

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE "DR. TAHAR MOULAY SAÏDA"

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER

SPECIALITE : Biologie

OPTION : microbiologie appliquée

Thème :

**Isolement, caractérisation et identification des rhizobia
associes à *Medicago sativa* en zone semi-aride (Saida)**

PRESENTÉ PAR:

-Zadi karima

-Harkat nour el houda

Soutenue le : 21/06/2017

Membres du jury :

Président : Mr Ammam Abdelkader Maitre assistant A Université Dr. Moulay Tahar

Examinatrice : Mlle Moulay Aicha Maitre de recherche B UNRF Université Dr. Moulay Tahar

Encadreur : Mme. Fares Soria Maitre assistant A Université Dr. Moulay Tahar

Année Universitaire : 2016-2017.

Remerciement



Notre remerciement va en premier lieu à ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la foi et de nous avoir permis d'en arriver là. Nous tenons à remercier particulièrement notre encadreur

Mme S.Fares pour son encadrement et pour

L'intérêt qu'il a manifesté a notre travail.

Nous remercierons très sincèrement, les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examineur.

Nous adressons également notre remerciements, à tous notre enseignants, qu'ils ont consentis pour nous permettre de suivre notre études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessez de nous encourager tout au long de nos années d'étude.

Nous tenons également à remercier tous nos collègues de promotion que nous avons eu le plaisir de les côtoyer pendant cette période de formation

Nous remercierons tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*À la mémoire de ma grande mère HALIMA
A mes très chers parents, Pour leur soutien permanent et inépuisable,
Que Dieu les protège.*

*A ma sœur Soumia et mes frères Abd el kader et Abd el waheb
Que Dieu les bénisse.*

*A mon encadreur Mme S.Fares
Que Dieu exauce ses vœux les plus chers.*

*A ma grand-mère, à mes tantes, mes oncles, mes cousins et
cousines.
A qui m'accompagné a tous moment pour réaliser ce modeste travail a
Mon binôme : Zadi Karima*

*Et à tous ceux qui me sont chers.
A TOUS, je dédie ce travail en leur adressant tous mes sentiments
D'affection et de considération.*

Nour El Houda



Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, Mr ZADI BOUALEM et Mme BOUBTIMA.A.

Vos encouragements et vos prières m'ont toujours accompagnée et guidée.

En ce jour, j'espère réaliser un de vos rêves et être digne de vous.

Veillez trouver, mes très chers parents, dans ce travail le fruit de votre dévouement ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour.

Que Dieu vous garde et vous procure santé et longue vie...

A mes très chères sœurs : Houria, Asmaa, Wahiba, et Fatima

A mes très chers frères : Ahmed, Mohamed, et Salah Eddine

À MES CHERS PETIT S NEVEUX ET NIECES

Loay, Achraf, Amina, Khadidja, Amira et Rayane.

A mon meilleure amie harket nour el houda

Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser

À votre tour vos vœux les plus chers....

Zadi karima

Table de Matières

| | |
|------------------------|---|
| Remerciement | |
| Dédicace | |
| Résumé | |
| Abstract | |
| الملخص | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| Introduction..... | 1 |

Chapitre I : Revue

Bibliographique

| | |
|--|---|
| I.1 fixation biologique de l'azote..... | 4 |
| I.2 Symbiose <i>Rhizobium</i> – légumineuse | 4 |
| I.2.1 Les partenaires de la symbiose Rhizobienne..... | 5 |
| I.2.1.1 Le partenaire végétal..... | 5 |
| I.2.1.1.1 Données sur <i>Medicago Sativa L.</i> | 5 |
| I.2.1.1.1.1 Origine et distribution..... | 6 |
| I.2.1.1.1.2 Systématique de <i>Medicago Sativa L.</i> | 6 |
| I.2.1.1.1.3 Descriptions morphologiques de <i>Medicago Sativa L6</i> | |
| I.2.1.1.2 Importance de la culture..... | 7 |
| I.2.1.1.3 Importance agronomique..... | 7 |
| I.2.1.1.4 Importance écologique..... | 8 |
| I.2.1.1.5 Importance socio-économique..... | 8 |
| I.2.1.2 Le partenaire bactérien..... | 8 |
| I.2.1.2.1 Caractéristiques des rhizobia..... | 8 |

| | | |
|-------------|---|----|
| I.2.1.2.1.1 | Caractères biochimiques..... | 8 |
| I.2.1.2.1.2 | Caractères physiologiques..... | 9 |
| I.2.1.2.1.3 | Caractères cultureux..... | 9 |
| I.2.1.2.2 | Taxonomie des rhizobia..... | 9 |
| I.2.1.3 | Mise en place de la symbiose Rhizobienne | 11 |
| I.2.1.4 | Fixation biologique de l'azote | 12 |
| I.3 | Intérêt de la symbiose rhizobienne..... | 12 |
| I.4 | La Biotechnologie de l'inoculation rhizobienne..... | 12 |
| I.4.1 | Inoculation | 13 |
| I.4.1.1 | Méthodes d'inoculation..... | 13 |

Chapitre II : Matériel et Méthodes

| | | |
|------------|---|----|
| II. | Matériels et Méthodes | 14 |
| II.1 | Matériel biologique | |
| II.2 | Méthodes | 15 |
| II. 2.1 | Echantillonnage du sol | 15 |
| II.2.2 | Isolement et purification des isolats bactériens récoltés <i>in-nature</i> .. | 16 |
| II.2.2.1 | Collection des nodosités | 16 |
| II.2.2.2 | Isolement de souches de <i>Rhizobium</i> | 17 |
| II.2.2.3 | Purification des isolats | 18 |
| II.2.2.4 | Conservation des souches | 18 |
| II.2.3 | Etude des paramètres physiologiques | 19 |
| II.2.3.1 | Effet de la température | 19 |
| II.2.3.2 | Effet du pH | 19 |
| II.2.3.3 | Effet de la salinité | 19 |
| II.2.4 | Etude des paramètres symbiotiques | 19 |
| II.2.4.1 | Test d'infectivité des isolats | 19 |
| II.2.4.1.1 | Désinfection, germination et mise en culture des plantules de <i>M. sativa</i> .. | 20 |

| | | |
|------------|---|----|
| II.2.4.1.2 | Inoculation des plantules <i>in-vitro</i> | 20 |
| II.2.4.2 | Estimation de la croissance des plantes <i>in-nature</i> et observation du phénotype des plantes Inoculées..... | 21 |

Chapitre III : Résultats et Discussion

| | | |
|-----------|---|----|
| III. 1 | Analyses de sol | 22 |
| III.2 | Constitution d'une collection de souches..... | 23 |
| III.3 | Etude de la diversité des isolats..... | 23 |
| III.3.1 | Caractéristiques morphologiques... | 23 |
| III.3.1.1 | Caractéristiques macroscopiques | 23 |
| III.3.2 | caractéristiques microscopiques..... | 24 |
| III.4 | Effet des différents facteurs sur la croissance des isolats.... | 25 |
| III. 4.1 | Effet de la température sur la croissance des isolats | 25 |
| III. 4.2 | Effet de PH sur la croissance des isolats ... | 27 |
| III.4.3 | Effet de la salinité sur la croissance des isolats.. | 28 |
| III.5 | Etude symbiotique..... | 29 |
| III.5.1 | Etude des inoculations des plantes <i>in-vitro</i> | 29 |
| III.5.1.1 | Germination de graines..... | 29 |
| III.5.1.2 | Test de nodulation..... | 30 |

Liste des figures

- **Figure 1:** Aspect de *Medicago sativa*.....7
- **Figure 2 :** Aspect des bactéries de *Mesorhizobium ciceri* bv. *Biserrulae* observées au Microscope électronique à transmission (Nandasena *et al.* 2013).....8
- **Figure 3:** Aspect des rhizobia sur milieu YEM.9
- **Figure 4 :** schéma illustrant les étapes de l'infection racinaire des légumineuses par les rhizobia.....12
- **Figure.05 :** plante de *Medicago sativa* récoltée *in-nature*.....14
- **Figure.06 :** Echantillon de graines de la luzerne "*Medicago sativa*" variété locale.....14
- **Figure.07 :** la collection des nodules à partir des racines de *Medicago sativa*.....16
- **Figure.08:** Isolements et écrasements des nodosités sur milieu YEM solide.....17
- **Figure.09 :** Ensemencement par la Technique de quatre quadrant (Vincent 1970).....17
- **Figure 10 :** Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisé *in-vitro*.....20

- **Figure 11** : Aspect macroscopique des colonies de rhizobia après sa culture sur milieu YEM solide à 28°C.....22
- **Figure 12** : Aspect microscopique d'une souche rhizobienne isolées après coloration de Gram **Gr x1000**.....24
- **Figure 13** : Aspect morphologique des isolats sur milieu YEM à différentes températures.25
- **Figure 14** : Aspect morphologique des isolats sur milieu YEM à différents pH.27
- **Figure 15** : Aspect morphologique des isolats sur milieu YEM contenant de 800mM de NaCl.....28
- **Figure 16** : Germination des graines de *Medicago sativa* ...29
- **Figure 17** : Croissance *in vitro* des plantes de *Médicagosativa* inoculées avec les isolats bactériens et témoin non inoculée.....30

Liste des tableaux

- **Tableau 1** : Classification récente des BNL (Berrada et Benbrahim, 2014)...10
- **Tableau 2**: Echelle international de la salinité du sol 16
- **Tableau 3** : les résultats d'analyses de sol effectuées ...21
- **Tableau 4** : Isolats bactériens obtenus à partir de nodules récoltés dans la région semi aride (Ouled Khaled,Saida)..... 22
- **Tableau 5** : caractéristiques macroscopiques des cultures des souches autochtones isolées de
 - *Medicago sativa*.....23
- **Tableau 6** : Effet des diverses températures sur la croissance des isolats de *Medicago sativa*.....25
- **Tableau 7** : Effet des différents pH sur la croissance des isolats.....26
- **Tableau 8** : Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance.....27
- **Tableau 9** : Résultats du test de nodulation réalisé avec les souches.....30

Liste des abréviations

- **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- **ATP** : Adénosine-5'-triphosphate.
- **BNL** : Bactéries nodulant les légumineuses.
- **EPS** : Exopolyssacharides.
- **GS** : la glutamine synthétase.
- **HgCl₂** : chlorure de mercure
- **Nod** : Facteurs de nodulation.
- **NaCl** : chlorure de sodium
- **Ph** : potentiel d'hydrogène
- **YEM** : Yeast Extract Mannitol.

ملخص

بهدف المساهمة في البحث العلمي الذي يدعو إلى استراتيجيات التي تعتمد على المخصبات الحيوية قمنا بإجراء عدة تجارب علمية من أجل الحصول على بكتيريا الريزوبيوم المتحصل عليها من نبتة الفصة من منطقة شبه جافة بأولاد خالد بسعيدة و إثراء مجموعة العينات البكتيرية الريزوبيوم بالجزائر .

في الجزء الأول من دراستنا تم عزل 7 سلالات من العقد الجذرية من نبتة الفصة في المنطقة الشبه جافة الواقعة في غرب الجزائر سعيدة. و بعد عدة دورات من التنقية تميزت هذه البكتيريا المعزولة بدراسة مظهرية التي تعطي وصفا مماثلا للريزوبيوم

لقد قمنا باختبار مقاومة السلالات لدرجات حرارة و ملوحة و حموضة مختلفة لوحظت بعد ذلك مقاومة واسعة لهذه المعايير الفيزيائية لمجموعة العينات المأخوذة من الفصة .

في الجزء الثاني من دراستنا تم اختبار 7 سلالات لقدرتها على تشكيل عقدات على النبتة المضيفة و النتائج المسجلة في ظروف بكتيريولوجية مراقبة سمح لنا بتحديد السلالات الأكثر فعالية في مرحلة تشكل العقد الجذرية لتشكل مجموعة من السلالات الأصلية .

في الجزء الأخير أظهرنا المميزات المظهرية المتمثلة في حجم العقدات الجذرية اللون و أيضا الجزء الهوائي للنبتة

الكلمات المفتاحية

ريزوبيوم- المناطق الشبه جافة- العقد الجذرية - أسمدة بيولوجية- المخصبات الحيوية

Résumé

Dans le but de contribuer à la recherche scientifique qui préconise des stratégies basées sur l'utilisation des engrais biologiques ou bio-fertilisants, notre travail de recherche a comme objet, la constitution d'un soucier de bactéries provenant de *Medicago sativa* d'un site de Ouled Khaled dans une zone semi-aride de Saïda et d'enrichir la collection de souches de *Rhizobium* d'Algérie.

Dans la première partie de notre étude, 7 souches ont été isolées à partir de nodules de racines de *Medicago sativa* issues de la région semi-aride localisé à Saïda- Ouled Khaled - (ouest Algérien).

Les bactéries isolées sont caractérisés par le biais d'une étude phénotypique qui donne une description comparable à celle des *Rhizobiums*. Nous avons purifié nos souches jusqu'à l'obtention de colonies isolées (la pureté des souches est vérifiée par épuisement).

Nous avons testées la résistance de ses souches à différentes température, salinité et ph. Une large tolérance à cet paramètre physique été montrée pour l'ensemble de la collection de souches (*Medicago sativa*).

Dans la deuxième partie de notre étude, 7 souches ont été testées pour leur aptitude à former des nodules sur leur plante hôte (Test de nodulation) et les résultats enregistrés en condition bactériologiques contrôlées nous ont permis de sélectionner les souches les plus performantes au stade de nodulation *in-vitro* afin de constituer une collection de souches natives.

Dans la dernière partie, nous avons montré les caractéristiques phénotypiques telles que la taille de nodule, leur couleur et aussi la partie aérienne.

Mots Clés:

Medicago sativa L, *Rhizobiums*, zones semi-arides, nodulation, engrais biologique, biofertilisants.

Abstract

In order to contribute to scientific research that advocates strategies based on the use of biological fertilizers or bio-fertilizers, our research work has as object, the constitution of a bacteria stem from *Medicago sativa* of a site Of Ouled Khaled in a semi-arid zone of Saida and to enrich the collection of strains of *Rhizobium* of Algeria.

In the first part of our study, 7 strains were isolated from nodules of *Medicago sativa* roots from the semi-arid region located at Saida- Ouled Khaled (western Algeria).

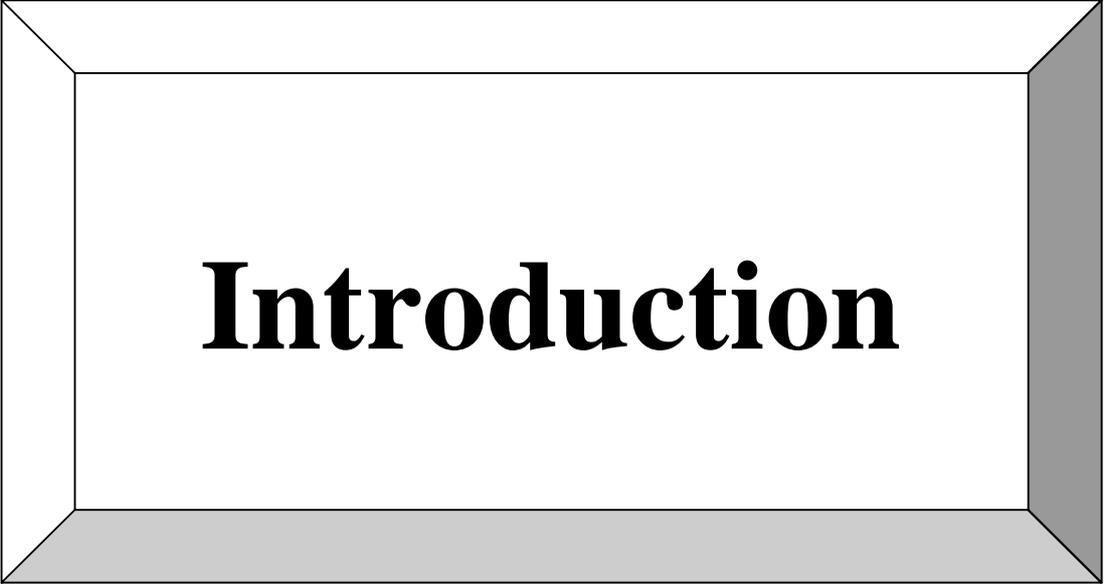
The isolated bacteria are characterized by a phenotypic study which gives a description comparable to that of *Rhizobia*. We purified our strains until isolated colonies were obtained (the purity of the strains is verified by exhaustion).

We tested the resistance of its strains at different temperatures, salinity and PH. It was observed that the resistance to the physical parameters of the sample group from (*Medicago sativa*) was highly resistant.

In the second part of our study, 7 strains were tested for their ability to form nodules on their host plant (nodulation test) and the results recorded in controlled bacteriological conditions allowed us to select the most efficient strains at the stage of Nodulation in-vitro to form a collection of native strains.

In the last part, we showed the phenotypic characteristics such as nodule size, their color and also the aerial part.

Keywords: *Medicago sativa* L, *Rhizobia*, semi-arid zones,, nodulation, biofertilizers.



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 aux 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).

Cette symbiose permet aux légumineuses d'être relativement indépendantes vis-à-vis de l'azote du sol, ce qui permet d'assurer leurs besoins.

En outre, avec l'ascension des prix des engrais azotés et au vu des problèmes de pollution par les nitrates, l'importance des légumineuses à forte capacité fixatrice de l'azote devient évidente.

Pour les régions où les sols sont généralement pauvres en azote, la luzerne constitue des cultures stratégiques sur le plan économique et alimentaire.

La fixation symbiotique de l'azote est devenue un élément incontournable des politiques de limitation des apports d'engrais azotés que ce soit pour des raisons économiques, écologiques ou de durabilité de l'activité agricole (Alkama et al, 2002; Jeder et al, 2003).

Il est donc avantageux de cultiver les légumineuses car d'une part, elles fournissent des aliments riches en protéines et d'autre part, ce sont des cultures à faible niveau d'intrants qui ne modifient que très peu les équilibres biologiques naturels (Sprent, 2001).

Cependant ces avantages sont subordonnés à leur capacité de contacter des symbioses fixatrices de l'azote avec des rhizobia des sols destinés à leur culture.

Cette capacité ne peut s'exprimer avantagement que si la légumineuse rencontre dans le sol la souche de rhizobia qui est compatible avec elle et qui en même temps présente un pouvoir d'infectivité des racines (une bonne compétitivité vis-à-vis des autres bactéries et une grande efficacité au plan de réduction symbiotique de l'azote atmosphérique) (Graham, 2008).

Dans une symbiose fixatrice de l'azote, la bactérie symbiotique et la plante hôte établissent entre elles un système de partenariat.

L'exploitation de cette symbiose dépend de nos connaissances non seulement sur le couple plante-bactérie mais aussi sur le couple bactérie-sol, le sol étant considéré comme une entité avec toutes ses composantes biologiques et physicochimiques (Dommergue et al. 1999).

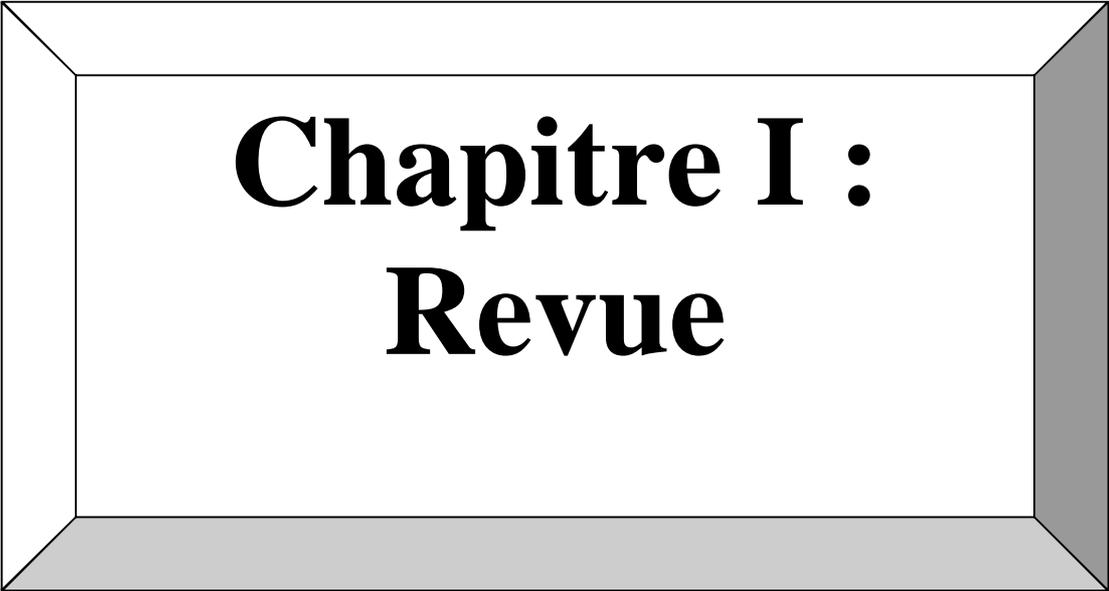
Au champ, la fixation de l'azote potentielle est limitée par des contraintes environnementales (On utilise aussi l'expression de facteurs limitants) dont l'impact est parfois considérable de sorte que la fixation de l'azote réelle peut être beaucoup plus faible que la fixation potentielle.

Ces contraintes sont de nature physique, chimique et biologique. Les facteurs limitants agissent à différents niveaux : ils peuvent affecter le microorganisme à l'état libre, le processus d'infection et le développement du nodule et le fonctionnement de la symbiose lorsque cette dernière a été établie. En outre, la plante joue un rôle dominant par rapport à la bactérie, de sorte que tout facteur affectant l'état physiologique de la plante (maladie, déficience nutritionnelle, toxicité, salinité, contraintes hydriques,...) retentit directement sur l'activité fixatrice de l'azote de la bactérie symbiotique (Brockwell et al, 1995).

L'étude de l'effet de toute contrainte environnementale est compliquée par le fait que cet effet dépend non seulement de l'intensité et de la durée de la contrainte considérée, mais aussi de ses interactions avec les autres facteurs du milieu.

En outre, il est nécessaire de tenir compte de la variabilité de tolérance intrinsèque des partenaires des symbioses à chaque contrainte (O'hara et al. 2002).

Notre travail est organisé en plusieurs chapitres. Le premier chapitre est consacré pour une synthèse bibliographique sur La symbiose entre les rhizobiums et les légumineuses. Le deuxième chapitre traite les données de la région et les matériels et méthodes adopté à l'expérimentation et en laboratoire. Les résultats et discussion sont présentés dans le troisième chapitre. En fin le travail sera achevé par une conclusion générale qui englobe des suggestions et des perspectives.



Chapitre I : **Revue**

I.1 fixation biologique de l'azote :

Dans la nature, l'azote est abondamment présent sous forme de gaz N₂ dans l'air dont il représente près de 4/5, sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante (Grama, 2008). C'est l'élément constitutif de la plante le plus important après le carbone. Il constitue très fréquemment le facteur limitant principal pour la production végétale agricole (Roger, 1996).

La concentration requise en azote pour une croissance optimale des plantes varie entre 2 et 5 % sur une base de matière sèche (Parent, 1999). Il peut représenter jusqu'à 7% de cette matière et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif, comme en début de floraison. L'insuffisance ou la carence de cet élément se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (Tourtre, Bordonneau et al., 2005).

La fixation biologique de N₂ est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique.

Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. Dans les écosystèmes cultivés, la fixation de N₂ et les apports d'engrais azoté constituent les apports pouvant compenser les exportations par les récoltes et les pertes dues à des activités microbiennes (volatilisation et dénitrification). En absence de fertilisation, la fixation de N₂ est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (Roger, 1996). Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée.

La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes, simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase, qui catalyse la

réduction de l'azote en ammoniac (Hopkin, 2003). Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte.

Chez les légumineuses, les bactéries (les rhizobiums) s'installent dans les racines des plantes ; le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie ; celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Pousset, 2003).

Ce mécanisme symbiotique est responsable chaque année de la réduction de 120 millions de tonnes d'azote atmosphérique en ammonium (Freiberg, Fellay et al. 1997). Les légumineuses cultivées en association avec leurs symbiontes fixent 40 à 60 Mt d'azote par an, tandis que 3 à 5 Mt d'azote sont fixées par les légumineuses des écosystèmes naturels (Graham et Vance, 2003).

Chaque année, les légumineuses associées à leur symbionte produisent autant d'azote que l'industrie mondiale des engrais. L'indépendance vis-à-vis des engrais azotés est particulièrement intéressante pour l'agriculture dite durable. La rotation des cultures avec les légumineuses permet d'économiser les engrais azotés, très coûteux en énergie fossile et contribuant à l'effet de serre via l'émission de grandes quantités d'oxyde nitrique (Crutzen, Mosier et al. 2007).

I.2 Symbiose *Rhizobium* – légumineuse :

L'azote atmosphérique (N₂) est le gaz le plus abondant dans l'atmosphère, mais il n'est pas utilisé par la plupart des organismes. En 1838, Boussingault a montré que les légumineuses peuvent assimiler l'azote atmosphérique. En 1888, Hellriegel et Wilfarth ont lié cette capacité à la présence de nodosités sur leurs racines, qui apparaissent suite à l'infection par des bactéries isolées par Beijerinck (1888), les rhizobia (Heller *et al.*, 1989) qui n'assimilent l'azote qu'en état symbiotique avec les légumineuses.

La symbiose *Rhizobium*- légumineuse est une association mutualiste à bénéfice réciproque entre les légumineuses et les

bactéries du type rhizobium. Ces dernières permettent de transférer l'azote de l'air en forme assimilable par les plantes. En échange, la plante fournit aux rhizobia le carbone résultant de sa photosynthèse (Dommergues *et al.* 1999). Au cours de la symbiose, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines ou plus rarement sur les tiges où l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries (Albrecht *et al.* 1999 ; Haag *et al.* 2013 ; Niste *et al.* 2014).

I.2.1 les partenaires de la symbiose Rhizobienne :

La symbiose rhizobienne est établie avec un grand nombre d'espèces de la famille des fabacées (légumineuses) qui est la troisième grande famille après les Astéracées et les Orchidacées.

I.2.1.1 le partenaire végétal :

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). Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidaceae et les Asteraceae), avec environ 750 genres (Polhill *et al.* 1981) et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.* 2006), et la deuxième plus importante pour les pâturages d'intérêt agricole, après les Poacées (graminées) qui incluent la canne à sucre et les céréales tels le maïs, le riz, le blé, l'orge, l'avoine, le seigle et le millet (Young *et al.* 2003). 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).

Les légumineuses sont extrêmement diversifiées, vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd *et al.* 2001). Cependant, elles présentent un point commun, leur fruit est une gousse (Caratini 1984). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard *et Dupont* 2005).

I.2.1.1.1 Données sur *Medicago Sativa L.*:

Le genre *Medicago* ou l'herbe de Médic appartient à la famille des Fabaceae sous-famille des papilionoideae (prosperi et al. 1995) il comporte 21 espèces herbacées pérennes ,63 especes annuelles (Small et Jamphe, 1989). L'espèce la plus connue est *Medicago sativa*, la luzerne cultivée.

La luzerne cultivée (*Medicago sativa L.*), aussi appelée alfalfa, est une plante herbacée fourragère. Elle est très cultivée pour sa richesse en protéines (allant jusqu'à 55%) et ses qualités d'amélioration des sols. la luzerne est très utilisée pour l'alimentation du bétail car elle est une véritable source industrielle de protéines .ses gousses et ses feuilles forment la base de l'alimentation des bétails en saison sèche. Sa capacité a préservé un stock de semence dans le sol grâce au taux important de graines dures (prosperi et al. 1995).

En plus de cette importance fourragère et grâce à leur association avec les bactéries du sol du genre *Ensifer meliloti*, un hectare de luzerne peut fixer jusqu' à 600Kg /an d'azote (Denarie et Joly., 1994).

I.2.1.1.1.1 Origine et distribution :

La luzerne (*Medicago sativa L.*) est une des plantes fourragères les plus répandues sur tous les continents, sa culture remonterait à plus de 9 000 ans, dans les toutes plateaux du Caucase, l'Iran et la Turquie d'où elle se serait répondeue dans le monde entier. On la cultive à peu près sous toutes les latitudes, de puis les régions équatoriales jusqu'aux abords du cercle Arctique. Elle trouve cependant son plus grand développement dans les zones tempérées chaudes : Etats-Unis, Europe, Amérique du sud, Asie, Japon, Australie, Chine, Nouvelle-Zélande, Afrique et Argentine. Au total la luzerne représente dans le monde près de 32 millions d'hectares dont 14 millions en Amérique

du nord où elle est le mieux représentée pour de 6 00000 hectares en France. Le nom américain donné à la luzerne alfalfa proviendrait de l'arabe. On retrouve d'ailleurs l'appellation alfalfa en Espagnol et en Italien. (Mathieu, 2003).

□ □ Nom scientifique (latin) : *Medicago sativa* L.

□ □ Nom vulgaire français : luzerne (f.)

□ □ (Germe (m.) de luzerne, pousses (f.) de la luzerne)

□ □ Nom vulgaire anglais : alfalfa

□ □ Ou encore : Lucerne (Munro et Small, 1997)

I.2.1.1.1.2 Systématique de *Medicago Sativa* L. :

La luzerne est une légumineuse appartenant à la famille des Fabacées d'après Quezel et Santa (1962), l'espèce est classée comme suite :

- ✓ Embranchement : Spermaphytes.
- ✓ Sous-embranchement : Angiospermes.
- ✓ Classe : Dicotylédones.
- ✓ Sous-classe : Dialypétales.
- ✓ Ordre : Rosales.
- ✓ Famille : Fabacées.
- ✓ Sous-famille : Papilionacées.
- ✓ Tribu: Trifoliées.
- ✓ Genre: *Medicago*.
- ✓ Espèce: *Medicago sativa* L.

I.2.1.1.1.3 Descriptions morphologiques de *Medicago Sativa* L. :

Medicago sativa est une plante vivace, capable de vivre plus de 30ans si les conditions sont favorables (Munro et Small, 1997).

La plante a des tiges dressées et ascendantes, très ramifiées, et peut atteindre plus de 80 cm de haut.

Les feuilles sont trifoliées, pétiolées, dentées et mucronnées au sommet, ordinairement glabre (**Fig. 1**). Les folioles, de formes assez variées, sont toujours plus ou moins obovalis et finement dentées au sommet. La foliole centrale est pétiolée, les stipules oblongues dentées, larges à la base se terminent par une longue pointe.

Le fruit est un grain de 2,5 mm de long, réniforme ; la courbe convexe est régulière, la courbe concave plus ou moins sinueuse (Lapeyronie, 1982).

Les racines sont pivotantes à fasciculées. L'inflorescence porte dix à trente fleurs en grappe.

Les fleurs sont violettes, parfois jaunes ou blanches souvent bigarrées de bleu, de vert ou de jaune. Les gousses sont plus ou moins spiralées, contenant de deux à dix graines. Les graines sont de 2 à 2,5 mm de long, réniformes, arrondies ou ovoïdes, de jaune olive à brun, suivant l'âge ou les conditions de récolte (ACTA, 1984 ; Prospero, Guy et al. 1995).

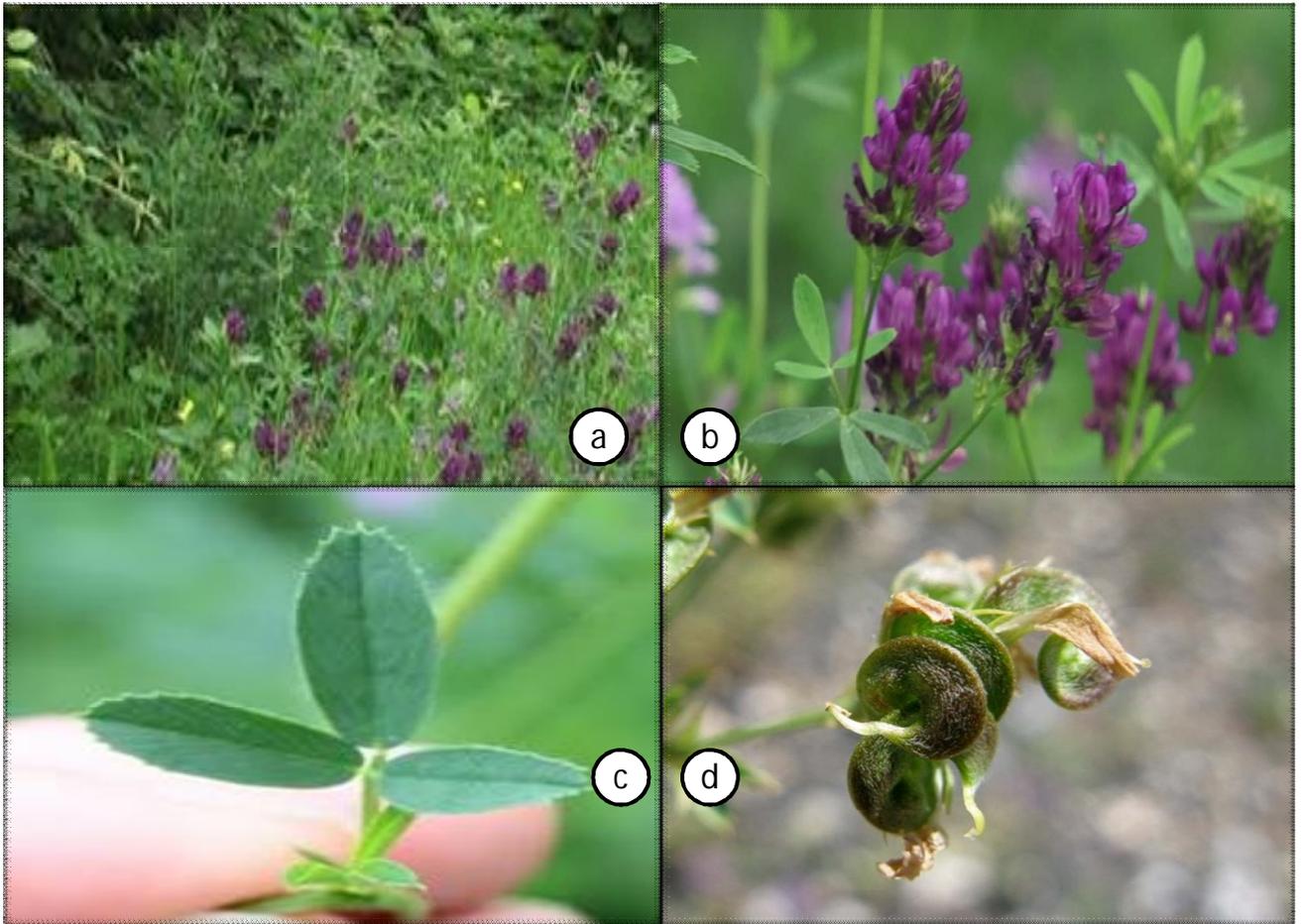


Figure 1: Aspect de *Medicago sativa*.
(A : Plante de *M. sativa*; B : Fleurs de *M. sativa* ; C : Feuilles de *M. sativa*; D :
Gousses de *M. sativa*)

I.2.1.1.2 Importance de la culture :

Parmi les légumineuses, la luzerne a vraiment bien mérité l'appellation de « reine des cultures fourragères », sauf là où les conditions édaphiques particulières donnaient priorité à d'autres, telles que le trèfle violet dans les sols acides, le Sulla dans les sols argileux (Bonciarelli, 1992). La luzerne (*Medicago sativa* L.) est cultivée sur plus de 33 millions d'hectares, c'est la première légumineuse fourragère utilisée dans le monde. La plus importante surface cultivée se trouve aux Etats- Unis d'Amérique (environ 1/3 de la superficie totale), suivis par l'Argentine et la Russie (Birouk, Bouizgaren *et al.*, 1997).

I.2.1.1.3 Importance agronomique :

La luzerne laisserait dans le sol 6 à 8 tonnes de racines sèches par hectare ce qui correspond à 10 tonnes de fumier par hectare (Villax, 1963). Elle est :

- ✓ Une source d'azote pour d'autres cultures d'assolement ;
- ✓ Une culture propre améliorant les sols ;
- ✓ Une source complète d'éléments nutritifs pour la production de viande et de lait ;
- ✓ Un aliment de haute qualité pour les chevaux (Marble, 1993) ;
- ✓ Elle assure :
 - ✓ Une mobilisation des nutriments des réserves profondes du sol grâce à son puissant système racinaire ;
 - ✓ Un haut potentiel de production de qualité ;
 - ✓ Une souplesse d'exploitation (fauche, foin, pâturage, déshydratation et ensilage) (Birouk, Bouizgaren *et al.* 1997) ;
 - ✓ Une masse importante de matière organique ainsi que des résidus azotés dans le sol après défrichage, grâce aux nodosités des racines (Soltner, 1999).

I.2.1.1.4 Importance écologique :

La fonction écologique de la luzerne se manifeste sur la conservation du sol et de sa fertilité, sur le contrôle de la pollution par les nitrates, sur la durabilité des systèmes fourragères qui la comprennent et sur la limitation des intrants chimiques et de labour grâce à sa pérennité.

I.2.1.1.5 Importance socio-économique :

Elle est essentiellement due à sa grande productivité de qualité et surtout à la multiplicité d'usages qu'elle peut permettre : couverture de protection, pâture, fourrage vert, foin, ensilage, déshydratation, production de fibres pour l'industrie de la papeterie (Talamucci, 1994).

I.2.1.2 Le partenaire bactérien :

Le rhizobium(r minuscule et au pluriel rhizobia) du grec rhiza (racine) et bios(vie) signifie étymologiquement « ce qui vit dans les racines »(FRANK,1889).le *Rhizobium*(en italique avec un « R »majuscule) est le nom taxonomique formel d'un genre bactérien Zakhia et al.,(2004) ont proposé le terme BNL (bactérie nodulant les légumineuses) pour éviter cette confusion.

I.2.1.2.1 Caractéristiques des rhizobia :

Les BNL se trouvent soit à l'état libre dans le sol ,sous forme de coccobacilles ou bâtonnets pléomorphes (0.5a 0.9 µm x 1,2à 3 µm) mobile grâce à un seul flagelle polaire ou subpolaires (Rhizobia à croissance lente)ou par deux à six flagelles péritriches (Rhizobia à croissance rapide)(Somasegaran et Hoben ,1994),soit à l'état symbiotique comme des bactéroïdes polymorphes de forme sphérique, enflées ,ellipsoïdes ,branchées en forme de crosse ou en massue(Perry et al,2004)(fig. 2).

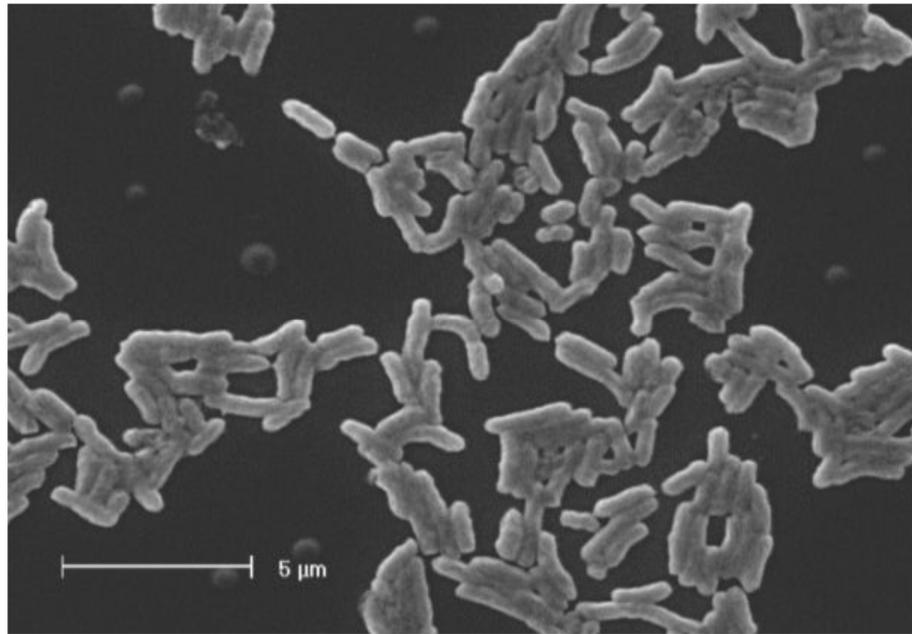


Figure 2 : Aspect des bactéries de *Mesorhizobium ciceri* bv. *Biserrulae* observées au Microscope électronique à transmission (Nandasena *et al.* 2013).

I.2.1.2.1.1 Caractères biochimiques :

Pour se développer à l'état libre, les BNL exigent une source d'azote, une large gamme de carbohydrates et des vitamines (pour certaines espèces) (Pelmont, 1995). Les rhizobia à croissance rapide ont une croissance meilleure en présence du saccharose, mannitol ou glucose et ceux à croissance lente préfèrent le pentose (Somasegaran et Hoben, 1994). Ces bactéries sont connues pour la production abondante de polysaccharides exo-cellulaires (Zevenhuizen et Scholten-Koerselman, 1979).

I.2.1.2.1.2 Caractères physiologiques :

Les BNL sont des aérobies stricts (Pelmont, 1993) ou microaérophiles, asporulés, Gram Négatif (Jordan, 1984) et mésophiles, Ils se développent mieux à une température qui se situe Entre 25 et 30°C (Somasegaran et Hoben, 1994) mais il existe des espèces qui tolèrent des Températures plus élevées en fonction de l'espèce et de la région d'isolement (Affianha et alexander, 1992 ; Cacciari *et al.*, 2003). Ces bactéries préfèrent un pH de 6 à 7 mais le

pH idéal est de 6,8. Certaines souches tolèrent des pH alcalins (Kulkarni *et al.*, 2000) ou très bas (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Vincent, 1977).

I.2.1.2.1.3 Caractères culturaux :

Les BNL (non différenciées en bactéroïdes) sont cultivés sur milieu YEM (Yeast Extra Mannitol.) , ils forment des colonies de 2 à 4 mm de diamètre après 3 à 5 jours d'incubation, de couleur blanchâtres ou beiges et parfois brillantes, circulaires, convexes, semi translucides ou opaques ou laiteuses, élevées, mucilagineuses (Vincent, 1970) et la plupart des espèces n'absorbent pas le rouge Congo (Fig. 3). Les rhizobia à croissance rapide (2 à 3 jours) ont une vitesse de dédoublement chaque 2 à 4 h et ceux à croissance lente (3 à 5 jours) ont une vitesse de dédoublement de 6 à 8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).

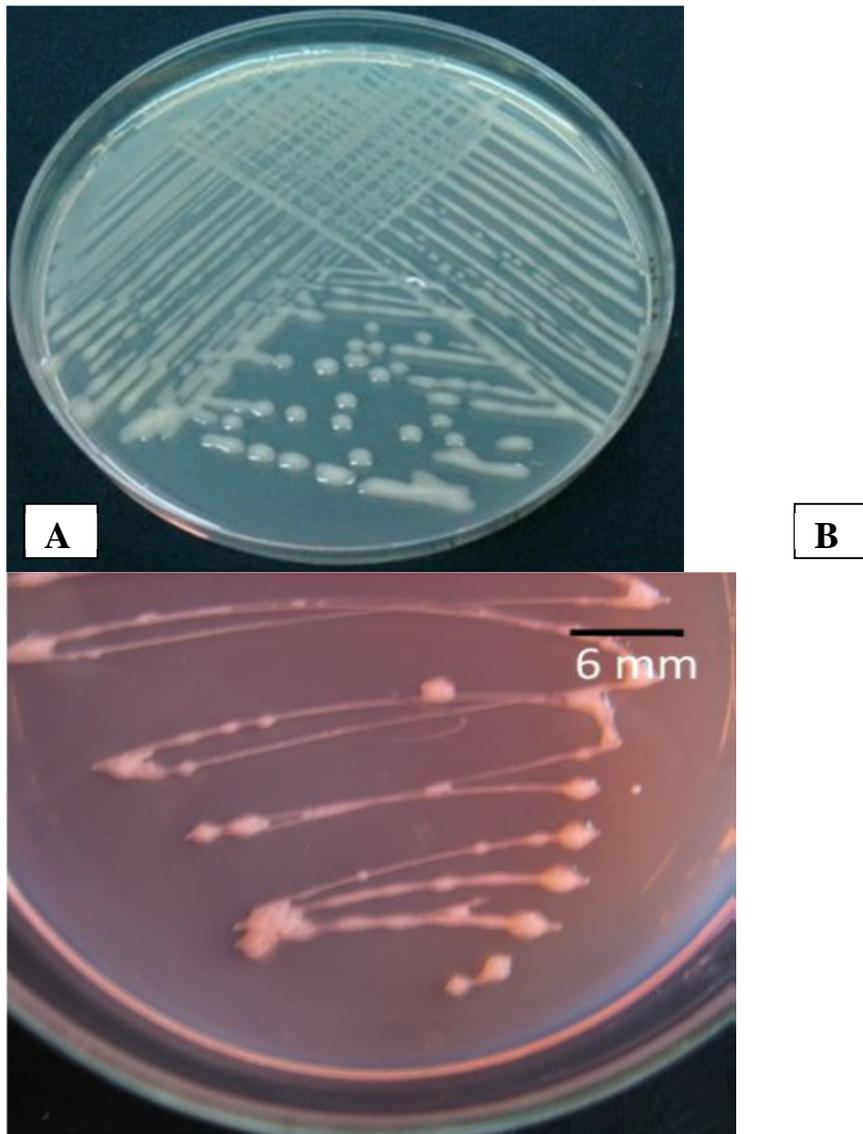


Figure 3: Aspect des rhizobia sur milieu YEM. A : *Rhizobium* sp. Après 2 jours de Croissance (Boukhatem *et al.* 2012). B : *Bradyrhizobium japonicum* sur YMA Contenant du rouge Congo après 10 jours de croissance (Mubarik et Sunatmo, 2014).

I.2.1.2.2 Taxonomie des rhizobia :

En se basant sur le séquençage de l'ADN ribosomal 16s, récemment, les BNL comprennent plus de 98 espèces appartenant à 14 genres de α -, β - et γ -protéobactéries, (Tab. 1) (Zakhia et De Lajudie, 2001 ; Rüberg *et al.* 2003 ; Nogom *et al.*, 2004 ; Benhizia *et al.*, 2004).

Tableau 1 : Classification récente des BNL (Berrada et Benbrahim, 2014).

| Classe | Ordre | Famille | Genre | Espèce |
|----------------------------|-------------|------------------------|---------------------------|--|
| α proteobacteria | Rhizobiales | Rhizobiaceae | <i>Rhizobium</i> | <i>R. leguminosarum</i> (symbiovar <i>vi</i> <i>symbiovar phaseoli</i>)- (<i>symbiovar officinalis</i> , <i>symbiovar</i> <i>leucaenae</i> - <i>R. tropici</i> - <i>R. endophytic</i> <i>R. etli</i> (<i>symbiovar mimosae</i> , <i>syn</i> <i>undicola</i> - <i>R. gallicum</i> (<i>symbiova</i> <i>gallicum</i>)- <i>R. giardinii</i> (<i>symbiova</i> <i>giardinii</i>)- <i>R. hainanensis</i> - <i>R. huau</i> <i>yanglingense</i> - <i>R. larrymoorei</i> - <i>R. i</i> <i>loessense</i> - <i>R. cellulosityticum</i> <i>multihospitium</i> - <i>R. oryzae</i> - <i>R. pisi</i> - <i>R.</i> <i>R. alkalisoli</i> - <i>R. tibeticum</i> - <i>R. tubono</i> <i>radiobacter</i> - <i>R. rhizog</i> <i>R. vitis</i> - <i>R. nep</i> |
| | | | <i>Ensifer</i> | <i>E. meliloti</i> - <i>E. fredii</i> (<i>symbiovar fre</i> <i>sahelense</i> - <i>E. terangae</i> (<i>symbiov</i> <i>sesbania</i>)- <i>E. medicae</i> - <i>E. arboris</i> - <i>E.</i> (Formerly <i>Sinorhizobium xingianense</i>)- <i>E. adh</i> <i>E. americanum</i> - <i>E. mexican</i> |
| | | | <i>Shinella</i> | <i>S. kummerow</i> |
| | | Phyllobacte riaceae | <i>Mesorhizob ium</i> | <i>M. loti</i> - <i>M. huakuii</i> - <i>M. ciceri</i> - <i>mediterraneum</i> - <i>M. plurifari</i> <i>M. chacoense</i> - <i>M. septentrional</i> <i>thiogangeticum</i> - <i>M. albiziae</i> - <i>M. ca</i> <i>tarimense</i> - <i>M. australicum</i> - <i>M.</i> <i>metallidurans</i> - <i>M. alhagi</i> - <i>M. camel</i> <i>muleiense</i> - <i>M. hawassense</i> - <i>M. qing</i> <i>shonense</i> - <i>M. shangrilense</i> - <i>M.</i> <i>tamadayens</i> |
| | | <i>Phyllobacte</i> | <i>P. trifolii</i> | |

| | | | | |
|------------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------------|---|
| | | | <i>rium</i> | |
| | | Methylobac teriaceae | <i>Methylobac terium</i> | <i>M. nodulan</i> |
| | | | <i>Microvirga</i> | <i>M. lupini-M. lotononidis</i> |
| | | Brucellacea e | <i>Ochrobactr um</i> | <i>O. cytisi-O. lu</i> |
| | | Hyphomicr obiaceae | <i>Azorhizobi um</i> | <i>A. caulinodans-A. dobereinere</i> |
| | | | <i>Devosia</i> | <i>Devosia neptu</i> |
| | | Bradyrhizo biaceae | <i>Bradyrhizo bium</i> | <i>B. japonicum-B. elkanii-B. liaoning B. betae-B. canariense-B. iriom lablabi-B. huanghuaihaiense-B. denitrificans-B. oligotrophia</i> |
| β- Proteobacteria | Burkholder iales | Burkholder iaceae | <i>Burkholder ia</i> | <i>B. caribensis-B. cepacia-B. tub nodosa-B. sabiae-B. mimosaru diazotrophica-B. endofungorum-</i> |
| | | | <i>Cupriavidu s</i> | <i>C. taiwanen.</i> |
| γ - Proteobacteria | Pseudomon adales | Pseudomon aceae | | <i>Pseuomonas</i> |

I.2.1.3 Mise en place de la symbiose Rhizobienne :

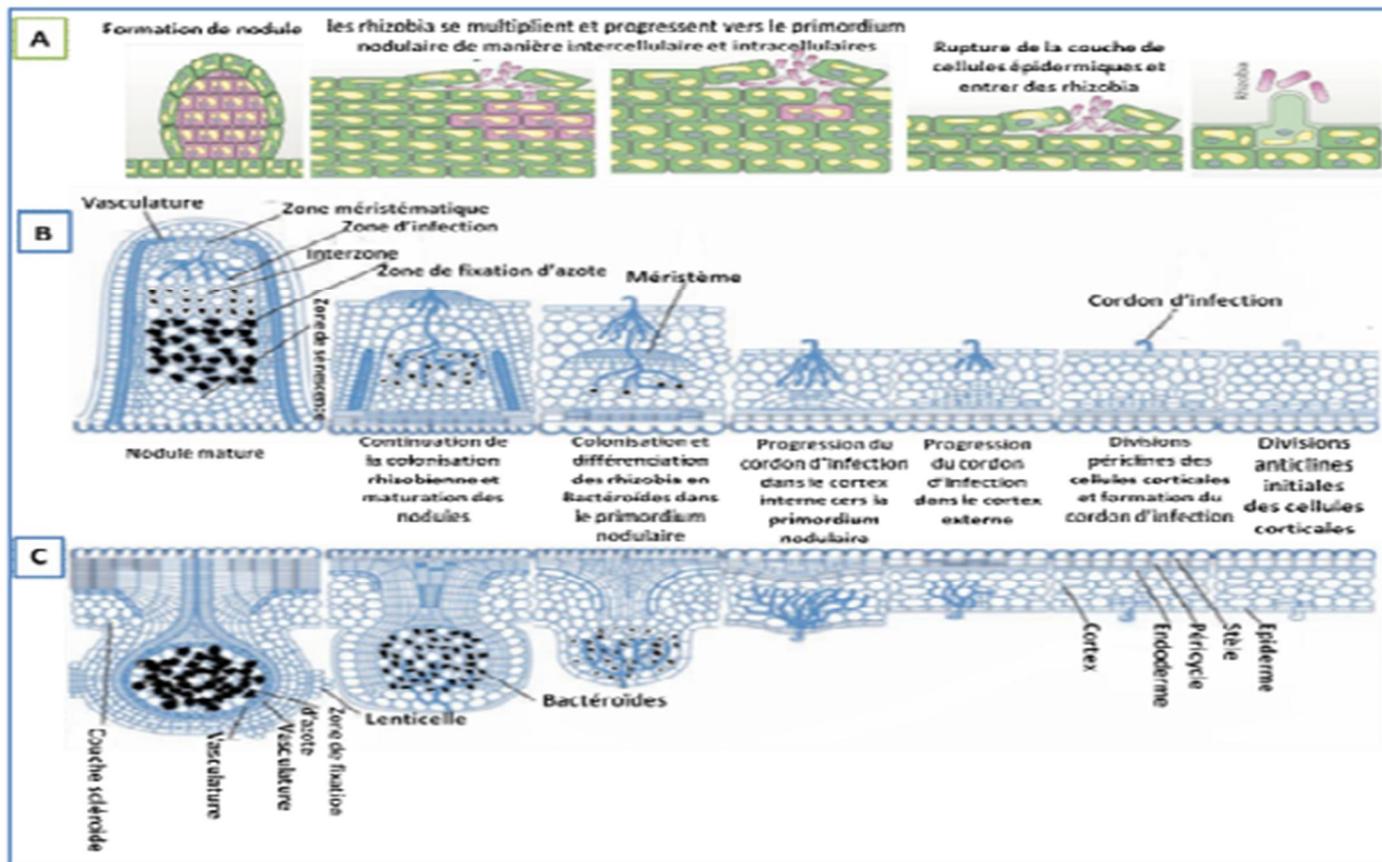
En condition de carence azotée et de photosynthèse active, la symbiose est établie dans la rhizosphère par une infection racinaire intracellulaire (la plus étudiée) ou intercellulaire (Oldroyd et Dowine, 2008).

Dans le cas de la voie intracellulaire, les poils racinaires attirent les rhizobia par une large gamme de substances (Kape et al, 1991). parmi ces exsudats racinaires, les flavonoïdes induisent l'expression des gènes Nod bactériens responsable de la production des facteurs Nod qui induisent des changement morphologiques, physiologiques, et moléculaires dans la plantes hôte (fig.5)(Caetano-Anolles et Gresshoff,1991 ;spaink,2000).

En cas de réussite du dialogue initial, les poils racinaires sont déformés (Wais et al., 2002 ; Timmers et al., 2007) en différentes formes en fonction de leur stade de développement (Wood et Newcomb, 1989), piégeant les bactéries et créant une zone dans laquelle les bactéries sont entourées par une paroi végétale (Yao et Vincent, 1969 ; Bhuvanewari et Solheim, 1985). À partir de cette zone, le cordon d'infection est initié par la hydrolyse de la paroi (Mateos et al., 2001), il s'agit d'une structure tubulaire qui croît à l'intérieur de la cellule et dans laquelle la bactérie prolifère. (Gage, 2004 ; Oldroyd et al., 2001)

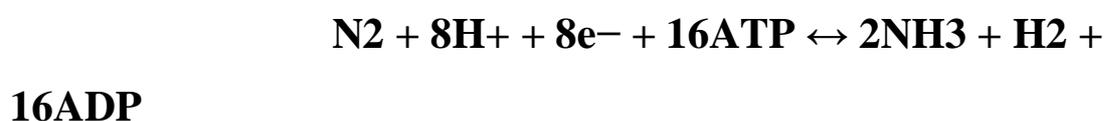
L'infection de la plante par les Rhizobia induit la division des cellules du cortex interne, pour les nodules indéterminés, ou des cellules sous-épidermiques, pour les nodules déterminés, de manière anticlinale puis périclinale (Timmers et al., 1999 ; Foucher et Kondorosi, 2000). En suite, la division des autres couches cellulaires conduit à la formation du primordium nodulaire. Le cordon d'infection progresse à travers ce primordium et libère les rhizobia qui se différencient en bactéroïdes. Lorsqu'ils atteignent les cellules du nodule, les bactéroïdes sont entourés par une membrane de l'hôte, formant des structures appelées « symbiosomes » (Udvardi et Day, 1997). Au sommet du primordium des nodules indéterminés, le méristème se développe en donnant naissance continue de nouvelles cellules, créant différentes zones qui correspondent aux différentes étapes symbiotiques. En revanche, le méristème des nodules déterminés n'est pas persistant et toutes les cellules sont en état de différenciation identique. (Newcomb et al., 1979 ; Rolfe et Gresshoff, 1988).

Dans le cas de la voie intercellulaire, les rhizobia entrent dans la racine à travers la rupture de la couche épidermique. Au sein de ces poches, elles se multiplient et progressent vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire et ensuite intracellulaire. Pour certains cas, les facteurs Nod sont impliqués dans cette stratégie de colonisation (Fig. 4) (Deakin et Broughton, 2009).



I.2.1.4 Fixation biologique de l'azote :

Le processus de fixation symbiotique d'azote est effectué par les bactéroïdes dans le symbiosome nodulaire grâce au complexe enzymatique de la nitrogénase qui est extrêmement sensible à l'oxygène. Dans les nodules, ce complexe est protégé par la leghémoglobine qui maintient la pression de l'oxygène à un niveau assez bas. La nitrogénase est composée de deux protéines. La protéine nitrogénase réductase est réduite par les électrons donnés par les ferrédoxines et ensuite liée aux ATP pour réduire la protéine dinitrogénase, qui cède les électrons au N₂ (Badenoch-Jones et al., 1989 ; Howard et Rees, 2006) comme suit :



Le NH_4^+ est toxique pour l'organisme, il est converti en glutamine par la glutamine synthétase (GS) et en asparagine. La glutamine est exportée aux peroxysomes des cellules non infectées où les allantoïnes et les acides allantoïques sont synthétisés. Toutes les molécules de transport d'azote (glutamine, asparagine, allantoïnes et les acides allantoïques) sont exportées *via* le système vasculaire aux autres cellules de la plante (Biswas et Gresshoff, 2014). Pour protéger la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène, la leghémoglobine permet de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule (Kundu, 2003).

I.3 Intérêt de la symbiose rhizobienne :

Globalement, la moitié de la fixation biologique d'azote est réalisée par la symbiose rhizobienne, soit 200 millions de tonnes d'azote sont fixés par an (Ferguson *et al.*, 2010). Elle permet de enrichir les sols en azote, de remplacer l'apport des engrais azotés et de satisfaire 90% de la nutrition des légumineuses (Berrada et Benbrahim, 2014).

La symbiose rhizobienne est aussi impliquée dans la protection des légumineuses contre les stress abiotique et biotique par une compétition nutritive entre les rhizobia et l'agent pathogène envers la source de carbone (Bordeleau, 1989 ; Ehteshamul-haque *et al.*, 1992) et par la production des sidérophores par certains rhizobia (Kloepper *et al.* 1980 ; Moore, 1988).

I.4 La Biotechnologie de l'inoculation rhizobienne :

L'inoculation est la pratique qui consiste à introduire les souches de *Rhizobia* ou *Bradyrhizobia* dans l'écosystème plante-sol ; un inoculum étant une formulation des souches en porteur solide ou liquide (Baraibar., 2000). Il y a plus de 100 ans que des recherches ont été entreprises en vue d'améliorer la croissance des plantes.

Les chercheurs se sont surtout attachés à élucider les questions de l'apport et la disponibilité d'azote et de phosphate, qu'ont les éléments nutritifs les plus indispensables à la croissance des plantes.

Les premiers inocula, constitués de bactéries telluriques, qui, induits dans les légumineuses, apportaient à celles-ci de l'azote, ont été commercialisés en 1898. Ces bactéries sont encore utilisées aujourd'hui et font l'objet d'importants travaux de recherche (Anonyme, 2001).

I.4.1 Inoculation :

Lorsque le sol ne contient pas naturellement les rhizobiums spécifiques fixateurs de la légumineuse que l'on veut introduire, il est indispensable d'apporter la souche bactérienne nécessaire. Cette opération appelée injustement « inoculation », il serait préférable de parler de « bactérisation » (Obaton, M. ; FAO, 1989).

I.4.1.1 Méthodes d'inoculation :

Les premières inoculations comprenant l'apport dans les nouveaux champs de tonnes de sol de terrains où poussaient les légumineuses en question ; cette méthode encombrante de transfert de sol fut probablement responsable de la naissance de l'industrie actuelle de la production d'inoculum.

Le but c'est pour améliorer la fixation de l'azote des plantes fourragères comme la *Medicago sativa*

✓ Selon Brokwell (1982) on distingue deux modes d'inoculation :

- **Inoculation directe:** les rhizobiums sont mis sur la graine avant le semis, Inoculation des semences:

- Cette opération doit être faite à l'ombre et si possible au frais, tout le matériel utilisé pour la réalisation de cette opération doit être propre (Vincent, 1970).

- **Inoculation indirecte** : les rhizobium sont disposés dans la raie de semis (micro-granulés, inoculum liquide). Inoculation du sol:

- Cette méthode est la plus utilisée, lorsqu'on utilise des graines qui n'ont pas été traitées.



Matériel et Méthodes

II Matériel et Méthodes :

Notre travail à été effectué au niveau du laboratoire de biologie au sein de l'université Docteur Tahar Moulay Saida, sous l'encadrement de M^{me}. FARES.

II.1 Matériel biologiques :

- **Sol**

A partir du sol entourant les pieds de la *Medicago sativa* nous avons prélevé des échantillons à différentes profondeurs respectivement 20, 40, et 60 cm. sont homogénéisés pour obtenir un échantillon représentatif pour la région puis aérés et conservés à température ambiante dans des sachets en plastique jusqu'à leur utilisation.

- **Matériel végétal**

Nous avons choisis le site dans une région semi-aride (Saida) de(Rabahia ouled khaled) exactement, connue par sa richesse en matière d'élevage. Le choix de cette plante son été dicté puisqu'elle est essentiellement cultivée comme plante fourragère (source nutritive pour les ruminants) et sa richesse en protéine, ainsi son étude entre dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles locales.

Dans le but de constituer une sélection de souches (un souchier); Le prélèvement a été effectué en avril 2017 de la plante *Medicago sativa* au stade d'apparition des boutons des fleurs pour l'isolement des Rhizobiums au laboratoire. (Fig.05).

Les graines de *Medicago sativa* proviennent d'une variété commercialisées (Saida), qui ont servi au test de nodulation (Fig.06).



Figure 05 : plante de *Medicago sativa* récoltée *in-nature*.



Figure 06 : Echantillon de graines de la luzerne "*Medicago sativa*".

II.2 Méthodes :

II.2.1 Echantillonnage du sol :

Les échantillons de sol qui ont été réalisés par un simple échantillonnage sont mélangés et homogénéisés à l'arrivée au laboratoire en un seul échantillon à étudier et nous avons réalisé les différents traitements :

- Tamisage sur tamis 2mm ;
- Stockage dans un sachet dans le réfrigérateur à 4 ° C en vue de leur conservation et préparation pour les différentes analyses à faire.

✓ **Détermination du PH :**

Le pH est un facteur qui influence directement la plante et leur nutrition d'une façon claire et remarquable. La mesure s'effectue à l'aide d'un pH mètre (Hanna instrument) à électrodes et réalisée dans la température du laboratoire (20-25°C) sur une suspension de sol diluée dans un rapport 1/5.

✓ **Détermination de l'humidité :**

L'humidité exprime la teneur en eau du sol, c'est la différence entre le poids avant et après séchage dans l'étuve d'une quantité P1=10g de sol à 105°C pendant 15h. Cette différence des poids P1 et du sol séché P2 est calculée en % par équation :

$$H = (P1 - P2) / P2 \times 100 \text{ (Dominique 2005)}$$

H : Humidité.

P1 : Poids avant séchage.

P2 : Poids après séchage.

✓ **Détermination de la conductivité électrique (La salinité) :**

La salinité et la sécheresse constituent les principales contraintes à la production végétale en Afrique du nord selon Maslin 1974.

La conductivité électrique d'une solution aqueuse du sol peut déterminer sa salinité exprimée en milli siemens (ms/cm).

L'échelle de salure internationale indiquant le degré de salinité de l'échantillon (Tableau 01).

La mesure est réalisée à l'aide d'un conductimètre de terrain (HACH Semon5) nous avons mesuré une solution contenant un volume de sol et cinq volumes d'eau distillée, La solution est homogénéisée pendant 30min et décantée pendant 48 heures. La température ambiante du laboratoire est (25°C) recommandée par Dominique 2005.

Tableau 02: Echelle internationale de la salinité du sol

| Salinité (ECe : mS/cm) | Salinité du sol | Réponses des plantes |
|------------------------|------------------|--|
| 0 à 2 | Nom salé | Pas l'impact sur la croissance des plantes. |
| 2 à 4 | Légèrement salé | la croissance des plantes sensibles peut être réduite. |
| 4 à 8 | moyennement salé | la croissance de plusieurs plantes est réduite. |
| 8 à 16 | Salé | Bonne croissance des plantes tolérantes au sel. |
| >16 | très salé | la croissance des plantes très tolérantes au sel. |

$1\text{S/m}=10^4\text{ uS/cm}=10\text{mS/cm}=10^3\text{ mS/m}$ (normalisation française, afnor, 1986).

II.2.2 Isolement et purification des isolats bactériens récoltés *in-nature*:

II.2.2.1 Collection des nodosités :

La collecte des nodules est faite à partir de *Medicago sativa* récolté *in-nature* ; La collecte est réalisée suivant la

méthode de Vincent (1970) et Somasegaran (1994) qui consiste à :

- ✓ creuser à environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.
- ✓ essayer d'enlever soigneusement le sol lié au niveau des racines en faisant attention à ne pas abîmer les nodules.
- ✓ placer délicatement la plante dans un sachet de plastique et les transporter immédiatement au laboratoire.
- ✓ laver délicatement au laboratoire les racines et les nodules sous l'eau courante.
- ✓ détacher les nodules à 1-2 mm du site d'attache, les rincer, puis les sécher avec du papier filtre (Figure.7).

Les nodosités été utilisée directement pour l'isolement.

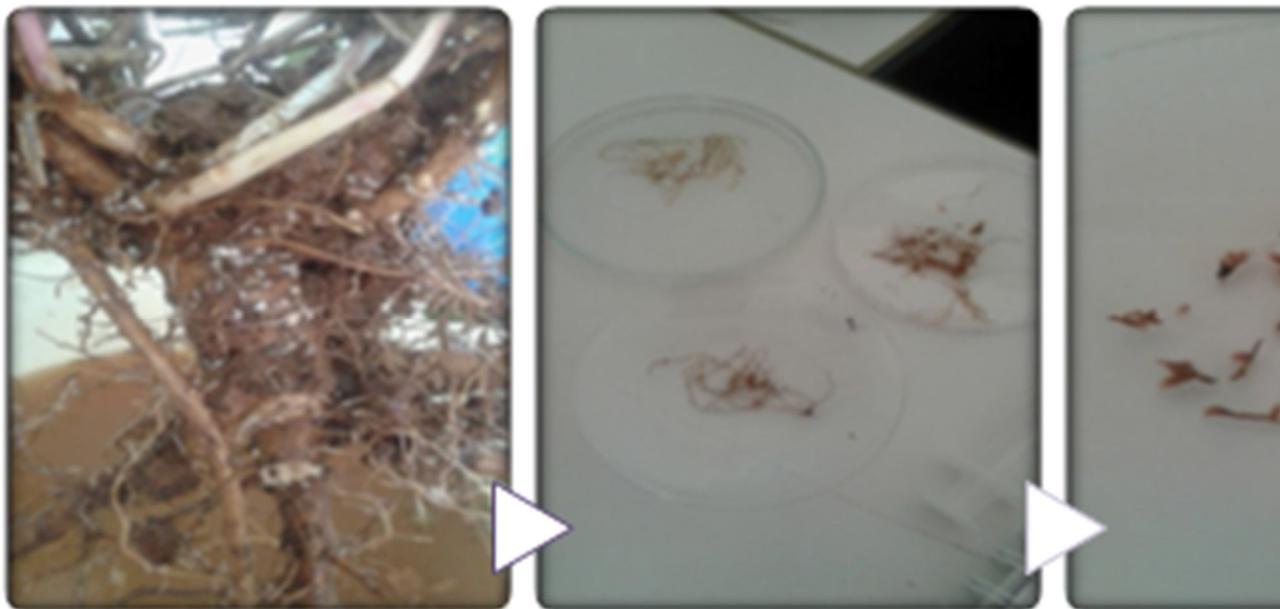


Figure 07: la collection des nodules à partir des racines de *Medicago sativa*

II.2.2.2 Isolement de souches de *Rhizobium*

L'obtention d'une culture pure de *Rhizobium* repose sur son identification au niveau de l'espèce et de la souche. Il n'existe pas de milieu de culture capable de permettre la croissance des *Rhizobium*s et d'exclure les contaminants. Le *Rhizobium* possède seulement à certain nombre de caractéristiques qui sont à la base de tests susceptibles de conduire à l'identification de souches de *Rhizobium*. (J.C Cleyet-Marel, Fao 1989)

L'isolement a été réalisé selon la méthode de Vincent (1970), c'est la technique classique d'isolement de souches de rhizobium à partir des nodosités :

- ✓ Laver les nodosités à l'eau courant pour éliminer les plus grosses particules de sol, puis les sécher entre deux papiers filtre.
- ✓ Immerger très brièvement les nodosités (5-10 secondes) dans l'éthanol à 95%.
- ✓ Puis dans une solution de chlorure de mercure (HgCl_2) à 0,1% (annexe 01) pendant 3-5 minutes pour désinfecter la surface des nodosités, la désinfection est suivie par un rinçage abondant avec de l'eau distillée puis rinçage rapide de chaque nodosité 5 fois et effectuer trois nouveaux rinçages en laissant les nodosités au moins 15 minutes dans chaque récipient pour éliminer les traces de HgCl_2 .
- ✓ Chaque nodosité est écrasée aseptiquement à l'aide d'une pince flambée à l'alcool dans une boîte de pétri

contenant le milieu YEM (Yeast, Extract, Mannitol) puis incubé à 28°C pendant 72 heures voir (fig.08).

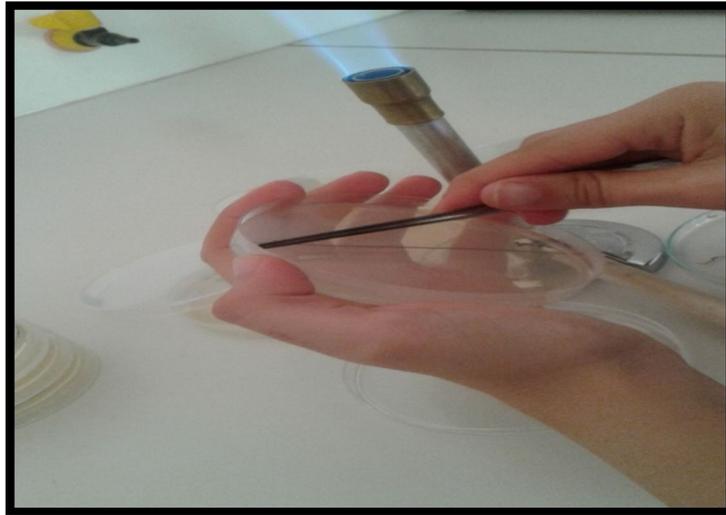


Figure 08: Isolements et écrasements des nodosités sur milieu YEM solide.

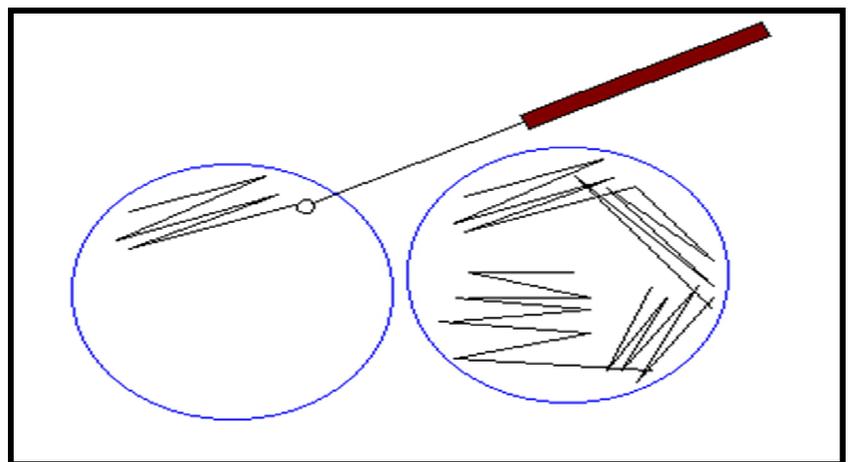
- **Milieu YEM (Vincent., 1970) :**

YEM (Yeast Extract Mannitol) est le milieu utilisé pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (Annexe 01). Le milieu de culture doit contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries. L'autoclavage de milieu se fait à 120°C pendant 20 minutes. Donc le milieu YEM est un milieu utilisé pour la culture des souches de BNL.

II.2.2.3 Purification des isolats

La pureté des isolats est confirmée par observation macroscopique et Observation microscopique après coloration de Gram ce qui permet aussi de vérifier l'homogénéité des cellules. Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les Milieu YEM (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994) ; des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des colonies bien isolées.

La méthode de purification consiste à repiquée sur milieu YEM gélosé et incubée à 28°C pendant 72 heures. Selon la technique de quatre quadrants de manière à isolé de simples colonies (fig.09). L'aspect macroscopique des colonies (couleurs, forme, contour et viscosité) ainsi que l'aspect microscopique des isolats et leur Gram ont été notés (fig.09).



permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries qui sont à Gram négatif et les autres bactéries à Gram positif.

La coloration de Gram doit son nom au médecin danois Hans Christian Gram qui mit au point de protocole en 1884 (Microsoft ®Encarta ® 2006©.1993-2005 Microsoft Corporation. Tous Droits Réservés) (Annexe 02).

II.2.2.4 Conservation des souches :

Les isolats purifiés sont conservés selon les deux procédés :

- ✓ Pour une courte durée, nous les repiquons sur le milieu YEM incliné ; en effectuant des stries régulières sur la surface de leur gélose. Après 48h d'incubation selon les isolats, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4°C, à raison de plusieurs exemplaires par souche selon la méthode de Vincent, (1970). Des repiquages réguliers tous les 6 mois est recommandés.
- ✓ Pour une conservation de longue de durée (jusqu'à 2 ans), les cultures d'isolats ont été transférées dans des Eppendorfs à raison de 0.550 ml de suspension bactérienne de Rhizobium en phase exponentielle additionné de 0.550 ml de glycérol (v/v).

Le mélange homogénéisé a été conservé à -12°C. Dans des conditions optimales, une conservation à -80°C est recommandée.

II.2.3 Etude des paramètres physiologiques :

Les facteurs environnementaux peuvent avoir un effet limitant sur l'établissement de la symbiose entre la légumineuse et les isolats rhizobien. Parmi ces facteurs la température et la salinité ainsi que le pH sont les principales contraintes qui prévalent dans les régions à climat méditerranéen aride et semi-

aride d'où l'intérêt d'utiliser des isolats résistantes (Caravaca *et al.* 2002).

II.2.3.1 Effet de la température :

Afin de déterminer l'effet de la température sur la croissance des isolats, les boîtes de Pétri sont ensemencées par une colonie de chaque isolat et incubées à différentes températures : 4°C, 19°C, 28°C, 37°C et 45°C.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement et la croissance des isolats est évaluée par l'apparition de colonies dans les boîtes de Pétri.

II.2.3.2 Effet du pH :

Le milieu YEM préparé est ajusté à différents pH 3, 5, 7, 9 et 11. Les boîtes de Pétri sont ensemencées par une colonie de chaque isolat de la même façon que pour le test de la température et sont incubées à 28°C. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement et la croissance des isolats est évaluée par l'apparition de colonies dans les boîtes de Pétri.

II.2.3.3 Effet de la salinité :

Ce test permet de sélectionner les isolats microbiennes les plus halotolérantes. L'évaluation De la tolérance au sel est effectuée par la culture des isolats sur milieu YEM gélosé renfermant Des concentrations croissante en Na Cl: 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM. Trois répétitions sont réalisées pour chaque traitement et la croissance des isolats est évaluée Par l'apparition de colonies dans les boites de Pétri.

II.2.4 Etude des paramètres symbiotiques :

II.2.4.1 Test d'infectivité des isolats :

Le test de nodulation est un critère important dans la caractérisation des rhizobia, les isolats extraites des nodosités de *Medicago sativa* ne peuvent être identifiées comme rhizobia qu'après avoir prouvé leur capacité à former des nodosités sur leur plante hôte en conditions bactériologiques contrôlées (Graham *et al.*, 1991).

II.2.4.1.1 Désinfection, germination et mise en culture des plantules de *M. sativa*

Le test est réalisé avec les graines de *Medicago sativa* une variété locale provenant d'une zone semi-aride. Les graines

sont désinfectées à l'eau de javel (12°) pendant 10 min puis rincées 10 fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines restent trempées dans la dernière eau de rinçage durant une heure; les graines sont divisées en quatre boîtes chaque boîte contient 25 graines ; elles sont ensuite récupérées et mises à germer sur eau gélosée à 1% (annexe 06) en boîte de pétri (sans scarification mécanique) dans l'obscurité totale (enveloppées avec du papier aluminium) à température ambiante pendant 2 à 3 jours jusqu'à l'apparition des radicelles. (Fig.10).

II.2.4.1.2 Inoculation des plantules *in-vitro* :

Après germination, les plantules sont transférées dans des tubes de Gibson (de 18 cm longueur, 2 cm diamètre et une capacité de 35 ml) contenant une solution nutritive dépourvue d'azote (Annexe 07) comme préconisé par Rigaut et Puppo (1975), et placée dans une chambre de culture en condition de lumière à 200 lux pendant 14 heures par jour à température ambiante.

Deux jours en injectant dans leur racine 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance en effectuant cinq répétitions par souche et chaque essai comprend un témoin négatif non inoculé. La préparation de l'inoculation a été effectuée à partir de la suspension bactérienne d'une culture sur gélose vers le milieu liquide (Fig.10). Nous avons comparés et

évalués par le standard de turbidité de Mc Farland indice 1 (avec une densité approximative correspondante à 3.10^8 bactéries /ml). La compensation de la quantité d'eau perdue se fait avec de l'eau distillée stérile en alternance avec la solution nutritive (Fig.10).

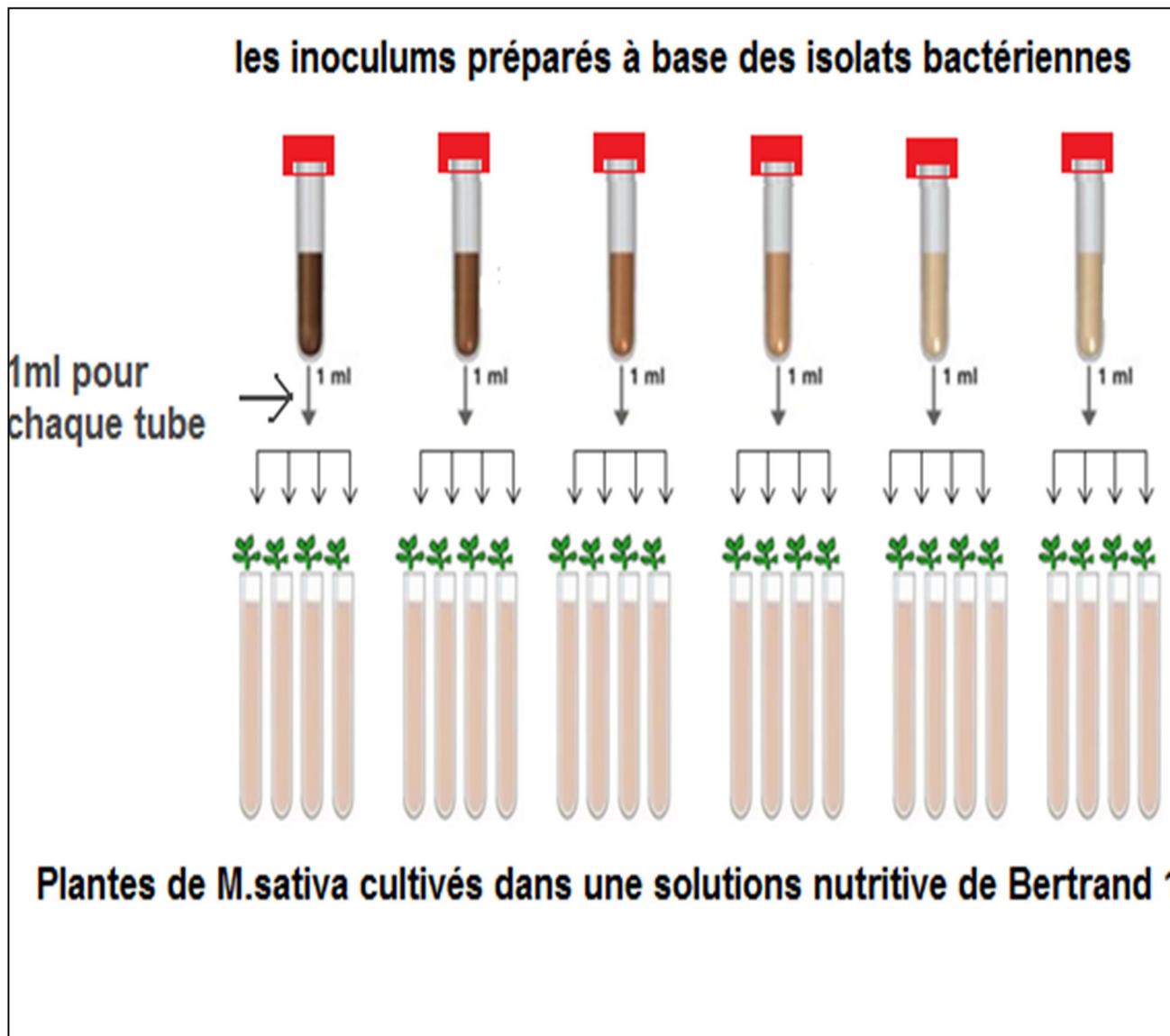


Figure 10 : Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisé *in-vitro*.

II.2.4.2 Estimation de la croissance des plantes *in-nature* et observation du phénotype des plantes inoculées :

L'observation de la couleur verte des plantes inoculées, de leur croissance (parties racinaires et aériennes) en comparaison

aux plantes non inoculées (témoin) dans les mêmes conditions de cultures et déterminer leur couleur et leur forme.



**résultats et
discussion**

III résultats et discussion :

III-1 Analyses de sol :

Les résultats des analyses de sol prélevés de notre zone d'étude Ouled Khaled (Saida) sont mentionnés dans le (tableau 3) :

Tableau 3 : les résultats d'analyses de sol effectuées

| Région | H (%) | PH | Conductivité (ms/cm) |
|----------------------|--------------|-------------|-------------------------|
| Ouled Khaled (Saida) | 12.85 | 7.28 | 2.5 |

✓ L'humidité :

Un excès d'humidité ou une sécheresse prolongée affecte négativement la nodulation et la fixation azotée (Gunasekaran et Balachandar., 2000). Venkateswaralu (1997) a rapporté que la population rhizobienne dans le sol est très faible en saison sèche mais qu'elle retourne à la normale dès les premières pluies.

Une baisse de l'humidité du sol, même passagère, près du point de flétrissement suffit pour arrêter la croissance de façon durable et orienter la morphogénèse racinaire vers la croissance secondaire (en épaisseur). (Raimbault, 2003).

L'humidité de notre sol est 12.85% et c'est un taux obtenu au cours de saison tempérée ce qui explique la forme ramifiée des racines de notre plante *Medicago sativa* adaptée à la sécheresse.

✓ Le pH :

Le résultat de la mesure du pH du sol enregistré est de 7.28, résultat compris entre 6.75 et 7.5. Et d'après Ollier et Foirée (1986) notre prélèvement a été effectué dans un sol neutre.

D'après Somasegaran et Hoben (1994) nos résultats justifient la présence des nodules car le pH optimal Pour les *rhizobia* est variable entre 5.8 et 7.2 en fonction des espèces de *Rhizobium*.

Le processus de fixation de l'azote est influencé par le pH du sol qui affecte les deux partenaires de la symbiose, en général un pH de 6.0 à 7.0 fournit un environnement optimal à l'assimilation pour les légumineuses (Gunasekaran et Balachandar, 2000).

✓ La conductivité

La conductivité électrique des extraits de sol par l'eau est utilisée comme diagnostic de la salinité des sols.

La résultat analytique du sol présenté dans le tableau 1, montrent que notre sol est caractérisé par salinité légère (**CE=2.5 ms/cm**) Selon les normes français réalisées par l'afnor (tableau 3), donc le sol représente un sol un peu salé et bien sur a un effet sur la croissance de plante et en peut considéré notre *Medicago Sp* comme une plante non sensible au sels, car La salinité des sols a un effet négatif à la fois sur le rhizobium, sur la légumineuse hôte et sur la relation symbiotique (Singleton, 1982).

L'effet néfaste du sel est essentiellement dû à l'augmentation de l'osmolarité du milieu environnant la bactérie, cette osmolarité entraine un efflux d'eau entraînant une diminution du volume du cytoplasme. Cette plasmolyse affecte le métabolisme de la cellule et le fonctionnement des macromolécules et finalement conduit à l'arrêt de la croissance (le rudulier, 2005).

III.2 Constitution d'une collection de souches :

L'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires récoltés *in-nature* nous a permis d'obtenir une collection de sept souches (année 2017), (tableau 4) :

Tableau 4 : Isolats bactériens obtenus à partir des nodules récoltés dans la région semi aride (Ouled Khaled, Rebahia, Saida).

| Souches | Origine géographique | Plante d'isolement |
|---------|----------------------|------------------------|
| MM01 | Ouled Khaled | <i>Medicago sativa</i> |
| MM02 | Ouled Khaled | <i>Medicago sativa</i> |

| | | |
|------|--------------|------------------------|
| MM03 | Ouled Khaled | <i>Medicago sativa</i> |
| MM04 | Ouled Khaled | <i>Medicago sativa</i> |
| MM05 | Ouled Khaled | <i>Medicago sativa</i> |
| MM06 | Ouled Khaled | <i>Medicago sativa</i> |
| MM07 | Ouled Khaled | <i>Medicago sativa</i> |

III.3 Etude de la diversité des isolats :

III.3.1 Caractéristiques morphologiques :

III.3.1.1 Caractéristiques macroscopiques :

Toutes les souches purifiées présentent les caractéristiques morphologiques de rhizobia (Dommergues et Mangenot, 1970), Après incubation pendant 48h-72h à 28°C sur milieu YEM gélosé, les colonies sont apparues homogènes circulaires à contour régulier, de surface lisse, bombées, brillantes, de couleur blanchâtre ou crème et d'une viscosité qui augmente avec le temps, Cette viscosité est due à une production massive d'exopolysaccharide (Zahran, 1994) (fig.11).

Ces résultats sont en accords avec ceux décrits par De Lajudie, (2004). La croissance sur le YEM solide chez la plupart des souches est plus lente par rapport à la croissance sur milieu YEM liquide. Sur milieu YEM gélosé, les bactéries sont sous condition d'aérobiose réduit, ce qui ralentit leur développement (tableau 5); par contre sur milieu liquide, l'aérobiose améliorée par l'agitation, réduit le temps de croissance.



Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies de rhizobia après sa culture sur milieu YEM solide à 28°C.

Tableau 5: caractéristiques macroscopiques des cultures des souches autochtones isolées de *Medicago sativa*.

| Caractères | Aspect | Couleur | forme | contour | Diamètre (mm) |
|------------|--------|---------|-------|---------|---------------|
|------------|--------|---------|-------|---------|---------------|

| | | | | | |
|------|-------|----------------------------|------------|----------|-----|
| MM01 | lisse | Beige à centre opaque | circulaire | régulier | 2-3 |
| MM02 | lisse | Blanchâtre à centre opaque | circulaire | régulier | 2-3 |
| MM03 | lisse | Blanchâtre à centre opaque | circulaire | régulier | 1-2 |
| MM04 | lisse | Blanchâtre à centre opaque | circulaire | régulier | 1-2 |
| MM05 | lisse | Beige à centre opaque | circulaire | régulier | 2-3 |
| MM06 | lisse | Blanchâtre à centre opaque | circulaire | régulier | 2-3 |
| MM07 | lisse | Blanchâtre à centre opaque | circulaire | régulier | 1-2 |

III.3.2 caractéristiques microscopiques :

L'aspect microscopique des isolats est visualisé après la coloration de Gram dont il montrée que les différents isolats présentent une forme coccobacillaire à bacilles de couleur rose (Gram-), ce qui confirme la pureté de nos isolats (Fig.12). Les caractères morphologique observés correspondent à ceux décrits pour les Rhizobiums (Vincent, 1970; Dommergues et Mangenot, 1971 ; Jordan, 1984;De Lajudie et al, 1994; Rome et al ,1996). Néanmoins ces observations restes insuffisantes pour déterminer la position taxonomique exacte des isolats.

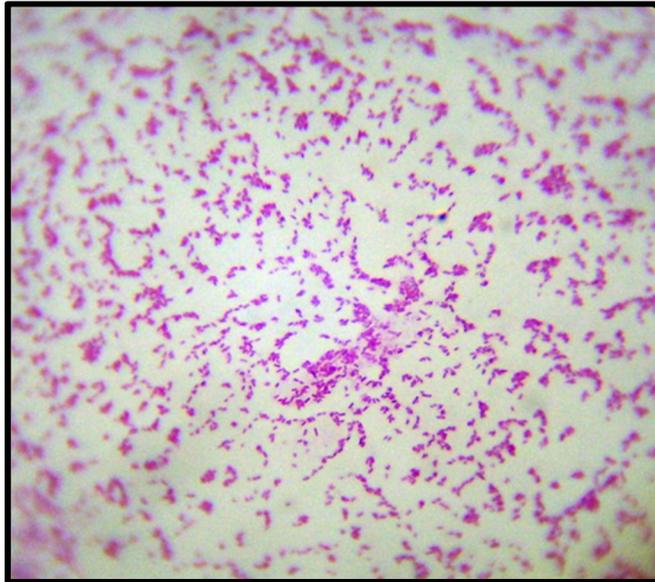


Figure 12 : Aspect microscopique d'une souche rhizobienne isolées après coloration de Gram **Gr x1000**.

III.4 Effet des différents facteurs sur la croissance des isolats :

Il est rapporté que les facteurs environnementaux tels que la température, le pH, et la salinité sont des facteurs limitant le développement des deux partenaires de la symbiose. (Zahran, 1999 ; Priefer *et al.* 2001 ; Chimining'wa et Vessey, 2006 ; Brigido *et al.* 2007 ; Ouslim *et al.* 2015). Afin d'assurer l'établissement de la symbiose dans les conditions naturelles, il est nécessaire de sélectionner des isolats résistants aux différents facteurs environnementaux (température, pH, salinité).

III. 4.1 Effet de la température sur la croissance des isolats :

Ce test a été effectué afin de déterminer la croissance des isolats à différentes températures, et de ce fait sélectionner ceux qui présentent une croissance à des températures extrêmes.

- Les résultats de l'effet de la température sur la croissance des isolats rhizobiennes sont consignés dans le (tableau 6).
 - Il en ressort que tous les isolats présentent une meilleure croissance à 28 °C, qui représente la température de croissance optimale des rhizobia (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Dommergues *et al.*1999).
 - A l'exception des isolats **MM03**, **MM04** et **MM05**, aucune croissance n'est signalée à 4 °C pour tous les isolats puisque c'est une température de conservation.
 - A 19 °C seules les deux isolats **MM03** et **MM07** qui présentent un peu de croissance, et la meilleure croissance est observée chez les isolats **MM01** et **MM02**.
 - A 37 °C, la croissance est notée chez tous les isolats mais avec un taux variable. Elle est meilleure pour les isolats **MM02**, **MM07** et modérée à faible pour les isolats **MM01**, **MM03**, **MM04**, **MM05**, **MM06**.
 - A 45°C la croissance est affectée pour les isolats **MM01**, **MM02**, **MM03**, **MM04**, **MM06**, **MM07** mais totalement inhibées pour les isolats **MM05**



A

B



Figure 13 : Aspect morphologique des isolats sur milieu YEM à différentes températures.

A : incubation à 19 °C. B : incubation à 04 °C.

L'appréciation de la croissance a été effectuée à différentes températures, pour déterminer le seuil de tolérance aux diverses températures sur milieu YEM liquide et solide (Fig.13). La croissance est estimée par la présence de trouble sur le milieu liquide et présente des colonies sur le milieu solide, les résultats obtenus sont présentés dans le (tableau 6) :

Tableau 6 : Effet des diverses températures sur la croissance des isolats de *Medicago sativa*.

MM0 MM0 MM0 MM0 MM0 MM0 MM0

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|
| 4°C | Solide | - | - | | + | ± | | - |
| | liquide | ± | ± | + | - | ± | ± | ± |
| 19°C | Solide | + | ± | | - | - | | |
| | liquide | ± | ± | + | + | + | + | + |
| 28°C | Solide | ± | ++ | + | | | | + |
| | liquide | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 37°C | Solide | ++ | ++ | + | | | + | + |
| | liquide | + | | | + | + | + | ++ |
| 45°C | Solide | ++ | | ++ | | | - | - |
| | liquide | ++ | ± | + | ± | - | - | + |

- ++ : Très bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)
- +: Bonne croissance (diamètre = 2 mm)
- ± : Croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)
- : Absence de croissance

Nous remarquons que toutes les souches présentent une croissance plus ou moins importante avec une variabilité selon les différentes souches. La totalité des souches de l'amas nodulaire et la plupart des autres souches tolèrent des températures variant de 4 à

45°C. Les souches **MM01**, **MM02**, **MM06** et **MM07** ne présentent aucun développement à des températures 4°C sur le milieu YEM solide. Certaines souches sont bien adaptées pour la nodulation à des basses températures (Prevost, Drouin *et al*, 2003).

Certaines souches ne peuvent pas tolérer des températures supérieures à 37°C sur le milieu YEM solide, c'est le cas de souches telles que **MM05** et **MM06**. Il résulte de ce test que la majorité des souches de Ouled Khaled présentent une bonne thermo tolérance tant aux basses qu'aux hautes températures.

Toutes les souches provenant de site d'Ouled Khaled présentent une bonne croissance à des températures situées entre 28°C et 37°C. Selon Graham (1992) certains espèces de rhizobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28°C.

Les températures élevées peuvent mener à la réduction du nombre de cellules au dessous du niveau demandé pour une bonne nodulation (Somasegaran, Reyes *et al*. (1984)).

Les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermorésistante est probablement liée à la capacité des bactéries a survivre dans des périodes chaudes (Räzänen, 2002).

III. 4.2 Effet de PH sur la croissance des isolats

Ce test permet de déterminer le pH optimal de croissance des différents isolats, ainsi que les pH extrêmes auxquels ils peuvent croître. (Tableau 7) :

Tableau 7 : Effet des différents pH sur la croissance des isolats.

| | MM01 | MM02 | MM03 | MM04 | MM05 | MM06 | MM07 |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PH=3 | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|
| PH=5 | ± | ± | ++ | + | - | - | + |
| PH=7 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PH=9 | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PH=11 | ++ | - | + | ± | + | ± | - |

++ : Très bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)

+: Bonne croissance (diamètre = 2 mm)

± : Croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)

- : Absence de croissance

D'après le tableau 7 et la figure 14, tous les isolats présentent une absence de croissance dans le pH de 3. Les isolats **MM01**, **MM03** présente également une bonne croissance dans l'intervalle de pH de 5 à 11. Les autres isolats présentent une bonne croissance dans un pH qui se situ entre 7 et 11. Les isolats **MM05**, **MM06** présentent une absence de croissance dans le pH 5.



Figure 14 : Aspect morphologique des isolats sur milieu YEM à différents pH.

A : pH = 3. B : pH=5.

Il est rapporté que le pH optimal de croissance des rhizobias est compris entre 6 et 7 (Singleton, 1999 ; Young *et al.* 2001), alors que celui de nos isolats se situe dans l'intervalle de 7 à 11 pour la plupart des isolats (Tab.7). Selon Beunard (2007), la croissance des isolats à cette gamme de pH au laboratoire ne signifie pas forcément que ces isolats peuvent croître à des pH aussi basique (pH 11) dans la nature.

Nos résultats sont en accord avec les travaux d'Ouslim *et al.* (2015) qui ont rapporté que les isolats de rhizobium isolés de la luzerne peuvent tolérer un pH modérément alcalin (pH 9-11). (Tableau7)

III.4.3 Effet de la salinité sur la croissance des isolats :

La salinité réduit la survie et la distribution des rhizobias dans le sol et la rhizosphère (Tate, 1995 ; Jenkins *et al.* 1989), elle affect également le processus de nodulation ainsi que la fixation symbiotique de l'azote (El-Sheikh et Wood, 1995), Néanmoins, cet effet diffère selon que les isolats de rhizobia présentes dans le sol sont sensibles ou tolérantes au sel (Kumar *et al.* 1999).

Afin de sélectionner les isolats les plus tolérants à la salinité et pour déterminer le seuil de tolérance de nos isolats vis-à-vis du NaCl, nous les avons cultivés sur milieu YEM avec différentes concentrations de NaCl, (tableau 8) :

Tableau 8 : Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des isolats.

| | MM01 | MM02 | MM03 | MM04 | MM05 | MM06 | MM07 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| 200mM | ++ | ++ | + | + | + | ++ | ++ |
| 400mM | + | ++ | ++ | + | + | + | + |
| 600mM | + | ± | ± | ± | ± | ± | + |
| 800mM | - | - | + | + | - | - | - |

++ : Très bonne croissance (diamètre de colonie ≥ 2 mm)

+: Bonne croissance (diamètre = 2 mm)

± : Croissance moyenne (diamètre de colonie ≤ 2 mm)

- : Absence de croissance

D'après le tableau 8, les isolats peuvent tolérer des concentrations de NaCl allant du 200 mM jusqu'à 600mM mais avec un taux variable. En présence de 800 mM de NaCl, la croissance de la majorité des isolats est inhibée à l'exception de celle des isolats **MM03**, **MM04** qui ont pu tolérer cette concentration (fig.15).

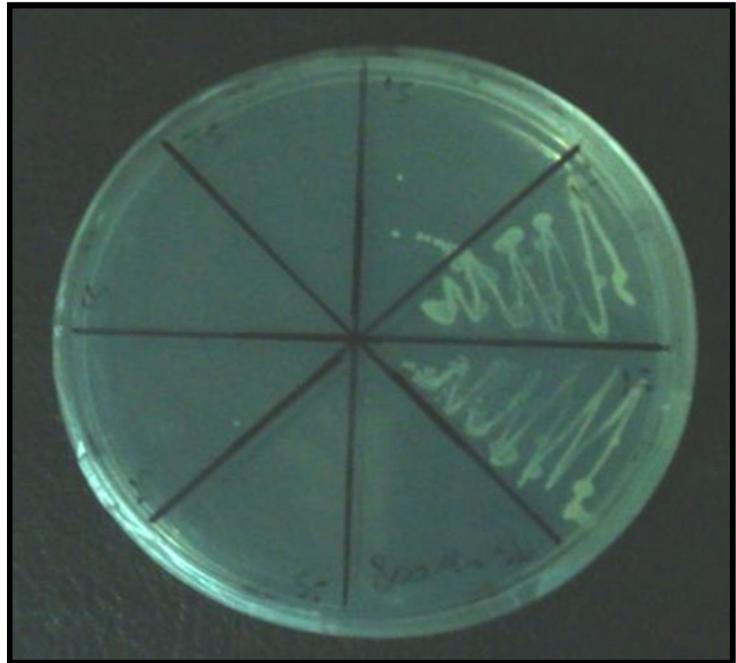


Figure 15 : Aspect morphologique des isolats sur milieu YEM contenant de 800mM de NaCl.

Malgré la provenance des différents isolats de la même plante hôte, leur réaction vis-à-vis du sel diffère. Cette variabilité s'observe non seulement entre deux espèces différentes de rhizobium mais aussi entre deux isolats d'une même espèce isolés à partir d'une même plante hôte (Bekki, 1983). Serraj *et al.* (2004) ont montré que la sensibilité des isolats de rhizobium à la salinité varie d'un isolat à l'autre.

La vitesse de croissance des rhizobias intervient dans la tolérance à la salinité, El-Sheikh et Wood (1995) ont observé que des souches de rhizobia isolées du pois chiche et à croissance rapide sur milieu de culture, étaient plus tolérantes à la salinité que celles à croissance lente. Ce qui peut expliquer la tolérance de nos isolats à de forte

concentration de sel à savoir que les isolats **MM03** et **MM04** présentent une croissance rapide. (Fig.15)

Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par Merabet *et al.* 2006 qui ont observé que certaines souches isolées du *M. ciliaris* et *M. polymorpha* peuvent tolérer des concentrations de 800 mM de NaCl.

Quoique cette tolérance reste faible comparant à des souches rhizobiennes isolées d'*Acacia saligna* qui ont tolérer une concentration jusqu'à 1000 mM de NaCl (Amrani *et al.* 2012).

III.5 Etude symbiotique :

III.5.1 Etude des inoculations des plantes *in-vitro* :

III.5.1.1 Germination de graines :

Dans notre travail nous avons préféré la méthode de désinfection des graines à l'eau de javel selon la méthode utilisée par (Tillard et Drevon, 1988), le taux de germination est de 75 % (figure 16). Malgré que le taux de germination des graines de *Medicago sativa* suite à la méthode de scarification mécanique (Dahmani, 1989 ; Bekki, 1997) est la plus utilisé. La méthode choisie reste pratique car la taille des graines de *Medicago sativa* est très petite pour la scarification mécanique.



Figure16: Germination des graines de *Medicago sativa*

III.5.1.2 Test de nodulation :

Le test de nodulation montre la capacité des souches à réinfecter

leur plante d'origine (Hungria, Johnston *et al.*1991; Murray, Thrall *et al.* 2001; Thrall, Burdon *et al.*2000). L'infectivité des souches isolées a été testée sur leur même plante d'isolement (*Medicago sativa*), l'essai a été réalisé *in-vitro* en tube Gibson (Gibson, 1980) contenant une solution nutritive pour les plantes (Bertrand, 1997) en condition bactériologique, avec cinq répétition par souche et un témoin non inoculé.

Ce test a été effectué afin d'évaluer la diversité des souches de rhizobium par leur potentiel infectieux et fixateur et afin de repérer les souches les plus efficaces.

La capacité symbiotique d'une souche de *Rhizobium* est évaluée par deux paramètres :

Son infectivité et son efficacité. L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodules formés sur la racine de chaque plante. L'efficacité est estimée par la détermination du pourcentage de gain en matière sèche de la partie aérienne des plantes inoculées (El Hilali, 2006)

L'expérience a été réalisée *in-vitro* pour permettre le bon développement du système racinaire et pour évaluer la capacité de nos souches de former des nodules sur les racines des différents échantillons de *Medicago sativa* prélevés dans les deux régions de l'Ouest algérienne de Saida.

L'inoculation de nos isolats avec leur légumineuse d'origine nous permet de vérifier leur appartenance aux bactéries nodulant les légumineuses (BNL), ceci a été montré par la formation des nodules sur les racines de la légumineuse hôte d'origine. Nous avons testées l'infectivité des souches suivantes (**MM01, MM02, MM03, MM04, M005, MM06, MM07**).

Cinq souches ont été réussies à infecter les racines parmi les sept souches testées et à former des nodules appart les souches **MM03, MM05**. Le temps d'apparition des premiers nodules sur les racines est différent selon les souches bactériennes. En effet, les isolats **MM01, MM04**, ont provoqué une nodulation quatre semaines après l'inoculation des plantes alors que pour le reste (**MM02, MM05, MM06** et **MM07**) des isolats, la nodulation n'est apparue que la cinquième semaine, voire la sixième semaine (Fig.17).

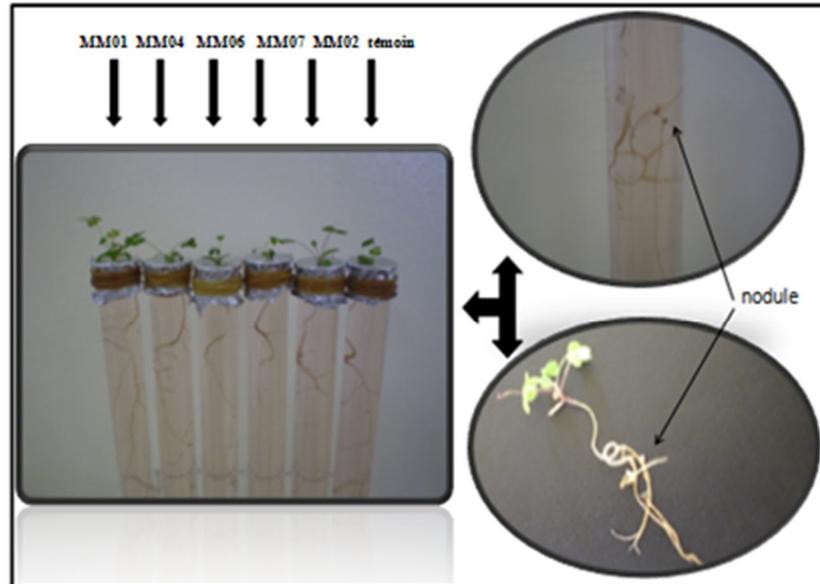


Figure17 : Croissance *in vitro* des plantes de *Medicago sativa* inoculées avec les isolats bactériens et témoin non inoculée.

La croissance des plantes s'est déroulée correctement. La partie aérienne est développée avec des feuilles vertes et de taille importante, la partie racinaire présente une stimulation même en absence des nodules.

Les nodosités obtenues sont de forme indéterminée indiquant la présence d'une zone méristématique à croissances continue (Vasse, De Billy *et al.* 1990) (Fig.9). Cette forme est typique de la luzerne (Duhoux et Nicole, 2004). Quelques nodules avaient une couleur rose qui indique leur richesse en leghémoglobine composé indispensable à la fixation de l'azote (Blondeau, 1981).

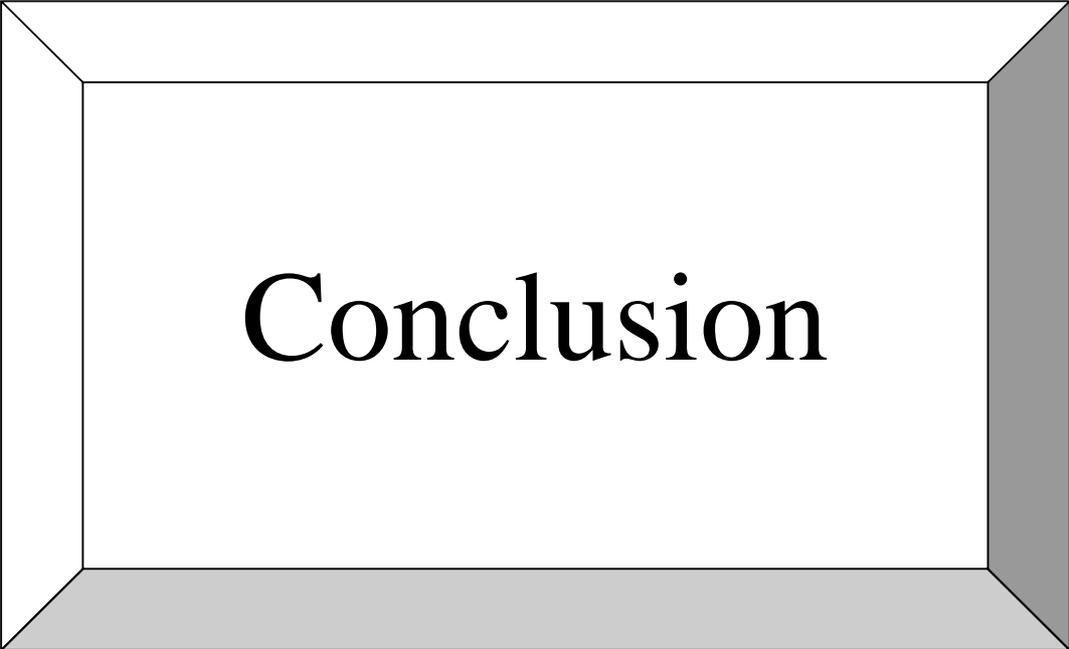
Les résultats du test de nodulation, nous ont permis de regrouper nos souches avec le groupe des rhizobiums nodulant *Medicago* en général comme démontré par les résultats obtenus Par De Lajudie, Willems *et al.* (1994) ; Young, Kuykendall *et al.*, (2003) ; les rhizobiums identifiés jusqu'à présent comme microsymbiotes des *Medicago* appartenant au genre *Ensifer* (*Sinorhizobium*).

L'évaluation de la symbiose *in vitro* après 35 jours d'inoculation a montré que la plupart des souches testées ont favorisé

la nodulation par rapport au témoin non inoculé (aucun nodule), mais à des degrés divers (Tableau 9). Les nodules obtenus sont presque de la même taille, de couleur rose (dû à la présence de la léghémoglobine), signe d'une efficacité des isolats (Vincent., 1970).

Tableau 9 : Résultats du test de nodulation réalisé avec les souches.

| Souches | Couleur des nodules | Taille des nodules | Couleur des feuilles de <i>M. sativa</i> |
|---------|---------------------|--------------------|--|
| MM01 | Rose | Grande | Verte |
| MM03 | R.A.S | R.A.S | R.A.S |
| MM05 | R.A.S | R.A.S | R.A.S |
| MM02 | Blanche | Moyenne | Verte, jaune |
| MM04 | Blanche | petit | Vert |
| MM06 | Rose | Moyenne | Verte |
| MM07 | Rose | Grande | Verte foncé |
| Témoin | Rien | Rien | Verte, jaune |



Conclusion

Conclusion générale et perspectives

L'introduction des inoculums dans le système sol/plante est utilisée pour augmenter le rendement des cultures. Les cultures de rhizobium sont préparées artificiellement et utilisées pour l'enrobage des semences avant le semis. Il est nécessaire de trouver, pour une légumineuse spécifique, une culture de rhizobium particulière disposant d'une capacité importante pour l'infection, la nodulation et la fixation de N₂.

Les possibilités d'application des Biotechnologies (biofertilisants) pour le développement durable, l'utilisation des ressources renouvelables (azote atmosphérique) et l'économie de l'environnement. Basé sur l'exploitation raisonnables des interactions plante-microorganisme indigène et sa valorisation afin d'assurer un développement durable en respectant la sélection et le choix naturel.

Notre étude nous a permis de disposer d'une collection de 5 isolats issus des nodosités fraîches a été construite. Tous ces isolats ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique. Tous les isolats sont des bactéries à Gram négatifs, en forme de bâtonnets, aérobies et à croissance rapide sur milieu YEM .

Les souches sont pures et des précautions strictes doivent être prises pour les conservées sur le milieu YEM solide incliné et dans du glycérol à 60%.

Ainsi, nous avons évalué la tolérance de toutes les souches de la collection vis-à-vis de température extrêmes. C'est l'effet de la température qui a permis une distinction entre les différentes souches

et leurs sites de collecte. En effet, la température optimale de croissance varie de 28°C à 37°C alors que la température maximale observée varie de 37°C à 45°C.

Ces isolats ont été authentifiés par inoculation des plantules de *Medicago sativa* cultivées *in-vitro*. Les résultats analysés après 35 jours d'inoculation ont montré que la plupart des souches testées ont favorisé la nodulation par rapport au témoin non inoculé (le test est en cours pour l'évaluation d'inoculation après 2-3 mois).

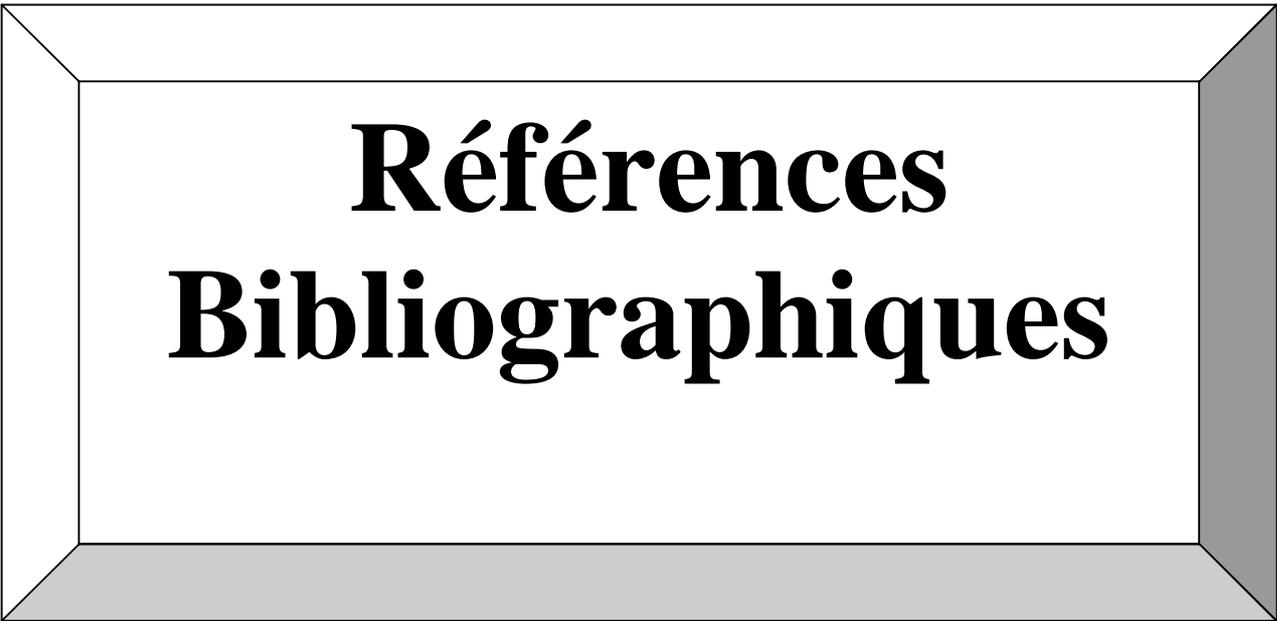
Les tests d'inoculation ont à nouveau confirmé la particularité de ces souches. En effet, elles ont la capacité après une quatre semaine d'inoculation de former des nodosités fixatrices sur les racines de *Medicago sativa* des régions semi-aride d'Algérie (Saida).

L'étude dégage aussi des perspectives afin de vérifier la variabilité des Rhizobiums et d'appréhender l'efficacité (adaptabilité et compétitivité des souches) de la symbiose Rhizobium-*Medicago Sp.* en milieu naturel :

- L'isolement, la caractérisation et la valorisation des souches bactériennes locales à haut pouvoir fixateur d'azote pour enrichir la collection de souches de rhizobia de Saida.
- Enrichir la collection de souches de rhizobia d'Algérie.
- Sélection et préparation des inoculums (biofertilisant) Rhizobiens.

- Une étude plus approfondie sur les interactions entre les micro-organismes de la rhizosphère et en association avec les légumineuses.
- Le transfert des expérimentations aux champs en matière de production d'inoculum à base de souches performantes autochtones. (Test de leur efficacité à l'échelle pilote, en pépinière et dans des parcelles d'expérimentation)
- Promouvoir et création des pépinières de production d'inoculum biologique.
- chargé d'étudier la biodiversité et l'écologie des rhizobia ou BNL (Bactérie nodulants les légumineuses) chez, les rhizobia des Medics et des autres petites légumineuses d'intérêt.
- Constitution d'une collection de souches provenant de diverses légumineuses endémiques. et répertoires des souches dans une banque de donnée et référenciés dans une collection de l'université de saïda.
- Mise au point des techniques de biologie moléculaire.

Valorisation des ressources végétales naturelles en Algérie pour contribuer au développement, à l'amélioration de la sécurité alimentaire et de l'environnement par le biais de l'accroissement de la production végétale en respectant la stabilité environnementale pour le développement d'une agriculture biologique durable.



**Références
Bibliographiques**

Références Bibliographiques

ACTA. (1984)- Fiche de l'Association de Coordination Technique Agricole, ACTA, 1984. Fiche N° 402.

- Affianha T, Alexander D. 1992. Defference among cowpea, rhizobia intolerance to high temperature and dissication in soil. Applied and environmental Microbiologie. 43 : 435 –439.
- Albrecht C, Geurts R, Bisseling T. 1999 Legume nodulation and mycorrhizae formation. EMBOJ., 18 (2) : 281-288.
- Alkama N., Nouredine N.E., Haddadj A., Sadji H., Issad S., Amrani S., 2002. La pratique de l'inoculation en agriculture et en foresterie : une biotechnologie à notre portée-communication orale présentée au 2eme congrès de Biotechnologie. Tunisie.
- ANONYME I.(2001)- Cinquième conférence des états parties chargée de l'examen de la convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques (biologiques) ou aux toxines et sur leur destruction. BWC/CONF.V/4, 14 Sep 2001.
- BARAIBAR A.(2000)- Rhizobium inoculants formulations, field performance and inoculation procedures.
- Berrada H, Benbrahim K F. 2014. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. British Microbiology Research Journal. 4 : 616-639.
- BIROUK A., BOUIZGAREN A. et BAYA B. (1997)- La luzerne (*Medicago sativa* L.). In: Production et utilisation des cultures fourragères au Maroc, Edition JARITZ G. et BOUNEJMATE M., 1997. INRA., Maroc, 1997, p. 126 -139.
- Biswas B, Gresshoff P M. 2014. The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels. International Journal of Molecular Sciences. 15 : 7380-7397.
- BONCIARELLI F. (1992)- Il ruolo agronomica dell'erba medica. Proc. X Int. Conférence EUCARPIA, lodi, p.33 -39.
- Bordeleau Phymprotecron. 70 : 1-41. L M. 1989. Potentiel du Rhizobim comme agent de lutte biologique.
- Brockwell J. 1982 .Inoculation methods for field experimenters and farmers In Nitrogen Fixation in Legumes. Ed J M Vincent, pp 211-227. Academic Press, Sydney. Burton J C. 1981. Rhizobium inoculants for developing countries. Tropical Agriculture (Trinidad), 58 : 291–295.
- Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. 1991. Plant genetic control of nodulation. Annual Reviews in Microbiology. 45 : 345-382.

- CRUTZEN P.J., MOSIER A.R., SMITH K.A. et WINIWARTER W. (2007)- N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys. Discuss*, p.11191- 11205, 7p.
- CRONK Q., OJEDA I. et PENNINGTON R.T. (2006)- Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* 9: 99-103.
- Dommergues Y, Mangenot F. 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cie édit.
- Paris. pp 796.
- Dommergues Y, Duhoux E, Diem H G. 1999. *Les arbres fixateurs d'azote*, Paris, ORSTOM et Rome, FAO, Montpellier, Espaces 34, 501 p.
- Frank B. 1889. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges.* 7 : 332–346.
- FREIBERG C., FELLAY R., BAIROCH A., BROUGHTON W.J., ROSENTHAL A. et PERRET X. (1997)-Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. *Nature* 387, 394-401.
- Gage D J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68 : 280-300.
- GUIGNARD J.L. et DUPONT F. (2005)- *Botanique*, 13ème Edition Masson
- GRAHAM P.H. et VANCE C.P. (2003)- Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, 131, 872-877.
- GRAMA B. S. (2008)- Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Mémoire de Magistère en génétique et amélioration des plantes ; Université Mentouri Constantine.
- Graham P.H., 2008. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Dilworth M.J, James E.K., Sprent J.L., Newton W.E.(Eds): *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Springer, 23-43.
- Heller R, Esnart R, Lance C. 1989. *Physiologie végétale*. 4ème Edition Masson, Paris
- HOPKINS W.G. (2003)- *Physiologie végétale ; Université des Sciences et Technologie de Lille*, Edition de boeck, p. 99-119.
- Jordan D C. 1984. Family III Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by. Krieg N R and Holt J G. Baltimore : Williams and Wilkins Co. pp 234–242.
- JUDD W.S., CAMPBELL C.S., JULES BOUHARMONT., KELLOGG E.A. et STEVENS P. (2001)- *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*, Edition de boeck.
- KAPE R., PARNISKE M. et WERNER D. (1991)- Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol.* 57, p.316-319.

- Kloepper J W, Leong J, Teintze M, Schroth M N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 286 : 885–886
- Kulkarni S, Surange S. et Nautiyal C. S. 2000 Crossing the limits of Rhizobium existence in extreme conditions. *Curr. Microbiol.* 41: 402-409 pp.
- Kulkarni M J, Prasad T G, Sashidhar V R. 2000. Genotypic variation in 'early warning signals' from roots in drying soil: intrinsic differences in ABA synthesising capacity rather than root density determines total ABA 'message' in cowpea (*Vigna unguiculata*L.). *Annals of Applied Biology*. 136 : 267-272.
- Kundu S, Trent JT, Hargrove M S. 2003. Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci*, 8:387–393
- LAPEYRONIE A. (1982)- Les productions fourragères méditerranéennes, Edition G-P. Maisonneuve et Larose., Paris, 425 p.
- MARBLE V.L. (1993)-Des fourrages pour Proche-Orient : La luzerne, Etude FAO. Production végétale et protection des plantes 97/1, FAO, Rome, 237 p.
- Mateos P F, Baker D L, Petersen M, Velázquez E, Jiménez-Zurdo J I, Martínez-Molina E, Squartini A, Orgambide G, Hubbell D H, Dazzo F B. 2001. Erosion of root epidermal cell walls by Rhizobium polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the Rhizobium-legume symbiosis. *Can J Microbiol.* 47 : 475-87.
- MATHIEU M. (2003)- Luzerne, Edition France, 11p.
- MUNRO B.D. et SMALL E. (1997)- les légumes du Canada, Edition NRC Research Press, 280p
- Nandasena K, Yates R, Tiwari R, O'Hara G, Howieson J, Ninawi M, Chertkov O, Detter C, Tapia R, Han S, Woyke T, Pitluck S, Nolan M, Land M, Liolios K, Pati A, Copeland A, Kyrpides N, Ivanova N, Goodwin L, Meenakshi U, Reeve W. 2013. Complete genome sequence of *Mesorhizobium ciceri* bv. *biserrulae* type strain (WSM1271T). *Standards in Genomic Sciences*. 9 : 462-472.
- Newcomb W, Sippell D, Peterson R L. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Revue canadienne de botanique*. 57 : 2603-2616.
- PARENT L.E. (1999)- Notes de cours de Fertilisation des sols. Département des sols et de génie agroalimentaire ; Université Laval, Québec In : VILLENEUVE S. (1999)-Fertilisation azotée et utilisation de testes rapides de dosage des nitrate dans la production brocoli. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.).
- Pelmont J. 1993. Bactéries et environnement. Presse Universitaire de Grenoble. p 899.
- POUSSET J. (2003)- Engrais verts et fertilité des sols, 2ème Edition Agridecisions., Paris.

- Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1 et 2). Edition du C.R.N.S. France, p.1170.
- RAVEN P. H., EVERT R. F. et EICHLORN S. E. (2000)- Biologie végétale, 6ème Edition de Boeck , Paris.
- PERRY J.J., STALEX J.T. et LORY S. (2004)-Microbiologie cours et questions de révision, Edition DUNOD., Paris. France.
- PROSPERI J.M., GUY P. et BALFOURIER F. (1995)-La luzerne cultivée ou *Medicago sativa* L. In : Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. BRG. INRA., Paris, p. 155-165
- Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S., 2003. Biologie végétale. Ed. De Boeck université. Paris. 968p.
- ROGER P. (1996)- La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement ? Conférence débat de l'ORSTOM., Paris Xe France.
- Sadowsky M.J., et Graham P.H., 2006. Root and stem nodule bacteria of legumes. In: Dworkin M et Falkow S. (Eds): the prokaryotes: ecophysiology and biochemistry. Springer. pp 817-841.
- SMALL E. et JOMPHE M. (1989)- A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canad. J. Bot.* 67: 3260 – 3294.
- SOLTNER D. (1999)- Les grandes productions végétales, 19ème édition : Sciences et techniques culturales, 464 p.
- SOMASEGARAN P. et HOBEN H.J. (1994)-Handbook for Rhizobia: Methods in legume- Rhizobia technology, 450p. Springer-Verlag., new York.
- 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.
- Sprent J.I., 2001. Nodulation in legumes. Dickerson (Eds). Royal botanical garden. Kew. united Kingdom. 364p.
- TALAMUCCI P. (1994)- Lucerne role in farming systems, technical itineraries and managements for different uses in diverse physical and socio-economic environments. Dans : *Eucarpia/FAO Medicago Meeting : Culture, Exploitation et Sélection de la Luzerne Pérenne pour Différentes Utilisations*, Lusignan (France), 4-8 septembre 1994. Publication FAOREUR Technical Series. 36, p. 6-17.
- Timmers A C, Auriac M C, Truchet G. 1999. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* rearrangements. *Development*. 126 : 3617–3628. interaction in relationship with microtubular cytoskeleton.
- TOURTRE Y., BORDONNEAU M., HENRY M. et TOURTE C. (2005)- Le monde des végétaux, Edition Dunod., Paris.
- Udvardi M K, Day D A. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48 : 493–523.

- VILLAX J. (1963)- La culture des plantes fourragères dans les régions méditerranéennes occidentales. INRA., Rabat, 358 p.
- Vincent J M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford : Blackwell Scientific.
- Wais R J, Keating D H, Long S R. 2002. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiol. 129 : 211-224.
- Wood S M, Newcomb W. 1989. Nodule morphogenesis: The early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. Can J Bot. 67 : 3108-3122
- YOUNG J. M., L. D. KUYKENDALL E. MARTINEZ-ROMERO A. KERR. ET SAWADA H.(2003)-Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Farrand et al.(2003). Int J Syst Evol Microbiol. 53: 1689-1695
- ZAKHIA F., JEDER H., DOMERGUE O., WILLEMS A., CLEYET-MAREL J.C., GILLIS M., DREYFUS B. et DE LAJUDIE P.(2004)-Characterisation of LegumeNodulating Bacteria (BNL) in arid region of Tunisia. Syst. And App. Microbiol., 27: 380-395.
- Zevenhuizen L P T M, Scholten-Koerselman H J. 1979. Surface carbohydrates of *Rhizobium*. I. P-1,2-Glucan. Antonie van Leeuwenhoek. 45 : 165-175.



Annexe

Annexe 1 : Préparation du Milieu YEM (Yeast Extract Mannitol)

Milieu YEM (Yeast Extract Mannitol)

Les ingrédients

Solution Bergen Sen : 100ml

Extrait de levure : 1g

Mannitol : 10g

Eau distillée : 900ml

Solution Bergensen

Kcl 1g

FeCl₃ 0.02g

CaCl 0.53g

NaHPO₄ 4.5g

MgSO₄ 1g

Eau distille 1000ml

La préparation: Peser les constituants précédemment écrits.

Agiter ces constituants jusqu'à l'obtention d'une solution homogénéisée (les mêmes étapes

pour milieu YEM et solution Bergen Sen)

Ajuster le PH a : 6.8 à 7 par CaCo₃.

NB : si en a besoin d'un YEM solide (gélósé) ; on ajout 20g d'Agar Agar avec augmentation de température.

Annexe 2 : Coloration de Gram

Un contrôle supplémentaire par la coloration de Gram permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries qui sont à Gram négatif (comme les rhizobia) et les autres bactéries à Gram positif. La coloration de Gram doit son nom au

médecin danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884.

Les étapes du protocole sont les suivantes :

Les cellules sont fixées à la flamme. Ensuite le violet de Gentiane est ajouté (1-2 min).

Les bactéries se colorent alors en violet. Le colorant est par la suite fixé à l'aide du lugol (iodure

de potassium (2 x 30 sec). La préparation est abondamment rincée à l'eau distillée afin

d'évacuer l'excès de colorant. La préparation est décolorée (éthanol 95 %, 5 sec) et rincée de nouveau abondamment à l'eau distillée. Puis, une deuxième coloration avec de la fuschine ou safranine est réalisée (1-2min). De nouveau, la préparation est rincée à l'eau et séchée à

température ambiante. L'observation microscopique au grossissement X1000 avec huile à

immersion permet de voir si les cellules sont colorées en violet (Gram-positif) ou bien en rose

(Gram -négatif).

Annexe 3 : Préparation du HgCl₂

HgCl₂.....0,1g

Eau distillée99,9ml
Agitation des constituants jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

Annexe 4 : Préparation du glycérol 60%

Glycérol.....60ml
Eau distillée.....40ml
Agitation des constituants jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

Annexe 5 : Préparation de l'eau physiologique NaCl à 0,9 %

NaCl.....9g
Eau distillée.....1000ml
La solution est stérilisée par l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 6 : Préparation du milieu Eau gélosé 1%

Agar-agar1g
Eau distillée.....100ml
Ce milieu est autoclaves pendant 20 minutes à 120°C.

Annexe 7 : Solution nutritive de Bertrand (1997)

KH₂PO₄ (solution à 13,609 g/L).....1ml
KCl (solution à 223,645 g/L).....1ml
CaCl₂ (H₂O) 2 (solution à 294,04 g/L).....1ml
MgSO₄ (H₂O) 7 (solution à 246,48 g/L).....1m

| | | |
|--|---|---|
| Solution des micro-élément.....0,04 ml | } | H ₃ BrO ₄6, 25 g/l |
| | | MgSO ₄ (H ₂ O).....25 g /l |
| | | ZrSO ₄ (H ₂ O).....6, 25g/l |
| | | CuSO ₄ (H ₂ O) ₅6, 25g/l |
| | | Na MOO ₄ (H ₂ O) ₂0,625g/l |

Séquestréne de Fer (solution à 16,6g/l).....1ml .
Ajouter le CaCo 3(1g/L) pour ajuster le pH à 7.
Eau distilléeqsp1000ml.

Annexe 8 : les tableaux

1-Standards de turbidité Mc Farland

| Standard de turbidité numéro | Dihydrate de chlorure de Baryum (1,175%), en ml | Acide sulfurique (1%), en ml | Densité approximative correspondante de bactéries/ml |
|------------------------------|---|------------------------------|--|
| 1 | 0,1 | 9,9 | 3.10^8 |
| 2 | 0,2 | 9,8 | 6.10^8 |
| 3 | 0,3 | 9,7 | 9.10^8 |
| 4 | 0,4 | 9,6 | 12.10^8 |
| 5 | 0,5 | 9,5 | 15.10^8 |
| 6 | 0,6 | 9,4 | 18.10^8 |