

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: Ecologie et Environnement
Spécialité : Ecologie Végétale et Environnement

Présenté par :

HAIDOUS CHAFIA

**Estimation de l'efficacité de quelques souches
rhizobiennes en symbiose avec trois variétés de luzerne
locales (*Medicago sativa L.*)**

Soutenu publiquement : 25/06/2018

Devant le jury :

M. BRADAI Lyes	Président	MCA	UKM Ouargla
Mlle. HANNANI Amina	Examinatrice	MAA	UKM Ouargla
M. AZIB	Promoteur	MAA	UKM Ouargla

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères, les plus continus s'adressent à ALLAH, le Tout puissant qui m'a aidé à surmonter les obstacles et parvenir à ce niveau d'étude.

Au terme de ce travail, je me fais un agréable devoir de remercier vivement mon promoteur Monsieur AZIB SALIM pour tous ses encouragements, son aide et ses conseils précieux qu'il m'a donné pendant la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à Mr. BRADAI Lyes d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Toute ma gratitude à Mlle Hanani Amina d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr MANSOUS MOUHAMED pour sa précieuse aide, ses encouragements et ses conseils.

Je remercie également tous les membres du laboratoire des Bioressources Sahariennes de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie sans exception.

Je tiens à remercier toute l'équipe de CRSTRA-Touggourt (**Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides**).

Je ne saurais comment remercier ma famille qui était patient avec moi durant toute la période de préparation de ce travail. Elle a grandement contribué à l'aboutissement de ce mémoire.

Dédicaces

J'adresse cette dédicace :

A qui ont toujours été à mes cotés ;

A ceux qui m'ont toujours soutenu dans les moments les plus difficiles et avec lesquels j'ai partagé les meilleurs et mauvais moments ;

A ceux qui ont participé avec force à la construction de mon avenir ;

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui a été à mes cotées durant toutes les années de mes études, à ma très chère mère.

A mon cher père, qui a toujours été là pour moi, et qui m'a encouragé pendant toute ma vie. Que ALLAH les garde et les protège.

A ma sœur Imane et son mari Fares et leur petite fille Miral.

A mes sœurs : Achoiak et Tassnim.

A mon frère : Alaaeddin

A ma chère ami NIRMINE qui m'a beaucoup aidé

A mes enseignants et mes collègues et à tous ceux qui connaissent Chafia.

HAIDOUS

CHAFIA

SOMMAIRE

N°	Titre	page
/	INTRODUCTION	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE		
1.	Le cycle de l'azote	4
1.1.	La fixation	4
1.2.	La nitrification	4
1.3.	Dénitrification	5
2.	La fixation biologique de l'azote	5
2.1.	La fixation libre (non symbiotique)	5
2.2.	La fixation symbiotique	6
2.3.	L'importance de la fixation de l'azote	6
3.	L'interaction symbiotique rhizobium-légumineuse	7
3.1.	Les partenaires intervenant dans la symbiose fixatrice d'azote	7
3.1.1.	Le partenaire végétale	7
3.1.1.1.	la luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	10
3.1.1.2.	Caractéristiques et morphologie de la luzerne	10
3.1.1.3.	Classification botanique de Luzerne	11
3.1.2.	Partenaire microbien	11
4.	L'établissement de la symbiose rhizobienne	12
4.1.	Les étapes de formation des nodules	12
4.1.1.	L'attraction et la reconnaissance	12
4.1.2.	L'infection	13
4.1.3.	Le Début de formation du nodule	13
4.2.	Le développement et la structure du nodule	14
4.3.	Les types des nodules	15
5.	L'inoculation	15
5.1.	L'importance de l'inoculation	16
6.	Relation entre génotype de plante et souche bactérienne	16
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES		
1.	Matériel d'étude	19
1.1.	Le substrat de culture	19
1.2.	Le Matériel végétale	19
1.3.	Le matériel microbiologique	19
1.4.	Les milieux de culture utilisés	20
1.5.	Milieu Fahraeus	21
2.	Méthodes d'étude	21
2.1.	Préparation du substrat de culture	21
2.1.1.	La déminéralisation et stérilisation du sable	21
2.1.2.	Analyses physico-chimiques du sable	22
2.2.	Germination des grains	22
2.3.	Désinfection et prégermination des graines	23
2.4.	Production d'inoculum	23
2.4.1.	Repiquages des bactéries	23
2.4.2.	Ensemencement des tubes	24
2.5.	Le semis et l'inoculation des graines	24

2.6.	Irrigation et suivi des plantes	25
2.7.	Prélèvements des plantes	25
2.8.	Paramètres étudiés	26
2.8.1.	Mesure de la croissance	26
2.8.2.	L'étude de la nodulation	26
2.8.3	Poids des parties aériennes et souterraines	27
2.8.4.	L'azote total	28
2.9.	Traitements statistiques	29
III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS		
1.	Caractéristiques physico-chimiques du substrat de culture	31
2.	Faculté germinative des graines de luzerne	32
3.	Présentation et analyse des résultats du test symbiotique	33
3.1.	Résultats de la croissance des plantes	33
3.4.	Résultats de poids frais des plantes	35
3.5.	Résultats du poids sec des plantes	36
3.6.	Résultats du nombre total des nodules	38
3.7.	Teneur en azote dans les parties aériennes	39
4.	Analyse de corrélation	40
Conclusion		44
Annexes		
References bibliographiques		

Liste des tableaux :

N°	Titre	page
1	Classification botanique de la luzerne.	11
2	Composition du milieu de culture YEM.	20
3	Composition de la solution nutritive de Fahraeus.	21
4	Résultats des analyses physicochimiques du sable.	31
5	Résultats des tests germinatifs.	32
7	Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés.	40

Liste des figures

N°	Titres	page
1	Cycle de l'azote	5
2	Classification de la phylogénie et de la sous-famille des légumineuses	9
3	Echange de signaux symbiotiques dans l'interaction légumineuse-rhizobium	13
4	Processus de la nodulation	14
5	Nodules indéterminés et déterminés	15
6	Phylogénies moléculaires des espèces végétales et des bactéries symbiotiques associées	17
7	Effet des souches sur la hauteur des tiges des différentes variétés	33
8	Effet des souches sur la longueur des racines des différentes variétés	34
9	Evolution du poids frais des plantes entières	36
10	Evolution du poids sec des plantes entières	37
11	Effet des souches bactériennes sur le nombre de nodules actifs	38
12	Variation du taux d'azote total dans les parties aériennes	39
13	ACP des différents paramètres étudiés chez les trois variétés de luzerne (graphe des variables)	41
14	ACP des différents paramètres étudiés chez les trois variétés de luzerne : graphe des individus	41

Liste des photos

N°	Titres	page
1	Déminéralisation du sable	22
2	Aspect des graines germées des trois variétés après 48 heures l'incubation à 25°C	23
3	Production d'inoculum rhizobien	24
4	Semis et l'inoculation des graines	25
5	Récolte des plantes	25
6	Mesure de la croissance des différentes parties végétatives	26
7	Etude de la nodulation dans les parties souterraine	27
8	Mesure de poids frais et sec des parties aériennes et souterraines des plantes	27
9	Préparation des échantillons	28
10	Digesteur à étape minéralisation	28
11	Etape de distillation	28
12	Etape de titrage	28
13	Aspect des deux parties végétatives de la plante inoculée après deux mois et demi de croissance	35

Liste des abréviations

FSN : Fixation symbiotique de l'azote

FBN : Fixation biologique de l'azote

L. : Linnée

NaCl: Chlorure de Sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NO₂⁻ : Nitrite

NH₄⁺: Ammonium

NO₃⁻ : Nitrate

NA : Nodule actif

T: Témoin

pH : Potentiel hydrogène

S : *Sinorhizobium*

YEM: Yeast Extract Mannitol

YMB: Yeast Mannitol Broth

YMA: Yeast Mannitol Agar

FAO: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

HT : Hauteur des tiges

LR : Longueur des racines

PS : Poids sec

N : Nodulation

N% : Taux d'azote en pourcentage

Introduction

INTRODUCTION

L'azote moléculaire en phase gazeuse (N_2) est le plus grand réservoir d'azote superficiel et représente environ 78% de l'atmosphère terrestre. Il est incorporé à la biosphère via le processus de fixation de N_2 (ZERKLE et MIKHAIL, 2017).

L'azote est nécessaire à tous les organismes vivants pour produire des protéines, des acides nucléiques et de nombreuses autres biomolécules. C'est un élément essentiel du développement des plantes et un facteur limitant de leurs croissances. Il représente environ 2% de la matière sèche totale des plantes entrant dans la chaîne alimentaire. Néanmoins, les plantes ne peuvent pas accéder directement au gaz de diazote, sous sa forme moléculaire en raison de sa forte liaison triple. Les plantes absorbent l'azote disponible dans le sol à travers leurs racines sous forme d'ammonium et de nitrates (SANTI et *al.*, 2013; LI et *al.*, 2015).

Il existe des relations étroites entre l'application excessive d'engrais azotés et les problèmes environnementaux tels que l'eutrophisation, l'effet de serre et les pluies acides. La consommation d'eau souterraine contaminée ou de cultures à forte teneur en nitrates a des effets négatifs sur la santé humaine (LIU et *al.*, 2014).

L'introduction de fabaceae permet d'éviter une partie de la production d'engrais azotés industriels et réduire les émissions de CO_2 (et N_2O) associées à cette production et au transport des engrais. Les cultures de fabaceae fournissent majoritairement des glucides et des protéines mais également une panoplie variée des autres éléments pour l'alimentation des hommes et des animaux (SCHNEIDER et HUYGHE, 2015).

La fixation biologique de l'azote réduit le N_2 moléculaire en ammonium, c'est la plus grande source d'azote disponible pour la vie sur la terre. Une grande partie de cet ammonium provient de la fixation symbiotique de l'azote (FSN) par les rhizobiums dans les nodules racinaires des fabaceae. Cette fixation symbiotique de l'azote permet aux fabaceae de coloniser les sols qui contiennent peu ou pas d'azote disponible (COLEBATCH et *al.*, 2004).

Les Fabaceae constituent une famille importante et économiquement importante de plantes à fleurs. Il comprend des arbres, des arbustes et des plantes herbacées pérennes ou annuelles, qui sont facilement reconnaissables à leurs fruits (légumineuses) et à leurs feuilles composées, stipulées. Un certain nombre sont des plantes agricoles et alimentaires importantes y compris *Glycine max* (soja), *Medicago sativa* (luzerne)... etc. (RAHMAN et PARVIN, 2014).

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une fabaceae fourragère importante qui est largement cultivée dans le Monde. En présence de rhizobiums, les racines de luzerne subissent une nodulation, établissant un partenariat symbiotique où les plantes fournissent des ressources de carbone aux rhizobiums. En retour, les rhizobiums nodulés effectuent la fixation de l'azote par nitrogénase, fournissant ainsi aux plantes de l'azote utilisable (SONG et *al.*, 2017).

L'utilisation d'inoculants de rhizobium dans la production de luzerne représente un moyen important d'obtenir une amélioration du FSN. Ils contiennent des rhizobiums vivants compétitifs sélectionnés pour un potentiel de fixation de N₂ très élevé et/ou d'autres caractères particuliers (augmente le rendement de la luzerne, et la teneur en protéines des graines, et fournit des cultures non fabaceae et des sols avec N et réduit la nécessité d'utiliser des engrais minéraux (DELIC et *al.*, 2016).

C'est afin de limiter les apports d'engrais azotés coûteux et polluants dans les écosystème cultivés et assurent le maintien de fertilité des sol dans les milieux naturels et améliorer la qualité des produits agricoles, nous avons utilisé dans notre étude des biofertilisants à base d'inoculum

L'objectif de notre travail est :

- D'évaluer l'effet de l'inoculation par huit souches rhizobiennes provenant de différentes zones agricoles sahariennes sur la croissance et le rendement de trois variétés locales de la luzerne, puis sélectionner les meilleurs couples symbiotiques à travers les résultats du test symbiotique.
- Estimer la quantité d'azote biologiquement fixé via cette association.

Notre travail est organisé en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré pour une synthèse bibliographique sur la fixation biologique de l'azote atmosphérique. Le deuxième chapitre est consacré à la partie matériel et méthodes adoptés à l'expérimentation et en laboratoire. Les résultats et discussions sont présentés dans le troisième chapitre. En fin, le travail achevé par une conclusion qui englobe des suggestions et des perspectives.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. Le cycle de l'azote

L'azote (N) est un élément essentiel dans les systèmes biologiques et qui limite souvent la production dans les systèmes terrestres, il 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. En raison de son besoin en macromolécules biologiques, son acquisition et son cycle ont le potentiel de structurer les communautés microbiennes, ainsi que de contrôler la productivité à l'échelle de l'écosystème (WILLIAM et HOPKINS, 2003; BESS et MARLENE, 2014).

Ce cycle, concerne les échanges des principaux composés azotés : diazote (N_2), nitrates (NO_3^-), nitrites (NO_2^-), ammoniacque (NH_4^+) et azote organique (principalement protéines et acides nucléiques). Les transformations de l'azote entre ses différentes formes présentes dans la nature constituent un réseau complexe de processus et de réactions qui sont détaillées ci-après (SUTY, 2015; GENERMONT et CELLIER, 2016).

1.1. La fixation

Le processus de conversion de N_2 en azote biologiquement disponible est appelé fixation de l'azote. Le gaz N_2 est un composé très stable dû à la force de la triple liaison entre les atomes d'azote, et il nécessite une grande quantité d'énergie pour rompre cette liaison.

L'ensemble du processus nécessite huit électrons et au moins seize molécules d'ATP. Par conséquent, seul un groupe restreint de procaryotes est capable de mener à bien ce processus exigeant sur le plan énergétique (BERNHARD, 2010).

1.2. La nitrification

La nitrification est l'oxydation biologique de l'ammonium en nitrate. Elle s'effectue dans un délai pouvant aller de quelques jours à quelques semaines. Elle procède en deux étapes successives, la nitritation (oxydation de l'ammonium (NH_4^+) en nitrite (NO_2^-), puis la nitratisation (oxydation des nitrites en nitrates). Ces réactions sont réalisées par des bactéries spécifiques. Le nitrite et le nitrate produits par des réactions aérobies dans le processus de nitrification peuvent être respirés anaérobiquement ou l'ammonium résultant peut être assimilé (GENERMONT S et CELLIER, 2016; STEIN et KLOTZ, 2016).

1.3. Dénitrification

La dénitrification est la réduction successive des formes oxydées de l'azote, ioniques solubles (nitrate : NO_3^- et nitrite : NO_2^-) puis gazeuses en azote moléculaire (N_2). La dénitrification biologique est une respiration microbienne, où les formes oxydées de l'azote servent d'accepteurs d'électrons, qui s'observe en général en absence d'oxygène (RECOUS et *al.*, 2014).

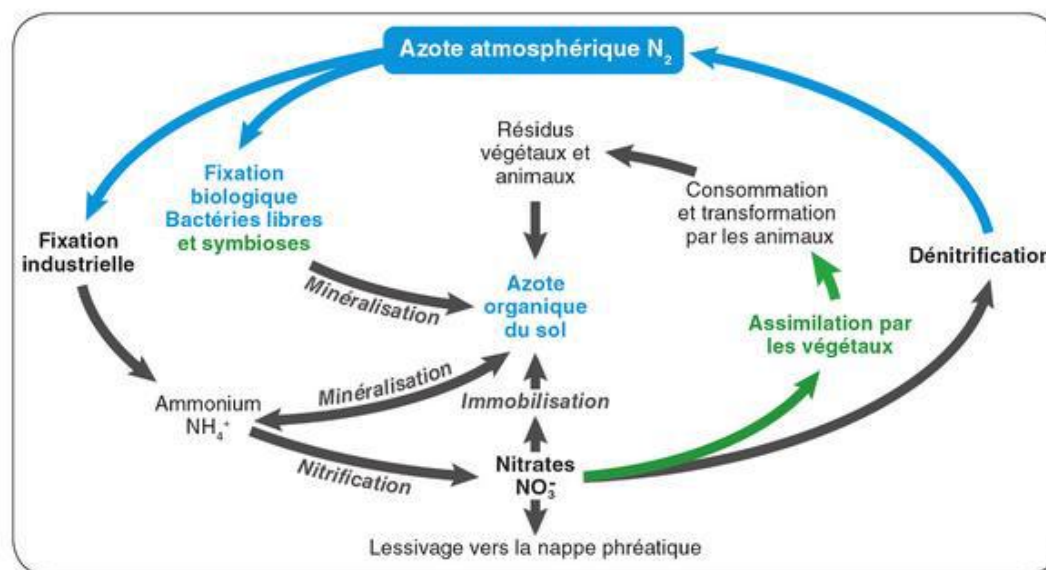


Figure 1 : Cycle de l'azote (WILLIAM et HOPKINS, 2003).

2. La fixation biologique de l'azote

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 fabaceae. C'est le processus biologique vital qui permet de convertir l'azote de l'air ambiant (N_2) en azote minéral intermédiaire (azote ammoniacal, NH_3) qui est alors assimilable par les organismes vivants pour constituer les molécules organiques (notamment les protéines) (SCHNEIDER et HUYGHE, 2015).

2.1. La fixation libre (non symbiotique)

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 certaines espèces soient aérobie (*Azotobacter*, *Beijerinckia*), la plupart d'entre elles ne fixent l'azote que dans des conditions anaérobies ou

dans des conditions de très faibles pressions partielles d'oxygène (condition dites de micro-aérophylie).

Elles comprennent des genres non photosynthétiques (*Clostridium*, *Bacillus*, *klebsiella*) et des genres photosynthétiques (*Chromatium*, *Rhodospirillum*). En plus de ces bactéries, plusieurs genres de cyanobactéries (principalement *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbia* et *Calothrix*) comprennent des espèces fixatrices d'azote (WILLIAM et HOPKINS, 2003).

La fixation non symbiotique apporte au sol des quantités d'azote relativement petites, de l'ordre de 10 kg d'azote ha⁻¹ an⁻¹ (CALVET, 2003).

2.2. La fixation symbiotique

La fixation symbiotique d'azote implique des interactions anatomique, morphologique et biochimiques importantes entre la plante hôte et les microorganismes qui l'envahissent. Elle s'effectue chez les légumineuses grâce à des bactéries du sol (*Rhizobiums*) intégrées au sein d'excroissances spécifiques des racines, les nodosités.

Ce processus biologique permet d'assurer tout ou partie des besoins en azote des fabaceae, selon les espèces et selon les conditions de milieu (WILLIAM et HOPKINS, 2003; VERTES et *al.*, 2015).

La fixation symbiotique de l'azote (FSA) par les rhizobiums dans les nodosités des racines des légumineuses apporte au sol des quantités pouvant atteindre plusieurs centaines de Kg d'azote ha⁻¹ an⁻¹(CALVET, 2003), ce qui équivaut à environ 40 millions de tonnes d'azote dans les systèmes agricoles de manière naturelle et durable (IGOR et *al.*, 2017).

2.3. L'importance de la fixation de l'azote

Les fabaceae établissent des symbioses racinaires avec des rhizobiums qui fournissent des plantes avec de l'azote (N) grâce à la fixation biologique de l'azote (FBA) qui contribue de manière significative au bilan azoté (N) des fabaceae, et fournir jusqu'à 90% de l'azote nécessaire à la plante. La quantité d'azote fixée peut dépasser quelquefois 400kg/ha/an (PÜSCHEL et *al.*, 2017).

La connaissance des relations entre la fixation biologique de l'azote (FBA) et les caractéristiques de la plante est déterminante dans le choix des critères de sélection pour

l'amélioration de la capacité de fixation de l'azote. Plusieurs caractères morphologique et physiologique de la plante-hôte ont été corrélés avec la FBA chez les fabaceae. Ainsi, chez la luzerne, ont relevé des associations significatives entre la FBA, la réduction de l'acétylène, le nombre de nodules par plante et le poids de la partie aérienne (DREVON et SIFI, 2003).

3. L'interaction symbiotique rhizobium-légumineuse

La symbiose entre les bactéries du sol rhizobium et les fabaceae est facultative et initiée par la privation d'azote de la plante hôte. L'échange de molécules entre les partenaires conduit à la formation de nodules racinaires où les bactéries sont converties en bactéroïdes fixateurs d'azote. Les plantes partenaires des rhizobiums appartiennent à la famille des Fabaceae. Jusqu'ici, 12 000 espèces de légumineuses nodulées sont connues (MAROTI et KONDOROSI, 2014).

La symbiose légumineuse-rhizobium commence par un échange de signaux entre la plante hôte qui doit sélectionner son partenaire Rhizobium à partir de milliards de bactéries dans la rhizosphère. Ceci est obtenu par la sécrétion de molécules de signal à partir de la racine qui sont les flavonoïdes. Ces derniers agissent comme des chimio-attractants mais surtout comme des inducteurs des gènes de nodulation de Rhizobium (MAROTI et KONDOROSI, 2014 ; WANG et *al.*, 2018).

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la symbiose rhizobium-légumineuse peuvent être divisés en deux fonctions principales : (i) formation et invasion de nodules, qui sont des processus distincts mais génétiquement coordonnés, et (ii) fixation symbiotique de l'azote qui survient le plus souvent dans les cellules nodulaires (CATHERINE et JOEL, 2018).

3.1. Les partenaires intervenant dans la symbiose fixatrice d'azote

3.1.1. Le partenaire végétale

Les fabaceae sont, avec les graminées, les familles botaniques les plus utiles à l'alimentation dans le monde (KLIEN et *al.*, 2014).

Les Fabaceae est une famille économiquement importante de plantes à fleurs. Elle est composée de 19 300 espèces dans 750 genres qui se produisent comme des herbes, des arbustes,

des vignes ou des arbres dans les habitats principalement terrestres et sont des composants de la plupart des types de végétation du monde. Actuellement, la famille des fabaceae est divisée en trois sous-familles, les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Papilionoideae.

La plupart des espèces de fabaceae peuvent fixer l'azote atmosphérique (N_2) par l'intermédiaire de bactéries symbiotiques «rhizobium» dans les nodosités racinaires (SAYYAH et *al.*, 2011, ANDREWS et ANDREWS, 2017).

La relation mutualiste entre les formes de fabaceae et Rhizobiaceae est la base de l'importance écologique des fabaceae dans les écosystèmes agricoles dans la promotion des rendements accrus des cultures (SARR et *al.*, 2015).

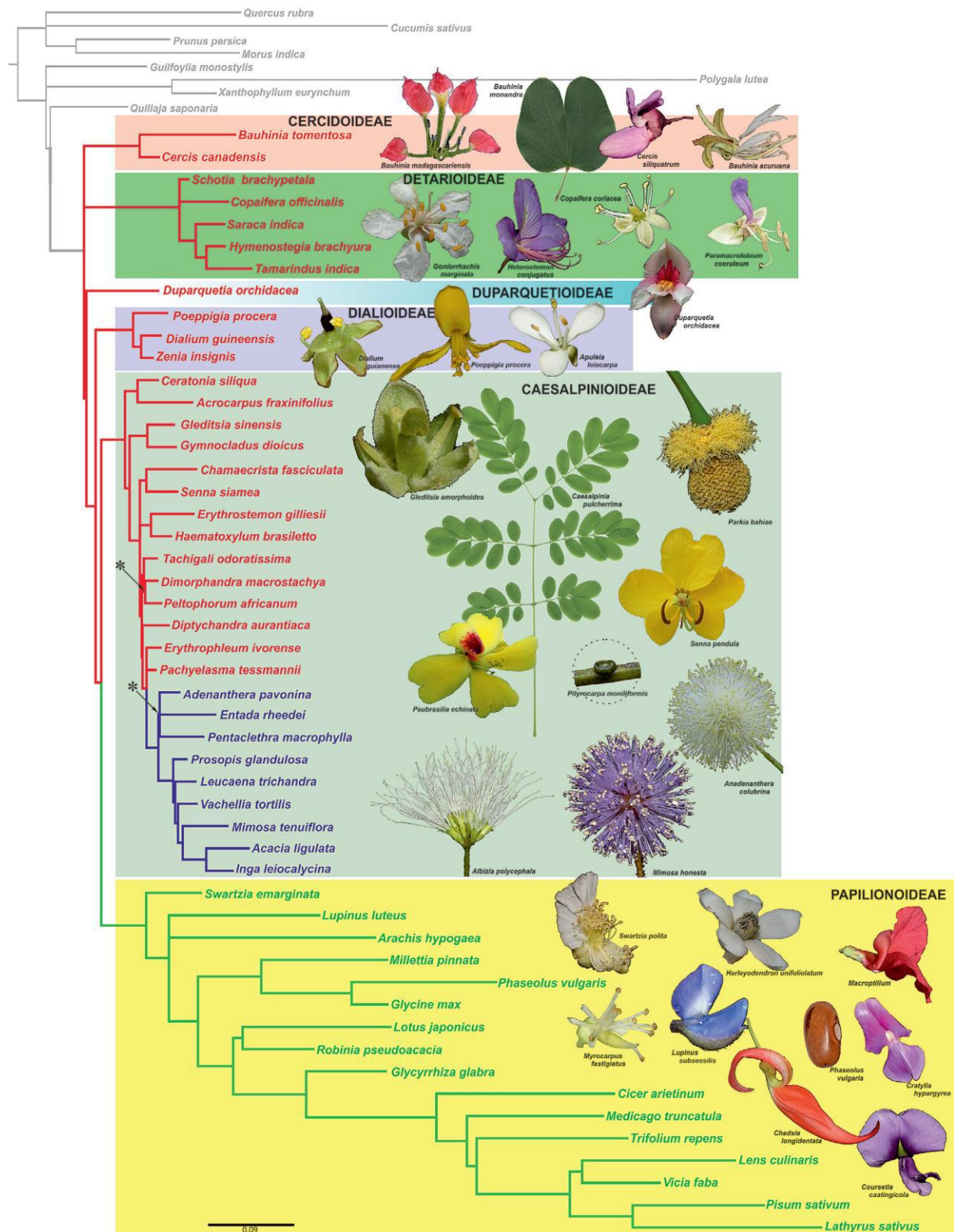


Figure 2 : Classification de la phylogénie et de la sous-famille des fabaceae (LPWG., 2017)

3.1.1.1. La luzerne (*Medicago sativa*)

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une fabaceae vivace importante utilisée comme fourrage dans le monde entier, non seulement en raison de sa productivité, de sa palatabilité élevées et de son profil nutritionnel de choix fournit des (sources fiables de protéines et de minéraux aux animaux), mais aussi de sa capacité écologique à prévenir l'érosion des sols, à accroître la fertilité des sols et également en tant que matière première bioénergétique (ZHANG et al., 2015; WANG et al., 2016; AL-KAHTANI et al., 2017; WANGA et al., 2018).

Les plantes de luzerne utilisent soit l'azote de l'atmosphère par fixation symbiotique soit également de l'azote du sol (SAMAC et al., 2016). Cependant, la quantité d'azote fixé par le système luzerne-rhizobium peut aller de zéro à 210 kg de N ha⁻¹ an⁻¹, montrant des variations qui dépendent de la souche et du cultivar (WANGA et al., 2018). Elles ont l'intérêt de diminuer les coûts énergétiques liés à la fertilisation azotée et aux pollutions provoquées par la synthèse d'engrais chimique azoté et par les fuites d'azote dans les sols (HERRMANN et al., 2017).

Les fabaceae, y compris la luzerne, sont bien connues pour leur sélection spécifique de souches de rhizobium avec une compétitivité supérieure. Pour améliorer la fixation symbiotique de l'azote, l'introduction des inoculums rhizobiales dans les sols est nécessaire (WANGA et al., 2018).

3.1.1.2. Caractéristiques et morphologie de la luzerne

Il existe une très grande variabilité génétique dans la morphologie et l'anatomie des différentes populations de luzerne. La luzerne est une dicotylédone, a la levée vont d'abord émerger deux cotylédons. Au cours de son développement, la première tige grandit en produisant des feuilles alternées. La luzerne développe dans le même temps une racine pivotante principale et des racines secondaires plus ou moins ramifiées, on distingue des tiges primaires, secondaires et tertiaires, les feuilles sont en général de type trifoliées mais il existe des variétés dites multifoliées (MAURIES, 2003).

Les graines de luzerne commencent à germer après avoir absorbé environ 125% de leur poids d'eau et se gonflent pour rompre le tégument. La luzerne peut germer à des

températures supérieures à 3 °c, mais la température optimale de germination se situe entre 18 et 25 °C (UNDERSANDER et *al.*, 2011).

3.1.1.3. Classification botanique de Luzerne

De nombreuses études ont décrit la classification, la diversité et la structure de la population de luzerne (*Medicago sativa*) ainsi que le flux génétique entre les populations naturelles et cultivées ou la relation entre diversité et rendement (HERRMANN et *al.*, 2017), la classification botanique de luzerne représente dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification botanique de Luzerne

Règne	Plantae
sous-règne	Tracheobionta
super division	Spermatophytes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Sousclasse
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées

Sources: SINGH (2011) et AKHTAR et *al.* (2016)

3.1.2. Partenaire microbien

Les rhizobiums sont des bactéries du sol, bacilles courts ou coccoïdes de 1 à 4 µm, il faut qu'il y ait dans la rhizosphère entre 10⁶ et 10⁹ rhizobium par gramme de terre pour pouvoir former des symbioses fixatrices d'azote avec les fabaceae, ce qui permet leur croissance dans les sols pauvres en azote. Ainsi, les rhizobiums ont été considérés comme des bio-engrais et ont été utilisés comme inoculant dans l'agriculture pendant plus de 120 ans. La diversité génétique des rhizobiums, ainsi que leurs interactions moléculaires avec les plantes, ont été bien étudiées (DELARRAS, 2014 ; ERNESTO et *al.*, 2015).

Le développement et la mise en œuvre de techniques agricoles durables, telles que la biofertilisation, sont d'une importance majeure pour réduire les besoins d'engrais chimiques, et réduire la pollution de l'environnement et la détérioration de la nature. La symbiose des rhizobiums avec les espèces de fabaceae est d'une importance particulière, produisant 50% des 175 millions de tonnes de fixation biologique totale de l'azote, fournissant annuellement près de la moitié de l'azote utilisé en agriculture (BERRADA et *al.*, 2012).

4. L'établissement de la symbiose rhizobienne

L'interaction symbiotique entre les plantes fabaceae et les rhizobactéries est un processus physiologique complexe, qui est régulé par un certain nombre de signaux produits à la fois par des macro et micro-symbiontes (DE LA PEÑA *et al.*, 2017).

La symbiose fixatrice d'azote dans les nodosités racinaires des légumineuses est la mieux étudiée à ce jour et elle est très importante pour l'apport d'azote dans les écosystèmes agricoles et naturels. Le nodule racinaire des fabaceae était considéré comme le meilleur exemple de morphogenèse symbiospécifique (STAMBULSKA *et al.*, 2018).

4.1. Les étapes de formation des nodules

4.1.1. L'attraction et la reconnaissance

Le processus de formation de nodules nécessite un échange coordonné de signaux entre les bactéries et les plantes. Quand les fabaceae sont en manque d'azote, ses racines émettent des flavonoïdes, qui attirent les rhizobactéries à proximité des jeunes poils absorbants des racines (BISWAS et GRESSHOFF, 2014 ; SUTY, 2015)

En réponse à ces flavonoïdes, les rhizobactérie synthétisent des facteurs Nod, principalement ces facteurs de nodulation vont être reconnus par la plante, qui déclenchent les premiers événements dans le processus de nodulation (BISWAS et GRESSHOFF, 2014 ; SUTY, 2015).

Les cellules des racines possèdent des récepteurs spécifiques des facteurs Nod, au niveau de leurs membranes plasmiques. La réception des facteurs Nod induit une chaîne de signalisation cellulaire. Cette chaîne aboutit à la synthèse des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes, dont les produits induisent les modifications biochimique et structurales des symbiontes, permettant la formation et le fonctionnement des nodules fixateurs d'azote (SUTY, 2015).

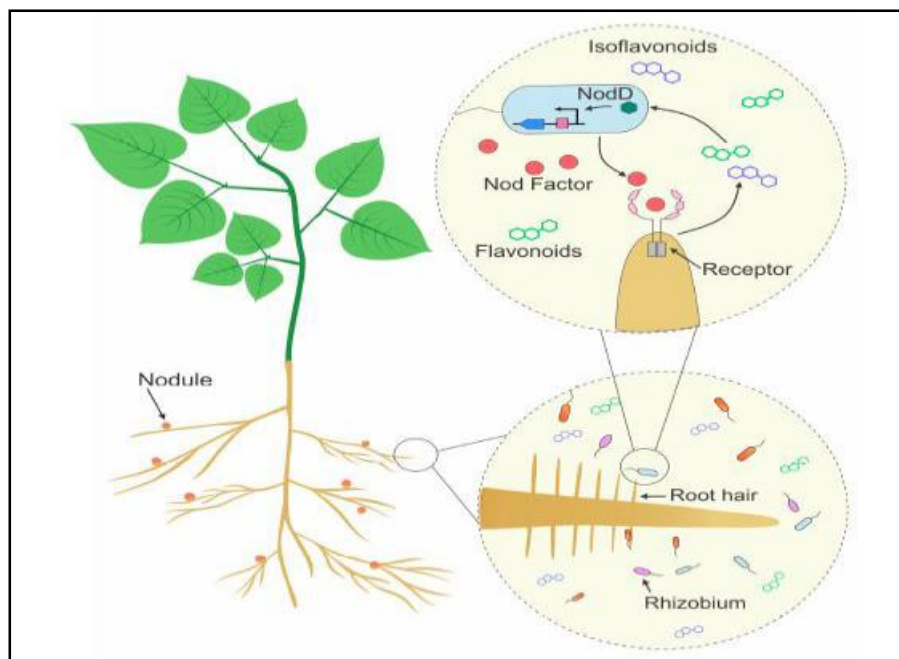


Figure 3 : Echange de signaux symbiotiques dans l'interaction légumineuse-rhizobium (CLUA et *al.*, 2018).

4.1.2. L'infection

C'est la phase d'infection pendant laquelle les rhizobactéries pénètrent dans les cellules du poil absorbant en formant un cordon infectieux discontinu, qui ramifie pour entrer dans les cellules corticales de la racine (SUTY, 2015).

Cela permet aux bactéries d'être libérées dans les divisions des cellules corticales nouvellement formées (primordium nodulaire) pour une infection ultérieure et la formation éventuelle de nodules (BISWAS et GRESSHOFF, 2014).

4.1.3. Le Début de formation du nodule

En général, la formation d'un nodule nécessite la reprogrammation de cellules racinaires différenciées pour former un primordium où un nodule peut se développer. La régulation et les étapes de la formation des nodosités racinaires ont été examinées de manière exhaustive. L'activation de la division cellulaire formant des petits méristèmes qui vont fusionner pour initier l'organogenèse de la nodosité (STAMBULSKA, 2018, SUTY, 2015).

La formation de nodules est terminée lorsque des bactéries nodulaires sont transformées en bactéroïdes fixant l'azote (STAMBULSKA, 2018).

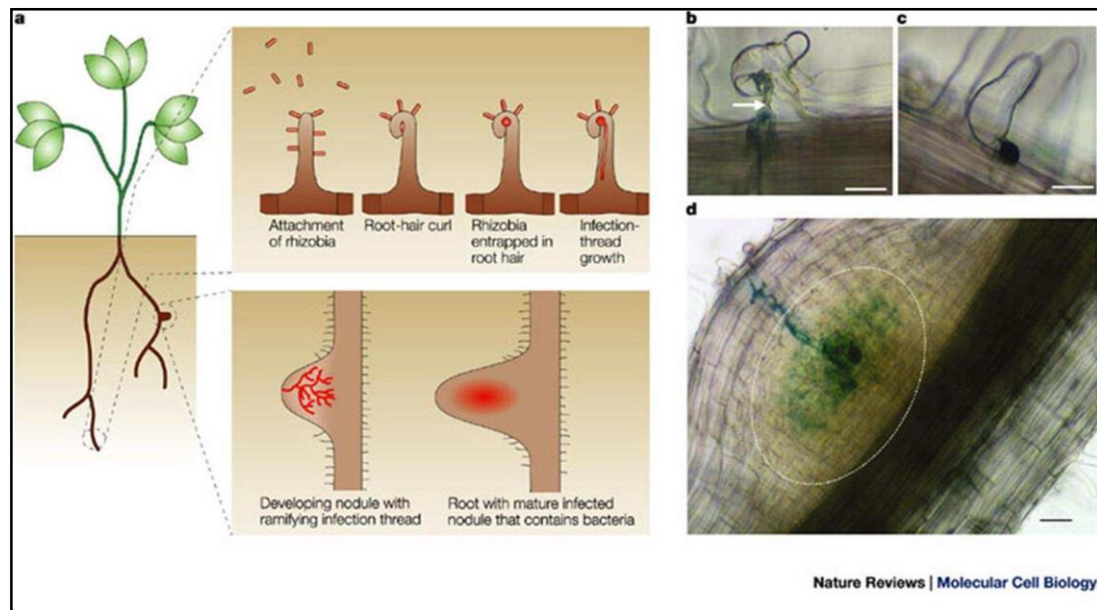


Figure 4: Processus de la nodulation (GILES *et al.*, 2004).

4.2. Le développement et la structure du nodule

Selon SUTY (2015) et OGDEN *et al.* (2017), le méristème produit un nodule mature cylindrique qui contient cinq zones de développement et physiologiquement distinctes :

- (ZI) une zone méristématique: La première et la plus petite zone est une couche mince de 2-5 cellules à la pointe du méristème, dans laquelle il y a peu de rhizobiums ;
- (ZII) la zone de croissance et d'infection: contenant récemment des rhizobiums endocytisés, dans laquelle les bactéries sont partiellement transformées en bactéroïdes différenciellement différenciés, et les cellules végétales se préparent à soutenir la fixation de l'azote ;
- (ZIII) zone de fixation d'azote dans laquelle Le FSA est considéré comme mature et le plus actif, caractérisé par des protéines impliquées dans la fixation et l'assimilation de l'azote ;
- (ZIV) la zone sénescente: qui apparaît dans la région du nodule proximal à la racine après cinq semaines ou plus de croissance.

4.3. Les types des nodules

Plusieurs types de nodules existent dans la nature. Cependant, les deux types les plus prédominants et les mieux étudiés sont: les nodules indéterminés et les nodules déterminés, Une différence majeure entre ces deux types est la durée de vie de leur méristème (KOHLEN, 2017).

Les nodules indéterminés ont un méristème persistant au sommet et obtiennent une forme allongée et l'infection est continue. Les nouvelles cellules nodulaires sont ensuite infectées par des rhizobiums résidant dans l'ancienne zone d'infection. En revanche les nodules déterminés ont un méristème à la périphérie et de courte durée, ceci n'est actif qu'aux premiers stades du développement, ce qui donne une forme sphérique (STAMBULSKA, 2018; REN, 2018).

Les nodules indéterminés les mieux caractérisés sont ceux de Medicago et du pois, par exemple, et des nodules déterminés typiques sont formés par exemple par le soja, le haricot commun et le lotus (REN, 2018).

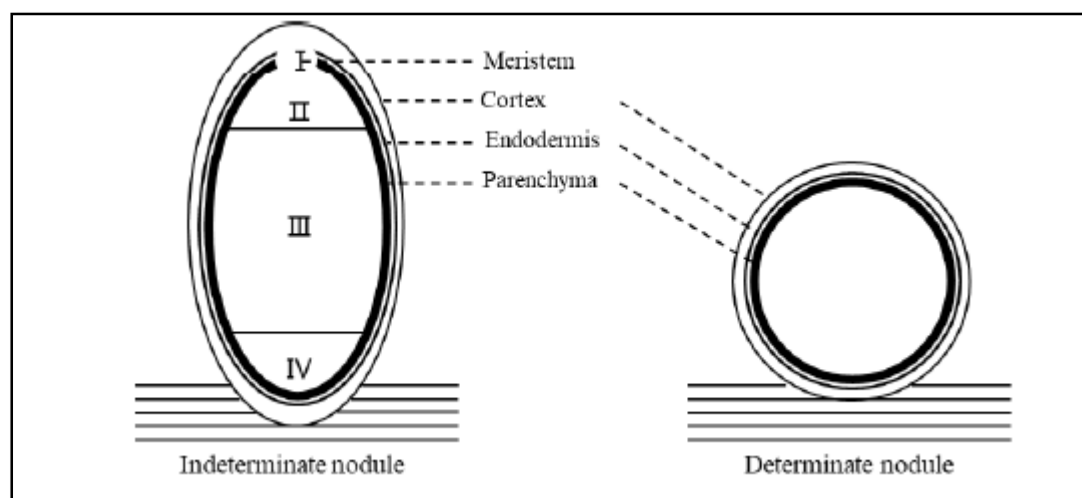


Figure 5 : Nodules indéterminés et déterminés (REN, 2018).

5. L'inoculation

Les producteurs de légumineuses fourragères appliquent un inoculant rhizobial commercial au moment de l'ensemencement afin de promouvoir la nodulation efficace et l'établissement de la relation symbiotique.

Les souches de rhizobium présentes dans l'inoculant doivent être en compétition pour les sites d'infection des racines avec des souches indigènes dans le sol (KNIGHT, 2015).

Cette technique pourrait protéger l'environnement contre la pollution par l'azote. En outre, il augmente le rendement et la qualité nutritionnelle du fourrage qui améliore la production animale (TOUNSI *et al.*, 2016).

5.1. L'importance de l'inoculation

L'utilisation d'inoculants de rhizobium dans la production de luzerne représente un moyen important d'obtenir une amélioration de FSA. Ils contiennent des rhizobiums vivants compétitifs sélectionnés pour un potentiel de fixation de N₂ très élevé et / ou d'autres caractères particuliers. L'inoculation artificielle par des rhizobia réduit la nécessité d'utiliser des engrais minéraux azotés, augmente le rendement de la luzerne, augmente la teneur en azote total des plantes et la teneur en protéines des graines (DELIC *et al.*, 2016).

La pré-inoculation de graines de légumineuses avec des rhizobiums est une pratique agricole traditionnelle. Toutes les méthodes d'inoculation ont été effectuées pour comprendre leurs effets sur la dynamique de migration et de colonisation des rhizobiums dans les plantes de luzerne (MIAO *et al.*, 2017).

6. Relation entre génotype de plante et souche bactérienne

Une caractéristique frappante de la symbiose légumineuse - rhizobienne est son haut niveau de spécificité. Les plantes acquièrent des rhizobiums du sol grâce à un processus de signalisation complexe dans lequel les bactéries pénètrent dans des nodules racinaires spécialisés, où ils fixent l'azote en échange de carbone dérivé des plantes.

L'établissement d'une interaction réussie nécessite une reconnaissance du signal entre les deux partenaires symbiotiques. Ainsi, l'évolution de la spécificité de l'hôte implique à la fois des gènes rhizobiens et hôtes (WANG *et al.*, 2012 ; WESTHOEK *et al.*, 2017)

La forme rhizobienne n'est pas parfaitement alignée avec la forme physique de la plante hôte, bien que chaque nodule soit habituellement occupé par les descendants clonaux d'un seul rhizobium, une plante est habituellement infectée par de multiples souches rhizobiennes. Ainsi, une souche non fixatrice peut potentiellement prospérer en prenant des

ressources végétales tout en laissant le processus coûteux de fixation de l'azote à d'autres (WESTHOEK et al., 2017).

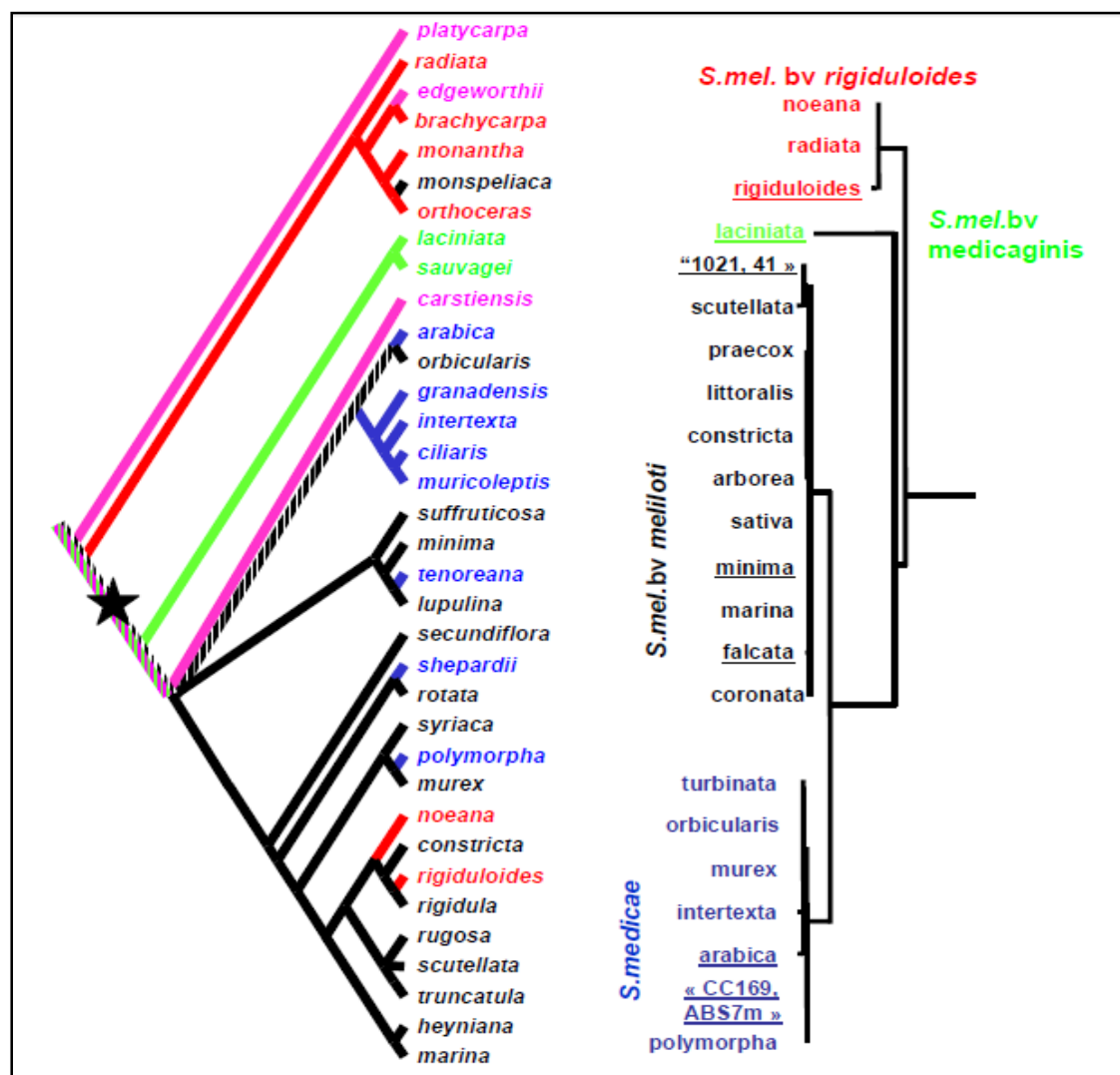


Figure 6: Phylogénies moléculaires des espèces végétales (à gauche) et des bactéries symbiotiques associées (à droite). Des couleurs identiques entre plantes et bactéries indiquent un résultat positif (fix+) en termes d'association symbiotique. La réciprocity d'association est exclusive pour les groupes 1 (rouge) et 2 (vert) de spécificité. Les espèces végétales en bleu s'associent uniquement avec les souches en bleu (en l'occurrence, *Sinorhizobium medicae*), alors que les espèces en noir s'associent efficacement avec les souches noires et bleues. Les espèces en rose n'ont montré aucune fixation effective lors des tests, et on ne connaît aujourd'hui pas leurs symbiotes associés (ou les conditions expérimentales où cette symbiose s'exprime effectivement). L'étoile suggère une modification majeure de spécificité au cours de l'évolution. Les souches soulignées sont celles ayant été utilisées pour les tests d'inoculation (BENA, 2008).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

1. Matériel d'étude

1.1. Le substrat de culture

Nous avons utilisé, dans le cadre de cette étude, un sable des dunes apporté localement de la région de Ouargla (région de Sidi Khouiled).

1.2. Le Matériel végétale

Le matériel végétal retenu pour notre essai est composé de trois Ecotypes locales de luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.).

Les graines que nous avons utilisées proviennent de différentes régions sahariennes à l'exemple de :

- Première Ecotypes (V1) : provient de la région d'El Meniaa;
- Deuxième Ecotypes (V2) : provient de la région de Ouargla;
- Troisième Ecotypes (V3) : provient de la région de Djamaa.

1.3. Le matériel microbiologique

Nous avons utilisé dans notre étude huit souches rhizobiennes isolées à partir de nodosités prélevées exclusivement de la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) (voir tableau1). Ces souches ont été sélectionnées parmi une soixantaine d'autres préalablement caractérisées vis-à-vis des facteurs pédoclimatiques prédominants dans les sols sahariens (pH, températures, salinité...etc.), des facteurs biotiques (résistance aux antibiotiques) et des réponses symbiotiques avec la plantes hôtes (HAIDOUS et SENOUSI, 2016, DJOUDER et KIBOUA, 2016 ; FECIH, 2016 ; RAMDANI et BOUKARANA, 2016).

- Six souches proviennent de différentes zones agricoles appartenant aux deux régions : Ouargla et El Oued.
- Deux souches références (*Sinorhizobium meliloti* 2011 et *S. meliloti* 1021) fournies par le laboratoire de l'INRA de Toulouse (France).

1.4. Les milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés pour la multiplication et la culture des souches bactériennes sont:

- **Milieu solide :** YMA (Yeast Manitol Agar) est un milieu de culture solide, mis au point par VINCENT (1970). Ce milieu est utilisé pour la croissance et la conservation des bactéries fixatrices d'azote dans les nodules.
- **Milieu liquide :** YMB (Yeast Manitol Broth) (VINCENT, 1970), bouillon de culture qui possède la même fonction, qui est totalement liquides.

Tableau 2 : Composition du milieu YEM (VINCENT, 1970).

Les composants	Quantité (g/l d'eau distillée)
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	10
Extrait de levure	0.5
Eau distillée	1000 ml

Pour obtenir un milieu solide, il convient d'ajouter 15 grammes par litre de gélose (agar-agar).

Tous les milieux, dont le pH a été ajusté à 6,8 par NaOH et du HCl, sont stérilisés à 120°C pendant 20 minutes dans un autoclave. La verrerie est stérilisée à 180°C dans un four Pasteur pendant 30 minutes. Il est à noter que toutes les manipulations microbiologiques sont effectuées dans des conditions stériles, c'est-à-dire, autour de la flamme du bec Bunsen.

1.5. La solution nutritive de Fahraeus

C'est la solution nutritive sans azote (VINCENT, 1970) dont la composition est mentionnée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composition du milieu Fahraeus.

Macroéléments		Microéléments	
Les composants	Quantité (g/l)	Les composants	Quantité(g)
NaH ₂ PO ₄	0.15	H ₃ BO ₃	0.57
KH ₂ PO ₄	0.1	MnSO ₄ 7H ₂ O	2.03
CaCl ₂	0.1	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.22
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.08
Citrate de ferre	0.005	H ₂ MoO ₄ H ₂ O	0.08
Eau distillée	1000 ml	Eau distillée	1000 ml

2. Méthodes d'étude

2.1. Préparation du substrat de culture

2.1.1 La déminéralisation et stérilisation du sable

Avant son utilisation, le sable a subi un lavage selon les étapes décrites par FAO (1993). Un traitement à l'esprit de sel (d'Acide Chlorhydrique H₃O+Cl⁻) pendant 15 à 20 minutes pour éliminer les carbonates de chlorures et de sel. Ensuite, le sable est rincé à l'eau douce 5 à 6 fois afin d'éliminer toute trace de chlore et les 2 derniers lavages à l'eau distillée.

Il est ensuite épandu à l'air libre pendant 3 jours, pour subir un séchage naturel, ainsi on obtient un support inerte à la plante. Puis, une stérilisation s'en suit dans un plateau galvanisé au four pasteur pendant 2 heures à 180°C.



Photo 1: La déminéralisation du sable

2.1.2. Analyses physico-chimiques du sable c

Une partie des échantillons a été analysée au Laboratoire de Recherche des Bioressources Sahariennes (BRS) pour les analyses de sable qui ont porté sur les propriétés suivantes :

Le pH : C'est un indicateur de l'état de fertilité du sol. Il fournit des informations sur l'activité microbienne du sol, sur la présence de certains sels toxiques et sur le degré d'assimilabilité des éléments par les plantes (PANSU et GAUTHEYROU, 2003). Le classement de pH de sol a été fait selon les normes internationales (Annexe 1). Il est déterminé par la méthode électrométrique (pH mètre), selon un rapport sol/eau (1/2,5).

La conductivité électrique (CE) : la mesure de la conductivité du sol renseigne sur sa salinité. Elle est déterminée par le conductimètre avec un rapport sol/eau (1/5). Les normes de salinité sont mentionnées dans l'annexe 1.

2.2. Germination des grains

Selon la méthode utilisée par MOURADI *et al.* (2015) et FARISSI *et al.* (2016), les graines ont été mises à germer à 25 °C dans l'obscurité totale dans des boîtes de Pétri contenant un papier filtre arrosé par l'eau distillée. Trois répétitions de 20 graines par répétition ont été effectuées. Une graine a été considérée germée lorsque la radicule dépasse de 2 mm du tégument de la graine. La durée de l'expérience recommandée est de 06 jours, pendant laquelle on compte quotidiennement le nombre de graines germées (germination physiologique).

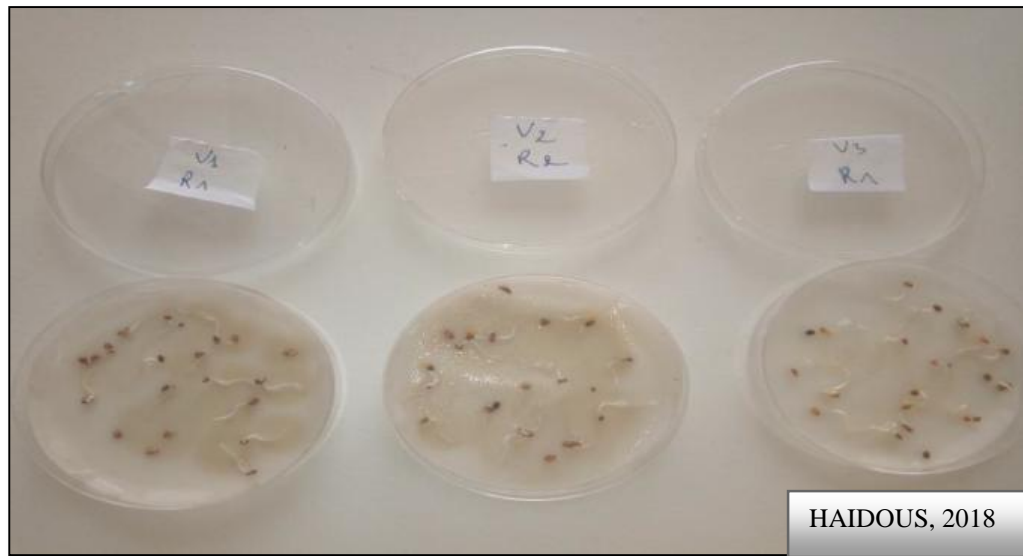


Photo 2: Aspect des graines germées des trois variétés de luzerne après 48 heures de l'incubation à 25°C.

2.3. Désinfection et prégermination des graines

La désinfection se fait selon la méthode de SOMASEGARAN et HOBEN (2012):

- ✓ Tout d'abord, les graines sont désinfectées à l'alcool éthylique (95%) pendant 10 à 30 secondes ;
- ✓ Ensuite, elles sont désinfectées superficiellement dans une solution d'hypochlorite de sodium pendant 10 min et rincées soigneusement 10 fois avec de l'eau distillée stérile ;
- ✓ Enfin, elles sont placées dans des boîtes stériles, et trempées dans l'eau distillée stérile pendant une nuit au réfrigérateur.

2.4. Production d'inoculum

Cette étape est réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de la Faculté SNV. Nous avons veillé durant cette étape à ne pas contaminer nos différents tubes en travaillant dans les meilleures conditions d'asepsie autour de la flamme du bec Bunsen.

2.4.1. Repiquages des bactéries

Les souches sont repiquées dans les boîtes de pétri contenant du milieu YMA. Les boîtes sont ensuite mises en incubation à 28°C pendant trois jours (VINCENT, 1970).

2.4.2. Ensemencement des tubes

Pour la production d'inoculum, les souches sont ensemencées dans un milieu liquide (YMB) et incubées à 28 °C pendant 3 jours, avec une agitation à 220 tr/mn (VINCENT, 1970).

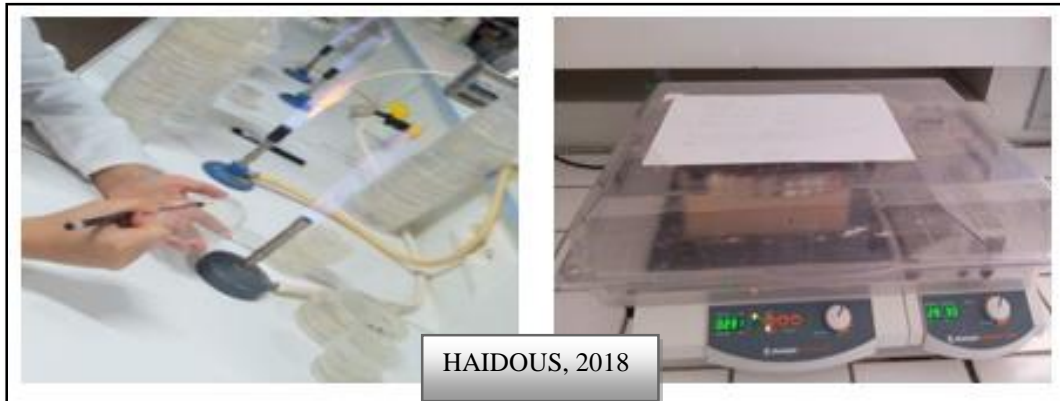


Photo 3: Production d'inoculum rhizobien.

2.5. Le semis et l'inoculation des graines

Le semis a été effectué le 27 Novembre 2017. Les graines sont semées dans les pots contenant le sable préalablement déminéralisé et stérilisé. Nous avons mis 3 graines par pot de chaque variété, à une profondeur ne dépassant pas 1cm. Les semences sont bien couvertes et tassées légèrement afin de favoriser un meilleur contact sol-graine.

Chaque pot est inoculé avec 1ml de la suspension bactérienne, fraîchement récoltée. Les densités optiques de toutes les souches de départ sont uniformisées à fin de garantir un même nombre de bactérie ($\approx 10^9$ bactéries/ml).

Un total de 81 pots a été utilisé. Neuf pots n'ont pas été inoculés et serviront comme des témoins.



Photo 4 : Semis et inoculation des graines

2.6. Irrigation et suivi des plantes

Les pots ont été placés sous serre. Ils sont irrigués régulièrement trois fois par semaine par 100 ml de la solution nutritive Fahraeus (SOMASEGARAN et HOBEN, 1985).

2.7. Prélèvements des plantes

Les récoltes ont eu lieu les 12 et 13 février 2018, c'est à dire après deux mois et demi d'expérience. Les pots sont transférés au Laboratoire Pédagogique de la Faculté SNV pour l'étude de la croissance des plantes et l'observation des résultats de la nodulation.

Les plantes entières sont soigneusement prélevées afin d'éviter de possibles pertes de nodosités, puis les racines sont rincées à l'eau de robinet et rapidement séchées à l'aide du papier hygiénique.



Photo 5: Récolte des plantes.

2.8. Paramètres étudiés

2.8.1. Mesure de la croissance

Dans ces mesures on a intéressé par la croissance de la partie aérienne et celle de la partie souterraine.

Les parties aériennes et souterraines des plantes sont coupées séparément au niveau du nœud cotylédonaire, ensuite à l'aide d'une règle graduée, on effectue les mesures de longueur des deux parties.

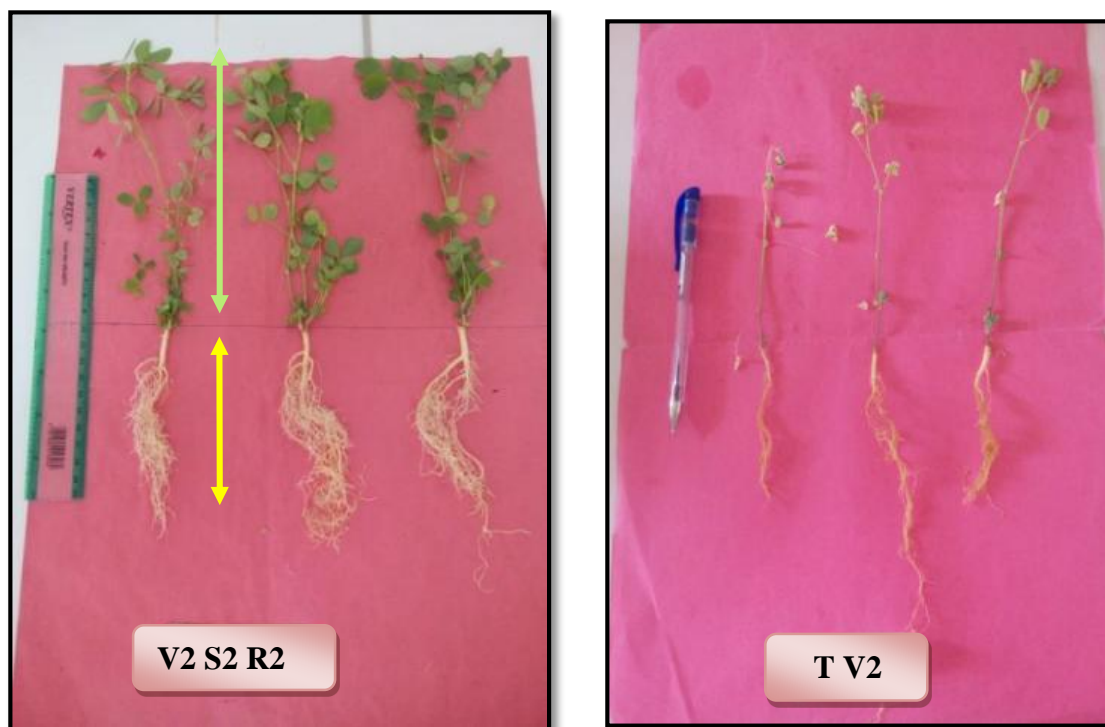


Photo 6 : Mesure de la croissance des différentes parties végétales

2.8.2. L'étude de la nodulation

A l'œil nue nous avons comptés le nombre des nodules à l'état frais, puis déterminer s'ils sont fixateurs d'azote, par recherche les nodules ont la couleur rouge ou rose résultant de la production de légghémoglobine.



Photo 7 : Etude de la nodulation dans les parties souterraine

2.8.3. Poids des parties aériennes et souterraines

Les mesures de poids ont été effectuées selon la méthode utilisé par (LAMPTEY et *al.*, 2014) et (TAREKEGN et KIBRET, 2017).

2.8.3.1. Le poids humide: nous avons déterminé Le poids humide, à l'aide d'une balance de précision électronique, le poids des deux parties à l'état frais.

2.8.3.2. Le poids sec : chaque partie est mise dans du papier aluminium portant le code de la souche. Le poids sec des deux parties est déterminé après séchage à l'étuve réglée à 70°C pendant 48 h.



Photo 8 : Mesure de poids frais et sec des parties aériennes et souterraines des plantes et conservation dans le papier aluminium

2.8.4. L'azote total

Pour estimer la quantité d'azote fixé par le biais de la fixation symbiotique, nous avons réalisé un dosage d'azote total par la méthode de KJELDAHL, sur la partie aérienne de la matière végétale (ISO, 1997).

Cette méthode consiste à broyer l'ensemble des parties aériennes des plantes pour avoir un échantillon pour chaque condition, pour chaque variété. Ensuite, la matière organique contenue dans l'échantillon est minéralisée par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur. L'azote organique est réduit en ammoniac sous forme de sulfate d'ammonium. L'échantillon est distillé ensuite par neutralisation avec la soude à 40% d'hydroxyde de sodium, et piégeage par l'acide borique et titré par l'acide sulfurique (0.1 N) (ISO, 1997).



Photo 9: Préparation des échantillons



Photo 10: digesteur à étape minéralisation



Photo 11 : Etape de distillation

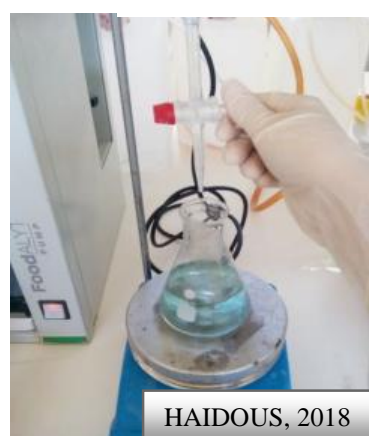


Photo 12 : Etape de titrage

2.9. Traitements statistiques

Pour le traitement statistique de nos résultats, l'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée. Nous avons utilisé le logiciel XLSTAT version d'évaluation téléchargé de site officiel XLSTAT.

Chapitre III
Résultats et discussions

1. Caractéristiques physico-chimiques du substrat de culture

Les résultats des différentes analyses physico-chimique de nos échantillons de sable figurent dans le tableau 4. L'interprétation des résultats est faite selon les normes présentées en annexes.

Tableau 4 : Résultats des analyses physicochimiques de sable

Paramètre	(A) Sable non déminéralisé	(B) Sable déminéralisé
T °C	24.53	22.2
CE (dS/cm)	2.16	1.03
pH	7.13	6.6

A partir des résultats ci-dessus, nous avons remarqué que les paramètres étudiés montrent que le sable présente des variations entre l'état initial et après traitement.

Selon l'échelle USSL (1954) et AUBERT (1978), les valeurs indiquées (tableau), montrent que le substrat de culture (sable) analysé avant la déminéralisation présente des valeurs de conductivité électrique élevées (moyenne de 2,16) indiquant un sable salé et le pH (7,13) est très légèrement alcalin.

La déminéralisation du sable a permis de faire descendre les valeurs de conductivité électrique à une moyenne de 1.03, le rendant ainsi peu salé. Le pH (6.6), quant à lui, est très légèrement acide.

D'après ORLOFF (2007), la disponibilité maximale des nutriments pour la plupart des cultures se produit lorsque les valeurs de pH se situent entre 6,0 et 7,0. Cependant, des valeurs de pH plus élevées (6.3 à 7,5) sont recommandées pour la production de luzerne car ils favorisent l'activité des bactéries *Rhizobium* fixatrices d'azote.

Les valeurs de CE supérieures à 2,0 (ds/cm) peuvent diminuer les rendements en luzerne, en fonction des ions spécifiques présents dans la solution sol-eau.

Selon les types de sols où on peut cultiver la luzerne (idéaux, marginaux et indésirables) cités par ORLOFF (2007), on conclut que le sable utilisé ne pose pas de problèmes ou de propriétés nuisibles au processus de symbiose Rhizobium légumineuse.

2. Faculté germinative des graines de luzerne

Le pouvoir germinatif des grains est évalué à l'aide d'un test de germination réalisé au laboratoire selon les normes internationales en vigueur (ISTA, 1999). Il a pour but de déterminer la capacité germinatif après une période d'incubation.

Après germination des graines, des plantules dont la longueur des racines ne dépasse pas 2 cm sont obtenues. Le taux de germination des graines des trois variétés de luzerne, est estimé, en utilisant la formule détecté par (FARISSI et *al.*, 2016) :

$$\text{Germination (\%)} = (N_t / N_i) \times 100$$

Avec : **N_t**, le nombre de semences germées au temps t ;

N_i, le nombre de semences mises à germer.

Les semences utilisées présentent les caractères résumés dans le tableau suivant :

Tableau 5: Résultats de test germinatifs

variétés	Poids de mille graines (PMG)	Taux de germination
V1	2.06	92.5%
V2	1.56	85 %
V3	2.48	97.5%

Des pourcentages finaux de germination d'ordre de 92,5 %, 85% et 97,5% ont été enregistrés respectivement chez les graines des trois variétés : V₁, V₂ et V₃.

La faculté germinative est satisfaisante chez les variétés V₁ et V₃, car d’après FOURY (1954) *in* CHAABNA (2001), elle doit être considérée comme telle si elle est supérieure à 89%. Elles sont caractérisées aussi par un poids de 1000 grains (PMG) le plus élevé. Le pourcentage de germination le plus bas est enregistré chez la variété V₂ avec 85 % et caractérisés par un PMG le plus faible. Cela est dû, peut-être, à un facteur intrinsèque ou extrinsèque à la graine.

3. Présentation et analyse des résultats du test symbiotique

La capacité symbiotique des souches rhizobiennes est évaluée par deux paramètres :

- L’infektivité de chaque souches signifie par le nombre de nodosités formées sur la racine de chaque plante;
- L’efficacité des souches en fonction de la croissance des plantes (hauteur des tiges, longueur des racines), le poids frais et secs des parties végétatives et la quantité d’azote fixé en comparaison avec des plantes témoins non inoculés. Les résultats se traduisent sous forme des histogrammes.

3.1. Résultats de la croissance des plantes

L’effet de l’inoculation sur la croissance des différentes parties végétatives est indiqué dans les figures ci-dessous où des différences existent entre les trois variétés de luzerne.

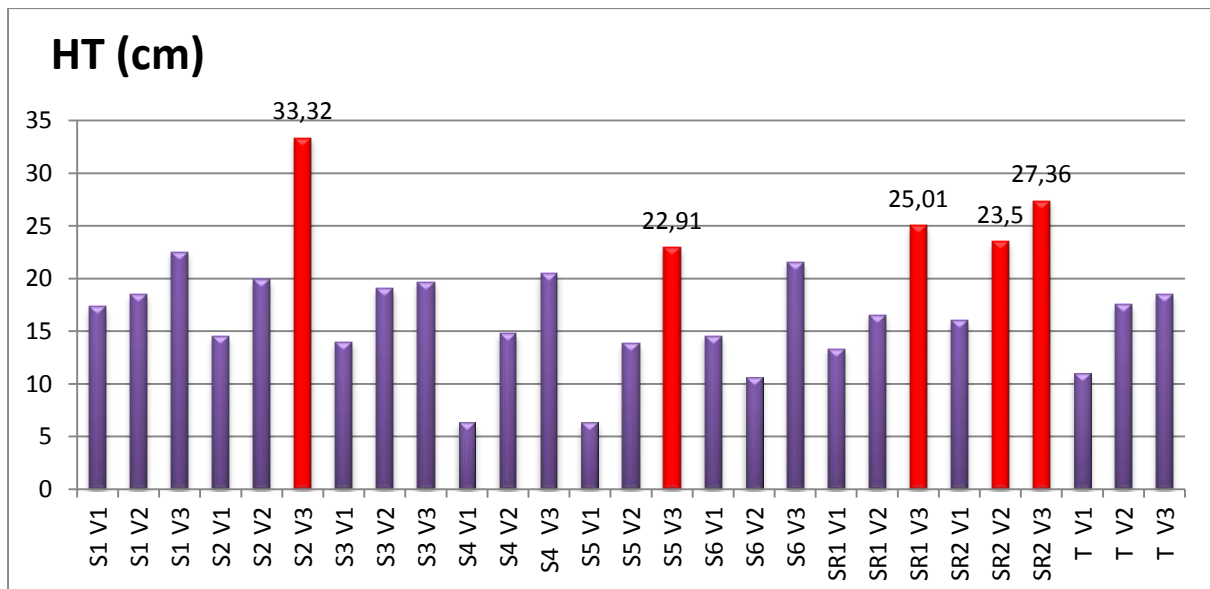


Figure 7 : Effet des souches sur la hauteur des tiges des différentes variétés.

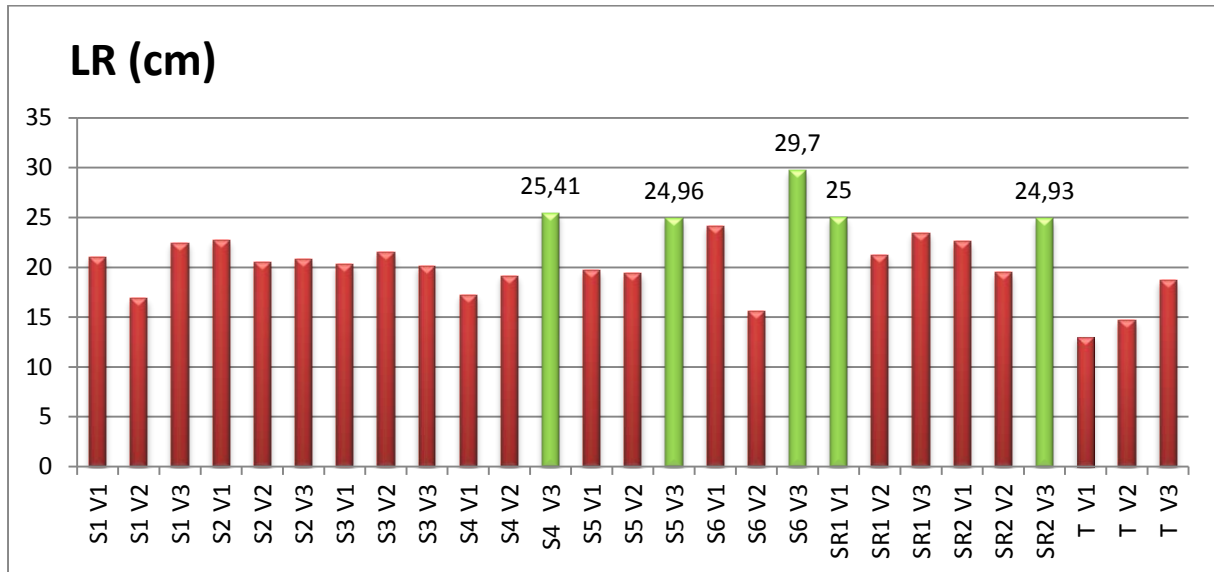


Figure 8 : Effet des souches sur la longueur des racines des différentes variétés.

L'effet de l'inoculation sur la croissance des plantes hôtes varie en fonction des souches bactériennes testées.

Pour la croissance des plantes, les meilleures croissances des tiges sont enregistrés par la condition S_2V_3 (moyenne de 33.32 cm), suivie respectivement par les conditions SR_2V_3 (moyenne de 27.36 cm), SR_1V_3 (moyenne de 25.01 cm), SR_2V_2 (moyenne de 23,5 cm) et S_5V_3 (moyenne de 22,91 cm).

Les résultats montrent que le traitement d'inoculation qui donne une longueur de racines la plus améliorée est enregistré chez les plantes des conditions S_6V_3 (moyenne de 29.70 cm), suivie respectivement par S_4V_3 (moyenne de 25.41 cm), SR_1V_1 (moyenne de 25 cm) et SR_2V_3 (moyenne de 24.93 cm).

Les témoins (plantes sans inoculation) ont eu une croissance faible, par rapport aux moyennes des plantes inoculées, avec des hauteurs moyennes des tiges de 11 cm et longueur des racines de 13 cm.

Les résultats obtenus montrent que, l'inoculation a amélioré favorablement le développement des parties aériennes et des parties racinaires par rapport aux témoins (TV_1 , TV_2 , TV_3).

D'après SAJID *et al.*, (2011) et GAO *et al.*, (2018), les traitements d'inoculation par les rhizobia ont donné des résultats supérieurs à ceux non inoculés. La raison de ceci pourrait être la quantité adéquate d'azote fixée par les Rhizobia.

RAVIKUMAR (2012), a montré aussi que tous les paramètres de croissance et de rendement sont augmentés par rapport aux témoins et sont statistiquement significatifs. Ces augmentations significatives de la croissance et du rendement sont dues aux inoculums de Rhizobium.

Par conséquent, il est conclu que les inoculums commerciaux de Rhizobium utilisés pour l'inoculation des plantes, à savoir les variétés, entraînent des augmentations de la croissance et du potentiel de rendement par rapport aux plantes témoins non inoculées.

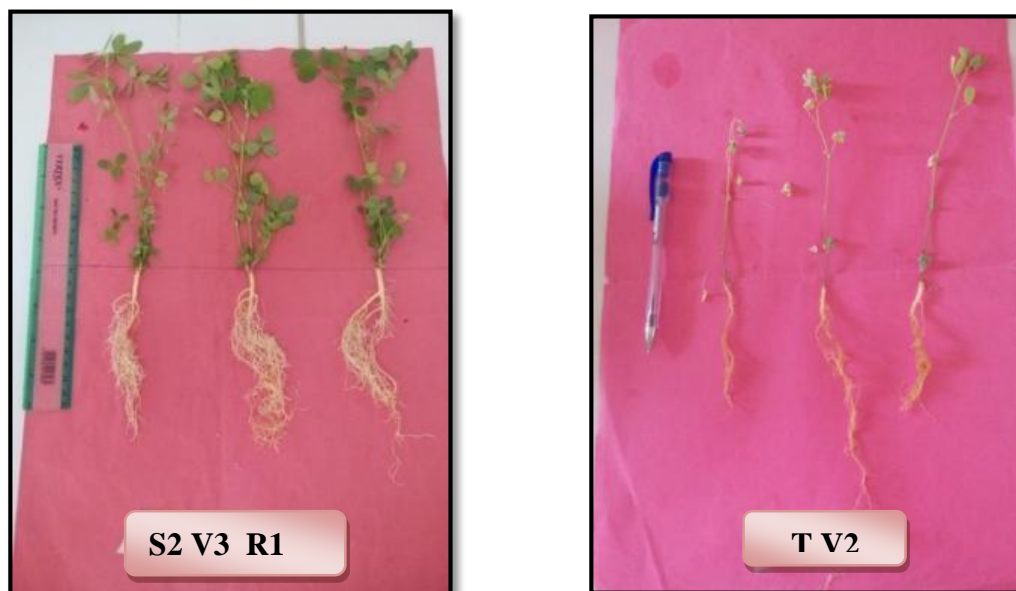


Photo 13 : Aspect des deux parties végétatives de la plante inoculé après deux mois et demi de croissance.

3.4. Résultats de poids frais des plantes

Il y avait des différences remarquables entre les plantes inoculées et non inoculées (plante témoin) en ce qui concerne le poids frais. La figure, ci-dessous montre l'effet d'inoculation sur le poids frais des plantes entière .

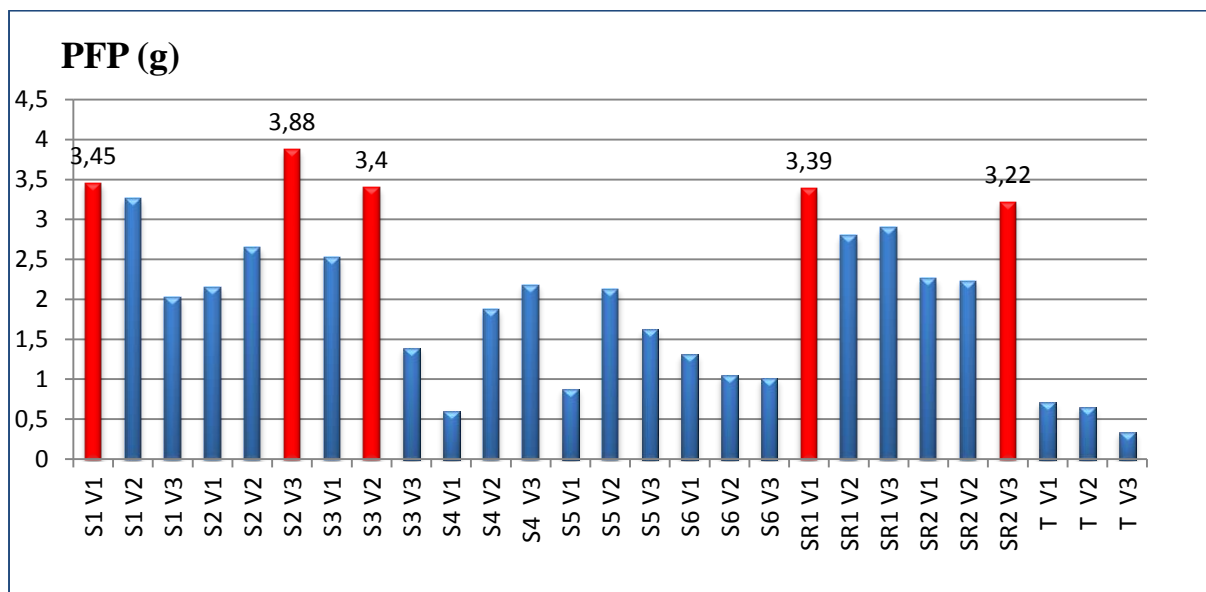


Figure 9 : Evolution du poids frais des plantes entières.

Le poids frais le plus élevé est observé chez les plantes des conditions S₂V₃, S₁V₁, S₃V₂, SR₁V₁ et SR₂V₃ avec des moyennes de (3,88 g), (3,45g), (3,40 g), (3,39 g), (3,22 g). Les poids frais les plus faibles sont ceux enregistrés avec la combinaison S₄V₁ avec 0.6 g seulement.

Le T (témoin) reste toujours la condition montrant les valeurs les plus faibles et cela avec les trois variété TV₃ (0.34 g), TV₂ (0.65 g), TV₁ (0,71 g) . Le poids frais des plantes T n'a pas dépassé en aucun cas celui des plantes inoculées par les souches rhizobiennes.

Les effets positifs d'inoculation sur le poids frais de la luzerne ont été documentés par ELNESAIRY *et al.*, (2005) et ZHOU *et al.*, (2017)

BOUGHRIBIL *et al.* (2018), ont rapporté que cette différence dans la production de biomasse fraîche a été attribuée au pouvoir de fixation de l'azote des différentes souches testées.

3.5. Résultats du poids sec des plantes

Des résultats a été observée en ce qui concerne l'effet d'inoculation sur le rendement en biomasse sèche des plantes, illustré par la figure suivant.

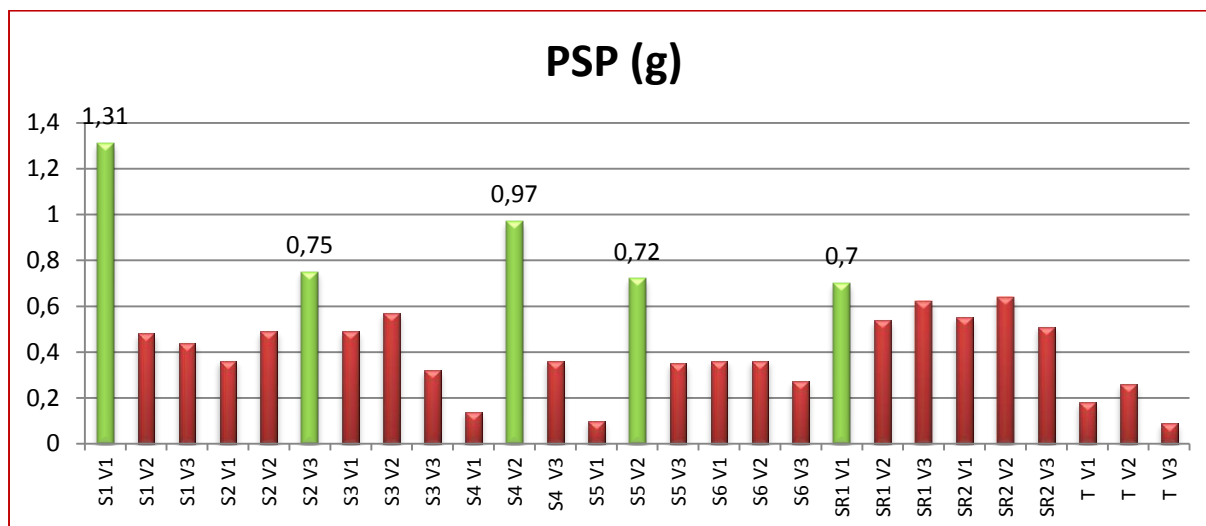


Figure 10 : Evolution du poids sec des plantes entières.

Les plantes qui donnent la plus grande masse sèche sont celles des conditions S₁V₁, S₄V₂, S₂V₃, S₅V₂, SR₁V₁ avec des moyennes respectives de (1.31g), (0.97g), (0.75g), (0.72g), (0,70 g) et la plus faible production est présentée par S₅V₁ avec (0.10 g) de matière sèche.

Les plantes témoins (T) montrent la masse sèche la plus faible avec seulement 0.09 g (TV₃).

Le poids sec des plantes inoculées, dépasse celui des plantes témoins, ce qui montre que l'inoculation avec diverses souches rhizobiennes augmente le poids sec des plantes.

Cette étude montre qu'il y avait un effet positif de l'inoculation par les souches sur le poids sec des différentes variétés de luzerne. Il a été conclu que l'inoculation par les rhizobia a considérablement amélioré le rendement en matière sèche de la plante. Des résultats similaires ont été aussi trouvés par plusieurs auteurs (SAJID *et al.*, 2011; ELNESAIRY *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2017) .

Les mêmes conclusions ont été aussi signalées par BOUGHRIBIL *et al.* (2018), qui ont montré que le rendement en matière sèche des parties aériennes par plante a augmenté en fonction du temps.

3.6. Résultats du nombre total des nodules

Les nodosités formées sur les racines de chaque plante ont été dénombrés. Une variabilité de la capacité infective des souches a été mise en évidence (Figure 11).

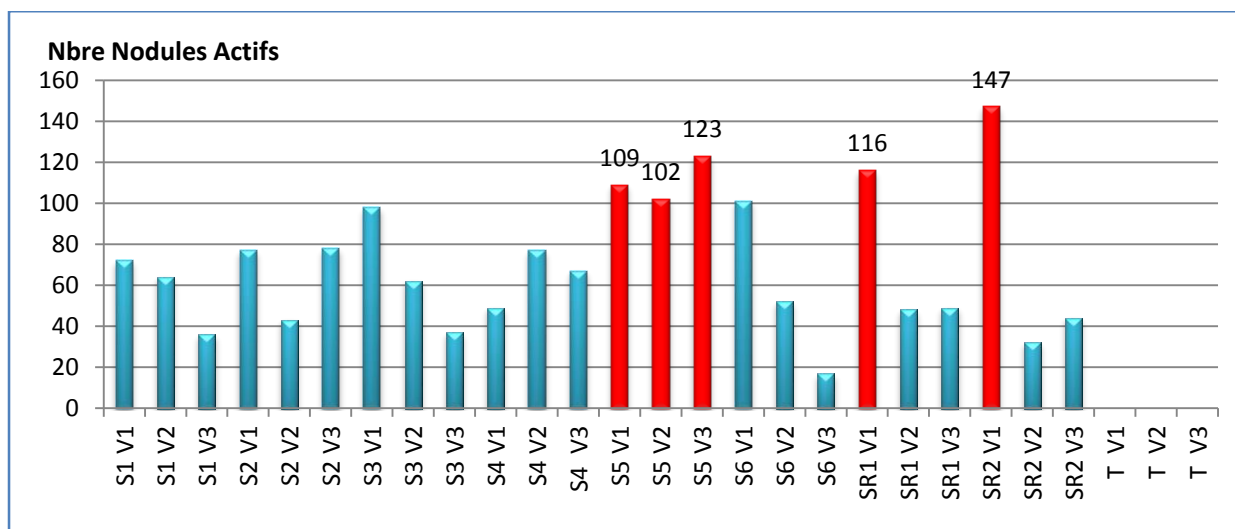


Figure 11: L'effet des souches bactériennes sur le nombre de nodules actifs.

Les résultats de la nodulation, présenté dans la figure, montrent que le nombre de nodules formés par plante varie entre 0 et 147, selon les combinaisons étudiés. La moyenne de nodulation enregistrée est de 70,83 nodules/plante.

Les conditions SR₂V₁, S₅V₃, SR₁V₁, S₅V₁ et S₅V₂ présentent les meilleures nodulations (avec respectivement : 147, 123, 116, 109 et 102 nodules/plante). Ces résultats sont dus à l'infectivité élevée des souches rhizobiennes correspondantes (SR₁, S₅ et SR₂).

Le minimum de nodulation a été enregistré chez les plantes de S₆V₃ et SR₂V₂ avec 17 et 32 nodules par plante. Nous remarquons l'absence totale des nodules chez les témoins non inoculés.

L'effet de l'inoculation sur la nodulation varie en fonction des souches rhizobiennes. Ces dernières se sont montrées toutes efficaces avec les trois variétés de luzerne, les résultats sont en accord avec ceux rapportés par BENSELAMA et *al.*(2014)

L'inoculation rhizobienne amélioré la nodulation. Une différence de nodulation est signalée entre les souches utilisées. Nous pouvons noter que nos résultats sont en accord avec ceux de ZHOU *et al.* (2017) et ELNESAIRY *et al.* (2005).

D'après MIAO *et al.* (2017), la faible nodulation de luzerne chez la combinaison S6V3 (17 nodules) peut être associée à un manque de spécificité entre la plante hôte et les rhizobiums.

3.7. La teneur en azote dans les parties aériennes

L'azote est un éléments nutritif nécessaire et limitant pour la croissance des plantes (SANTI *et al.*, 2013). L'étude de l'effet de l'inoculation sur la teneur en azote dans les partie aérienne (figure 12), a montré que l'interaction symbiotique a positivement affecté la fixation azotée par l'association luzerne- rhizobia à cause de la diminution de ce taux chez la plante non inoculé (témoin) par rapport a celles inoculées.

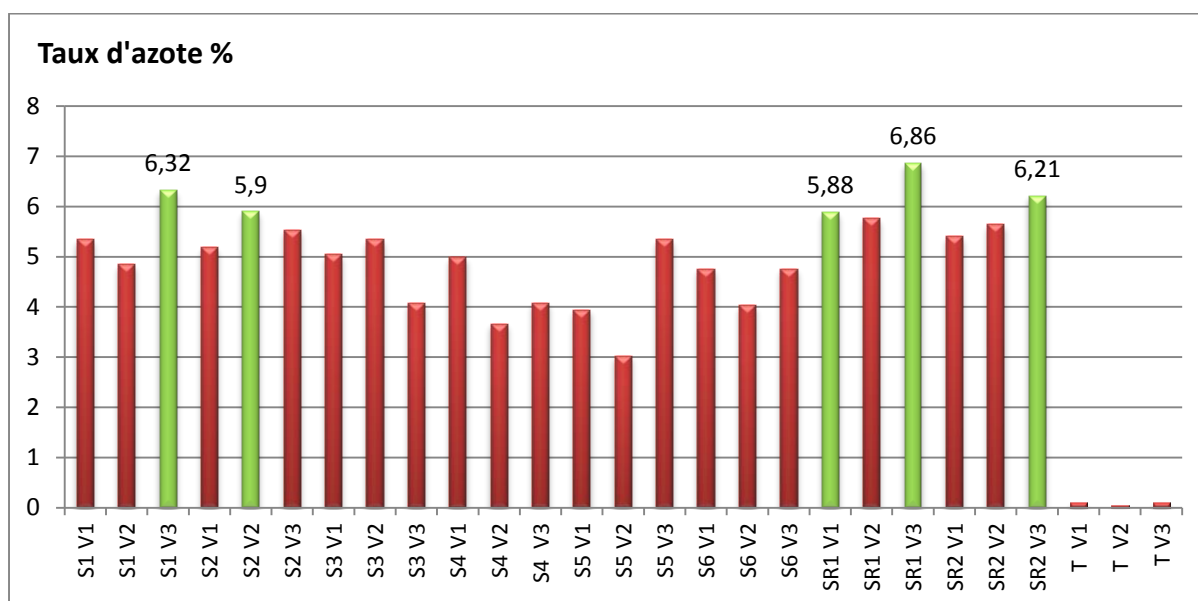


Figure 12 : variation du taux de l'azote total dans les parties aériennes.

Le dosage en azote total dans la matière sèche pour les trois variétés, démontre que la teneur la plus élevée est affichée par la combinaison SR₁ V₃ avec (6.86 %) suivi par les condition S₁ V₃, SR₂ V₃, S₂V₃ et SR₁V₁ avec (6.32 %), (6.21 %), (5,90%) et (5,88%).

Par contre, une baisse de quantité de l'azote dans la partie aérienne est notée chez la combinaison S₅ V₂ avec (3.02%).

les souche SR₁ V₃, S₁ V₃, SR₂ V₃, S₂ V₃ et SR₁ V₁ ont produit les meilleurs rendements en azote . Ce résultat montre que les nodules de ces combinaisons ont exprimé une meilleure capacité de fixation de l'azote. En revanche, la souche locale S₅ V₂ a produit un rendement médiocre, soit près de la moitié de celui fixé par les souches mentionnées avant. Ainsi, cette souche a une faible capacité de fixation de l'azote (BOUGHRIBIL *et al.*, 2018).

Selon les normes des taux d'azote déterminés par la méthode de KJELDAHL (Annexe 2), les teneurs en azote dans les parties aériennes des trois variétés sont comprises entre (3.02%) et (6.86 %), sont donc trop fort, par contre le taux d'azote enregistré chez les témoins > 0.5 donc il est trop faible.

Les rhizobium ont rôle important dans la fixation de N, il augmentait La concentration de N a entraîné une légère augmentation de la croissance des plantes, des résultats similaires ont été trouvés par plusieurs auteurs notamment (GAO *et al.*, 2018).

4. Analyse de corrélation

Afin de déterminer les relations possibles entre les variables mesurées (hauteur des tiges, longueur des racines, la nodosité, le poids sec et le taux d'azote), une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée et les résultats sont présentés dans les figures (13 et 14).

Tableau 6 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés.

Variables	HT (cm)	PST (g)	LR (cm)	PSR (g)	PSP (g)	NA
PST (g)	0,353	1				
LR (cm)	0,417	-0,020	1			
PSR (g)	0,246	0,305	0,207	1		
PSP (g)	0,286	0,648	0,143	0,881	1	
NA	-0,175	0,172	0,342	0,284	0,311	1
N%	0,203	0,271	0,436	0,395	0,389	0,402

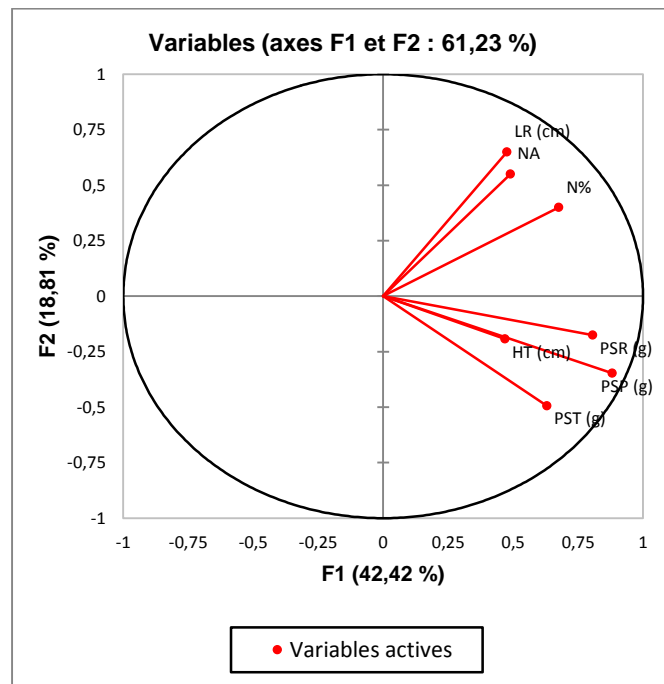


Figure 13 : ACP des différents paramètres étudiés chez les trois variétés de luzerne (graphe des variables).

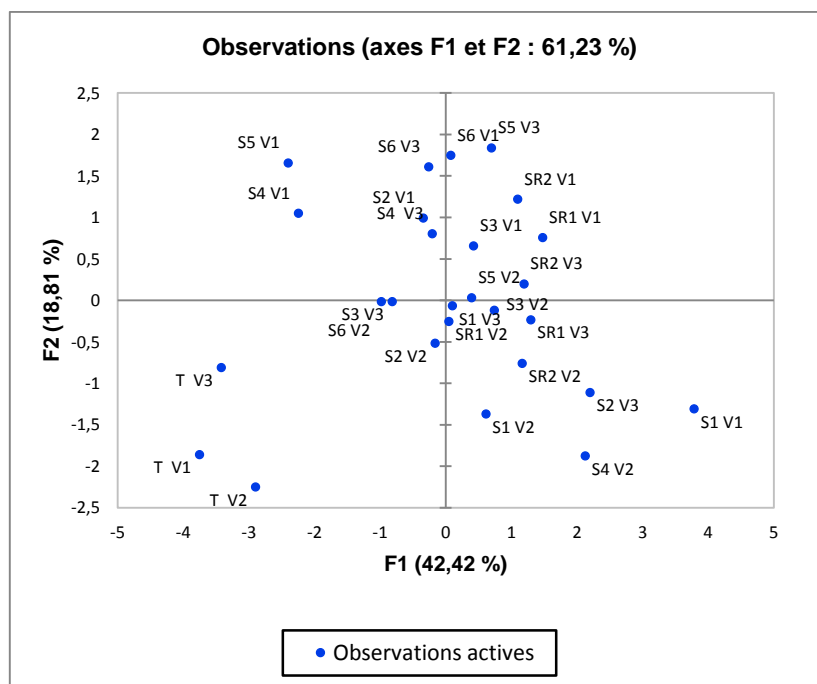


Figure 14 : ACP des différents paramètres étudiés chez les trois variétés de luzerne : graphe des individus.

Les individus sont les 28 combinaisons, les variables sont toutes quantitatives et correspondent aux paramètres mesurés.

Les corrélations des valeurs des variables mesurées avec les premiers axes principaux de l'analyse en composantes principales sont représentées dans la figure 13. Les deux axes (axe F1 et axe F2) de l'ACP expliquent 42,42 et 18,81 % respectivement, soit 61,23 % de la variation totale. Ce pourcentage, est toutefois lié à un nombre de variables important et la relation entre elles. Cela signifie que 61,23 % de la variabilité des données est exprimée sur le plan principal. Le premier axe F1 (42,42 %) , en particulier, est largement prépondérant.

Le graphe des variables (figure 13) montre que la plupart des variables sont projetées c'est-à-dire bien représentées (car la pointe des flèches est proche du cercle de corrélation). La plupart des variables sont fortement corrélées avec le premier axe factoriel (F1). Les variables hauteurs des tiges, poids sec de tige, de racine et de la plante entière sont corrélées positivement. Ces variables sont négativement corrélées avec la longueur des racines et le nombre des nodules.

Par rapport à l'axe factoriel dans le graphe des individus (figure 14), nous avons déterminé les combinaisons qui présentent un niveau élevé de croissance des plantes et de fixation symbiotique de l'azote et celle qui présentant un niveau faible ou nulle.

Les combinaisons à droite sur le graphe (figure 14), comme par exemple SR_1V_1 , SR_2V_3 , S_2V_3 , S_1V_1 , SR_2V_1 etc. caractérisées par une bonne croissance végétative, un nombre des nodules et biomasse sèche importantes et une teneur en azote élevé. Par contre les plantes témoins à gauche sur le graphe caractérisent par des valeurs faible pour toutes les variables.

Conclusion

Le développement de systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluantes et qui permettent de réduire l'usage

CONCLUSION

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 rhizobium –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.

Notre étude a porté sur trois variétés locales de la luzerne (*Medicago sativa* L.) inoculée par six souches rhizobiennes provenant de différentes zones agricoles sahariennes et deux souches de références.

Ce travail a été effectué dans le but d'étudier l'effet de l'inoculation par les souches rhizobiennes sur la croissance et le rendement de la luzerne locale et de sélectionner les meilleurs couples symbiotiques et en fin d'estimer la quantité d'azote biologiquement fixé.

Les résultats obtenus montrent que l'inoculation par les souches rhizobiennes a favorisé le développement des plantes par rapport aux témoins non inoculés.

Une bonne infectivité et une bonne efficacité des rhizobia sont les premiers critères à retenir pour préparer des inoculums efficaces. Pour cela, la croissance des plantes, les meilleures croissances des tiges est enregistré par la condition S₂V₃ (moyenne de 33.32 cm). Aussi, le traitement d'inoculation qui donne une longueur de racines la plus améliorée est enregistré chez les plantes des conditions S₆V₃ (moyenne de 29.70 cm).

Le poids frais le plus élevé est observé chez les plantes de condition S₂V₃ avec une moyenne de 3,88 g/plante. Les plantes qui donnent la plus grande masse sèche sont celles de la condition S₁V₁ avec une moyenne de 1,31g/plante.

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 70,83 nodules/plante. La souche la plus efficace est SR₂V₁ avec une moyenne de nodulation de 147 nodules.

Les rhizobiums ayant les concentrations en N la plus importante ont entraîné une légère augmentation de la croissance des plantes, est affichée par la combinaison SR₁ V₃ avec (6.86 %).

CONCLUSION

Une corrélation positive est remarquée entre les différents paramètres étudiés hauteurs des tiges, poids sec de tige, de racine et de la plante entière, par contre ces variables sont négativement corrélées avec la longueur des racines et le nombre des nodules.

Notre étude nous a permis de sélectionner les combinaisons les plus performantes à partir de différentes conditions. Cinq combinaison sont choisies, à savoir S_2V_3 (Djamaa), SR_2V_3 (Djamaa), S_1V_1 (Meniaa), SR_2V_1 (Meniaa), S_6V_3 (Djamaa). Elles présentent les meilleurs résultats par rapport aux autres combinaisons.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

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

AL-KAHTANI S. N., TAHA E. K. A., AL-ABDULSALAM. M., 2017: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed yield in relation to phosphorus fertilization and honeybee pollination, Saudi Journal of Biological Sciences 24, pp 1051–1055.

ANDREWS M et ANDREWS M. E., 2017 : Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses, Faculty of Agriculture and Life Sciences, Lincoln University, PO Box 84, Lincoln 7647, New Zealand, Int. J. Mol. Sci, 18, 705, 39p.

AUBERT G., 1978 : Méthodes d'analyses de sols. Centre de Documentation Pédagogique de Marseille. CNDP-CRDP, Marseille, France. 191PP.

BENA G., 2008 : Habilitation à Diriger des Recherches Diversité et Evolution des Bactéries Symbiotiques Fixatrices d'azote, Université Montpellier II, 51p.

BENSELAMA A., BTALLAH S., BOUNANE S.M., ABEKKI A., 2014: Effects of inoculation by bradyrhizobium japonicum strains on nodulation, nitrogen fixation, and yield of lablab purpureus in Algeria, Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue: 2, pp 1870-1876.

BERNHARD A., 2010: The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact, Nature Education Knowledge Lead Editor 2(2):12, pp 1-9.

BERRADA H., NOUIOUI I., HOUSSAINI M I., EL GHACHTOULI N., GTARI M and BENBRAHIM K F., 2012: Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco, African Journal of Microbiology Research Vol. 6(25), pp 5314-5324.

BESS B.W et MARLENE M.J., 2014: The microbial nitrogen cycle, Geosciences, Princeton University, Princeton, NJ, USA, Volume 5 / Article 553.

BISWAS B et GRESSHOFF P.M., 2014: The Role of Symbiotic Nitrogen Fixation in Sustainable Production of Biofuels, Centre for Integrative Legume Research (CILR), the University of Queensland, St Lucia Brisbane, QLD 4072, Australia, 15, pp 7380-7397.

BOUGHRIBIL S., ABUMSIMIR B., MONTASSIR L., TAREK F., ENNAJI M.M., BESSI. H., 2018: Effect of Competitiveness on Nodulation and Nitrogen Fixation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), 9 (3), pp 828-833.

CALVET R., 2003 : le sol : propriétés et fonctions, volume 2, France Agricole Editions, 511p.

Références bibliographiques

CATHERINE M-B., JOEL L. S., 2018: Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia — the roots of a success story, *Current Opinion in Plant Biology*, 44: pp 7–15.

CHAABNA A., 2001 : Situation des cultures fourragères dans le sud du Sahara septentrional algérienne et caractérisation de quelque variété introduite et population sahariennes de luzerne cultivée, thèse Magistère, ANFS/AS, Ouargla, p 124.

CLÚA J., RODA C., ZANETTI M E and BLANCO F A., 2018: Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Centro Científico y Tecnológico-La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, 1900-La Plata, 9, 125, 21p.

COLEBATCH G., DESBROSSES G., OTT T., KRUSELL L., OMBRETTA M., SEBASTIAN K., JOACHIM K and MICHAEL K. U., 2004: Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*, *The Plant Journal*, 39, pp 487–512.

DE LA PEÑA T. C., FEDOROVA. E., PUEYO J J., AND MERCEDES M. L., 2017 : The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle?, *Front Plant Sci*, volume 8.

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

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

DJOUDE K et KIBOUA W., 2016 : Inoculation de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par des souches rhizobiennes provenant de différents sols de la région de Ouargla. Projet de fin d'Etude Licence Académique, Université KASDI Merbah, Ouargla 32 p.

DREVON J-J., SIFI B., 2003 : fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le bassin méditerranéen, Edition Quae, 417 p.

ELNESAIRY N.N.B., ELSHEIKH E.A.E and MAHDI A.A., 2005: Effect of Rhizobium inoculation and nitrogen fertilization on alfalfa under irrigation, *Trop. Sci*, 45, pp14–18.

ERNESTO O.O., LUIS E.S.G., MARCO A.R., VÍCTOR G.H.P., JAIME M, JULIO M.R. et ESPERANZA M.R., 2015: Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics, *Systematic and Applied Microbiology* 38, pp 287–291.

FARISSI M., MOURADI M., BOUIZGAREN A., GHOULAM C., 2016 : Amélioration de la germination de la luzerne (*Medicago sativa* L.) sous stress salin par traitement pré-germinatif, *Fourrages*, 228, pp 261-264.

Références bibliographiques

FECIH T., 2016: Effet des différents facteurs prédominants dans les sols sahariens sur la croissance des souches autochtones de *Sinorhizobiums meliloti*. Mémoire Master Académique, Université KASDI Merbah, Ouargla. 56 p.

Food and Agriculture organization of the United Nations., 1993: technical handbook on symbiotic Nitrogen fixation : legume/Rhizobium, Edition illustrée, révisée, 162 p.

GAO P., GUO Y., LI Y., DUAN T., 2018: Effects of dual inoculation of AMF and rhizobium on alfalfa (*Medicago sativa*) root rot caused by *Microdochium tabacinum*, Australasian Plant Pathology, 9 p.

GENERMONT S., CELLIER P., 2016: l'azote, si cher à nos campagnes nitrogen, so dear but so expensive to our countryside, UMReCosys, inra, agroparistech, universitéparis-saclay, POLLUTION ATMOSPHERIQUE - NUMÉRO SPÉCIAL, pp 116-129.

GILES E.D., OLDROY D., DAWNIN J.A., 2004: Calcium, Kinases and nodulation signalling in legume. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, pp 566-576.

HAIDOUS C., SENOUSSE K., 2016: Inoculation de la luzerne (*medicago sativa* L.) par des souches rhizobiennes provenant de différents sols de la région d'El oued. Projet de fin d'Etude Licence Académique, Université KASDI Merbah, Ouargla 32p.

HERRMANN D., FLAJOULOT S., BARRE P., HUYGHE C., RONFORT J., JULIER B., 2017: Comparison of morphological traits and molecular markers to analyse diversity and structure of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars, Genet Resour Crop Evol, 14 p.

ISO., 1997 : Aliments des animaux. Détermination de la teneur en azote et calcul de la teneur en protéines brutes-Méthode Kjeldahl.ISO 5983.

ISTA, 1999: International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technol., 27: 31.

IGOR S. K., PRATYUSH R., SENJUTI S., IVONE T-J., MANUEL T-J., LYDIA A. F., JIN N., CATALINA I. P., VAGNER A. B., MANUEL G-G., DANIEL M. R., AND MICHAEL K. U., 2017: An Iron-Activated Citrate Transporter, MtMATE67, Is Required for Symbiotic Nitrogen Fixation, Plant Physiology Preview, 37 p.

KLEIN H-D., RIPPSTIEN G., HUGUENIN J., TOUTAIN B., GUERIN H, LOPPE D., 2014 : les cultures fourragères, Agricultures tropicales en poche, Editions Quae, 264 p.

KNIGHT J. D., 2015: Delayed inoculation of alfalfa with *Sinorhizobium meliloti* and *Penicillium bilaiae*, Department of Soil Science, University of Saskatchewan, 51 Campus Drive, Saskatoon, 95: pp 205-211.

KOHLER W., NG J L. P., DEINUM E. E and MATHESIUS U., 2017: Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules, Journal of Experimental Botany, Received 8, Editor: Dolf Weijers, Wageningen University, 16p.

Références bibliographiques

LAMPTEY S., AHIABOR B. D. K., YEBOAH S AND OSEI D., 2014., Effect of Rhizobium Inoculants and Reproductive Growth Stages on Shoot Biomass and Yield of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), Department of Agronomy, University for Development studies, Tamale, Ghana, Journal of Agricultural Science; Vol. 6, No. 5, pp 44-54.

LI H., SHANG J., AI Z., AND ZHANG L., 2015: Efficient Visible Light Nitrogen Fixation with BiOBrNanosheets of Oxygen Vacancies on the Exposed {001} Facets , J. Am. Chem. Soc, 137, pp 6393–6399.

LIU C-W., SUNG Y., CHEN B-C., and LAI H-Y., 2014 :Effects of Nitrogen Fertilizers on the Growth and Nitrate Content of Lettuce (*Lactuca sativa* L.), 11(4): pp 4427–4440.

LPWG., 2017: A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group, Phylogeny and classification of the Leguminosae66 (1), pp 44–77.

MARÓTI G., KONDOROSI É., 2014: Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? Volume5, Article 326, 6p.

MAURIES M., 2003 : Luzerne : culture, récolte, conservation, utilisation, produire mieux, France Agricole Editions, 240 p.

MIAO Y-Y., SHI S-L., ZHANG J-G and MOHAMAD O., A., 2017: Migration, colonization and seedling growth of rhizobia with matrine treatment in alfalfa (*Medicago sativa* L.), Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science, 13p

MOURADI M., BOUIZGAREN A., FARISSI M., MAKOUDI B., KABBADJ A., VERY A-A., SENTENAC H., QADDOURY A., and GHOULAM1 C., 2015: Osmopriming improves seeds germination, growth, antioxidant responses and membrane stability during early stage of Moroccan alfalfa populations under water deficit, Chilean journal of agricultural research 76 (3), pp 265 -272.

OGDEN A J., GARGOURI M., PARK J., GANG D R., KAHN M L., 2017: Integrated analysis of zone-specific protein and metabolite profiles within nitrogen-fixing *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium medicae* nodules, Peter Mergaert, Centre National de la Recherche Scientifique, FRANCE, PLoS ONE 12(7).

ORLOFF S.B., 2007: Choosing appropriate sites for alfalfa production , farm advisor, university of California cooperative Extension, yreka, CA, Division of Agriculture and Natural Resources, 12p.

PANSU M., GAUTHEYROU J., 2003: Handbook of soil analysis: Mineralogical, organic and Inorganic Methods. (ED) Springer-verlag, Berlin Heideelberg New York. 993p.

Références bibliographiques

PÜSCHEL D., JANOUSKOVA M., VORISKOVA A., GRYNDLEROVÁ H., VOSATKA M and JANSÁ J., 2017 : Arbuscular Mycorrhiza Stimulates Biological Nitrogen Fixation in Two *Medicago* spp. through Improved Phosphorus Acquisition, *Frontiers in Plant Science*, Volume 8, 12 P.

RAHMAN- M. M. H A., and PARVIN- A. I. M., 2014 : Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi, Bangladesh, *Research in Plant Sciences*, volum 2 (1), pp 6-8.

RAMDANE I., BOUKARANA I. K., 2016: Sélection des souches rhizobiennes efficaces, autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L.).

RAVIKUMAR R., 2012: Growth effects of *Rhizobium* inoculation in some legume plants, INT. J. CURR. SCI. 2012, pp 1-6.

RECOUS S., JEUFFROY M. H., HENAULT C., BAMIÈRE L., 2014 : Réduire le recours aux engrais azotés de synthèse : quel potentiel et quel impact sur les émissions de N₂O à l'échelle France ?, *Innovations Agronomiques* 37, pp 11-22.

REN G., 2018: The evolution of determinate and indeterminate nodules within the Papilionoideae subfamily, PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, With references, with summary in English, 130 pages.

SAJID M., RAB A., WAHID F-I., SHAH S. N. M., JAN I., AJMAL K M., HUSSAIN S. A., ANWAR KHAN M. et IQBAL Z., 2011: influence of rhizobium inoculation on growth and yield of groundnut cultivars, *sarhad j. agric. vol.27, no.4*, pp 573-576.

SAMAC D., LENZ P, MILLER S., DORNBUSCH M., KLATT C., CAO Y., CASTLE S., FERGUSON J., NELSON M., SADOWSKY M., 2016: Persistence and Diversity of Rhizobial Bacteria Nodulating Alfalfa, University of Minnesota USDA-ARS, Forage Focus, August.

SANTI C., BOGUSZ D. et FRANCHE C., 2013: Biological nitrogen fixation in non-legume plants, *Annals of Botany*, 111: pp 743–767.

SAYYAH M., KHODAPARAST A., YAZDI A et SARDARI S., 2011: Screening of the anti-convulsant activity of some plants from Fabaceae family in experimental seizure models in mice. *DARU.*, 19: pp 301-305.

SCHNEIDER A et HUYGHE C., 2015 : Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires, Edition Quae, 512 p.

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

SOMASEGRAN P., HOBEN J.H., 2012 : Handdbook for rhizobia : Methods in legume-Rhizobium Technology, Edition Spriner Science et Business Media, 450 P.

Références bibliographiques

SONG T., XU H., SUN N., JIANG L., TIAN P., YONG Y., YANG W., CAI H et CUI G., 2017 : Metabolomic Analysis of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Root-Symbiotic Rhizobia Responses under Alkali Stress, *Frontiers in Plant Science*, Volume 8 | Article 1208, 15p .

SARR P S., FUJIMOTO S. et YAMAKAWA T., 2015: Nodulation, Nitrogen Fixation and Growth of Rhizobia-Inoculated Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) In Relation with External Nitrogen and Light Intensity. *Int J Plant Biol Res* 3(1): 1025.

STAMBULSKA U.Y., BAYLIAK M.M., et LUSHCHAK V.I., 2018: Chromium (VI) Toxicity in Legume Plants: Modulation Effects of Rhizobial Symbiosis, Department of Biochemistry and Biotechnology, Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, 57 Shevchenko Str, Ivano-Frankivsk 76018, Ukraine, 13 pages.

STEIN L. Y and KLOTZ M. G., 2016: The nitrogen cycle, *Current Biology* 26, pp83–101.

SUTY L., 2015 : les végétaux: la relation avec leur environnement, Editions Quae, volume 2, 56p.

TAREKEGN M.A., KIBRET K., 2017: Effects of Rhizobium, Nitrogen and Phosphorus Fertilizers on Growth, Nodulation, Yield and Yield Attributes of Soybean at Pawe Northwestern Ethiopia, Horticulture Department, College of Agriculture and Natural Resources, Debremarkos University, Debremarkos, Ethiopia, EISSN pp 2392-2192.

Effect of Rhizobium Inoculation on Growth and Nutrient Uptake of Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) Grown in Calcareous Soil of Northern Tunisia

Effect of Rhizobium Inoculation on Growth and Nutrient Uptake of Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) Grown in Calcareous Soil of Northern Tunisia

TOUNSI H.S., DHANE F.S., BEN JEDDI F., HAMMAMI I., 2016: Effect of Rhizobium Inoculation on Growth and Nutrient Uptake of Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) Grown in Calcareous Soil of Northern Tunisia, Vol. 21, No. 4, pp 11632-11639.

UNDERSANDER D., HALL M. H., VASSALOTTI P., COSGROVE D., 2011: Alfalfa Germination and Growth, University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension, in cooperation with the U.S. Department of Agriculture and Wisconsin counties, 18p.

USSL, 1954: Diagnostique and improvement of saline and alkali soils hand book n°60.USA, 160p.

VERTES F., JEUFFROY M.-H. , LOUARN G., VOISIN A.-S., JUSTES E., 2015: Légumineuses et prairies temporaires : des fournitures d'azote pour les rotations Fourrages 223, pp 221-232.

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

Références bibliographiques

WANG Q., LIU J., ZHU H., 2018: Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions, Volume 9, Article 313, 8P.

WANG Z, QIANG H, ZHAO H, XU R, ZHANG Z, GAO H, WANG X, LIU G AND ZHANG Y, 2016: Association Mapping for Fiber-Related Traits and Digestibility in Alfalfa (*Medicago sativa*), Volume 7 | Article 331, pp 1-7.

WANG D, YANG S., TANG F and ZHU H., 2012: Symbiosis specificity in the legume – rhizobial Mutualism, Cellular Microbiology, 14(3), pp 334–342.

WANG X L, CUI W J, FENG X Y, ZHONG B Z M, LIA Y, CHEN W X, CHEN W F, SHAO X M, TIAN C F, 2018: Rhizobia inhabiting nodules and rhizosphere soils of alfalfa: A strong selection of facultative microsymbionts, Soil Biology and Biochemistry, 116, pp 340–350.

WESTHOEK A., FIELD E., REHLING F., MULLEY G., WEBB I., POOLE P S. and TURNBULL L A., 2017: Policing the legume-Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice, Scientific Reports, 7: 1419, 10p.

WILLIAM G., HOPKINS., 2003: physiologie végétale, Editeur de boecksupérieure ,532 p.

ZERKLE A.L. et MIKHAIL S., 2017: The geobiological nitrogen cycle: From microbes to the mantle, Geobiology, 15: pp 343–352.

ZHOU J., DENG BO., ZHANG Y., COBB A B, ZHANG Z., 2017: Molybdate in Rhizobial Seed-Coat Formulations Improves the Production and Nodulation of Alfalfa, PLoS ONE 12(1), 14 p.

ZHANG T, YU L-X, ZHENG P, LI Y, RIVERA M, MAIN D, STEPHANIE L G, 2015 : Identification of Loci Associated with Drought Resistance Traits in Heterozygous Autotetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Using Genome-Wide Association Studies with Genotyping by Sequencing, PLoS ONE 10(9): pp 1-17.

ANNEXES

Annexe n° 1 : Analyses physico-chimiques du sable

A. Mesure du pH

- Dans un bécher, introduire 10 g de sable, ajouter 25 ml d'eau distillée, mélanger 30 mn à l'aide d'un agitateur magnétique.
- Avant de procéder à la mesure du pH, procéder à l'étalonnage du pH mètre puis à la remise en suspension de la terre à l'aide d'un agitateur.

Echelle d'interprétation de pH dans l'extrait aqueux 1/2,5 selon USSL (1954) et AUBERT (1978):

Extrait 1 /2,5	
Valeur de pH	Classe d'interprétation
<4.5	Extrêmement acide
4.5 – 5.0	Très fortement acide
5.1 – 5.5	Fortement acide
5.6 – 6.0	Moyennement acide
6.1 – 6.5	Légèrement acide
6.6 – 7.0	Très Légèrement acide
7.1 – 7.5	Très Légèrement alcalin
7.6 – 8.0	Légèrement alcalin
8.1 – 8.5	Moyennement alcalin
>8.6	Très fortement alcalin

B . Mesure de la conductivité électrique :

- Dans un bécher, introduire 10 g de sable, compléter le volume à 50 ml avec de l'eau distillée, mélanger 30 mn à l'aide d'un agitateur magnétique.

Echelle de la salinité pour l'extrait 1/5 (AUBERT, 1978) :

CE (ds/m) à 25°C	Degré de salinité
< 0.6	Sol non salé
$0.6 < CE \leq 2$	Sol peu salé
$2 < CE \leq 2.4$	Sol salé
$2.4 < CE \leq 6$	Sol très salé
> 6	Sol extrêmement salé

**Annexe n° 2 : Les normes des taux d'azote déterminés par la méthode de
KJELDAHL**

Teneur en N	Interprétation
0.5 - 1	Trop faible
1 – 1.5	Satisfaisante
1.5 – 2 .5	Un peut fort
Supérieure à 2.5	Trop fort

Annexe n° 3 : les Caractéristiques de sables idéaux, marginaux et indésirables pour la production de luzerne selon ORLOFF (2007).

caractéristique	IDÉAL	Marginal	indésirable
Texture du sol	Terre sablo-argileuse sableuse	Terre sablo-argileuse sableuse	Sable, argile
pH	6.3 - 7.5	5.8 - 6.3 et 7.5 - 8.2	< 5.8 ou >8.2
CE (dS/cm)	0 - 2	2 - 5	> 5



Photo : Mesure de la DO des suspensions bactériennes avec un spectrophotomètre



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



Photo : Remplissage des cuvettes les suspensions bactériennes de chaque souche.



Photo : Stérilisation de sable au four pasteur pendant 2 heures à 180°C.



Photo : Broyage des parties aériennes des plantes.



Photo : les échantillons après minéralisation dans le digesteur

Estimation de l'efficacité de quelques souches rhizobiennes en symbiose avec trois variétés locales de luzerne (*Medicago sativa* L.)

Résumé

Dans cette étude, trois variétés locales de la luzerne (*Medicago sativa* L.) ont été inoculées par six souches rhizobiennes provenant de différentes zones agricoles sahariennes et deux souches de références.

Les trois objectifs principaux dans lesquels s'inscrit ce travail tentent i) d'évaluer l'effet de l'inoculation par huit souches rhizobiennes sur la croissance et le rendement de la luzerne ii) de sélectionner les meilleurs couples symbiotiques iii) d'estimer la quantité d'azote biologiquement fixé. L'analyse en composantes principale (ACP) nous a permis de montrer qu'il y a une corrélation significative entre les différents paramètres étudiés.

La hauteur des tiges, longueur des racines, le poids frais et secs des parties végétatives, le nombre de nodosités et la quantité d'azote fixé, sont les paramètres étudiés pour évaluer la capacité symbiotique des souches rhizobiennes

Les résultats de test symbiotique nous ont permis de sélectionner, au final, la combinaison la plus performante à savoir S₂V₃, SR₂V₃, S₁V₁, SR V₁, S₆V₃, présentent les meilleurs résultats pour tous les paramètres étudiés par rapport aux autres combinaisons.

Mots clés : Inoculation, symbioses fixatrices d'azotes, *Medicago sativa*, souches rhizobiennes, Sahara.

Estimation of the effectiveness of some rhizobial strains in symbiosis with three varieties of local alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Summary

In this study, three local varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) were inoculated with six rhizobial strains from different agricultural areas of the Sahara and two reference strains.

The three main objectives of this work are to i) evaluate the effect of inoculation with eight rhizobial strains on alfalfa growth and yield ii) select the best symbiotic pairs iii) stimulate the amount of biologically fixed nitrogen. Principal component analysis (ACP) allowed us to show that there is a significant correlation between the different parameters studied.

The height of the stems, root length, the fresh and dry weight of the vegetative parts, the number of nodules and the amount of fixed nitrogen, are the parameters studied to evaluate the symbiotic capacity of the rhizobial strains.

The symbiotic test results allowed us to select, in the end, the most powerful combination namely S₂V₃, SR₂V₃, S₁V₁, SR V₁, S₆V₃, presenting the best results for all the parameters studied compared to the other combinations.

Key words: Inoculation, nitrogen-fixing symbiosis, *Medicago sativa*, rhizobial strains, Sahara.

تقدير فعالية بعض السلالات الريزوبية في التكافل مع ثلاثة أنواع من الفصّة المحلية (*Medicago sativa* L.)

الملخص

في هذه الدراسة، تم تلقيح ثلاثة أصناف محلية من الفصصة (*Medicago sativa* L.) مع ثمانية سلالات ريذوبية من مناطق زراعية مختلفة في الصحراء. الأهداف الرئيسية الثلاثة لهذا العمل هي (i) تقييم تأثير التلقيح مع ثمانية سلالات ريذوبية على نمو وخصيلة الفصصة (ii) اختيار أفضل أزواج تكافلية (iii) تقدير كمية النيتروجين المثبتة بيولوجيا. لقد سمح لنا تحليل المكون الرئيسي (PCA) بأن نوضح وجود علاقة ملحوظة بين مختلف المعايير التي تمت دراستها. إن ارتفاع السيقان، وطول الجذر، والوزن الطازج والجاف للأجزاء النباتية، وعدد العقيدات وكمية النيتروجين المثبتة، هي العوامل المدروسة لتقييم القدرة التكافلية للسلالات الريزوبية.

سمحت لنا نتائج الاختبارات التكافلية باختيار، في النهاية، المجموعة الأفضل وهي S₂V₃, SR₂V₃, S₁V₁, SR₂V₁, S₆V₃، هي التي قدمت أفضل النتائج لجميع العوامل التي تمت دراستها مقارنة بالتركيبات الأخرى.

كلمات مفتاحية: التلقيح، تكافل تثبيت النيتروجين، *Medicago sativa*، سلالات الريزوبيا، الصحراء.