

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 : Biotechnologie végétale

Présenté par :

RAMDANE Iman
BOUKARANA Iman Khaoula

Thème :

Sélection des souches rhizobiennes efficaces,
autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la
luzerne (*Medicago sativa L.*)

Soutenu publiquement

Le : 31/05/2016

Devant le jury :

M.	SLIMANI Nour eddine	M.C.B	Président	UKMOuargla
M.	AZIB Salim	M.A.A.	Promoteur	UKMOuargla
Melle	SALHI Nesrine	M.C.A	Examineur	UKMOuargla

Année Universitaire : 2015/2016

Dédicaces

Nous dédions ce travail à :

Nos très chers parents que nous aimons le plus au monde

Pour leur encouragement illimité, et pour leurs sacrifices énormes.

Aucun mot ne serait suffisant pour les remercier.

Qu'ALLAH les protège et les garde.

A nos sœurs et frères pour leurs soutiens

A toutes nos familles

A nos amis en souvenirs des bons moments passés ensemble

Merci à tous et à toutes.

***BOUKARANA imane et
RAMDANE imane.***

Remerciements

Nous voulons exprimer par ces quelques lignes de remerciements notre gratitude envers tous ceux en qui par leur présence, leur soutien, leur disponibilité et leurs conseils, nous avons eu courage d'accomplir ce projet.

Nous commençons par remercier M. AZIB Salim qui nous a fait l'honneur d'être notre encadreur. Nous le remercions profondément pour son encouragement continu et aussi d'être toujours là pour nous aider et nous guider à retrouver le bon chemin par sa sagesse et ses précieux conseils.

Nous adressons nos remerciements également aux membres de jury pour nous avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail : M. SLIMANI Nour eddine; président du jury et Mlle. SALHI Nesrin; examinatrice de ce travail.

Nous n'oublions pas d'adresser nos vifs remerciements au responsable du laboratoire de microbiologie pour son aide ainsi que toutes les équipes du laboratoire de contrôle de qualité des produits alimentaires(Ouargla).

Nous tenons à remercier toute l'équipe de l'ANRH, Agence national des ressources hydrique. Ouargla.

Nous tenons à remercier également, M. El-haddad djillali, doctorant en écologie des systèmes vectoriels, faculté des sciences, Université M'hamed bougurra. Boumerdes.

Un grand merci à Mme Boukarana wafa, doctorante en microbiologie. Alger. Et même Dr- babeziz, laboratoire d'analyse médical (Ouargla). Et Mlle. Zoubida, surveillance générale du paramédical, Ouargla.

Nous remercions également, M. BOUMAAKAL (TASS), technicien supérieur de la santé, et aussi Dr Dada moussa, chef de laboratoire central, hôpital Mohamed boudiaf. Ouargla.

Nous oublier toutes les équipes des laboratoires pédagogiques de l'université Kasdi Merbah, Ouargla.

Liste des abréviations

GA	Acides gibbéréllique
AIA	Acide-indole-acétique
PG	Polygalacturonase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide D ésoxyribonucléique r ibosomique
ATP	Adénosine Triphosphate
CCIR	Cellule corticale infectée par les rhizobactéries
CCS	Cellule corticale racinaire saine
DO	Densité optique
H₃O⁺Cl⁻	Acide Chlorhydrique
LCO	Lipochitinoooligosaccharides
INRA	Institut national de la recherche agronomique
N₂	azote gazeux
N₂O	Oxyde d'azote
NA	Nodule actif
NaCl	Chlorure de sodium
NH₃	Ammoniac
NH₄⁺	Ammonium
NIA	Nodule inactif
NO₂⁻	Nitrite
NO₃⁻	Nitrate
Nod	nodulation
G	Ghardaïa
%	Pourcentage
pH	Potentiel hydrique
PS	Partie souterraine

PA	Partie aérienne
S	Sinorhizobium
Gx	Grossissement
S.R	Souche référence
tr/mn	Tour par minute
YMA	Yeast Manitol Agar
YMB	Yeast Manitol Broth
µm	Micromètre
°C	degré Celsius
L.	Linée
mM	millimole
cm	centimètre
g	Gramme
l	Litre
SNV	Science de nature et de la vie
BNL	Bactéries nodulant les légumineuses
CA-S.F.M	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie
T	Témoin
µL	Microlitre
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
r	Coefficient de corrélation
mm	millimètre

Liste des tableaux

Tableau 1. Stades physiologiques de la luzerne.	9
Tableau 2. Espèces de <i>Sinorhizobium</i>	11
Tableau 3. Les principales différences entre les types de nodule indéterminé et déterminée. 16	
Tableau 4. Liste des antibiotiques utilisés dans notre étude.....	26
Tableau 5. Corrélation entre la nodulation et les différents paramètres étudiés.....	33
Tableau 6. Croissance des souches sur milieu solide à 0mM d'NaCl.	35
Tableau 7. Croissance des souches sur milieu solide à 40mM d'NaCl.	35
Tableau 8. Croissance des souches sur milieu solide à 80Mm d'NaCl.	36
Tableau 9. Croissance des souches sur milieu solide à 160mM d'NaCl.	37
Tableau 10. Croissance des souches sur milieu solide à 320mM d'NaCl.	38
Tableau 11. Croissance des souches sur milieu solide à 640mM d'NaCl.	39
Tableau 12. Croissance des souches sur milieu solide à 1280mM d'NaCl.	40
Tableau 13. Croissance des souches sur milieu solide à T = 4°C	42
Tableau 14. Croissance des souches sur milieu solide à T = 28°C	43
Tableau 15. Croissance des souches sur milieu solide à T = 37°C	43
Tableau 16. Croissance des souches sur milieu solide à T = 45°C	44
Tableau 17. Croissance des souches sur milieu solide à pH = 4	45
Tableau 18. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 5	46
Tableau 19. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 6.	47
Tableau 20. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 6.8	48
Tableau 21. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 8	49
Tableau 22. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 9	50
Tableau 23.Sélection les souches les plus efficaces par rapport aux paramètres étudiées. ...	54

Liste des figures

Figure 1. Cycle de l'azote.....	3
Figure 2. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique	5
Figure 3. Formation d'un nodule induit par rhizobium.....	15
Figure 4. Architecture de nodule déterminé et indéterminé.	16
Figure 5. Description du dispositif expérimentale.	20
Figure 6. Effet des souches sur la croissance des parties aériennes.	27
Figure 7. Effet des souches sur la croissance de la partie souterraine.....	28
Figure 8. Biomasse sèche aérienne (g/plante) de la luzerne.....	29
Figure 9. Biomasse sèche racinaire (g/plante) de la luzerne.	30
Figure 10. L'effet des souches bactériennes sur le nombre des nodules.....	31
Figure 11. Nombre des nodules actifs en fonction des différentes souches examinées.	32
Figure 12. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 0mM.....	34
Figure 13. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 40Mm.....	35
Figure 14. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 80mM d'NaCl.....	36
Figure 15. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 160Mm.....	37
Figure 16. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 320Mm.....	38
Figure 17. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 640mM.....	39
Figure 18. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 1280mM.....	40
Figure 19. Effet de la température sur la croissance des souches à 4°C.	41
Figure 20. Effet de la température sur la croissance des souches à 28°C.	42
Figure 21. Effet de la température sur la croissance des souches à 37°C.	43
Figure 22. Effet de la température sur la croissance des souches à 45°C.	44
Figure 23. Effet du pH=4 sur la croissance des souches étudiées.	45
Figure 24: Effet du pH=5 sur la croissance des souches étudiées.	46
Figure 25. Effet du pH=6sur la croissance des souches étudiées.	47
Figure 26. Effet du pH=6.8 sur la croissance des souches étudiées.	48
Figure 27. Effet du pH=8 sur la croissance des souches étudiées.	49
Figure 28. Effet du pH=9sur la croissance des souches étudiées.	50
Figure 29. La résistance des souches aux différents antibiotiques testés.	51
Figure 30. Dendrogramme représentant les regroupements des souches étudiées en fonction de leurs résistances aux antibiotiques testés.	53

Liste des photos

Photo 1. Plantes de la luzerne étudiée.	8
Photo 2. Support de la culture des graines de la luzerne.	21
Photo 3. Mise en culture des graines de la luzerne.	22
Photo 4. Production d'inoculum.	22
Photo 5. Inoculation des jarres avec la suspension bactérienne.	23
Photo 6. Croissance végétale de la partie aérienne et souterraine.	24
Photo 7. Vue générales des jarres avant récolte.	27
Photo 8. Quelques nodules actifs prélevés des racines de la luzerne (Gx3).	32
Photo 9. Exemple de résistance et de sensibilité de quelques souches aux différents antibiotiques étudiés.	52

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. L'azote et sa relation avec les micro-organismes	3
1.1. Cycle de l'azote	3
1.1.1. Transformation de l'azote dans la nature	4
1.2. Effets de l'azote sur la croissance des plantules	4
2. La fixation biologique de l'azote.....	5
2.1. Les fixateurs libres de l'azote	5
2.2. Les fixateurs symbiotiques de l'azote.....	6
3. Molécules clés de la fixation biologique de l'azote	7
3.1. La nitrogénase.....	7
3.2. La leghémoglobine	7
4. Les partenaires de la symbiose rhizobium-légumineuse	7
4.1. Le partenaire végétal (macro-symbionte)	7
4.1.1. La luzerne (<i>Medicago sativa L.</i>)	8
4.1.2. Classification botanique	8
4.1.3. Caractère généraux	8
4.2. Le partenaire bactérien (micro-symbionte).....	9
4.2.1. Caractéristiques des rhizobia.....	9
4.2.2. Classification des rhizobia	10
5. Génétique de la nodulation	12
5.1. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes nod	12
5.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie	12
5.3. Génétique de la nodulation chez la plante	12
6. Processus de la nodulation.....	13
6.1. La pré-infection.....	13
6.3. L'organogénèse.....	14

7. Structure et morphologie des nodules	16
8. Facteurs influençant la fixation symbiotique.....	17
8.1. Le pH du sol.....	17
8.2. Le stress salin.....	17
8.3. Le stress hydrique	17
8.4. La température	18

Chapitre II: Matériel et méthodes

1. Matériels d'étude	19
1.1. Le substrat de culture	19
1.2. Le matériel végétal.....	19
1.3. Le matériel microbiologique.....	19
1.4. Principaux milieux de culture utilisés.....	19
2. Méthodes d'étude	20
2.1. Test de nodulation.....	20
2.1.1. Préparation des jarres -Léonard.....	21
2.1.2. Préparation du support de culture.....	21
2.1.3. Désinfection, pré-germination et mise en culture des graines	21
2.1.4. Production d'inoculum et inoculation des jarres.....	22
2.1.5. Irrigation et suivi des plantes	23
2.1.6. Prélèvements des plantes.....	23
2.2. Paramètres mesurés.....	23
2.2.1. Poids sec des parties aériennes et souterraines.....	24
2.2.2. Hauteur des parties aériennes et souterraines.....	24
2.2.3. Nombre de nodules par plante.....	24
2.2.4. La forme, la couleur, la taille et la distribution des nodules	24
2.3. Effet des Facteurs extrinsèques.....	25
2.3.1. Tolérance des isolats au pH.....	25

2.3.2. Tolérance des isolats à la température.....	25
2.3.3. Tolérance des isolats à la salinité	25
2.4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques	26

Chapitre III: Résultats et discussion

1. Test symbiotique	27
1.1. La croissance végétale	27
1.1.1. Hauteur de la partie aérienne.....	27
1.1.2. Longueur de la partie souterraine.....	28
1.1.3. Poids sec de la partie aérienne.....	29
1.1.4. Poids sec de la partie souterraine	30
1.2. La nodulation	30
1.2.1. Nombre total des nodules	31
1.2.2. Forme et taille des nodules.....	32
1.2.3. Nodules actifs	32
1.2.4. Distribution des nodules.....	33
1.3. Estimation des corrélations entre les différents paramètres mesurés.....	33
2. Effet des facteurs extrinsèques	34
2.1. Effet d'NaCl sur la croissance des souches étudiées	34
2.2. Effet de la température sur la croissance des souches étudiées	41
2.3. Effet du pH sur la croissance des souches étudiées	45
3. La résistance intrinsèque aux antibiotiques	51
Conclusion	54
Références bibliographiques.....	56

Annexes

Introduction

Introduction

L'azote est un constituant essentiel des acides aminés et des protéines et est par conséquent un élément minéral nécessaire pour tout organisme vivant. Dans la nature, l'azote est abondamment présent sous forme de gaz N₂ dans l'air dont il représente près de 4/5 (78%), il se présente aussi sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante. Il constitue le principal facteur limitant la croissance de la plante qui ne peut l'utiliser que sous forme combinée (nitrate, ammoniacque ou urée), et par conséquent un facteur limitant majeur de la production agricole (Robert *et al.*, 2005).

Pour les productions agricoles et dans la plupart des secteurs, la carence des sols en différents nutriments ainsi générée est souvent contre balancée par l'ajout externe d'engrais chimiques contenant ces nutriments (éléments minéraux, dont une grande proportion de produits azotés) (Vallée *et al.*, 1999).

Cette carence des sols en azote associée à l'augmentation des besoins mondiaux en nourriture on fait que Le recours à l'ajout d'engrais azoté a quasiment décuplé entre 1960 et 2000 pour atteindre 88 millions de tonnes par an dans le monde, les projections prévoyant l'usage de 120 millions de tonnes en 2040. Cependant, toutes cultures confondues, il est estimé qu'environ 50 % de cet azote épandu n'est pas absorbé mais lessivé, causant de graves problèmes environnementaux tel que l'eutrophisation des milieux aquatiques. A cela s'ajoute le fait que la production et l'épandage de ces engrais consomment de grandes quantités d'énergies fossiles aggravant leur impact écologique (Vance, 2001).

Ce fait a crée un passage de l'agriculture conventionnelle à un système de production agricole, basé sur la gestion rationnelle de la fraction du sol, dans le respect des cycles biologiques et de l'environnement, tenant compte des connaissances en écologie, pour une production de qualité, équilibrée, plus autonome, plus économe et non polluante, c'est l'agriculture biologique qui vise toujours la durabilité. Les apports en azote dans l'agriculture biologique proviennent des résidus de récolte, des fumiers et des lisières des animaux, des matières compostées mais aussi de l'azote N qui est fixé biologiquement par les légumineuses (engrais vert) (Fleuriet, 2005). La fixation biologique de l'azote est un processus métabolique exclusivement réalisé par les organismes procaryotes : certaines bactéries et cyanobactéries libres dans le sol ou l'eau, et les bactéries symbiotiques des légumineuses (Skerman *et al.*, 1982).

L'association symbiotique entre Rhizobia et légumineuses à bénéfices réciproque fournit pour la bactérie, les ressources carbonées nécessaires à sa croissance, et pour la plante, la fixation de l'azote atmosphérique essentielle à son développement. Cette fixation biologique de l'azote atmosphérique a constitué pendant longtemps (jusqu'au début du xx^e siècle) la seule voie d'entrée d'azote combiné dans les sols, et représente encore aujourd'hui à l'échelle mondiale, un apport supérieur à celui des engrais (Pellerin et *al.*, 2014).

Notre travail consiste à :

I) inoculer une variété locale de luzerne (*Medicago sativa* L.) par une vingtaine de souches rhizobiennes provenant de différentes zones agricoles de la région de Ghardaïa et

II) réaliser une caractérisation phénotypique (test de sensibilité aux antibiotiques, effet des facteurs abiotique tels que la température, le pH et la salinité) de ces différents isolats, qui nous permettra d'une part de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches et d'autre part d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats pouvant maintenir une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu.

Notre travail est organisé en trois chapitres. Le premier chapitre bibliographique est consacré à la description des symbioses fixatrices d'azote. Le deuxième chapitre est consacré à la partie matériel et méthodes adopté à l'expérimentation et en laboratoire. Les résultats et discussions sont présentés dans le troisième chapitre. En fin, le travail sera achevé par une conclusion générale qui englobe des suggestions et des perspectives.

Chapitre I-

Synthèse bibliographiques

1. L'azote et sa relation avec les micro-organismes

1.1. Cycle de l'azote

L'azote total est généralement réparti dans trois ensembles principaux : l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote (Hopkins, 2003).

Le cycle de l'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et soumet de nouveau l'azote dans la nature. C'est un cycle continu et peut être décomposé en quatre types de réactions où les microorganismes jouent un rôle dans ces derniers (Tourche, 2006).

Le cycle de l'azote débute par sa fixation biologique. Des composés d'azote d'origine organique (nitrates) sont libérés dans l'environnement par certains champignons et certaines bactéries et utilisés par les plantes. D'autres microorganismes contribuent au processus d'ammonification, où l'azote contenu dans la matière végétale morte est transformé en ammoniac, ce qui le rend de nouveau disponible au processus de nitrification.

Les bactéries, les plantes et les champignons peuvent assimiler directement les nitrates et les composés d'ammoniac. Finalement, l'azote est libéré de la masse organique d'un écosystème à travers le processus de dénitrification (Mulder, 2009).

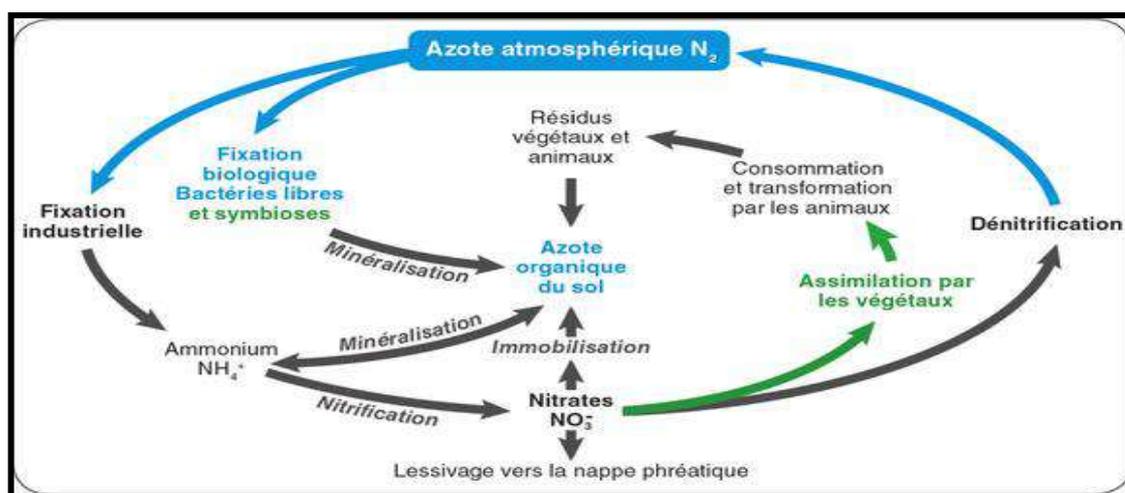


Figure 1. Cycle de l'azote (Suty, 2015).

1.1.1. Transformation de l'azote dans la nature

1.1.1.1. Ammonification

Ce processus participe à la dégradation de la matière organique. Il est réalisé aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène principalement par des bactéries hétérotrophes et d'autres microorganismes (champignon, levures,...) qui utilisent la matière organique comme source d'énergie et de carbone. Le stade final de l'ammonification, est l'ion ammonium (NH_4^+) (Montuelle, 2003).

1.1.1.2. Nitrification

La transformation de l'ammoniac (NH_3) ou de l'ammonium (NH_4^+) en nitrate (NO_3^-) s'appelle la nitrification. Les bactéries terrestres transforment l'ammoniac ou l'ammonium en nitrite (NO_2^-). Ensuite, d'autres bactéries terrestres oxydent le nitrite en nitrate. Le processus de nitrification fournit à ces bactéries, appelées bactéries nitrifiantes, de l'énergie (Raven, 2009).

1.1.1.3. Dénitrification

Un processus anaérobie au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux N_2 et l'oxyde d'azote N_2O , qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven et *al.*, 2007).

De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus tels que *Bacillus*, *Prococcus* et *Pseudomonas* (MADIGAN et *al.*, 2007).

1.2. Effets de l'azote sur la croissance des plantules

Selon Vallee et *al* (1999), l'azote peut avoir plusieurs effets sur la croissance des plantes :

- Il stimule la croissance végétative, qui se traduit par la formation plus abondante de feuilles et de tiges qui accentuent la photosynthèse (formation de glucides) ;
- Un excès de cet élément favorise la formation de plantules dont les tiges et les feuilles sont plus succulentes (tendres et juteuses), avec les nœuds plus espacés que la normale (étiolement) ;

- Il accélère le développement des racines et favorise une augmentation de l'absorption de l'eau et des éléments minéraux ;
- Il permet une reprise plus rapide des plantules après le repiquage.

2. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel un certain nombre d'espèces de bactéries utilisent l'enzyme nitrogénase pour convertir l'azote moléculaire N_2 en ammoniac, une forme d'azote qui peut ensuite être incorporée dans les composantes organiques tels que les acides nucléiques des bactéries et des plantes associées (Unkovick et al., 2008).

La symbiose Rhizobium-Légumineuse est responsable de plus de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (Bory et al., 1993).

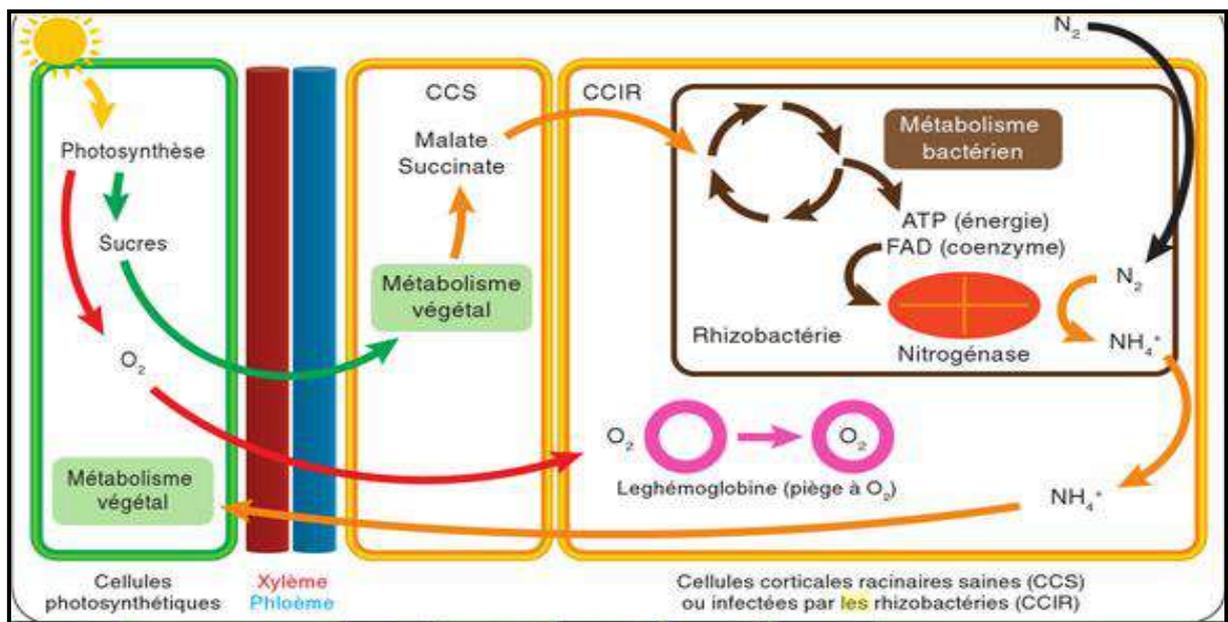


Figure 2. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Suty, 2015).

2.1. Les fixateurs libres de l'azote

Les bactéries libres fixatrices 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. Bien que les organismes libres, fixateurs d'azote soient très répandus, la plupart ont une croissance lente et, exceptées les espèces photosynthétiques, ils

ont tendance à être confinés dans des habitats riches en carbone organique. Comme une proportion importante de leur énergie respiratoire est nécessaire pour fixer l'azote, la part disponible pour leur croissance est moindre (Hopkins, 2003).

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophe (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatifs (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*) (Dobereiner et al., 1995 ; Kennedy et al., 1997).

2.2. Les fixateurs symbiotiques de l'azote

La réduction de l'azote est très exigeante en énergie : il faut 16 molécules d'ATP (donneur d'énergie dans les cellules) pour réduire une molécule d'azote. C'est pourquoi les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses associant des bactéries fixatrices à des organismes photosynthétiques capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique (Denarie, 2000).

La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes d'azote, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996).

Les espèces fixatrices d'azote réellement symbiotiques sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement des *Rhizobiums*, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaenaazollae*) (Pelmont, 1995).

Les bactéries de ce type jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes agricoles (Tortora et al., 2003). Mais la symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant des bactéries du sol, les *Rhizobiums*, aux légumineuses (Denarie, 2000).

3. Molécules clés de la fixation biologique de l'azote

3.1. La nitrogénase

C'est une enzyme bactérienne, responsable de la fixation de l'azote et de sa transformation en ammonium directement assimilable par la plante (Fleurentin, 2004), qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines solubles du bactéroïdes et qui possède une grande homologie de structure et de fonctionnement chez les différents diazotrophes (Drevon et al., 2003).

3.2. La leghémoglobine

La leghémoglobine végétale, présente dans les nodosités des légumineuses est très proche des hémoglobines animales (Dajoz, 2012); rouge comme le sang, apporte de l'oxygène aux mitochondries de la bactérie (Fleurentin, 2004). Dans les nodules fixateurs d'azote, la leghémoglobine peut représenter jusqu'à 20 à 25% des protéines cytoplasmiques. Elle a pour fonction d'assurer l'approvisionnement en oxygène des bactéries symbiotiques et de préserver le complexe nitrogénase d'une inactivation irréversible par l'oxygène (Hamon, 2001).

4. Les partenaires de la symbiose rhizobium-légumineuse

4.1. Le partenaire végétal (macro-symbionte)

Les légumineuses représentent la famille des *Leguminosae* (ou *Fabaceae*), Dicotylédones. Elles forment une famille importante et variée des Angiospermes (Doyle et Luckow, 2003).

Plus de 18000 espèces de légumineuses que l'on classe en trois catégories : les papilionacées, les mimosées et les césalpinées (Griffon, 2013).

En agriculture, les légumineuses sont soit cultivées pour leurs graines, riches en protéines (fève, fèverole, soja, pois sec, lentille, haricot...) qui sont utilisées en alimentation humaine et animale, soit pour leur appareil végétatif (luzerne, trèfles, sainfoin) utilisé comme ressource fourragère (Cavaillées, 2009).

4.1.1. La luzerne (*Medicago sativa* L.)

La luzerne est un membre de la famille des Légumineuses ou Fabacées (Cumò, 2013). Elle est connue également sous le nom d'*Alfalfa* (Botineau, 2010).

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une espèce cosmopolite pérenne originaire du bassin Méditerranéen, d'Arménie et de l'Asie centrale où elle existe aujourd'hui à l'état sauvage. Son nom scientifique dérive de Médéa (*Medicago*) ancienne ville du Nord de l'Afrique, alors que *sativa* signifie cultivée. Elle est la plus importante à l'échelle mondiale comme source de protéine pour l'alimentation de l'animal et comme source d'azote pour l'amélioration du sol (Hamon, 2001 ; Marinoff et *al.*, 2005).

4.1.2. Classification botanique

Ordre: Fabales

Famille : Fabaceae (Leguminosae)

Sous- famille : Faboideae

Tribu : Trifolieae

Genre : *Medicago*

Espèce : *Medicago sativa* L



(Singh, 2009).

Photo 1. Plantes de la luzerne étudiée.

4.1.3. Caractère généraux

La Luzerne (*Medicago sativa* L.) est de 50 à 80 cm de hauteur, à fortes racines pivotantes profondes et à tige rameuse, présentant une grande variabilité morphologique. Elle présente des tiges plus ou moins ligneuses et très ramifiées avec des feuilles ovoïdes et oblongues avec trois folioles et finement dentées au sommet, d'environ 3 cm de long chacune, ses fleurs sont disposées au niveau axillaire et de couleur bleu – violacé sous forme d'inflorescences en grappes de 10 à 20 fleurs de couleur violette, pourpre ou bleuâtre (Camille, 1980).

La fécondation est allogame (Prosperi et *al.*, 1993). Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en forme de faucille, soit spiralée (de 1 à 4 spires) parfois épineuse. La graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 10 mm (Hireche, 2006).

Tableau 1. Stades physiologiques de la luzerne (Mueller et Teuber, 2007).

Stade	Descriptions
Végétatif	<p>Stade 0: au début de stade végétatif, Longueur de tige ≤ 6, pouces (15cm).</p> <p>Stade 1: au milieu de stade végétative, Longueur de la tige 6-12, pouces (16-30cm).</p> <p>Stade 2: à la fin de stade végétative, Longueur de tige ≥ 12, pouces (31cm), pas des bourgeons, fleurs ou des gousses visibles.</p>
Début bourgeonnement	<p>Stade 3: Début de bourgeonnement 1-2 nœuds avec des bourgeons visibles; pas de fleurs ou gousses.</p> <p>Stade 4: à la fin de ce stade, ≥ 3 nœuds avec des bourgeons visibles; pas de fleur ou gousses.</p>
Floraison	<p>Stade 5: Début de floraison, Un nœud avec une fleur ouverte</p> <p>Stade 6: à la fin de ce stade, ≥ 2 nœuds avec des fleurs ouvertes; aucune graine gousses.</p>
Développement	<p>Stade 7 : Début de ce stade, 1-3 nœud avec des gousses vertes</p> <p>Stade 8: ≥ 4 nœuds avec des gousses vertes.</p> <p>Stade 9: Les nœuds avec principalement brun, mature gousses</p>

4.2. Le partenaire bactérien (micro-symbionte)

4.2.1. Caractéristiques des rhizobia

À chaque espèce de légumineuse correspond une espèce de Rhizobium qui lui est inféodée, mais certaines espèces de Rhizobium peuvent être communes à plusieurs espèces végétales (exemple de *R.leguminosarum* bv.*viciae* capable de nodulaire efficacement les pois, fèves et vesces). Les souches de Rhizobium associées avec les légumineuses tempérées comme la luzerne, les trèfles, les vesces sont à croissance rapide, alors que les *Bradyrhizobium* associées aux espèces comme les lupins, les soja et la plupart des espèces tropicales sont à croissance lente (Laguerre et *al.*, 2007 ; Bourion et *al.*, 2007).

Les rhizobia font partie de la subdivision des α - et β -Proteobacteria (Moulin et al., 2007).

Sont des bâtonnets mobiles de 0,5 à 0,9 sur 1,2 à 3,0 μm , aérobies Non sporulant (Prescott et al., 2010), à Gram négatif qui appartient à la famille des *rhizobiaceae* infectent de manière symbiotique les plantes de la famille des légumineuses. L'association qui en résulte peut être bénéfique pour la plante, et donc importante pour l'agriculture en fournissant de l'azote au sol (Chaby, 2010).

4.2.2. Classification des rhizobia

Pendant longtemps, les propriétés symbiotiques sont restées la seule base de la caractérisation des rhizobia mais actuellement l'on a complété l'étude classique des caractères phénotypiques par celle de la structure génomique (Krishnan et Bennet, 2007).

La classification moderne est basée sur l'approche poly-phasique, c'est à dire sur l'analyse génétique (Séquence de l'ADNr, homologie ADN / ADN) ainsi que sur l'analyse numérique afin de décrire toute nouvelle espèce de rhizobia (Frederic et De lajudie, 2006).

Selon Weir (2016), on dénombre, actuellement, quelque 98 espèces appartenant à 13 genres différents.

4.2.2.1. Le genre *Sinorhizobium*

Les rhizobiums identifiés jusqu'à présent comme micro symbiote des *Medicago* appartiennent au genre *Ensifer* (*Sinorhizobium*) (Young, 2003).

Seules les espèces *S. medicae* et *S. meliloti* ont été décrites capables d'entrer en symbiose avec les plantes du genre *Medicago* (De lajudie et al., 1994 ; Elboutahiri et al., 2010).

Tableau 2. Espèces de *Sinorhizobium*

Espèce	Plante hôte	Référence
<i>Ensifer abri</i>	<i>Abrus precatorius</i>	Ogasawara et al. (2003)
<i>Sinorhizobium americanum</i>	<i>Acacia</i> spp. (<i>A.farnesiana</i> , <i>A.acatlensi</i> , <i>A.pennatula</i> , <i>A.macilent</i> , <i>A.cochaliacantha</i>)	Teledo et al. (2003)
<i>Ensifer arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>	Brenner et al. (2005)
<i>Ensifer fredii</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Cajanus caja</i> , <i>Glycine max</i> cv .Peking, <i>Glycine soja</i> , <i>Vigna unguiculata</i>	
<i>Ensifer garamanticus</i>	<i>Argyrobium uniflorum</i> , <i>Medicago sativa</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer indiaense</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Ogasawara et al. (2003)
<i>Ensifer kostiensis</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>	Brenner et al. (2005)
<i>Ensifer kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei et al. (2002)
<i>Ensifer medicae</i>	<i>Medicago orbicularis</i> , <i>M.polymorpha</i> , <i>M.rugosa</i> , <i>M. truncatula</i>	Brenner et al. (2005)
<i>Ensifer meliloti</i>	Espèces de genre <i>Melilotus</i> , <i>Medicago</i> , <i>Trigonella</i>	
<i>Ensifer mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lioret et al. (2007)
<i>Sinorhizobium morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang et al. (2002)
<i>Ensifer numidicus</i>	<i>Argyrobium uniflorum</i> , <i>Lotus creticus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer saheli</i>	<i>Sesbania</i> espèce (<i>S.cannabina</i> , <i>S.grandiflora</i> , <i>S.rostrata</i> , <i>S.pachycarpa</i>), <i>Acacia seyal</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Neptunia natans</i>	Brenner et al. (2005)
<i>S.xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>	
<i>Ensifer terangae</i>	<i>Acacia</i> spp. (<i>A.senegal</i> , <i>A.laeta</i> , <i>A.tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i> , <i>A.horrida</i> , <i>A.mosllissima</i>) et <i>Sesbania</i> spp. (<i>S.rostrata</i> , <i>S.cannabina</i> , <i>S.aculeata</i> , <i>S.sesban</i>)	
<i>S.chiapanecum</i>	<i>Acaciella angustissima</i>	Rincón-Rosales et al. (2009)

5. Génétique de la nodulation

5.1. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes nod

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol (Taylor et Grotewold, 2005 ; Gibson et *al.*, 2008).

Actuellement, de nombreuses espèces de flavonoïdes ont été caractérisées dans les exsudats racinaires, beaucoup d'entre elles stimulent la nodulation mais certaines espèces inhibent en fait le processus (Hopkins, 2003)

À l'induction des gènes nod, les flavonoïdes semblent avoir des rôles multiples pendant plusieurs étapes du développement du nodule et de la plante, et leur production est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle la plupart des nodules se développent plus tard (Broughton et *al.*, 2000).

5.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie

Les gènes qui participent aux interactions symbiotiques sont généralement localisés dans un grand plasmide chez les espèces de rhizobiums (Raven et *al.*, 2000).

De nombreux gènes bactériens interviennent dans la nodulation de la plante (gènes nod) et dans le fonctionnement du nodule avec tous les gènes impliqués dans la fixation de l'azote (gènes nif et fix) (Werner, 1992).

Les gènes nod sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes nif et les gènes fix sont regroupés dans 5 régions distinctes (Crossman, 2004).

5.3. Génétique de la nodulation chez la plante

Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite la production par les cellules hôtes d'un certain nombre de protéines nommées nodulines en réponses des stimuli provenant des bactéries symbiotiques. Ces protéines sont codées par des gènes NOD localisés dans le génome des cellules hôtes (Hopkins, 2003).

Une distinction est parfois faite entre les nodulines tardifs, qui sont exprimés

autour du début de la fixation de l'azote, et les nodulines précoces, qui sont exprimés aux étapes initiales de l'infection et du développement de nodule (Brewin et *al.*, 1992).

Certaines nodulines sont des enzymes du métabolisme azoté ou carboné. La plus spectaculaire est une protéine qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la leghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène, et ce dispositif est indispensable à la fixation de l'azote (Pelmont, 1995).

6. Processus de la nodulation

6.1. La pré-infection

La bactérie et la plante hôte mettent en place un système de dialogue basé sur un échange de molécules chimiques (Hirsh et *al.*, 2001; Graham, 2008).

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. Les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca et *al.*, 2004).

Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes Nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipo-chitino-oligosaccharides ou LCO) (Gage, 2004). Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca et *al.*, 2004).

Les rhizobiums différents dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (Moschetii et *al.*, 2005).

6.2. L'infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de rhizobia. D'autres substances comme les lectines, qui sont des glycoprotéines végétales, ainsi que des récepteurs spécifiques présents au niveau de la paroi des cellules végétales jouent également un rôle dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Perrt et *al.*, 2000; Krishnan et Bannett, 2007).

Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005).

Le rhizobium s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane (Belanger, 1998).

Cette interaction induit une déformation du poil absorbant à 360° appelée «**crosse de berger** ». Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (Machrafi, 2001).

En réponse le poil absorbant secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi ; la pénétration des bactéries (Dupuy et Nougier, 2005). Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (Perry et *al.*, 2004). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme (Pelmont, 2005).

6.3. L'organogénèse

En parallèle de la progression d'infection, l'organogénèse nodulaire se met en place.

Le primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, se différencie en nodule mature (Brewin, 1991; Trevaskis et *al.*, 2002). Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane péribactéroïdienne d'origine végétale (Day et *al.*, 2001; Brewin, 2004). Cette membrane assure la séparation des bactéries de la cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires (Udvardi et Day, 1997).

Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologiques et morphologiques, se différenciant en bactéroïdes (Mergaert et *al.*, 2006).

La présence de leghémoglobine autour des symbiosomes permet de baisser la pression partielle en oxygène, qui agit comme inhibiteur sur la nitrogénase bactérienne, tout en assurant un approvisionnement en oxygène pour la respiration des bactéroïdes (Ott et *al.*, 2005).

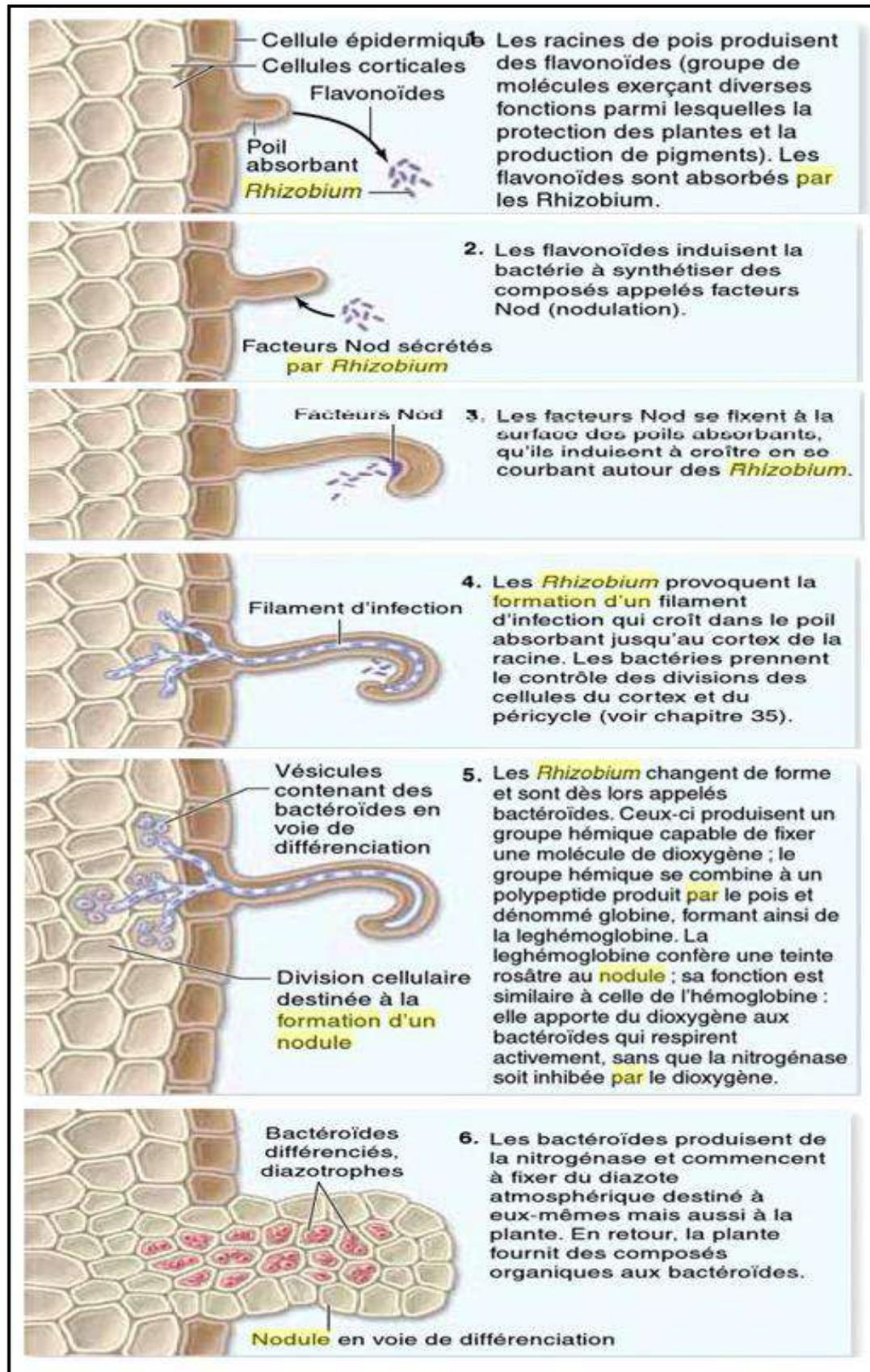


Figure 3. Formation d'un nodule induit par rhizobium (Georges et al., 2011).

7. Structure et morphologie des nodules

On distingue deux types de nodules : les nodules indéterminés, qui comportent un méristème nodulaire persistant, et les nodules déterminés, chez lesquels ce méristème n'existe pas (par méristème on entend qui de perpétue tel quel et non simplement un ensemble de cellules qui se divisent activement pendant un certain temps pour se différencier ultérieurement) (Dommergues et *al.*, 1999).

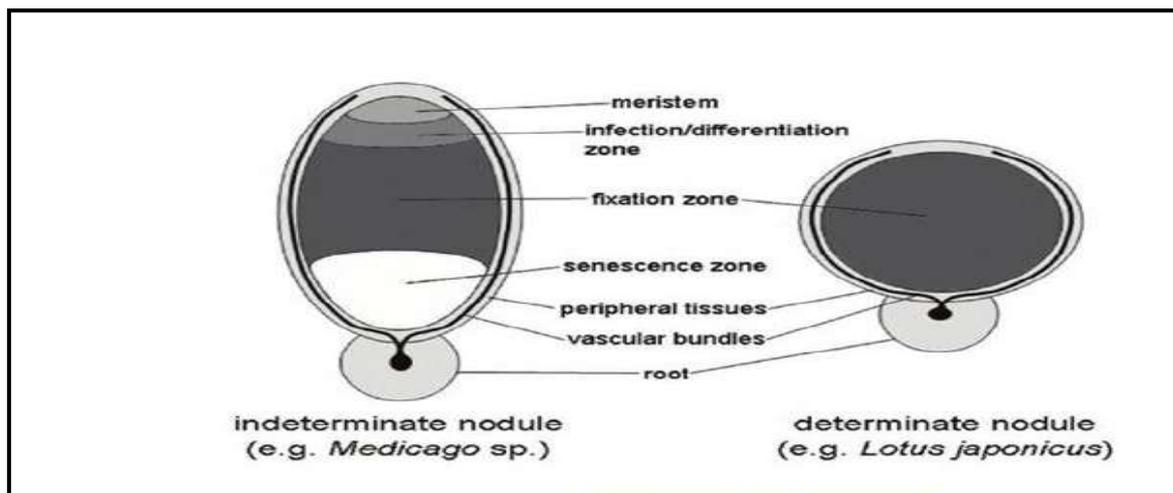


Figure 4. Architecture de nodule déterminé et indéterminé (Dilworth et *al.*, 2008).

Tableau 3. Les principales différences entre les types de nodule indéterminé et déterminé (Ferguson et *al.*, 2010).

Type de nodosité	Indéterminée	Déterminée
Site de divisions cellulaires initiales	Cortex racinaire intérieur à côté du pôle de xylème	Externe ou au milieu, le cortex à côté du pôle xylème
Type de méristème	méristème Persistante	Aucun méristème persistant
Forme de nodule	Cylindrique / ramifié	Sphérique
Fil de l'infection	Large	Étroit
Les cellules infectées	hautement vacuolé	vacuolisation Minimal
Région géographique d'origine végétale	Les régions tempérées	Subtropicale et tropicale
Exemples	<i>Medicago</i> , clovers et <i>pea</i>	<i>Soybean</i> , <i>bean</i> , <i>Pongamiapinnata</i> , et <i>Lotus</i>

8. Factures influençant la fixation symbiotique

Plusieurs facteurs tels que la composition physico-chimique du sol peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice de l'azote après symbiose (Collavino *et al.*, 2005; Kinkema *et al.*, 2006).

8.1. Le pH du sol

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficiente dans le sol (Bordeleau et Prevost, 1994).

L'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficiencia des rhizobiums et engendre par conséquent une diminution de la nodulation (Munns, 1977). Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (Bordeleau et Prevost, 1994).

8.2. Le stress salin

En symbiose, le rhizobium est plus résistant à la salinité que son partenaire végétal (Zahran, 2001). La tolérance de la plante hôte constitue donc un facteur déterminant (Soussi *et al.*, 1998).

La salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la Fixation Symbiotique de l'Azote est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao *et al.*, 2002).

Généralement l'activité des nodules est plus touchée par le sel que la nodulation, mais l'étape la plus sensible à la présence du sel est le processus infectieux (Payakapong *et al.*, 2006)

8.3. Le stress hydrique

La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les légumineuses est très sensible au manque d'eau. Une grande variété de légumineuses tempérées et tropicales présentent une

réduction de fixation lorsque ils sont soumis à un stress hydrique La réponse de la fixation au stress hydrique dépend cependant du stade de croissance de la plante, et est plus prononcée pendant la période de croissance végétative (Zahran, 1999).

Le stress hydrique affecte la fixation symbiotique de l'azote à différents niveaux:

La formation et la croissance nodulaire; le métabolisme du carbone et de l'azote; l'activité de la nitrogénase et la perméabilité nodulaire à l'oxygène (Aguirreolea et Sanchez-d'Yaz, 1989; Sadowsky, 2005).

8.4. La température

Des températures trop fortes au niveau du système racinaire affectent l'infection des racines par les bactéries et la fixation symbiotique de l'azote chez plusieurs espèces de légumineuses. Les températures élevées retardent la nodulation et la situent en profondeur, réduisent ou inhibent l'activité de la nitrogénase et la fixation symbiotique (Zahran, 1999).

La température critique pour la fixation symbiotique chez cette légumineuse est l'une des plus élevée et se situerait entre 35 et 40°C (Michiels et *al.*, 1994).

Chapitre II-

Matériel et méthodes

1. Matériels d'étude

1.1. Le substrat de culture

Nous avons utilisé, dans le cadre de cette étude le sable des dunes recueillis localement au niveau de la région de Ouargla (exploitation agricole de l'université).

1.2. Le matériel végétal

Les graines de la luzerne (*Medicago sativa*) que nous avons utilisées proviennent de la région de Ouargla, que les agriculteurs cultivent depuis plusieurs années. Nous l'avons acheté chez un grainetier du coin. Nous ne disposons pas de sa fiche technique détaillée, mais nous savons que sa capacité de germination est très élevée et dépasse 90%.

1.3. Le matériel microbiologique

Une collection de dix-huit souches rhizobiennes que nous avons utilisées sont isolées à partir de nodosités prélevées exclusivement de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*). Elles proviennent de différentes zones agricoles de la région de Ghardaïa.

Deux souches de référence (souche 2011 et souche 1021), fournies par le Laboratoire de l'INRA de Toulouse (France), sur lesquelles plusieurs études ont été réalisées à travers le monde, sont utilisées pour servir à la comparaison avec les souches autochtones.

1.4. Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (**Annexe n°1**).

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants:

- Milieu liquide: YMB (Yeast Manitol Broth) (Vincent, 1970).
- Milieu solide: YMA (Yeast Manitol Agar) (Vincent, 1970).

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes.

2. Méthodes d'étude

Description du dispositif expérimentale

L'expérimentation a été réalisée au niveau de la serre multi-chapelles de l'exploitation de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Le schéma général du dispositif expérimental est montré par la figure suivante.

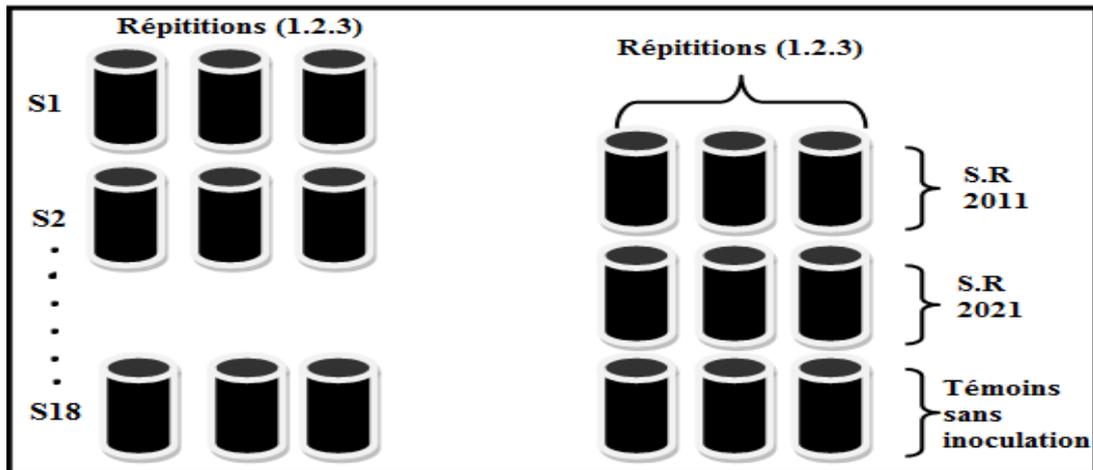


Figure 5. Description du dispositif expérimentale.

Nous avons utilisé le système des jarres de Leonard (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1985), pour évaluer la nodulation de la luzerne sous des conditions expérimentales contrôlées.

2.1. Test de nodulation

L'aptitude des bactéries à infecter les racines de la plante hôte et à induire des nodules s'appelle « l'infectivité », alors que le terme 'efficacité' ou 'effectivité' désigne l'aptitude des plantes nodulées à fixer au maximum l'azote (Beck et *al.*, 1993).

Le but de ce test est d'évaluer la capacité des souches et leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte et contribuer à leur développement. Il consiste en l'inoculation des graines germées de la plante hôte (*Medicago sativa* L.) avec les différentes souches (Vincent, 1970).

2.1.1. Préparation des jarres -Léonard

Des bouteilles d'eau minérales en plastique (1.5L) sont choisies et coupées horizontalement en deux parties. Ces jarres sont lavées avec un détergent courant, puis désinfectées avec de l'eau javellisée pour éliminer toutes traces de bactéries.

Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse stérile ce qui permet d'alimenter en continu, par capillarité, la partie supérieure en solution nutritive.

2.1.2. Préparation du support de culture

Nous avons versé une quantité d'Acide Chlorhydrique $H_3O^+Cl^-$ (esprit de sel) sur le sable, pour le déminéralisé, dans une bassine et laissé réagir pendant une quinzaine de minutes. Trois à quatre lavages successifs sont réalisés à l'eau filtrée jusqu'à ce que cette dernière devienne claire. Deux à trois autres lavages sont effectués, dans ce cas, avec de l'eau distillée.

Cette quantité a été répartir sur les jarres équitablement comme décrit ci-après.



Photo 2. Support de la culture des graines de la luzerne.

2.1.3. Désinfection, pré-germination et mise en culture des graines

Tout d'abord, nous avons sélectionné celles ayant des tailles identiques, entières et indemnes de toute anomalie. Sous la hotte à flux laminaire, les graines sont désinfectées à l'éthanol (95%) pendant 10 à 30 secondes. Dix lavages successifs sont réalisés avec l'eau distillée. Nous les avons laissé s'imbiber dans le dernier rinçage pendant une nuit à 4°C.

Les graines sont plantées dans les jarres de léonard contenant le sable préalablement déminéralisé et stérilisé, à raison de 3 graines par jarre. La profondeur de semis était égale au double de la dimension de la graine.



Photo 3. Mise en culture des graines de la luzerne.

2.1.4. Production d'inoculum et inoculation des jarres

Pour l'activation des souches, nous les avons cultivés dans un milieu liquide d'extrait de levure-mannitol (YEM). Ensuite, nous les avons incubés à 28 °C pendant 3 jours dans un incubateur-agitateur à 220 tr/mn.



Photo 4. Production d'inoculum.

Les jarres sont inoculées avec 3 ml de culture bactérienne fraîchement récolté. Trois jarres n'ont pas été inoculées et serviront comme témoin. Des seringues stériles sont utilisées pour l'inoculation pour assurer un maximum d'asepsie.

La partie extérieure des jarres est couverte avec du plastique noir pour éviter l'exposition des racines et de la solution nutritive à la lumière.



Photo 5. Inoculation des jarres avec la suspension bactérienne.

2.1.5. Irrigation et suivi des plantes

L'irrigation des jarres par la solution de Fahreus (**Annexe n°2**) s'effectue superficiellement à chaque fois que le niveau de la solution nutritive a diminué fortement et que le substrat apparaît sec pour éviter le flétrissement des plantules.

La plus part des temps, la solution nutritive est apportée au niveau du compartiment inférieur et la montée de celle-ci se fait par capillarité, via le cordon de compresse.

2.1.6. Prélèvements des plantes

Après une période de trois mois, les plantes ont été dépotées, des mottes de terre entières furent prélevées puis nettoyées doucement à l'eau afin d'éviter autant que possible d'abîmer le système racinaire. Les racines sont examinées pour détecter la présence de nodules. S'ils sont présents, les nodules sont comptés à l'état frais.

2.2. Paramètres mesurés

Les paramètres que nous avons mesurés, au cours de cette partie d'étude, ont été retenus vue leur importance pour dans la symbiose établie. Nous les énumérons comme suit :

2.2.1. Poids sec des parties aériennes et souterraines

Chaque partie est mise dans du papier aluminium. La matière sèche des deux parties est déterminée après séchage à l'étuve réglée à 70°C pendant 48 h (Shibley et Vu, 2002 ; Zaka et *al.*, 2015). Une fois les échantillons complètement séchés, leur poids sec est déterminé à l'aide d'une balance de précision électronique.

2.2.2. Hauteur des parties aériennes et souterraines

Les parties aériennes et racinaires des plantes sont coupées au niveau du collet. Les mesures de hauteurs se font à l'aide d'une règle graduée.



Photo 6. Croissance végétale de la partie aérienne et souterraine.

2.2.3. Nombre de nodules par plante

L'évaluation du taux de nodulation consiste à compter le nombre de nodules.

2.2.4. La forme, la couleur, la taille et la distribution des nodules

Nous avons déterminées, à l'œil nue, la couleur (rose, blanc, vert), la forme (coralloïde ou allongée), la taille (grande ou petite) et la distribution (partie supérieur ou inférieure).

2.3. Effet des Facteurs extrinsèques

L'étude de la diversité phénotypique a été menée pour la caractérisation de 20 souches rhizobiennes (18 souches locales et deux souches références) de rhizobia nodulant la luzerne. La tolérance au pH, à la salinité et à la température a été évaluée pour l'ensemble des souches de la collection. Ces trois paramètres constituent les plus importants facteurs du stress abiotique qui contraignent la croissance normale des rhizobia dans les sols sahariens. L'ensemble de ces paramètres pourra constituer une base d'étude de la diversité phénotypique qui existe entre ces souches autochtones et nous permettra de sélectionner les plus efficaces.

2.3.1. Tolérance des isolats au pH

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance au pH sur milieu YEM (solide et liquide) ajusté à 6 valeurs (pH=4, pH=5, pH=6, pH=6.8, pH=8 et pH=9).

- Sur milieux solide, les boîtes sont incubées à 28°C. Les observations sont faites après chaque 24 heures d'incubation qui est de 72 heures.

- Sur milieux liquide, les tubes sont incubés à 28°C pendant 72h sous agitation continue (220 tr /mn). La mesure de la DO à 600 nm se fait après chaque 24h.

2.3.2. Tolérance des isolats à la température

Dans le but d'étudier les températures optimales de croissance et de définir l'intervalle de tolérance à celle-ci, ce test a été réalisé, comme précédemment pour le pH, sur milieu YEM solide et liquide.

La capacité des souches à tolérer différentes températures a été déterminée après 72 heures d'incubation à 4°C, 28°C, 37°C et 45°C.

2.3.3. Tolérance des isolats à la salinité

La tolérance à la salinité a été évaluée pour le NaCl. La démarche suivie est celle décrite pour les tests précédents.

Les souches sont cultivées sur milieu YEM (solide et liquide) à différentes concentrations de NaCl : (1mM), (40mM), (80mM), (160mM), (320mM), (640mM) et (1280mM).

Remarque

Les tests ont été reconduits sur le milieu YEM solide pour la confirmation des résultats obtenus sur milieu liquide.

2.4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude des *Rhizobium*, comme un moyen d'identification (Beck et al., 1993).

La résistance aux antibiotiques permet de caractériser et de comparer les souches entre elles. Le principe de l'antibiogramme est de mettre en culture des bactéries, et d'appliquer un disque contenant un antibiotique, de concentration connue, afin de voir quels effets jouent sur la bactérie ciblée.

En appliquant la méthode préconisée par Sanofi Diagnostics Pasteur (CA-S.F.M., 1996 ; Yattra et al., 2000), Pour déterminer la résistance aux antibiotiques, la boîte de pétri gélosée est inondée avec 300 µl de culture bactérienne, puis étaler la suspension sur toute la surface de la gélose afin d'obtenir la quantité la plus homogène possible de bactéries à la surface. Laisser sécher la suspension pendant 5 minutes. A l'aide d'une pince stérile, on applique les disques d'antibiotiques en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Ainsi, 6 disques sont placés sur une boîte de 9 cm de diamètre, en prenant soin de flamber la pince à chaque nouvel antibiotique.

Après application, les souches sont incubées pendant 72h à 28°C.

Tableau 4. Liste des antibiotiques utilisés dans notre étude

Sigle	Antibiotique	Sigle	Antibiotique
AMx	Amoxicilline	CTx	Cefotaxime
VA	Vancomycine	E	Erytromycine
K	Kanamycine	C	Cloramphénicol
P	Penicilline	CN	Céfalexine
FA	Acide fusidique	AN	Amikacine
SP	Spiramycine	CS	Colistine

Chapitre III-

Résultats et discussion

1. Test symbiotique

1.1. La croissance végétale

La croissance des plantes s'est déroulée, pendant les trois mois d'étude, dans des conditions normales jusqu'au moment de la récolte. La partie aérienne s'est bien développée avec des feuilles vertes.



Photo 7. Vue générales des jarres avant récolte.

1.1.1. Hauteur de la partie aérienne

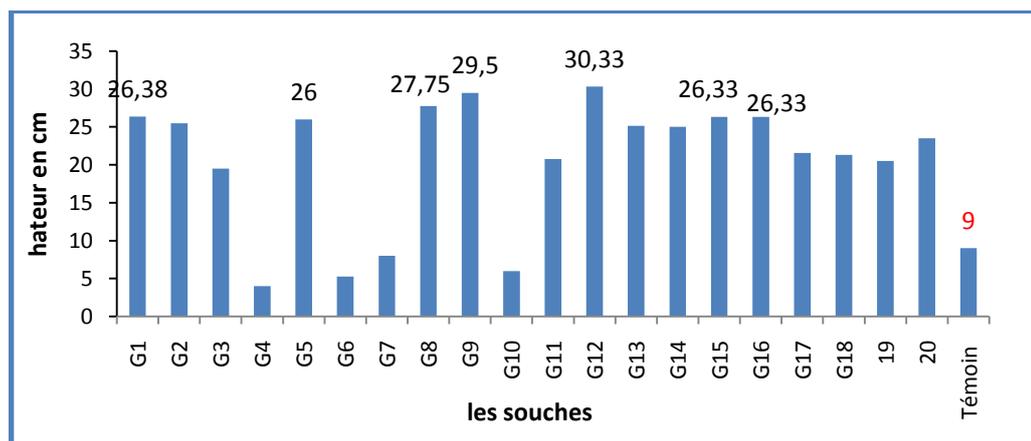


Figure 6. Effet des souches sur la croissance des parties aériennes.

Nous avons enregistré pour l'ensemble des plantes inoculées une hauteur moyenne des plantes égales à 19.84 cm.

Les plantes inoculées par les souches G12, G9, G8, G1, G15, G16 et G5 ont eu le meilleur développement avec des hauteurs moyennes de 30.33 cm, 29.5 cm, 27.75 cm, 26.38 cm, 26.33 cm (pour 2 souches) et 26 cm.

Les témoins (plantes sans inoculation) ont eu un développement faible, par rapport à la moyennes des plantes inoculées, avec des hauteurs moyennes de 9 cm.

Nous pouvons conclure que l'inoculation à eu un effet positif sur le développement des plantes en hauteur dépassant 100% par rapport aux témoins.

Nos résultats sont en concordance avec ceux trouvé par Ravikumar (2012) qui a conclu que les plantes inoculées possédaient une plus grande hauteur et plus grande nombre de feuilles que les plantes non inoculées.

1.1.2. Longueur de la partie souterraine

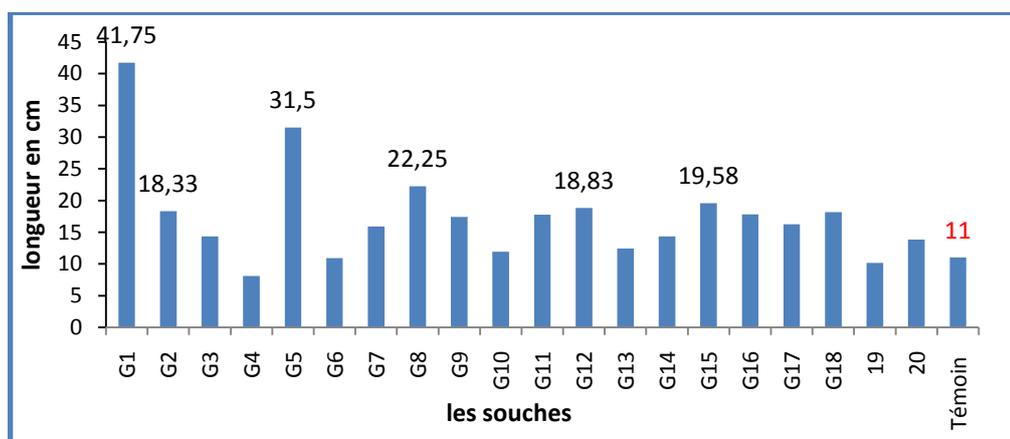


Figure 7. Effet des souches sur la croissance de la partie souterraine.

La longueur moyenne des racines, des plantes inoculées, est de 17.58 cm pour l'ensemble des plantes. A partir des résultats de la figure ci-dessus, nous avons remarqué que les plantes inoculées par les souches G 1, G5, G8, G15, G12 et G2 ont eu une bonne croissance la partie racinaire en comparaison aux autres plantes, avec une longueur moyenne égale à : 41.75 cm, 31.5 cm, 22.25 cm, 19.58 cm, 18.83 cm et 18.33 cm.

Une baisse très marquée au niveau de la croissance de la partie racinaire est notée chez les témoins, avec une longueur moyenne de 11 cm (la moitié de la longueur moyenne des racines des plantes inoculées).

Là aussi, l'effet de l'inoculation s'est traduit par une croissance racinaire notable par rapport au témoin, justifiant ainsi l'utilisation de la technique d'inoculation.

1.1.3. Poids sec de la partie aérienne

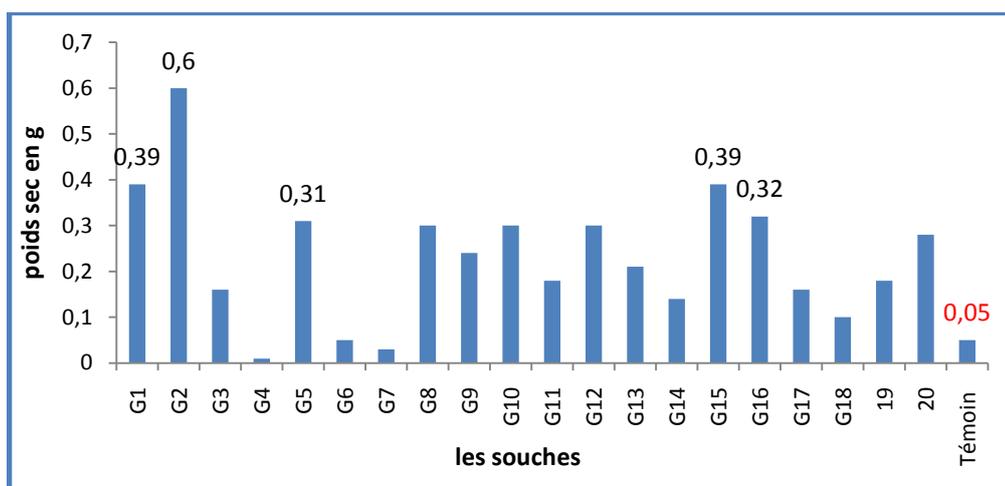


Figure 8. Biomasse sèche aérienne (g/plante) de la luzerne.

Le graphique ci-dessus, montre que les plantes qui donnent la plus grande masse sèche de la partie aérienne sont celles inoculées par les souches : G2, G1, G15, G16, G5 et G12 avec respectivement 0.6 g, 0.39g, 0.39g, 0.32g, 0.31g et 0.30 g. La plus faible production de biomasse aérienne moyenne est présentée par les plantes inoculées par les souches G4 (0.01g), G7 (0.03g) et G6 (0.05g). Les témoins, quant à eux, ont eu un moyen de 0.05g.

D'après Boulbaba et *al.* (2009), les résultats obtenus en Tunisie ont montré que les traitements d'inoculation *in situ* ont abouti à une augmentation des biomasses aériennes par rapport aux témoins.

Le coefficient de corrélation r , entre les hauteurs des parties aériennes et leurs poids secs, est égale 0,60. Cela signifie qu'il y a une forte corrélation entre ces deux paramètres, plus la hauteur des tiges augmente, le poids sec augmente.

1.1.4. Poids sec de la partie souterraine

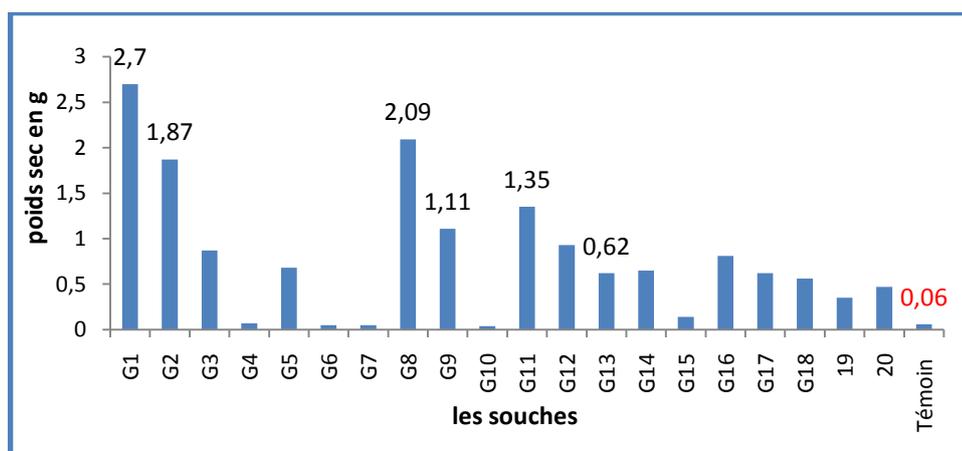


Figure 9. Biomasse sèche racinaire (g/plante) de la luzerne.

L'histogramme ci-dessus montre que les masses racinaires sèches les plus importantes sont celles des plantes inoculées par les souches : G1, G8, G2, G11, G9 et G13, avec une moyenne respective de 2.7g, 2.09g, 1.87g, 1.35g, 1.11g et 0.93g.

Les plantes témoins et celles inoculées par les souches G4, G6, G7, G10 et G15 ont enregistrées les poids secs moyens les plus faible.

La corrélation entre le poids sec la longueur des racines est trop forte ($r=0,70$), ce qui signifie que plus la longueur des racines augmente, le poids sec le sera aussi.

1.2. La nodulation

L'examen du système racinaire des plantes de la luzerne étudiées nous a permis de vérifier qu'ils sont tous nodulés et fixateurs de l'azote.

Selon Stacey et *al.* (2006), le nombre de nodule est un caractère de grande importance. Il renseigne sur la capacité de la plante à fixer l'azote atmosphérique.

1.2.1. Nombre total des nodules

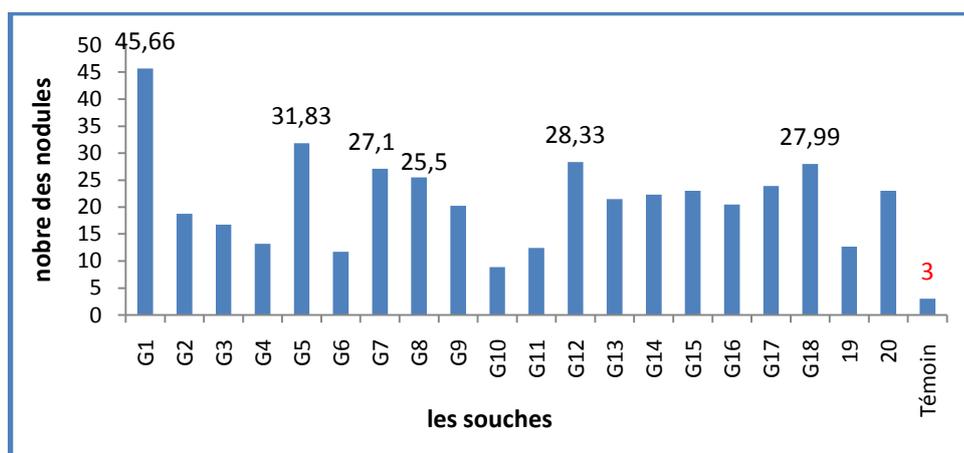


Figure 10. L'effet des souches bactériennes sur le nombre des nodules.

La figure montre que le nombre de nodules varie d'une plante à une autre (de 3 à 45 nodules/plante). La moyenne de nodulation enregistrée dans cette étude est de 21,76 nodule/plante. Cette moyenne de nodulation correspond parfaitement à celle obtenue *in situ* par AZIB *et al.* (2013) qui est égale à 22,64 au même stade de développement.

Les souches les plus performantes : G1, G5, G12, G18, G7 et G8 ont conduit à la formation, respectivement, de : 45,66, 31,83, 28,33, 27,99, 27,1 et 25,5 nodules/plante.

Les souches référence 2011 et 1021 ont eu une moyenne nodulation de l'ordre de 23 nodules/plante pour la première et 12,66 nodules/plante pour la seconde.

Les témoins ont seulement formé 3 nodules. Cela peut paraître anormal d'enregistrer des nodules chez des plantes non inoculées, ce qui laisse présager une contamination quelconque. La réalité c'est que ces nodules sont inactifs, de couleur blanchâtre et petits de taille.

1.2.2. Forme et taille des nodules



Photo 8. Quelques nodules actifs prélevés des racines de la luzerne (Gx3).

Les nodules observés sur le système racinaire des plantes examinées ont montré des variations la taille et de la forme.

Les nodules sont de type indéterminé indiquant la présence d’une zone méristématique à croissance continue (Vasse et *al.*, 1990). Ils sont de formes allongées et coralloïdes, formes typiques de la luzerne (Corby, 1981 ; Duhoux et Nicole, 2004).

La taille des nodules des plantes traitées, montre que la majorité est de grandes tailles.

1.2.3. Nodules actifs

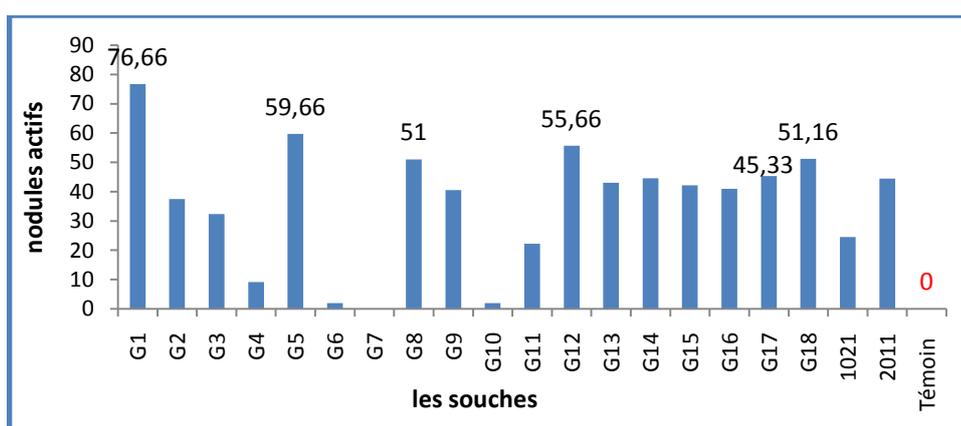


Figure 11. Nombre des nodules actifs en fonction des différentes souches examinées.

La figure, ci-dessus montre que nombre moyen des nodules actifs est égale à 36.25. Les souches qui un nombre élevé des nodules actifs sont les suivantes G1, G5, G12, G18, G8 et G17.

En comparaison avec les plantes inoculées les nodules des plantules témoins sont de couleur vert ou blanc, Cette couleur signifie que les nodules sont de type inactif.

L'estimation du nombre de nodules actifs ou inactifs est réalisée à travers la coloration de ces derniers (Duhoux et Nicole, 2004). Une couleur rouge ou rose indique la présence de la leghémoglobine signe de fixation active de l'azote.

Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Downie (2005) et Ott et *al* (2005). Les nodules des plants examinés ont présenté toute une couleur rose révélatrice de la présence de leghémoglobine, une hémoprotéine produite uniquement par les nodules fixateurs de l'azote.

1.2.4. Distribution des nodules

Les nodules sont présents sur les racines principales et secondaires. Ils sont répartis majoritairement au niveau des racines secondaires. Leur distribution s'est faite dans la partie inférieure et supérieure de système racinaire. Selon la FAO (1992), une nodulation très bien répartis sur les racines indique à la fois la présence d'un nombre élevé de rhizobium mais aussi de conditions du milieu favorable.

1.3. Estimation des corrélations entre les différents paramètres mesurés

Tableau 5. Corrélation entre la nodulation et les différents paramètres étudiés

Paramètres étudiés	Nombre totale des nodules	
	Coefficient de corrélation	Signification
Hauteur de la partie aérienne	$r = 0.517$	Forte corrélation
Longueur de la partie souterraine	$r = 0.849$	Très forte corrélation
Poids sec de la partie aérienne	$r = 0.280$	Faible corrélation
Poids sec de la partie souterraine	$r = 0.526$	Forte corrélation

Le tableau ci-dessus montre que la hauteur de la partie aérienne est liée fortement au nombre de nodules formés ($r = 0.517$). Bien que le coefficient de corrélation entre la longueur des racines est très fortement liée avec la nodulation ($r = 0.849$).

Le calcul du coefficient de corrélation montre qu'il existe une faible corrélation ($r = 0.280$) entre le poids sec de la partie aérienne des plantes et le nombre des nodules. Le poids sec de la partie souterraine est corrélé fortement avec la nodulation, le coefficient de corrélation (r) est égale à (0.526).

2. Effet des facteurs extrinsèques

2.1. Effet d'NaCl sur la croissance des souches étudiées

▪ Effet d'Na Cl à (1mM)

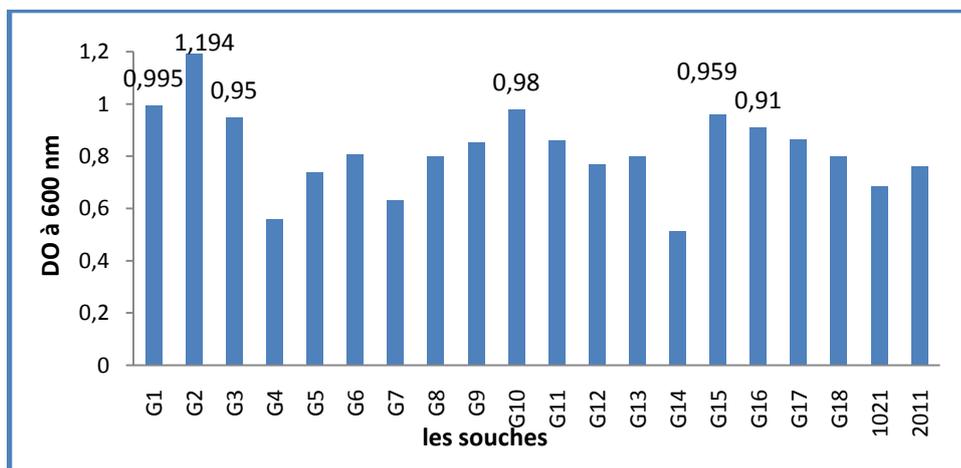


Figure 12. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 1mM.

Les résultats obtenus à la concentration 1mM d'NaCl montrent une croissance importante par rapport aux autres concentrations. Cette croissance est traduite par des DO élevées. Les souches qui présentent le meilleur développement sont les suivantes : G2, G1, G10, G15, G16 et G3 avec, respectivement, des DO égale à : DO= 1.194, 0.995, 0.980, 0.995, 0.910 et 0.950.

Celles qui présentent une croissance minimale sont les souches G14, G4, G7 et 1021.

Tableau 6. Croissance des souches sur milieu solide à 1mM d’NaCl.

souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011	
croissance	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ : Très bonne croissance

Sur milieu solide, la totalité des souches ont une prolifération importante en comparaison avec les autres concentrations en NaCl. Tout au long des striés d’ensemencement, des colonies très denses, parfois avec production d’exopolysaccharides.

▪ Effet d’Na Cl à (40mM)

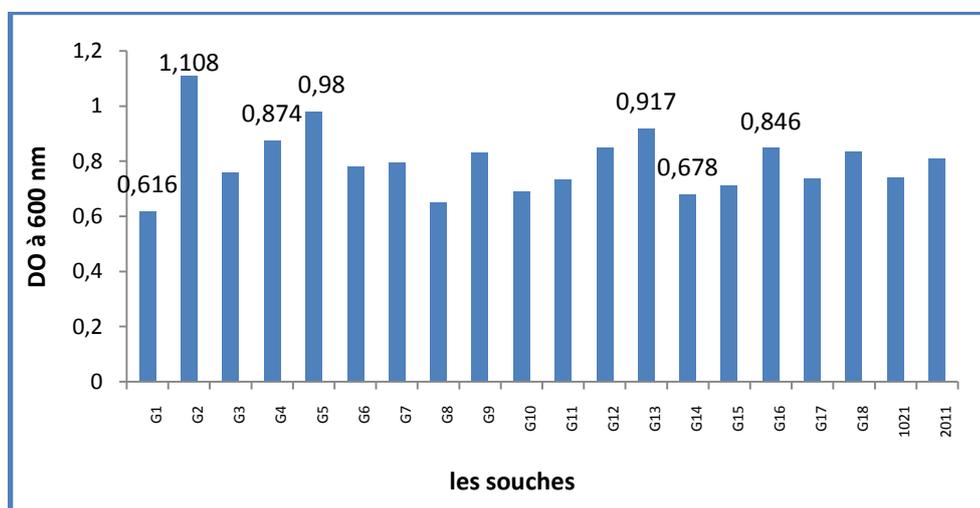


Figure 13. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 40Mm.

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 G2, G5, G13, G4, G12 et G16 (voir la figure 22), suivi par les souches G1, G8, G14 et G10.

Tableau 7. Croissance des souches sur milieu solide à 40mM d’NaCl.

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
Croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Bonne croissance

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

▪ Effet d’Na Cl à (80mM)

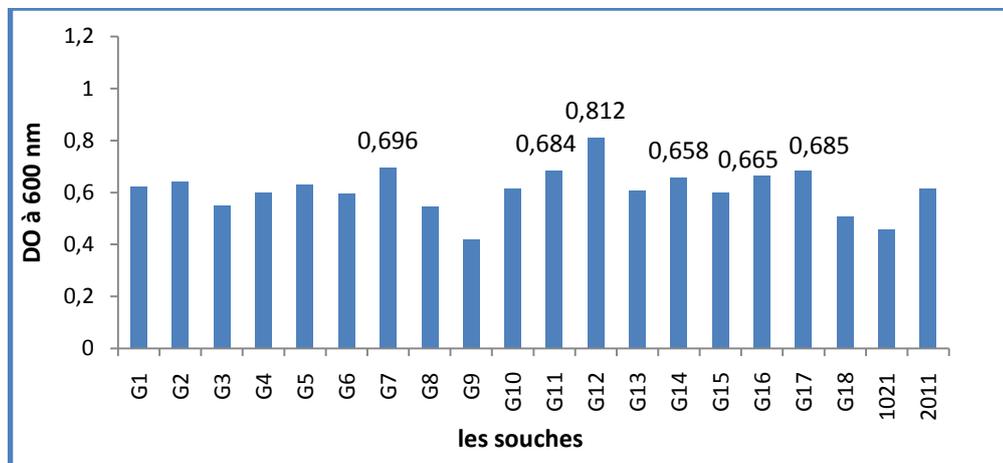


Figure 14. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 80mM d’NaCl.

Les résultats obtenus à la concentration 80 mM montrent une bonne croissance avec une DO moyenne de 0,60. L’optimum de croissance est présenté par les souches G12, G7, G11, G16, G14 et G17, alors que les faibles sont présentées par les souches G9, G19, G18 et G8.

Tableau 8. Croissance des souches sur milieu solide à 80Mm d’NaCl.

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Bonne croissance

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

▪ Effet d'NaCl à (160mM)

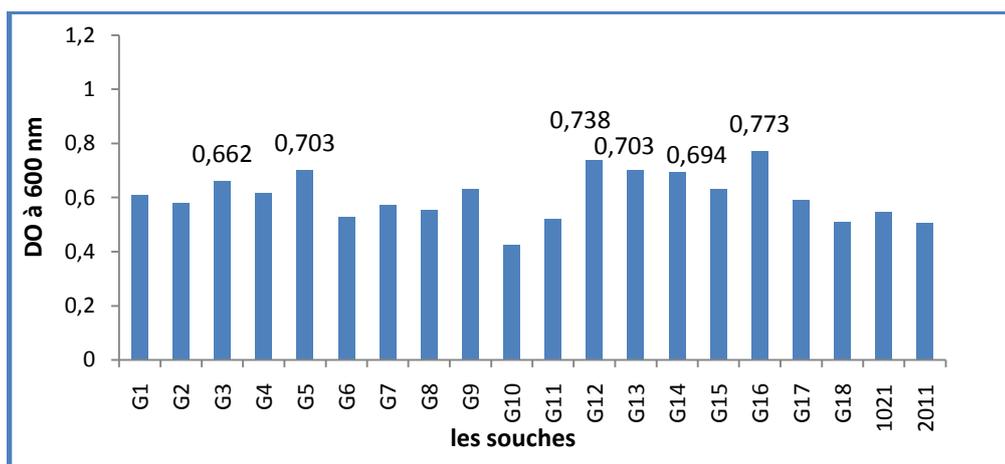


Figure 15. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 160Mm.

A travers les résultats qui nous avons obtenus, nous notons que la croissance à 160mM d'NaCl est égale à celle obtenue à 80 mM. Les meilleures densités optiques (0.773, 0.738, 0.703, 0.694, 0.662 et 0.703) présentées successivement par les souches (G16, G12, G5, G14, G3 et G13), la faible DO (0.425) présentée par la souche G10.

Tableau 9. Croissance des souches sur milieu solide à 160mM d'NaCl.

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Bonne croissance

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

▪ Effet d'NaCl à (320Mm)

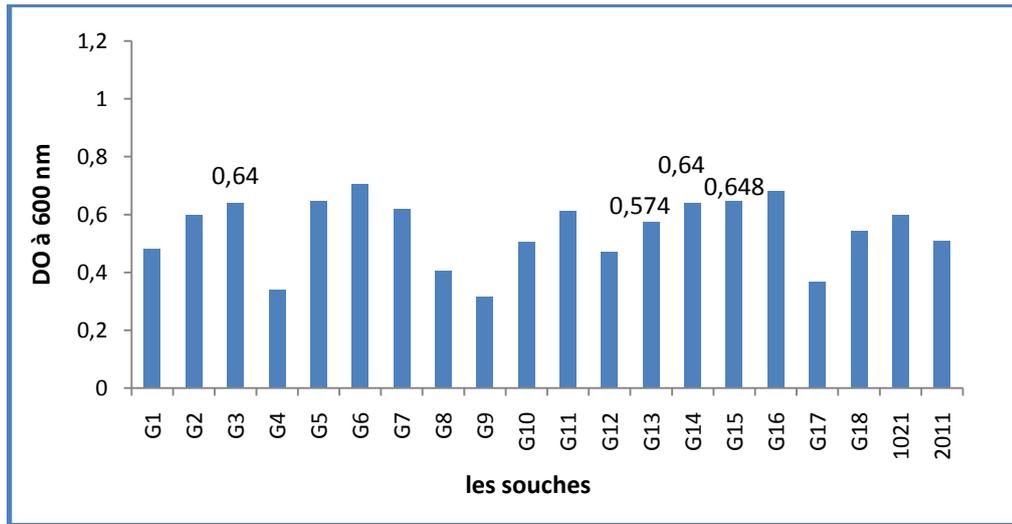


Figure 16. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 320Mm.

La croissance obtenue à cette concentration semble être affectée sensiblement par la salinité à 320 mM par rapport aux autres concentrations précédentes. La DO maximale, signe d'une meilleure croissance, (0.707, 0.681, 0.648 0.640, 0.648 et 0.640) présentée par les souches G6, G16, G15, G14, G5 et G3. La croissance minimale est enregistrée avec les souches G9, G4 et G17.

Tableau 10. Croissance des souches sur milieu solide à 320mM d'NaCl.

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: bonne croissance

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

Effet d'NaCl à (640mM)

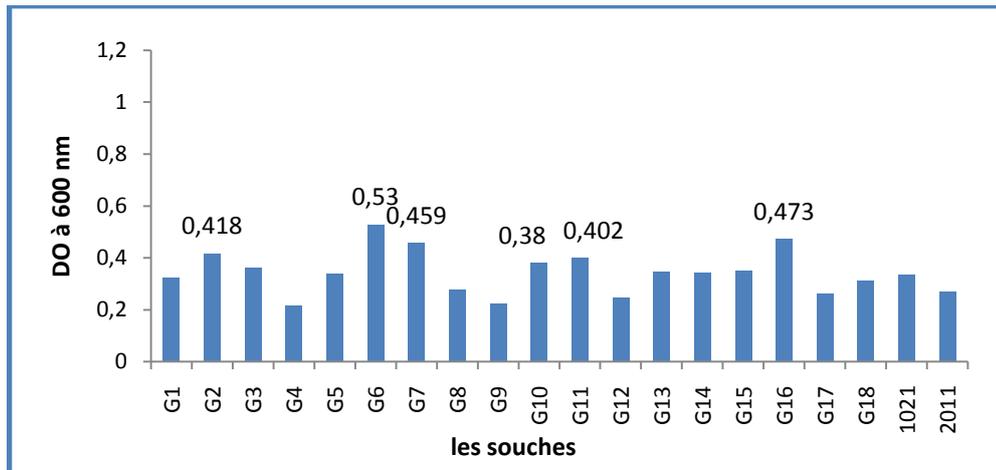


Figure 17. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 640mM.

Les résultats obtenus à la concentration 640 mM d'NaCl montrent que la croissance des souches est affectée par cette salinité élevée. La DO moyenne enregistrée est de 0,34. Les souches G6, G16, G7, G11, G10 et G2 sont les plus résistantes à l'élévation de la salinité alors que les plus sensibles sont les souches G4, G9, G12 et G17.

Tableau 11. Croissance des souches sur milieu solide à 640mM d'NaCl.

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
Croissance	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

± : faible croissance

Sur milieu solide, toutes les souches sont capables de croître d'une façon moins importante de celle trouvée à la concentration 320 d'NaCl.

Effet d'NaCl à (1280mM)

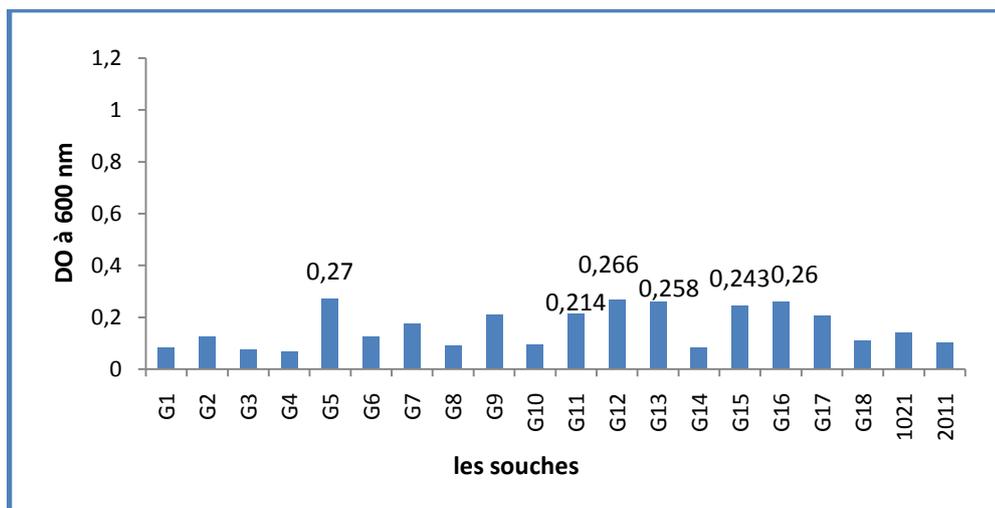


Figure 18. Effet de la salinité sur la croissance des souches à 1280mM.

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 0,15 seulement. Les souches G5, G12, G16, G13, G15 et G11 ont eu une certaine croissance mais reste très faible.

Tableau 12. Croissance des souches sur milieu solide à 1280mM d'NaCl.

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Aucune croissance

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

Discussion

Les résultats obtenus à partir de différentes concentration de NaCl montrent que jusqu'à une salinité de (640mM), la croissance des souches se fait mais à des degrés moindres à chaque augmentation. A la concentration de 1280mM, aucune croissance n'est observée pour la totalité des souches.

Par comparaison, nous observons que nos isolats sont plus halotolérants que les souches références (souche 1021 et souche 2011).

La tolérance à la salinité chez les rhizobiums varie d'une espèce à une autre (**Mandal, 2014**). D'après Zahran (2001), les souches de *Sinorhizobium meliloti* sont capables de résister à des concentrations de NaCl allant de 300 à 700 mM, ce qui confirme nos conclusions faites auparavant, où nous signalons que les souches étudiées ne sont pas trop affectées par la salinité jusqu'à des concentrations égales à 640 mM.

Mrabet et al. (2010), ont obtenu une bonne croissance (DO=0.7) à 684 mM et affirme que la croissance a révélé une diminution de la capacité de croissance provoquée par l'augmentation de la concentration en NaCl.

Beaucoup d'espèces bactériennes ainsi que les rhizobia s'adaptent aux concentrations élevées de sel par l'accumulation intracellulaire des osmolytes ; corps organique de faible poids moléculaire (Zahran, 1999) ; tels que des acides aminés comme la proline, la bétaine (et dérivés), l'ectoïne et le glutamate ou des carbohydrates comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Boncompagni *et al.*, 1999 ; Botsford et Lewis, 1990 ; Brhada *et al.*, 1997 ; Gouffi *et al.*, 1999).

2.2. Effet de la température sur la croissance des souches étudiées

▪ Effet de la température 4°C

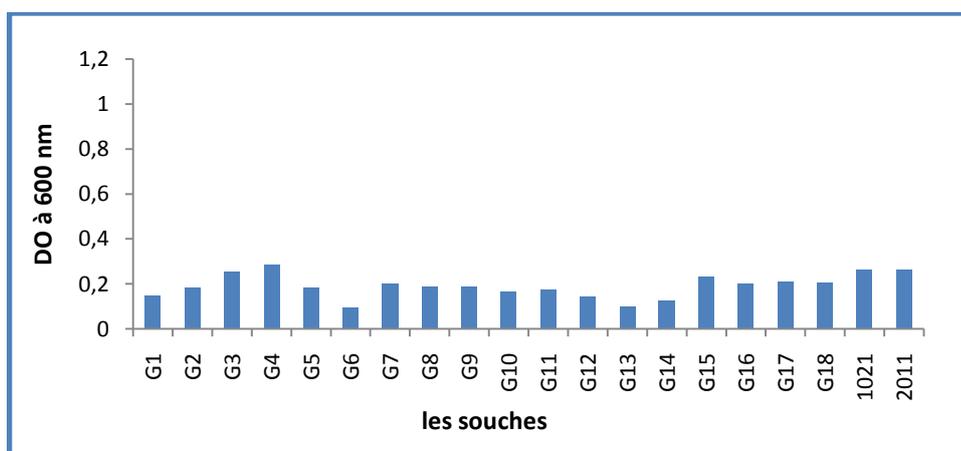


Figure 19. Effet de la température sur la croissance des souches à 4°C.

Les résultats que nous avons obtenus à la température 4°C, qui est la température de conservation des rhizobia, indiquent que la totalité des souches ont une très faible croissance.

Les DO restent très faibles après 72h d'incubation, avec une moyenne de DO= 0,19.

Tableau 13. Croissance des souches sur milieu solide à T = 4°C

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Aucune croissance

Sur le milieu solide, aucune souche n'a poussée, ce qui signifie que ces derniers ne tolèrent pas les basses températures.

▪ **Effet de la température 28°C**

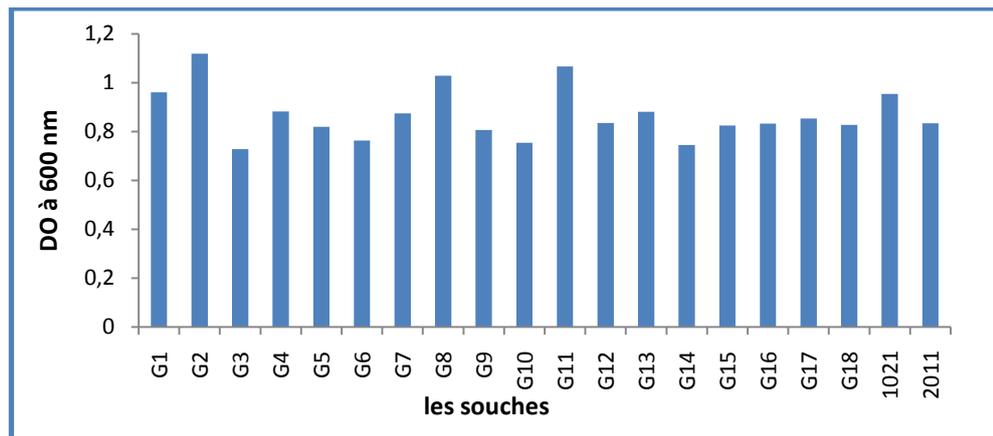


Figure 20. Effet de la température sur la croissance des souches à 28°C.

A une température de 28°C, qui est la température optimale pour la croissance des rhizobia, la totalité des souches ont montrés une croissance importante. Avec des DO élevées (1.119, 1.029, 1.067, 0.961, 0.883 et 0.954) présenté par les souches G2, G8, G11, G1, G4 et 1021. Alors que les DO faibles (0.728, 0.745, 0.754 et 0.764) présentées par les souches G3, G14, G10 et G6.

Tableau 14. Croissance des souches sur milieu solide à T = 28°C

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011	
croissance	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ : Très bonne croissance

Sur milieux solide, la croissance est importante et comparables à celui trouvé sur milieu liquide.

▪ **Effet de la température 37°C**

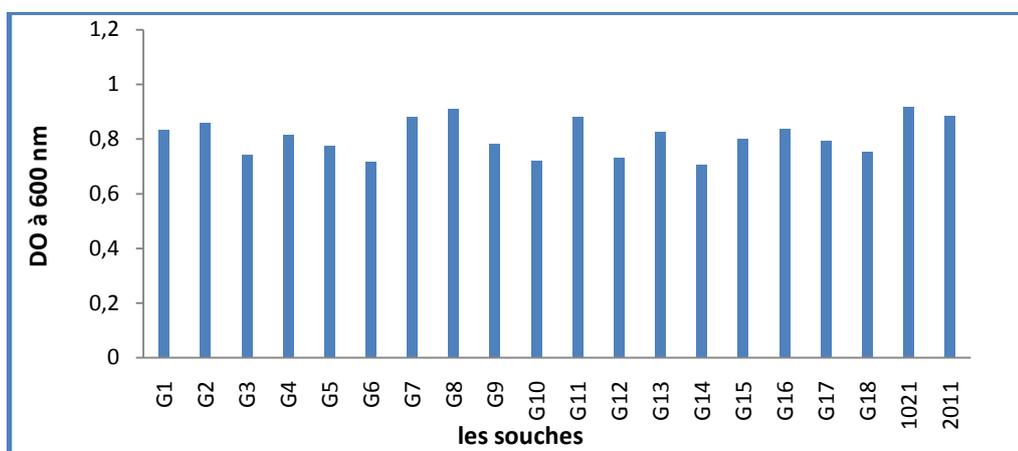


Figure 21. Effet de la température sur la croissance des souches à 37°C.

Nous remarquons que la souche qui présente les DO les plus élevées (0.917, 0.910, 0.883, 0.880, 0.879 et 0.860) sont G19, G8, G20, G7, G11 et G2, alors que les DO faibles (0.707, 0.730, 0.722 et 0.718) présentées par les souches G14, G12, G10 et G6.

Tableau 15. Croissance des souches sur milieu solide à T = 37°C

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : bonne croissance

Sur milieu solide, nous soulignons que la totalité des souches ont une meilleure croissance.

▪ Effet de la température 45°C

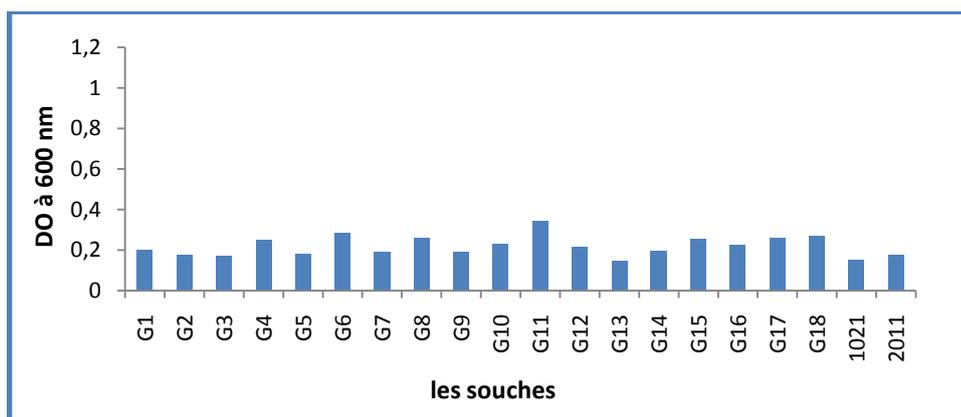


Figure 22. Effet de la température sur la croissance des souches à 45°C.

Concernant la température extrême 45°C, les souches introduites une DO élevées sont G11, G6, G18, G8, G17 et G15 avec respectivement (0.341, 0.282, 0.268 et 0.259, 0.259 et 0.251).

Tableau 16. Croissance des souches sur milieu solide à T = 45°C

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

± : faible croissance

Sur milieux solide la totalité des souches sont capables de croitre en quelques colonies visibles (2 à 40 colonies).

Discussion

La confirmation sur milieux solide montre que la plupart des souches sont capables de croître à une température allant de 28°C jusqu’à 45°C.

Les températures trop élevées (45°C) ralentissent fortement la croissance des souches. Seulement quelques colonies sont visibles sur milieu gélosé. Nos résultats vont avec ceux Bowen et Kennedy (1959); Diouf et al. (2000), qui ont constaté que plusieurs *Rhizobium* sont capables de pousser à des températures très élevées de 40°C à 45°C. Razanen et al. (2002), déterminent que les souches résistantes aux températures très élevées n’ont pas une bonne

capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermo-résistante est probablement reliée à la capacité des bactéries de survivre durant les périodes chaudes.

Dans l'intervalle de 28°C à 37°C, la croissance est optimale, comme l'ont décrit par Drouin *et al.* (2000), qui signalent que la température optimale de croissance des rhizobiums est comprise entre 28 et 31 ° C.

Aucune souche n'a poussé à 4°C ce qui signifie que ces souches ne tolèrent pas les basses températures.

Pour la thermo-tolérance, elle est très variable parmi les espèces et les souches de rhizobia (Sebbane *et al.*, 2004). Dans plusieurs organismes, l'apparition de thermo-tolérance a été corrélée avec la production des protéines hsp (heat shock proteins) (Michiels *et al.*, 1994).

2.3. Effet du pH sur la croissance des souches étudiées

- effet du pH=4

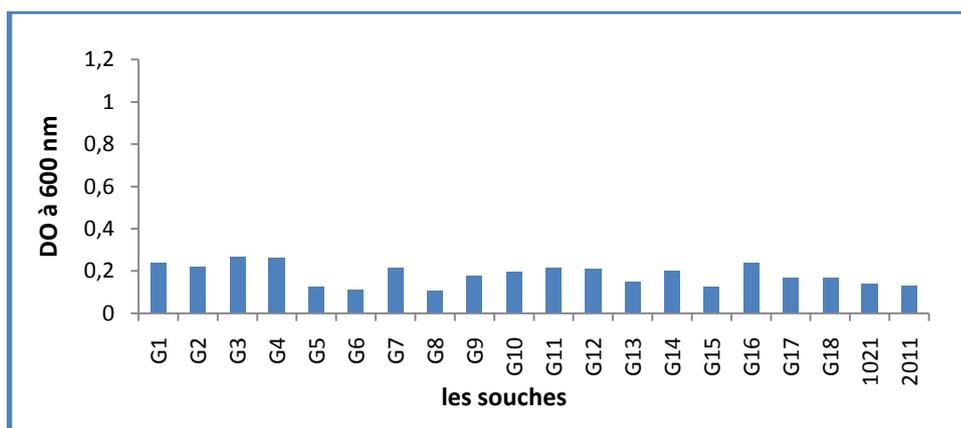


Figure 23. Effet du pH=4 sur la croissance des souches étudiées.

Les résultats obtenus au pH 4 montrent que les souches ont une très faible croissance avec une DO moyenne égale à 0,18. Les valeurs de DO les plus importantes sont présentées par les souches (G3, G4, G16, G1, G7 et G2).

Tableau 17. Croissance des souches sur milieu solide à pH = 4

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±	±	±	-	±	-	-	-

- : Aucune croissance

± : faible croissance

Sur milieu solide, la plus part des souches étudiées ne montrent aucune croissance. Six souches seulement ont pu croître et former des colonies visibles.

▪ Effet du pH=5

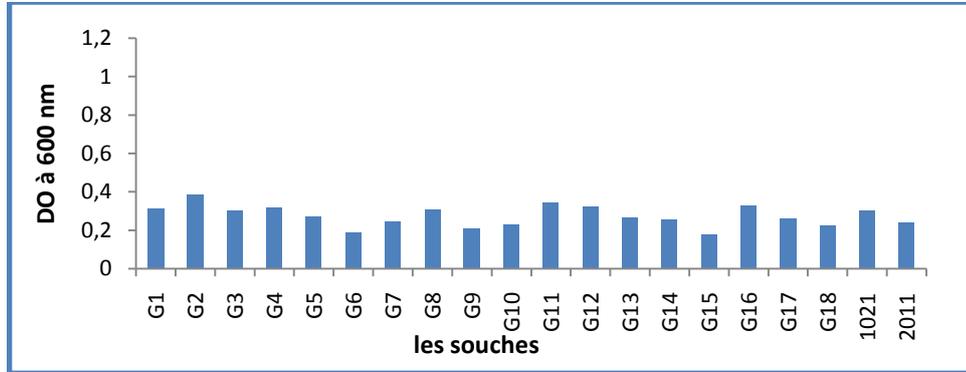


Figure 24: Effet du pH=5 sur la croissance des souches étudiées.

Les résultats que nous avons obtenus au pH= 5 montrent que la plupart des souches ont une faible croissance. Avec une DO moyen égale à 0.275. Les souches G2, G11, G16, G12, G4 et G1 présentent les DO élevées (0.388, 0.340, 0.329, 0.322, 0.317 et 0.314).

Tableau 18. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 5

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	±	+	-	-	-

± : faible croissance

+ : Bonne croissance

Sur milieu solide, la totalité des souches ont cru, et des colonies bien visibles sont observées.

▪ Effet de pH=6

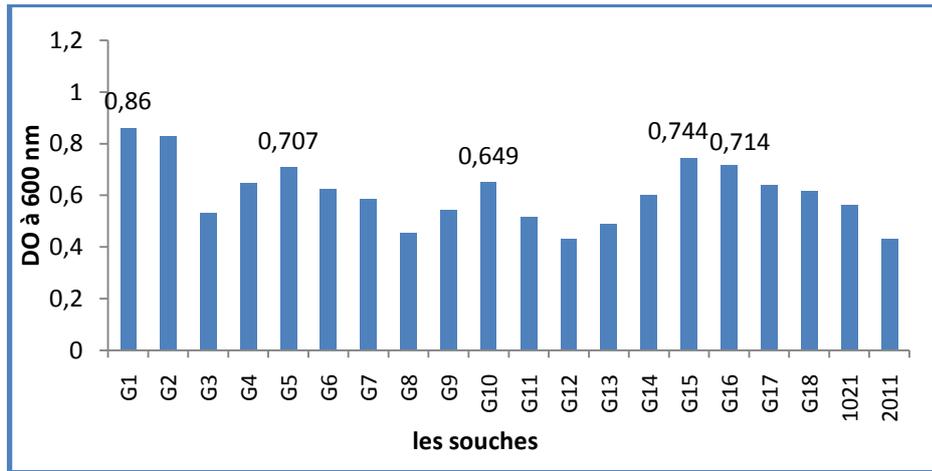


Figure 25. Effet du pH=6 sur la croissance des souches étudiées.

Au pH= 6, nous avons enregistré que la totalité des souches ont une bonne croissance. La figure 36 montre que les souches ayant une DO élevée sont G1, G2, G15, G16, G5 et G10.

Tableau 19. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 6.

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Bonne croissance

Les résultats obtenus sur milieu solide montrent que l'ensemble des souches ont un développement plus ou moins important.

▪ Effet de pH=6.8

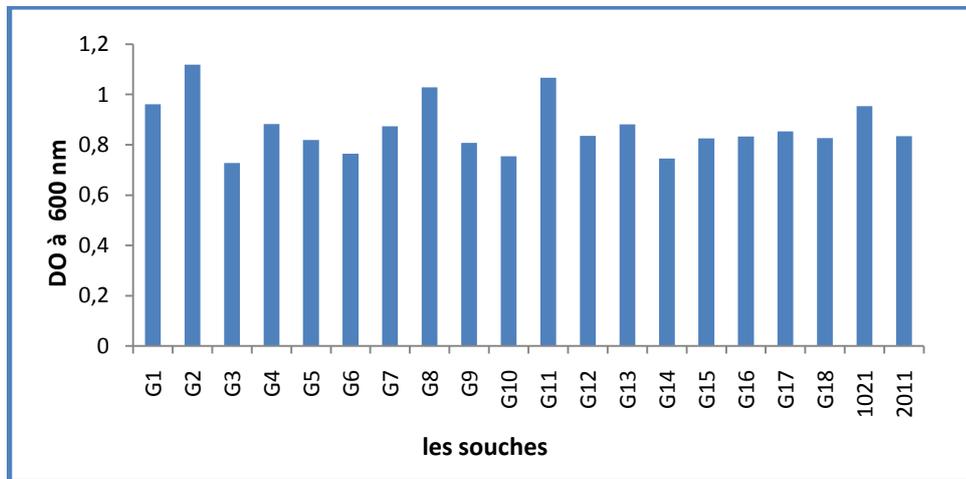


Figure 26. Effet du pH=6.8 sur la croissance des souches étudiées.

Nous avons remarqué à pH = 6.8 un optimum de croissance de toutes les souches testées. Les plus performantes sont G2, G8, G11, G1, G4 et 19, alors que les moins performantes sont les souches G3, G14, G10 et G6.

Tableau 20. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 6.8

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011	
croissance	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ : Très bonne croissance

Sur milieux solide, toutes les souches ont une meilleure croissance par rapport aux autres pH.

▪ Effet de pH=8

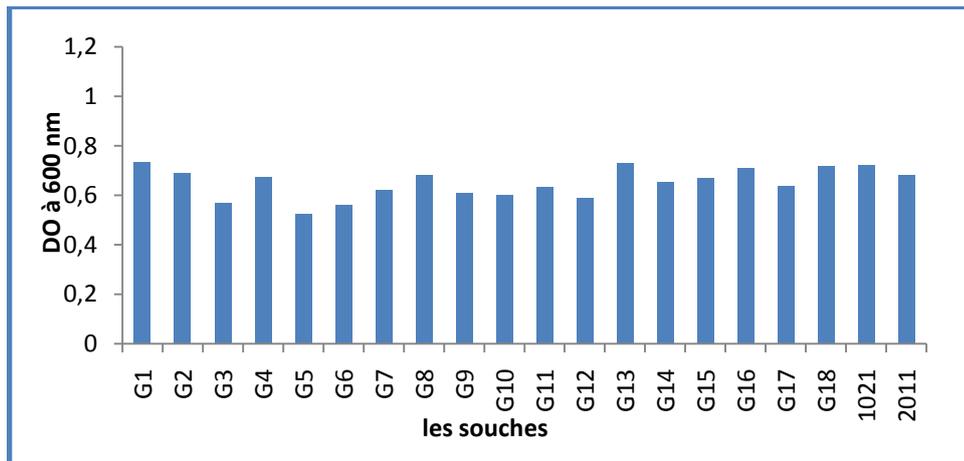


Figure 27. Effet du pH=8 sur la croissance des souches étudiées.

Les résultats exprimés par le pH=8 montrent qu’il y’a un développement remarquable de toutes les souches. Les souches G1 G13 G16 G8 G2 et 1021 ont eu les meilleures croissances, alors que les plus faibles sont les souches G5, G6, G3et G12.

Tableau 21. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 8

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Bonne croissance

L’évaluation des souches à pH=8 sur milieu solide, montre qu’elles ont toutes une bonne croissance.

▪ Effet de pH=9

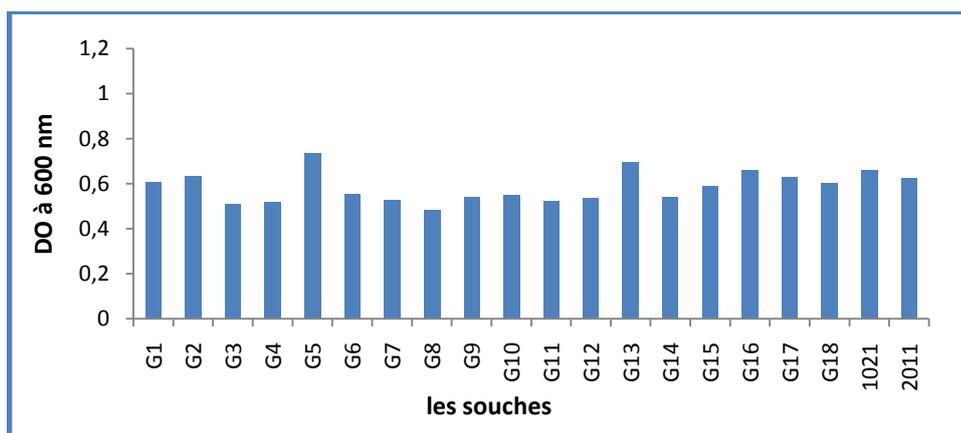


Figure 28. Effet du pH=9 sur la croissance des souches étudiées.

Les résultats obtenus au pH= 9 montrent des croissances comparables à celle de pH=8. Les meilleures sont celles des souches G5, G13, G16, G17, G2 et la souche 1021, alors que les souches G8 G3 G4 et G11 ont les faibles croissances.

Tableau 22. Croissance des souches sur milieu solide au pH= 9

Souches	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	1021	2011
croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Bonne croissance

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

Discussion

Il ressort du test de l’effet du pH sur la croissance et le développement des souches que la majorité est incapable de pousser à pH 4. Alors que, la totalité des souches sont capable de croitre à pH 5 jusqu’à pH 9, avec un optimum de croissance de toutes les souches testées se situant entre pH 6 et 6.8, ce qui indique que les souches testées de rhizobia sont neutrophiles.

Les mêmes résultats sont obtenus par Ali *et al.* (2009), avec des isolats de différentes légumineuses poussant dans la région semi-aride de l’Inde. L’acidité du sol limite la fixation symbiotique de l’azote par limitation de la survie du *Rhizobium* et sa persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation (Appunu et Dhar, 2006).

Selon Zahran (2012), les Rhizobiums isolés en Egypte croissent à un pH allant de 6 à 8 avec un certain pouvoir de tolérer un pH acide allant de 3.5.to 4,0.

En générale, les rhizobia sont des bactéries neutrophiles, cependant leur pH optimal de croissance peut varier (el-hilali, 2006).

3. La résistance intrinsèque aux antibiotiques

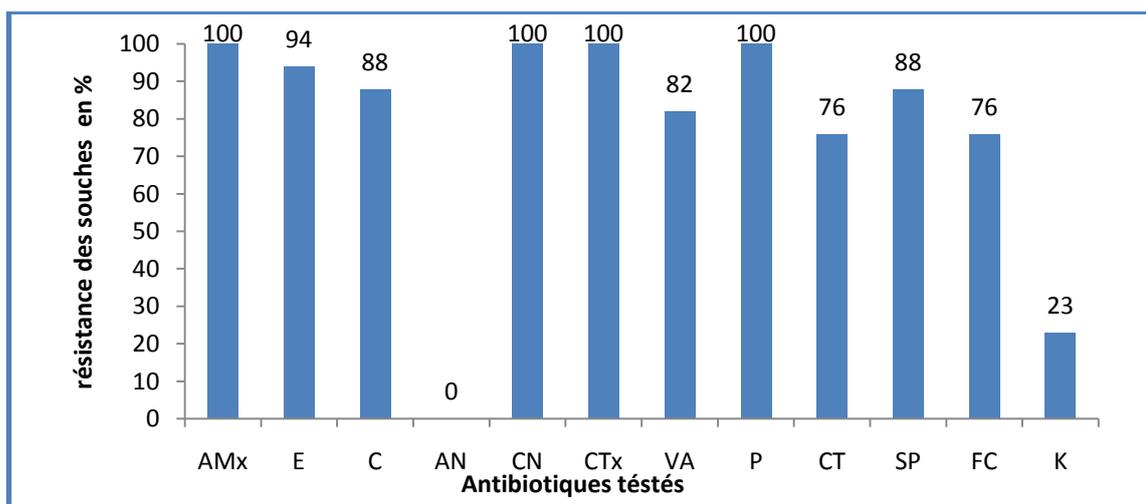


Figure 29. La résistance des souches aux différents antibiotiques testés.

Les tests d'antibiogrammes ont permis d'établir le spectre de résistance de chacune des souches à 12 antibiotiques sélectionnés arbitrairement.

Les résultats indiquent que les souches montrent des réponses variables aux différents antibiotiques testés. La résistance révèle que toutes les souches sont sensibles aux AN, CT (excepté la souche G2), K (excepté G3, G4, G17 et G19). Par contre, elles se comportent différemment vis-à-vis des autres antibiotiques testés. De fortes résistances de (100%) ont été notées avec l'AMx, CTx, P et le CN, suivies par le E avec (94%), le C et le SP avec (88%), le VA avec (82%) et enfin le CT et le FC avec (76%).

Par comparaison, nous avons remarqué que nos souches sont plus résistantes aux antibiotiques que les souches de références sauf pour G5, G7 et G8.

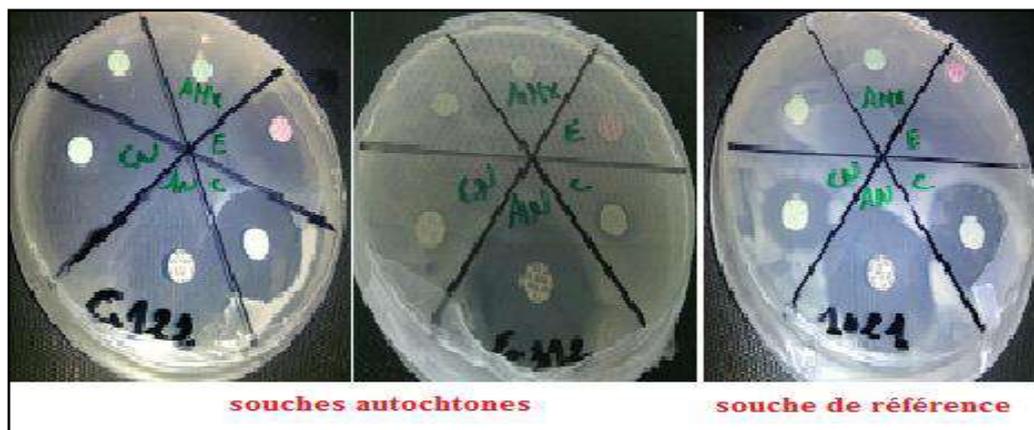


Photo 9. Exemple de résistance et de sensibilité de quelques souches aux différents antibiotiques étudiés.

Les antibiotiques agissent globalement sur les enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) et sur la synthèse des protéines et des acides nucléiques par des mécanismes spécifiques (Karanja et Wood, 1988). Le mode d'action de ces molécules varie en fonction du type de l'antibiotique (Graham, 1963).

Maatallah et *al.* (2002) ont eu des résultats qui ne sont pas toujours en adéquation avec les autres, ce qui témoigne de la grande diversité des Sinorhizobiums par rapport à leur milieu de provenance. Ils montrent que les souches sont résistantes au kanamycine alors que les autres ne le sont pas. Aussi, les résultats de Batzli et *al.* (1992) présentent des souches avec une grande tolérance au chloramphénicol et nos résultats montrent le contraire.

La Pénicilline est connue pour son empêchement à la formation de la paroi cellulaire surtout chez les Gram- (Stanier et *al.*, 1976). Malgré ça, nos souches se sont toutes montrées résistantes à la pénicilline, rejoignant ainsi les conclusions de Young et Chao (1989) qui énoncent que les *rhizobiums* à croissance rapide et ceux à croissance lente, sont extrêmement résistants à la pénicilline.

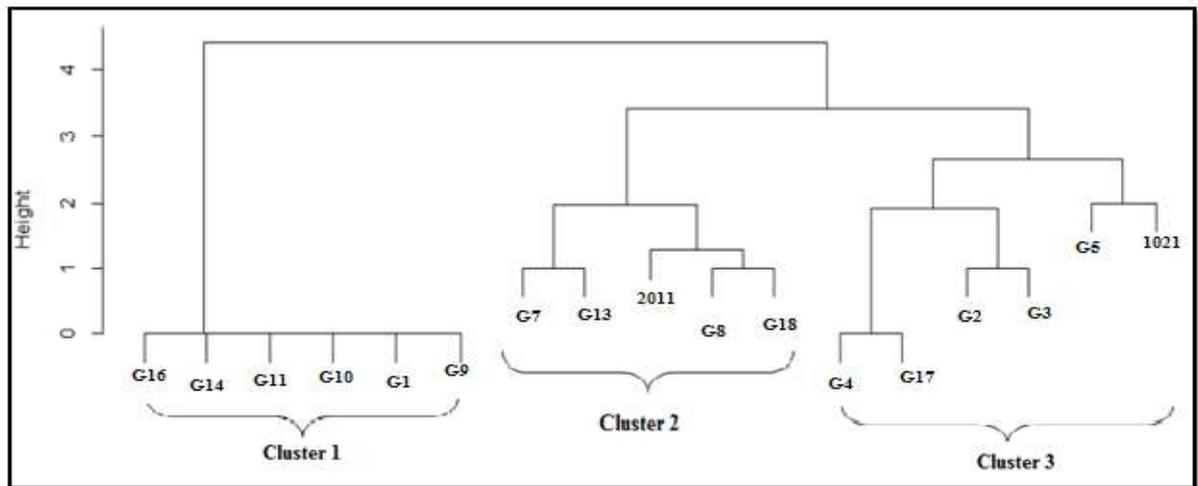


Figure 30. Dendrogramme représentant les regroupements des souches étudiées en fonction de leurs résistances aux antibiotiques testés.

Le dendrogramme montre que les souches étudiées sont classées en trois groupes selon leurs réponses vis-à-vis des antibiotiques utilisés. Chaque groupe montre que les souches qui lui appartiennent montrent des similitudes entre elles. Des différences très marquées sont observées entre les groupes. Le premier est composé de 6 souches ayant les mêmes réponses faces aux antibiotiques, le second cinq souches et enfin le dernier avec six souches.

Tableau 23.Sélection les souches les plus efficaces par rapport aux paramètres étudiées.

Les paramètres		Les souches						
Test symbiotique	croissance végétale	Hauteur de la P.A	G12	G9	G1	G15	G16	G5
		Longueur de la P.S	G1	G5	G8	G15	G12	G2
		Poids sec de la P.A	G2	G1	G15	G16	G5	G12
		Poids sec de la P. A	G1	G8	G2	G11	G9	G13
	nodulation	Nombre total des nodules	G1	G5	G12	G18	G7	G8
		Nodules actifs	G1	G5	G12	G18	G8	G17
Les facteurs extrinsèques	Température	4°C	G4	2011	1021	G3	G17	G15
		28°C	G2	G8	G11	G1	G4	1021
		37°C	1021	G8	2011	G7	G11	G2
		45°C	G11	G6	G18	G8	G17	G15
	NaCl	0mM	G2	G1	G10	G15	G16	G3
		40mM	G2	G5	G13	G4	G12	G16
		80mM	G12	G7	G11	G16	G14	G17
		160mM	G16	G12	G5	G14	G3	G13
		320mM	G6	G16	G15	G14	G5	G3
		640mM	G6	G16	G7	G11	G10	G2
		1280mM	G5	G12	G16	G13	G15	G11
	pH	PH=4	G3	G4	G16	G1	G7	G2
		PH=5	G2	G11	G16	G12	G4	G1
		PH=6	G1	G2	G15	G16	G5	G10
		PH=6,8	G2	G8	G11	G1	G4	1021
		PH=8	G1	G13	G16	G8	G2	1021
		PH=9	G5	G13	G16	G17	G2	1021
	Facteur intrinsèque	Amx	Toutes les souches sont résistantes.					
VA		Toutes les souches sont résistance sauf G2, G3 et G8.						
K		Toutes les souches sont sensibles sauf G3, G4, G17 et la souche 1021.						
P		Toutes les souches sont résistantes.						
FA		Toutes les souches sont résistance sauf G7, G8, G13 et G18.						
SP		Toutes les souches sont résistances sauf G7 et 1021.						
CTx		Toutes les souches sont résistantes.						
E		Toutes les souches sont résistantes sauf G5.						
C		Toutes les souches sont résistantes sauf G5 et 1021.						
CN		Toutes les souches sont résistantes.						
AN		Toutes les souches sont sensibles.						
CS	Toutes les souches résistance sauf G8, G18, 1021 et 2011.							

Pour l'interprétation du tableau ci-dessus, nous nous sommes basés sur le nombre de répétitions de chaque souche par rapport au paramètre étudié, c'est-à-dire que les souches ayant le plus de présence sont considérées comme les plus efficaces car elles donnent toujours les meilleurs résultats.

Les résultats du tableau montrent que les souches les plus efficaces sont respectivement: G16 (24 présences), G2 (23 présences), G1 (22 présences) et G12 (20 présences).

Ces souches sélectionnées comme étant efficaces, peuvent constituer de bonnes candidates pour de futures campagnes d'inoculation de la luzerne dans les sols sahariens car :

- La souche G1 a conduit à une bonne croissance végétale et une nodulation importante. Elle croit bien aux températures moyennes et moyennement aux températures élevées. Elle se montre sensible aux élévations de salinité, mais performante aux salinités basses. Elle est largement résistante aux variations pH. Le pourcentage de sa résistance aux antibiotiques est égal à 66%.
- La souche G2 semble avoir provoquée chez les plantes qu'elle a nodulé un développement racinaire très important, une masse sèche élevée de la partie aérienne. Elle se montre très tolérante aux salinités mêmes élevées (de 0mM à 640mM), résistante à une large gamme de pH allant de 4 à 9. Sa résistance aux antibiotiques est importante avec un taux de 66%. Par rapport aux températures élevées, elle montre une croissance remarquable à 37°C.
- La souche G16 résiste à une large gamme d'NaCl de 0mM jusqu'à 1280 mM. nous la trouvés aussi au pH acide, neutre et alcalin. Le pourcentage de résistance de cette souche aux antibiotiques est de 83%. Par rapport à la température, elle montre une croissance moyenne.
- La souche G15 marque une très forte tolérance à la salinité, peut se développer à un pH légèrement acide (pH= 6) et elle peut tolérer à des fortes températures mais avec une croissance très faible.

Conclusion

Conclusion

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluantes et qui permettent de réduire l'usage d'engrais notamment riches en azote, a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote. En effet, la reconnaissance de l'importance de la symbiose rhizobia –légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

Une bonne efficacité des rhizobia est le premier critère à retenir pour les sélectionner dans la perspective de préparer d'un inoculum efficace.

À travers les résultats obtenus, nous remarquons que la totalité des souches testées ont formé des nodules actifs sur la racine de la luzerne. La moyenne de nodulation des plantes inoculées est égale à 21,76 nodules. La souche la plus efficace parmi celles de la collection est la G1 avec une moyenne de nodulation de 45.66 nodules/plante.

Une corrélation positive est remarquée entre les différents paramètres étudiés (la longueur des racines, la hauteur de la partie aérienne, le poids sec racinaire et aérienne) et la nodulation. A travers le test phénotypique, nous remarquons qu'il y a une grande diversité entre les souches de la collection.

Face aux variations de salinité, les résultats obtenus à partir de différentes concentrations d'NaCl montrent que jusqu'à 640mM, la croissance des souches se fait mais à des degrés moindres à chaque augmentation. A la concentration de 1280mM, aucune croissance n'est observée pour la totalité des souches. , nous observons que nos isolats sont plus halotolérants que les souches références (souche 1021 et souche 2011).

L'étude de l'effet des variations de températures sur la croissance des souches montre qu'elles sont capables de croître à une température allant de 28°C jusqu'à 45°C. Les températures trop élevées (45°C) ralentissent fortement la croissance des souches. Seulement quelques colonies sont visibles sur milieu gélosé.

Dans l'intervalle de 28°C à 37°C, la croissance est optimale. Aucune souche n'a poussé à 4°C ce qui signifie que ces souches ne tolèrent pas les basses températures.

Il ressort du test de l'effet du pH sur la croissance et le développement des souches que la majorité est incapable de pousser à pH 4. Alors que, la totalité des souches sont capable de croître à pH 5 jusqu'à pH 9, avec un optimum de croissance de toutes les souches testées se situant entre pH 6 et 6.8, ce qui indique que les souches testées de rhizobia sont neutrophiles.

Les tests d'antibiogrammes ont permis d'établir le spectre de résistance de chacune des souches à 12 antibiotiques sélectionnés arbitrairement.

Les résultats indiquent que les souches montrent des réponses variables aux différents antibiotiques testés. La résistance révèle que toutes les souches sont sensibles aux AN, CT (excepté la souche G2), K (excepté G3, G4, G17 et G19). Par contre, elles se comportent différemment vis-à-vis des autres antibiotiques testés. De fortes résistances de (100%) ont été notées avec l'AMx, CTx, P et le CN, suivies par le E avec (94%), le C et le SP avec (88%), le VA avec (82) et enfin le CT et le FC avec (76%).

Notre étude nous a aussi permis de sélectionner les souches les plus performantes à partir de différentes conditions. Quatre souches sont choisies, à savoir G1, G2, G16 et G15. Elles présentent les meilleurs résultats par rapport aux autres souches de la collection.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- Aguirreolea J et Sanchez-Dýaz M., 1989. CO₂ evolution by nodulated roots in *Medicago sativa* L. under water stress. *Journal Plant Physiol* .134: 598-602
- Akhtar F., Bashir M., Baig W., Zahoor Z., Shujaat N., Humayun E., Bad-e-Saba J., Azam H., Rehman M.M., Jadoon M.J, Abdulmalik A ., Ullah Z., Gul S., Mallick M.S., Qazi I.H., 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*. Volume 11, Issue 1. PP 77-84.
- Azib S., Attab S., Cheloufi H., 19-30 Octobre 2013. La nodulation de *Medicago sativa* dans la région d'Ouargla : description et importance (Cas de l'exploitation de l'Université de Ouargla). Séminaire International d'écologie microbienne. Béjaia- Algérie.
- Batzly J.M., Graves W.R., Vanberkum P., 1992. Diversity among Rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *Applied and environmental microbiology*. 58(7): 2137-2143
- Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993. *Practical Rhizobium- Legume Technology Manual*. ICARDA. Syria.
- Bélangier E., 1998. Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium* sp. (*Oxytropis Arctobla*) souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.
- Bogusz D., Franche C., 1985. La fixation biologique de l'azote, l'orstom et les recherches fondamentales. N° 23059. 1-15pp.
- Boncompagni E.M., Osteras M.C., Poggi D., Le Rudulier., 1999. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family of rhizobiaceae and their roles in omoprotection. *Appl. Environ. Microbial*. 65: 2072-2077.
- Bordeleau L.M et Prevost D., 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*. 161:115-124.
- Botineau M., 2010. *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Ed. Tec&Doc. Paris. 613p.
- Botsford L et Lewis T., 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti* production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Env. Microbial*. 56: 488-494.
- Boulbaba L.T, Bouaziz S, Mainassara Z.A, Mokhtar H., Mokhtar L., 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. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. Tunis. Volume 13 (4) : 537-544.
- Bourion V., Laguerre G., Depret G., Voisin A.S., Salon C., Duc G ., 2007. Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Ann. Botany* n°100. pp589-598.

- Bowen G.D et Kennedy M.M., 1959. Effect of high soil temperatures on *Rhizobium* spp. QdJ. Sci. pp16-177.
- Brenner D.J., Kreig N.R., Staley J.T., 2005. Bergeys' manual of systematic bacteriology. vol2, 2nd. The proteobacteria. Part C :The alpha, beta, delta and epsilonproteobacteria. Springer. Berlin.
- Brewin N.J., 2004. Plant cell wall remodeling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Critical Reviews in Plant Sciences. 23: 293–316.
- Brewin N.J., Downie J.A., Young J.P.W., 1992. Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology, M.R Josha Lederberg. Rockefeller University. New York .volume 3. PP 239-248.
- Brewin Nicholas J. 1991. Development of the legume root nodule. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 7: 191–226.
- Brhada F., Poggi M.C., D. Le Rudulier., 1997. Choline and Glycine betaine uptake in various strains of *Rhizobia* isolated from nodules of *Vicia faba* and *Cicer arietinum* L. : Modulation by salt, choline and glycine betaine. Current Microbial. 34: 167-172.
- Broughton W. J., Jabbouri S., Perret X., 2000. Keys to Symbiotic Harmony. Journal of Bacteriology. 182(20): 5641-5652.
- Camille M., 1980. "Fourrages". Ed. La maison rustique. Paris.302 p.
- Cavaillès E., 2009. La relance des légumineuses dans le cadre d'un plan protéine : Quels bénéfices environnementaux ?. Etudes et documents n°15. 5p.
- Chaby R., 2010. Des endotoxines au lipopolysaccharides structures, activités cellulaires et effets physiopathologiques. Ed. Tec&Doc. Paris. 369 p.
- Collavino M., Riccillo P.M., Grasso D.H., Crespi M., Aguilar O.M., 2005. GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but is dispensable for the *Sinorhizobium meliloti* - Alfalfa symbiotic interaction. Mol Plant Microbe Interact. 18:742-750.
- Cordy H.H.L., 1981.The systematic value of leguminous root nodules. In Polhil R.M et Raven P.H. (Eds). Advances in legume Systematic. Part2. pp657-669.
- Courtin J.P., 2012. L'homme et les lois de la nature. Précis de culture générale scientifique., Tome 2. France. 80 p.
- Courtin J.P., 2012. L'homme et les lois de la nature. Précis de culture générale scientifique. Tome 2. France.80 p.
- Crossman L.C., 2004: Plasmid replicons of *Rhizobium*. Biochemical Society Transactions. Volume 33, part 1. pp157-158.

- Cumo C., 2013. Encyclopedia of cultivated plants from acacia to zinnia. Volume I:A-F. California. 9p.
- Dajoz R., 2012. L'évolution biologique au XXI^e siècle, les faits, les théories. Ed Lavoisier. Paris. 40p.
- Davet P., 1996. vie microbienne du sol et production végétale. Ed INRA. Paris. 147 p.
- Day D.A., Poole P.S., Tyerman S.D., Rosendahl L., 2001. Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. Cellular and Molecular Life Sciences. 58: 61–71.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kersters K., Gillis M., 1994. Polyphonic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb.nov., *Sinorhizobium sahelisp*.nov and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 44:715-733.
- Denarie J., 2000. Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8^{ème} conférence de l'Université de tous les savoirs des plantes fourragères et à gazon. Ed INRA. Paris. 13p.
- Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I., Newton W.E., 2008. Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Ed. Springer. USA. 155p.
- Diouf A., De Lajudie P., Neyra M., Kersters K., Gillis M., Martinez-Romero E., Gueye M., 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50 : 159–170.
- Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G., 1999. Les arbres fixateurs de l'azote caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulier aux zones subhumides et arides .Ed . CIRAD, Edition Espaces, FAO .IR. Montpellier. France. 499p.
- Downie J.A., 2005. Legume Haemoglobins: Symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. Current Biology. 15: 196-198.
- Doyle J.J et Luckow M.A., 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physio. 131 : 900–910.
- Drevon J.J., SIFI B., 2003. Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le bassin méditerranéen. Ed INRA. Paris.
- Drouin P., Prévost D., Antoun H., 2000. Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. FEMS Microbiology Ecology. 32:111-120.
- Duhoux E. et Nicole M., 2004. Atlas de biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes à fleurs. Ed. Dunod. Paris. 166 p.

- Dupuy Y. et Nougier P., 2005. Les micro-organismes : du gène à la biosphère. Ed.Ellipses. Paris. 256p.
- EL -Boutahiri 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. *Bio Med Central Microbiology*. pp1-13.
- El-Hilali I., 2006. La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des micro symbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupins luteus*. Thèse de doctorat. Université Mohammed – AGDAL .Faculté des sciences. Rabat.
- FAO., 1992. Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse-rhizobium. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome. 185 p.
- Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M.H., Lin Y.H., Reid D.E., Gresshoff P.M., 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52: 61–76.
- Fleurentin J., 2004. Guérisseurs et plates médicinales du Yémen, au pays de l'encens, de l'aloès et du café. Ed Karthala, Paris. 156 p.
- Fleuriet A ; Allemand C-J ; Macheix J-J. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. 103p.
- François J., Gaudry M., 1997. Assimilation de l'azote chez les plantes ; aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Ed INRA. Paris.
- Frederic Z., Lajudie De P., 2006. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses(BNL). *Canadian Journal of Microbiology*. Volume 52(3):169-181.
- Gage D.J., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during Acclimation of white lupine to phosphorus deficiency involved enhanced expression of genes advances .24: 382-388.
- George M., Garrity D., Boone R., Richarad W., 2005. Bergy's manual of systematic bacteriology. VolumaII.2^{ème} Ed .Library of Congress.
- Georges B.J, Raven P.H, Mason k.A., Losos J.B, Singer S.R., 2011. Biologie. Ed. De boeck. Paris .793p.
- Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C., 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*. 42: PP 413–441.
- Gobat J.M., Aragno M., Matthey W., 2010. Les sols vivant, bases de pédologie-biologie des sols. 3^{ème} ed. Italie. 126p.

- Gouffi K., N. Pica, V. Pichereau, and C. Blanco., 1999. Disaccharides as a new class of non accumulating osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 65:1491-1500.
- Graham P. H., 1963. Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria. Aust. J. Biol. Sci. 16:557-559.
- Griffon M., 2013. Qu'est ce que l'agriculture écologiquement intensive ?. Ed. Quae. France .93p.
- Hamom S., 2001. Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes. Ed. IRD. Paris. 657p.
- Hireche Y., 2006 : Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère. Batna
- Hirsch A. M., Michelle R.L., Downie A. J, 2001. What makes the rhizobia. Legume symbiosis so special?. Plant Physiol. Vol 127: pp 1484-1492.
- Hopkins W.G., 2000. Physiologie végétale. Ed De Boeck. Paris. 101p.
- Karanja N. K et Wood.M., 1988. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya. Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. Plant Soil. 112, 15-22.
- Kinkema M., Scott P.T., Gresshoff M., 2006. Legume nodulation: successful symbiosis through short and long distance signaling. Func. Plant Biol. 33:707-721.
- Krichnan H.B. et Bennett J.O., 2007. Rhizobia that are important for nodulation. In: Gnanamanickam S.S. (Ed): Plant-Associated Bacteria. Springer. pp 57-104.
- Krishnan H.B et Bennett J.O., 2007. Rhizobium-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. In: Gnanamanickam S.S. (Ed): Plant-Associated Bacteria. Springer. pp57-104.
- Laguerre G., Depert G., Bourion V., Duc G., 2007. Rhizobium *leguminosararum* bv.viciae geno-types interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. New phytologist. 176:680-690.
- LAZREK F., BEN FRIHA., 2008. Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin.
- Lioret L ., Ormeno-Orrilo E ., Rincon R et al ., 2007. *Ensifer mexicanus* sp .nov .a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico.Syst Appl Microbiol . 30:280-290.
- Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. Agronomie. 22: 321–329.

Machrafi Y., 2001. Inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.

Madigan M., Martink J., 2007. Brock Biologie des microorganismes. Ed Person Education. France. pp 599-601, 676-681.

Margaret P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset AE., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondorosi E., 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103: 5230–5235.

Marinoff M.A., Zago G. L., Pzocik H. J., Chifa C., Giménez M. C., 2005. Contribucion al concimiento de la actividad farmacologia de *Medicago sativa* L. (Fabaceae) « alfalfa ». Comunicaciones Cientificas Y Tecnologicas . Universidad Nacional Del Nordeste. Fernández n° 755. pp1-3.

Mendal H.K., 2014. Isolation of salt tolerant strains of Rhizobium trifoli. International Journal of Agriculture and Food Technolohy.5 (4):325-332.

Merabet C., Martens M., Mahdhi M et al., 2010. Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. Int JSyst Evol Microbiol. 60:664-674.

Michiels J.C. Verreth and Vanderleyden J., 1994. Effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains. Appl Environ Microbiol. 60:1206-1212.

Mille G., Louppe D., 2015. Mémento du forestier tropical. Ed. Quea. France. 352p.

Mille G., Louppe D., 2015. Mémento du forestier tropical. Ed. Quea. France. 352p.

Montuelle B., 2003. Qualité et gestion des sédiments d'eau douce. éléments physico-chimiques et biologiques. Ed. cemagref.

Moschetti G., Peluso A., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., Defez R., 2005. Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of Rhizobium *leguminosarum* biovar *viciae*. Syst Appl Microbiol. 28(7): 619-631.

Moulin L., Giraud E., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C., Jaubert M., Simon D., Cartieaux F., Prin Y., Bena G., Hannibal L., Fardoux J., Kojadinovic M., Vuillet L., Lajus A., Cruveiller S., Rouy Z., Mangenot S., Segurens B., Dossat C., Franck W.L., Chang W.S., Saunders E., Bruce D., Richardson P., Normand P., Dreyfus B., Pignol D., Stacey G., Emerich D., Vermeglio A., Medigue C., Sadowsky M., 2007. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science 316(5829):1307-1312.

Mueller S.C et Teuber L., 2007. Alfalfa growth and developpement. Agriculture and natural resources communication services. Ed. UC PEER REVIEWED. California. pp1-9.

MULDER K.F., 2009. L'ingénieur et le développement durable, presses de l'université du Québec. Ecole de technologie supérieure. P 18-19.

Munns D. N., 1977. Soil acidity and related factors. Bose (Ed) .pp211-236.

Ott t., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., BockV., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M .K., 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*. 15: 531–535.

Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M., 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* .234: 201-262.

Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W., Borthakur D., 2006. Identification of Two Clusters of Genes Involved in Salt Tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain BL3. *Symbiosis*. 41: 47-51.

Pellerin S., Bulter F., Guiard-Van L.G., 2014. Fertilisation et environnement. Quelles pistes pour l'aide à la décision. Ed. Quae et Acta. France. 194p.

Pelmont J., 1995. Bactérie et environnement adaptation physiologique. Ed Dunod. France.

Pelmont J., 1995. Bactérie et environnement : adaptation physiologique. Vol 2. Office des Publications Universitaires, PP 897-906.

Pelmont J., 2005. Biodégradation et métabolisme les bactéries pour les technologies de l'environnement, Ed. EDP Sciences. France. pp187-301.

Perret X., Staehe L. C., Selander R.K., 2000. Molecular basis of symbiotic

Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004. Microbiology. Ed. Dunod, Paris. 889p.

Prescott L.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J., 2010. Microbiologie. 3^{ème} ed. De Boeck. Bruxelles .544p.

Prosperi J. M., Isabelle O., Angevain M., Génier G., Nansat P., 1993 .Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes. INRA. Mauguio n°4. pp1-5.

Rao D., Giller K.E., Yeo A.R., Flowers T.J., 2002. The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot*. 89: 563- 570.

Rasanen L.A., 2002. Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixingsymbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

Raven P.H., Berg L.R., Hassenzahl D.M., 2009. Environnement. Ed De Boeck. Belgique. 94p.

- Raven P.H., Evert R., Eichhorn S.E., 2007. Biologie végétale. 2^{ème} Ed. De Boeck. France. pp 653-660.
- Raven P.H., Ray F., Eichhorn S.E., 2000. Biologie végétale. 2^{ème} Ed. De Boeck. Paris France. pp 653-660.
- Ravikumar R., 2012. Growth effects of *Rhizobium* inoculation in some legume plants. INT J CURR SCI. USA. pp 1-6.
- Riedacker A., Dreyer E., Pafadnam C., JOLY H., BORY G., 1993. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Diversité des Rhizobium, spécificité de nodulation et aptitude à fixer l'azote chez les Acacia sahéliens. Ed John Libby Euronext. Paris. 257-262p.
- Rincón-Rosales R., Lioret L., Ponce E., Martinez-Romero E., 2009. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. Which has common symbiotic gene with *Sinorhizobium mexicanum*. FEMS Microbiol Ecol. 67 : 103-117.
- Robert E., Ricklefs G., Miller L., 2005. Ecologie. Ed. De Boeck. Paris. 214p.
- Sadowsky M.J., 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: Werner D, Newton WE (Ed) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer. The Netherlands. pp 89-112.
- Schneider A., Huyghe C., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Paris. Ed. Quae. p 6-7.
- Singh R.J., 2009. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. In: Gary R. Banchan (Ed): Chapter 2. Alfalfa (*Medicago sativa ssp. sativa* (L.)). CRC. 18p.
- Skerman P.J., 1982. Légumineuses fourragères tropicales. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Rome. 115p.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin. Strains in the rhizosphere of Egyptian clover in relation to salt stress and pattern of competition. 464p.
- Soussi M., Ocana A., Lluch C., 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal Exp Bot. 49: 1329-1337.
- Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, D May G., 2006. Genetics and functional genomics of legume nodulation. Current Opinion in Plant Biology. 9: 110–121.
- Stanier R. Y., Adelberg E. A., Ingraham J., 1976. The Microbial World. Prentice. Hall, New Jersey. pp 65- 82.
- Suty L., 2015. Les végétaux. Les relations avec leur environnement. Ed Quae. 13p.
- Taylor L.P., Grotewold, E., 2005. Flavonoïds as developmental regulators. Curr Opin Plant Biologie. 8(3): 317-323.

- Toledo I., Lioret L., Martinez-Romero E., 2003. *Sinorhizobium americanus* sp .nov., a new *Sinorhizobium*, species nodulating native *Acacia* ssp. in Mexico. Syst Appl Microbiol .26:55-64.
- TORCHE A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*.
- Tortora G.J., FUNK B.R., CASE C.L., 2003. Introduction à la microbiologie. Ed du Renouveau Pédagogique Inc.
- Trevaskis B., Colebatch G., Desbrosses G., Wandrey M., Wienkoop S., Saalbach G., Udvardi M., 2002. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. Comparative and Functional Genomics. 3: 151–157.
- Udvardi M.K., Day D.A., 1997. Metabolite Transport across Symbiotic Membranes of Legume Nodules. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 48: 493–523.
- Vance J-E. 2001. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. 4^{eme} édition. Canada.557p.
- Vallée C., Bilodeau G., 1999. Les techniques des cultures en multicellules. Ed IQDHO. Canda. P197 198.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G., 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J Bacteriol. 172: 4295-4306.
- Vincent J.M., 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Wang E.T., Tan Z.Y., Willem A et al., 2002. *Sinorhizobium morelense* sp .nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. Int J Sydt Evol Microbial .52:1687-1693.
- Wei G.H ., Wang E.T., Tan Z.Y., Zhu M.E., Chen W.X., 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. Nov . and *Sinorhizobium Kummerowiae* sp.nov.respectively isolated from Indigofera ssp . and *Kummerowia stipulacea*. Int J Syst Evol Microbial. 52:223-2239.
- Weir B.S., (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. [Http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia](http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia) last updated.
- Werner D., 1992. Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany.
- 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.

Young C.C et Chao C.C., 1989. Intrinsic antibiotic resistance and competition in fast and slow-growing soybean rhizobia on a hybrid of Asian and US cultivars. *Biol Fertil Soils*. 8:66–70.

Young J.M., Sawada H., Kuykendall L.D., 2003. Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal Genetic Microbiology*. (49) 3:155-179.

Zahran H.H., 1999. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under Severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews* .63 (4). pp 968-989.

Zahran H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and Biotechnology. *Journal Biotechnology* .91: 143-153.

Zahran H.H., Abdel-Fattah., Yasser M.M., Mahmoud A.M., Bedmar E.J., 2012. Diversity and environmental stress responses of rhizobial bacteria from Egyptian grain legumes. *Australian journal of basic and applied sciences*. 6:571-583.

Annexes

Annexe n° 1

I. Milieu de culture

Pour la culture de nos souches de rhizobia, nous avons utilisé le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970) qui est un milieu spécifique aux rhizobia. Dont la composition est la suivante :

Composées	Quantité en g/l
K₂HPO₄	0.5
MgSO₄, 7H₂O	0.1
NaCl	0.05
Mannitol	10
Extrait de levure	1
Eau distillée	100

Le pH est ajusté à 6,8 en suite la solution est stérilisée par autoclavage à 120°C pendant 20min.

Pour la composition de milieu solide YMA (Yeast Mannitol Agar) :

Composées	Quantité en g/l
K₂HPO₄	0.5
MgSO₄, 7H₂O	0.1
NaCl	0.05
Mannitol	10
Extrait de levure	1
Eau distillée	100
Agar –agar	15

Le pH est ajusté à 6,8 en suite la solution est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20min.

Annexe n° 2

II. Milieu Fahraeus : solution nutritive sans azote (Vincent, 1970).

Composition de la solution nutritive en g/l :

Macro éléments g/l :

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

Micro éléments g/l :

H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.03
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	0.22
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.14

Le pH de solution nutritive doit être ajusté à 6,8 ; autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

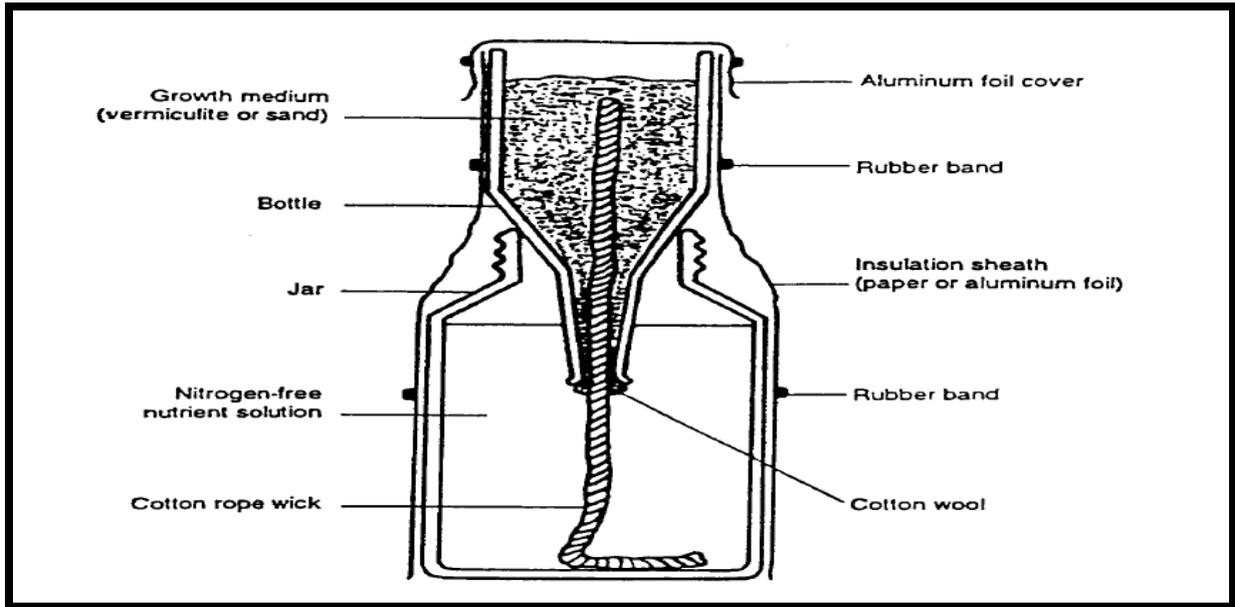


Figure. Assemblage de Jarre de Léonard (Vincent, 1970)

La classification du genre *Sinorhizobium* (George et *al.*, 2005)

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Alpha Proteobacteria
Ordre	Rhizobiales
Famille	Rhizobiaceae

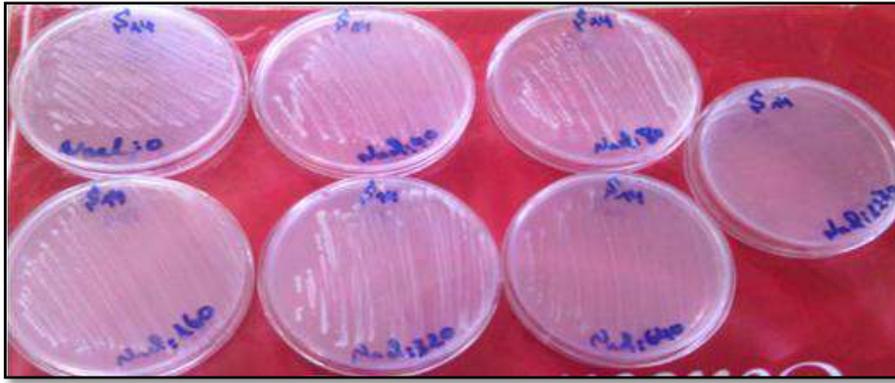


Figure. La croissance des souches sur milieux solide à différentes concentrations d'NaCl

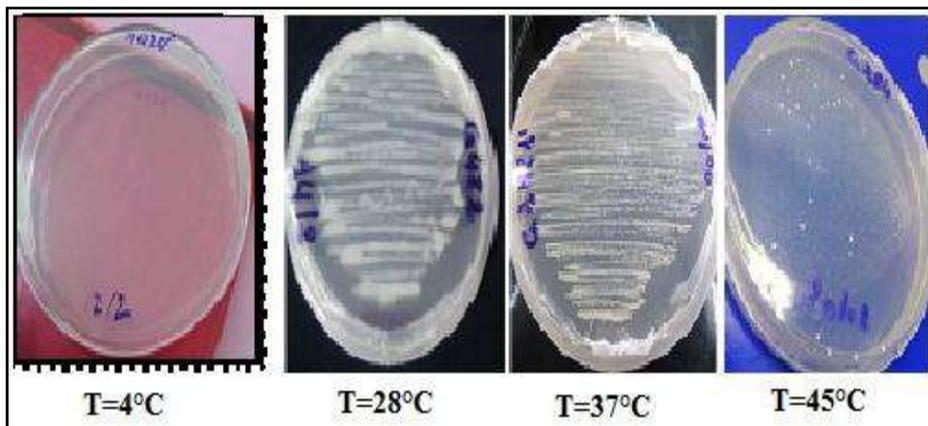


Figure. La croissance des souches sur milieux solide à différentes températures étudiées.

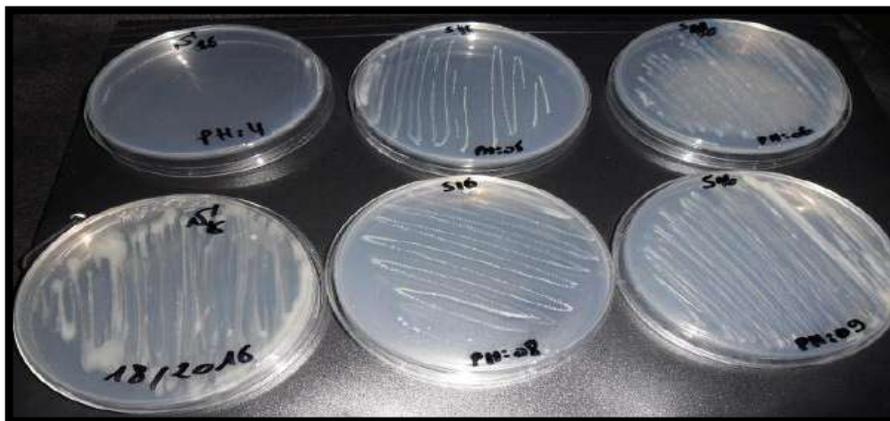


Figure. La croissance des souches sur milieux solide à différentes pH testés.



Photo : Pesée des plantes séchées



Photo : Séchage des plantes à l'étuve à 70°C



Photo : spectrophotomètre utilisée (La marque « SECOMAM », 2012).



Photo : Les tubes des disques d'antibiotique

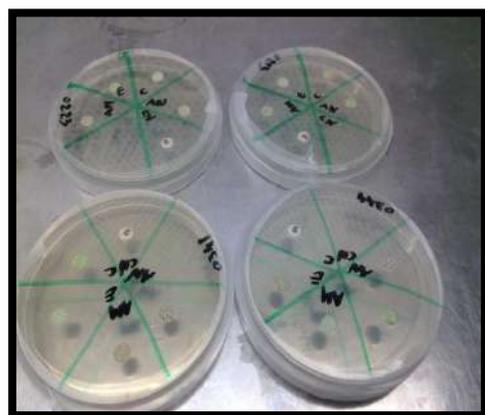


Photo : L'antibiogramme



Photo : Coulage des boites



Photo : Les milieux de culture liquide



Photo : Désinfection les grains de la luzerne (*Medicago sativa L.*)



Photo : Solutions nutritive mères

Tableau. Les codes des souches.

Les souches	Les codes
G1	G1M21'
G2	G1M22'
G3	G2M11
G4	G2M12
G5	G122
G6	G124
G7	G211
G8	G312
G9	G315
G10	G321
G11	G421
G12	G422'
G13	G424'
G14	G431
G15	G431'
G16	G511
G17	G514'
G18	G522'
1021	1021
2011	2011

Tableau. Résistance intrinsèque aux antibiotiques.

	AMx	E	C	AN	CN	CTx	VA	P	CT	SP	FC	K
G1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
G2	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
G3	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
G4	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
G5	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
G7	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
G8	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
G9	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
G10	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
G11	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
G13	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
G14	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
G16	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
G17	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
G18	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
1021	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
2011	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0

0 : sensible

1 : Résistance

سélection des souches rhizobiennes efficaces, autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L.)

Résumé

Dans cette étude, un total de dix-huit souches bactériennes ont été isolées à partir des nodules de *Medicago sativa* L. Cultivée dans la région de Ghardaïa.

Notre travail est basé sur deux objectifs principaux qui s'inscrivent dans le cadre i) de la sélection des souches Sinorhizobiennes efficaces nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L.) et ii) la réalisation d'une caractérisation phénotypique de celles-ci face aux facteurs prédominants dans la région d'étude (effet de facteurs extrinsèques tels que le pH, la salinité et la température et la résistance intrinsèque aux antibiotiques). La combinaison des résultats de caractérisation phénotypique et ceux du test d'inoculation nous ont permis d'une part de montrer qu'il y a une corrélation significative entre la nodulation et les différents paramètres phénotypiques, d'autre part de sélectionner les souches les plus efficaces vis-à-vis des paramètres étudiés. Les souches en question sont : G16, G2, G15 et G1. Elles peuvent être utilisées dans la production d'un inoculum bien adapté aux conditions de la région et susceptible d'accroître le développement des plantes.

Mots clés : Inoculation, symbioses fixatrices d'azotes, caractérisation phénotypique, *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*, le Sahara

Selection of efficient rhizobial strains, native of the region of Ghardaia, nodulating alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Summary

In this study, a total of eighteen bacterial strains were isolated from nodules of *Medicago sativa* L. Cultivated in the Ghardaia region.

Our work is based on two main objectives which form part i) the selection of efficient strains Sinorhizobiennes nodulating alfalfa (*Medicago sativa* L.), and ii) conducting a phenotypic characterization of these factors deal with predominant in the study area (effect of extrinsic factors such as pH, salinity and temperature and the intrinsic resistance to antibiotics). Combining the results of phenotypic characterization and those of inoculation test allowed one hand to show us that there is a significant correlation between nodulation and different phenological parameters, and also to select the strains more efficient vis-à-vis certain values of the parameters studied. The strains in question are: G16, G2, G15 and G1. They can be used in the production of inoculum well adapted to the conditions of the region and likely to increase plant development.

Keywords: inoculation, nitrogen-fixing symbioses, phenotypic characterization, *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*, the Sahara.

اختيار السلالات الريزوبية المحلية من منطقة غرداية، ذات الكفاءة في تكوين العقد الجذرية مع (*Medicago sativa* L.)

الملخص

في هذه الدراسة، تم عزل مجموعة مكونة من ثمانية عشر سلالة بكتيرية من عقيدات (*Medicago sativa* L.) المزروعة في منطقة غرداية.

يستند عملنا على هدفين رئيسيين، أولاً اختيار السلالات البكتيرية Sinorhizobiennes ذات الكفاءة في تكوين العقد الجذرية مع (*Medicago sativa* L.)، ثانياً إجراء توصيف مظهري للسلالات البكتيرية بالنسبة للعوامل السائدة في منطقة الدراسة (تأثير العوامل الخارجية مثل درجة الحموضة، الملوحة، درجة الحرارة والمقاومة الذاتية للمضادات الحيوية).

الجمع بين نتائج التوصيف المظهري و اختبار التلقيح سمحت لنا بتوضيح من جهة، أن هناك ارتباط كبير بين تشكل العقد الجذرية والعوامل الفيزيولوجية المختلفة، ومن ناحية أخرى تحديد السلالات ذات كفاءة بالنسبة لبعض القيم المدروسة. السلالات المعنية هي: G16، G2، G15 و G1.

ويمكن استخدامه في إنتاج اللقاح نظراً لتأقلمهم مع ظروف المنطقة لتطوير نمو النباتات.

الكلمات المفتاحية: التلقيح، التعايش المثبت للنيتروجين، توصيف المظهري، *Medicago sativa*، *Sinorhizobium meliloti*، الصحراء.