit est une gousse velue surmontée d'un style persistant, qui contient deux petites graines (PIERRE et LYS, 2007 ; WIERSEMA et LEON, 2016).

2.1.2. Description générale de la luzerne (*Medicago sativa* L.)

La Luzerne (*Medicago sativa*) *est une* plante vivace présentant *une* grande variabilité morphologique. Il s'agit de la *légumineuse* fourragère la plus cultivée dans le monde. Elle colonise facilement les bordures des champs et des routes elle est semée en culture pure ou en association avec une graminée pérenne (IGHIL et *al*., 2011)

La luzerne est une espèce autotétraploïde, pérenne allogame et à fécondation entomophile. Comme les autres fabaceae, elle ne nécessite pas d'apport d'engrais azotés grâce à sa symbiose avec une bactérie *Sinorhizobium meliloti*. C'est une plante fourragère recherchée, car c'est l'espèce qui produit le plus de protéines à l'hectare (2.5 t/ha/an). Elle est aussi riche en minéraux assimilables par les ruminants et contient au moins 10 vitamines. Elle a aussi quelques débouchés en alimentation humaine et en industrie pharmaceutique. Par contre, sa valeur énergétique est assez moyenne (0.7/UF/kg de matière sèche). Ces caractéristiques font de la Luzerne un bon complément des céréales pour l'alimentation

animale. Elle est de plus, très appétible et ingestible. Enfin, elle représente une très bonne tête d'assolement, résiste bien à la sécheresse et se montre de culture et d'entretien faciles et peu couteux (DORE et VAROQUAUX, 2006).

2.1.3.Classification taxonomique de Mélilot et de la Luzerne

Selon SINGH (2011) et AKHTAR et *al*. (2016), ces plantes appartiennent au Règne des Planteae, sous-règne des Tracheobionta, super division des Spermatophytes, division des Magnoliophyta, et la classe des Magnoliopsida. Elles sont également insérées dans la sous-classe des Rosidae, Ordre des Fabales, famille des Fabacées.

- **Pour le Mélilot :** genre Melilotus , espèce *Melilotus indicus*.
- **Pour la Luzerne :** Section Medicago, genre Medicago, espèce *Medicago sativa*, sub-espèce s*ativa.*

2.2.Partenaire microbien (Rhizobiacées)

C'est une famille de rhizobactéries fixatrices d'azote (GARBAYE, 2013)**,** de l'Ordre des Rhizobiales dans les α-protéobactérie (PRESCOTT et *al*., 2010).

Les rhizobiums, bacilles courts ou coccoïdes de 1 à 4 µm, vivent dans les sols pour infecter les fabaceae (DELARRAS, 2014).

Elles ont la faculté d'induire la formation d'un nouvel organe chez leur hôte appelé nodule. Contrairement aux tumeurs classiques, le nodule produit est un organe pleinement fonctionnel et bénéfique pour son hôte (WALIGORA et TETU, 2008).

Depuis l'adoption de la taxonomie polyphasique, comme critère de caractérisation, leur classification se repartit en 13 genres et 98 espèces, que nous désignons collectivement sous le nom de Rhizobium (DUHOUX et NICOLE, 2004 ; WEIR, 2016). Parmi ces genres on distingue: Rhizobium, Bradyrhitobium, Arorhizobium, Sinorhirobium, et Mesorhizobium (LAURENT-FULELE et *al*.,2000), les souches étudiées appartiennent au genre Sinorhizobium.

Tableau 1 : Classification des espèces Rhizobiennes du genre S*inorhizobium*

GENRE	HOTE	ESPECE
Sinorhizobium	*Abrus precatorius*	*Ensifer abri*
	Acacia spp	*Sinorizobium americanum*
	Acacia senegal, Prosopis chilensis	*Ensifer arboris*
	Medicago sativa, Cajanus cajan, Glycine max ,Glycine soja, et Vigna unguiculata.	*Ensifer fredii*
	Argylorobium uniflorum et Medicago sativa	*Ensifer gramanticus*
	Sesbania rostrata, abrus precatorius	*Ensifer indiaense*
	A.senegal,P.chilensis	*Ensifer kostiensis*
	Kummerowia stipulacea	*Ensifer kummerowiae*
	Medicago spp	***Ensifer medicae***
	Medicago sativa	***Ensifer meliloti***
	Acacia angustissima	*Ensifer mexicanus*
	Leucena Leucocephala	*Sinorhizobium morelense*
		Ensifer adhaerens
	Argyrolobium uniflorum et Lotus creticus	*Ensifer numidicus*
	Sesbania sps,Acacia seyal, Leucena Leucocephala et Natunia natans	*Ensifer saheli*
	Glycine max	*Ensifer sojae*
	Acacia, Sesbania	*Ensifer terangae*
	Glycine max	*Ensifer xinjiangense*

Sources : GOYAL et MAHESHWARI (2012) ; AROCA(2013) ; MAHESHWARI(2014) ; WEIR (2016).

Tableau 2: Différence biologique entre *S. medicae et S.meliloti*

	S. medicae	***S. meliloti***
M. truncatula	Oui	Oui
M. polymorpha	oui	non
Resistance à la Néomycine	Oui	Non
Resistance au chloramphénicol	non	oui
Croissance a pH 4	oui	Non
Croissance à 3 % d'NaCl	oui	Oui

Source : (SHI, 2008)

3. Les nodules racinaires : siège de la symbiose

Le nodule est le siège de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniaque qui *est* ensuite assimilé par la plante sous forme d'acides aminés (FAURIE, 2011).

3.1. Infection racinaire et formation des nodules

un système complexe de signalisation entre les deux organismes permet à chacun d'eux, non seulement de reconnaitre la présence de l'autre, mais également de déterminer si la bactérie est bien de l'espèce appropriée à l'espèce de légumineuse (RAVEN et *al.*, 2011).

Les étapes de nodulation sont :

A. Phase d'échange de signaux symbiotique

Comme pour la plupart des symbioses, la première étape consiste en une reconnaissance mutuelle effectuée par échange de messages chimiques entre les deux partenaires. C'est une étape très spécifique qui se fait en deux phases :

- **Phase d'attraction**

Quand la légumineuse est en manque d'azote, ses racines émettent des flavonoïdes, composés hétérocycliques qui attirent les Rhizobactéries, à proximité des jeunes poils absorbants des racines (SUTY, 2015)

La symbiose se met en place lorsque la bactérie forme des facteurs de nodulation (dits facteurs Nod) qui vont être reconnus par la plante (MACHEIX et *al*., 2005).

- **Phase de reconnaissance**

Les rhizobiums sont attirés chimiquement par les composés phénoliques (Flavonoïdes) libérés par les racines des fabaceae. Grâce à ce chimiotactisme positif, ces bactéries colonisent la rhizosphère et s'accolent à la racine, au niveau des poils absorbants. Les signaux chimiques de la racine activent le produit d'un gène de nodulation des rhizobiums, le gène constitutif nodD, qui induit l'expression des autres gènes nod bactériens. Les produit de l'expression de ces gènes sont des petits polymères de chitine, appelés facteurs de nodulation ou facteur Nod (MEYER et *al*., 2004).

B. Phase d'infection

Les facteurs Nod induisent la courbure des poils absorbants en croissance. Ils activent aussi l'expression des gènes nod du végétal, qui code des nodulines nécessaires à la construction et au fonctionnement de la nodosité (MEYER et *al*., 2004).

Ces mitoses aboutissent à la formation de petits méristèmes qui permettront l'organogenèse des futures nodosités, en contact avec les tissus conducteurs de la racine.

A ce stade, les bactéries ayant infecté les cellules de la racine se transforment en gros bactéroïdes qui absorbent les sucres issus de la photosynthèse de la plante hôte (SUTY, 2015).

C. Début de formation du nodule

L'activation de la division cellulaire formant de petits méristèmes qui vont fusionner pour initier l'organogénèse de la nodosité. A ce stade, les nodosités ne sont pas encore fonctionnelles pour la fixation de l'azote gazeux (SUTY, 2015).

La formation d'un nodule fonctionnel exige la présence de 3 groupes de gènes chez la bactérie : nod, fix et nif. (ROBERT et CATESSON, 2000).

D. Développement du nodule

Il est caractérisée par la différenciation de la nodosité avec organisation en quatre zones : méristématique , zone d'infection, zone de fixation de l'azote et la zone de sénescence de nodule (HAMON, 2001).

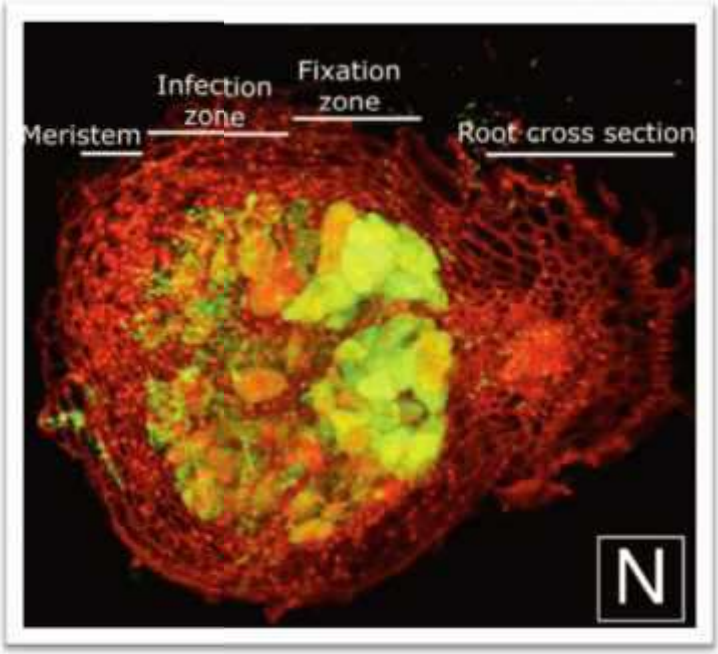

Figure 1: Section longitudinale d'un nodule de *Medicago* âgé de 10 jours. En rouge les contours du nodule racinaire, en jaune fluorescent les bactéries *Sinorhizobium meliloti* (GAGE, 2004).

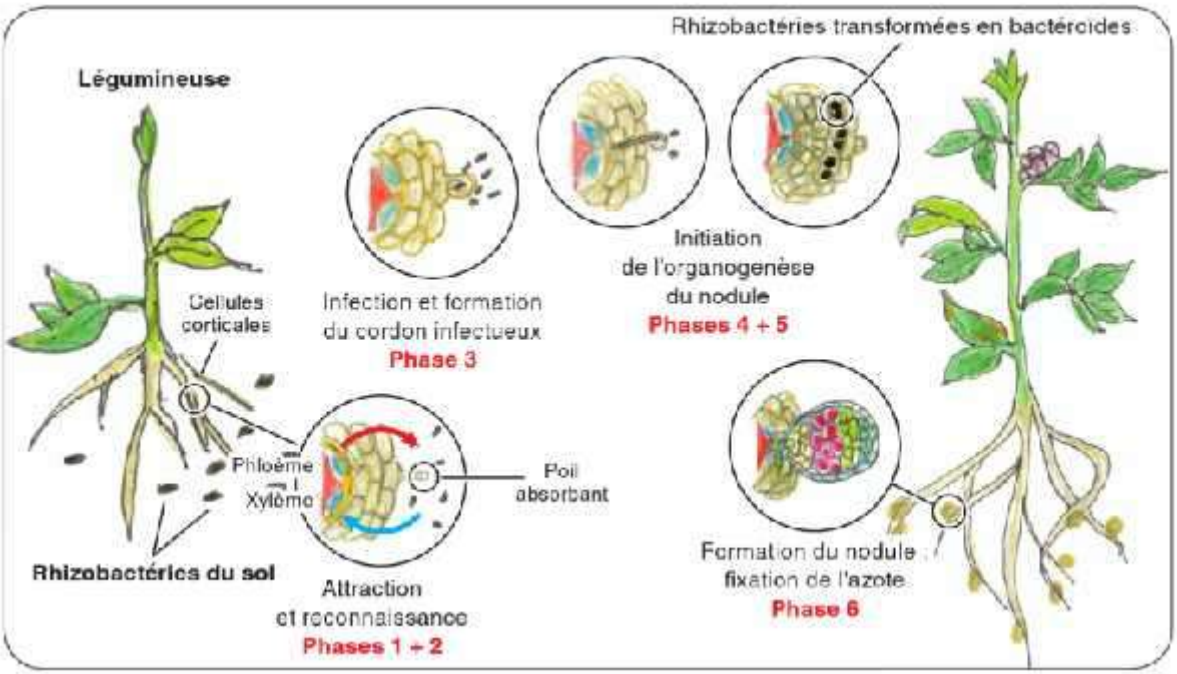

Figure 2 : résumé des différentes étapes conduisant à la formation du nodule (SUTY,2015).

3.2.La couleur des nodules

La couleur des nodules varie du blanc au marron, vert et rose (PANDA, 2013).

Les jeunes nodules ne fixent pas l'azote et sont généralement de couleurs blanches ou grises à l'intérieur. Les Nodules plus âgés qui sont fixateurs d'azote sont rosâtres ou rougeâtres (DURNER, 2013).

La couleur rose est due à la Leghémoglobine indiquant l'apparition de la fixation d'azote. Il existe un grand nombre de nodules inefficaces qui peuvent avoir des centres verts blancs ou pâles (KRISHNAMURTHY et *al*., 2009).

3.3.Types de nodules

La forme des nodules racinaires varie de ronde à allongée. les nodules peuvent être isolés ou en groupe sur la racine, et ce, par rapport à la présence ou non de la zone méristématique (SECKBACH et GRUBE, 2010)

Deux types majeurs peuvent être distingués : nodule indéterminé qui contient un méristème persistant qui aboutit à une structure cylindrique et un nodule déterminé qui ne forme pas un méristème persistant et reste donc en forme sphérique (SPAINK et *al*., 2012).

Tableau 3 : Différence entre nodule déterminé et indéterminé

Nodule déterminé	Nodule indéterminé
Ne possède pas un méristème et donc capable d'une croissance seulement limitée	Présence d'un méristème qui facilite la croissance continue du nodule
Les cellules du cortex se divisent seulement après avoir été infectées par les bactéries	Les bactéries sont libérées seulement après que les cellules eurent cessé de diviser
Les nodules sont sphériques	Les nodules sont allongés et ramifiés

Source : (VARMA et KHARKWAL, 2009)

4. Influence des facteurs du milieu sur la fixation biologique d'azote

Généralement, les souches tropicales de rhizobia possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans les milieux arides et semi arides. Les

principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont le déficit hydrique, la salinité, les températures élevées et les pH extrêmes. Les interactions fréquentes entre ces différentes contraintes affectent la croissance et la capacité de survie des microorganismes dans les sols arides (CACCIARI et *al*., 2015).

Les quantités d'azote fixés par l'association symbiotique fabaceae-rhizobium sont très dépendantes des conditions du milieu (concentration en nitrate, pH, humidité, souche de rhizobium) (SCHVARTZ, 2005).

4.1.Le pH du sol

L'influence du pH sur la nodosité et l'activité des rhizobia est différente selon le climat. Dans les zones tempérées, la croissance et la nodulation sont plus actives sur les sols neutres ou légèrement acides. Tandis que l'optimum de croissance des fabaceae tropicales est compris entre 5 et 6,5. Dans ces dernières, les rhizobia résistent mieux à l'acidité et sont capables de fixer l'azote à pH 4,5. Toutefois, il y a toujours une baisse de nodosités sur sols acides, comme ceux riches en aluminium. Pour assurer leur survie dans ces conditions difficiles, tout un arsenal chimique protecteur est alors mis en place (WALIGORA et TETU, 2008).

La luzerne nécessite l'inoculation des semences lorsque le pH du sol est inférieur à 6,5 (FRICK et *al*., 2014).

Le pH optimal pour la croissance des rhizobia se situe entre 6 et 7 (KUMAR, 2008).

La symbiose *Medicago sativa- Sinorhizobium* est contestée par l'acidité, ce qui entraîne et généralement pauvres nodulation et de la production (WATKINet *al*., 2009)

4.2. Salinité des sols et des eaux d'irrigations

On définit en général deux types de salinité : la salinité primaire et la salinité secondaire. La première résulte de la présence initiale de sels dans le sol ou dans la nappe phréatique. La seconde résulte des apports de l'eau d'irrigation (FARISSI et *al.*,2014)

La salinité est l'un des facteurs majeurs responsables de la détérioration des sols en les rendant impropres à l'agriculture. Par leur concentration excessive en sels et leur pH élevé, les sols salins constituent un environnement défavorable pour la croissance de la plupart des fabaceae et de leurs bactéries symbiotiques (DREVON et SIFI, 2003)

Cette contrainte sur la symbiose fabaceae-rhizobia se manifeste par un effet osmotique et /ou ionique inhibant les différents processus physiologiques et biochimiques gouvernant la croissance de la plante hôte, la survie et la prolifération des rhizobia et par la suite l'inhibition des processus d'infection et de la fixation biologique de l'azote (FARISSI et *al*., 2014).

Les fabaceae sont classées comme des cultures sensibles au sel avec leur productivités particulièrement affectées par la salinité (PALMA *et al*., 2014).

La croissance de la plupart des souches rhizobiums est inhibée par 100 mM de NaCl. Cependant, certaines souches tolèrent plus de 500 mM (BOUHMOUCH et *al*., 2001)

l'effet de la salinité se traduit par une chute progressive de la matière sèche des parties aérienne, racinaire et des nodules, ainsi que du nombre de nodules (IBRIZ et *al.*, 2004).

4.3. La Température

La température est le facteur environnemental majeur qui affecte la survie et l'établissement des Rhizobia en culture ou dans le sol (YADAV et NEHRA, 2013).

La température des racines affecte le processus d'infection et de nodulation. Une température <10°C retarde la croissance des racines alors qu'une température >24°C la favorise. La distribution du nitrogène entre les racines et les pousses est généralement affectée par la température des racines (HASSAN DAR, 2009).

Pour la plupart des rhizobiums, la température optimale pour leur croissance est 28 à 31 °C (MAHESHWARI, 2008).

4.4. Les contraintes hydriques

La fixation d'azote semble être un des processus biologiques de la plante les plus sensibles au stress hydrique (BOSSUET et VADEZ, 2013) .

Des rapports récents indiquent que le manque d'humidité du sol affecte la survie des rhizobiums et du processus de nodulation de la plante hôte. Cependant, des études récentes ont établi que le niveau d'humidité du sol au moment des semis, apporté par les pluies pour de nombreuses fabaceae, est adéquat pour soutenir une bonne nodulation. L'inhibition est principalement due à la cessation de l'activité de la nitrogénase au moment où les plantes développent des nodules et commencent à fixer l'azote. En conséquence, une diminution

significative de la Fixation biologique et de la croissance végétale ont lieu, surtout si le stress hydrique coïncide avec le pic de la fixation d'azote par la plante. Une plus grande importance a donc été apportée sur la sélection de plante cultivée tolérant une sécheresse appropriée plutôt que la souche Rhisobium pour atteindre une réponse stable à la fixation biologique dans des conditions de sécheresse (BOARD, 2012).

4.5. Effet des nitrates

Les *Rhizobium* sont sensibles à l'apport de *nitrates* et de sels ammoniacaux dans les sols qui inhibent leur développement (FAURIE, 2011).

L'effet inhibiteur de nitrate sur l'activité de la nitrogénase dans les nodules des racines des plantes fabaceae est connu depuis longtemps. Le principal facteur induisant des changements dans l'activité de la nitrogénase est la concentration d'oxygène libre à l'intérieur des nodules. La disponibilité de l'oxygène dans la zone infectée de nodule est limitée, entre autres, par la résistance à la diffusion du gaz dans le cortex nodulaire. La présence de nitrate peut provoquer des changements dans la résistance à la diffusion d'O_2 (LUCINSKI et *al*., 2002).

4.6. Maladies et ravageurs

La fixation symbiotique peut aussi être limitée, de manière plus au moins directe, par des agents pathogènes ou des ravageurs comme les larves de Sitones qui s'attaquent aux nodosités ou le pathogène *Aphanomyces euteiches* qui provoque une pourriture du système racinaire chez certaines espèces comme le pois, la lentille ou certaines vesces (SCHNEIDER et *al*.,2015) .

4.7. Resistance aux antibiotiques

La résistance intrinsèque aux antibiotiques est importante, du point de vue écologique, pour les micro-organismes du sol, en raison d'une compétitivité plus élevée et d'une plus grande aptitude à survivre, principalement dans les micro-organismes du sol, en raison d'une compétitivité plus élevée d'une grande aptitude a survivre, principalement dans les sites arides où la sécheresse et le pH alcalin favorisent la croissance d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques (GROUZIS et LE FLOC'H,2003).

Tableau 4 : la résistance aux antibiotiques chez *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium medicae*

Antibiotiques	*Sinorhizobium meliloti*	*Sinorhizobium medicae*
Ampicilline	+	+
Erythromycine	+	+
Ciprofloxacine	-	-
Pénicilline	+	+
Polymixine	-	-
Cloxacilline	+	+
Oxitetracycline	-	-
Gentamicine	-	-
Cefuroxime	+	+

Source : VELAZQUEZ et RODRIGUEZ-BARRUECO,2007

5. Intérêts de la symbiose

5.1. Pour les deux organismes

La légumineuse donne à la bactérie les glucides, l'énergie qu'elle fabrique et la seconde fournit à la première une partie de l'azote qu'elle prélève dans l'air (POUSSET, 2008).

Les Fabacées en digérant les vielles bactéries, profitent des protéines synthétisées par le rhizobium. La nodosité offre ainsi un abri aux rhizobiums et leur apporte l'azote gazeux du sol qui pénètre dans les racines par les poils absorbants et les tissus (FAURIE, 2011)

Non seulement les bactéries de la nodosité profitent de la symbiose mais aussi les bactéries libres du sol. En effet, la plante « nodulée », plus vigoureuse sur le sol pauvre en azote qu'une plante non « nodulée », enrichit sa rhizosphére en composés carbonés et azotés (sucres, acides aminés, vitamines…) qui seront assimilés par les bactéries vivantes au contact de ses racines (MOROT-GAUDRY et PRAT, 2012).

La luzerne par exemple en se décomposant, ces racines laissent des vides qui profiteront aux vers de terre (BERTRAND et DE HALLEUX, 2005)

5.2. Sur le plan agronomique

MOCEK-PLOCINIAK et *al.* (2008) ont démontré que les plantes inoculées avec une densité de 10% étaient caractérisées par une meilleure croissance, une grande quantité de matière sèche et un bon développement de la partie racinaire ainsi qu'une activité de nitrogénase la plus élevée.

Cet effet s'est exercé surtout à un stade précoce du développement de la plante (25 jours après la levée), où les nodules n'ont pas encore atteint la maturité et n'ont pas commencé la fixation de l'azote (L'TAIEF et *al*., 2009).

Grâce à cette association symbiotique, les fabaceae participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote, en s'établissant comme flore pionnière, initiatrice d'une succession écologique. Elles constituent par ailleurs une source d'alimentation extrêmement importante aussi bien pour l'homme (soja, pois, haricot…) que pour l'animal (trèfle, luzerne…) (GIRAUD, 2007).

Les fabaceae peuvent aider à combattre le problème du manque d'azote et des mauvaises herbes (NIEUWENHUIS et NIEUWENLINK, 2005).

5.3. Sur le plan écologique

La symbiose est aussi identifiée comme une voie possible de limitation des émissions de gaz à effet de serre par les systèmes cultivés ,d'une part par l'absence d'usage de carburants fossiles pour la fourniture d'azote assimilable et d'autre part par l'absence d'émissions de N_2O au cours du développement de la culture de fabaceae ; à la différence des plantes recevant une fertilisation de synthèse industrielle (GERMON, 2013).

L'introduction de fabaceae au sein d'une succession culturale ou en association dans les prairies génère plusieurs effets positifs sur l'environnement, à commencer par une réduction des émissions de gaz à effet de serre. Ces plantes, capables de capter l'azote de l'air et d'apporter de la diversité végétale, favorisent les économies d'intrants à l'échelle des rotations : principalement des engrais azotés, mais aussi des produits phytosanitaires.

L'impact sur la qualité du sol est également démontré pour la culture de fabaceae fourragères comme la luzerne : apport de matière organique, restructuration, développement de microflore et microfaune (DEBARGE et TENAUD, 2015).

5.4.Les symbioses et développement durable

Les cultures fourragères tropicales, qui servent à nourrir le bétail, sont d'une importance capitale dans le développement durable des régions chaudes (KLEIN et *al*., 2014).

Les symbioses végétales jouent un rôle déterminant dans le développement de la production agricole durable vu leurs intérêts agronomiques, économiques et écologiques et leur compréhension a été perçue comme un grand événement scientifique. L'introduction des symbioses végétales dans les systèmes de culture offre aussi d'autres atouts environnementaux tels que le maintien de la productivité des agro-écosystèmes en contribuant à l'amélioration de la fertilité des sols et la réhabilitation des sols dégradés, au contrôle des insectes nuisibles, des maladies telluriques et des mauvaises herbes (LAZALI, 2015).

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Les Souches utilisées

Quarante et une souches de Sinorhizobium, déjà isolées et purifiées, fournies par M. AZIB , obtenu à partir des nodosités de deux fabaceae : la Luzerne (*Medicago sativa*L.) et le Mélilot (*Melilotus indicus*), ont été utilisées pour la réalisation de cette étude. Ces souches proviennent de différentes zones agricoles appartenant aux deux régions : Ouargla et El Oued. Les micro-symbiontes utilisés sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5: Codes et origines des souches utilisées dans notre étude.

Code initiale des souches	Nouveau code	Plante hôte	Origine
O1M12	O1	*Melilotus indicus*	**Ouargla**
O1M13	O2	*Melilotus indicus*	**Ouargla**
O114	O3	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O132	O4	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O152	O5	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O163	O6	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O172	O7	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O182	O8	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O211	O9	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O213	O10	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O223	O11	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O313	O12	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O321	O13	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O341	O14	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O344	O15	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O413	O16	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O422	O17	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O442	O18	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O452	O19	*Medicago sativa*	**Ouargla**
O461	O20	*Medicago sativa*	**Ouargla**
E111	E1	*Medicago sativa*	**El Oued**
E114	E2	*Medicago sativa*	**El Oued**
E131	E3	*Medicago sativa*	**El Oued**
E141	E4	*Medicago sativa*	**El Oued**
E213	E5	*Medicago sativa*	**El Oued**
E222	E6	*Medicago sativa*	**El Oued**
E232	E7	*Medicago sativa*	**El Oued**
E244	E8	*Medicago sativa*	**El Oued**
E251	E9	*Medicago sativa*	**El Oued**
E333	E10	*Medicago sativa*	**El Oued**
E344	E11	*Medicago sativa*	**El Oued**

E352	E12	*Medicago sativa*	**El Oued**
E353	E13	*Medicago sativa*	**El Oued**
E421	E14	*Medicago sativa*	**El Oued**
E432	E15	*Medicago sativa*	**El Oued**
E441	E16	*Medicago sativa*	**El Oued**
E452	E17	*Medicago sativa*	**El Oued**
E512	E18	*Medicago sativa*	**El Oued**
E521	E19	*Medicago sativa*	**El Oued**
E532	E20	*Medicago sativa*	**El Oued**
E543	E21	*Medicago sativa*	**El Oued**
1021	1021	/	INRA de Toulouse, France
2011	2011	/	INRA de Toulouse, France

2. Milieu de culture utilisé

Les ensemencements des souches se sont fait sur milieu YMB (liquide) et YMA (solide) selon la méthode préconisée par VINCENT, 1970. Le milieu liquide servira pour la réalisation des différents tests physiologiques, suivi par la confirmation sur milieux solide.

Le milieu de culture YEM est réputé être le mieux adapté pour l'étude des rhizobiums dont la composition (en g/l) est la suivante : Extrait de levure : 10; mannitol: 10 ; KH_2 PO_4: 0,1 $MgSO_4$: 0,2; KNO_3: 0, 7; $CaCl_2$:0.04 ; Agar: 12 à 15, est utilisé pour l'isolement et la production de biomasse des souches des Rhizobiums, c'est un milieu qui permet d'obtenir une croissance optimale de ces souches, il contient le mannitol (source de carbone préférée par les *Rhizobium*) (VINCENT, 1970).

3. Méthodes d'étude de la diversité des rhizobiums

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour évaluer la diversité des rhizobiums. Ces techniques permettent l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques nécessaires à l'étude de la diversité.

Nous nous sommes limités, dans notre étude, à la caractérisation physiologique des souches rhizobiennes par rapport aux facteurs abiotiques prédominant dans les sols sahariens, à savoir : la température, le pH, la salinité. Ces derniers sont complémentés par un test de résistance aux antibiotiques.

3.1. Tolérance à la Salinité

La capacité des souches à croître à différentes concentrations de NaCl a été testée par l'additionnement à des concentrations croissantes en sel allant de 0 à 1280 mM/L.

Chaque tube est rempli de milieu de culture est ensemencé par 300 microlitre de pré-culture bactérienne d'une souche connue, puis incubé à 28 °C dans un incubateur-agitateur à 220 tour/mn pendant 72h.

Pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus par ensemencement sur milieu liquide, les souches sont ensemencées sur milieu solide à différentes concentrations en NaCl , puis incubées à 28°C pendant 72h.

3.2.Tolérance au pH

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance au pH sur milieu YEM liquide à 0,1g/l de NaCl après trois jours d'incubation à 28°C. Les pH étudiés vont de 4à 9. Nous les avons ajusté par l'addition de HCl ou du NaOH.

Comme pour le paramètre précèdent, les souches sont ensemencées sur milieu solide à différentes pH, puis incubées à 28°C pendant 72h.

3.3.Tolérance à la Température

L'ensemencement des tubes a été établi de la même manière que les précédents paramètres, puis incubés à différentes températures (4, 28,37 et 45 °C), dans un incubateur agitateur à 220 tr/mn.

Le pH de milieu est ajusté à 6.8. La salinité du milieu de culture est 0,1g/1.

La croissance des souches dans ces différents tests est mesurée grâce à l'évolution de la densité optique pendant trois jours successifs (spectrophotomètre à 600 nm).

3.4.Test de résistance aux antibiotiques

En appliquant la méthode préconisée par Sanofi Diagnostics Pasteur (CA-S.F.M., 1996 ; in YATTARA et *al.*,2000); Pour chaque souche, une suspension de 300 microlitres a été servi pour ensemencer une boîte de Pétri contenant du milieu yeast extract mannitol agar, Après

avoir aspiré l'excès de suspension, les disques sont légèrement appliqués à la surface du milieu, à l'aide de pinces stériles puis incubés pendant 3 jour à 28°C.

L'objectif du test n'est pas d'examiner les concentrations inhibitrices des antibiotiques, mais de voir les réponses des différentes souches face à ces derniers dans le but d'étudier la diversité.

Les antibiotiques utilisés sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau6 : Liste des antibiotiques utilisés

Antibiotiques	sigle
Acide fusidique	FC
Amikacine	AN
Amoxicillin	AMX
Chloramphénicol	C
Colistine	CN
Erythromycine	(E)
Kanamycine	K
Pénicilline	P
Spiramycine	SP
Vancomycine	VA

Chapitre III

Résultats et discussions

1. Lecture des résultats de l'effet des températures sur la croissance rhizobienne

Tableau 7 : effet des différentes températures sur la croissance des souches étudiées

SOUCHES	TEMPERATURES (°C)				SOUCHES	TEMPERATURES (°C)			
	T4 (°C)	T28	T37	T45		T4	T28	T37	T45
O1	0,022	0,759	0,575	0,118	**E1**	0,12	0,945	0,802	0,127
O2	0,081	0,653	0,977	0,089	**E2**	0,17	0,918	0,638	0,129
O3	0,082	1,188	0,927	0,096	**E3**	0,152	0,719	0,945	0,164
O4	0,066	1,019	1,039	0,222	**E4**	0,066	0,726	0,814	0,143
O5	0,136	0,972	0,936	0,202	**E5**	0,045	0,623	0,635	0,252
O6	0,121	0,972	1,025	0,125	**E6**	0,035	0,823	0,644	0,124
O7	0,067	0,935	0,71	0,12	**E7**	0,189	0,55	0,595	0,191
O8	0,05	0,973	0,586	0,202	**E8**	0,036	0,822	0,637	0,141
O9	0,03	1,087	0,623	0,108	**E9**	0,111	0,53	0,674	0,129
O10	0,08	0,809	0,863	0,098	**E10**	0,112	0,724	0,638	0,12
O11	0,174	0,891	1,105	0,186	**E11**	0,11	0,709	1,078	0,122
O12	0,026	1,006	0,77	0,203	**E12**	0,198	0,861	0,856	0,097
O13	0,099	0,975	0,755	0,109	**E13**	0,067	0,693	0,914	0,11
O14	0,035	0,892	0,935	0,082	**E14**	0,128	0,821	0,661	0,135
O15	0,055	0,794	0,638	0,103	**E15**	0,064	0,747	0,653	0,141
O16	0,043	0,927	0,92	0,114	**E16**	0,071	0,707	0,693	0,119
O17	0,082	0,972	0,85	0,095	**E17**	0,067	0,825	0,431	0,123
O18	0,076	0,849	0,725	0,089	**E18**	0,017	0,591	0,766	0,291
O19	0,046	1,102	0,838	0,094	**E19**	0,043	0,834	0,703	0,276
O20	0,156	0,824	0,982	0,165	**E20**	0,069	0,721	0,815	0,302
1021	0,264	0,954	0,917	0,149	**E21**	0,191	0,634	0,812	0,195
2011	0,266	0,834	0,883	0,175					

1.1.Effet de la Température 4°C

L'effet de la température 4°C sur la croissance des souches est représenté dans la figure suivante :

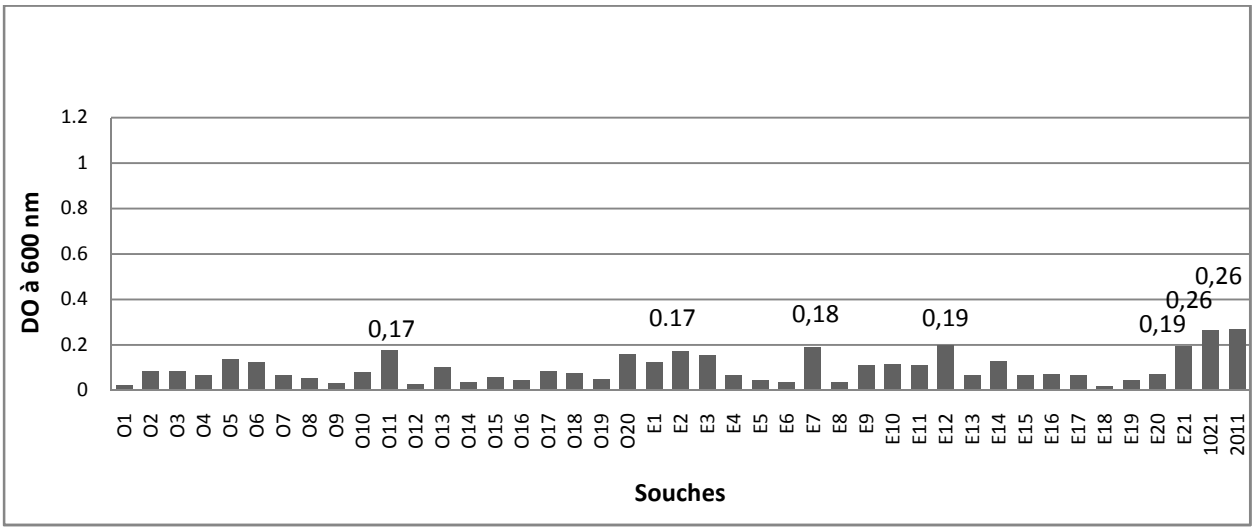

Figure3 : Effet de la température 4°C sur la croissance des souches

Nous remarquons, à première vue, que les DO enregistrées à 4°C sont très faibles, ce qui indique que la croissance des différentes souches est inhibée. Celles ayant eu les meilleures croissances à cette température (traduite par les DO les plus élevées) sont respectivement : 2011, 1021, E12, E21, E7, E11, O20 et E3. La plus faible croissance est enregistrée avec la souche E18.

Tableau 8. Croissance des souches sur milieu solide à 4°C.

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Sur milieu solide, cette température a inhibé la croissance de toutes les souches. Aucune colonie n'est apparue sur le milieu gélosé.

Photo 4 : absence de croissance chez deux souches à 4°C

1.1.1. Effet de la Température 28

L'histogramme ci-dessous représente l'effet de la température 28°C sur la croissance de souches étudiées :

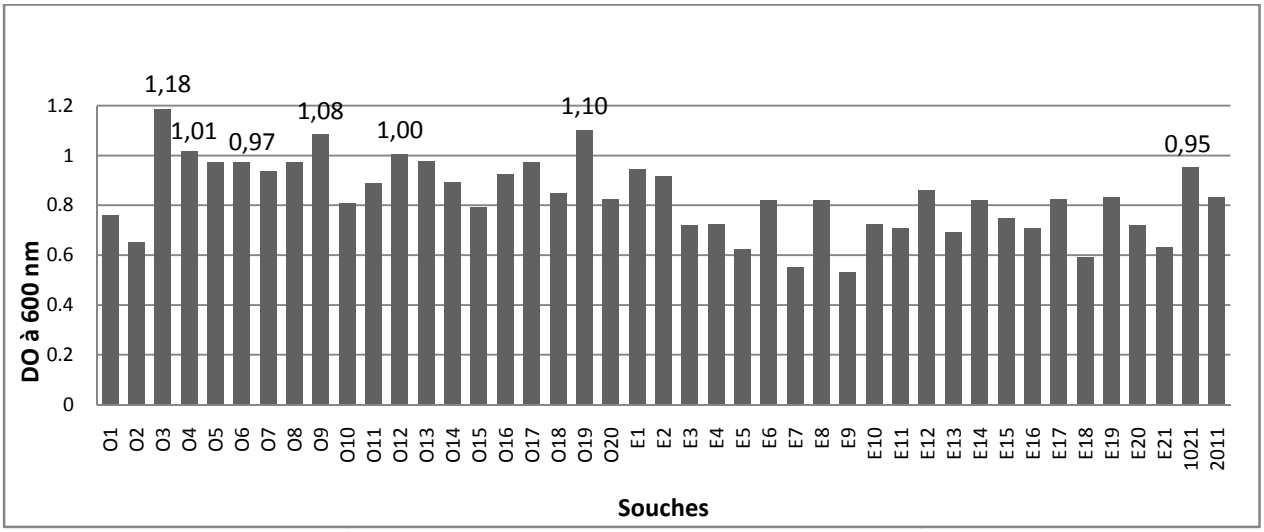

Figure 4 : Effet de la température 28°C sur la croissance des souches

Les résultats de la DO obtenus à cette température sont largement plus élevés que ceux mentionnés précédemment à 4°C. Les meilleures croissances (avec DO>0.9) sont enregistrées avec les souches : O3, O19, O9, O4, O12 O13, O17, O8, O5 et O6, O7 et O16 .Nous remarquons que celles qui ont poussé le mieux (à partir d'une DO= 0.9) appartiennent,

exclusivement, à la région de Ouargla. Les souches références utilisées se classent au milieu avec la 1021(DO=0.945) et la 2011 (DO=0.834) La souche qui a obtenu la plus faible croissance est la E9 .

Tableau9. Croissance des souches sur milieu solide à 28°C.

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sur un milieu solide, toutes les souches ont montré une bonne croissance.

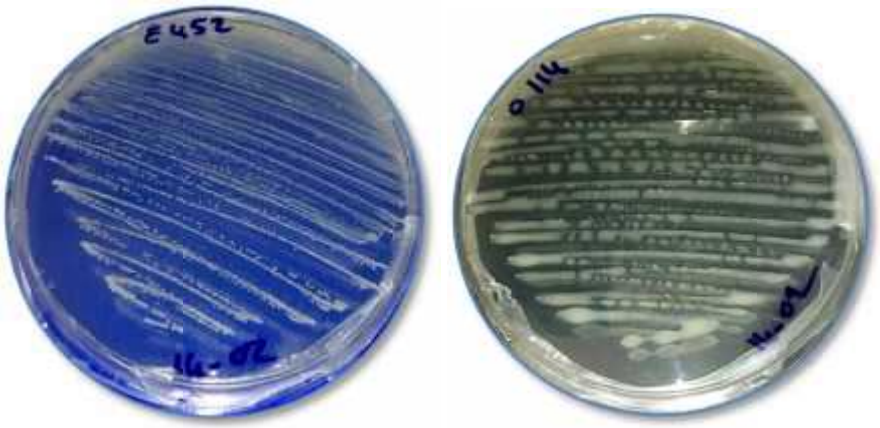

Photo 5 : bonne croissance enregistrée chez deux souches à 28°C sur milieu solide.

1.1.2. Effet de la Température 37

L'influence de la température 37°C sur la croissance des souches est indiqué dans la figure ci-dessous :

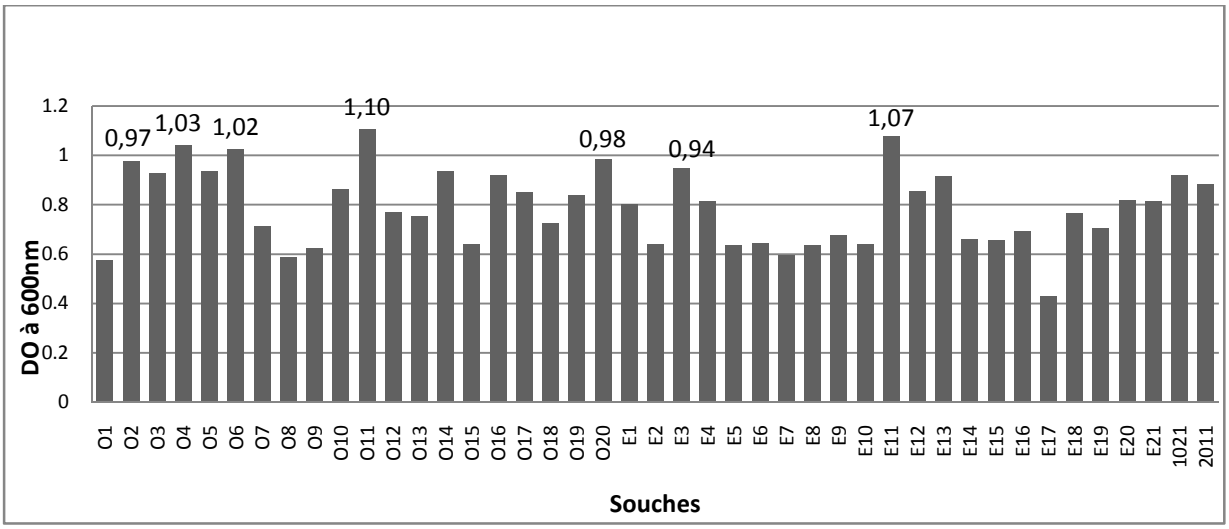

Figure 5 : Effet de la température 37°C sur la croissance des souches

Les souches qui ont obtenu des croissances égales ou supérieures à DO = 0.9, sont par ordre décroissant: O11, E11, O4, O6, O20, O2, E3, O5, O14, O3, O16, 1021 et E13 et Nous constatons, comme ce fut le cas à 28°C, que les souches provenant de la région de Ouargla enregistrent les meilleures croissances. La souche qui a marqué la plus faible valeur est E17.

Tableau10. Croissance des souches sur milieu solide à 37°C.

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20		
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Un résultat positif, pour toutes les souches, en milieu solide est enregistré.

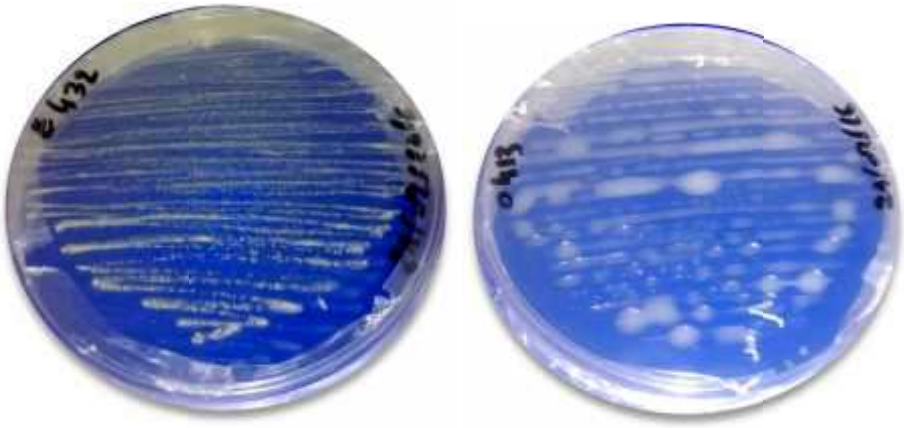

Photo 6 : Résultats de deux souches cultivées à 37°C

1.1.3. Effet de la Température 45

La figure suivante représente la DO des souches incubées à 45°C pendant 72h :

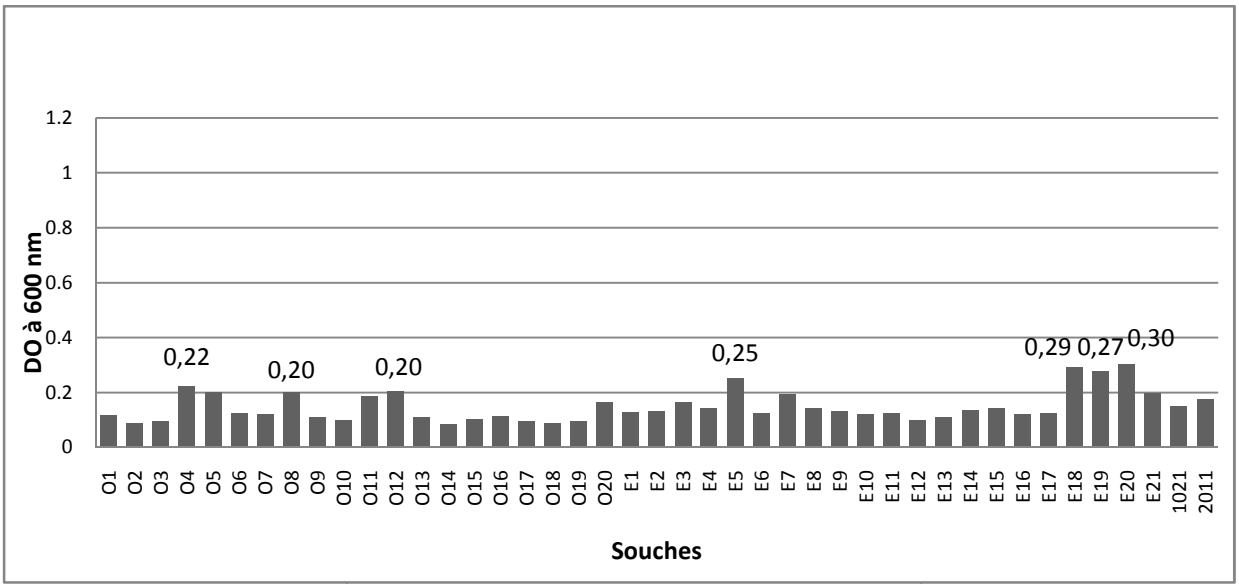

Figure 6 : Effet de la température 45°C sur la croissance des souches

La croissance enregistrée à 45 °C est trop faible pour toutes les souches. Seules les huit suivantes ont franchi le seuil de (DO= 0,2) : E20, E18, E19, E5, O4, O12, O8, et O5, où cette dernière a atteint la valeur maximale de croissance DO=0.302, tandis que la valeur minimale est de DO=0.082, obtenue par la souche O14.

Tableau11. Croissance des souches sur milieu solide à 45°C.

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20	1021	
Observation	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	2011
Observation	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

Sur milieu YEM solide, les six souches ayant montrées les meilleures croissances sur milieu liquide l'ont confirmé sur milieu solide où elles ont pu former quelques colonies isolées, à savoir : O4, O5, E5, E18, E19 et E20.

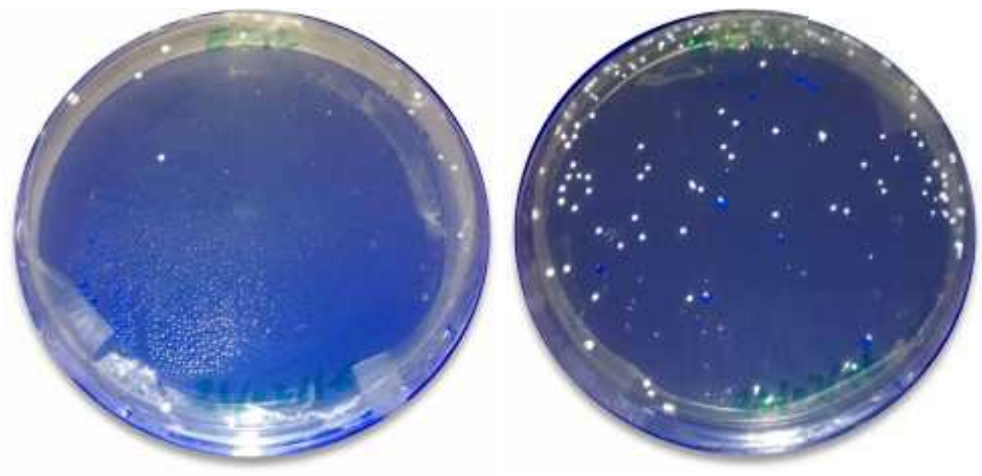

Photo 7 : apparition de quelques colonies chez deux souches cultivées à 45°C.

1.2.Discussion de l'effet des différentes Températures

Nos résultats montrent que toutes les souches Rhizobiennes étudiées ont une meilleure croissance à 28 et 37 °C avec des moyennes de DO égales à 0.83 et 0.79 respectivement. Parfois, la croissance des souches à 37°C a dépassé celle de 28°C chez onze souches à savoir : O2, O4, O6, O10, O11, O14, O20, E3, E4, E5, E7, E9, E11, E13 , E18, E20, E21 et 2011). Nos conclusions confirment celles faites par BRENNER et KRIEG (2006) et de HAMEED et *al*. (2014), qui énoncent que la température optimale pour la croissance des rhizobia est comprise entre 25 et 28°C et peuvent croitre à 37 °C.

BLAZINKOV et *al*. (2010) ont confirmé une diversité au sein des souches de *Sinorhizobium meliloti* à croître dans des températures élevées (croissance à 37°C > à celle entre 25 et 29°C). Des résultats similaires ont été publiés par SHAMSELDIN *al*. (2009), qui

stipulent également que les souches de *S. meliloti* indigènes poussent bien à des températures de 37 ° C.

Pour les températures extrêmes 4 et 45°C, la croissance bactérienne est fortement inhibée, traduite par des valeurs de DO moyenne, de l'ensemble des souches, très faible (0,09 et 0,15). L'effet des températures basses (4°C) sur l'arrêt de la croissance des rhizobia est signalé par NISTE et *al*., (2015). De nombreuses souches de rhizobia isolées de sols sahéliens, sénégalais et tunisiens ont été étudiées par *CACCIARI et al., 2016*. Leurs résultats montrent que des souches sont capables de se multiplier à 40 °C et même à 45 °C.

SINGH et *al.*, (2013) confirment que les Rhizobia se développent moins bien à 45°C. Il y'a des espèces Rhizobiennes thermophiles qui croissent au-dessus de 45 ° C à 50 °C (BOBOYE et *al*., 2011). Dans notre cas, six souches en pu croitre à 45°C (O4, O5, E5, E18, E19 et E20), laissant croire qu'elles sont résistantes aux températures élevées. Cette résistance peut être justifiée par la zone climatique d'où elles sont isolées (Sahara). Cette conclusion est confirmée par GROUZIS et LE FLOC'H (2003).

2. Lecture des résultats de l'effet de pH

2.1. Effet de pH=4

Le graphe ci-dessous montre l'effet du pH=4 sur la croissance des souches étudiées :

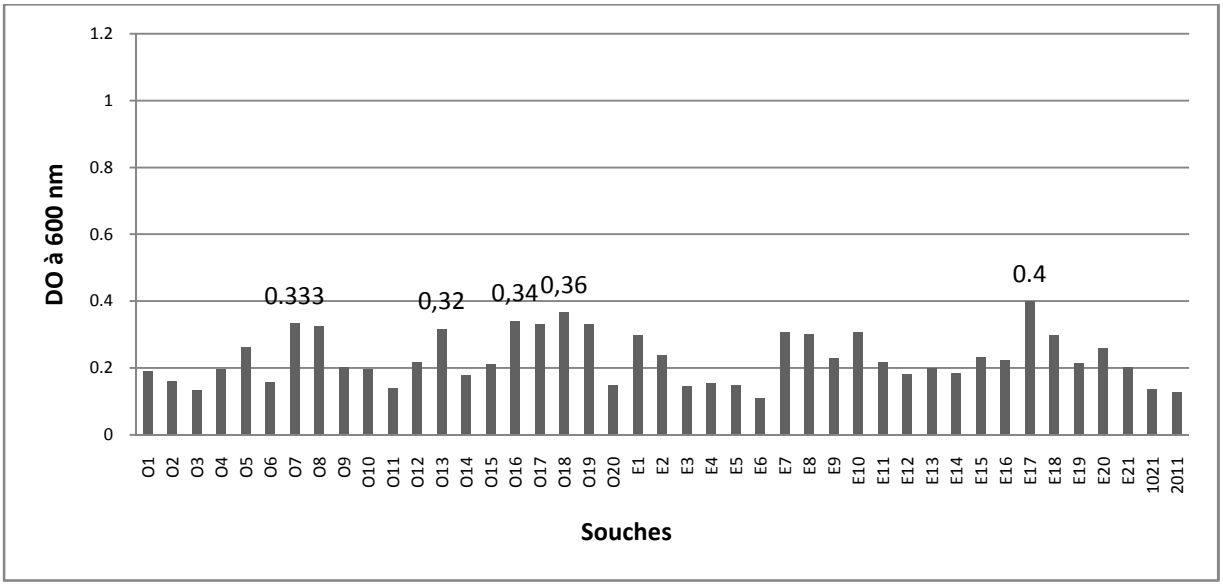

Figure 7: Effet du pH=4 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.

Les densités optiques enregistrées sont trop faibles (la DO moyenne est de 0.23 pour l'ensemble des souches), comparativement avec celles relevées au pH neutre. D'après la figure ci-dessous, douze souches ont dépassé le seuil de DO=0,3. La souche qui a résisté le mieux à ce pH est la E17 (DO= 0,4). La souche la moins tolérante est E6.

Tableau12. Croissance des souches sur milieu solide à pH=4.

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) croissance, (-) pas de croissance

En milieu solide, huit souches seulement ont pu croitre à ce pH (O5, O6, O8, O16, O17, O18, O19 et E17), appartenant majoritairement à la région de Ouargla.

Photo 8 : Croissance de quelques souches à pH=4 incubés à 28°C

2.1.1. Effet de pH 5

L'action du pH=5 exercé sur la croissance des souches est illustré par l'histogramme suivant :

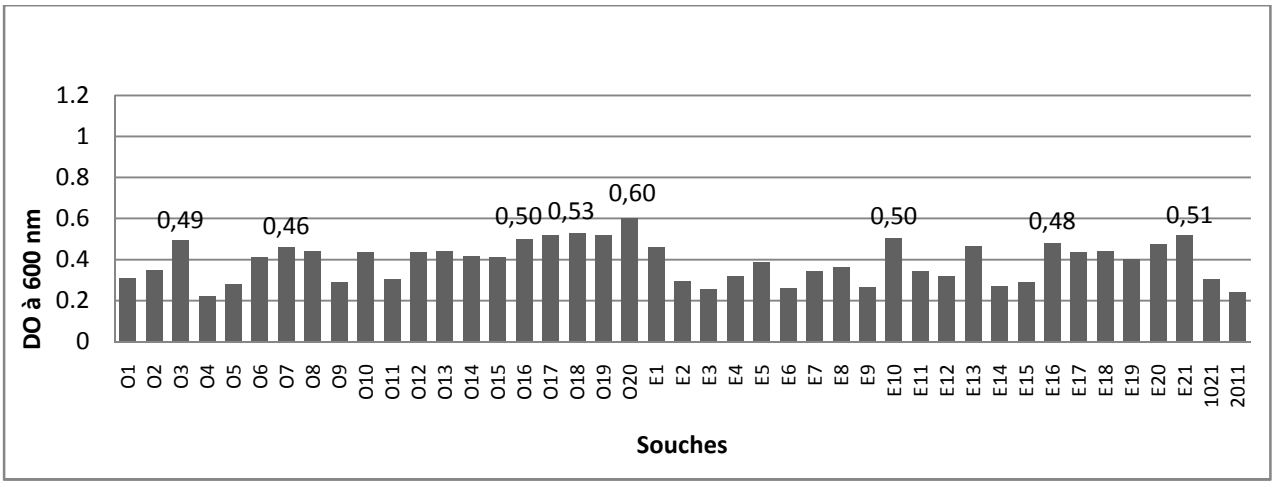

Figure 8: Effet du pH=5 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.

D'après la figure 8, la croissance des souches est meilleure que celle enregistrée à pH=4 (la DO moyenne de la condition est de 0.40). Les souches les plus tolérantes au pH=5 ont atteint une densité optique égale ou supérieure à DO= 0,5 : O20, O18, O19, O17, E21, E10 et O16 .Celle qui a marqué la plus faible croissance est la souche O4.

Tableau13. Croissance des souches sur milieu solide à pH=5.

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Sur milieu YEM solide, 30 souches appartenant aux deux régions d'étude, ont pu croitre et former des colonies visibles (O3, O6, O7, O8, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19, O20, E1, E2, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E13, E16, E17, E18, E19, E20 et E21)

Photo 9 : Croissance de quelques souches à pH=5 incubées à 28°C

2.1.2. Effet de pH 6

La figure ci-dessous représente l'effet du pH =6 sur la croissance de souches étudiées :

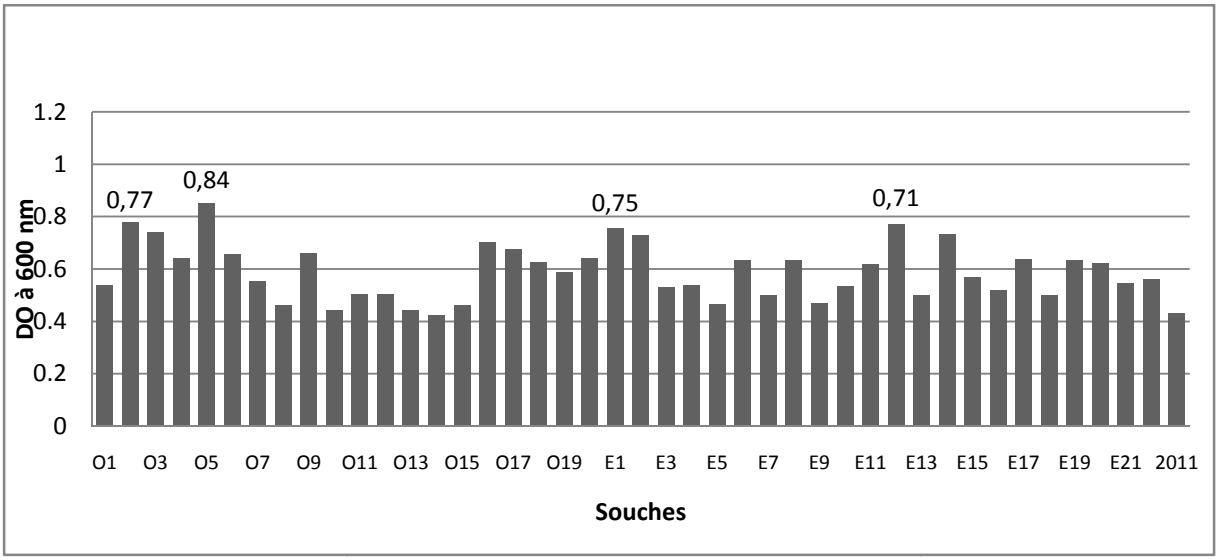

Figure 9: Effet du pH=6 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.

La croissance semble être meilleure que celle des deux pH précédents. La DO moyenne enregistrée est de 0.59. Les souches ayant une bonne croissance sont O5, O2, E12 E1, E14, E2, et O16. La valeur maximale de croissance à ce pH est 0.85 (souche O5) tandis que la valeur la plus faible est la O14.

Tableau14. Croissance des souches sur milieu solide à pH=6.

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	**+**	**+**

Sur milieu solide, toutes les souches ont montré une croissance comme montrée par la photo suivante.

Photo 10 : Croissance d'une souche à pH=6 cultivées à 28°C.

2.1.3. Effet de pH 6.8

L'influence du pH=6.8 sur la croissance des souches est indiquée dans la figure ci-dessous :

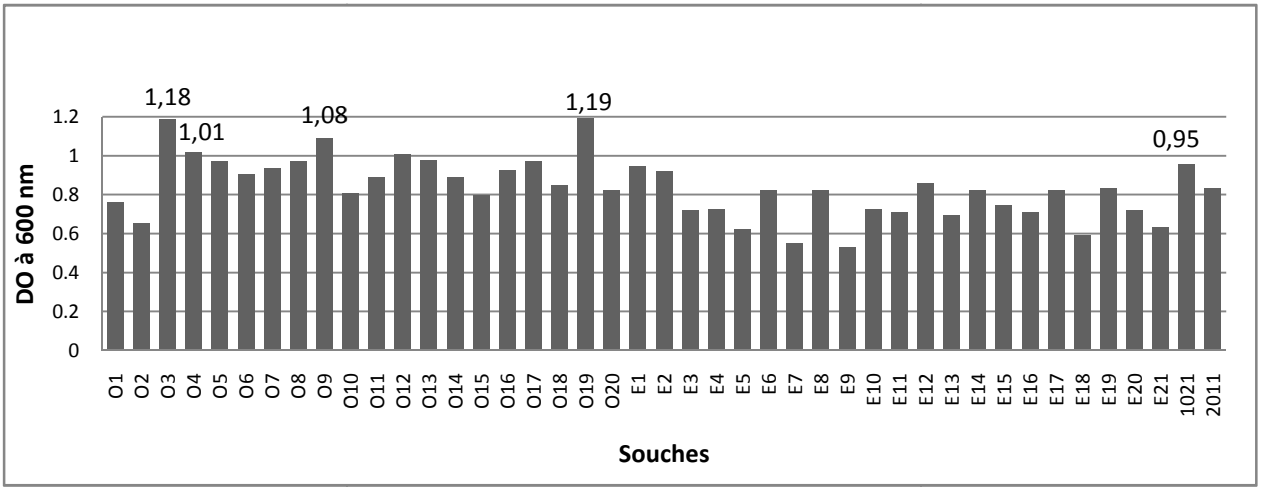

Figure 10: Effet du pH=6.8 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.

A pH neutre, la croissance se montre la meilleures par rapport aux autres pH avec une DO moyenne égale à 0.83. Quelques souches ont dépassé la valeur de DO=0.9 (O3, O19, O9, O4, O12, O13, O17, O8, O5 et O6, O7 et O16. La souche ayant la meilleure croissance est O20 (DO=1.191) et la souche qui a obtenu la plus faible croissance est E9 .

Tableau15. Croissance des souches sur milieu solide à pH=6.8

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20		
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++

Sur milieu solide toutes les souches ont montré une bonne croissance comme montré ci-après.

Photo 11 : Croissance d'une souche à pH=6.8 cultivées à 28°C.

2.1.4. Effet de pH 8

La figure suivante représente la DO des souches cultivé au milieu YMB ajusté à pH=8 :

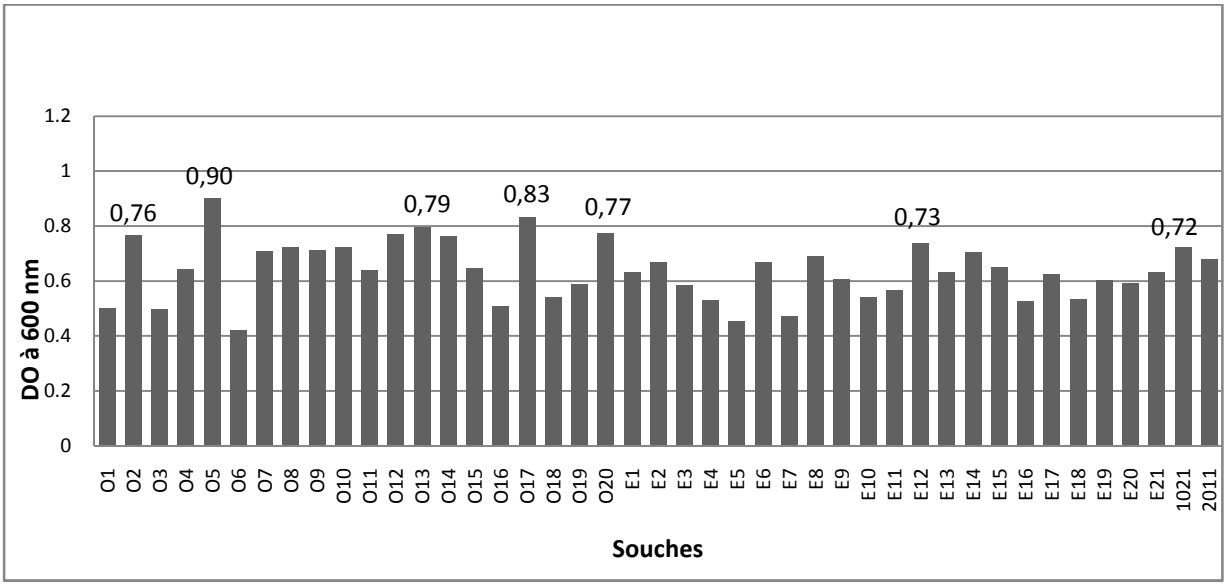

Figure 11: Effet du pH=8 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.

Nous remarquons que la croissance est affectée, traduite par une DO égale à DO=0.63 (moins importante qu'au pH=6.8). Les souches ayant la meilleure croissance sont, dans l'ordre (DO>0.7): O5, O17, O13, O20, O12, O2, O14, E12, O10, O8, 1021 O9, O7, E14. Ces souches appartiennent, presque toutes, à la région de Ouargla. Par contre, la plus faible notée est O6 (0.422).

Tableau16. Croissance des souches sur milieu solide à pH=8

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Sur milieu solide toutes les souches tolèrent cette concentration de pH et montrent une bonne croissance telle que montrée ci-dessous.

Photo 12 : Croissance d'une souche à pH=8 cultivées à 28°C.

2.1.5. Effet du pH = 9

L'histogramme ci-dessous montre l'effet du pH=9 sur la croissance des souches étudiées :

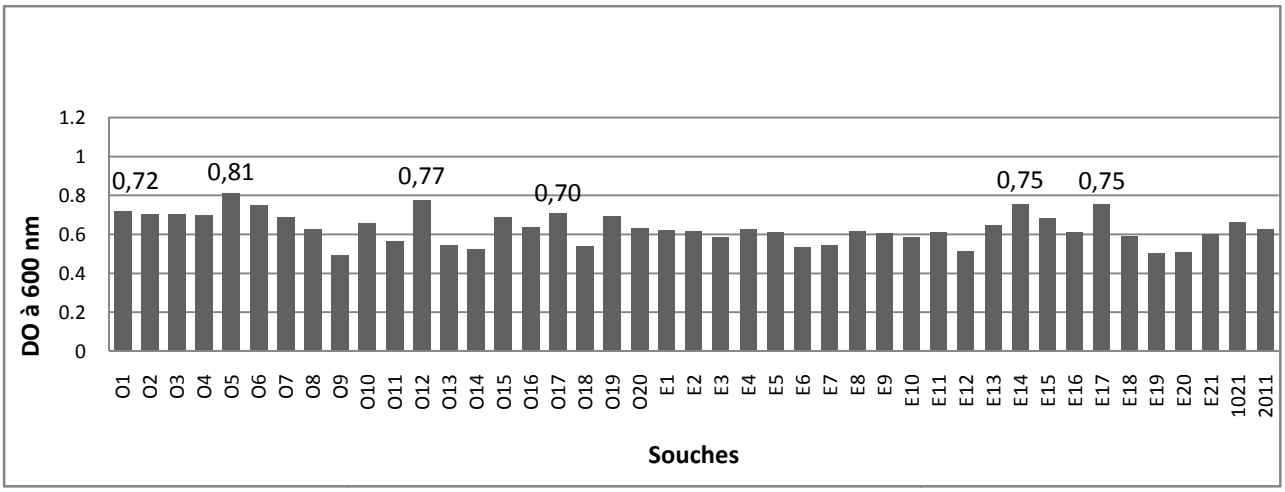

Figure 12: Effet du pH=9 sur la croissance des souches après 72h d'incubation.

La croissance enregistrée à cette condition ne semble pas être affectée par l'alcalinité du milieu. La DO moyenne est égale à celle de la condition précédente. Cela signifie que les souches étudiées sont résistantes à ce pH. Les souches O1, O2, O3, O4, O5, O6, O12, O17, E14 et E17 ont montré la meilleure croissance. La valeur maximale de croissance est 0.813, atteinte par la souche O5, tandis que la plus faible est 0.493 obtenue par la souche O9.

Tableau17. Croissance des souches sur milieu solide à pH=9

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	**+**	**+**

Sur les boites de pétri, toutes les souches ont montré une bonne croissance.

Photo 13 : Croissance d'une souche sur milieu de culture à pH=9.

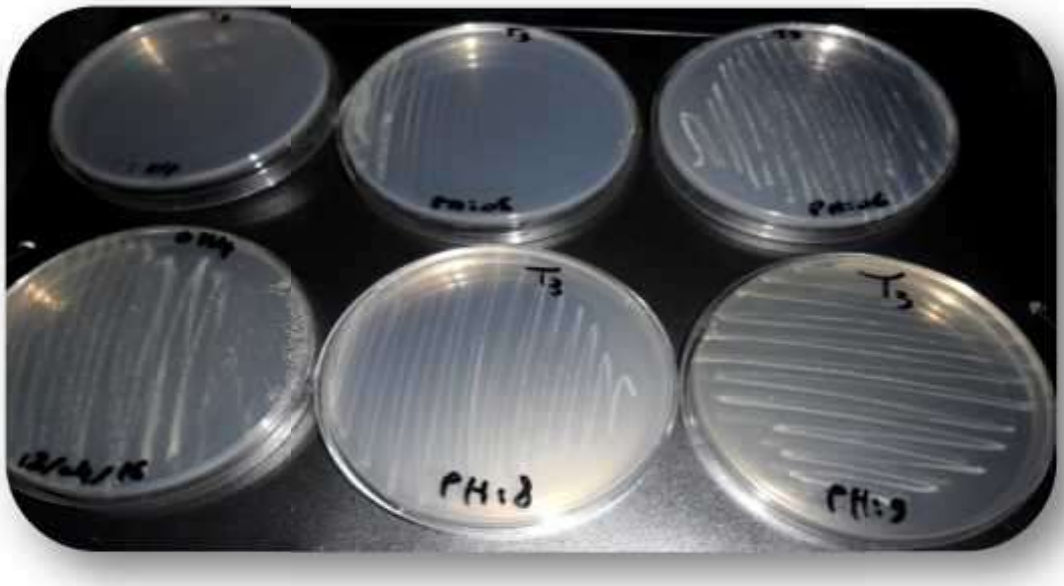

Photo 14 : Croissance des souches sur milieu de culture ajusté à différents pH cultivées à 28°C.

2.2.Discussion des résultats des différents pH

Le pH optimal pour la croissance de nos souches est le 6,8. Toutes les souches avaient une bonne croissance sur les milieux utilisés (liquide et solide).

Les meilleures croissances sont, par la suite, enregistrés aves les pH alcalins (8 et 9) où toutes les souches ont poussé, conclusion faite aussi par THAMI-ALAMI et *al*. (2010) qui ont travaillé sur la variabilité naturelle des populations de *Sinorhizobium meliloti* au Maroc.

Les travaux d'EL BOUTAHIRI et *al*., (2010) ont confirmé, en outre, que les rhizobiums de luzerne sont sensibles aux pH acides (pH 4) et la plupart des souches tolèrent une acidité de pH= 5,5 à 6,0,et que leur croissance a augmenté en milieu alcalin. Seules 6 souches sur 43 souches de la collection ont eu une croissance à pH4. En condition de pH 5, quelques souches ont une bonne croissance alors que les autres ont eu une croissance partielle, confirmée sur milieu gélosé. Ce résultat coïncide avec ceux de SATYANARAYANA et JOHRI (2005) et BLAZINKOV et *al*. (2010).

A travers ces résultats, nous constatons clairement que les réponses des souches aux variations de pH sont variées. Quelques unes ont montré une meilleure croissance au pH6 comparativement à celle obtenue au pH 8 et 9, comme le confirme HAMEED et *al*.(2014). D'autres préfèrent le milieu légèrement alcalin (pH = 8) qu'acide (pH 6 et 5). Ces conclusions sont similaires à celles obtenues par NISTE et *al*. (2013).

3. Lecture des résultats de l'effet du NaCl

Les différentes souches testées présentent une tolérance variable au NaCl

3.1.Croissance des souches à [0mM]

L'effet de l'absence de l'NaCl dans le milieu de culture sur la croissance des souches est illustré par l'histogramme suivant :

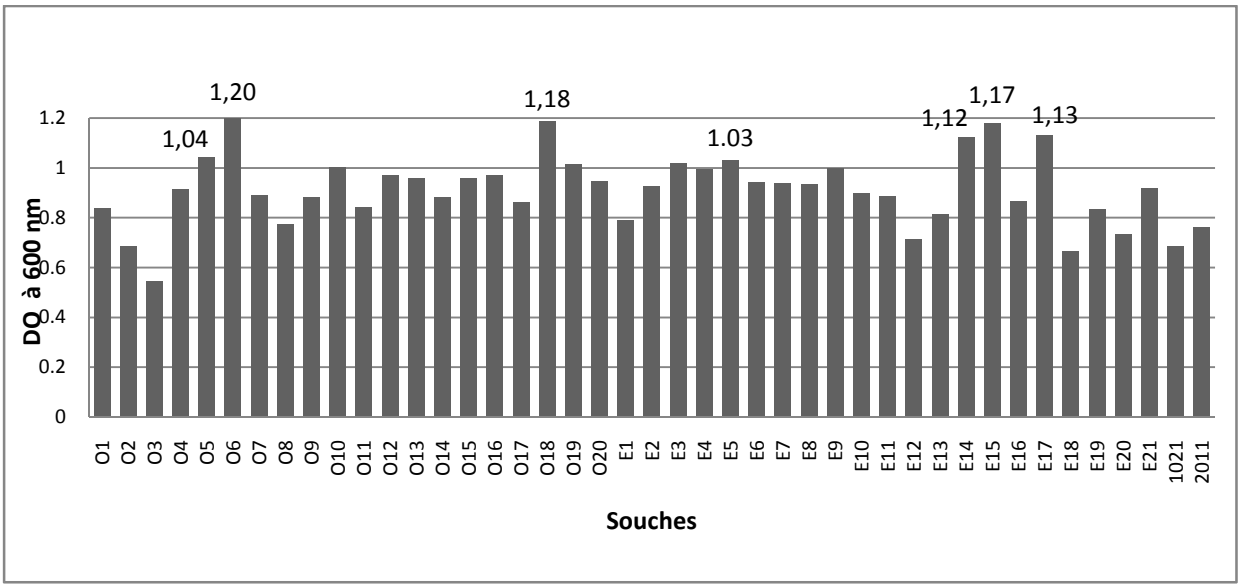

Figure 13 : Effet de l'NaCl 0 mM sur la croissance des souches

Les résultats obtenus à la concentration 0mM de NaCl montrent une croissance importante par rapport aux autres, avec une DO moyenne de 0,91. Cette croissance est traduite par des DO élevées. Les souches qui présentent le meilleur développement sont les suivantes (DO>1): O6, O18, E17, E14, O5, E5, E3, O19, et O10. Celle qui présente une croissance minimale est la souche O3.

Tableau18. Croissance des souches sur milieu solide à 0mM d'NaCl

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sur milieu solide, la totalité des souches ont une prolifération importante en comparaison aves les autres concentrations en NaCl, tel que montré par la figure ci-dessus.

Photo 15 : Croissance à 0 mM de NaCl cultivées à 28°C.

3.1.1. Croissance des souches à [40mM]

L'histogramme ci-dessous montre l'effet du NaCl=40 mM sur la croissance des souches étudiées :

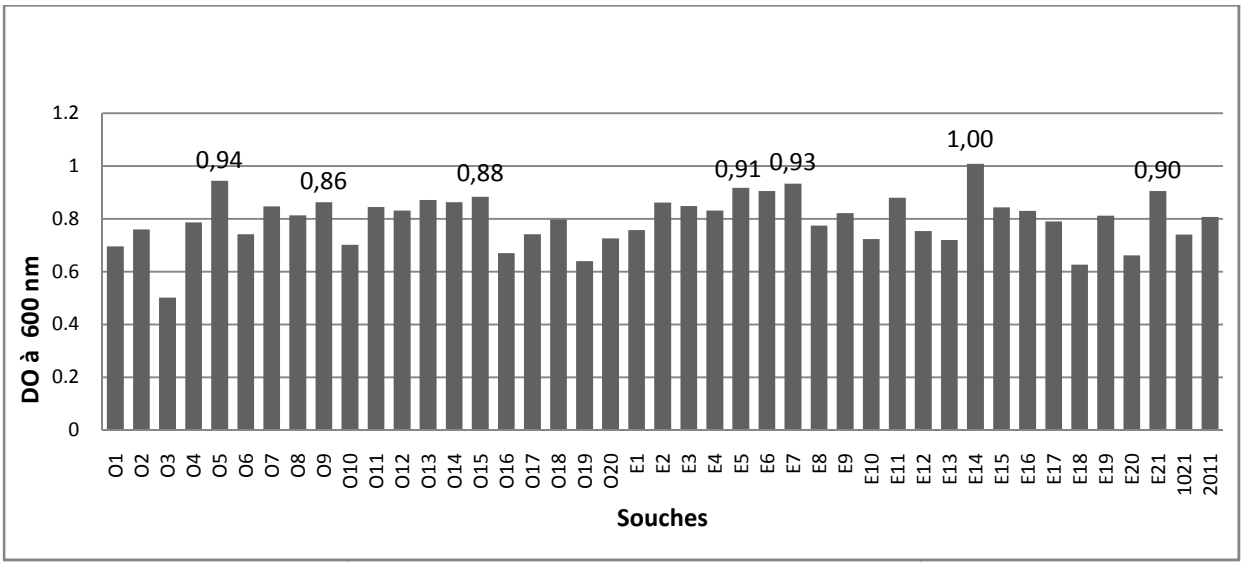

Figure 14 : Effet de l'NaCl 40 mM sur la croissance des souches

A faible concentration en NaCl égale à 40mM, toutes les souches montrent une bonne croissance avec une DO moyenne égale à 0,80. Les souches les plus performantes sont E14,

E5, E21 **(voir la figure 14),** par contre la souche qui a enregistré la plus faible croissance est O3 (DO=0.502).

Tableau19. Croissance des souches sur milieu solide à 40mM d'NaCl

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sur milieu solide, les souches ont une croissance importante comme montré par la photo 16. Des colonies nombreuses et bien visibles sont relevées.

Photo 16 : Croissance à 40 mM de NaCl cultivées à 28°C.

3.1.2. Croissance des souches à [80mM]

La figure ci-dessous représente l'effet du NaCl =80mM sur la croissance de souches étudiées :

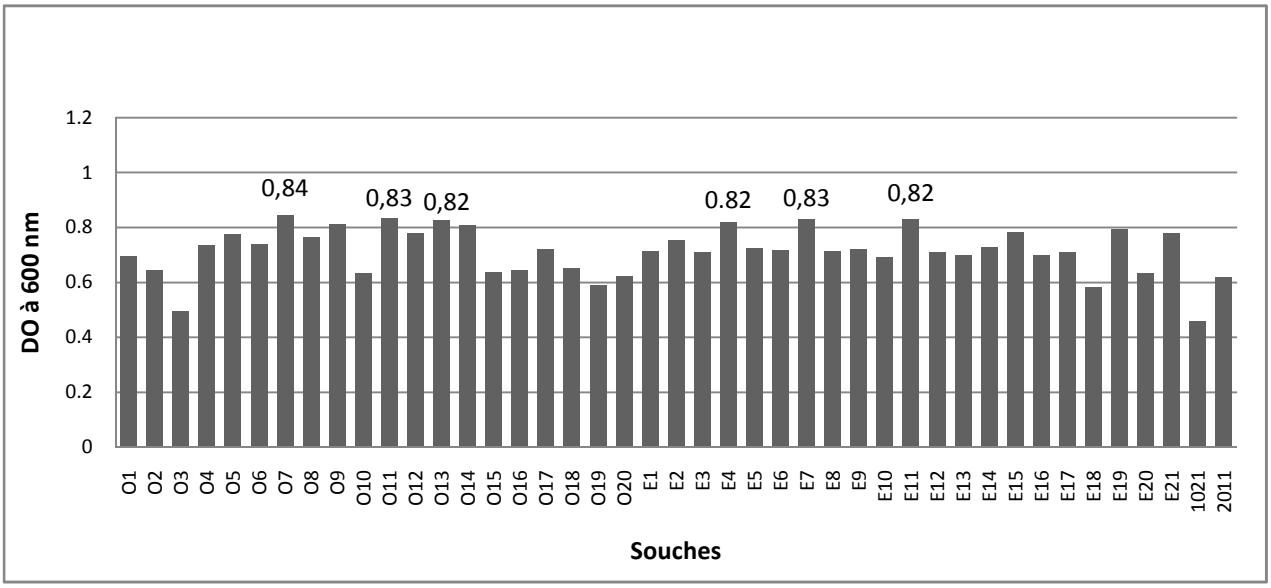

Figure 15 : Effet de l'NaCl 80 mM sur la croissance des souches

Les résultats obtenus à la concentration 80 mM montrent une bonne croissance avec une DO moyenne de 0,71. L'optimum de croissance est présenté par les souches O7, O11, E7, E11, O13, E4, O9 et O14, alors que la plus faible est présentée par la souche O3.

Tableau20. Croissance des souches sur milieu solide à 80mM d'NaCl

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

L'évaluation de la tolérance des souches à une concentration en NaCl, égale à 80mM sur milieu solide, a montré que toutes les souches présentent une bonne croissance.

Photo 17 : Croissance d'une souche sur milieu de culture à 80 mM d'NaCl cultivée à 28°C.

3.1.3. Croissance des souches à [160mM]

L'influence du NaCl=160mM sur la croissance des souches est indiqué dans la figure ci-dessous :

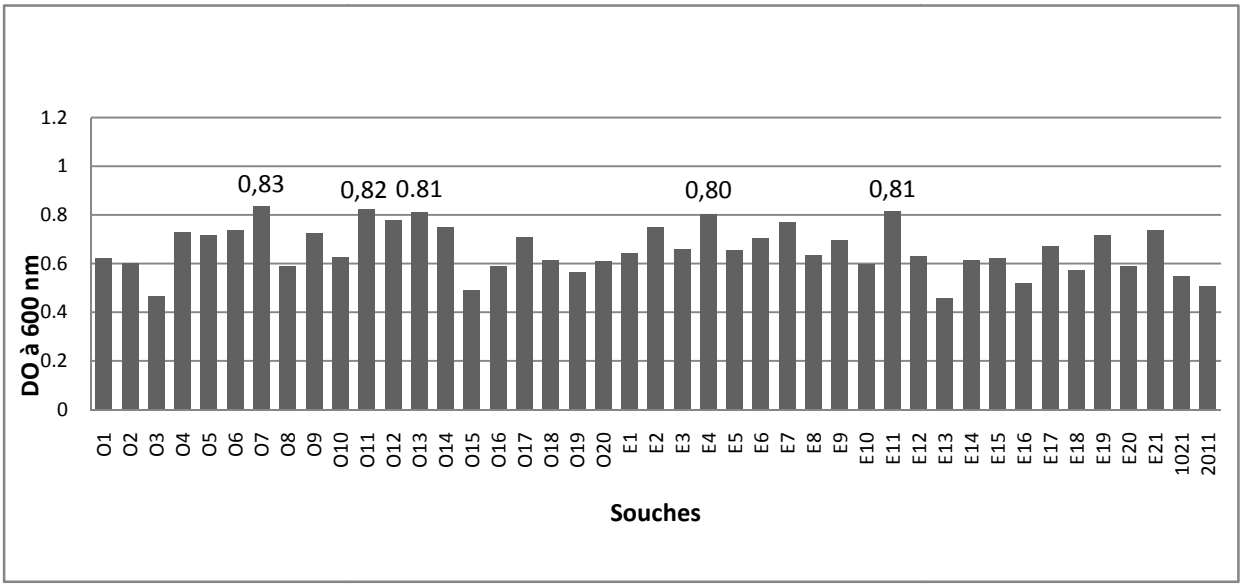

Figure 16 : Effet de NaCl à 160 mM sur la croissance des souches.

A travers les résultats que nous avons obtenus, nous notons que la croissance à 160mM de NaCl est inférieure à celle obtenue à 80 mM, avec une moyenne de DO=0,66. Les souches les plus performantes sont O7, O11, E1, O13, E4, O12, E7, E2, O14, E21, O6, O4, O9, O5, E19, O17 et E6. La moins performante est la souche O3.

Tableau21. Croissance des souches sur milieu solide à 160mM d'NaCl

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Les résultats obtenus sur milieu solide montrent une croissance remarquable de toutes les souches.

Photo 18: Croissance d'une souche sur milieu de culture à 160 mM d'NaCl cultivée à 28°C.

3.1.4. Croissance des souches à [320mM]

La figure suivante représente la DO des souches cultivé au milieu YMB additionné de 320mM d' NaCl

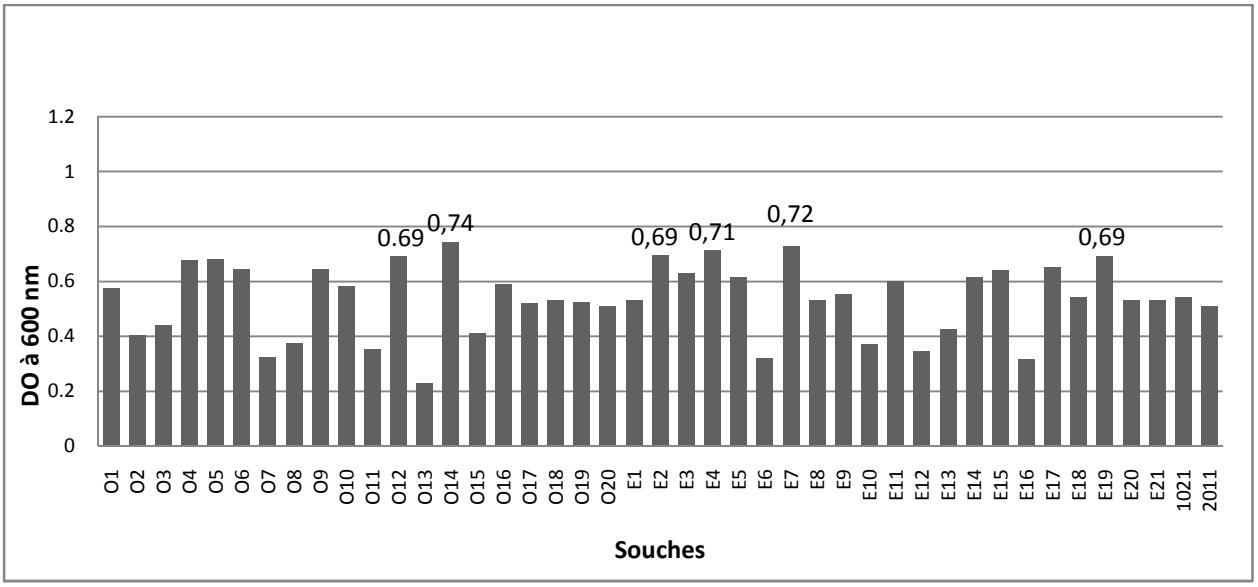

Figure 17 : Effet de l'NaCl 320 mM sur la croissance des souches

La croissance obtenue à cette concentration semble être affectée sensiblement par la salinité à 320 mM, par rapport aux autres concentrations précédentes. La DO moyenne est de 0,53. Les meilleures croissances sont enregistrées avec les souches : O14, E7, E4, E2 ,E19 ,O19, O5, O4, E17, O9 et O6, E15, E3, E14 et E5. La croissance minimale est celle de la souche E6.

Tableau22. Croissance des souches sur milieu solide à 320mM d'NaCl

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sur milieu solide, la totalité des souches montrent une croissance.

Photo 19 : Croissance d'une souche sur milieu de culture à 320 mM d'NaCl cultivée à 28°C.

3.1.5. Croissance des souches à [640mM]

L'histogramme ci-dessous montre l'effet du NaCl=640mM sur la croissance des souches étudiées :

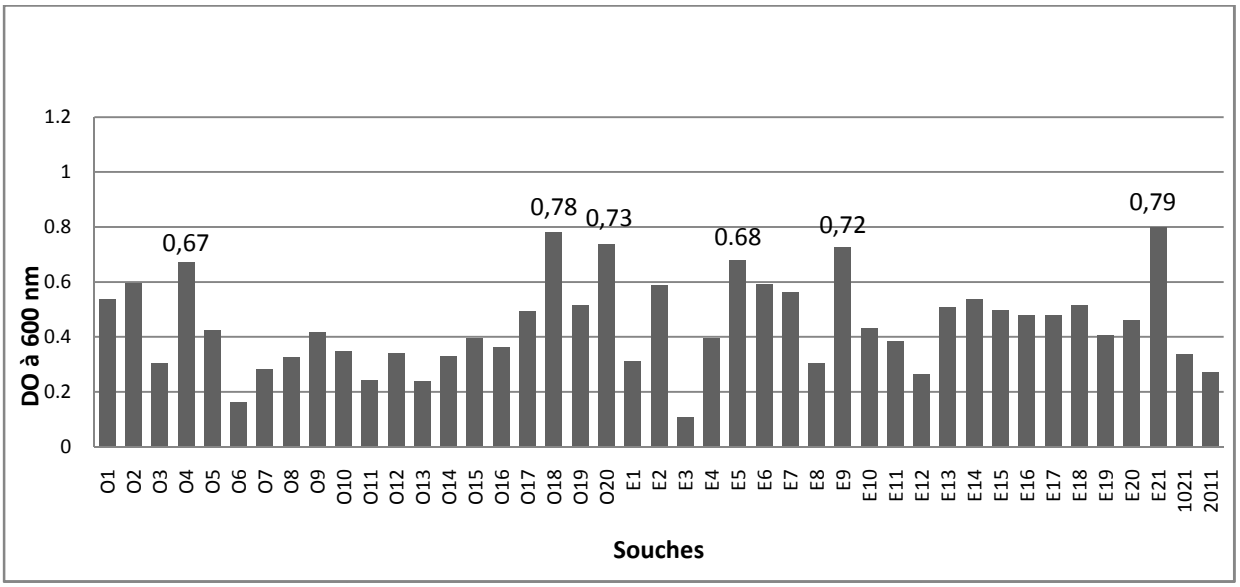

Figure 18 : Effet de l'NaCl 640 mM sur la croissance des souches

La figure 18 montre que la croissance des souches est affectée par cette salinité élevée. La DO moyenne enregistrée est de 0,44. Les souches les plus résistantes à l'élévation de la salinité sont : E21, O18, O20 et E9. La plus sensible est la souche E3.

Tableau23. Croissance des souches sur milieu solide à 640mM d'NaCl

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20			
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sur milieu solide, toutes les souches sont capables de croitre d'une façon moins importante que celles trouvées à la concentration 320mM d'NaCl.

Photo 20 : Croissance à 640 mM de NaCl à 28°C.

3.1.6. Croissance des souches à [1280mM]

L'action du NaCl=1280 mM sur la croissance des souches est illustré par l'histogramme suivant :

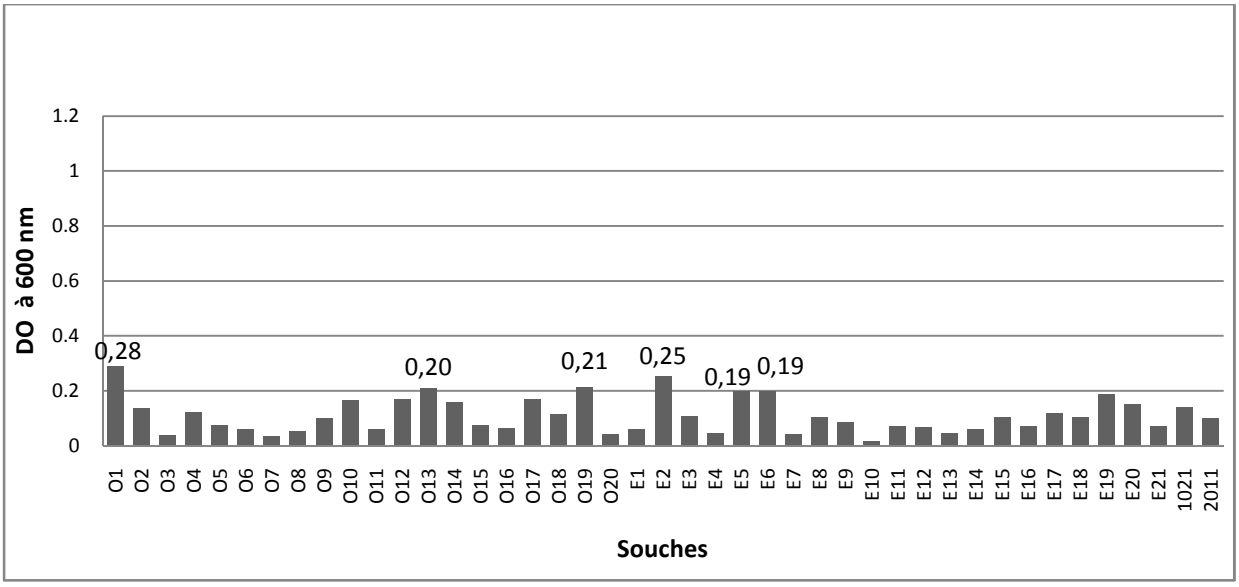

Figure 19 : Effet de NaCl à 1280 mM sur la croissance des souches

A la concentration 1280 mM de NaCl, la croissance est très fortement inhibée par la salinité élevée. Toutes les souches ont une très faible croissance. La DO moyenne de cette concentration est de 0,10 seulement. Les souches O1, E2, O19, O13 ont eu une certaine croissance (DO > 0.2) mais qui reste très faible.

Tableau24. Croissance des souches sur milieu solide à 1280mM d'NaCl

Souches	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20		
Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Souches	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	**1021**	**2011**
Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sur milieu solide, aucune croissance n'est observée pour la totalité des souches.

Photo20 : aucune colonie observée à 1280 mM

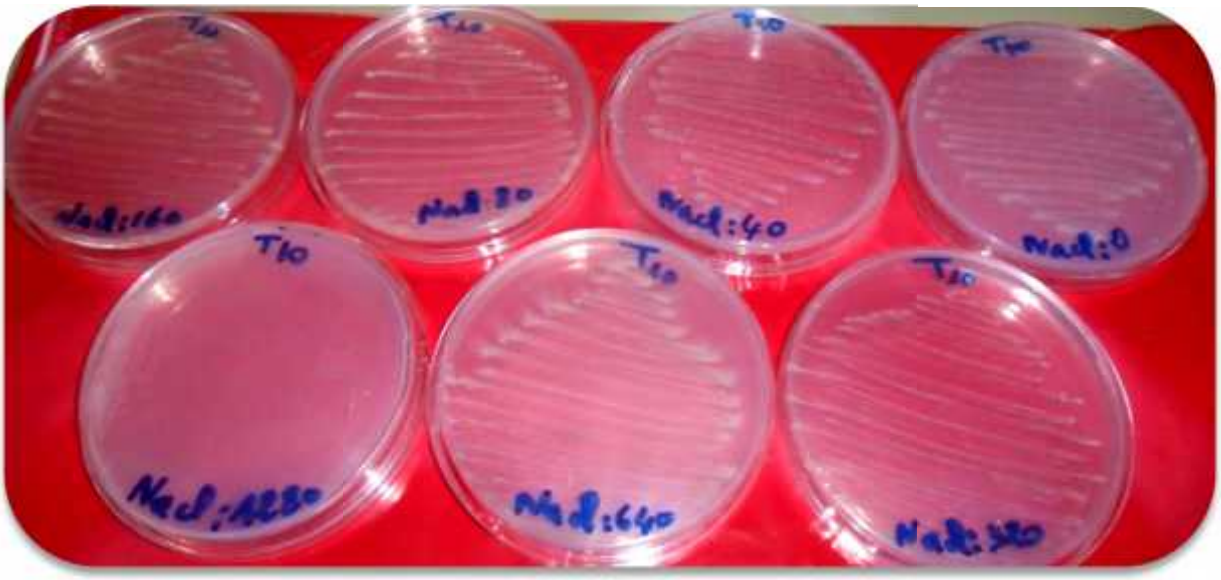

Photo22 : exemple de la souche O10, cultivée sur milieu YEM à différentes concentration d'NaCl cultivées à 28°C.

3.2. Discussion des résultats de l'effet de la Salinité

De grandes variations ont été enregistrées entre les différentes souches de *S. meliloti* en fonction de leur tolérance au sel. Le point commun entre elles est que leur optimum de croissance se situe entre 0 et 40 mM. À 1280 mM, la croissance des souches était fortement

ralentie comparativement aux autres concentrations. Trois niveaux de résistance ont pu être distingués :

Groupe 1 : Les souches sensibles aux salinités élevées

Regroupe la majorité des espèces Sinorhizobiennes étudiées (65%). Elles ont montré une croissance maximale à des niveaux de sel inférieurs à 40 mM, et une croissance faible aux concentrations élevées en NaCl (croissance à 640 mM, DO <0,4 ; croissance à 1280mM, DO<0,2). Donc, le NaCl a considérablement diminué la croissance de la plupart des souches comme l'ont confirmé TALEBI et *al.* (2008) en Iran et HADADI et *al* ., 2012 à Oman.

Groupes 2 : les souches supportant les concentrations élevées d'NaCl

Sept souches ont montré une croissance importante à des concentrations supérieures à 320 mM. RODELAS GONZALEZ et GONZALEZ-LOPEZ (2016) confirment que *Sinorhizobium meliloti* tolèrent 300 mM d'NaCl, ce qui est le cas pour nos sept souches où leur croissance reste importante même à 640 mM (DO>0.5 à 640 NaCl).

Nos résultats sont aussi en concordance avec ceux d'ELBOUTAHIRI et *al*. (2010), ainsi que RAY et WARD (2006) où ils confirment que les espèces de *Sinorhizobium meliloti* croissent au-dessus de 600 mM.

Groupe 3 : Les souches préférant les concentrations très élevées d'NaCl

Sept souches avaient une croissance aux fortes concentrations, meilleure que celle des plus basses concentrations. Ce cas est similaire à celui enregistré par ABDEL-AZIZ et *al*. (2008), dans les sols d'Arabie Saoudite, où certains de leurs souches de *Sinorhizobium meliloti* ont cru à 425 mM mieux qu'à 170 mM. Ainsi HADADI et al., 2012

Parmi ces souches, quatre ont dépassé la DO=0.7, ce chiffre coïncide avec celui obtenu par MRABET et *al*. (2010) au Maroc.

4. Lecture des résultats de résistance aux Antibiotiques

4.1. Résistances des souches à l'ensemble des antibiotiques

La figure suivante représente résistances des souches à l'ensemble des antibiotiques

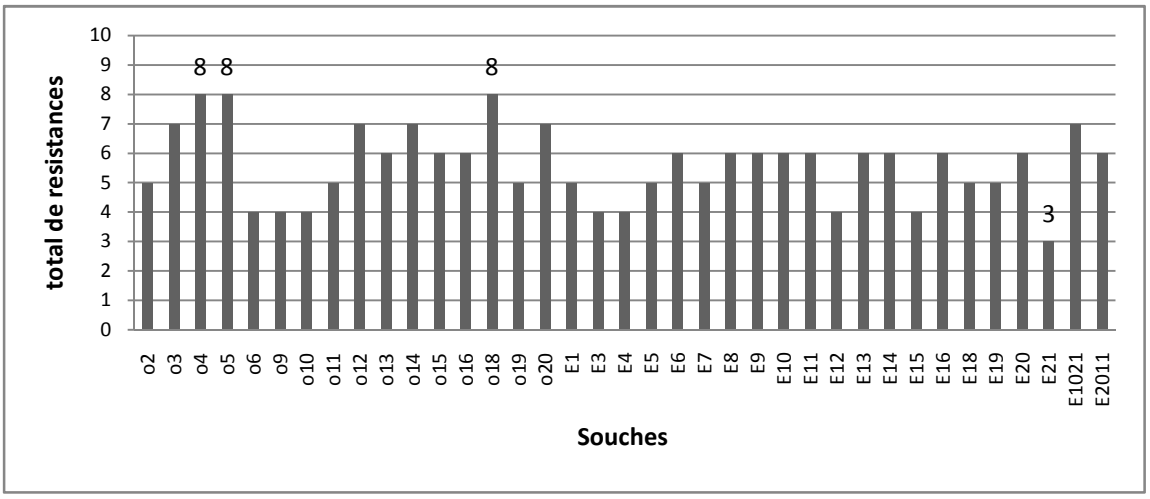

Figure 20 : Résistances des souches à l'ensemble des antibiotiques

La figure 22 montre que les souches les plus résistantes aux antibiotiques sont O4, O5 et O18 avec huit résistances et deux sensibilités seulement à CT et AN. La souche la plus sensible est la E21 qui a résisté à 3 antibiotiques uniquement (C, AMX et P). Les autres montrent une large diversité de réponses indiquant une grande différence entre elles.

4.1.1. Réponses des souches aux antibiotiques utilisés

L'histogramme ci-dessous représente la Réponses de l'ensemble des souches aux antibiotiques utilisés :

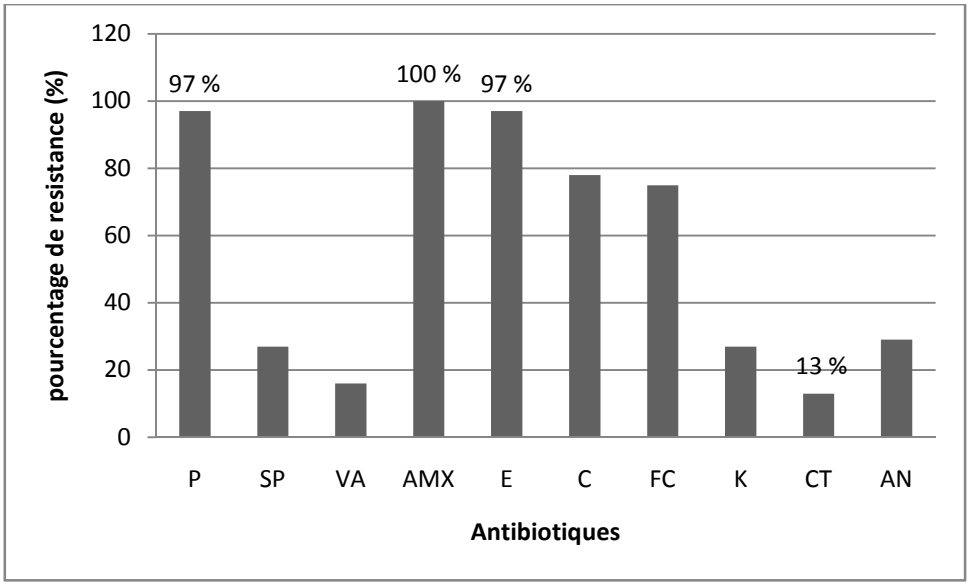

Figure 21 : Réponses des souches aux antibiotiques utilisés

La plupart des souches étudiées se sont montrées résistantes à l'*Amoxicillin* (100%), Pénicilline (97%), Erythromycine (97%), Chloramphénicol (78%), et l'Acide fusidique (75%). Néanmoins, elles se sont montrées sensibles à l'Amikacine (29%), Spiramycine (27%), Kanamycine (27%), Vancomycine (16%) et Colistine (13%).

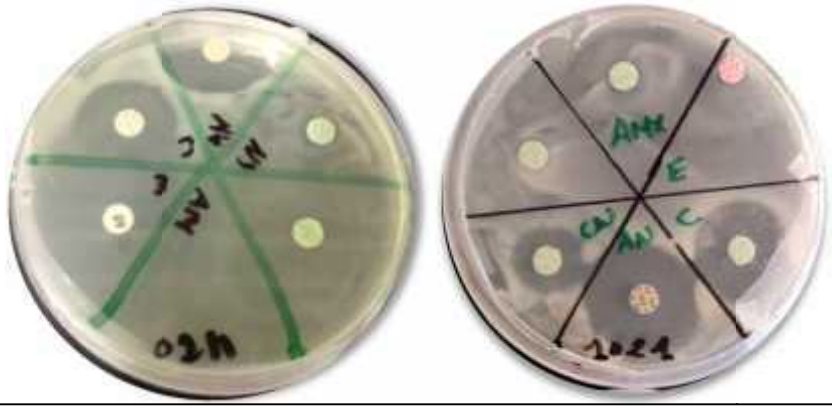

Photo 23 : Resistance aux antibiotiques chez quelques souches

Discussion des résultats de test d'Antibiotiques

La quasi-totalité des souches ont résisté à la Pénicilline et à Erythromycine (une souche seulement s'est montré sensible envers P, et une autre envers E). Selon VELAZQUEZ et RODRIGUEZ-BARRUECO (2007), *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae* résistent à la Pénicilline, l'Erythromycine. Nos résultats vont avec ceux obtenus par SABZEVAR et MOGHADDAM (2012) qui ont montré que certaines de leurs souches étaient sensibles à la Vancomycine.

Sélection des souches efficientes :

Tableau 25. Représentation des souches les plus efficientes par rapport aux différents paramètres étudiés.

Paramètres	Les souches les plus efficientes									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1. Températures										
4°C	2011	1021	E12	E21	E7	E11	**O20**	E3	E10	**O13**
28°C	O3	O19	O9	**O4**	O12	**O13**	**O17**	O8	O7	O16
37°C	O2	O3	**O4**	**O5**	O6	O11	O14	O16	E3	E11
45°C	**O4**	**O5**	O8	O12	E5	E18	E19	E20	E7	E21
2. Salinités										
0 mM	O6	**O18**	E17	E14	**O5**	E5	E3	O19	E10	E13
40 mM	E14	**O5**	E5	E21/E6	O15	E11	**O13**	O14	E2	E3

80 mM	O7	O11	E7	E11	**O13**	**O4**	O9	O14	E15	E19
160 mM	O7	O11	E11	**O13**	E4	E7	E2	O14	E21	O6
320 mM	O14	E7	E4	E2	E19	O19	**O5**	**O4**	E17	O9/O6
640 mM	E21	**O18**	**O20**	E9	E7	E2	E6	O10	O12	E5
1280 mM	O1	E2	O19	**O13**	E6	E5	E19	**O17**	**O20**	**O18**
3. pH										
4	O7	O8	**O13**	O16	E17	**O18**	O19	E1	E8	**O17**
5	O16	**O17**	**O18**	O19	**O20**	E10	E21	E20	E16	O3
6	O2	**O5**	E2	E1	E12	E14	O9	**O17**	O6	**O20**
6,8	O3	O19	O9	**O4**	O12	**O13**	**O17**	O8	O7	O16
8	**O5**	O10/O8	E13	O2	O9	O12	**O13**	O14	**O17**	**O20**
9	O1	O2	O3	**O4**	**O5**	O6	O12	**O17**	E14	E17
3. Antibiotiques										
P	Toutes les souches, sauf E11									
SP	O3	**O4**	O16	**O18**	E3	E10	E11	E13	E14	E16
VA	**O4**	**O5**	O11	**O20**						
AMX	Toutes les souches									
E	Toutes les souches, sauf E21									
C	Toutes les souches, sauf O19, O6, O9, O10 et O11									
FC	Toutes les souches, Sauf O11, E3, E4, E5, E21, E18, E16 et E15.									
AK	O3	**O4**	**O5**	O11	O12	O14	**O18**	E6	E13	
CT	E9	E15	E16							
AN	E20	**O5**	E5	**O20**	O19	**O18**	O12	**O13**	O14	O15/E8

=O4, =O5, O18, O13, O17, 20

A partir de ce tableau, nous avons retiré les 6 souches ayant le plus grand nombre de présence. Il s'agit de la O4, O5, O13 et O17 avec 15 présences chacune, suivies par la O18 et la O20 avec 13 présences.il est à signaler que ces souches appartiennent toutes à la région de Ouargla.

- **Caractéristiques de La souche O4 :**

Cette souche est apparue parmi les 10 meilleures souches résistantes à des températures élevées (37°C et 45°C). Sa résistance à la salinité est moyenne (80 et 320 mM). Pour le pH, elle se porte mieux en condition neutre et alcaline. Sa résistance aux antibiotiques est élevée avec une moyenne de 80%.

- **Caractéristiques de La souche O5 :**

Elle résiste à des températures élevées (37°C et 45°C). Elle tolère seulement des concentrations de salinité moyennes (0, 40 et 320 mM), un pH allant de 6 à 9. Elle a enregistré, en outre, une forte résistance aux antibiotiques (80%).

Caractéristiques de la souche O13 :

Elle apparait comme résistante aux températures basses (4 et 28 °C). Sa tolérance à la salinité est large (de 40 à 1280 mM). Sa résistance au pH va de : acides jusqu'à l'alcalins en passant par le neutre. Elle a résisté à 60% des antibiotiques.

Caractéristiques de La souche O17

Sa meilleure croissance est à la température 28°C. Elle a marqué une faible tolérance à la forte salinité (1280mM), peut se développer à un pH acide, légèrement acide, légèrement alcalin et alcalin, et sa résistance est élevée face aux antibiotiques étudiés (70%)

Caractéristiques de La souche O18

Elle peut croitre à de faibles et hautes concentrations en NaCl (0, 640, 1280mM), tolérante à des pH acides (4 et 5) et résistante à 80% des antibiotiques. Son expression face aux températures est moyenne.

Caractéristiques de la souche O20

Elle peut tolérer des températures basses (4°C), se classe parmi les dix meilleures souches résistantes à de hautes concentrations en NaCl (640, 1280 mM), préfère des pH légèrement acide (pH=6) et légèrement alcalin (pH=8), et sa résistance est élevée face aux antibiotiques (70%).

La description détaillée des caractéristiques phénotypiques de ces souches montre que celles-ci peuvent constituer un bon inoculum et rentrer dans les campagnes visant à améliorer les productions de la luzerne au milieu saharien.

Conclusion

CONCLUSION

La salinité, l'alcalinité et la sécheresse sont les contraintes abiotiques majeures qui entravent la productivité de la luzerne (*Medicago sativa*) dans les régions arides et semi-arides.

Une collection de souches, appartenant au genre *Sinorhizobium*, est étudiée par rapport à sa tolérance à une forte teneur en sel, aux pH, aux températures élevées et aux antibiotiques afin de sélectionner les plus adaptées à ces conditions environnementales.

Les résultats obtenus montrent que parmi les 43 souches étudiées, 6 se sont montrées plus efficaces par rapport aux autres, à savoir : O4, O5, O13 ,O18, O19 et la O20. Il est à noter que ces souches proviennent de la région de Ouargla.

- Les souches qui résistent aux hautes températures (37°C et 45°C) sont les O4 et O5. bien que les souches qui poussent le mieux à des températures basses (4°C) sont O13 et O20.
- En ce qui concerne le pH, la souche O17 tolère toutes les concentrations de pH ; O13 et O19 pousse en milieu acide (pH<5) ; O4 et O5 poussent en milieu alcalin (pH>8).
- Les souches O17 et O20 sont des souches halophiles et poussent à des concentrations de NaCl >320 mM.
- Les souches O4 et O18 ont pu résister à 80 % des antibiotiques, tandis que les souches O5, O17 et O20 l'ont été à 70%
- En prenant en considération les conditions pédoclimatiques qui règnent en milieu saharien, les souches qui peuvent constituer un inoculum efficace sont la O4 et la O5, car ces deux là résistent le mieux aux hautes températures (>37°C), à de moyennes salinités (320 mM), ne sont pas affectées par l'alcalinité du milieu et résistent à 80% des antibiotiques.

Ces souches sélectionnées peuvent constituer de futures candidates pour d'éventuelles compagnes d'inoculation de la Luzerne dans les sols sahariens, particulièrement à El Oued et Ouargla.

Ce travail n'est qu'une partie, parmi d'autres, qui traite les symbioses fixatrices d'azote entre la luzerne et le *Sinorhizobium meliloti*. Il peut constituer une base fiable pour d'autres travaux traitants la même problématique. Il est impératif le compléter par d'autres visant à définir le meilleur couple symbiotique *Sinorhizobium meliloti* et la variété locale de luzerne,

conduisant à améliorer les rendements en fourrage. Une caractérisation moléculaire du microsymbiote s'impose pour une profonde compréhension des réponses de ces souches dans un contexte pédoclimatique contraignant.

ANNEXES

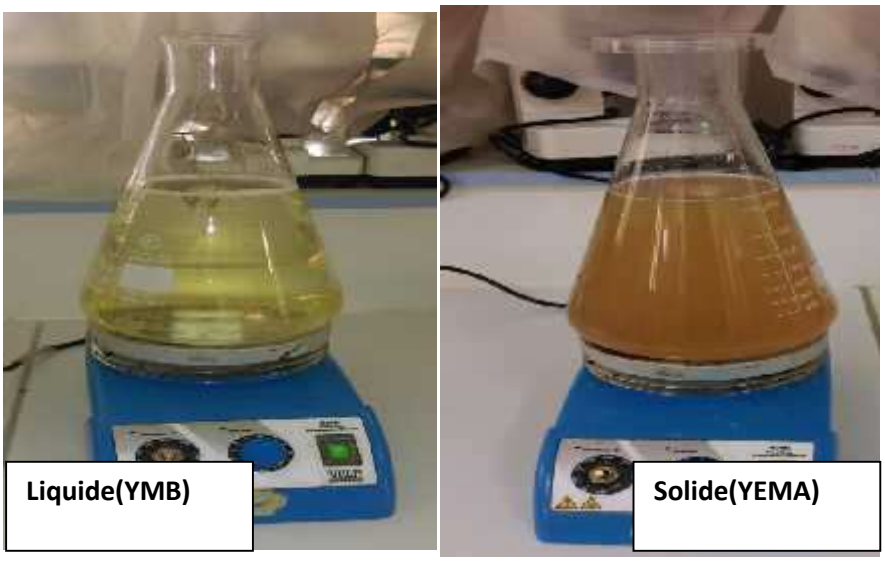

Photo 1 : Préparation des milieux de culture

Photo2 : Stérilisation des milieux de cultures dans un autoclave

Photo 3 : ensemencement des souches

Photo 4 : Incubation des souches

Photo 5 : Homogénéisation des suspensions bactériennes à l'aide d'un Vortex

Photo 6 : Remplissage des cuves les suspensions bactériennes de chaque souche.

Photo 7 : Masure de la DO avec un spectrophotomètre à flamme.

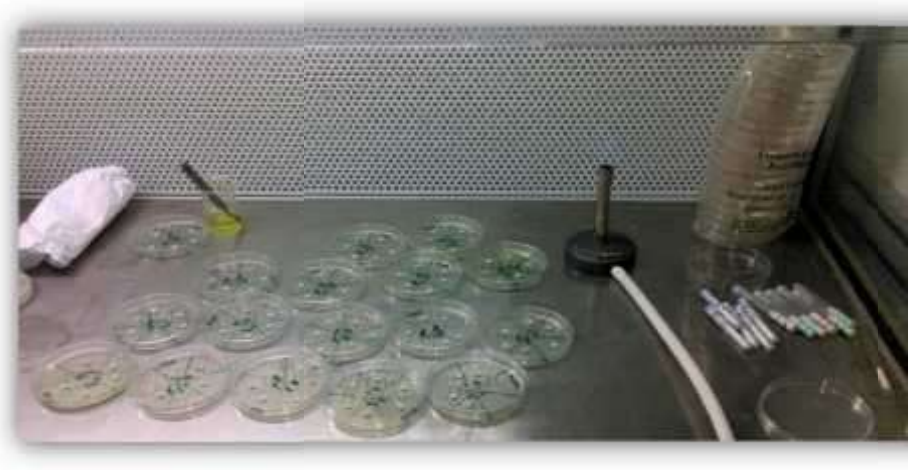

Photo 8 : réalisation de test de résistance aux antibiotiques sous hotte à flux luminaire horizentale

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ABDEL-AZIZ R A., AL-BARAKAH F N., AL-ASMARY H M., 2008: Genetic identification and symbiotic efficiency of Sinorhizobium meliloti indigenous to Saudi Arabian soils, African Journal of Biotechnology, Vol 7 (16), PP 2803-2809.

ABOLHASANI M., LAKZIAN A., TAJABADIPOUR A., HAGHNIA G., 2010 : The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline condition,Australian Journal of Basic and Applied Sciences,Vol 4(5): PP 882-886

AKHTAR F., BASHIR M., BAIG W., ZAHOOR F., SHUJAAT N., HUMAYUN E., JAMSHAID B., HAYAT A., MUJADDAD UR REHMAN M., JADOON M.A., ABDULMALIK A., ULLAH Z., GUL S., MALLICK M.A., UL HAQ Q.I.,2016 : In Vitro Antibacterial Activity of Spinacia Oleracea and Melilotus Indicus Used In Pakistani Folk Medicines against Some Specific Bacterial Strains , IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS), Volume 11, PP 77-84.

AROCA R., 2013: Symbiotic Endophytes, Springer Science & Business Media, Technology & Engineering, 348 P

BEREAU M ., LOUISANNA É ., DE GRANDCOURT A ., GARBAYE J.,2003 : Description et dynamique des milieux forestiers :Symbiose mycorhizienne et nutrition minérale, Rev. For. Fr. LV - numéro spécial, PP 74-83.

BERTRAND Y., DE HALLEUX G., 2005 : Chevaux et prairies, Ed FRANCE AGRICOLE, 223 P.

BLAZINKOV M., VRBANAC D., HUIC BABIC K ., SIKORA S., 2010 : Phenotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* strains, Original scientific paper , PP 191-204

BOARD N., 2012: The Complete Technology Book on Biofertilizer and Organic Farming (2nd Revised Edition), Niir Project Consultancy Services, P 608.

BOBOYE B.E., OGUNDEJI B.A., EVBOHOIN H., 2011: Mutational search for high temperature (60°C) tolerant variant of *Rhizobium species CWP G34A*, Advances in Bioscience and Biotechnology, Vol 2, PP 255-262

BOSSUET J. et VADEZ V., 2013 : S'appuyer sur les multiples bénéfices des l'fabaceae a graines pour une agriculture plus productive et nutritive dans les tropiques semi-arides, Sécheresse 24, PP 314–21

BOUDJENOUIA A., FLEURY A., TACHERIFTE A., 2003: Les fabaceae alimentaires dans les zones périurbaines de Sétif (Algérie): analyse d'une marginalisation, vol 2, n° 4, PP 23-27

BOUHMOUCH I, BRHADA F, FILALI-MALTOUF A, AURAG J., 2001: Selection of osmotolerant and effective strains of Rhizobiaceae for inoculation of common bean (Phaseolus vulgaris) in Moroccan saline soils, Agronomie 21, INRA, EDP Sciences, PP 591–599.

Références bibliographiques

BRENNER D.J., KRIEG N.R., 2006 : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part 3, Springer Science & Business Media, Science,1388 P.

CACCIARI I., DI MATTIA E., QUATRINI P., MOSCATELLI M. C., GREGO S., LIPPI D., DE PAOLIS M. R., 2015 : Un arbre au désert Réponses adaptatives des isolats de Rhizobium aux stress, Éd IRD, PP 1-34

CALVET R., 2003 : Le sol: propriétés et fonctions, Vol 2, Ed France Agricole, 511 P

CHAABENA A., ABDELGUERFI A., 2001 : Situation de la luzerne pérenne dans le Sahara et comportement de quelques populations locales et variétés introduites dans le sud-est du Sahara algérien, n° 45, PP 57- 60

DEBARGE S. ET TENAUD A., 2015 : Cultiver des fabaceae pour réduire l'utilisation d'intrants de synthèse, ADEME, PP 1-11

DELARRAS C., 2014 : Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures, Ed Lavoisier, 772 P.

DELIC D., STAJKOVIC-SRBINOVIC O., KNEZEVIC-VUKCEVIC J., 2016: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *Sinorhizobium meliloti*: prospects of using rhizobial inoculants in Serbia, Botanica Serbica,40 (1),PP 13-19

DORE C., VAROQUAUX F., 2006 : Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées, Ed Quae, Technology & Engineering , 812 P

DREVON J.J., SIFI B., 2003 : Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen: Carthage (Tunisie), 13-16 octobre 1998 ; Montpellier (France), 9-13 juillet 2000, Ed Quae,Technology & Engineering, 417 P

DUC G., MIGNOLET C., CARROUEE ., HUYGHE C., 2010 : Importance économique passée et présente des fabaceae : Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution, Innovations Agronomiques 11 ,PP 187-204.

DUHOUX E. et NICOLE M., 2004 : Atlas de biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes à fleurs, Ed Dunod, 166 P

DURNER E.F., 2013 : Principles of Horticultural Physiology, CABI, Science, 405 P

DUTUIT P. et GORENFLOT R., 2008 : Glossaire pour le développement durable: des mots pour les maux de la planète. Edition des archives complémentaires, 182 P

ELBOUTAHIRI N., THAMI-ALAMI I., UDUPA S.M., 2010: Phenotypic and genetic diversity in Sinorhizobium meliloti and S. medicae from drought and salt affected regions of Morocco, BMC Microbiology, PP 1-13

FARISSI M., AZIZ F., BOUIZGAREN A. et GHOULAM C., 2014: La symbiose Fabaceae-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de

la tolérance, International Journal of Innovation and Scientific Research ISSN 2351-8014, Vol 11 , N° 1, PP 96-104

FAURIE C., 2011: Ecologie: Approche scientifique et pratique, Ed Lavoisier, 450 P

FRICK R., MOSIMANN E., AEBI P., SUTER D. et HIRSCHI H.U., 2014 : Essais de variétés de luzerne (2011-2013), Production végétale , nstitut des sciences en production animale IPA, Agroscope, 1725 Posieux, Suisse,institut des sciences en durabilité agronomique IDU, Agroscope, 8046 Zurich, Suisse.,Recherche Agronomique Suisse 5 (9): PP 358–365

GAGE D J., 2004: Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes, Microbiol. Mol. Biol. Rev. vol. 68, n° 2, PP 280-300.

GARBAYE J., 2013 : La symbiose mycorhizienne : Une association entre les plantes et les champignons, Ed Quae, 280 P.

GERMON JC., 2010: Quelques apports de la microbiologie des sols à l'agronomie et au développement des plantes cultivées ,académie d'agriculture de France ,PP 2-15

GIRAUD E, 2007 : Symbiose rhizobium/ légumineuse : un nouveau sésame, Médecine/Sciences, PP 663-664

GOBAT J-M., ARAGNO M., MATTHEY W., 2010 : Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols, PPUR Presses polytechniques, Soil biology, 817 P

GOYAL A. et MAHESHWARI P., 2012 : Frontiers on Recent Developments in Plant Science. Bentham Science Publishers, Science ,182 P

GROUZIS M., LE FLOC'H É., 2003 : Un arbre au désert: Acacia raddiana, IRD Editions, Science, 313 P

HADAD M. A., AL-HASHMI H. S., SAMOAL M. M., 2012: Osmoadaptation and performance of Indigenous *Sinorhizobium meliloti* isolates from Oman in comparison with exogenous strains tested for efficiency on alfalfa (*Medicago sativa*), Bioscience Research, 9(2): PP 87-91

HALEVY M., 2009 : Que vaut une idée ?: introduction à l'économie de l'immatériel , Edipro,189 P.

HAMEED R.A ., HUSSAIN N. N., ALJIBOURI A.M., 2014: Phenotypic Characterization of Indigenous Iraqi Sinorhizobium meliloti Isolates for Abiotic Stress Performance , Journal of Life Sciences, Vol. 8, No. 1, PP 1-9

HAMON S., 2001 : Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes, Ed IRD, Crop improvement, 892 P

HASSAN DAR G., 2009: Soil Microbiology and Biochemistry, New India Publishing, 526 P

Références bibliographiques

HO M W., 2013 : La technologie de fixation de l'azote par toutes les plantes cultivées n'est pas une bonne solution, ISIS Agriculture Azote, PP1-8

HOPKINS WG., 2003: Physiologie végétale, Ed De Boeck Supérieur,532P.

IBRIZ M., I. ALAMI T., ZENASNI L., ALFAIZ C. , BENBELLA M.,2004 : Production des luzernes des régions pré-sahariennes du Maroc en conditions salines, Fourrages 180, PP 527-540

IGHIL A.I.E. , HULLE M., DEDRYVER C.A, CHAUBET B. , 2011: Les pucerons des grandes cultures: cycles biologiques et activités de vol, Editions Quae, - Aphids – 135 P

JEFFERY S., GARDI C., JONES A., MONTANARELLA L., MARMO L., MIKO L., RITZ K., PERES G., RÖMBKE J., et VAN DER PUTTEN W. H. (eds.), 2013 :Atlas européen de la biodiversité du sol.128 P

KLEIN H.D., RIPPSTEIN G., HUGUENIN J., TOUTAIN B, GUERIN H., LOUPPE D., 2014 : Les cultures fourragères,Ed Quae, 264 P

KRISHNAMURTHY V.N., GOWARIKER S., DHANORKAR M. et PARANJAPE K., 2009 : The Fertilizer Encyclopedia ., John Wiley & Sons, Technology & Engineering,872 P

KUMAR D., 2008: Definitional Glossary Of Agricultural Terms: I. K. International Pvt Ltd, 328 P

L'TAIEF B., SIFI B., ZAMAN-ALLAH M., HAJJI M ., LACHAAL M ., 2009 : Effets de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *Rhizobium* sp. et du régime des pluies sur la production de la biomasse et la teneur en azote du pois chiche,Vol 13,n°4, PP 537-544.

LAURENT-FULELE E., DE LAJUDIE P., GILLIS M., NEYRA M., 2000 : Diversité des rhizobia associés aux fabaceae herbacées Zornia spp. et Tephrosia spp. dans les jachères au Sénégal, La jachère en Afrique Tropicale - Ch. Floret, R. Pontanier John Libbey Euroiext. Paris, PP 333-340.

LAZALI M., 2015: La symbiose haricot-rhizobia sous déficience en phosphore, Ed universitaires europeennes EUE ,60 P.

LEGAULT MA. : Mille Milliards D'habitants : Planète Vivante :comprendre et préserver la biodiversité, Ed Québec Amérique, 2010 ,176 P

LUCINSKI R., POLCYN W., RATAJCZAK L., 2002: Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes. Acta Biochim Pol ,49 (2), PP 537-46.

MACHEIX JJ .,FLEURIET A., et JAY-ALLEMAND C., 2005 : Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Editions PPUR presses polytechniques, 192 P

MAHESHWARI D.K. ,2008 : Potential Microorganisms For Sustainable Agriculture: A Techno-Commercial Perspective, I. K. International Pvt Ltd,498 P

Références bibliographiques

MAHESHWARI D.K., 2014: Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture, Springer, Science ,376 P.

MEYER A., DEIANA J., et BERNARD A., Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés, Ed Wolters Kluwer France, 2004, 430 P

MOCEK-PLOCINIAK A., NIEWIADOMSKA A., GLUCHOWSKA K .,2008: Effect of the culturing density of the *sinorhizobium meliloti* bp on the development of lucerne (*medicago sativa* l.) and nitrogenase activity , PP 39-45

MOROT-GAUDRY J.F et PRAT R., 2012 : Biologie végétale croissance et développement .Edition Dunod ,241 P

MRABET M., ZRIBI K., MHADHBI H., DJEBALI N., MHAMDI R., AOUANI M E., NAKAMURA K., 2010 : Salt tolerance of a Sinorhizobium meliloti strain isolated from dry lands: growth capacity and protein profile changes, Annals of Microbiology, DOI 10.1007/s13213-010-0153-x, PP 1-9.

NIEUWENHUIS R. ET NIEUWENLINK J., 2005 : La culture du soja et d'autres fabaceae, Agromisa Foundation, 75 P

NISTE M., VIDICAN R., ROTAR L., POP., 2013 : The Effect of pH Stress on the Survival of *Rhizobium Trifolii* and *Sinorhizobium Meliloti in Vitro,* Bulletin UASMV serie Agriculture 70(2), PP 449-450

NISTE M., VIDICAN R., ROTAR L., POP., 2015: The Effect of Temperature Stress on *Rhizobium trifolii* and *Sinorhizobium meliloti* Strains In Vitro, Bulletin USAMV series Agriculture 72(1), PP 297-298

PALMA F., LOPEZ-GOME M., TEJERA N.A., LLUCH C., 2014: Involvement of abscisic acid in the response of Medicago sativa plantsin symbiosis with Sinorhizobium meliloti to salinity, Plant Science 223 ,PP 16–24

PANDA H., 2013 : Integrated Organic Farming Handbook, ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc, 472 P

PIERRE M. et LYS M., 2007 : Secrets des plantes : Ed Artemis,463 P

POUSSET J., 2008 : Agriculture naturelle: face aux défis actuels et à venir, pourquoi et comment généraliser une pratique agricole "naturelle" productive, France Agricole Editions, 444 P

POUSSET J., 2002 : Engrais verts et fertilité des sols, Ed France Agricole, Green manure crops,303P

PRESCOTT L.M., HARLEY J.P., KLEIN D.A., 2003 : Microbiologie. Edition De Boeck Supérieur, 1137 P

PRESCOTT L.M., SHERWOOD L M., WOOLVERTON C.J., 2010 : Microbiologie. Ed De Boeck Supérieur, 1216 P

Références bibliographiques

RAVEN P.H., JOHNSON G.B., A. M KENNETH., LOSOS J .B., 2011 : Biologie, De Boeck Supérieur, Science ,1406 P

REVELLIN C., 2012 : Les symbioses fixatrices d'azote,UMR Agroécologie, Inra/Université de Bourgognepp, PP 32-36

ROBERT D., CATESSON AM., Organisation végétative, Wolters Kluwer France, 2000 ,356 pages.

RODELAS GONZALEZ M.B., GONZALEZ-LOPEZ J., 2016 : Beneficial Plant-microbial Interactions: Ecology and Applications, CRC Press,Science,468 P

SABZEVAR H.A., NAKHAEI MOGHADDAM M., 2012 : Isolation and characterization of native strains of Ensifer meliloti from provinces of Qom province and Khorasan Razavi. Iranian and International Congress of Micorbiology**,** Ardabil, PP 1-88

SATYANARAYANA T., N. JOHRI B., 2005 : Microbial Diversity: Current Perspectives and Potential Applications, I. K. International Pvt Ltd,Microbial diversity,1133P

SCHNEIDER A., HUYGHE C., COORDINATEURS., 2015 : Les fabaceae pour des systémes agricoles et alimentaires durables, Ed Quae, 462 P

SCHVARTZ C., DECROUX J., MULLER J.C ., 2005 : Guide de la fertilisation raisonnée: grandes cultures et prairies , France Agricole Editions, 414 P

SECKBACH J. et GRUBE M., 2010 : Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology. Springer Science & Business Media, Science, 630 P

SHAMSELDIN, A., EL-SAADANI, M., SADOWSKY, M.J., SUN AN C., 2009: Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of *nod*C, ARDRA and rDNA sequence analysis. Soil Biology and Biochemistry 41, PP 45-53

SHI R., 2008: Sinorhizobium Medicae Genome Sequencing, Annotation and Nitrogen Fixation, ProQuest, 155 P

SINGH R.J., 2011: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Medicinal Plants, CRC Press,Technology & Engineering, 1098 P

SPAINK H.P., KONDOROSI A., HOOYKAAS P., 2012 : The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria, Springer Science & Business Media,Science, 566 P

SUTY L., 2015 : Les végétaux: Des symbioses pour mieux vivre, Ed Quae, Science, 56 P

TALEBI M B., BAHAR M., SAEIDI G., MENGONI A.,BAZZICALUPO M., **2008 :** Diversity of Sinorhizobium strains nodulating Medicago sativa from different Iranian regions, Federation of European Microbiological Societies 288, PP 40–46

Références bibliographiques

THAMI-ALAMI I., ELBOUTAHIRI N. et UDUPA S.M., 2010 : Variability in natural populations of Sinorhizobium meliloti in Morocco, Options Mediterranéennes 92, PP265-269.

UDVARDI M ET POOLE P S., 2013: Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses, Annual Review of Plant Biology, Vol. 64, PP 781-805

VARMA A. et KHARKWAL A.C., 2009: Symbiotic Fungi: Principles and Practice ,Springer Science & Business Media, Science,430 pages.

VELAZQUEZ E. et RODRIGUEZ-BARRUECO C., 2007 : First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Springer Science & Business Media, Technology & Engineering, 362 P

VINCENT, J.M., 1970: A manual for the practical study of the root-nodulebacteria. International Biological Programme [by] Blackwell Scientific,164 P

WALIGORIA C. et TETU T., 2008 : techniques culturales simplifiées. n°48., PP 12-22.

WATKIN E.L.J., MUTCH L.A., ROME S., REEVE W.G., CASTELLI J.M., GRUCHLIK Y., BEST W.M., O'HARA G.W., HOWIESON J.G., 2009 : The effect of acidity on the production of signal molecules by *Medicago* roots and their recognition by *Sinorhizobium,* Soil Biology and Biochemistry,Volume 41, 163–169 PP

WEIR B.S (2016) the current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website.

WIERSEMA J H.et LEON B., 2016 : World Economic Plants: A Standard Reference, Ed Second, CRC Press, Science, 1336 P

YADAV A. S. et NEHRA K., 2013 : Selection/ Isolation of High Temperature Tolerant Strains of *Rhizobium* for Management of High Temperature Stress on *Rhizobium*- Legume Symbiosis, International Journal of Microbial Resource Technology , Vol 2, n°1 ,PP 47-57

YATTARA I I., NEYRA M., LAHBIB M M., YOSSI H., DE LAJUDIE P., 2000 : Diversité des Rhizobiums associés à Dolichos lablab utilisé pour l'amélioration de la jachère en zone sahélienne, La jachère en Afrique tropicale - Ch. Floret, R. Pontanier, session VIII, PP 679-687.

ZAKHIA F., DE LAJUDIE P., 2001: Taxonomy of rhizobia. Agronomie, EDP Sciences, 21 (6-7), PP 569-576

Résumé

Effet des différents facteurs prédominants dans les sols sahariens sur la croissance des souches autochtones de Sinorhizobiums meliloti

Quarante et une souches de *Sinorhizobium meliloti* ,nodulant la Luzerne (*Medicago sativa* L.), provenant de deux régions sahariennes (Ouargla et El Oued), ont été utilisées dans cette étude. Ces souches ont été caractérisées sur le plan phénotypique. L'analyse de leurs réponses face aux facteurs prédominants dans les sols sahariens (résistance à la salinité, aux variations de pH et de températures et la résistance aux antibiotiques) a permis de mettre en évidence une large diversité au sein de ces collection Sinorhizobienne étudiée.

Les résultats obtenus ont permis, parmi les 41 souches, de sélectionner six souches présentant les meilleures caractéristiques adaptatives, vis-à-vis des facteurs pédoclimatiques étudiés, sont respectivement : O4, O5, O13, O18, O19 et O20.

Il est à noter que toutes les souches sélectionnées proviennent de la région de Ouargla. Elles peuvent constituer un inoculum bactérien efficace, bien adapté aux sols sahariens et conduisant à l'accroissement des rendements fourragers chez la plante hôte, qui est la luzerne.

Mots clés: Sahara, Réponses adaptatives, *Sinorhizobium meliloti*, Caractérisation phénotypique, inoculum bactérien.

Abstract

Effect of different factors predominant in Saharan soil on the growth of indigenous strains Sinorhizobiums meliloti

Forty-one strains of *Sinorhizobium meliloti*, nodulating Alfalfa (Medicago sativa L.) from two Saharan regions (Ouargla and El Oued), were used in this study. These strains have been characterized phenotypically. The Analysis of their responses to the predominant factors in Saharan soils (resistance to salinity, variation in pH, temperature and antibiotic resistance) helped to highlight a wide diversity within these collection of *Sinorhizobium* studied.

The results obtained allowed among the 41 strains, selecting six strains with the best adaptive characteristics, against the soil and climatic factors studied are respectively: O4 O5, O13, O18, O19 and O20.

It should be noted that all the strains selected from the region of Ouargla. They can be an effective bacterial inoculum, well adapted to the Saharan soil and leading to increased forage yields in the host plant, which is alfalfa.

Keywords: Sahara, Adaptive responses, Sinorhizobium meliloti, phenotypic characterization, bacterial inoculum.

ملخص

تأثير العوامل المختلفة الغالبة في التربة الصحراوية على نمو السلالات الأصلية *Sinorhizobium meliloti*

إستخدمت في هذه الدراسة واحد وأربعون سلالة *Sinorhizobium meliloti*، المشكلة للعقد الجذرية مع نبات البرسيم الحجازي اخذت من منطقتين صحراويتين (ورقلة والوادي). وقد حللت هذه السلالات ظاهريا. استجابتها للعوامل السائدة في التربة الصحراوية (مقاومة الملوحة، والتغيرات في الحموضة، درجة الحرارة ومقاومة المضادات الحيوية) ساعدت على تسليط الضوء على تنوع الواسع في المجموعة البكتيرية المدروسة.

النتائج المتحصل عليها سمحت باختيار من بين 41 سلالة، ستة سلالات تميزت بأفضل الخصائص على التكيف مع التربة والعوامل المناخية و هي على التوالي: O5 O4، O13، O18، O19 وO20 .

وتجدر الإشارة إلى أن جميع السلالات المختارة تنحدر من منطقة ورقلة. ويمكن أن تشكل لقاح بكتيري فعال، متكيف جيدا مع التربة الصحراوية ويؤدي إلى زيادة المردودية عند النبات العائل الذي هو البرسيم.

كلمات البحث: الصحراء، الاستجابات التكيفية، *Sinorhizobium meliloti*، وتوصيف المظهري، اللقاح البكتيري.