

**UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES**



**Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de**

**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie

**Filière** : Sciences biologiques

**Spécialité** : Biotechnologie Végétale

**Présenté par** : HAOUED MOUISSA Imane

**Thème** :

**Efficacité de l'inoculation de la luzerne (*Medicago sativa L.*)  
par des souches rhizobiennes, *in vivo* et *in vitro*, sous stress  
salin.**

**Soutenu publiquement Le : 08/07/2019**

**Devant le jury :**

M <sup>elle</sup> SALHI Nesrine	Professeur	Présidente	UKM Ouargla
M <sup>me</sup> DJERROUDI Ouiza	MCA	Examinatrice	UKM Ouargla
M <sup>me</sup> ATTAB Sara	MAA	Encadreur	UKM Ouargla
M. AZIB Salim	MAA	Co-encadreur	UKM Ouargla

Année Universitaire : 2018/2019

## **Remerciements**

*Avant tout, je remercie mon **DIEU** de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience de réaliser ce modeste travail.*

*Je remercie plus particulièrement : Monsieur **AZIB Salim** pour l'encadrement, les efforts, les encouragements et les précieux conseils et la confiance qu'il m'a prouvé durant cette période, il n'a ménagé ni son temps ni ces efforts pour me faciliter la tâche*

*Ainsi, mes remerciements vont à l'encontre de **M<sup>me</sup> ATTAB Sara** qui a su être patiente avec moi durant les étapes critiques de la réalisation de ce travail où nous étions obligé de nous adapter aux nouvelles situations a chaque fois.*

*Je souhaite adresser mes remerciements à professeure **SALHI Nesrine**, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Toute ma gratitude à **M<sup>me</sup> DJARROUDI Ouiza** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont également à ma belle tante **CHETTIBA Zineb** Pour tout l'encouragement et l'aide qui m'a été faite.*

*Mes remerciements à ma famille pour son soutien, toutes mes chères amies particulièrement **Maroua, Khouloud, Sana et Bouthaina**.*

*Un grand merci est adressé à tous les collègues de la promotion de Master II Biologie et Agronomie, particulièrement à la spécialité Biotechnologie végétale.*

*Ainsi qu'à tous les professeurs qui nous ont enseigné durant notre parcours.*

*J'adresse mes remerciements aux membres de laboratoire de la faculté SNV et aussi aux membres de laboratoire des Bioressources Sahariennes de m'avoir aidé.*

*En fin, un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

**...Merci**

# Dédicaces

*Ce modeste mémoire est dédié à ...*

**Ma maman** : source de ma vie, aimable, honorable : Tu représentes pour moi la  
réseau de vivre de continuer, réseau d'être plus forte en franchissant  
les barrières de ma vie, pour moi t'est l'exemple de la beauté de monde par  
excellence, la  
source de tendresse, t'est un cas de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager  
Tu sais maman aucune dédicace ne serait expérimentée et ne serait assez  
Suffisantes pour toutes les sacrifices que tu avais de courage à les faire et tous le  
chemin que  
tu a partagé avec moi : bonheur, joie, tristesse, échouements...Quoi que je dit je  
pourrais

Jamais tu remercie pour tous les sacrifices que tu as consentis depuis ma naissance.

**Mon papa** : Aucune dédicace ne pourra exprimer le respect que j'ai pour toi,  
l'amour que on

Partage entre nous. Ton silence été toujours pour moi un regret que je n'arrive pas  
à

comprendre, tes effort jour et nuit pour mon éducation mon bien être.

*Ce travail représente le fruit de tes sacrifices.*

**Papa Maman** : Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond respect et  
amour.

Que DIEU vous garde pour moi, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et  
bonheur.

À mes très chers frères : **Sayeh, Abdenacer, Taki Eddine** et ma petite sœur  
**Chahed**, Les mots n'arrive pas à exprimé le respect, le remerciement, l'attachement,  
et l'amour que je vous porte, Je vous souhaite un avenir radieux et plains de  
bonheur.

À mon directeur de recherche monsieur **AZIB Salim**, pour son aide, sa  
compréhension et ses encouragements.

À ma belle famille (**HAOUED MOUISSA et CHETTIBA**)

À toutes mes tantes, mes oncles, mes cousins et mes cousines pour leurs soutiens,  
leurs amours et leurs encouragements

À tous mes professeurs et enseignants

À tout mes chères ami (e)s. À tous ceux qui m'ont aimée, aidée ou encouragée.

**HAOUED MOUISSA Imane**

## Liste des figures

Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres. ....	5
Figure 2 : Architecture de nodule déterminé et indéterminé .....	14
Figure 3: Principales étapes de la symbiose rhizobium/légumineuse.....	16
Figure 4 : Formation d'un nodule induit par rhizobium .....	18
Figure 5 : Etapes de déminéralisation du sable.....	27
Figure 6 : Séchage du sable à l'air libre.....	28
Figure 7 : Remplissage des pots .....	28
Figure 8 : Désinfection des graines.....	29
Figure 9: Incubation d'inoculum bactérien préparé.....	31
Figure 10 : Semis des graines. ....	31
Figure 11: L'inoculation des pots. ....	32
Figure 12: Préparation des solutions nutritives avec les différentes concentrations en NaCl. .33	
Figure 13: Arrosage des plantes.....	34
Figure 14 : Trempage des pots dans de l'eau et déterrement soigneux des racines. ....	35
Figure 15: Ressuyage des racines dans du papier absorbant. ....	35
Figure 16: Les pesés des poids secs des parties aériennes et souterraines. ....	36
Figure 17: Préparation des solutions nutritives solides avec sel.....	37
Figure 18: Remplissage des boîtes par le milieu nutritif. ....	38
Figure 19: La mise en germination des grains.....	38
Figure 20: Hauteur de la partie aérienne des plantes de luzerne en fonction des combinaisons .....	41
Figure 21: Longueur de la partie racinaire des plantes en fonction des combinaisons. ....	42
Figure 22: Poids sec de la partie aérienne des plantes.....	44
Figure 23 : Poids sec de la partie racinaire .....	45
Figure 24: Evolution du nombre des nodules actifs en fonction des combinaisons.....	46
Figure 25: Hauteur des parties aériennes des plantules de en fonction des combinaisons.....	48
Figure 26: Longueur de la partie racinaire des plantules en fonction des combinaisons. ....	49

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de Luzerne .....	9
Tableau 2: Stades physiologiques de la luzerne .....	11
Tableau 3: Espèces appartenant au genre <i>Sinorhizobium</i> .....	13
Tableau 4: Les principales différences entre les types de nodule indéterminé et déterminée .	14
Tableau 5: Classification des sols salinisés . .....	21
Tableau 6: Classification des eaux d'irrigation selon leurs CE et le taux d'absorption du sodium .....	21
Tableau 7 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés. ....	48

## Liste des abréviations

FSN	Fixateurs symbiotique de l'azote
FAO	Food and agriculture organisation
AM	Mycorhize a Arbuscule
PPA	Appareil de Pré-Pénétration
PII	Pré-cordon d'infection
SNV	Science de Nature et de la Vie
BNL	Bactéries Nodulant Les légumineuses
SAR	Taux d'absorption du sodium
YMB	Yest Mannitol Broth
tr/mn	Tour par minute
INRA	Institut national da la recherche agronomique
Nod	Nodulation
S	Souche
HP	Hauteur des plantes
LR	Longueur des racines
P.S.R	Poids sec des racines
P.H.R	Poids humide des racines
P.S.T	Poids sec des tiges
P.H.T	Poids humide des tiges
NN	Nombre des nodules
T	Témoin
Anova	Analyse of variance

# Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
<b>Chapitre I:Etude Bibliographique</b>	
I.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes.....	4
I.2. Cycle de l'azote .....	4
I.3. Fixation biologique de l'azote .....	5
I.3.1. Les fixateurs libre .....	5
I.3.2. Les fixateurs symbiotiques .....	6
I.3.2.1. Frankia.....	6
I.3.2.2. Rhizobia.....	6
I.4. Les légumineuses.....	7
I.4.1. Présentation générale des légumineuses.....	7
I.4.2. Intérêts des légumineuses .....	7
I.4.3. Le genre de la luzerne ( <i>Medicago sativa</i> L.).....	8
I.4.3.1. Classification botanique .....	9
I.4.3.2. Caractères généraux.....	9
I.5. Taxonomies et classification des rhizobiums .....	11
I.6. La nodulation.....	13
1.6.1. Processus de la nodulation.....	14
1.6.1.1. L'étape pré-symbiotique.....	15
1.6.1.2. L'infection et l'initiation des divisions corticales.....	16
1.6.1.3. Le développement du nodule (l'organogénèse).....	16
I.7. La spécificité symbiotique.....	18
1.8. Facteurs influençant la fixation symbiotique.....	19
1.8.1. Le stress salin.....	19
1.9. Généralités sur la salinité.....	20
1.9.1. Définition.....	20

1.9.2. Sols salins et eaux salées .....	20
1.9.3. Mesure de la salinité .....	21
1.10. Effets de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuses.....	22
1.10.1. Effet sur la germination des graines .....	22
1.10.2. Effet sur la croissance des légumineuses.....	22
1.10.3. Effet sur la croissance et la survie des rhizobia.....	23
1.10.4. Effet sur le processus d'infection et de développement des nodules.....	23
1.10.5. Effet sur la fixation biologique de l'azote et la respiration nodulaire.....	24
1.10.6. Effet sur les paramètres hydriques.....	24
1.10.7. Effet sur la photosynthèse.....	25
1.10.8. Effet sur le métabolisme carbone.....	25
1.10.9. Effet sur la nutrition minérale.....	26

## Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1. Mise en place du test symbiotique <i>in vivo</i> .....	27
II.1.1. Matériel d'étude .....	27
II.1.1.1. Le substrat de culture .....	27
II.1.1.1.1. Déminéralisation du sable.....	27
II.1.1.1.2. Stérilisation et remplissage des pots .....	28
II.1.1.2. Le matériel végétal.....	28
II.1.1.2.1. Désinfection et pré-germination des graines.....	29
A. Désinfection des graines .....	29
B. Prégermination des graines .....	29
II.1.1.3. Le matériel microbiologique.....	29
II.1.2. Méthodes d'étude.....	30
II.1.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien .....	30
II.1.2.2. Mise en culture des graines.....	31
II.1.2.3. Inoculation des pots.....	32
II.1.2.5. Le choix de la solution de Fahareus.....	34
II.1.2.6. Prélèvements des plantes.....	34
II.2. Mise en place du test de germination <i>in vitro</i> .....	36
II.2.1. Matériel d'étude .....	36
II.2.1.1. Le matériel végétal.....	36
II.2.1.1.1. Désinfection et prégermination des graines.....	36



II.2.1.2. Le matériel microbiologique .....	36
II.2.2. Méthode d'étude.....	36
II.2.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien .....	36
II.2.2.2. Préparation de solutions nutritive solide-saline.....	37
II.2.2.3. Remplissage des boîtes pétri .....	37
II.2.2.3. Mise en germination des graines .....	38
II.2.2.4. Inoculation des boîtes.....	38
II.2.2.5. Prélèvements des plantules .....	38

## **Chapitre II: Résultats et discussion**

III.1. Le test symbiotique <i>in vivo</i> .....	41
III.1.1. Hauteur des tiges.....	41
III.1.2. Longueur des racines .....	42
III.1.3. Poids sec de la partie aérienne .....	44
III.1.4. Poids sec de la partie racinaire.....	45
III.1.5. Nombre des nodules actifs .....	46
III.2. Corrélations entre paramètres .....	48
III.3. Test de germination <i>in vitro</i> .....	48
III.3.1. Hauteur des tiges.....	48
III.3.2. Longueur des racines .....	49
Conclusion .....	51

# *Introduction*

## **Introduction**

L'azote bien qu'abondant dans l'atmosphère, est le facteur limitant le plus fréquent après l'eau, de la production agricole. Un problème crucial auquel doit faire face l'agriculteur en fournissant à la plante l'azote assimilable lorsqu'elle en a besoin, tout en maintenant le stock du sol (Raven et *al.*, 2003). Certaines plantes, comme les légumineuses, peuvent cependant puiser et fixer l'azote gazeux présent dans l'atmosphère grâce à une association symbiotique avec des bactéries appelées rhizobia. Cette symbiose se traduit par la formation au niveau des racines des légumineuses de protubérances appelées nodules ou nodosités dans lesquels ces plantes hébergent les rhizobia dans un environnement propice à l'activité fixatrice d'azote. Au sein de ces nodules, la plante fournit les substrats énergétiques/carbonés nécessaires au rhizobia qui en retour fournissent de l'azote sous forme d'ammoniac directement utilisable dans le flux métabolique de la plante (Sadowsky et Graham, 2006).

La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, renferme trois sous-familles : Mimosoideae, Caesalpinoideae et Papilionoideae ; la majorité des espèces nodulées se rencontrent dans la sous-famille des Papilionoideae.

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) est une légumineuse fourragère pérenne, autotétraploïde et allogame appartenant à la famille des Fabacées qui constitue un taxon végétal de grande importance. Elle est tolérante à la sécheresse et aux hautes températures et est cultivée essentiellement pour une exploitation en fauche, sur des sols non acides et non hydromorphes. Elle est exploitée, depuis les débuts de l'agriculture, pour sa partie aérienne riche en protéines et destinée à l'alimentation animale (Julier et Huyghe, 2001).

En Algérie, pour la période 1995 à 1997, la superficie consacrée à la luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.) représente entre 0,37 et 0,71% de la superficie réservée aux cultures fourragères ; par rapport aux cultures herbacées sa superficie représente entre 1,86 et 3,03% pour la même période. Dans le Sahara algérien, paradoxalement, la luzerne constitue le premier fourrage. Afin de mieux préciser la place de la luzerne dans la zone saharienne, une analyse des superficies réservées à cette culture a été menée. Parallèlement, un essai de comportement sur plusieurs populations locales et variétés introduites a été réalisé dans la région de Ouargla (Chaabena, 2001).

Les rhizobia, deuxième élément de l'association, sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités, au

sein desquels ils réduisent l'azote de l'air. Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte (Sebihi, 2008).

En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique. Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus* (Weir, 2016 ; Khalfi et Smara, 2017) forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes des légumineuses.

Dans le bassin méditerranéen, la symbiose légumineuse-rhizobia est une composante importante de cet agrosystème vu ses intérêts agronomiques, économiques et écologiques (FAO, 2009). En effet, cette symbiose pourrait, lorsqu'elle fonctionne bien, assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes et garantir une production convenable permettant ainsi aux agriculteurs d'épargner le coût des fertilisants chimiques et soulager l'environnement de leur pollution (Faghire et *al.*, 2011).

Dans les zones arides et semi-arides, la contrainte saline reste l'un des facteurs majeurs limitant la production des légumineuses particulièrement lorsque la nutrition azotée est assurée par la FSN. De nombreuses études agrophysiologiques ont mis en évidence l'effet de la contrainte saline sur la croissance des légumineuses dépendantes de la FSN (Ciat, 1992 ; Elboutahiri, 2010 ; Jansa et *al.*, 2011).

La réaction des plantes à la salinité est très différente selon que l'on s'intéresse à la phase de la germination (Bani-aameur et Janis, 1999) ou à celle du développement (Bani-aameur, 2000). La germination devient un facteur déterminant pour la réussite de la croissance des plantes dans les milieux salés (Belkheiri, 2009). La culture *in vitro* a pris une importance croissante dans les programmes d'amélioration des plantes pour la sélection de génotypes tolérants à la salinité (Benhassaini et *al.*, 2012). Cette technique constitue un test précoce et rapide pour évaluer et caractériser le comportement des espèces végétales face à la contrainte saline (Belkhodja et Bidai, 2004). La réponse des graines à la salinité est un indicateur de la tolérance de la plante, durant les étapes postérieures de développement (Bell, 1999). En effet, la germination est considérée comme un stade critique dans le cycle de développement des végétaux (Bellefontaine et *al.*, 2009). C'est elle qui conditionne

l'installation de la plante autotrophe et probablement sa production ultérieure (Ben naceur, 2001).

C'est dans cette optique que notre travail s'inscrit pour tenter d'améliorer les productions de la luzerne en conditions salines, en cherchant la meilleure combinaison concentration-souche rhizobienne qui s'adapte le plus aux conditions pédoclimatiques de la région de Ouargla. La première partie consiste mettre en place le test symbiotique, *in vivo*, dans les conditions salines entre une variété locale de luzerne (*Medicago sativa* L.), provenant de la région d'Ouargla, et trois souches rhizobiennes sélectionnées pour leur efficacité parmi une collection d'une centaine d'isolats. La deuxième partie consiste à mettre en place du test de germination *in vitro* sous conditions de salinité et à l'étude de l'interaction symbiotique durant la phase précoce de développement, afin de choisir la combinaison qui résiste le mieux à la salinité tout en garantissant une bonne germination des graines.

Notre manuscrit sera organisé en trois chapitres. Le premier chapitre sera consacré à l'étude bibliographique décrivant les symbioses fixatrices d'azote. Le deuxième chapitre sera celui du matériel et méthodes adoptés pendant les expérimentations. Les résultats et les discussions seront présentés dans le troisième chapitre. En fin, le travail sera achevé par une conclusion générale qui comportera des suggestions et des perspectives.

# **Chapitre I**

## ***Etude Bibliographique***

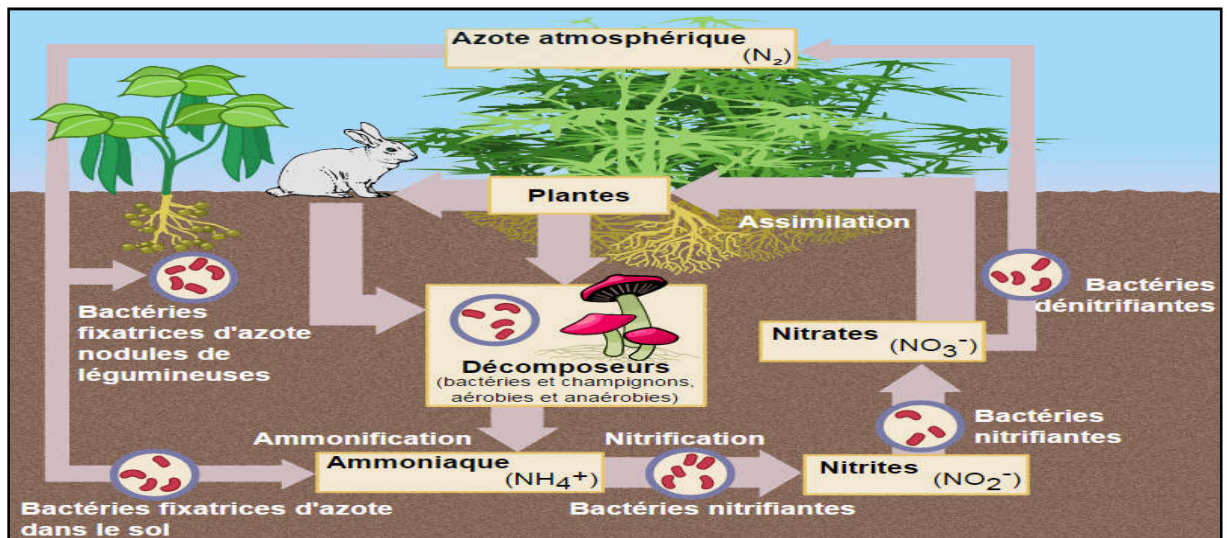
### **I.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes**

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. C'est le constituant principal de l'atmosphère terrestre sous forme d'azote gazeux ( $N_2$ ) mais les plantes n'ont pas la capacité de l'assimiler directement. Les plantes absorbent l'azote dans le sol sous forme de nitrates ( $NO_3^-$ ) et d'ammonium ( $NH_4^+$ ). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu. Mais les légumineuses peuvent aussi acquérir l'azote grâce à leur aptitude à établir une symbiose avec des bactéries du sol collectivement appelées Rhizobium. Dans ce cas, elles ne nécessitent pas l'apport d'engrais azotés, à la différence des céréales ou des oléo-protéagineux comme le colza et le tournesol. (Lazrek Ben-friha, 2008).

### **I.2. Cycle de l'azote**

Dans le sol, l'azote (N) est essentiellement sous forme organique. Söderlund et Svensson(1976) ont estimé que l'azote organique du sol compte 95% du pool d'azote total du sol. Dans les sols riches en argiles capables de fixer l'ammonium, environ 90% de l'azote du sol est contenu dans les structures organiques, 8% est sous forme d'ammonium ( $NH_4^+$ ) fixé et 1 à 3% peut se trouver sous forme inorganique (Baldock et Nelson, 2000). Dans les sols à faible capacité de fixation d'ammonium, l'azote organique représente une proportion > 97% et l'azote inorganique 1-3%.

Généralement, les plantes absorbent l'azote sous forme d'ions nitrate ( $NO_3^-$ ) ou d'ions ammonium ( $NH_4^+$ ) (Abuzinadah et Read, 1986), l'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des microorganismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée ; et le cycle recommence (Saoudi, 2008).



**Figure 1** : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres.

(D'après Peret, 2007).

### I.3. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est effectuée par des microorganismes soit autonomes soit en symbiose avec des plantes supérieures. En dehors des légumineuses, seul un petit nombre d'espèces (quelques centaines au plus) possèdent des nodules fixateurs d'azote. Il s'agit exceptionnellement d'une association avec les Rhizobiums (on ne connaît qu'un seul exemple: Parasponia) mais le plus souvent la symbiose est réalisée avec des actinomycètes (bactéries filamenteuses) du genre Frankia (Benson et Silvester, 1993). Dans ce cas, les plantes hôtes, dites plantes actinorhiziennes, sont des arbres ou des arbustes appartenant à des familles primitives: Alnus, Casuarina... La symbiose fixatrice d'azote est un processus complexe déterminé par les deux partenaires. L'un des systèmes les plus étudiés est celui associant les bactéries rhizobiales avec les légumineuses (Lazrek-Ben Friha, 2008).

#### I.3.1. Les fixateurs libre

Les organismes fixateurs capables de fixer le diazote sous leur forme libre sont regroupés sous l'appellation « diazotrophes ». Parmi eux, certains sont des anaérobies stricts comme les Archaeobactéries des genres *Methanosarcina* et *Methanococcus* et les procaryotes du genre *Clostridium*. Certains procaryotes fixateurs sont des anaérobies facultatifs comme les genres *Klebsiella* et *Erwinia* ou des aérobies stricts comme les membres du genre. Enfin les cyanobactéries photosynthétiques des genres *Anabaena* ou *Nostoc* sont aussi capables



d'effectuer cette fixation de l'azote au sein de cellules spécialisées appelées hétérocystes (Dixon et Wheeler, 1986).

### **I.3.2. Les fixateurs symbiotiques**

Existe deux types majoritaires de symbioses fixatrices d'azote impliquant un microorganisme et un hôte végétal : la symbiose actinorhizienne et la symbiose rhizobium légumineuse. Ces deux symbioses ont pour particularité d'aboutir à la formation d'un nouvel organe chez les plantes, le nodule, au sein duquel la bactérie fixe l'azote atmosphérique. Les termes « noduler » et « nodulation » font référence à cette capacité. Il est à noter que les cyanobactéries peuvent aussi établir des associations symbiotiques avec les végétaux. C'est le cas par exemple pour les membres du genre *Anabaena*, symbiotes des fougères d'eau *Azolla* sp., et pour le genre *Nostoc*, symbiote des angiospermes du genre *Gunnera* (Mbengue, 2010).

#### **I.3.2.1. Frankia**

Les bactéries actinomycètes gram positif du genre *Frankia* sont capables d'établir une symbiose avec plus de 200 angiospermes répartis dans 8 familles (Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Datisceae, Elaeagnaceae Myricaceae, Rhamnaceae, et Rosaceae) et 25 genres. Les plantes hôtes sont toutes des dicotylédones pérennes, arbres ou arbustes, à l'exception du genre *Datisca*, plantes vivaces de la famille des Datisceae (Huss-Danell, 1997). Les végétaux capables d'établir ce type de symbiose sont regroupés sous la dénomination de végétaux actinorhiziens. Le prototype de cette symbiose actinorhizienne est représenté par l'association entre *Frankia* et les hôtes *Casuarina glauca* ou *Alnus glutinosa*. Un certain degré de spécificité existe entre l'hôte et le symbiote dans cette symbiose actinorhizienne mais il n'est pas un déterminant majeur pour la caractérisation des espèces de *Frankia*. En effet, une même espèce de bactérie a pu être isolée à partir de nodules formés sur des plantes hôtes issues de différentes familles (Benson et Silvester, 1993).

#### **I.3.2.2. Rhizobia**

Certaines bactéries gram négatif de la classe des  $\alpha$ - et  $\beta$ -protéobactéries sont capables d'établir des associations symbiotiques avec les plantes de la famille des légumineuses (Leguminosae ou Fabaceae) constituée de plus de 700 genres (Doyle et Luckow, 2003).

Ces bactéries sont appelées rhizobia et il en a été dénombré 13 genres regroupant 98 espèces dont la capacité à noduler a été démontrée (Weir, 2016).

Il s'agit des genres *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *allorhizobium*. Contrairement à ce qui est observé dans la symbiose actinorhizienne, ces associations entre l'hôte et le symbiote sont spécifiques et dans certains cas exclusives. Par exemple, la légumineuse *Sesbania rostrata* n'établit cette symbiose qu'avec *Azorhizobium caulinodans*. D'autres légumineuses peuvent entrer en symbiose avec plusieurs espèces de bactéries, comme *Phaseolus vulgaris* (haricot) avec les symbiotes *Rhizobium tropicii*, *R. leguminosarum* biovar. *phaseoli* et *R. etli*. La réciprocité est aussi vraie avec le cas de *R. leguminosarum* biovar. *viciae* qui peut noduler la vesce et le pois (*Vicia sativa* et *Pisum sativum*) (Doyle, 1998).

Seules exceptions à cette règle, les souches de *Rhizobium* NGR234 et *R. fredii* USDA257 possèdent un spectre d'hôte étendu (Pueppke et Broughton, 1999). NGR234 est en effet capable de noduler 112 genres de légumineuses ainsi que la seule non-légumineuse *Parasponia andersonii*. Quant à *R. fredii* USDA257, cette souche bactérienne peut noduler 79 genres de légumineuses (Pueppke et Broughton, 1999).

#### **I.4. Les légumineuses**

##### **I.4.1. Présentation générale des légumineuses**

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones. Elles sont les sœurs des Polygalaceae, composant avec les familles des Quillajaceae et Surianaceae, les Fabales (Judd et *al.*, 2001).

Elles sont extrêmement diversifiées, cependant elles présentent un point commun, leur fruit est une gousse (Caratini, 1984). En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (Papilionoideae, Mimosoideae) et la troisième paraphylétique (Caesalpinoideae) (Guignard et Dupont, 2005).

Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven et *al.*, 2000). Cependant il y a encore 40% des légumineuses qui n'ont jamais été examinées pour la nodulation (Sprent, 1999).

##### **I.4.2. Intérêts des légumineuses**

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés

annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001).

Au total un champ de trèfle fixe entre 50 et 100 Kg d'azote par hectare et par an. Le Soja et le Lupin, connus pour leur richesse en protéines, apportent au sol plus de 300 et jusqu'à 500 kg d'azote par hectare et par an protéines végétales ce qui constitue une source très importante dans l'alimentation humaine et animale (Baudoin, 2001).

Leurs graines sont des aliments d'excellente qualité car leur contenu en protéines est parmi les plus élevés de toutes les plantes destinées à l'alimentation. Cela représente (Frontier et al., 2004).

Cette fixation leur permet de produire en abondance des nte le meilleur moyen de produire des protéines végétales dans le cadre d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. En effet leurs capacités à fixer l'azote rendent inutile l'utilisation d'engrais azotés dont la synthèse, le transport et l'épandage consomment des combustibles fossiles (2 tonnes de fuel pour une tonne d'ammoniac) et contribuent à l'effet de serre (Dénarié, 2000).

Leur utilisation joue également un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles. Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, elles apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système (Babo, 2002).

Dans les systèmes de culture utilisant les rotations, l'azote fixé par les légumineuses peut être utilisé d'abord par elles-mêmes, puis par les cultures suivantes qui peuvent bénéficier indirectement par l'entremise des résidus qu'elles laissent (Baudoin, 2001).

Enfin elles servent également de cultures de fourrages, d'engrais verts et produisent un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures et des parfums.

#### **I.4.3. Le genre de la luzerne (*Medicago sativa* L.)**

La luzerne cultivée ou *Medicago sativa* L. appartient à la famille des Fabacées qui constituent la troisième famille la plus importante du monde végétal (environ 12000 espèces) après les Astéracées et les Orchidacées (Messioughi, 2016).

Elle est connue également sous le nom d'Alfalfa (Botineau, 2010). C'est une plante herbacée vivace à tige dressée dès la base puis rameuse et anguleuse. Elle présente des nodules racinaires qui témoignent de son association symbiotique avec les bactéries *Rhizobium* (Messioughi Amel, 2016).

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 animal et comme source d'azote pour l'amélioration du sol (Hamom, 2001 ; Marinoff et al., 2005).

La luzerne est plus développée dans les zones tempérées chaudes : Europe, Amérique du Nord, Japon, pointes sud d'Afrique et d'Amérique, Australie, Nouvelle-Zélande. Elle représente dans le monde près de 32 millions d'hectares dont 13 millions, en Amérique du nord, là où elle est la mieux représentée (Mauriès, 1994).

#### I.4.3.1. Classification botanique

**Tableau 1** : Classification botanique de Luzerne (Singh, 2011 ; Akhtar et al. 2016)

Règne	Plantae
sous-règne	Tracheobionta
super division	Spermatophytes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Sousclasse
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées
Genre	<i>Medicago</i>
Espec	<i>Medicago sativa</i> L.

#### I.4.3.2. Caractères généraux

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) est une plante de taille variant de 30 à 120 cm. Elle possède des tiges couchées, ascendantes à dressées, partant de la couronne. Les parties végétatives sont couvertes, à des différents degrés, avec de simples poils. Les feuilles sont trifoliées composées de trois folioles. Il existe aussi des variétés multifoliées à 4, 5, 6 ou

7 folioles portées par un pétiole et même des feuilles portant jusqu'à 11 folioles ont été observées (*Apis mellifera*, *Megachile rotundata*, *Nomia melanderi*, *Bombus* ssp.) (Frame, 2005).

Les stades physiologiques de la luzerne allant du semis jusqu'à la récolte sont : levée, initiation florale, début floraison, fin floraison, fin remplissage, maturité (Fick et *al.*, 1988).

La luzerne est une plante de jours longs. Son potentiel de croissance dépend de plusieurs facteurs : la disponibilité en eau, la température et le rayonnement visible intercepté par le couvert végétal (Mauriès, 1994).

La luzerne est capable, grâce à son système racinaire pivotant, d'utiliser l'eau et les minéraux du sol à une profondeur qui peut atteindre dans certains cas les 6 m et plus et d'échapper ainsi aux périodes de sécheresse et mieux résister au stress hydrique. La luzerne a la capacité d'entrer en dormance dans les périodes de froid et d'assurer la croissance en conditions favorables. Le développement d'un système racinaire profond et la préservation des bourgeons qui assurent sa pérennité sont ainsi une priorité. La luzerne exige des sols profonds, fertiles et bien drainés avec des pH proche de la neutralité (supérieur à 6- 6,5) afin de maximiser son potentiel. Elle craint les sols acides et/ou hydromorphes ainsi que les sols compacts. Elle tolère les sols salins mieux que d'autres espèces fourragères. Son plus grand développement est de la fin du printemps jusqu'au début de l'été. Il est important de choisir un sol sain engendrant un développement plus rapide au printemps et des coupes peu fréquentes (préservation des réserves azotées et carbonées des pivots) (Frame, 2005).

C'est une plante qui résiste très bien au gel. Durant la période de froid, elle entre en dormance. Au printemps, elle crée de nouvelles tiges à partir de son pivot central. Elle repousse après l'hiver ou après chaque coupe grâce aux réserves constituées dans ses racines durant les périodes de végétation. Ces réserves durent jusqu'à 10 mois. Elle pousse de Mars à Octobre avec en moyenne de quatre coupes par an espacées de 35 à 45 jours selon la température (Mauriès, 2003).

**Tableau 2:** Stades physiologiques de la luzerne (Mueller et Teuber, 2007)

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

### I.5. Taxonomies et classification des rhizobiums

Les rhizobiums ont été antérieurement définis comme des micro-organismes symbiotiques capables de former des nodosités au niveau du système racinaire des légumineuses. Baldwin et Fred (1929) ont rapporté que la classification des différents rhizobiums devrait être basée sur la spécificité de l'espèce bactérienne par rapport à la plante hôte. Ainsi, Fred et *al.* (1932) ont pu identifier six groupes de nodulation croisée. Cette première classification a connu par la suite plusieurs critiques (Wilson, 1944).

Lohnis et Hansen (1921) ont montré que les rhizobiums présentent une croissance soit lente soit rapide dans le milieu synthétique. Le concept du taux de croissance a été repris par Norris (1965) qui a défini en plus le critère de l'affinité symbiotique. Selon l'auteur, les bactéries à croissance lente n'acidifient pas le milieu de culture et nodulent les légumineuses des régions tropicales, alors que les bactéries à croissance rapide acidifient le milieu de culture et nodulent les légumineuses des régions tempérées.

Aujourd'hui, la taxonomie polyphasique basée sur des techniques spécifiques (phylogénétiques, phénotypiques et génotypiques) est largement utilisée pour définir les nouveaux groupes (Graham *et al.*, 1991 ; Vandamme *et al.*, 1996) et ainsi proposée pour la classification des rhizobia.

### **I.5.1. Sinorhizobium**

*Sinorhizobium meliloti* isolée de *Melilotus* et caractérisée initialement par Dangeard (1926) a été la première espèce reconnue de ce groupe sous le nom de *R. meliloti* (Skerman *et al.*, 1980 ; Jordan, 1984).

D'autres recherches ont indiqué l'isolement de souches à croissance rapide à partir des nodosités de *Glycine max* (Keyser *et al.*, 1982) et de différentes autres légumineuses (Trinick, 1980). Ces souches ont été incluses dans le genre *Rhizobium* sous le nom de *R. fredii* (Scholla *et al.*, 1984) puis elles ont été reclassées au sein de genre *Sinorhizobium* en tant que *Sinorhizobium fredii* (Chen *et al.*, 1988).

Des données moléculaires ont indiqué que *S. fredii* et *S. meliloti* sont très similaires (Jarvis *et al.*, 1992). Par une nouvelle révision du genre, de Lajudie *et al.* (1994) ont pu différencier entre quatre espèces :

- *Sinorhizobium meliloti*, proposée initialement par Dangeard (1926) et isolée à partir des espèces *Melilotus*, *Medicago* et *Trigonella*,
- *Sinorhizobium Saheli* et *Sinorhizobium teranga*, isolées respectivement à partir d'*Acacia* et de *Sesbania*.
- *Sinorhizobium fredii*, isolée initialement de *Glycine max*, *Vigna unguiculata* et *Cajanus cajan*, mais aussi d'autres légumineuses. Scholla *et al.* (1984) ont pu distinguer à partir de tests de sérologie et d'hybridation ADN / ADN, deux chémovars : *fredii* et *siensis*. Chen *et al.* (1995) ont même proposé l'existence de deux espèces différentes : *Sinorhizobium fredii* et *Sinorhizobium xinjiangensis*.

Actuellement, on dénombre 98 espèces réparties en 13 genres appartenant à la famille des Rhizobiacées (Weir, 2016)

**Tableau 3:** Espèces appartenant au genre *Sinorhizobium* (Weir, 2016)

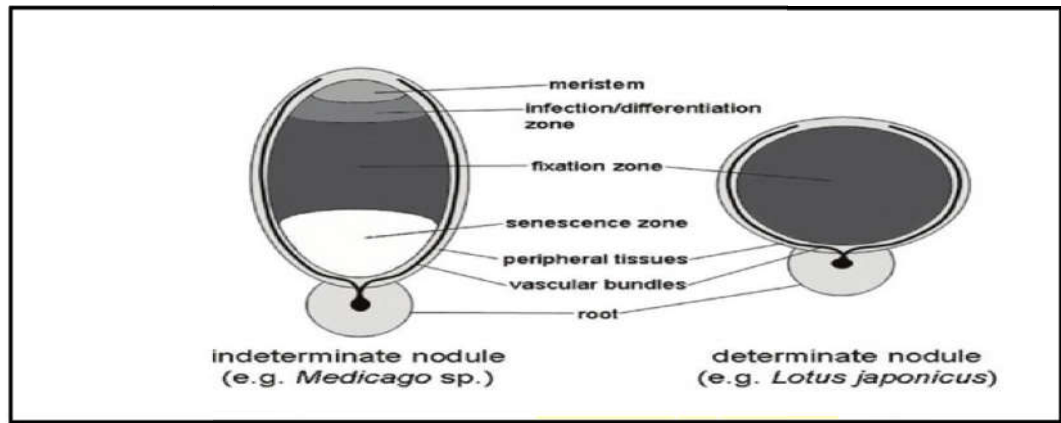
Espèces	références
<i>Ensifer abri</i>	<b>D</b>
<i>Sinorhizobium americanum</i>	<b>F</b>
<i>Ensifer arboris</i>	
<i>Ensifer fredii</i>	formerly <i>Rhizobium fredii</i> , former Type of <i>Sinorhizobium</i> <b>G</b>
<i>Ensifer garamanticus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer indiaense</i>	<b>D</b>
<i>Ensifer kostiensis</i>	
<i>Ensifer kummerowiae</i>	
<i>Ensifer medicae</i>	
<i>Ensifer meliloti</i>	formerly <i>Rhizobium meliloti</i>
<i>Ensifer mexicanus</i>	Lloret et al. (2007)
' <i>Sinorhizobium morelense</i> '	<b>E</b>
<i>Ensifer adhaerens</i>	<b>A</b>
<i>Ensifer numidicus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer saheli</i>	<b>B</b>
<i>Ensifer sojaj</i>	Li et al. (in press)
<i>Ensifer terangae</i>	<b>C</b>

### I.6. La nodulation

La famille des légumineuses rassemble aussi bien des arbres que des herbacées annuelles. Ces plantes sont pour la plupart capables d'interagir avec les rhizobia qui sont quant à elles divisées en 13 genres bactériens (Gyaneshwar et *al.*, 2011). De cette diversité résulte une grande variabilité dans l'interaction entre ces deux organismes. Au niveau morphologique, les structures d'accueil des bactéries présentent une grande disparité (Masson-Boivin et *al.*, 2009). Il existe en effet des nodules sur tige et d'autres sur racine. Au niveau des nodules racinaires, nous en distinguons deux grands types en fonction de la morphologie et du processus de formation du nodule (Ferguson et *al.*, 2010):

- Les nodules déterminés: Généralement présents chez les légumineuses tropicales ou subtropicales, de forme ronde avec une croissance définie.
- Les Nodules indéterminés: Habituellement présents chez les légumineuses tempérées, de forme allongée avec une croissance indéfinie.





**Figure 2 :** Architecture de nodule déterminé et indéterminé (Dilworth et al., 2008)

**Tableau 4:** 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	Céristème 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, clovers et pea</i>	<i>Soybean, bean, Pongamiapinnata, et Lotus</i>

### 1.6.1. Processus de la nodulation

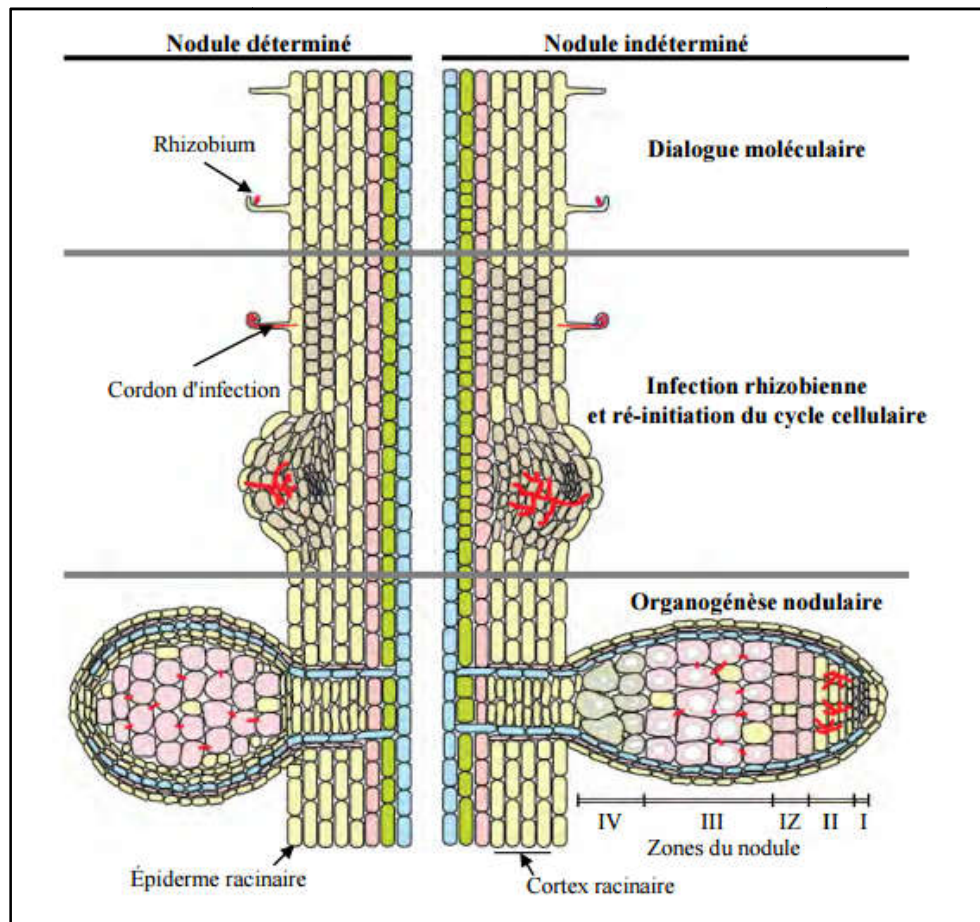
La mise en place de la symbiose rhizobienne peut se diviser en trois grandes étapes:

1. L'étape pré-symbiotique durant laquelle les deux organismes se reconnaissent via un échange de molécules diffusibles.
2. La pénétration des bactéries dans les tissus de l'hôte associée à une initiation des divisions cellulaires corticales.

3. L'organogenèse nodulaire, le développement d'un nouvel organe dédié à la fixation de l'azote (Popp et Ott, 2011).

#### **1.6.1.1. L'étape pré-symbiotique**

Comme pour les symbioses AM et actinorhizienne, le succès de l'interaction entre les rhizobia et les légumineuses est conditionné par un dialogue moléculaire entre les deux organismes. Ce dialogue est initié par la plante qui en condition de carence azotée, diffuse dans la rhizosphère des composés phénoliques (flavonoïdes) reconnus par les bactéries présentes dans l'environnement racinaire proche (Weston et Mathesius, 2013). Ces composés activent chez la bactérie la synthèse de molécules clefs, appelées facteurs Nod(NF) (Cooper, 2007). Les NF sont perçus par la plante hôte et induisent les premières réponses cytologiques et moléculaires au niveau de la racine (Lerouge et *al.*, 1990). Parmi les réponses cytologiques les plus précoces, nous notons une déformation des poils racinaires principalement dans une région de la racine appelée zone de sensibilité (Figure03). Cette déformation est la conséquence d'une réorientation de la croissance apicale du poil absorbant après un contact avec les NF (Sieberer et *al.*, 2005). Dans certains cas, les NF purifiés sont aussi capables d'induire des divisions cellulaires aboutissant à la formation de structures comparables aux nodules (Truchet et *al.*, 1991).



**Figure 3:** Principales étapes de la symbiose rhizobium/légumineuse (d'après Popp et Ott, 2011).

#### 1.6.1.2. L'infection et l'initiation des divisions corticales

L'infection rhizobienne qui se traduit par la pénétration de bactéries dans les cellules de la plante, commence par l'attachement des rhizobia à la surface de l'épiderme racinaire. Suite à cette fixation, certaines bactéries se retrouvent piégées par les déformations des poils absorbants dans une structure appelée "crosse de berger" (Oldroyd et *al.*, 2011). Les bactéries continuent alors de se diviser pour former une micro-colonie au niveau de laquelle une dégradation locale de la paroi du poil absorbant est observée (Perrine-Walker et *al.*, 2014).

#### 1.6.1.3. Le développement du nodule (l'organogénèse)

L'organogénèse nodulaire est l'aboutissement de la symbiose rhizobienne et consiste au développement du nodule, un organe racinaire unique et dédié à la fixation d'azote. Dans le cadre de nodules à croissance déterminée, le méristème nodulaire possède une durée de vie limitée, ce qui entraîne la formation d'un organe sphérique sans zonation distincte. Dans ce type d'organe, la différenciation des bactéries et des cellules de l'hôte est partielle (Den

Herder et Parniske, 2009). Au contraire, dans le cadre de nodules indéterminés, un méristème apical dirige la croissance du nodule pendant toute sa vie, ce qui lui confère une forme allongée. En fonction de l'âge du nodule, nous retrouvons quatre à six zones déterminées par un type de cellule et par un stade de différenciation:

- La zone méristématique (Z1) est la zone la plus distale du nodule. (Vasse et *al.*, 1990).
- La zone d'infection (Z2) est celle dans laquelle la différenciation débute. (Foucher et Kondorosi, 2000)
- L'interzone 2-3 (IZ) est constituée de une à trois assises cellulaires riches en amyloplaste. Associée au cortex nodulaire, cette zone constitue une barrière qui limite l'entrée de l'oxygène en zone 3 (Soupène et *al.*, 1995).
- La zone 3 (Z3) est le cœur du nodule. Dans cette zone, les bactéries et les cellules végétales ont atteint un stade terminal de différenciation. (Timmers et *al.*, 1998)
- La zone de sénescence (Z4) qui apparaît plus tardivement, est caractérisée par une coloration verdâtre due à l'oxydation de la leghémoglobine. Dans cette zone, les cellules végétales et les bactéries qu'elles contiennent dégénèrent (Timmers et *al.*, 1998).
- La zone saprophytique (Z5) est une zone encore mal décrite où les bactéries non différenciées sont libérées des cordons d'infections restants (Timmers et *al.*, 2000).

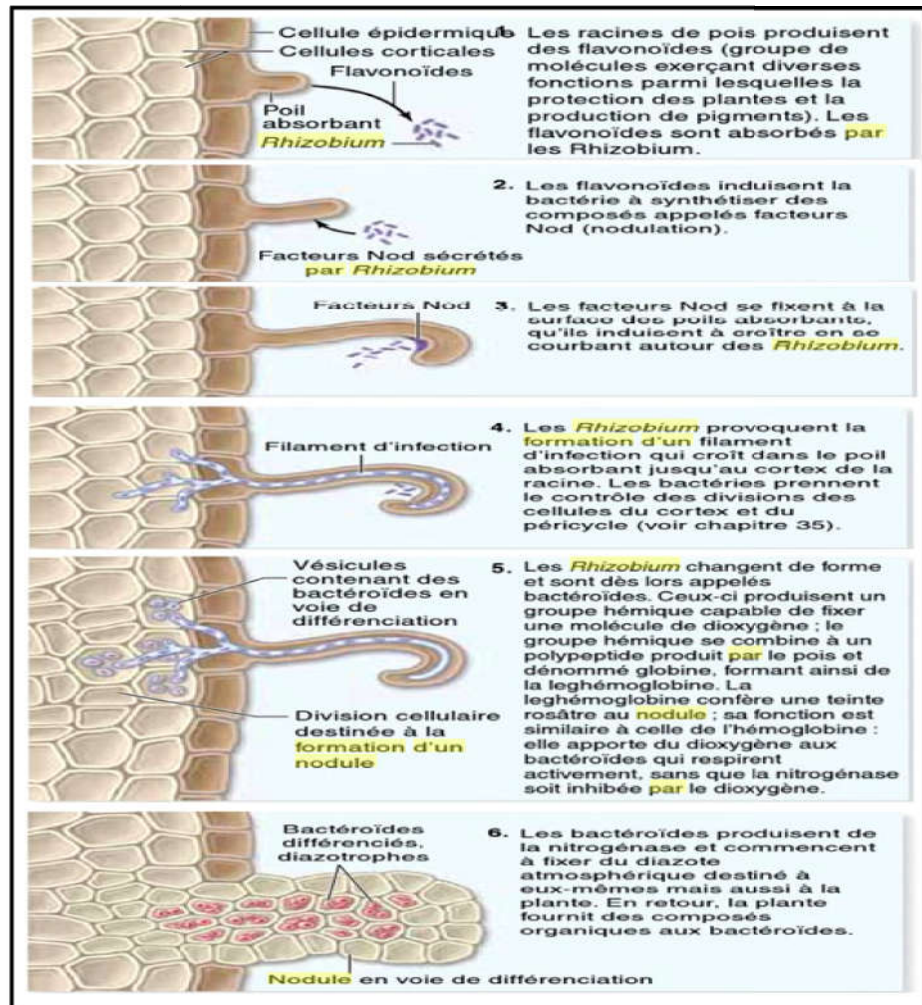


Figure 4 : Formation d'un nodule induit par rhizobium (Georges et al. 2011).

### I.7. La spécificité symbiotique

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobium-légumineuse est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de rhizobium donnée n'est capable, en général, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même, une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de rhizobium (Tilak et al. 2005).

Les associations entre l'hôte et le symbiote sont spécifiques et dans certains cas exclusives. Par exemple, *Sesbania rostrata* n'établit cette symbiose qu'avec *Azorhizobium caulinodans* alors que *Rhizobium* NGR234 est capable de noduler 112 genres de légumineuses.

## 1.8. Facteurs 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) comme par exemple :

- Le pH du sol (Bordeleau et Prevost, 1994).
- Le stress hydrique (Aguirreolea et Sanchez-d'Áyaz, 1989 ; Zahran, 1999 ; Sadowsky, 2005).
- La température (Michiels *et al.*, 1994 ; Zahran, 1999).
- La salinité (Zahran, 2001) qui fait l'objet de notre travail.

### 1.8.1. Le stress salin

La tolérance au sel des rhizobia est très variable et dépend, probablement dans une grande mesure, de l'efficacité de leurs mécanismes d'osmorégulation (Brhada et Le Rudulier, 1995). L'inhibition de la nodulation et de la fixation de l'azote chez les légumineuses sous stress salin, peut s'expliquer en partie par l'incapacité des rhizobia à survivre dans le milieu salin (Craig *et al.*, 1999) .

La salinité affecte l'initiation, ce développement et le fonctionnement des nodules ainsi que la capacité photosynthétique des feuilles. Des études montrent que l'activité nodulaire est moins affectée par la salinité que la nodulation (Bekki *et al.*, 1987; Hafeez *et al.*, 1988). L'infection semble l'étape la plus sensible au sel (Velagaleti *et al.*, 1990). Il semble aussi que la nodulation soit plus sensible que la plante hôte elle-même (Reddell, 1993). Cependant les travaux de Serraj *et al.* (1994, 1995) montrent que NaCl inhibe l'activité de la nitrogénase et la respiration des nodules en diminuant la disponibilité de l'oxygène.

La baisse de la conductance nodulaire à la diffusion de l'oxygène est responsable de l'inhibition de l'activité nitrogénasique (Drevon *et al.*, 1995; Irekti et Drevon, 2003). D'autres résultats suggèrent que l'accumulation des ions toxiques ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) dans la nodosité peut affecter le métabolisme dans ces organes et inhiber leur activité fixatrice de  $\text{N}_2$  (Serraj *et al.*, 1998; Khadri *et al.*, 2003; Pliego *et al.*, 2003). Notons enfin que les plantes noduleées poussent mieux que les mêmes plantes non noduleées lorsqu'on les cultive dans un sol légèrement salin (Dommergues *et al.*, 1999).

## 1.9. Généralités sur la salinité

### 1.9.1. Définition

La salinité des sols et celles des eaux d'irrigation désigne la surcharge de ces derniers en sels minéraux solubles. Elle est causée par la combinaison de quatre cations ( $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{Mg}_2^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ ) et de quatre anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ ) (Hu et Schmidhalter, 2001 ; Geetanjali et Neera, 2008).

Les sols salins se caractérisent par la présence dans la rhizosphère de sels solubles en concentration suffisamment élevée pour nuire à la plupart des plantes (Munns et Termaat, 1986). La salinité du sol est causée par une combinaison de facteurs géologiques, climatiques et agronomiques (Rengasamy, 2006). La salinité qui était présente avant la colonisation des terres est souvent appelée salinité historique ou primaire, tandis que les cas de salinité soupçonnés s'être développés principalement après cette colonisation sont souvent appelées remontées salines ou la salinisation secondaire (Ghassemi et *al.*, 1995).

### 1.9.2. Sols salins et eaux salées

L'évaluation de la salinité des sols et celles des eaux d'irrigation est en général définie par leurs conductivités électriques (CE) à 25 °C. Cette dernière est exprimée en décisiemens par mètre (ds/m) qui est équivalent au mmhos par centimètre (mmhos/cm).

Un sol est dit salin lorsqu'il présente une CE supérieure à 4 mmhos/cm à 25 °C (Dommergue et Mougenot, 1970). Le Comité d'experts sur la prospection pédologique formé en 1984 a classé les sols salins selon leur teneur en sels (modérée ou forte) à deux profondeurs (Tableau 05) (Brady, 2002).

Les eaux dont la CE est inférieure à 0,25 mmhos/cm sont faiblement salines alors que celles dont la CE est comprise entre 0,75 et 2,25 mmhos/cm sont très salines. Une autre classification des eaux d'irrigation (tableau 06) est proposée par Durand (1983), celle-ci est basée sur la conductivité électrique et le taux d'absorption du sodium (SAR).

**Tableau 5:** Classification des sols salinisés (Brady, 2002).

Classification	Conductivité électrique (dS m <sup>-1</sup> )	pH du sol	Ratio d'adsorption du sodium	Condition physique du sol
Saline	> 4.0	< 8.5	< 13	Normal
Salin-sodique	> 4.0	< 8.5	> 13	Normale
Sodique	< 4.0	> 8.5	> 13	Pauvre

**Tableau 6:** Classification des eaux d'irrigation selon leurs CE et le taux d'absorption du sodium (SAR) (Durand, 1983).

Classe de salinité	CE (mmhos/cm)	Degré de salinité
C1	0,00 à 0,25	Faible
C2	0,25 à 0,75	Moyen
C3	0,75 à 2,25	Fort
C4	2,25 à 5	Très fort
C5	> 5	Excessif

### 1.9.3. Mesure de la salinité

On dispose de nombreuses méthodes pour mesurer la salinité d'un sol. Certaines sont fondées sur des procédures analytiques et permettent de connaître la concentration d'un élément soluble, ce qui implique des prélèvements d'échantillons de sol, ou de solution du sol. D'autres utilisent les propriétés électriques du sol soit par propagation de signaux (induction électromagnétique, résistivité, réflectométrie), soit par capteurs in situ (conductivité). La mise en œuvre de ces dernières techniques demande moins d'investissements financiers et humains que les méthodes analytiques. Cependant, une combinaison de ces deux méthodologies est souhaitable pour minimiser le nombre de prélèvements, caractériser de plus grandes surfaces et suivre les évolutions temporelles (Rhoades, 1984).



## 1.10. Effets de la salinité sur la symbiose rhizobia-légumineuses

### 1.10.1. Effet sur la germination des graines

La germination constitue un stade critique dans le cycle de développement de la plante. Elle conditionne l'installation de la plantule, sa fixation sur le milieu, et probablement sa productivité ultérieure. La germination des plantes, qu'elles soient halophytes ou glycophytes, est affectée par la salinité (Debez A et *al.*, 2001) .

L'influence de NaCl sur la germination de la légumineuse *Medicago sativa L.* se traduit soit par un allongement de la phase de latence avant la germination, soit par l'inhibition complète de celle-ci (Farissi et *al.*, 2001 et 2013).

Chez d'autres plantes légumineuses telles que *Glycine max*, *Mucuna pogeii*, *Phaseolus adenanthus*, *Phaseolus vulgaris* et *Vigna unguiculata* (Taffouo et *al.*, 2009) ont noté que les pourcentages de germination des graines diminuaient à partir d'une concentration de 50 mM NaCl. Ces réductions peuvent être dues à la création d'un potentiel osmotique externe qui empêche l'absorption d'eau ou à des effets toxiques des ions sodium et chlorure sur les graines en germination (Khajeh-hossini et Powell, 2003).

En fait, le stress salin affecte le métabolisme de l'embryon des graines en germination et induit des perturbations dans les processus impliqués dans la mobilisation des réserves de l'endosperme (Farissi et *al.*, 2001) .

La salinité entraîne une réduction de l'activité des enzymes hydrolytiques de l'endosperme des graines, telles que les amylases, les protéases et les phosphatases. Cette réduction est plus importante chez les légumineuses sensibles que chez les tolérantes (Dubey, 1994).

### 1.10.2. Effet sur la croissance des légumineuses

La salinité est une contrainte majeure qui affecte la croissance et le développement des plantes. La croissance de la majorité des plantes est réduite ou inhibée quand la concentration en sel dans l'environnement racinaire s'élève au dessus de 100 mM NaCl. Chez les légumineuses, l'effet dépressif du sel se manifeste à partir d'un seuil critique de concentration, caractéristique de l'espèce ou de la variété (Farissi et *al.*, 2011 et 2013 ; Faghire et *al.*, 2011) .

Ainsi, la croissance végétative de *Phaseolus vulgaris* L. est fortement déprimée par une concentration de NaCl de l'ordre de 25 mM (Faghire et al., 2011). Chez la luzerne, le sel entraîne une réduction des productions de matière sèche aérienne et racinaire (Ibriz et al., 2004 ; Chaabena et al., 2004). Plusieurs causes sont évoquées pour expliquer le déterminisme de la réduction de la croissance sous les conditions de stress salin, incluant entre autre, la diminution du contrôle du statut hydrique (Khajeh-hossini et Powell, 2003), le désordre nutritionnel (Farissi et al., 2011 ), le ralentissement de la synthèse protéique, la perturbation de la stabilité des structures membranaires et l'inhibition de l'activité des enzymes (Blaha et al., 2000 ; Faghire et al., 2011 ), les changements dans l'extensibilité de la paroi cellulaire en relation avec sa composition protéique, et la réduction de la capacité photosynthétique (Erice et al., 2010).

Mezni (2010) a montré que le stress causé par la salinité inhibe de manière significative la croissance de différents organes de la luzerne, toutefois, les racines sont souvent plus touchées que les parties aériennes (Amooghaie, 2011).

### **1.10.3. Effet sur la croissance et la survie des rhizobia**

La salinité est un facteur majeur limitant la fixation symbiotique de l'azote. Elle affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol (Farissi et al., 2014).

Jebara et al. (2000), ont montré que certains isolats de *Sinorhizobium nodulans* *Medicago* sp, avaient une croissance lente sous des conditions salines. La croissance des rhizobia a été notée normale sous des concentrations en NaCl d'environ 1 %. Certaines souches ont été rapportées pour leur capacité à croître à des concentrations élevées en sel (>3%), notamment *Sinorhizobium meliloti* (Chen ,2000).

### **1.10.4. Effet sur le processus d'infection et de développement des nodules**

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia indirectement, en réduisant la croissance de la plante hôte et en affectant certains de ses processus physiologiques, ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules (Zahran, 1999 ; Jebara et al.,2000 ; Cesar et al.,2011 ).

Chez des cultivars tolérants de pois chiche, la salinité inhibe le processus d'infection et affecte la taille et le nombre des nodules (Borucki, Sujkowska, 2008), tandis que chez la fève, une inhibition du cordon d'infection a été remarquée (Zahran et Sprent, 1986).

Cependant, une stimulation de la croissance des nodules a été observée chez certaines légumineuses comme les cultivars tolérants du pois chiche (Soussi, 1999) ou de luzerne (Aydi et al., 2008). En général, les premières étapes de la nodulation sont les plus sensibles au stress salin (Cesar et al., 2011).

#### **1.10.5. Effet sur la fixation biologique de l'azote et la respiration nodulaire**

La salinité inhibe l'activité de la nitrogénase (Aydi S et al., 2008) et la respiration nodulaire (Serraj et al., 1994) qui cause, par la suite, une diminution des teneurs en azote total dans la plante (Salehi et al., 2008; Faghire et al., 2011).

La réduction de l'activité fixatrice de N<sub>2</sub> est généralement due à la réduction de la respiration nodulaire (Bargaz et al., 2011). Cette réduction est due à une limitation du substrat N<sub>2</sub> ou à la régulation de la diffusion de l'oxygène dans le nodule (Serrat, 2002) ou une diminution de la production de protéines cytosoliques, surtout la légghémoglobine, par les nodules (López et al., 2008).

Serraj et al. (1994), ont montré que l'augmentation de la pression d'oxygène dans le milieu d'une racine nodulée permet de supprimer l'effet inhibiteur du stress salin sur l'activité nitrogénase. D'autres résultats suggèrent que l'accumulation des ions toxiques (Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>) dans les nodosités peut affecter le métabolisme dans ces organes et inhiber leur activité fixatrice d'azote (Cordovilla et al., 1995).

#### **1.10.6. Effet sur les paramètres hydriques**

Dans la nature, les plantes perdent de l'eau par transpiration et ont tendance à la remplacer par son absorption à partir de la solution du sol (Yeo, 1998).

La présence des sels dans le milieu de culture limite la disponibilité de l'eau pour la plante et par conséquent, cette dernière se trouve en état de déficit hydrique (Farissi et al., 2013). Les potentiels hydrique et osmotique de plantes deviennent plus négatifs avec l'augmentation de la salinité, alors que la pression de turgescence se trouve augmentée (Khan, 2001).

Le stress salin réduit la teneur en eau, le contenu relatif en eau et le potentiel hydrique chez les légumineuses telles que *Phaseolus vulgaris* L. ( Snoussi et *al.*, 2004), *Vicia faba* L. Rabie et Almadini, 2005) et *Ceratonia siliqua* L. (El-Refaeye et El-Dengawy, 2011).

Ces réductions sont plus importantes chez les cultivars sensibles comparativement aux tolérants. Le statut hydrique de la plante est un facteur déterminant pour l'activité métabolique et la survie des feuilles (Sinclair et Ludlow, 1985). La réduction de la teneur relative en eau entraîne une faible disponibilité de l'eau pour l'extension cellulaire (Katerji et *al.*, 1997).

#### **1.10.7. Effet sur la photosynthèse**

L'effet de salinité sur la photosynthèse se manifeste essentiellement par la réduction de l'assimilation du CO<sub>2</sub>, la conductance stomatique (Deng et *al.*, 2010 ; Latrach et *al.*, 2014) et le ralentissement de l'activité du transport des électrons du photosystème II (Eyidogan et Oz, 2007).

La réduction de la photosynthèse par la salinité est l'une des causes majeures de la réduction de la croissance et de la productivité végétale. Dans ce sens, les mesures de la photosynthèse sont souvent utilisées dans les études d'adaptation des plantes à différentes contraintes du milieu, telles que la salinité. Garg et Singla (2004) ont noté les réductions de l'assimilation photosynthétique nette (PN), la concentration interne en CO<sub>2</sub>, la conductance des stomates et la transpiration chez les plantes de pois chiche. Le même constat a été observé par Gama et *al.* (2007) chez l'haricot. La réduction de PN est accompagnée de la réduction de la conductance des stomates. La fermeture de ceux-ci pourrait être à l'origine de la diminution de la concentration intracellulaire en CO<sub>2</sub> par limitation de son entrée dans les feuilles.

#### **1.10.8. Effet sur le métabolisme carbone**

L'énergie nécessaire à la fixation de l'azote par les bactéroïdes est fournie par la plante sous forme de carbone réduit. La plante fournit du saccharose à travers le phloème. De fortes activités sucrose synthase et invertase sont présentes dans le cytosol des cellules infectées, permettant l'hydrolyse du saccharose en glucose. Le glucose est ensuite métabolisé en phosphoénolpyruvate, en oxaloacétate, en malate et en succinate. Ces deux derniers composants constituent la principale source carbonée des bactéroïdes (Kahn et *al.*, 1998).

Le malate est un métabolite clé chez les plantes et il est synthétisé par l'action de phosphoénolpyruvate carboxylase et la malate déshydrogénase. Une inhibition de l'activité de ces deux enzymes, de la sucrose synthase et de l'invertase alcaline a été noté dans les nodules de luzerne et de haricot (López et al., 2008 ; Faghire et al., 2011).

#### 1.10.9. Effet sur la nutrition minérale

Le stress salin engendre un déséquilibre de la nutrition minérale de la plante qui résulte d'une perturbation de l'absorption et du transport des éléments essentiels. En général, la présence du NaCl dans le milieu de culture inhibe l'absorption des ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Pi$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$  et renforce celle des ions salins,  $Na^+$  et  $Cl^-$  qui s'accumulent jusqu'à devenir toxiques pour la plante (Mezni et al., 2010 ; Faghire et al., 2011).

Ainsi, Farissi et al. (2014), ont montré chez *Medicago sativa* L. que la contrainte saline engendrait des réductions significatives de  $K^+$  et des accumulations significatives de  $Na^+$ . Chez la même espèce, Ibriz et al. (2004), ont noté que la salinité provoquait une accumulation de  $Na^+$  et  $Cl^-$ , et une réduction d'absorption de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et de N. Les activités de certaines enzymes impliquées dans la nutrition azotée n'échappent pas à la surcharge en sel. En effet, il s'est avéré que le stress salin a une influence sur l'activité de la nitrate réductase (Farissi et al., 2014b), une enzyme clé dans les processus d'assimilation de l'azote.

Gouia et al. (1994) ont noté que l'effet négatif du NaCl sur l'activité de cette enzyme était plus remarquable sur les plantes de la fève sensible au sel. Egalement, l'augmentation de la concentration en NaCl réduit l'activité nitrate réductase dans les organes de *Medicago sativa* L. (Khan et al., 1995).

# **Chapitre II**

## ***Matériel et Méthodes***

Notre travail est divisé en deux parties : la première partie consiste à mettre en place le test symbiotique, *in vivo*, dans des conditions salines avec une variété locale de luzerne (*Medicago sativa* L.), provenant de la région d'Ouargla, et trois souches rhizobiennes sélectionnées pour leur efficacité parmi une collection d'une centaine d'isolats. La deuxième partie consiste à mettre en place le test de germination *in vitro* sous conditions de salinité et à l'étude de l'interaction symbiotique durant la phase précoce de développement, afin de choisir la combinaison qui résiste le mieux à la salinité tout en garantissant une bonne germination des graines.

## **II.1. Mise en place du test symbiotique *in vivo***

### **II.1.1. Matériel d'étude**

#### **II.1.1.1. Le substrat de culture**

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

##### **II.1.1.1.1. Déminéralisation du sable**

Elle est réalisée selon la méthode préconisée par Djerroudi (2017). Une quantité d'acide chlorhydrique (esprit de sel) est versée sur le sable et laissée réagir pendant 15 mn. Des lavages successifs (six lavages) à l'eau filtrée sont appliqués pour enlever les restes de l'acide chlorhydrique, suivis de trois lavages à l'eau distillée (figure 5).



**Figure 5 :** Etapes de déminéralisation du sable

Le séchage du sable est effectué à l'air libre pendant 03 jours. Puis, une stérilisation s'en est suivie au four pasteur pendant 02 h à 180°C.



**Figure 6 :** Séchage du sable à l'air libre

#### **II.1.1.1.2. Stérilisation et remplissage des pots**

Nous avons commencé par laver et stériliser les pots avec du savon de vaisselle, puis tremper dans l'hypochlorite de sodium (eau javel). Enfin, un dernier lavage est effectué à l'eau distillée. Les pots sont ensuite remplis par le sable préalablement déminéralisé et stérilisé.



**Figure 7 :** Remplissage des pots

#### **II.1.1.2. Le matériel végétal**

Les graines de luzerne (*Medicago sativa* L.) que nous avons utilisé proviennent de la région de Ouargla, que les agriculteurs locaux cultivent depuis plusieurs années.



### II.1.1.2.1. Désinfection et pré-germination des graines

#### A. Désinfection des graines

Nous avons suivi les étapes décrites par Vincent (1970) comme illustré dans la Figure 8 :

- Trempage des graines dans l'éthanol (96°) pendant 5 à 10 secondes.
- Trempage dans l'hypochlorite de sodium pendant 5 à 10 minutes.
- Lavages successifs (10 fois) à l'eau distillée pour se débarrasser des restes d'alcool et de l'eau javel.



Figure 8 : Désinfection des graines

#### B. Prégermination des graines

Les graines désinfectées sont trempées dans des flacons stériles remplis d'eau distillée stérile et laissées toute une nuit au réfrigérateur à 4°C selon la méthode de Somasegaran et Hoben (1985).

### II.1.1.3. Le matériel microbiologique

Deux souches rhizobiennes locales (S1 et S2) que nous avons utilisées sont isolées à partir de nodosités prélevées de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*) provenant d'une zone agroécologique de la région de Ouargla. Une souche de référence (souche *Sinorhizobium meliloti* 2011), fournie par le Laboratoire de l'INRA de Toulouse (France), sur laquelle plusieurs études ont été réalisées à travers le monde, est utilisée pour servir à la comparaison avec les souches autochtones.

## II.1.2. Méthodes d'étude

### II.1.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien

- Tout d'abord, nous avons préparé notre milieu de culture liquide dénommé YMB (Yeast Mannitol Broth) (Vincent, 1970) dont la composition (en g/l) est la suivante :

Mannitol.....	2,5g
Extrait de levure.....	0,35g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O).....	0,46g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,12g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,46g
NaCl.....	0, 1g
Eau distillée.....	1000 ml
Ajustement du pH à 6.8 (± 0,2)	
Autoclavage à 120 °C pendant 20 mn.	

- Remplissage des flacons stériles par le milieu de culture YMB.
- Prélèvement d'une colonie bactérienne des souches à utiliser à l'aide d'une anse de platine passée au bec benzen.
- Ensemencement des flacons.
- Étiquetage des flacons selon les noms des souches bactériennes.
- Incubation des flacons à 28°C pendant 72h et agitation à 220 tr/mn.

**NB.** Les manipulations sont réalisées sous conditions d'asepsie pour éviter, au maximum, les risques de contamination.



**Figure 9:** Incubation d'inoculum bactérien préparé.

### **II.1.2.2. Mise en culture des graines**

Six graines par pot sont semées. Un éclaircissage sera fait par la suite, pour ne laisser que trois plantes par pot.



**Figure 10 :** Semis des graines.

### II.1.2.3. Inoculation des pots

A l'aide de seringues stériles, nous avons effectué l'inoculation à raison de 3 ml/pot. L'étiquetage des pots est réalisé selon les codes des souches bactériennes et de la concentration en sel.



**Figure 11:** L'inoculation des pots.

### II.2.4. Arrosage et suivi des plantes

Nous avons commencé l'arrosage à raison de 03 arrosages par semaine avec la solution nutritive de *Fahareus* (Somasegaran et Hoben, 1985) dont la composition est la suivante (g/l) :

#### Macroéléments :

MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O.....0,12g

CaCl<sub>2</sub>.....0,1g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,1g

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO.5H<sub>2</sub>O...0,005g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,1g

**Microéléments :**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,86g	} 1000ml eau distillée
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	2,03g	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,22g	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,08g	

Ajustement du pH à 6.8

Autoclavage à 120°C pendant 20mn

Après ça, en ajoute le sel (NaCl) à 03 concentrations différentes :

- C1: sans sel
- C2: 2.33g/l
- C3: 4.67 g/l



**Figure 12:** Préparation des solutions nutritives avec les différentes concentrations en NaCl.



**Figure 13:** Arrosage des plantes.

#### **II.1.2.5. Le choix de la solution de Fahareus**

Nous avons choisi la solution nutritive de *Fahareus* parce qu'elle ne contient pas d'azote. Ce dernier doit être fourni par les souches rhizobiennes apportées par inoculation.

La dose d'arrosage est de 50 ml, voir 100 ml après les week-ends. Quelques fois, nous avons procédé à l'irrigation avec de l'eau distillée pour éviter la formation de croûtes salines superficielles.

#### **II.1.2.6. Prélèvements des plantes**

Après deux mois et demi d'expérimentation (le semis : 05 Février, récolte : 20 Avril), nous avons récoltées les plantes. Suivant une fiche détaillée des différents paramètres à étudiés, nous avons procédé à l'analyse de ces derniers en relation avec la croissance végétale et la nodulation.

Pour faciliter la récolte des plantes, nous les avons trempé dans une bassine pleine d'eau, comme ça les racines se détacheront facilement sans qu'elles soient abimées.

Ci-dessous les photos illustrant les étapes suivies durant la récolte :

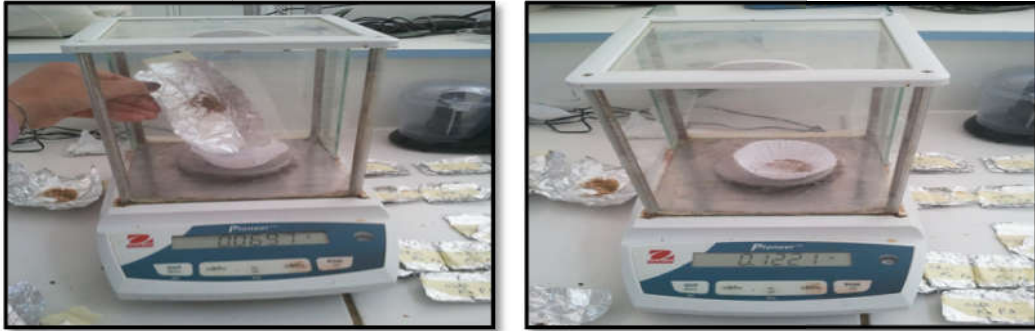


**Figure 14 :** Trempage des pots dans de l'eau et déterrement soigneux des racines.



**Figure 15:** Ressuyage des racines dans du papier absorbant.

Après déterrement des racines, nous les avons ressuyés dans du papier absorbant pour faciliter leur observation.



**Figure 16:** Les pesés des poids secs des parties aériennes et souterraines.

Les pesées des parties aériennes et souterraines ont été effectuées après 48h de séchage dans une étuve sèche à 70°C (Shibley et Vu, 2002 ; Zaka et *al.*, 2015).

## **II.2. Mise en place du test de germination *in vitro***

### **II.2.1. Matériel d'étude**

#### **II.2.1.1. Le matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé est celui décrit dans la première partie ci-dessus.

##### **II.2.1.1.1. Désinfection et prégermination des graines**

Ces deux étapes sont réalisées selon les mêmes protocoles expliqués dans la partie précédente.

#### **II.2.1.2. Le matériel microbiologique**

Nous avons utilisé les mêmes souches que celles prises dans la partie de la culture *in vivo*.

### **II.2.2. Méthode d'étude**

#### **II.2.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien**

Nous avons utilisé le même milieu de culture liquide dénommé YMB (Yeast Mannitol Broth) (Vincent, 1970) que nous avons utilisé dans la partie de la culture *in vivo*.



### II.2.2.2. préparation de solutions nutritive solide-saline

Nous avons préparé dans ce cas une solution nutritive solide de *Fahareus* (Somasegaran et Hoben, 1985), avec ajout de 15 g/l d'agar.

Après ça, en ajoute le sel (NaCl) aux différentes concentrations voulues :

C0 : Solution nutritive sans sel

C1 : Solution nutritive avec 0.5 g/l de sel

C2 : Solution nutritive avec 1 g/l de sel

C3 : Solution nutritive avec 1.5 g/l de sel

C4 : Solution nutritive avec 2 g/l de sel

C5 : Solution nutritive avec 2.5 g/l de sel



**Figure 17:** Préparation des solutions nutritives solides avec sel.

### II.2.2.3. Remplissage des boîtes pétri

A l'aide de seringues stériles, nous avons effectué le remplissage des boîtes à raison de 10 ml/boîte. L'étiquetage des boîtes est réalisé selon les codes des souches bactériennes et de la concentration en sel.



**Figure 18:** Remplissage des boîtes par le milieu nutritif.

### II.2.2.3. Mise en germination des graines

Après la gélification de la solution nutritive, nous mettons cinq graines par boîte.



**Figure 19:** La mise en germination des grains.

### II.2.2.4. Inoculation des boîtes

A l'aide de seringues stériles, nous avons effectué l'inoculation à raison de 1 ml/boîte. L'étiquetage des boîtes est réalisé selon les codes des souches bactériennes et de la concentration en sel.

### II.2.2.5. Prélèvements des plantules

Après une semaine de la germination des plantules au niveau de phytotron, nous avons prélevées les plantules. Suivant une fiche détaillée des différents paramètres à étudiés, nous

avons procédé à l'analyse de ces derniers en relation avec la croissance végétale et le stress salin.

# **Chapitre III**

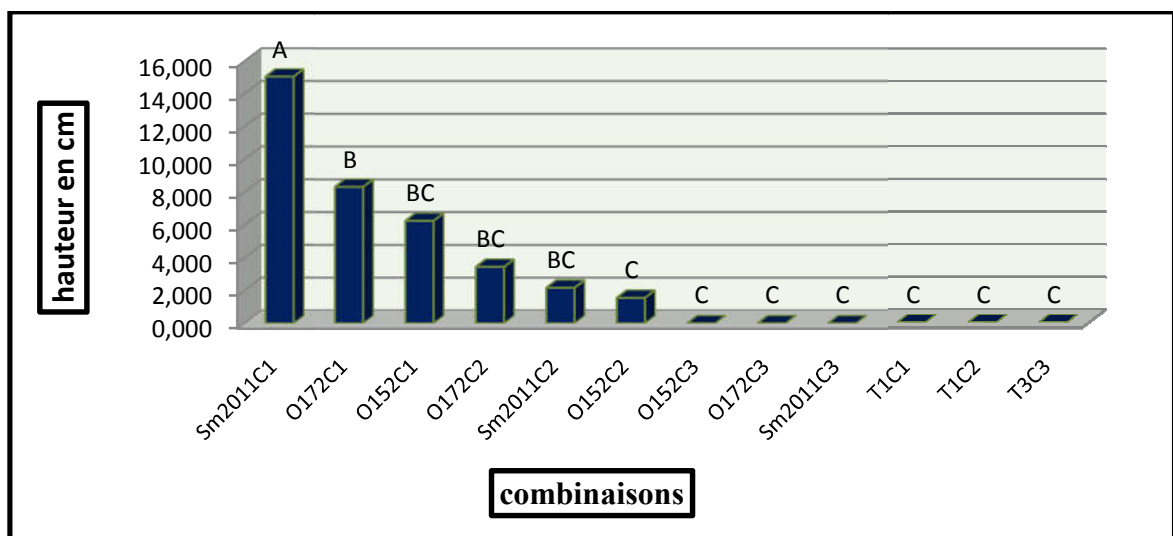
## ***Résultats et discussions***

Notre travail est divisé par deux parties : La première partie consiste à mettre en place le test symbiotique, *in vivo*, dans les conditions salines entre une variété locale de luzerne (*Medicago sativa* L.), provenant de la région d'Ouargla, et trois souches rhizobiennes sélectionnées pour leur efficacité parmi une collection d'une centaine d'isolats. La deuxième partie consiste à mettre en place du test de germination *in vitro* sous conditions de salinité et à l'étude de l'interaction symbiotique durant la phase précoce de développement, afin de choisir la combinaison qui résiste le mieux à la salinité tout en garantissant une bonne germination des graines.

### III.1. Le test symbiotique *in vivo*

L'effet de l'inoculation et de stress salin sur la croissance des différentes parties végétatives est indiqué dans les figures ci-dessous (figure 5 et figure 6).

#### III.1.1. Hauteur des tiges

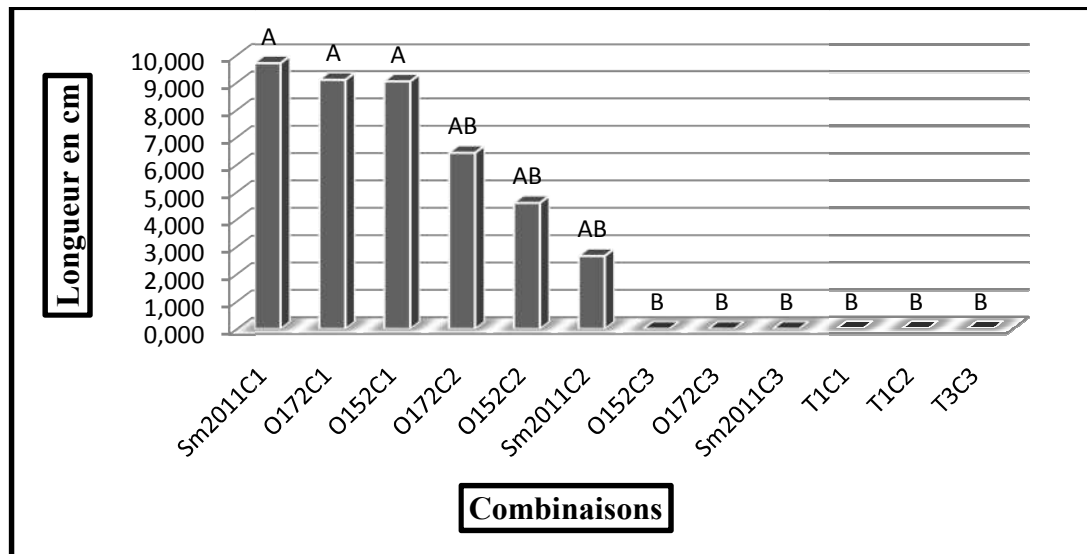


**Figure 20:** Hauteur de la partie aérienne des plantes de luzerne en fonction des combinaisons.

Les résultats de l'analyse de la variance ont montré des différences significatives entre les groupes obtenus. La figure 5 montre que le groupe A relatif à la combinaison Sm2011C1 montre la meilleure croissance en hauteur des tiges, suivi par le groupe B de la combinaison O172C1. Les combinaisons 152C1, O172C2 et Sm2011C2 respectivement, montrent des hauteurs de tiges faibles et appartenant au groupe BC. Enfin, les combinaisons appartenant au

groupe C : O152C3, O172C3, Sm2011C3, T1C1, T1C2 et T3C3 n'ont enregistré aucune croissance des plantes sauf la combinaison O152C2 qui a donné une légère croissance.

### III.1.2. Longueur des racines



**Figure 21:** Longueur de la partie racinaire des plantes en fonction des combinaisons.

Les résultats de l'analyse de la variance ont montré des différences significatives entre les groupes obtenus. La figure 6 montre que le groupe A relatif aux combinaisons Sm2011C1, O172C1 et O152C1 montre le meilleur résultat en longueur des racines, suivi par les combinaisons O172C2, O152C2 et Sm2011C2 du groupe AB. Enfin, les combinaisons O152C3, O172C3, Sm2011C3, T1C1, T1C2 et T3C3 du groupe B n'ont enregistré aucune croissance racinaire.

Nous remarquons que plus la salinité augmente, la hauteur des tiges et la longueur des racines diminuent, ce qui renseigne sur l'effet négatif de la salinité sur le développement des plantes.

En général, nos résultats s'accordent avec ceux de Sairam et Tyagi (2004) qui indiquent que le stress salin induit une diminution de la croissance des plantes et des processus de développement.

La salinité est une contrainte majeure qui affecte la croissance et le développement des plantes (Farissi et al., 2014). La croissance de la majorité des plantes est réduite ou inhibée

quand la concentration en sel dans l'environnement racinaire s'élève au dessus de 100 mM (5, 83 g/l) de NaCl (Farissi et *al.*, 2014).

Le stress salin engendre un déséquilibre de la nutrition minérale de la plante qui résulte d'une perturbation de l'absorption et du transport des éléments essentiels. En général, la présence du NaCl dans le milieu de culture inhibe l'absorption des ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Pi$ ,  $NO_3$ ,  $NH_4^+$  et renforce celle des ions salins,  $Na^+$  et  $Cl^-$  qui s'accumulent jusqu'à devenir toxiques pour la plante (Mezni et *al.*, 2010 ; Faghire et *al.*, 2011).

Munns et *al.* (1995) montrant aussi que la majorité des changements physiologiques notés chez les plantes soumises à un stress salin est une réponse à des composantes osmotiques. Néanmoins, en présence d'une osmorégulation, les plantes traitées par le sel sont confrontées au problème d'accumulation d'ions toxiques dans leurs tissus, ce qui est considéré comme un élément clé limitant la croissance des plantes en milieu salin.

Ainsi, Farissi et *al.* (2014) ont montré, chez *Medicago sativa* L., que la contrainte saline engendrait des réductions significatives de  $K^+$  et des accumulations significatives de  $Na^+$ . Chez la même espèce, Ibriz et *al.* (2004) ont noté que la salinité provoquait une accumulation de  $Na^+$  et  $Cl^-$ , et une réduction d'absorption de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et de N.

La différence de hauteurs des tiges et des longueurs des racines entre les plantes et due, probablement, à la différence de l'efficacité des combinaisons entre la souche rhizobienne et les différentes concentrations en NaCl. Les plus efficaces se traduisent souvent par une meilleure croissance des plantes (Sm2011C1, 0172C1 et 0152C1) et inversement les inefficaces par des plantes chétives.

Les souches 0172, 0152 et Sm2011 de C2 montrent, quant à elles, la plus faible hauteur due peut être à l'efficacité faible de la souche combinée avec la concentration en NaCl ce qui s'est traduit par des plantules naines.

Les souches 0152, 0172, Sm2011 de C3 et les témoins T n'ont enregistré aucune valeur due à la mort des plantes.

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

Ravikumar (2012), a montré aussi que tous les paramètres de croissance et de rendement sont augmentés chez les plantes inoculées par rapport aux témoins et sont statistiquement significatifs. Ces augmentations significatives de la croissance et du rendement sont dues aux inoculum de Rhizobiums.

### III.1.3. Poids sec de la partie aérienne

L'effet de l'inoculation et du stress salin sur le rendement en biomasse sèche de la partie aérienne est illustré par la figure suivante:

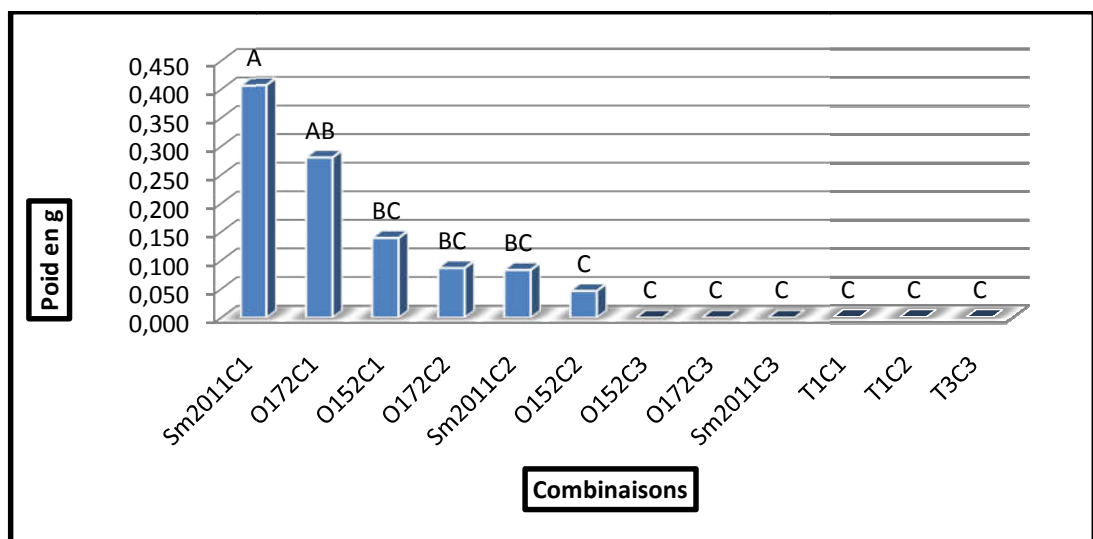


Figure 22: Poids sec de la partie aérienne des plantes.

Les résultats de l'analyse de la variance obtenus montrent des différences significatives entre les groupes. La figure 7 montre que le groupe A relatif à la combinaison Sm2011C1 montre le poids sec de la partie aérienne des plantes le plus élevé, suivi par le groupe intermédiaire AB relatif aux combinaisons O172C1, O152C1, O172C2 et Sm2011C2 respectivement, montrant de faibles quantités en matière sèche produite. Pour le groupe C, à l'exception de la combinaison O152C2, toutes les autres n'ont rien enregistré à cause de la mort des plantes.



### III.1.4. Poids sec de la partie racinaire

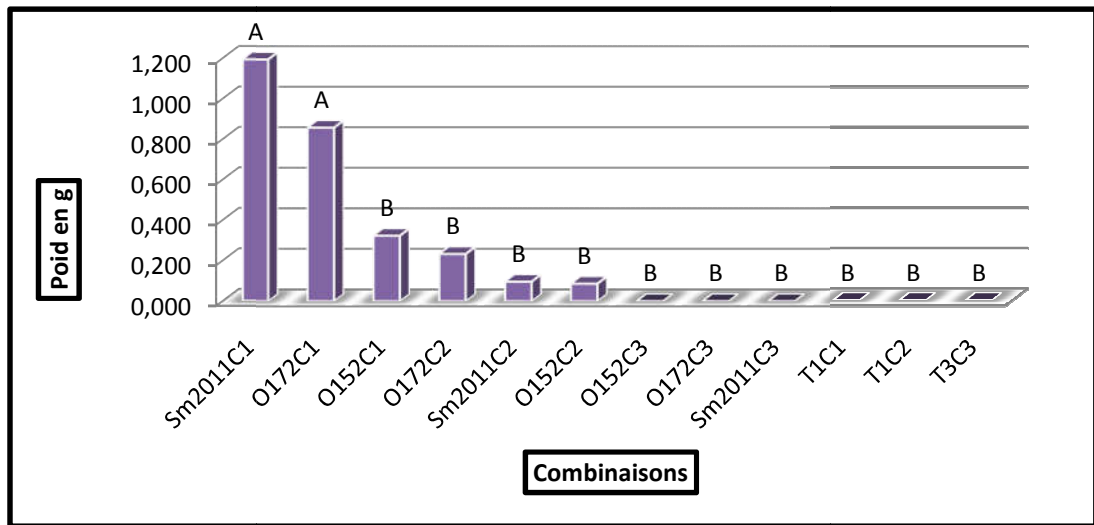


Figure 23 : Poids sec de la partie racinaire

Les résultats de l'analyse de la variance ont montré des différences significatives entre les deux groupes obtenus. La figure 8 ci-dessus montre que le groupe A, relatif aux combinaisons Sm2011C1 et O172C1, montre le meilleur résultat en poids sec de la partie racinaire. Les combinaisons O152C1, O172C2, Sm2011C2 et O152C2 respectivement, appartenant au groupe B, ont eu de faibles quantités en matière sèche racinaire, alors que les combinaisons O152C3, O172C3, Sm2011C3, T1C1, T1C2 et T3C3 n'ont enregistré aucun poids sec.

Les différences entre les poids des parties racinaires et caulinaires, au sein d'une même concentration en sel, sont peut être expliquées par la différence de fixation d'azote par la plante via la symbiose avec les différentes souches.

Plusieurs résultats s'accordent avec les nôtres. Par exemple, Ibriz et *al.*, (2004) et Chaabena et *al.*, (2004) travaillant sur la luzerne, montrent que le sel entraîne une réduction des productions de matière sèche aérienne et racinaire.

Mezni (2010), a montré que le stress causé par la salinité inhibe de manière significative la croissance des différents organes de la luzerne, toutefois. Les racines sont souvent plus touchées que les parties aériennes (Amooaghaie, 2011).

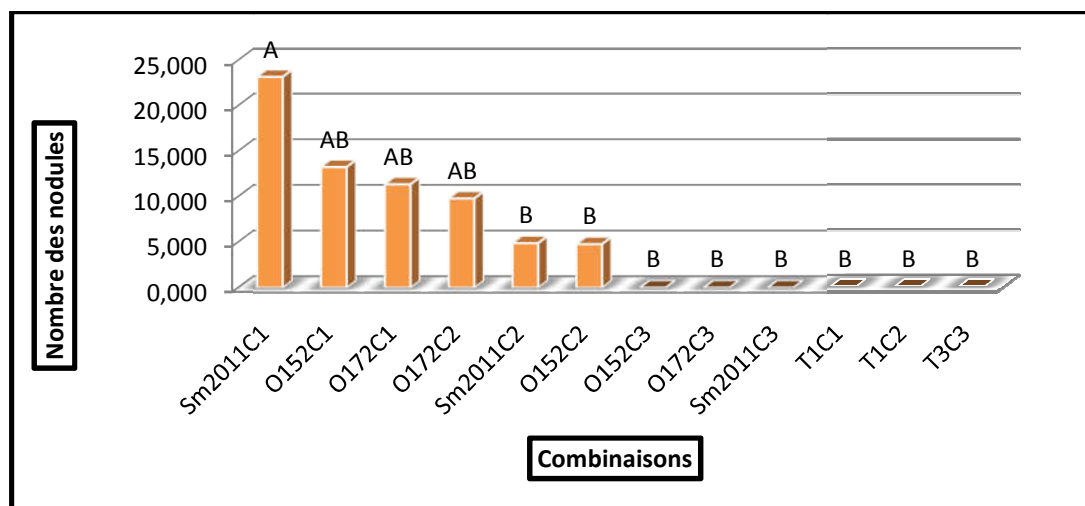
Par contre, par rapport les souches dans Cette étude nous remarquons aussi qu'il y avait un effet positif de l'inoculation par les souches et avec des basses concentrations sur le poids sec. Il a été conclu que l'inoculation par les rhizobia a considérablement amélioré le rendement en matière sèche de 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 résultats obtenues montrent que toutes les plantes inoculées ont permis un gain en matière sèche de la partie aériennes supérieur à celui du témoin. Ces résultats sont obtenus par Solomon et Fassil (2014) chez les plantes de *Vicia faba* inoculées avec différentes souches rhizobiennes. Les résultats du poids de la matière sèche des plantes témoins n'ont dépassé en aucun cas celui des plantes inoculées par des souches rhizobiennes et ceci est en accord avec ceux plusieurs chercheurs (Moawad *et al.*, 2004 ; Morgante *et al.*, 2007).

L'amélioration de la biomasse racinaire est observée en réponse à l'inoculation par les bactéries en comparaison avec le traitement témoin ce qui est en accord avec les résultats de (Lazali, 2009).

### III.1.5. Nombre des nodules actifs

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 9).



**Figure 24:** Evolution du nombre des nodules actifs en fonction des combinaisons.

Les résultats de l'analyse de la variance ont montré des différences significatives entre les groupes obtenus. La figure 9 montre que le groupe A relatif à la combinaison Sm2011C1

montre le meilleur résultat en nombre des nodules actifs (25 nodules/plante), suivi par les combinaisons O152C1, O172C1 et O172C2 respectivement, appartenant au groupe AB. Enfin, concernant le groupe B, les combinaisons Sm2011C2 et O152C2 ont enregistré un faible nombre des nodules. En ce qui concerne les combinaisons: O152C3, O172C3, Sm2011C3, T1C1, T1C2 et T3C3, nous remarquons qu'elles sont dépourvues des nodules à causes de la mort des plantes.

Il apparait clairement que l'augmentation de la salinité affecte significativement le processus de nodulation. La concentration C1 (0 g/l de NaCl) est celle qui n'a pas affecté la nodulation. Au fur et à mesure que la salinité augmente, la nodulation diminue, comme nous l'avons remarqué avec les concentrations C2 et C3 respectivement (40 et 80 mM).

La salinité est un facteur majeur limitant la fixation symbiotique de l'azote. Elle affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol (Farissi et *al.*, 2014). Jebara et *al.* (2000) ont montré que certains isolats de *Sinorhizobium Medicago sp.*, avaient une croissance ralentie sous les conditions salines. La croissance des rhizobia a été notée normale sous des concentrations en NaCl d'environ 1%.

L'effet du stress salin sur la symbiose légumineuse-rhizobia peut être indirecte en réduisant la croissance de la plante hôte et en affectant certains de ses processus physiologiques, ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules (Zahran, 1999 ; Jebara et *al.*, 2000 ; Cesar et *al.*, 2011).

Rao et *al.* (2002), ont montré que 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 FSN (Fixation Symbiotique de l'Azote) est plus affectée par le sel que la croissance des plantes. 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).

III.2. Corrélations entre paramètres

Tableau 7 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés.

Variables	HP	PST	LR	PSR	NN
HP	1	0,931	0,821	0,928	0,914
PST	<b>0,931</b>	1	<b>0,709</b>	<b>0,967</b>	<b>0,907</b>
LR	<b>0,821</b>	<b>0,709</b>	1	<b>0,736</b>	<b>0,835</b>
PSR	<b>0,928</b>	<b>0,967</b>	<b>0,736</b>	1	<b>0,900</b>
NN	<b>0,914</b>	<b>0,907</b>	<b>0,835</b>	<b>0,900</b>	1

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

Le tableau ci-dessus montre que tous les paramètres que nous avons étudié (la hauteur de la partie aérienne, le poids sec des tiges, la longueur des racines, le poids sec des racines et le nombre des nodules) sont très fortement liés entre eux (très forte corrélation).

III.3. Test de germination *in vitro*

III.3.1. Hauteur des tiges

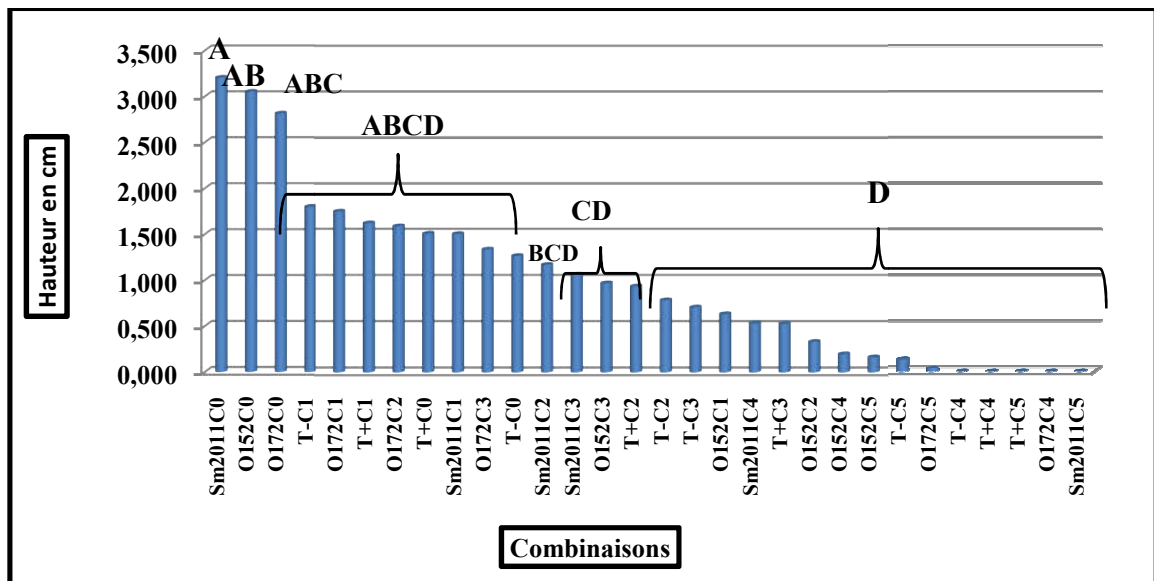


Figure 25: Hauteur des parties aériennes des plantules de en fonction des combinaisons.

Des différences significatives entre les groupes ont été obtenues après analyse de la variance. Nous remarquons que la salinité affecte significativement la croissance des plantules, plus la salinité augmente, la croissance diminue.

Les plantules inoculées par les souches rhizobiennes en l'absence et en présence de salinité ont eu une meilleure croissance des parties aériennes par rapport aux témoins négatifs

et positifs. Cette différence de croissance peut être attribuée à l'inoculation qui contribue à la protection des plantules contre les effets de la salinité. Nous constatons que la souche O172 est la plus efficace, suivie de Sm2011 et O152 respectivement.

III.3.2. Longueur des racines

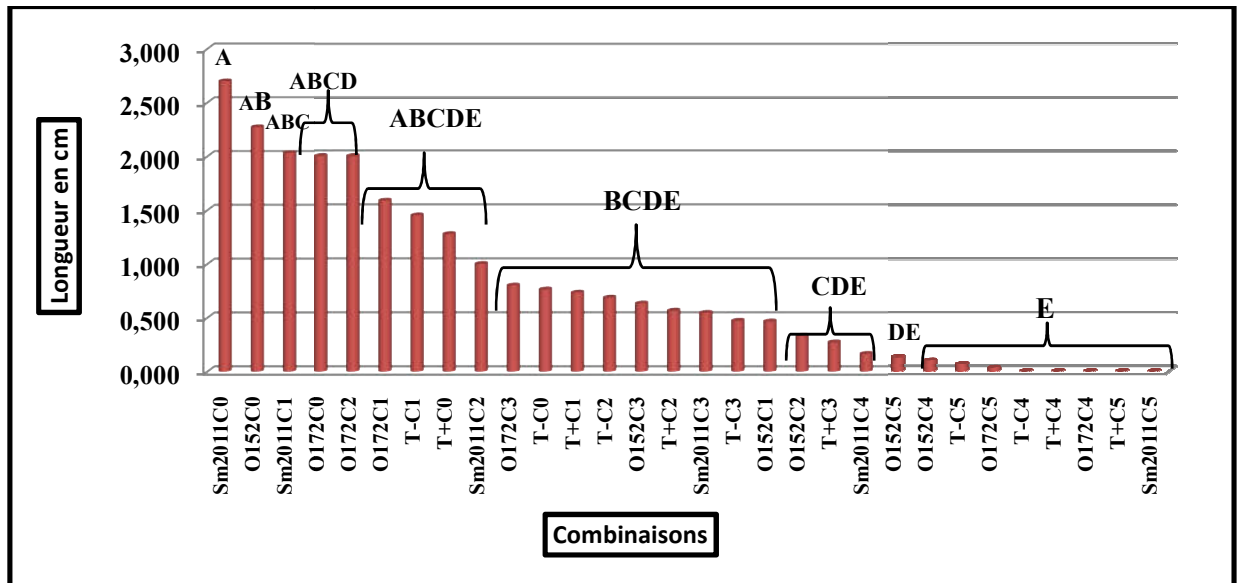


Figure 26: Longueur de la partie racinaire des plantules en fonction des combinaisons.

Les valeurs de la longueur des racines des vitro plantules de luzerne révèlent un comportement particulier des plantules inoculées sous stress salin (figure11). A la concentration 0 g/l de sel et l'inoculation, la croissance racinaire a été améliorée de façon significative. Cette augmentation a été de 62-71,68 % et de 36,5-53% par rapport aux témoins négatifs et positifs respectivement. Chez les traitements C1, C2 et C3, l'inoculation a aussi amélioré la croissance racinaire, par rapport aux témoins négatifs et positifs, sauf dans les conditions de la souche O152 qui ne s'est pas montrée efficaces. Pour les concentrations C4 et C5, nous remarquons que l'effet de ces traitements a été défavorable sur la croissance de la partie racinaire des vitro plantules même en présence de l'inoculum.

De façon générale, nous remarquons que la salinité affecte significativement la croissance des vitro plantules, plus la salinité augmente la croissance diminue.

Les vitro plantules inoculées par les souches rhizobiennes en l'absence et en présence de salinité ont eu une meilleure croissance des parties racinaires par rapport aux témoins négatifs et positifs. Cette différence de croissance peut être due à l'inoculation qui renforce à

la protection des plantules contre la salinité. Nous constatons que la souche Sm2011 est la plus efficace, suivie par O172 et O152 respectivement.

La germination est régulée par des caractéristiques génotypiques mais aussi par les conditions environnementales et en particulier par la disponibilité de l'eau dans le sol et la présence de sel (Gutterman, 1993; in Ndour et Danthu, 2000). Ainsi, la germination des graines est le stade le plus sensible aux stress salin et hydrique (Boulghalagh et *al.*, 2006). Maillard (2001), considère que la plupart des plantes sont plus sensibles à la salinité durant leurs phases de germination et de levée. Parmi les causes de l'inhibition de la germination en présence du sel, la variation de l'équilibre hormonal a été évoquée (Ungar, 1978 et Kabar, 1986; in Debez et *al.*, 2001).

Plusieurs auteurs ont montré un retard de la germination causé par la salinité chez plusieurs espèces (Ndour et Danthu, 2000; Boughalagh et *al.*, 2006, Benata et *al.*, 2006), même chez des plantes halophytes (Debez et *al.*, 2001; Bajji et *al.*, 2002; Belkhoja et Bidai, 2004; et Rahmoune et *al.*, 2008).

# ***Conclusion***

## **Conclusion**

La tolérance aux sels chez les légumineuses en symbiose dépend à la fois des deux partenaires symbiotiques selon Laranjo et *al.* (2002). Cependant, quelques légumineuses, forment une symbiose efficiente et tolérante au sel avec une sélection de souches de rhizobia adéquates (Rai et Singh, 2000). L'exploration de la diversité de réponse à la salinité, permettrait non seulement d'identifier des lignées tolérantes mais aussi de déterminer les caractères utilisables pour une amélioration génétique de la tolérance au sel. En symbiose, la tolérance de la plante hôte constitue un facteur déterminant de la tolérance au sel (Soussi et *al.*, 1998).

Notre étude a porté sur l'utilisation de deux souches de rhizobia (O152 et O172) isolées à partir des nodosités de luzerne (*Medicago Sativa* L.) provenant dans la région de Ouargla et d'une souche de référence (*Sinorhizobium meliloti* 2011) fournie par le Laboratoire de l'INRA de Toulouse (France). Elles ont été sélectionnées parmi des souches préalablement caractérisées par rapport à leur aptitude symbiotique et leur comportement face aux divers facteurs biotiques et abiotiques, à fin d'évaluer l'effet de l'inoculation sur la croissance de la plante hôte (*Medicago Sativa* L.).

A la lumière des résultats obtenus dans ce travail, nous pouvons conclure que la salinité a un effet néfaste sur les différents aspects de symbiose étudiés. L'étude de l'effet de la salinité sur la croissance des plantes inoculées nous a permis de conclure que la salinité a un effet dépressif sur la croissance des plantes et de la performance symbiotique chez les combinaisons testées avec une variation importante entre elles. En effet, la performance de la symbiose sous traitement salin semble être principalement déterminée par l'interaction entre le génotype de la luzerne et les souches rhizobiennes. Par exemple l'inoculation avec la souche Sm2011 caractérisée par une efficacité symbiotique élevée et pourrait compenser la perte de la croissance de la plante hôte, induite par la salinité.

L'évaluation de la tolérance de toutes les combinaisons vis-à-vis du stress salin, concernant le test symbiotique *in vivo*, montre que :

✚ Les plus grandes hauteurs de tige sont enregistrées chez les plantes qui sont irrigués par la condition C1 (0 g/l de sel), inoculées par la souche Sm2011 (souche de référence) avec une moyenne de 15,04 cm/plante, et aussi présente le meilleur résultat pour le poids sec de la



partie aérienne d'une moyenne de 0,407g/plante, ainsi que la moyenne du nombre des nodules qui est très élevé (23,11 nodules/plante) par rapport aux autres combinaisons.

✚ La longueur de la racine la plus élevée en condition C1 est enregistrée par les plantes inoculée par les trois souches Sm2011, 0172 et O152 ; avec des moyennes égales (même groupe indiqué par l'anova).

✚ Les plantes qui ont le poids sec le plus important de la partie racinaire sont celles qui irrigués par la condition C1, inoculées par les souches Sm2011 et O172 (avec des moyennes égales).

✚ Par rapport à l'effet de la C2 et de l'inoculation, la diminution de la croissance était visible. Nous observons un effet négatif de l'élévation de la concentration en NaCl sur le développement général des plantes. Les traitements d'inoculation, par les souches 0172, O152 et Sm2011 respectivement, ont donné des résultats supérieurs à ceux des plantes non inoculés (T+ et T-). La raison de ceci pourrait être la quantité adéquate d'azote fixée par les Rhizobia.

✚ Par rapport à l'effet de la C3, la mort des plantes est enregistrée sous l'effet contraignant de l'augmentation de la concentration en NaCl (La croissance de la majorité des plantes est réduite ou arrêtée quand la concentration en sel dans l'environnement racinaire est trop élevée).

✚ Les témoins négatifs et positifs sont ceux qui présentent les résultats les plus faibles presque pour tous les paramètres étudiés.

✚ Une très fort corrélation positive est remarquée entre les différents paramètres étudiés hauteurs : la hauteur de la partie aérienne, le poids sec des tiges, la longueur des racines, le poids sec des racines et le nombre des nodules.

Les meilleurs résultats que nous avons obtenus à travers le test de germination *in vitro* ont été comme suit :

✚ De façon générale, nous remarquons que la salinité affecte significativement la croissance des *in vitro* plantules. Plus la salinité augmente, la croissance diminue.

✚ Les plantules inoculées par les souches rhizobiennes en l'absence et en présence de salinité ont eu une meilleure croissance des parties aériennes et racinaires par rapport aux témoins négatifs et positifs. Cette différence de croissance peut être attribuée à l'inoculation qui contribue à la protection des plantules contre les effets de la salinité. Nous constatons que la souche O172 est la plus efficace, suivie de Sm2011 et O152

respectivement pour la croissance des parties aériennes. Pour la partie racinaire, la souche Sm2011 est la plus efficace, suivie par O172 et O152 respectivement.

Certaines souches de *Rhizobiums* sont tolérantes au sel et dans des conditions de stress et peuvent aider à améliorer la croissance et la nutrition de leur hôte plantes. Elles diffèrent par leur capacité à faire face aux stress abiotiques, et utilisent des mécanismes distincts pour l'adaptation lorsqu'elles sont exposées au stress salin, tel que l'accumulation de solutés organiques de faible poids moléculaire ou des modifications de la morphologie et taille et modifications dans la structure des polysaccharides extracellulaires...etc. ce qui rend leur utilisation comme inoculum *in situ* sera envisagée pour en tester l'efficacité en symbiose avec la luzerne cultivée sous conditions salines.

*Références*  
*Bibliographiques*

**Abuzinadah R.A., Read D.J., 1986:** The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilisation of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New phytologist* 103, 481-493.

**Akhtar F., Bashir M., Baig W., Zahoor F., Shujaat N., Humayun E., Jamshaid B., Hayat A., Mujaddad UR Rehman M., Jadoon M.A., Abdulmalik A., Ullah z., Gul S., Mallick M.A., Ul haq Q.I., 2016 :** In Vitro Antibacterial Activity of Spinacia Oleracea and Melilotus Indicus Used In Pakistani Folk Medicines against Some Specific Bacterial Strains , IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS), Volume 11, PP 77-84.

**Amooghaie R., 2011:** The effect of hydro and osmopriming on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under saltstress. *Afr J Biotech*; 10: 6269-6275.

**Aydi S., Sassi S., Abdelly C., 2008:** Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* L. subjected to salt stress. *Plant and Soil*; 312: 59-67.

**Babo B V., 2002 :** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor. Université Laval, Québec.

**Baldock, J.A., Nelson, P.N., 2000 :** Soil organic matter. In: Sumner, M.E. (Ed.), *Handbook of soil science*. CRC PRESS, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.

**Baldwin, I. L., and E. B. Fred., 1929:** Nomenclature of the root nodule bacteria of the leguminosae. *J. Bacteriol.* 17, 141-150.

**Bani-aameur F., 2000:** Phenological phases of *Argania spinosa* (L.) Skeels flower. *Forest Genetics*, 7(4):329 - 334.

**Bani-aameur F., Janis Sipple Michmerhuizen., 1999:** Variabilité de la germination et de la croissance des plantules d'arganier sous des conditions salines. Résumé des communications. Les premières journées de L'UFR. État de l'environnement et biodiversité des Écosystèmes terrestres. Faculté des Sciences, Marrakech, 20-23 avril.

- Bargaz A., Ghoulam C., Faghire M., Aslan Attar H., Drevon JJ., 2011:** The nodule conductance to O<sub>2</sub> diffusion increases with high phosphorus content in the Phaseolus vulgaris-rhizobia symbiosis. *Symbiosis*; 53: 157-164.
- Baudoin J-P., 2001 :** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 5(4): 221-230.
- Bekki A., Trinchant J.C., Rigaud J., 1987:** Nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) by Medicago nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.* 71: 61-67.
- Belkheiri O., 2009:** Adaptabilité des espèces du genre Atriplex aux conditions de salinité et d'aridité. Thèse de doctorat, Université di Sassari (Espagne), 90p.
- Belkhodja M et Bidai Y., 2004:** Réponse des graines d'Atriplex halimus L. à la salinité au stade de la germination. *Sécheresse*, 4(15) :331-334.
- Bell D.T., 1999:** Australian trees for the rehabilitation of waterlogged and salinity-damaged landscapes. *Aust. J. Bot.* (47): 697-716.
- Bellefontaine R., Galiana A., Kenny L., 2009:** Multiplication végétative et symbioses racinaires de l'arganier Optimisation des agro systèmes à base d'arganier. Projet UE / MEDA / ADS « Appui à l'amélioration de la situation de l'emploi de la femme rurale et gestion durable de l'arganeraie dans le sud-ouest du Maroc ». Rapport final.71p
- Ben naceur M., Rahmoune C., Sdiri H., Meddahi M.L et Selmi M., 2001:** Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains de quelques variétés maghrébines de blé. *Sciences et changements planétaires/ sécheresse*, 3(12):74-167.
- Benhassaini H., Fetati A., Kaddour Hocine A. et Belkhodja M., 2012:** Effect of salt stress on growth and accumulation of proline and soluble sugars on plantlets of Pistacia atlantica Desf. Subsp. atlantica used as rootstocks. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 16(2), 159165.
- Benson DR., Silvester WB., 1993:** Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev.* 57: 293-319.
- Blaha G., Stelzl U., Spahn CMT., Agrawad RK., Frank J., Nierhaus H., 2000:** Preparation of functional ribosomal complexes and effet of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol*; 317: 292309.

**Bordeleau L.M., Prevost D., 1994 :** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*. 161:115-124.

**Borucki W., Sujkowska M., 2008:** The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Phys. Plant*; 30: 293-301.

**Botineau M., 2010 :** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec&Doc. Paris. 613p.

**Brady NC., 2002:** The Nature and Properties of Soils, New Jersey, USA, Prentice Hall.

**Brhada F., Le Rudulier D., 1995:** Osmorégulation chez les bactéries et chez *Rhizobium* en particulier: rote de la glycine bétaine dans l'osmorégulation chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. In: Drevon J.J. (Ed): Facteurs limitant la fixation d'azote dans la Bassin Méditerranéen. INRA. Paris. pp 127-137.

**Caratini R., 1984 :** Les plantes. Bordas, Paris.

**Cesar A.I., Esther M.G., Daniel M., Ruben L., Estibaliz L., et Erena GQ., 2011:** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*; 5: 24-31.

**Chaabena A., 2001:** Situation des cultures fourragères dans le Sud-Est septentrional du Sahara algérien et caractérisation de quelques variétés introduites et populations sahariennes de luzerne cultivée. Thèse de Magister, INA, Alger.

**Chaabena A., Abdelguerfi A., et Baameur M., 2004 :** Comportement et caractérisation de quelques variétés de luzerne ( *Medicago sativa* L.) dans la région de Ouargla. *Cah Agric*; 13 :271-6.

**Chen W. X., E. T. Wang., S. Wang., X. Chen and Y. Li., 1995:** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 153-159.

**Chen W. X., G. H. Yan., and J. L. Li., 1988 :** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned by *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 38, 392-397.

**Chen WM., Lee TM., Lam CC., Cheng CP., 2000:** Characterization of halotolerant Rhizobia isolated from root nodules of *Canavalia rosea* from seaside areas. FEMS Microb Eco; 34, 9-16.

**CIAT, 1992:** Constraints to and opportunities for improving bean production. A planning document 1993–98. An achievement document 1987-92, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia

**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.

**Cooper, J.E., 2007:** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. Journal of Applied Microbiology 103, 1355-1365.

**Cordovilla MP., Ocana A., Ligeró F., Lluch C., 1995:** Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes Rhizobium symbiosis. J Plant Nutr; 18:1595-1609.

**Craig G.F., Atkin C.A., BELL D. T., 1999:** Effect of salinity on growth of four strains of rhizobium and their infectivity and effectiveness on two species of Acacia. Plant Soil. 133: 253-262.

**Dangeard, P. A., 1926 :** Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses. Le botaniste, Ser.16. 270 p. Paris

**De Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, and 7 other authors., 1994 :** Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 715-733.

**Debez A, Chaibi W, Bouzid S., 2001 :** Effet du NaCl et de régulateurs de croissance sur la germination d'*Atriplex halimus* L. Cah Agric ; 10 : 135-8.

**Den Herder, G., and Parniske, M., 2009 :** The unbearable naivety of legumes in symbiosis. Curr Opin Plant Biol 12, 491-499.

**Dénarié J., 2000** : Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier.

**Denarie, J., Debelle, F., and Rosenberg, C., 1992** : Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol* 46, 497-531.

**Deng CN., Zhang GX., Pan XL., Zhao KY., 2010** : Chlorophyll fluorescence and gas exchange responses of maize seedlings to salinealkaline stress. *Bulg J Agric Sci*; 16: 49-58

**Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I., Newton W.E., 2008**: Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Ed. Springer. USA. 155p).

**Dixon, R.O.D., and Wheeler, C.T., 1986** : Nitrogen Fixation in Plants. ( New York: Chapman et Hall Press).

**Dommergue R., Mougenot F., 1970** : Symbiose Rhizobium-légumineuses. Ecologie microbienne du sol. Ed. Masson et Cie, Paris.

**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, Editions Espaces, FAO, IR. Montpellier. France. 499p.

**Doyle, J.J., and Luckow, M.A., 2003** : The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131, 900-910.

**Drevon J.J., Deransart C., Irekti H., Payre H., Roy G., Serraj R., 1995**: la salinité (NaCl) abaisse la conductance des nodosités de légumineuse à la diffusion de l'oxygène. In: Drevon J.J., (Ed): Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin Méditerranéen. INRA. Paris. Les colloques n°77: 73-84.

**Dubey RS., 1994**: Protein synthesis by plant under stress ful condition in handbook of plant and crop stress; 277-299 p.

**Durand JH., 1983**: Les sols irrigables. Agence de coopération culturelle et technique. Ed. Presse universitaire, pp: 339, Paris.



**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.

**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.

**El-Refaey El-Dengawy FA, Ahmed Hussein A, Saad Alamri A., 2011** : Improving Growth and Salinity Tolerance of Carob Seedlings (*Ceratonia siliqua* L.) by Azospirillum Inoculation. American-Eurasian J Agric Environ Sci; 11: 371-384.

**Erice G., Louahlia S., Irigoyen JJ., Sánchez D., Avice JC., 2010** : Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. J Plant Physio; 38: 114-120.

**Eyidogan F., Oz MT., 2007** : Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. Acta Physio Plant; 29:485– 493.

**Faghire M., Bargaz A., Farissi M., Palma F., Mandri B., et Lluch C., 2011** : Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. Symbiosis; 54, DOI: 10.1007/s13199-011-0144-0.

**Faghire M., Bargaz A., Farissi M., Palma F., Mandri B., Lluch C., Tejera García NA., Herrera-Cervera JA., Oufdou K., Ghoulam C., 2011**: Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. Symbiosis, 55:69-75.

**Farissi M., Bouizgaren A., Faghire M., Bargaz A., Ghoulam C., 2011**: Agro-physiological responses of Moroccan alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations to salt stress during germination and early seedling stages. Seed Sci Technol; 39: 389- 401.

**Farissi M., Faghire M., Bouizgaren A., Bargaz A., Makoudi B., et Ghoulam C., 2014**: Growth, nutrients concentrations and enzymes involved in plants nutrition of alfalfa populations under saline conditions. J. Agr. Sci. Tech.; 16:301-314.

**Farissi M., Ghoulam C., and Bouizgaren A., 2013** : Changes in water deficit saturation and photosynthetic pigments of Alfalfa populations under salinity and assessment of proline role in salt tolerance. *Agricultural Science Research Journals*; 3: 29-35.

**Farissi, M., Bouizgaren, A., AZIZ, F., Faghire, M., Ghoulam, C., 2014a** : Isolation and screening of rhizobial strains nodulating alfalfa for their tolerance to some environmental stresses. *PJAR*; 2, 9-19.

**Farissi, M., Faghire, M., Bouizgaren, A., Bargaz, A., Makoudi, B., Ghoulam, C., 2014b** : Growth, nutrients concentrations and enzymes involved in plants nutrition of alfalfa populations under saline conditions. *J. Agr. Sci. Tech.*; 16:301-314.

**Farissi, M., Ghoulam, C., Bouizgaren, A. Variabilité 2013a** : de la tolérance à la salinité de la luzerne : évaluation au stade germination de populations issues de différents agro-écosystèmes marocains. *Fourrages*; 216: 329-332.

**Fatma Lazrek - 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,P(22).

**Fatma Lazrek - 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,P(23).

**Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M., 2010**: Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 61-76

**Fick G.W., Holt D.A. and Lugg D.G., 1988** : Environmental Physiology and Crop Growth. In: Hanson A.A., Barnes D.K. and Hill R.R. (eds) *Alfalfa and alfalfa improvement*. Madison, W.I.: ASA. pp. 163-194

**Foucher, F., and Kondorosi, E., 2000** : Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43, 773-786.

**Frame J., 2005**: Forage legumes for temperate grasslands. Enfield (NH), USA: Science Publishers, Inc.

- Fred, E. B., I. L. Baldwin, and E. McCoy., 1932** : Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis. (in: Elkan, 1902).
- Frontier S., Piched-Viale D., Leprêtre A., Davoult D., Luczak C., 2004** : Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution. 3ème Edition Dunod, Paris.
- Gama PB., Inanaga S., Tanaka K., 2007**: Nakazawa R. Physiological response of common bean (*Phaseolus Vulgaris*. L.) seedlings to salinity stress. *Afri J Biotech*; 6:79-88.
- 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.
- Garg N., Singla R., 2004** : Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Braz J Plant Physiol*; 16:137-146.
- Geetanjali M., Neera G., 2008** : Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant*. 30:595–618
- Georges B.J, Raven P.H, Mason k.A., Losos J.B, Singer S.R., 2011**: *Biologie*. Ed. De boeck. Paris .p793.
- Ghassemi F, Jakeman AJ, Nix HA, 1995** : Salinization of land and water resources. Human causes, extent management and case studies. University of New South Wales Press Ltd, Sydney.
- Gouia, H, Ghorbal MH, Touraine B., 1994** : Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO<sub>3</sub> reduction rate within whole plants of salt sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiol*; 105:1409-1418.
- Graham et al., 1991 ; Vandamme et al., 1996** : *Plant-Associated Bacteria*.59-60p.
- Guignard J.L., Dupont F., 2005** : *Botanique*. 13ème Edition Masson.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F.B., Sprent, J.I., Young, J.P., and James, E.K., 2011** : Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 1276-1288

**Hamom S., 2001** : Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes. Ed. IRD. Paris. 657p.

**Hellriegel et Willfarth 1888** : Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Ztschr. Ver. Rübenzucker-industrie Deutschen Reichs, 234 pour., 1888.

**Hofeez F.Y., Aslam Z., Malik K.A., 1988** : Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* (L.) Wicczek. Plant Soil. 106: 3-8.

**Hu Y., Schmidhalter U., 2001** : Reduced cellular crosssectional area in the leaf elongation zone of wheat causes a decrease in dry weight deposition under saline conditions. Aust. J. Plant Physiol, 28: 165-170.

**Huss-Danell, K., 1997** : Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> fixation. New Phytologist 136, 375-405.

**Ibriz M., Thami Alami I., Zenasni L., Alfaiz C., Benbella M., 2004** : Production des luzernes des régions pré-sahariennes du Maroc en conditions salines. Fourrages; 180: 527-540.

**Ibriz M., Thami Alami I., Zenasni L., Alfaiz C., et Benbella M., 2004** : Production des luzernes des régions pré-sahariennes du Maroc en conditions salines. Fourrages; 180: 527-540  
INT. J. CURR. SCI. 2012, pp 1-6.

**Irekti H. et Drevon J.J., 2003**: Acide abscissique et conductance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités de haricot soumises à un choc salin. In: Drevon J.J.,et Sifi B. (Eds): Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. INRA. PARIS; Les Colleques, n°100. pp 371-380.

**Jansa J., A Bationo, E Frossard, IM Rao, 2011**: Options for Improving Plant Nutrition to Increase Common Bean Productivity in Africa. Fighting poverty in sub-saharan africa: the multiple roles of legumes in integrated soil fertility management 2011:201-240.

**Jarvis, B. D. W., H. L. Downer, and J. P. W. Young., 1992**: Phylogeny of fast- growing soybean nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 93-96.

**Jebara M., Aouani ME., Mhamdi R., Ghrir R., Mar M., 2000** : Effet du sel sur des isolats de *Sinorhizobium* sp. de Tunisie in vitro ou en association avec *Medicago* sp. Cah Agric; 9 : 99-102.

**Jordan, D.C., 1984** : Family III. Rhizobiaceae, p.234-242. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore

**Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A., Stevens P., 2001**: *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*. Edition de boeck.

**Julier B., Guines ., Ecalle C., Huyghe C., 2001**: From description to explanation of variations in alfalfa digestibility. Proceedings of the XIV Eucarpia *Medicago* sp. Group Meeting. Zaragoza 45: 19-23

**Kahn ML., McDermott TM., Udvardi MK., 1998**: Carbon and Nitrogen Metabolism in Rhizobia En: "The rhizobiaceae" HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas (Eds.). Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherland; 461-485 p.

**Kalfi C., et Smara R., 2017**: Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Lupinus angustifolius*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Ecologie Microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine.10-13

**Katerji N., Van Hoorn JW., Hamdy A., Mastrorilli M., Mou Karzel E., 1997**: Osmotic adjustment of sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomatal conductance, growth and yield. *Agric Water Manage*; 34: 57-69.

**Keyser, H. H., B. B. Bohlool, T. S. Hu, and D. F. Weber., 1982**: Fast-growing rhizobia isolated from roots of soybean. *Science* 215, 1631-1632.

**Khadiri M., Pliego L., SoussiM., Ocana A., Lluch C., 2003**: Assimilation de l'ammonium et métabolisme des uréides chez *Phaseolus vulgaris*: effet de la contrainte saline. In: Drevon J.J. et Sifi B.(Eds): fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranées. INRA. Paris. Les Colloques. N°100. pp 303-312.

**Khajeh-hossini M, Powell AA., 2003**: The interaction between salinity stress and seed vigor during germination of soybean seed. *Seed Sci Technol*; 31: 715-725.

- Khan MA., 2001:** Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. *Aquat Bot*; 70: 259-268.
- Khan MG., Silberbush M, Lips SH., 1995:** Physiological studies on salinity and nitrogen interaction in alfalfa plants: nitrate reductase activity. *J Plant Nutr*; 18: 2495-2500.
- Laranjo M., Branco C., Soares R., Alho L., Carvalho MDE., Oliveira S., 2002:** Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1–8.
- Latrach, L., Farissi M., Mouradi M., Makoudi B., Bouizgaren A., Ghoulam C., 2014 :** Growth and nodulation in alfalfa-rhizobia symbiosis under salinity: effect on electrolyte leakage, stomatal conductance and chlorophyll fluorescence. *Turk. J. Agric. For.*; 38 : 320-326.
- Lazali M., 2009:** Etude de la symbiose à rhizobium chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) cultivée sous contrainte hydrique: aspects morpho-physiologiques et agronomiques. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister. INA, El-Harrach, Alger. 136 p.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J.C., and Denarie, J., 1990:** Symbiotic host-specificity of rhizobium-meliloti is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.
- Lévêque C., Mounoulou J.C., 2001 :** Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod, Paris.
- Lloret J., Bolaños L., Lucas MM., Peart JM., Brewin NJ., Bonilla I., Rivilla R., 1995:** Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. *Appl Environ Microbiol* 61:3701–3704.
- Lohnis, F., and R. Hansen, 1921 :** Nodule bacteria of leguminous plants. *J. Agr. Res.* 20, 543-546.
- López M., Herrera-Cervera JA., Iribarne C., Tejera NA., Lluch C., 2008;:** Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: nodule carbon metabolism. *J Plant Physio* 165: 641- 650.

**Malick Mbengue, 2010** : Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LysMRLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula*,P(05).

**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

**Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009)** : Establishing nitrogenfixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends in microbiology 17, 458-466.

**Mauriès M., 1994** : La luzerne aujourd'hui.

**Mauries M., 2003** : Luzerne culture récolte conservation. Ed. France agricole.12-13 p.Medicinal Plants, CRC Press,Technology and Engineering, 1098 P.

**Messioughi Amel, 2016** : Etude d'une plante fourragère la luzerne *Medicago sativa*.L: importances phytochimiques, aspects thérapeutiques et essais microbiologiques.

**Mezni M., Albouchi A., Bizid E., et Hamza M.,2010** : Minerals uptake, organic osmotica contents and water balance in alfalfa under salt stress. J Phytol; 01–12.

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

Miller KJ., Wood JM., 1996: Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Annu Rev Microbiol 50:101–136. doi:10.1146/ annurev.micro.50.1.101

**Moawad H., Abd El-Rahim W.M., et Abd EL-Haleem D., 2004**: Performance of phaseolus bean rhizobia in soils from the major production sites the Nile Delta. C. R. Boil., 327: 455-453.

**Morgante C., Castro S., Adriana F., 2007**: Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-infection process. Soil. Boil. Biochem., 39: 1222-1225.

- Mueller S.C. et Teuber L., 2007** : Alfalfa growth and development. Agriculture and natural resources communication services. Ed. UC PEER REVIEWED. California. pp1-9.
- Munns R., Schachtman DP., Condon AG., 1995**: The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. Australian Journal of Plant Physiology 22: 561-569
- Munns R., Termaat A., 1986**: Whole plant responses to salinity. Aust J Plant Physiol 13:143-160.
- Norris, D. P., 1965** : Rhizobium relationships in legumes. Proc. 9th Int. Grassl. Congr. Sao Paulo. 2, 1087-1092.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J., Poole, P., and Downie, J., 2011**: The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annual Review Genetics, Vol 45 45, 119-144.
- Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton PW., Borthakur D., 2006**: Identification of Two Clusters of Genes Involved in Salt Tolerance in Sinorhizobium sp. Strain BL3. Symbiosis 41: 47-51
- Peret B., 2007**: Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical Casuarina glauca. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III (France).
- Perrine-Walker F.M., Lartaud M., Kouchi H., and Ridge, R.W., 2014**: Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the Mesorhizobium-Lotus symbiosis. Protoplasma.
- Pliogo L., Khadri M., Soussi M., Ocana A., Lluch C., 2003**: Métabolisme du carbone dans les nodosités de Phaseolus vulgaris var. Coco en conditions de Stress Salin. In: Drevon J.J. et Sifi B. (Eds): Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranées. INRA. Paris. Les Colleques, n°100. pp 313-320.
- Popp C., and Ott T., 2011**: Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. Current Opinion in Plant Biology 14, 458-467.
- Rabie GH and Almadini AM., 2005**: Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of Vicia faba L.plants under salinity stress, Afr J Biotech; 4: 210-222.



- Rai R., Singh RP., 2000:** Effect of salt stress on interaction between lentil (*Lens culinaris*) genotypes and *Rhizobium* spp. strains: symbiotic N<sub>2</sub> fixation in normal and sodic soils. *Biol. Fertil. Soils* 29: 187–190.
- Rao DLN, Giller KE, Yeo AR, Flowers TJ (2002):** The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* 89: 563–570
- Raven P. H., Evert R. F., Eichlorn S. E., 2000:** *Biologie végétale*. 6ème Edition de boeck , Paris.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S., 2003:** *Biologie végétale*. Ed. De Boeck université. Paris. 968p.
- Ravikumar R., 2012:** Growth effects of *Rhizobium* inoculation in some legume plants.
- Reddell P., 1993** Soil constraints to the growth of nitrogen-fixing trees in tropical environment. In: Subba Rao N.S., Rodriguez-Barrueco C. (Eds): *Symbioses in nitrogen-fixing trees*. Oxford & IBH. New Delhi. pp 65-83.
- Rengasamy P., 2006:** World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 57:1017-1023.
- Rhoades JD., 1984:** Principles and methods of monitoring soil salinity. In *soil salinity and irrigation: processes and management*, Shainberg and Shalhevet. Berlin SpringerVerlag 130-142.
- Sadowsky M.J., et Graham P.H., 2006:** Root and stem nodule bacteria of legumes. In: Dworkin M et Falkou S. (Eds): *the prokaryotes: ecophysiology and biochemistry*. Springer. pp 817-841.
- Sairam et Tyagi, 2004:** Physiological and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86:407-420.
- 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.

- Salehi M., Salehi F., Poustini K., Heidari-Sharifabad H., 2008:** The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage. *Res J Agric Biol Sci*; 4:413-415
- Saoudi M., 2008 :** Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*, P(13).
- Sawada H., Kuykendall L.D., and Young J.M., 2003 :** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* 49, 155-179.
- Scholla M. H., and G. H. Elkan, 1984:** *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast growing species that effectively nodulates soybean. *Int. J. System. Bact.* 34, 484-486.
- Sebihi Fatima zohra, 2008 :** Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*, P(110).
- Serraj R., Fleurat L.P., Jaillard B., Drevon J.J., 1995:** Structural changes in the innercortex of soybean root-nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen content. *Plant Cell Environ.* 18: 455-462.
- Serraj R., Roy G., Drevon J.J., 1994:** Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and their permeability to oxygen diffusion. *Physiol. Plant.* 91: 161-168.
- Serraj R., Vasquez D.H., Drevon J.J., 1998:** Effects of Salt Stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion and ion distribution in soybean. Common bean and alfalfa. *J. Plant Nutr.* 21: 475-488.
- Serrat R., 2002:** Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity stress. *Physiol Mol Biol Plant* ; 8: 77-86.
- Shiple, B. et VU, T.-T., 2002 :** Dry matter content as a measure of dry matter concentration in plants and their parts. *New Phytologist*, 153, pp. 359–364.
- Sieberer, B.J., Timmers, A.C.J., and Emons, A.M.C., (2005):** Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Molecular plant-microbe interactions* 18, 1195-1204.

- Sinclair TR., Ludlow MM.,1985:** Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Aust J Plant Physiol*; 12: 213-217.
- Singh R J., 2011:** Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement:
- Skerman, V. B. D., V. Mc Gowan, and P. H. A. Sneath, 1980 :** Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 225-240.
- Snoussi SA., Halitim A., Valles V., 2004:** Absorption hydrique en milieu salin chez la tomate et le haricot. *Cah Agric*; 13: 2837.
- Söderlund R., Svensson B.H., 1976:** The global nitrogen cycle. *Ecological Bulletins* 22, 23-73.
- Solomon L. et Fassil A., 2014:** Caractéristiques symbiotiques et phénotypiques de la rhizobie nodula faba haricot (*vicia faba*) de tahtay koraro, zone nord-ouest de l'État régional de Tigray, Éthiopie . *IJTEEE* : 2 (11), 15-23.
- Somasegaran et Hoben, 1985:** Handdbook for rhizobia : Methods in legume-Rhizobium Technology, Edition Spriner Science et Business Media, 450 P.
- Soupène E., Foussard M., Boistard P., Truchet G., and Batut J., 1995:** Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N<sub>2</sub>-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3759-3763.
- Soussi M., Lluch C., Ocaña A., 1999:** Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *Jof Exp Bot*; 50:1701-1708.
- Soussi M., Ocana A., Lluch C., 1998:** Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1329–1337
- Soussi M., Santamaria M., Ocaña A., Lluch C., 2001:** Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in a salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. *J Appl Microbiol* 90:476–481. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01269.x
- Sprent J.I., 1999:** Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. *Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 2/2: 149-162.

**Tilak KVBR., Ranganayaki N., Pal KK, De R., Saxena AK., Shekhar Nautiyal C., Mittal S., Tripathi AK., Johri BN., 2005:** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150

**Timmers A.C., Auriac M.C., de Billy F., and Truchet G., 1998 :** Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* 125, 339-349.

**Timmers, A.C., Soupène, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., and Truchet G., 2000:** Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 13, 1204-1213.

**Trinick, M. J., 1980 :** Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bact.* 49, 39-53.

**Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., Debilly F., Prome J.C., and Denarie J., 1991:** Sulfated lipo-oligosaccharide signals of rhizobium-meliloti elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351, 670-673.

**Upadhyay SK., Singh JS., Singh DP., 2011:** Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere* 21:214–222. doi:10.1016/S1002-0160(11)60120-3

**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.

**Velagaleti R.R., Morsh S.,Kramer D., 1990:** Genotypic differences in growth and nitrogen fixation among soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars grown under salt stress. *Trop. Agric.* 67: 169-177

**Vincent, J.M., 1970 :** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological programme (by) Blackwell Scientific. 164 p.

**Weir B.S., 2016:** The current taxonomy of Rhizobia. NZ Rhizobia website.

**Weston L.A., and Mathesius U., 2013:** Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 39, 283-297.

**Wilson J. K., 1944:** Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Sci.* 58, 61-69

**Yeo AR., 1998 :** Salinity resistance: Physiology and prices. *Physiol Plant*; 58: 241-222.

**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): 968-989.

**Zahran H.H., 1999:** Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:968-989.

**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.

**Zidane Djerroudi O., 2017 :** Caractérisation morpho-physique d'une halophyte, atriplex, aux conditions arides. Doctorat en sciences Biologiques, physiologie végétale, Université d'Oran.

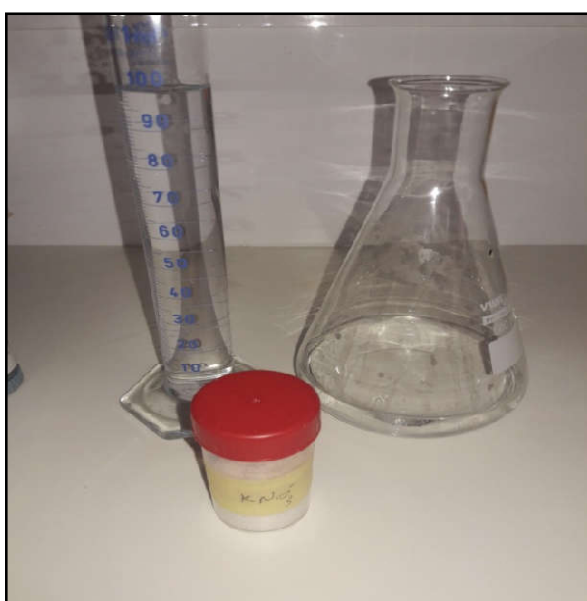
# *Annexes*



**Photo** : Préparation des flacons des différentes concentrations saline.



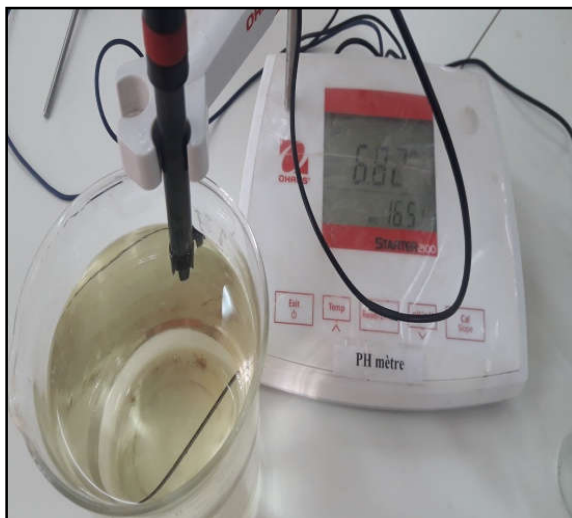
**Photo** : Préparation de la solution nutritive de *Fahareus* (solide et saline).



**Photo** : Préparation de la solution nutritive de *Fahareus* avec  $\text{KNO}_3^-$  (pour le traitement T +)



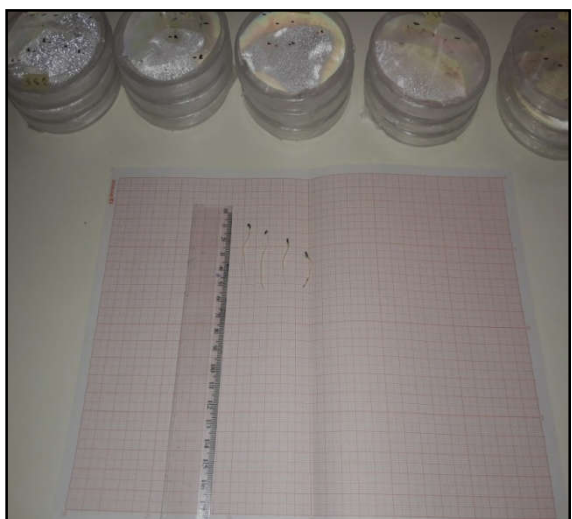
**Photo** : Remplissage des boîtes par la solution nutritive à différentes concentrations salines.



**Photo :** ajustemet du pH du milieu YMB à 6,8



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



**Photo :** Mesure de croissance des plantules de test de germination *in vitro*.



**Photo :** Préparation des flacons de solutions mères.





**Photo :** Nodules racinaires de luzerne cultivée.

## Efficacité de l'inoculation de la luzerne (*Medicago sativa* L.) par des souches rhizobiennes, *in vivo* et *in vitro*, sous stress salin.

### Résumé

L'étude de l'efficacité de l'inoculation de la luzerne *in vivo* et *in vitro*, sous stress salin et dans les conditions contrôlées. Les résultats obtenus à travers l'analyse de la variance (ANOVA) nous a permis de montrer qu'il y a un effet positif de l'inoculation sur l'évolution des différents paramètres étudiés. Ces résultats nous ont permis de sélectionner les meilleures combinaisons souches bactériennes et concentrations en sel ayant été favorables à la croissance de la luzerne. Parmi les trois souches et les traitements salins étudiés, les conditions Sm2011C1, O172C1 et O152C1 (en l'absence de sel) ont conduits à de bons résultats symbiotiques et phénologiques. Les concentrations élevées étaient contraignantes pour le développement des couples symbiotiques mais donnent des résultats meilleurs après l'inoculation par rapport aux témoins positifs et négatif. Les souches rhizobiennes Sm2011 et O172, en l'absence et en présence de salinité, ont été les plus efficaces et peuvent faire l'objet d'une inoculation in situ de la luzerne pour en tester d'autres paramètres.

**Mots clés :** Luzerne, symbiose fixatrice d'azote, *Sinorhizobium meliloti*, germination, la salinité, région de Ouargla.

## inoculation efficiency of alfalfa (*Medicago sativa* L.) with rhizobial strains, *in vivo* and *in vitro*, under salt stress.

### Abstract

The study of the efficacy of alfalfa inoculation *in vivo* and *in vitro*, under salt stress and under controlled conditions. The results obtained through analysis of variance (ANOVA) enabled us to show that there is a positive effect of inoculation on the evolution of the different parameters studied. These results allowed us to select the best bacterial strain combinations and salt concentrations that were favorable to alfalfa growth. Of the three strains and saline treatments studied, the conditions Sm2011C1, O172C1 and O152C1 (in the absence of salt) led to good symbiotic and phenological results. High concentrations were restrictive for the development of symbiotic pairs but gave better results after inoculation compared to positive and negative controls. The rhizobial strains Sm2011 and O172, in the absence and in the presence of salinity, were the most effective and can be inoculated in situ alfalfa to test other parameters.

**Key words:** Alfalfa, nitrogen fixing symbiosis, *Sinorhizobium meliloti*, germination, salinity, Ouargla region.

## فعالية تلقيح الفصّة بسلاّلات الريزوبيا، في الظروف الحية وفي المختبر، تحت تأثير الملوحة

### الملخص

أجريت دراسة فعالية التلقيح الفصّة في البيت البلاستيكي و في المختبر، تحت تأثير الملح وتحت ظروف خاضعة للرقابة. حيث مكنتنا النتائج التي تم الحصول عليها من خلال تحليل التباين من إظهار وجود تأثير إيجابي للتلقيح على تطور المعاملات المختلفة التي تمت دراستها. سمحت لنا هذه النتائج بإنقاء أحسن الثنائيات: السلالات البكتيرية-تراكيز الملوحة والتي كانت مواتية لنمو الفصّة. من بين السلالات الثلاثة و التراكيز الملحية التي تمت دراستها، اعطت الثنائيات Sm2011C1 و O172C1 و O152C1 (في غياب الملح) نتائج تكافلية و فينولوجية جيدة. حيث كانت التراكيز العالية حاجز لتطوير الثنائيات التعايشية ولكنها أعطت نتائج أفضل بعد التلقيح مقارنة بالشواهد الإيجابية والسلبية. سلالات الريزوبيا Sm2011 و O172، في غياب الملوحة وفي وجودها، هي الأكثر فعالية ويمكن تلقيحها في الفصّة في الظروف الطبيعية لاختبار معاملات أخرى.

**الكلمات المفتاحية:** الفصّة، التعايش المثبت للأزوت، سينوريزوبيوم ميليلوتي، الإنبات، الملوحة، منطقة ورقلة.