

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

EN MICROBIOLOGIE

Option: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THEME

Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris* L.) fixatrices d'azote.

Presentée par M^{elle} Dahbia CHERIET

Directeur de thèse : M. CHEKIREB Djamel

Professeur Université d'Annaba

Membres du Jury :

Présidente : M^{me} GACEMI-KIRANE Djamila

Professeur Université d'Annaba

Examineurs : M^{me} AOUN Leila

Professeur Université d'El -Taref

M. MECHAI Abdelbassat

Maître de Conférences Université de Tebessa

M. MERAD Tarek

Maître de Conférences Université d'Annaba

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier Madame **OUARTSI Akila**, Maître de Conférences à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba d'avoir dirigé cette thèse de Doctorat. Ses conseils sur la méthodologie et le suivi dont elle a fait durant toute la période de manipulations m'ont été d'un grand bénéfice. Elle a mis à notre disposition les moyens matériels pour travailler dans les meilleures conditions.

Mes remerciements vont s'adresser aussi à Monsieur **CHEKIREB Djamel**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba pour son aide précieuse, ses efforts et ces remarques et critiques bénéfiques pour me diriger vers un esprit scientifique.

Je tiens à remercier infiniment madame **GACEMI-KIRANE Djamil**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, je la remercie aussi pour son soutien tout au long de mon cursus universitaire.

Mes remerciements vont s'adresser à madame **AOUN Leila**, Professeur à l'Université d'El - Taref pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de participer à mon jury de thèse et pour le temps consacré à la lecture de cette thèse.

Mes remerciements à monsieur **MECHAI Abdelbasset**, Maître de Conférences de l'Université de Tebessa, qui me fait l'honneur d'assister à cette soutenance de thèse et d'examiner ce travail, je le remercie également de me consacrer de son temps pour juger ce travail.

Je tiens à remercier infiniment monsieur **MERAD Tarek**, Maître de Conférences de l'université d'Annaba qui ma fait l'honneur d'analyser ce travail, je vous suis particulièrement reconnaissante.

Je tiens à remercier infiniment monsieur **BRANES Zidane**, Professeur et chef de département de Biochimie à l'université Badji Mokhtar Annaba. Il va être difficile en quelques lignes aussi, de décrire à quel point je vous suis reconnaissante pour votre accueil, votre écoute.

Je souhaite également remercier, l'ensemble des personnes à commencer par nos techniciens et techniciennes de laboratoire, qui permettent un formidable environnement de travail que ce soit scientifique ou humain.

Je tiens à remercier mes très chers parents et mes frères.

Sommaire

| | |
|------------------------|---|
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction | 1 |

Chapitre I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|----|
| I. Généralités | 5 |
| I.1 Le cycle de l'azote | 5 |
| I.2 la fixation biologique de l'azote..... | 6 |
| I. 3 Les différentes symbioses fixatrices d'azote chez les plantes | 7 |
| I. 3.1 La symbiose actinorhizienne..... | 8 |
| I. 3.2 Les symbioses avec cyanobactéries | 8 |
| II. Les légumineuses..... | 8 |
| II.1 Généralités sur les légumineuses | 8 |
| II.2 La phylogénie des Légumineuses | 9 |
| II .3 Les Légumineuses fourragères | 10 |
| II .3.1 Le genre <i>Medicago</i> | 10 |
| II .3 .1.1 La distribution géographique du genre <i>Medicago</i> | 11 |
| II .3 .1.2 Les espèces de <i>Medicago</i> annuelles | 11 |
| II.3 1.2.1 La légumineuse <i>Medicago ciliaris</i> (L.) All. | 12 |
| II.3.1.2.1 Généralités | 12 |
| II.3.1.2.1.2 La position systématique | 13 |
| II.3 .1.3 Les espèces <i>Medicago</i> pérennes | 13 |
| II.3 .1.4 Les espèces <i>Medicago</i> arbustives | 13 |
| III. Les rhizobiacées | 14 |
| III.1 Les caractères des rhizobia..... | 14 |
| III.1.1 Caractérisation symbiotique | 14 |
| III.1.2 Caractérisation phénotypique | 15 |
| III.2 La classification actuelle des rhizobia..... | 16 |
| III.2.1 La sous-classe <i>Alpha Proteobacteria</i> | 16 |

| | |
|--|----|
| III.2.1.1 La branche <i>Rhizobium /Ensifer /Shinella /Agrobacterium</i> | 16 |
| III.2.1.2 La branche <i>Mesorhizobium</i> | 18 |
| III.2.1.3 La branche <i>Azorhizobium</i> | 18 |
| III.2.1.4 LA branche <i>Bradyrhizobium</i> | 19 |
| III.2.1.5 La branche <i>Methylobacterium</i> | 19 |
| III.2.1.6 La branche <i>Burkholderia</i> | 19 |
| III.2.2 La sous-classe <i>Beta Proteobacteria</i> | 20 |
| III.2.2.1 D'autres symbionts fixateur d'azote | 20 |
| III.3 La mise en place de la symbiose fixatrice d'azote | 21 |
| IV. L'association symbiotique entre les genres <i>Medicago</i> et leurs microsymbiotes | 27 |
| V. Les bases moléculaires de la symbiose | 28 |
| V.1. Les flavonoïdes..... | 28 |
| V.2. Les facteurs de nodulation, ou facteurs Nod | 29 |
| VI. La fixation azotée via le complexe nitrogénase | 29 |

Chapitre II

MATERIELS ET METHODES

| | |
|--|----|
| I. Constitution d'une collection de rhizobia nodulant <i>Medicago ciliaris</i> L. | 32 |
| I.1 Site d'échantillonnage des plantes de <i>Medicago ciliaris</i> L..... | 32 |
| I.2 Collecte des plantes de <i>Medicago ciliaris</i> L. | 32 |
| I.3 Conservation des nodules | 33 |
| I.4 Constitution d'une collection de rhizobia | 34 |
| I.4.1 Isolement direct des souches..... | 34 |
| I.4.2 Isolement des souches après le piégeage | 34 |
| I.4.3 Milieu d'isolement | 34 |
| I.4.4 Préparation du broyat nodulaire..... | 34 |
| I.4.5 Ensemencement et incubation..... | 35 |
| I.4.6 Caractérisation morphologique des colonies | 35 |
| I.4.7 Vérification de la pureté des souches..... | 35 |
| I.4.8 Stockage des isolats | 36 |
| II. Caractérisation symbiotique des isolats..... | 36 |
| II.1 Test de nodulation <i>in vitro</i> | 36 |
| II.1.1 Germination aseptique des graines | 37 |
| II.1.2 Conditions de culture des plantules de <i>Medicago ciliaris</i> L. | 37 |

| | |
|--|----|
| II.1.3 Culture et inoculation des plantules de <i>Medicago ciliaris</i> L. | 37 |
| II.2 Test de nodulation en pot..... | 37 |
| II.2.1 Préparation des pots et du substrat | 37 |
| II.2.2 Récolte des nodules | 38 |
| II.2.2.1 Culture en milieu liquide en tube | 38 |
| II.2.2.2 Culture en pot | 38 |
| II.2.3 Caractéristiques symbiotiques : Infectivité et Efficience. | 38 |
| III. Caractérisation préliminaire des isolats..... | 39 |
| III.1 Croissance sur milieu Tryptone agar additionné de rouge Congo | 39 |
| III.2 Croissance sur milieu YEMA au glutamate FeCl ₃ et bleu de bromothymol | 39 |
| III.3 Croissance sur milieu Peptone Glucose Agar GPA au pourpre de bromocrésol | 39 |
| III.4 Test distinctif entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> | 39 |
| IV Caractérisation phénotypique des isolats | 40 |
| IV.1 Tolérance à la salinité | 40 |
| IV.2 Tolérance à la température | 41 |
| IV.3 Tolérance au stress hydrique | 41 |
| IV.4 Tolérance au pH | 41 |
| IV.5 Résistance intrinsèque aux antibiotiques | 41 |
| V. Caractérisation biochimique..... | 41 |
| V.1 Test Oxydase | 41 |
| V.2 Test de la catalase..... | 42 |
| V.3 Test sur galerie API 20 NE..... | 42 |
| V.3.1 Mode opératoire | 42 |
| V.3.1.1 Sélection des colonies | 42 |
| V.3.1.2 Préparation de la galerie | 43 |
| V.3.1.3 Préparation de l'inoculum..... | 43 |
| V.3.1.4 Inoculation de la galerie | 43 |
| V.3.1.5 Lecture et interprétation | 44 |
| V.4 Test sur galerie API 50 CH | 45 |
| V.4.1 Mode opératoire | 46 |
| V.4.2 Inoculation des galeries | 46 |
| V.4.3 Interprétation | 46 |

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|-----|
| I. Isolement des rhizobia sur les différents milieux de culture..... | 48 |
| II. Caractérisation symbiotique des isolats..... | 52 |
| II.1 Test de nodulation <i>in vitro</i> | 52 |
| II. 2 Test de nodulation en pot..... | 57 |
| II. 2. 1 Premier essai de nodulation..... | 57 |
| II. 2. 2 deuxième essai de nodulation..... | 59 |
| II. 2. 3 Troisième essai de nodulation..... | 61 |
| II. 2. 4 Discussion générale des trois essais de nodulation en pot..... | 63 |
| III. Caractérisation préliminaire des isolats sur les différents milieux de culture..... | 67 |
| III.1 Croissance sur milieu Tryptone agar additionné de rouge Congo..... | 67 |
| III.2 Croissance sur milieu YEMA au bleu de bromothymol..... | 67 |
| III. 3 Croissance sur milieu GPA au pourpre de bromocrésol..... | 68 |
| III. 4 Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> | 70 |
| IV. Caractérisation phénotypique des isolats..... | 72 |
| IV.1 Tolérance à la salinité et la température..... | 72 |
| IV.2 Tolérance au stress hydrique..... | 77 |
| IV.3 Tolérance au pH..... | 80 |
| IV.4 Résistance intrinsèque aux antibiotiques..... | 82 |
| V. Caractères biochimiques des isolats..... | 85 |
| V.1 Test de l'oxydase et catalase..... | 85 |
| V. 2 Test sur galerie API 20 NE..... | 88 |
| Conclusion générale..... | 99 |
| Perspectives..... | 101 |
| Bibliographie..... | 103 |

ANNEXES

Résumés

Liste des abréviations

| | |
|--------------------|---------------------------------|
| °C | Degré Celsius |
| % | Pourcentage |
| G | Gramme |
| mg | Milligramme |
| µg | Microgramme |
| ml | Millilitre |
| µl | Microlitre |
| M | Molaire |
| µmol | Micromole |
| mm | Millimètre |
| H | Heure |
| min | Minute |
| S | Seconde |
| U | Unité |
| DO | Densité optique |
| pb | Paire de base |
| bv | Biovar |
| Ty | Tryptone Yest Extract |
| YEM | Yest Extract Mannito |
| Mg Cl ₂ | Chlorure de Magnesium |
| EDTA | Ethyl Diamine Tétra acétyle |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| v/v | Volume par volume |
| w/v | Poids par volume |
| YEM | Yeast Extract Mannitol |
| LCO | Oligosaccharide de Lipo-chitine |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| NH ₃ | Nitrate |
| <i>Nod</i> | Gènes de nodulation |

Liste des figures

| | |
|---|-----------|
| Figure 01 : Cycle de l'azote | 5 |
| Figure 02 : Phylogénie de quelques Légumineuses..... | 10 |
| Figure 03 : Distribution géographique du genre <i>Medicago</i> dans le monde | 11 |
| Figure 04 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α , β et γ -protéobactéries..... | 20 |
| Figure 05 : Nodosités indéterminées et déterminées..... | 23 |
| Figure 06 : Organogénèse de la nodosité de type indéterminée..... | 23 |
| Figure 07 : Schéma représentatif des différentes étapes de la nodulation..... | 25 |
| Figure 08 : Association symbiotique entre les espèces de <i>Medicago</i> et les souches de <i>Sinorhizobium</i> | 27 |
| Figure 09 : Le dialogue moléculaire entre les deux partenaires..... | 28 |
| Figure 10 : La fixation de l'azote via le complexe nitrogénase..... | 30 |
| Figure 11 : La localisation géographique du site d'échantillonnage (Zerizer Wilaya d'El Tarf)..... | 32 |
| Figure 12 : Conservation des nodules avec CaCl ₂ | 33 |
| Figure 13 : La nodulation <i>in vitro</i> | 55 |
| Figure 14 : Infectivité et effectivité et l'indice relative des isolats nodulant <i>M. ciliaris</i> L. issus de la nodulation <i>in vitro</i> | 56 |
| Figure 15 : Infectivité des isolats nodulant <i>M. ciliaris</i> issus du 1 ^{er} essai de nodulation | 58 |
| Figure 16 : Infectivité des isolats nodulant <i>M. ciliaris</i> issus du 2 ^{ème} essai de nodulation..... | 60 |
| Figure 17 : Infectivité et effectivité et l'indice relative des isolats nodulant <i>M. ciliaris</i> L. issus de troisième essai de la nodulation <i>in vivo</i> | 62 |
| Figure 18 : Les différents essais de la nodulation en pot | 66 |
| Figure 19 : Aspect macroscopique des isolats sur le milieu Tryptone Agar | 67 |
| Figure 20 : Aspect des isolats sur milieu YMA additioné bleu de bromothymo..... | 68 |
| Figure 21 : Réaction des isolats du test 3- céto lactose | 70 |
| Figure 22 : Pourcentage des isolats selon le test de 3-céto lactose | 72 |
| Figure 23 : Dendrogramme indiquant la résistance des isolats à la température et aux différentes concentrations de NaCl..... | 75 |
| Figure 24 : Effet du PEG 4000 sur la croissance des isolats à partir de nodules de <i>Medicago</i> <i>ciliaris</i> L..... | 77 |
| Figure 25 : La résistance des souches sur le milieu YEMA aux différentes concentrations de PEG..... | 78 |

| | |
|---|-----------|
| Figure 26: Effet du pH sur la croissance des isolats à partir de nodules de <i>Medicago ciliaris</i> L..... | 80 |
| Figure 27 : Effet des antibiotiques sur la croissance des souches nodulant <i>Medicago ciliaris</i> L..... | 83 |
| Figure 28 : Résistance intrinsèque de la souche Meds 18 à différents antibiotiques testés... | 85 |
| Figure 29: Photographie du test de catalase..... | 87 |
| Figure 30 : Dendrogramme indiquant les résultats des tests API 20 NE..... | 93 |
| Figure 31 : Dendrogramme indiquant les résultats des tests API 50 CH..... | 89 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----------|
| Tableau 01 : Classification du genre <i>Ensifer</i> et quelques exemples de plantes associées..... | 26 |
| Tableau 02 : La croissance des rhizobia sur différents milieux de culture testés..... | 48 |
| Tableau 03 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats..... | 49 |
| Tableau 04 : Dénombrement des nodules de <i>M. ciliaris</i> issues de la nodulation <i>in vitro</i> | 54 |
| Tableau 05 : Liste des souches nodulantes <i>M. ciliaris</i> L. du 1 ^{er} essai de la nodulation <i>in vivo</i> | 57 |
| Tableau 06 : Liste des souches nodulantes <i>M. ciliaris</i> L. du 2 ^{eme} essai de la nodulation..... | 64 |
| Tableau 07 : Liste des souches nodulantes <i>Medicago ciliaris</i> L. du 3 ^{eme} essai de nodulation..... | 61 |
| Tableau 08 : La caractérisation des isolats..... | 69 |
| Tableau 09 : Résultats du test de 3-cétolactose..... | 71 |
| Tableau 10 : Marge de tolérance des rhizobia nodulant <i>Medicago ciliaris</i> a la température, au NaCl..... | 76 |
| Tableau 11 : La résistance des isolats à la sécheresse..... | 79 |
| Tableau 12 : Tolérance des souches testées aux pHs..... | 81 |
| Tableau 13 : Résistance intrinsèque des souches nodulant <i>Medicago ciliaris</i> L à différents types d'antibiotiques testés..... | 84 |
| Tableau 14 : Résultats des tests catalase et oxydase..... | 86 |
| Tableau 15 : Identification des isolats en utilisant système l'API 20 NE..... | 91 |
| Tableau 16 : Résultats des tests catalase et oxydase..... | 98 |
| Tableau 17 : Résultats de l'Api 50 CH..... | 94 |

Introduction

Introduction

L'azote est l'un des nutriments essentiels pour tous les organismes (LaBauer et Treseder, 2008) est un composant essentiel de tous les acides aminés et nucléiques. Cependant, la disponibilité d'azote est limitée dans beaucoup de sols, et bien que l'atmosphère terrestre se compose environ 78.1% (N_2). En effet les seuls organismes capable de l'utiliser sont les bactéries, dites diazotrophes qui possèdent le complexe enzymatique réducteur appelé nitrogénase (Downie, 2005). Au cours de ces associations à bénéfice réciproque, la plante fournit de l'énergie à son symbiote, tandis que celui-ci fixe l'azote, le rendant assimilable pour la plante. Cette contribution illustre quelques exemples d'utilisation, réelle ou potentielle, de composantes de cette microflore à des fins d'amélioration de la production végétale ou de meilleure gestion environnementale. Selon Liu et *al.*, (2010), 55% d'azote global appliqué a été prise par les cultures, le reste a été perdu dans la lixiviation (16%) (Ollivier et *al.*, 2011).

Les entrées d'azote dans les systèmes cultivées ont essentiellement deux origines : la fixation biologique par les bactéries dont certaines ont été isolées à partir de nodules de racines des légumineuses ; ou la synthèse industrielle de fertilisants dérivants du procédé Haber-Bosch. Cette synthèse industrielle est énergétiquement couteuse en carburants fossiles et constitue une contribution marquante de l'agriculture à l'effet de serre tant par les émissions de CO_2 dues à la consommation de ces carburants, que par la production de protoxyde d'azote qu'elle accentue (Labreuche et *al.*, 2011).

La fabrication industrielle des engrais azotés minéraux est très coûteuse en énergie (Galloway, 2008). Pour certaines cultures, le coût des engrais azotés peut représenter à l'heure actuelle jusqu'à 50% des charges opérationnelles énergétiques d'une culture (Reganold et *al.*, 1990). Globalement, le coût de la fabrication des engrais azotés minéraux et de leur impact sur l'environnement est estimé à 100 milliards de dollars par an (Beatty et Good, 2011). En comparaison, la fixation d'azote atmosphérique symbiotique réalisée par les légumineuses est « gratuite » pour une production de biomasse ou de grains presque équivalente à celle obtenue avec des espèces non fixatrices, demandant une fertilisation azotée (Andrews et *al.*, 2013). Par conséquent, il serait avantageux pour l'agriculteur de cultiver plus de légumineuses. Cependant, il faut tenir compte du fait que l'on ne contrôle pas la minéralisation des quantités importantes d'azote organique d'un sol après la récolte d'une légumineuse, ce qui peut entraîner des fuites de nitrates supérieures à celles se produisant lors d'une culture de céréale

avec l'apport d'engrais azotés.

Les nitrates sont les engrais azotés minéraux les plus utilisés en agriculture. Ils sont très solubles et peuvent être rapidement entraînés lors de l'écoulement des eaux de surface vers les cours d'eau et les nappes phréatiques. Une concentration élevée de nitrates dans l'eau de consommation peut constituer un risque pour la santé humaine (Umar et Iqbal, 2007). En outre, l'industrie de l'eau doit faire face à des coûts supplémentaires pour éliminer les nitrates des sources (Cameron et Schipper, 2010). Cette fuite de nitrates peut aussi avoir des conséquences négatives sur l'environnement avec l'eutrophisation de l'eau douce et des écosystèmes marins (London, 2005). Ce phénomène se manifeste par une prolifération d'algues vertes, qui réduit la pénétration de lumière, appauvrit en oxygène les eaux de surface, et fait disparaître les invertébrés vivant dans les fonds marins. Ces algues peuvent aussi produire des toxines nocives pour les poissons, pour le bétail et pour les humains (Stoate *et al.*, 2009).

Les sols contenant un surplus d'azote minéral constituent également une source de l'émission de N₂O (oxyde nitreux), qui peut réagir avec l'ozone stratosphérique, augmentant ainsi l'effet de serre. L'excès d'azote dans le sol peut aussi provoquer des émissions toxiques d'ammoniac dans l'atmosphère qui peuvent contribuer à l'acidification des sols par les pluies acides (Ramos, 1996).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est l'une des sources les plus importantes d'azote dans les systèmes agricoles, estimée à environ 122 millions de tonnes par an, soit une quantité du même ordre que la production industrielle d'engrais azotés. Les associations symbiotiques entre légumineuses et des bactéries du genre *Rhizobium* sont parmi les plus efficaces (Liu *et al.*, 2011). Mais, il existe aussi des associations non symbiotiques, comme celles existant entre les bactéries libres du sol fixatrices d'azote présentes dans la rhizosphère du riz, de la canne à sucre et des céréales (Adrews *et al.* 2013).

L'intérêt de la fixation biologique de l'azote par les légumineuses a été mis en avant de longue date comme support de la fourniture d'azote aux systèmes d'agriculture et sa devient de plus en plus une meilleure stratégie actuelle pour la mise au point d'une production agricole plus économe énergétiquement et plus respectueuse des contraintes environnementales (Thiébeau *et al.*, 2010).

Le Bassin Méditerranéen est le berceau de diversification d'un grand nombre d'espèces végétales d'intérêt fourrager et/ou pastoral tel que le genre *Medicago*. Certains

écosystèmes méditerranéens présentent des problèmes particuliers comme par exemple des sols affectés par la salinité ou pauvres en matière organique, dégradation du couvert végétal et érosion des sols suite à la pression zooanthropique (surpâturage, abattement d'arbres pour bois de chauffe, exploitation de carrières...) (Abdelguerfi et *al.*,2003).

D'autre part il existe un déficit en fourrage dans de nombreux pays de la région. Des programmes d'habilitation de carrières sont actuellement mis en place. Bien que le rôle des rhizobia dans la fixation de l'azote pour la croissance des plantes soit connu depuis des décennies, leurs applications en biotechnologie et en agriculture n'ont pas encore été généralisées. Une meilleure compréhension de la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia et les bénéfices tirés par l'un et l'autre, peuvent fournir de nouvelles stratégies visant à améliorer la productivité des plantes, tout en contribuant à protéger l'environnement et à maintenir la biodiversité mondiale.

Notre travail a pour but d'étudier la biodiversité des symbiotes de *Medicago ciliaris* L. sur le plan phénotypique. Les plantes de *Medicago ciliaris* L. ont été récoltées de la région de Zerizer (wilaya d'El Taref).

Chapitre I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités

I.1 Le cycle de l'azote

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

Au centre du concept du cycle de l'azote (Figure 01) se trouve l'azote contenu dans le sol. L'azote du sol pénètre dans la biomasse surtout sous la forme des nitrates (NO_3^-) qui est absorbé par les plantes et les microorganismes. Une fois assimilé, l'azote nitrique est converti en azote organique sous la forme d'acides aminés, et d'autres composés azotés qui constitueront les protéines et d'autres macromolécules. L'azote continue son chemin dans la chaîne alimentaire, lorsque les animaux mangent les plantes. Puis l'azote retourne au sol sous la forme des déchets animaux, ou lors de la mort et la décomposition des différents organismes.

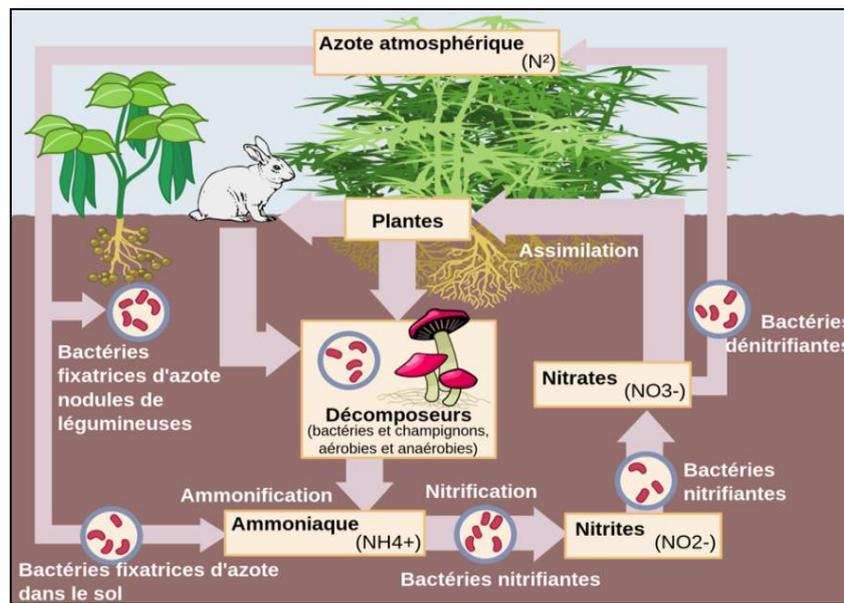


Figure 01 : Cycle de l'azote (Peret, 2007).

Au cours de la décomposition, l'azote organique est transformé en ammoniac par une série de microorganismes ce processus est connu sous le terme d'ammonification (Figure 01). Une partie de l'ammoniac peut être volatilisé et retourne dans l'atmosphère, mais la plus grande partie est recyclée en nitrate par des bactéries du sol. La première étape de la formation

de nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite (NO_2^-) par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus*. Le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter* ces deux groupes bactériens sont dits bactéries nitrifiantes, le résultat de leurs activité est la nitrification.

Les bactéries nitrifiantes sont chimioautotrophes, ce qui signifie que l'énergie libérée par l'oxydation des matières inorganiques telles que l'ammonium ou le nitrite est utilisée pour convertir le dioxyde de carbone en carbone organique. En prélevant de l'azote dans le sol, les plantes entrent en compétition avec des bactéries dites dénitrifiantes (ex : *Thiobacillus denitrificans*) (Hokpins ; 2003).

I.2 la fixation biologique de l'azote

De même que le carbone (C), l'azote (N) est un des éléments majeurs constituant les composants cellulaires nécessaires à la vie (notamment les acides nucléiques et les protéines indispensables à la reproduction et à la croissance). Seules certaines familles d'êtres vivants peuvent utiliser directement l'azote gazeux qui est présent dans l'air. Le mécanisme en jeu, appelé fixation biologique du diazote N_2 (diazotrophie), est le mécanisme principal permettant l'introduction d'azote dans la biosphère. La fixation biologique de l'azote est un processus métabolique exclusivement réalisé par les organismes procaryotes : certaines bactéries et cyanobactéries libres dans le sol ou l'eau, et les bactéries symbiotiques des légumineuses (LaBauer et Treseder, 2008).

Dans le monde végétal, les légumineuses ont la capacité de mettre en place une symbiose avec certaines bactéries naturellement existantes dans le sol et qui convertissent l'azote de l'air (N_2), présent dans leur environnement, en une forme intermédiaire (ammonium NH_4^+) qui est alors assimilable par la plante pour constituer les molécules organiques (notamment les protéines). Cette symbiose naturelle permet à la plante d'utiliser directement l'azote de l'air environnant pour sa croissance. On parle de plantes fixatrices d'azote et de fixation symbiotique (**en anglais symbiotic nitrogen fixation, ou biological nitrogen fixation, BNF**) (Schneider et Huyghe, 2015).

L'atmosphère terrestre est très riche en azote (79 % de N_2 , 21 % d' O_2) mais la structure de cette molécule N_2 est très difficile à casser chimiquement. Elle doit être d'abord associée à de l'oxygène ou de l'hydrogène au sein de composants tels que l'ammonium (NH_3 , NH_4^+), ou les oxydes d'azote dont en particulier le nitrate (NO_3^-). Cette conversion de l'azote

atmosphérique est une réaction chimique réductrice ($\text{N}_2 + 3\text{H}_2 + \text{énergie} \rightarrow 2\text{NH}_3$), appelée fixation azotée, qui peut se faire soit par voie chimique soit par voie biologique (Schneider et Huyghe, 2015).

Dans le cas de la fixation azotée chimique, l'énergie utilisée par l'industrie est généralement de l'énergie fossile, alors que dans le cas de la fixation azotée biologique, l'énergie est issue de la photosynthèse, sous forme d'ATP provenant de l'oxydation des substrats carbonés. Une mole d'azote atmosphérique donne 2 moles d'ammonium avec une dépense énergétique de 16 moles d'ATP et la production d'électrons et de protons (ions hydrogène). Cette réaction est catalysée par une enzyme, la nitrogénase, présente chez certains microorganismes (procaryotes) (Peoples et *al.*, 2009 ; Duc et *al.*, 2010).

La symbiose que peuvent établir certaines plantes eucaryotes avec des bactéries fixatrices d'azote spécifiques leur permet de bénéficier de cette réaction. Une particularité métabolique des Fabacées est la présence d'une hémoprotéine fixatrice de dioxygène, la leghémoglobine, très proche de l'hémoglobine. Cette protéine se trouve dans les nodules des racines et permet de fixer l'oxygène pour former un milieu anaérobie favorable à la fixation du N_2 par le rhizobium. Les estimations des quantités d'azote symbiotique des cultures agricoles sont de l'ordre de 50 Mt par an au niveau mondial. À titre de comparaison, la fixation azotée industrielle réalisée pour la fabrication d'engrais azotés (par le procédé Haber-Bosch) produit environ 87 Mt « d'azote chimique » par an dans le monde (Peoples et *al.*, 2009 ; Duc et *al.*, 2010).

I. 3 Les différentes symbioses fixatrices d'azote chez les plantes

Au cours de l'évolution, certaines plantes ont mis en place des associations symbiotiques avec des micro-organismes de façon à pallier la faible disponibilité de l'azote dans les sols. Il existe plusieurs types de symbioses fixatrices d'azote. Cependant les principales symbioses fixatrices d'azote sont les symbioses nodulaires.

Au cours de cette interaction un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines ou plus rarement sur les tiges. C'est au sein de cet organe protecteur que l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries (Kneip et *al.*, 2007). D'autres symbioses fixatrices d'azotes, non rhizobiennes, ont été caractérisées chez les plantes. Ces autres symbiontes fixateurs d'azote sont divers : bactéries telluriques, épiphytes ou endophytes, Cyanobactéries ou encore Actinomycètes.

I. 3.1 La symbiose actinorhizienne

Les Actinomycètes, maintenant appelés Actinobactéries, sont des Procaryotes telluriques Gram-positifs. Les Actinobactéries du genre *Frankia*, sont des organismes filamenteux et diazotrophes, capable de réduire le diazote atmosphérique en condition libre ou symbiotique. En interaction avec une plante compatible, *Frankia* est capable d'induire de novo la différenciation d'un organe racinaire propice à la symbiose, la nodosité.

Les *Frankia* sont ainsi capables de noduler plus de 200 espèces, pour la plupart des plantes ligneuses, réparties en 8 familles regroupées sous le terme de plantes actinorhiziennes: les *Betulaceae*, les *Casuarinaceae*, les *Coriarioaceae*, les *Datisceae*, *Elaeagaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* et *Rosaceae* (Pawlowski et Demchenko, 2012).

A l'instar des Cyanobactéries, chez *Frankia* la fixation d'azote est assurée par des cellules spécialisées de 2 à 6 µm appelées diazovésicules.

I. 3.2 Les symbioses avec cyanobactéries

Les cyanobactéries constituent un des groupes les plus vastes et variés de bactéries filamenteuses Gram-négatives, capables de photosynthèse, et souvent de fixation azotée. Parmi ces bactéries, les genres *Nostoc* et *Anabaena* peuvent s'associer aux végétaux et présentent un très large spectre d'hôtes : algues, bryophytes, ptéridophytes, gymnospermes et angiospermes (Franche et al., 2009).

Dans des conditions de carence azotée, elles peuvent se différencier en cellules spécialisées appelées hétérocystes. Cette différenciation est associée à une réduction de l'activité photosynthétique, et à la création d'un environnement anaérobie, nécessaire au bon fonctionnement de leur nitrogénase. Le type d'associations symbiotiques avec les plantes hôtes peut être extracellulaire ou intracellulaire, mais ces bactéries n'induisent pas la différenciation d'organes spécifiques.

II. Les légumineuses

II.1 Généralités sur les légumineuses

Les Légumineuses représentent une des familles les plus importantes et les plus variées des Angiospermes avec 750 genres et environ 20 000 espèces réparties sur une aire géographique diversifiée. (Cronk et al., 2006). Seul un nombre réduit des espèces sont utilisés

dans l'alimentation humaine et animale, certaines sont des espèces médicinales et quelques-uns sont toxiques (Velazquez et *al.*, 2010).

Les légumineuses viennent en second lieu après les cultures céréalières (Ejigui et *al.*, 2007; Paul et *al.*, 2008).

En 2004, plus de 300 millions de tonnes de légumineuses à graines ont été produites sur les 190 millions d'hectares (environ 13 % du total des terres cultivées dans le monde et 27% de la production mondiale des cultures).

Les légumineuses contribuent pour 33% au besoin azoté de l'alimentation humaine avec par ordre d'importance : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le pois d'Angole (*Cajanus cajan*), le pois a vache (*Vigna unguiculata*) et la lentille (*Lens culinaris*) (Graham et Vance, 2003). Notant que 35% des huiles végétales traitées proviennent de Légumineuses principalement le soja et d'arachide. Les graines de légumineuses contiennent au moins 20 % à 40 % des protéines, elles entrent donc dans l'alimentation humaine et comme forrage pour l'alimentation animale.

II.2 La phylogénie des Légumineuses

Les Légumineuses sont des plantes Eudicotylédones appartenant à l'ordre des Fabales, ordre appartenant à la famille des Fabacées (Zhu et *al.*, 2005). Les Fabacées sont divisées en trois sous-familles (Figure 02) : *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* ou *Faboideae* (Doyle et Luckow, 2003). Les Faboideae regroupent la plus grande diversité avec plus de 12 000 espèces de Légumineuses tropicales ou tempérées, dont celles présentant un intérêt agronomique majeur comme *Glycine max* (Soja), *Phaseolus vulgaris* (Haricot), *Arachis hypogaea* (Arachide) ou *Medicago sativa* (luzerne) (Zhu et *al.*, 2005).

Le caractère monophylétique des Papilionoideae a clairement été démontré, et les analyses phylogénétiques basées sur les variations de la séquence de la maturase chloroplastique K (*matK*) subdivisent les Papilionoideae en 7 clades (Wojciechowski et *al.*, 2004) dont le clade des IRLC (Inverted Repeat Loss Clades) qui regroupe la majorité des Légumineuses d'intérêt agronomique comme *Pisum* (ex : Pois), *Lens* (ex : Lentilles), *Trifolium* (ex : Trèfle) et *Medicago* (ex : Luzerne) (Cronk et *al.*, 2006).

Les Mimosoideae incluent 77 genres et environ 3 000 espèces principalement en région tropicale et subtropicale comme les genres *Albizia* et *Acacia*, utilisées comme bois de

coupe (Young et al., 2011). Les Caesalpinoideae composés de 162 genres et près de 3000 espèces sont principalement composés de Légumineuses tropicales comme le caroubier (*Ceratonia siliqua*) ou le tamarinier (*Tamarindus indica*) et sont principalement utilisés comme plantes alimentaires, ornementales ou comme bois de coupe (Young, 2003).

Notons que toutes les Légumineuses n'établissent pas une symbiose rhizobienne. En effet, 90% des Papilionoideae et des Mimosoideae établissent une symbiose rhizobienne (Doyle, 2011) contre seulement 25% des Caesalpinoideae (Hirsch, 1992).

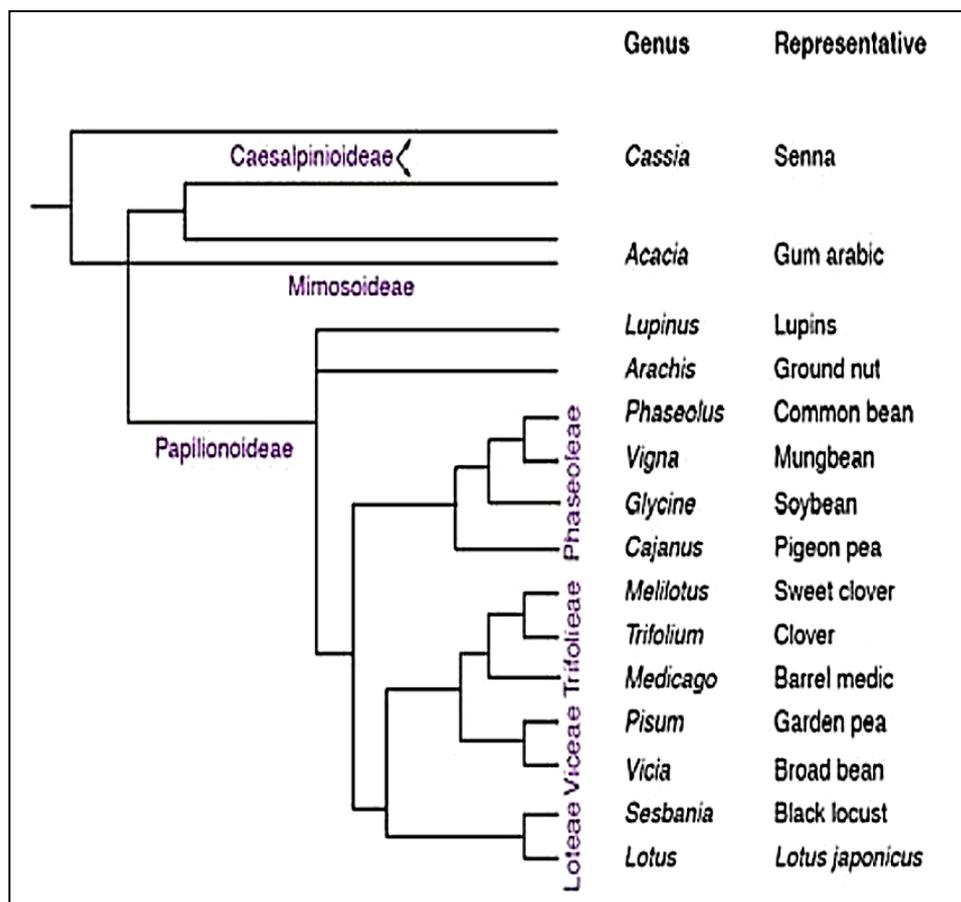


Figure 02 : Phylogénie de quelques Légumineuses (Udvardi et al., 2005)

II .3 Les Légumineuses fourragères

II .3.1 Le genre *Medicago*

Le genre *Medicago* regroupent 83 espèces présentes majoritairement autour du bassin méditerranéen (Béna et al., 2005) .

II .3 .1.1 La distribution géographique du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* fait partie de la famille des *Papilionacées*. Comme beaucoup des espèces de cette famille, les espèces de *Medicago* fixent l'azote atmosphérique grâce à la symbiose. Il est reconnu que les aires d'origine de toutes les espèces du genre *Medicago* sont « le croissant fertile », recouvrant les pays ou régions actuelles de Turquie, Iran, Irak, sud du Caucase et le pourtour méditerranéen.

Ces espèces ont ensuite conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne et les steppes avoisinantes. Au cours du XIXème siècle, elles ont ensuite envahi d'autres parties du monde, en particulier les continents américain et australien à l'occasion des différents courants de colonisation humaine (Prosperi, 1995). La distribution des espèces du genre *Medicago* diffère selon l'espèce et selon les parties et les étages bioclimatiques.

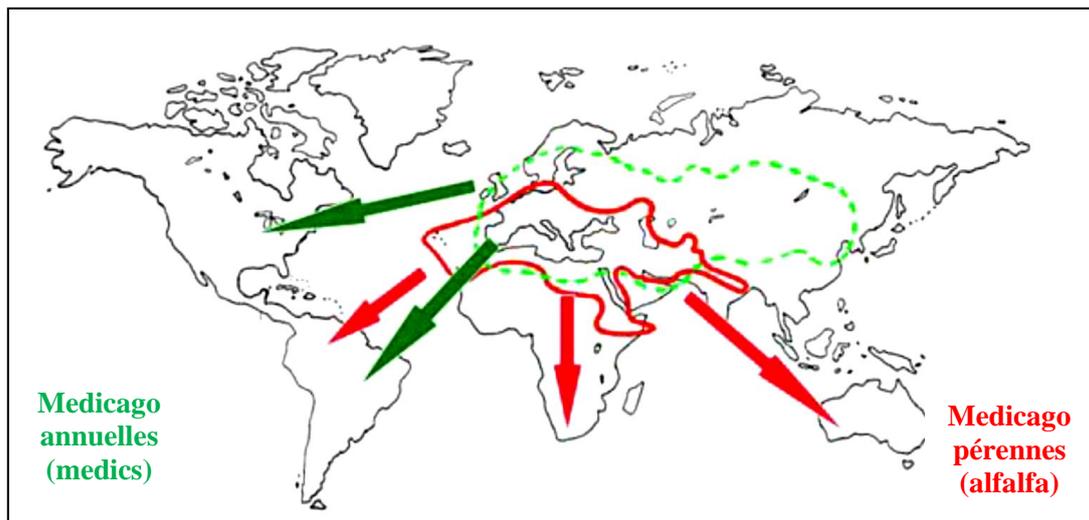


Figure 03 : Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde

II .3 .1.2 Les espèces de *Medicago* annuelles

Le genre *Medicago* présente des espèces annuelles diploïdes ($2n=16$) et pérennes tétraploïdes ($2n=4x=32$), une seule espèce arbustive (*M. arborea*) a été recensée. Les formes annuelles sont réputées comme étant autogames, les tétraploïdes sont préférentiellement allogames.

Le pourtour Méditerranéen est l'aire d'expansion naturelle des *Medicago* annuelles. Dans ce continuum éco-géographique, les espèces annuelles se retrouvent dans tous les étages bioclimatiques: de l'humide au saharien. Les unes sont à large spectre de répartition les autres

ont une distribution spatiale plus délimitée. *M. truncatula* et *M. polymorpha*, présentes dans tous les étages bioclimatiques, sont considérées comme des formes ubiquistes, un ensemble d'espèces formé par *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. orbiculnris* et *M. murex*, s'étend de l'étage humide au semi-aride (Nègre, 1959; Heyn, 1963; Lesins et Lesins, 1979; Small et Jomph, 1989).

Tandis que *M. laciniata* et *M. minima* sont présentes du semi-aride au saharien. Les espèces annuelles ou "Medics" produisent une grande quantité de gousses indéhiscentes contenant des graines dures. Les espèces annuelles améliorent les qualités physique et biologique des sols (réduction des pertes en azote par lessivage, apport de matière organique, diminution de la fréquence de certains parasites) et interviennent dans la dégradation des pesticides, enfin en raison de leur cycle végétatif court elles n'entrent pas en compétition avec la strate arborée pour l'eau et l'azote.

II.3 1.2.1 La légumineuse *Medicago ciliaris* (L.) All.

II.3.1.2.1.1 Généralités

Medicago ciliaris L. est une plante annuelle de 20-50 cm. couchée, presque glabre ; folioles obovales, dentées dans le haut; stipules incisées ou laciniées ; fleurs jaunes, assez petites (5-7 mm.), 1-3 sur des pédoncules aristés plus courts que la feuille ; pédicelles plus longs que le tube du calice ; ailes plus courtes que la carène ; gousse pubescente-glanduleuse, grande, subglobuleuse, arrondie aux deux bouts, à faces planes, à 6-10 tours de spire peu serrés, à bords plans et épais, hérissés d'épines rapprochées, étalées et entrecroisées ; graines grandes, oblongues en rein (www.tela-botanica.org).

L'Algérie est l'un des pays méditerranéens, si ce n'est le seul, qui présente les fréquences de présence de *M. ciliaris* et *M. intertexta* les plus élevées. En effet, la fréquence de *M. intertexta* est assez élevée (38%) comparée aux autres régions de la Méditerranée occidentale ; *M. ciliaris* est aussi considéré comme fréquent en Algérie (39.6%) (Abdelguerfi, 1978 ; Abdelguerfi et al., 1988a et 1988b).

II.3.1.2.1.2 La position systématique

| | |
|--------------------|---|
| Règne | <i>Plantae</i> |
| Sous-règne | <i>Tracheobionta</i> |
| Division | <i>Magnoliophyta</i> |
| Classe | <i>Magnoliopsida</i> |
| Sous-classe | <i>Rosidae</i> |
| Ordre | <i>Fabales</i> |
| Famille | <i>Fabaceae</i> |
| Genre | <i>Medicago</i> |
| Espèce | <i>Medicago ciliaris / Medicago sativa...</i> |

II.3 .1.3 Les espèces *Medicago* pérennes

Les *Medicago* pérennes qu'on trouve essentiellement sur les rives nord de la Méditerranée et s'étendent jusqu'en Asie centrale; quelques formes spontanées sont localisées sur les hauts plateaux des chaînes de l'Atlas Nord Africain.

Dans le complexe d'espèces pérennes l'interfertilité est entretenue naturellement entre les différentes formes spontanées qui le composent, ainsi le maintien de types différents (populations naturelles ayant des caractères singuliers) est dû essentiellement à l'isolement géographique. Grâce à l'étendue de son aire de culture, la luzerne, espèce pivot du groupe des *Medicago* pérennes, a une expansion mondiale.

La luzerne cultivée, (*Medicago sativa* L.) répond à deux filières l'une réservée à la déshydratation, l'autre à l'élevage. Les critères aux quels une luzerne, destinée à la déshydratation, doit répondre sont la qualité et une bonne répartition de la production dans l'année ainsi que la résistance à la verse et aux maladies. Pour le secteur de l'élevage, la pérennité en sec et la tolérance au pâturage de la luzerne sont de plus en plus recherchés.

II.3 .1.4 Les espèces *Medicago* arbustives

Les *Medicago* arbustives sont représentées, depuis peu, par trois espèces pérennes ligneuses récemment décrites *Medicago arborea* ($2n=4x=32$) présente en Méditerranée orientale, seule espèce ligneuse cultivée *Medicago citrina* ($2n=6x=48$) localisée dans le bassin occidental de la Méditerranée, forme insulaire *Medicago strasseri*, endémique de Crète, est une forme insulaire.

Ces espèces arbustives ont été soumises à une caractérisation morphologique et moléculaire par RAPD (Chebbi *et al.*,1995) qui a permis de déceler que *M. strasseri* et *M. arborea* (originaire de Grèce) sont génétiquement similaires et s'écartent suffisamment de *M. arborea* (collection F.A.0) alors que *M. citrina* constitue un groupe parfaitement distinct.

III. Les rhizobiacées

Les rhizobia sont des bactéries Gram-négative (Sato *et al.*,2005) , strictement aérobies dont l'oxygène est l'accepteur final des électrons d'une longueur de 1,2 à 3,0 µm et une largeur de 0,5 à 0,9 µm, non sporulant (Jordan, 1984). Contiennent souvent des granules de poly-β-hydrox butyrate (PHB), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien 2 à 6 flagelles péritriches.

III.1 Les caractères des rhizobia

Plusieurs études ont été réalisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des rhizobiums. Ces études ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce (Jarvis, 1982; Zhang *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 1993; De Lajudie *et al.*, 1994; Dupuy *et al.*, 1994).

III.1.1 Caractérisation symbiotique

Les critères symbiotiques indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée.

Les propriétés symbiotiques ont longtemps été la base unique de la caractérisation des rhizobia. L'infectivité d'un rhizobium s'exprime par sa spécificité à travers sa capacité de noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées.

L'efficacité est la capacité de réduire efficacement l'azote atmosphérique en ammonium. Différentes techniques d'estimation de l'efficacité sont disponibles. Trois sont les plus utilisées, la méthode Kjeldahl qui permet de mesurer l'azote total de la partie végétative de la plante, la méthode de l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) qui permet d'évaluer l'activité de la nitrogénase par l'apport de l'acétylène comme substrat et par la mesure de l'éthylène dégagé comme produit de réduction final, la troisième méthode consiste à

déterminer le poids sec de la partie végétative des plantes inoculées par la souche à tester comparativement au témoin non inoculé.

III.1.2 Caractérisation phénotypique

La caractérisation phénotypique classique des rhizobiums se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (Graham *et al.*, 1991). Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration Gram, et les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme).

Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différentes enzymes telles que glutamate déshydrogénase, glucose 6-phosphate déshydrogénase, indole-phénol oxydase, nitrate réductase, uréase, adénylate kinase ainsi que d'autres enzymes impliqués dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés.

Les critères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie sur le milieu YEM (*Yeast Extract Mannitol*) (Vincent, 1970), la capacité d'utiliser différents carbohydrates et différentes sources d'acides aminés, la tolérance à différentes concentrations en sels et aux variations du pH, la croissance à différentes températures, la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, etc...

Parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des rhizobiums, figure la croissance dans le milieu YEM (Vincent, 1970). La première classification des bactéries symbiotiques fixatrices de l'azote en deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* s'était basée sur ce critère (Jordan, 1982, 1984).

En fait, les souches à croissance rapide du genre *Rhizobium* possèdent un temps de génération inférieur à 4 heures et forment des colonies circulaires convexes généralement translucides avec un diamètre de 2 à 4 mm après 3 à 5 jours sous des conditions optimales d'incubation.

En revanche, les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* possèdent un temps de génération de 6 à 8 heures et forment des colonies circulaires convexes et rarement translucides avec un diamètre de 1 à 2 mm après 5 à 7 jours d'incubation. En culture, une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant

de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0 (Somasegaran et Hoben ,1994). Les températures extrêmes sont de 4°C et 42,5°C.

III.2 La classification actuelle des rhizobia

Les premières classifications de rhizobia ont été basées sur des tests d'inoculation croisée entre rhizobia et leurs plantes hôtes. La plante hôte n'était pas les seuls critères pris en compte pour la classification des rhizobia pour lequel été classifiée dans deux groupes : les rhizobia à croissance rapide et les rhizobia à croissance lente, basées sur leur temps de génération et leur taux de la croissance sur le milieu de culture (Vincent, 1970).

Cependant, des observations discordantes entre la notion de vitesse de croissance bactérienne et la gamme hôte ont montré beaucoup de doute sur la validité de cette classification. Ceci fait l'endroit aux méthodes comparatives telles que la sérologie, le coefficient de Chargaff, hybridation de ARN/DNA ou de DNA/DNA, analyse des plasmides, etc (Saoudi ,2008).

Sur la base des séquences de l'ADNr 16S les bactéries nodulant les légumineuses actuellement décrite appartient à trois sous-classes phylogénétiques distinctes principales : α , β et γ -Proteobacteria. Plus de 98 espèces groupées dans 11 genres appartenant à la sous-classe α -Proteobacteria et 2 genres appartenant à l'ordre *Burkholderiales* dans sous-classe β -Proteobacteria (Zakhia et de Lajudie, 2001., Rüberg et al., 2003., Chen et al., 2001., Nogom et al., 2004) et finalement, un genre appartenant à l'ordre *Pseudomonales* dans la sous-classe γ -Proteobacteria (Benhizia, 2004).

III.2.1 La sous-classe *Alpha Proteobacteria*

III.2.1.1 La branche *Rhizobium /Ensifer /Shinella /Agrobacterium*

Cette branche est subdivisée en trois sous-branches correspondant aux genres *rhizobium* (Frank et al., 1989), *Ensifer* (autre fois *Sinorhizobium*) (Chen et al., 1988., de Lajudie et al., 1994) et *Shinella* (Lin et al., 2008). Ces genres sont groupés avec:

- Les bactéries améliorant la croissance de plantes PGPR (Plants Growth Promoting Bacteria)
- Agents pathogènes humains et animaux y compris la *brucella*, l'*Ochrobactrum*, *Bartonella* ou les bactéries comme *Mycoplasma*.

La première sous-branche correspondant au genre *rhizobium*, définit un groupe de trente-quatre espèces, de divers plante hôte et inclut *R. leguminosarum*, *R. tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), *R. lotii* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* (Amarger et al., 1997), *R. mongolense* (Van Berkum et al., 1998), *R. undicola* (de Lajudie et al., 1998) et également d'autres espèces précédemment appelée *Agrobacterium*. Il y a quelques espèces actuelles dans ce genre qui n'ont pas été observées pour former des nodules et donc n'adaptent pas la définition fonctionnelle du rhizobia. Celles-ci incluent les espèces autre fois connues sous le nom d'Agrobactérie (par exemple : *R. larrymoorei*, *R. rubi* et *R. vitis*) (Young et al., 2001).

En 2001, Young et al., ont mis à jour des données taxonomiques et ont prouvé que les caractéristiques phénotypiques discriminatoires à distinguer ces types ne sont pas d'une façon convaincante, et que les relations phylogénétiques entre les genres déduits de l'analyse comparative des ordres du rDNA16S diffèrent selon l'algorithme choisi et plus particulièrement sur les ordres choisis. Par conséquent, en dépit des différences phénotypiques, de ces auteurs suggérés pour combiner les trois genres *rhizobium*, d'*Agrobacterium* et d'*Allorhizobium* dans un genre simple: *Rhizobium*, y compris toutes les espèces d'*Agrobacterium* et d'*Allorhizobium* en tant que nouvelles combinaisons: *R. Radiobacter.*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* et *R. vitis*.

La deuxième sous-branche correspond au genre *Ensifer* (autre fois *Sinorhizobium*) et inclut des espèces de *E. fredii* (Scholla et al., 1984, Chen et al., 1988), *E. meliloti*, *E. teranga* et *E. sahelense* (de Lajudie et al., 1994, Trüper et al., 1997), *E. medicae* (Rome et al., 1996), *E. kostiense* et *E. arboris*, *E. xingianense*, *E. adhaerens*, *E. kummerowiae*, *E. l'americanum*, *E. mexicanus* et *E. numidicus*. *Sinorhizobium* a été précédemment séparé de *rhizobium* et *Bradyrhizobium* et proposés comme nouveau genre du *rhizobia* à croissance rapide de *Medicago*.

Cette classification a été basée non seulement sur les caractéristiques phénotypiques (taxonomie numérique, les données sérologiques d'analyse, la composition de la gomme extra cellulaire), et des caractéristiques génotypiques telles que (hybridation de ADN/ADN). Puis, les espèces du genre *Sinorhizobium* ont été transférées au genre *Ensifer* puisque ce dernier est le synonyme qui prend la priorité.

La troisième sous-branche correspond au genre *Shinella* et inclut les espèces une: *S. Kummerowiae*, une bactérie symbiotique qui nodule *Kummerowia stipulacea*.

Les espèces du genre *Agrobacterium* ont été classées comme des phytopathogènes capables d'induire des tumeurs sur plusieurs espèces de plantes. Ces phytopathogènes ont été distingués grâce à leurs plasmides. Ainsi, deux biovars ont été reconnus, *Agrobacterium* Biovar 2 (*rhizogenes*) portant le plasmide Ri qui cause des tumeurs au niveau des racines et *Agrobacterium* Biovar 1 portant le plasmide Ti et qui comporte deux types : Biovar 1 (*tumefaciens*) qui induit des tumeurs au niveau du collet.

Une étude plus récente basée sur l'analyse comparative des séquences de l'ADNr 16S a montré que les genres *Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Agrobacterium* forment un seul groupe monophylétique et qu'il serait judicieux de les regrouper dans un seul genre *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001, 2003).

III.2.1.2 La branche *Mesorhizobium*

Un nouveau genre est proposé en 1997 inclut les espèces de croissance intermédiaire appelées *Mesorhizobium* a été inclus dans la famille *Phyllobacteriaceae* comprenant également l'ancien genre *Phyllobacterium* (avec une espèce: *Phyllobacterium* isoler a partir des nodules de *Trifolium pratense*).

La branche de *Mesorhizobium* contient presque trente espèces parmi les quelles nous citons: *M. Loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum*, *M. tianshanense*, *M. amorphae*, *M. plurifarum*, *M. muleiense*, *M. qingshengii*, *M. robiniae*, *M. tamadayense*. Ils sont phylogénétique connexes et distincts du grand groupe phylogénétique qui inclut *rhizobium*, *Agrobactérium* et *Sinorhizobium*. Ils sont caractérisés par un taux de croissance intermédiaire (Jarvis *et al.*, 1997) .

III.2.1.3 La branche *Azorhizobium*

Cette famille regroupe seulement un genre et trois espèces de bactérie symbiotique: *Azorhizobium Caulinodans*, *A. dodereinereae* et *A. oxalatophilum*. L'analyse des séquences de l'ADNr 16S a montré que la souche type se trouve entre-mélangée avec des souches du genre *Xanthobacter* et *Aquabacter*.

Le regroupement de ces deux derniers genres avec *Azorhizobium* a été examiné sans être cependant proposé en raison de la grande dissimilitude des caractères phénotypiques (Trinick,1980 ; Kuykendall *et al.*, 2004).

III.2.1.4 LA branche *Bradyrhizobium*

Ce genre a été défini pour inclure tout les rhizobia a croissance lente (Jordan,1982). Cette branche a inclus, pendant longtemps des espèces simples: *Bradyrhizobium japonicum* qui a regroupé toutes les souches qui nodulent le soja (*glycine max*). Très hétérogène, il a été alors divisé en trois groupes (I et II), basés sur des homologies obtenues par hybridation de ADN/ADN (Hollis et al., 1981).

Nouvelles espèces: *Bradyrhizobium elkanii* a été créé dans le groupe II, qui diffère du *Bradyrhizobium japonicum* (Moreira et al., 2006). Le genre *Bradyrhizobium* inclut les souches pour lesquelles la position taxonomique n'est pas bien définie aux espèces de niveau. Une nouvelle espèce *B. yuanmingense* a été récemment isolée du genre *Lespedeza* (Yao et al., 2002 ; Euzéby et Findall, 2004).

Dans la même année, une souche de *Bradyrhizobium* nodulant une plante sauvage du genre *Phaseolus* a été rapportée (Parker, 2002). Les autres espèces reconnues de ce groupe sont *Bradyrhizobium betae* (Rivas et al., 2004) et *Bradyrhizobium canariense* (Vinuesa et al., 2005).

Ces dernières années, la caractérisation de différentes souches de *Bradyrhizobium* en comparant plusieurs techniques moléculaires a indiqué l'existence de 11 génotypes différents, trois dont correspondent aux souches connues, alors que 8 génotypes sont très distincts.

III.2.1.5 La branche *Methylobacterium*

Decrit par Patt et al., en 1976, il est divisé en 28 espèces avec une seule espèce rhizobiale : *M. nodulans*. Cette espèce, en plus de sa capacité de pousser sur le méthanol qui est la caractéristique de tous les *Methylobacterium*, elle porte deux gènes codant pour les enzymes clés de la méthylophie et la nodulation.

Le gène *mxoF* code pour la sous unité alpha du méthanol deshydrogénase et le gène *nodA* code pour une acyltransférase impliquée dans la biosynthèse des facteurs *Nod* (Jourand et al., 2004; Sy et al., 2001).

III.2.1.6 La branche *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* a été proposé par Yabuuchi et al., en 1992. Sa définition a été basée principalement sur des considérations génomiques et sur la composition de lipide cellulaire.

Les différentes espèces du genre peuvent être différenciées par les résultats des auxanogrammes (137 substrats ont été examinés dans l'étude de Gillis *et al.*, 1995).

Ce genre contient 39 espèces comprenant les bactéries rhizosphériques, les bactéries pathogènes humaines, aussi bien que les bactéries fixatrices d'azote comme *Burkholderia vietnamiensis* et *Burkholderia kururiensis*. Néanmoins, le genre inclut également des espèces importantes à l'écologie de l'environnement en particulier *Burkholderia xenovorans*.

III.2.2 La sous-classe *Beta Proteobacteria*

III.2.2.1 D'autres symbionts fixateurs d'azote

Récemment, on a rapporté que plusieurs bactéries nodulant les légumineuses peuvent fixer l'azote mais ont été phylogénétiquement situées en dehors des groupes traditionnels de rhizobies dans le α -*Proteobacteria*. Les nouvelles lignes qui contiennent les symbionts fixateurs d'azote incluent *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* et *Phyllobacterium* dans α -*Proteobacteria* et *Burkholderia*, *Ralstonia* et *Cupriavidus* dans β -*Proteobacteria*.

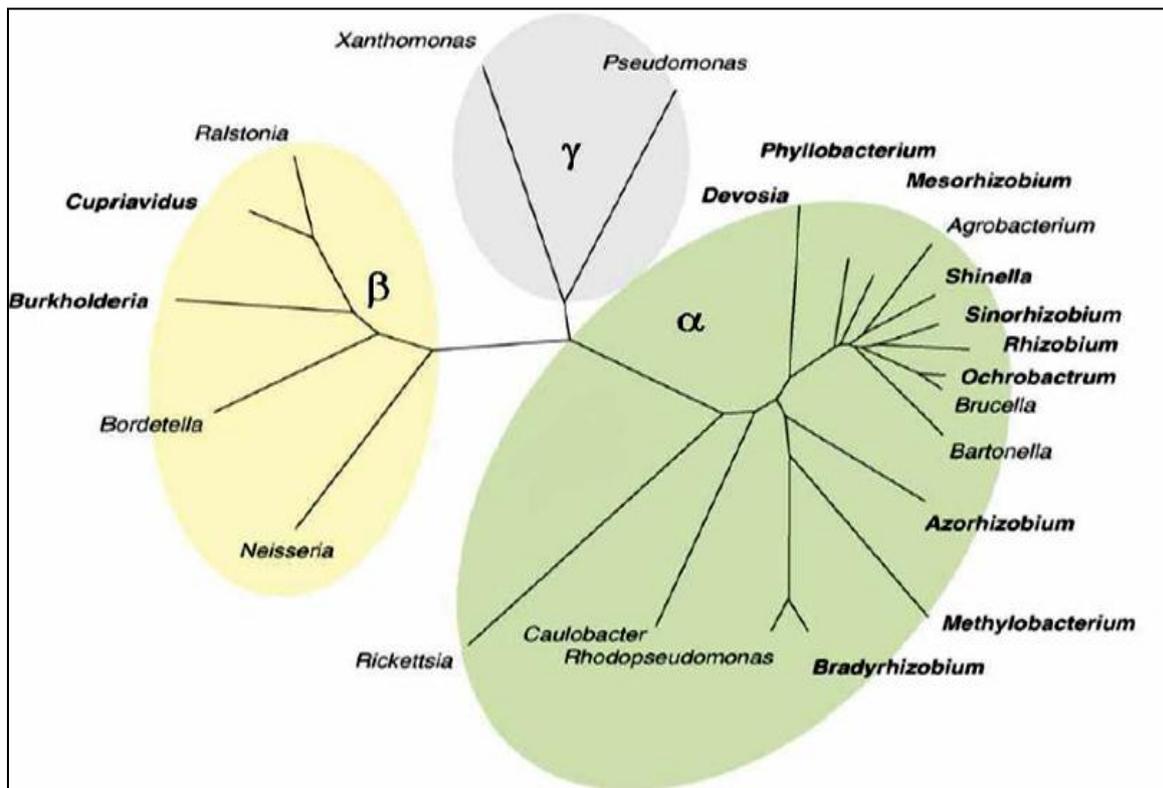


Figure 04: Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α , β et γ -protéobactéries. Les genres en gras contiennent les rhizobies nodulants des légumineuses (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

III.3 La mise en place de la symbiose fixatrice d'azote

La séquence des événements qui débutent par l'infection bactérienne et qui se terminent par la formation d'un nodule différencié fixant l'azote, a été très étudiée chez les légumineuses.

L'initiation de l'infection entre les deux partenaires débute par un dialogue moléculaire spécifique (Hirsch and Fujishige, 2012). D'une part, les légumineuses exsudent, par l'intermédiaire de leurs racines, une grande quantité de composés carbonés : acides organiques, acides aminés, vitamines, sucres (Perret et *al.*, 2000) (De-la-Peña et *al.*, 2008, 2010; Badri et Vivanco, 2009), et composés phénoliques tels que les flavones, flavonones, isoflavones, betaines (Cooper, 2007). C'est parmi ces derniers que l'on trouve les flavonoïdes issus du métabolisme secondaire (Broughton et *al.*, 2006), qui vont jouer un rôle important au cours de la symbiose rhizobienne. L'émission des flavonoïdes permet en effet l'attraction des bactéries dans la rhizosphère, par chimiotactisme induisant les gènes de nodulation (Hirsch et Fujishige, 2012; Ryu et *al.*, 2012).

D'autre part, plusieurs molécules de surface des deux partenaires symbiotiques ont été décrites elles interviennent lors de l'attachement des bactéries aux poils absorbants des racines des plantes hôtes est assuré par l'intermédiaire des protéines produites par les plantes, les Lectines végétales qui vont se lier à des polysaccharides (LPS) (Williams et *al.*, 2008).

Il existe deux modes d'infection : l'infection intracellulaire et l'infection intercellulaire (Goormachtig et *al.*, 2004). Pour les plantes tempérées tel que *Medicago*, l'infection est intracellulaire et l'entrée des bactéries dans la plante se fait via les poils absorbants (Gage, 2004).

En réponse les rhizobia synthétisent un signal réciproque bactérien nommé facteur de nodulation (facteur Nod) (Wang et *al.*, 2012). Les facteurs Nod sont des molécules de signalisation de nature lipochito-oligosaccharides (Oldroyd and Downie, 2008). Tous les facteurs Nod ont la même structure chimique de base, mais diffèrent d'une espèce à l'autre par leurs chaînes latérales.

Les facteurs Nod provoquent la déformation des poils absorbants en fin de croissance apicale. Sous l'action de ces composés les cellules du cortex se mettent en mitose pour former le primordium nodulaire dans le méristème (Gage et Morgolin, 2000). Les facteurs Nod

induisent aussi l'expression des nodulines précoces au niveau des cellules de l'épiderme du cortex du péri-cycle de la racine

après l'attachement des bactéries, on observe une déformation des poils absorbants, Cette déformation se traduit généralement par un gonflement dans la partie apicale du poil, accompagné d'une courbure qui aboutit à la formation d'une structure en « crosse de berger », dans laquelle les bactéries sont piégées, formant une « poche d'infection » les bactéries emprisonnées à l'intérieur de cette crosse vont alors pénétrer à l'intérieur du poil absorbant et donnent naissance à une structure tubulaire appelé : le cordon d'infection (Oldroyd et *al.*, 2011).

Ces cordons d'infection progressent à l'intérieur des poils absorbants, puis à travers le cortex de la racine. Simultanément, des cellules du cortex interne situées à proximité des cordons d'infection, se différencient et se divisent activement. Les divisions successives mènent à la formation d'un primordium nodulaire, le lieu de la libération des bactéries se différencie en nodule mature (Brewin, 2004). La libération des bactéries dans le cytoplasme des cellules végétales se fait via le processus d'endocytose par lequel elles sont incluses dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane péribactéroïdienne d'origine végétale (Brewin, 2004 ; Gage, 2004). Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonde transformation pour devenir une forme mature fixatrice d'azote le bactéroïde (Mergaert et *al.*, 2006).

En effet, des divisions successives au niveau du cortex interne de la racine induisent la formation d'une nodosité indéterminée (Ferguson et *al.*, 2010) , alors que l'initiation de divisions successives dans le cortex externe conduit à la formation de nodosités de type déterminée. Les nodosités indéterminées sont caractérisées par la présence d'un méristème persistant au niveau distal de la nodosité (Udvardi et Poole, 2013). Ainsi, par le biais de divisions cellulaires successives et continues, ce méristème assure une croissance indéterminée de la nodosité, générant une nodosité de forme allongée.

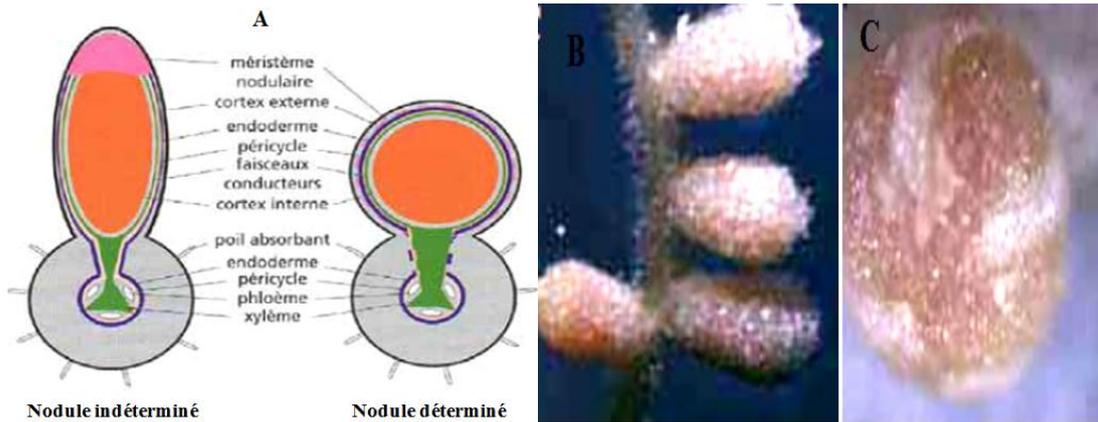


Figure 05: Nodosités indéterminées et déterminées

A : Duhoux et Nicole, 2004, B : Timmers *et al.*, 2000; C : Ott *et al.*, 2005.

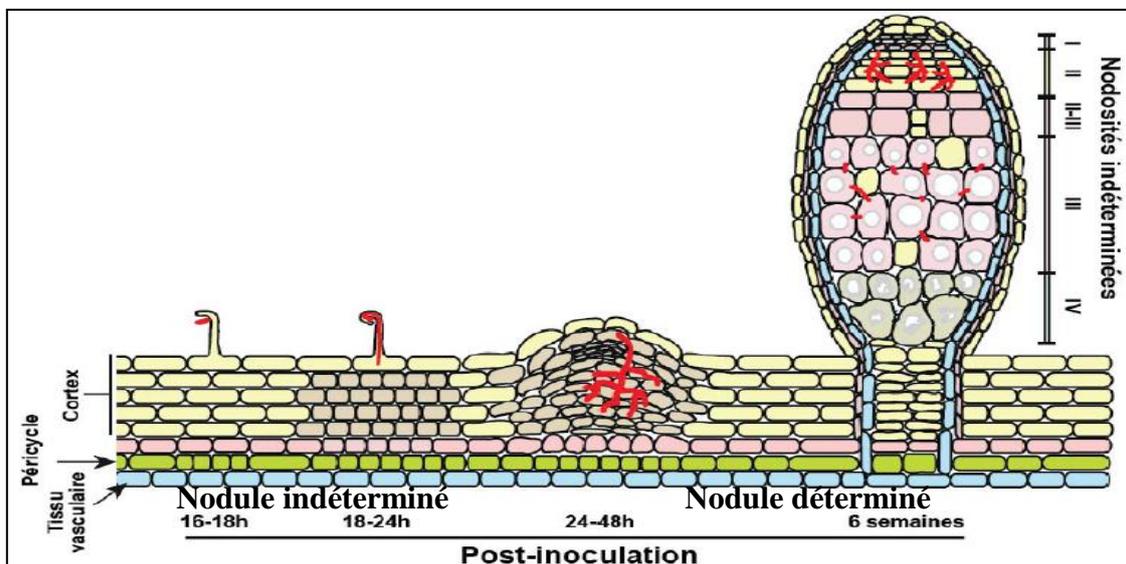


Figure 06 : Organogénèse de la nodosité de type indéterminée (Popp et Ott, 2011)

La nodosité est ainsi composée en cinq zones :

La zone I, méristématique assurant une croissance indéterminée de la nodosité. Une zone II, dite d'infection où les cellules néoformées par la zone I sont infectées de manière chronique par les rhizobia libérés par le cordon d'infection puis internalisés par endocytose par la cellule hôte végétale. Une zone III, dite fixatrice où les bactéries sont différenciées en bactéroïdes fixateurs d'azote et une zone IV, dite de sénescence où les bactéroïdes et les cellules végétales sont dégradées (Crespi et Galvez, 2000; Hirsch, 1992). Puis, plus tardivement, se met en place une zone V, dite saprophytique où les rhizobia sont libérés par le

cordons d'infection et envahissent les tissus dégradés issus de la zone de sénescence, qui deviennent une niche écologique pour des rhizobia non différenciés (Timmers et *al.*, 2000; Vasse et *al.*, 1990).

Une reproduction schématique du processus de nodulation dans le temps est présentée dans la Figure 07.

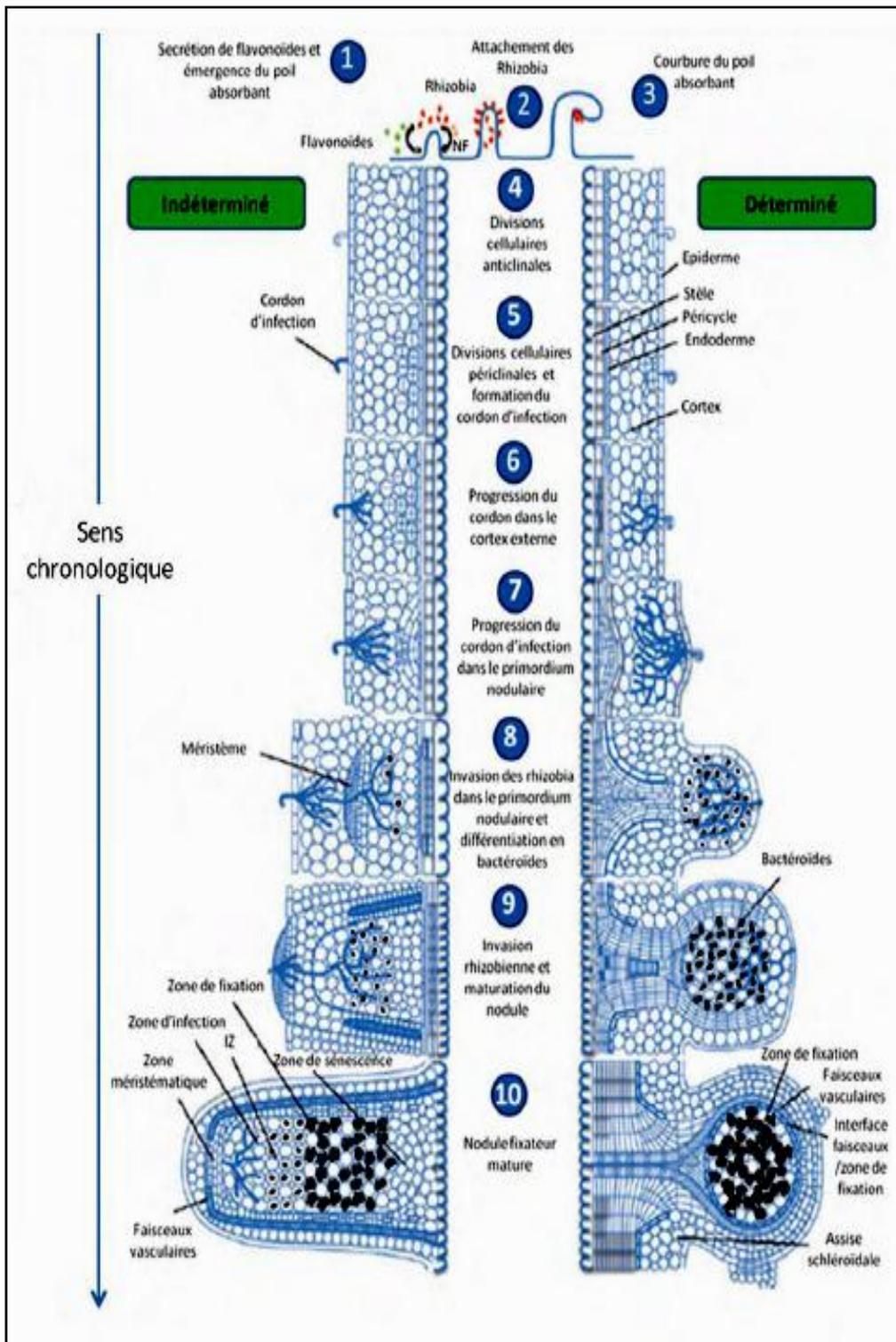


Figure 07 : Schéma représentatif des différentes étapes de la nodulation (Ferguson et al., 2010).

L'ordre chronologique des processus développementaux menant à la formation du nodule mature

Tableau 01 : Classification du genre *Ensifer* et quelques exemples de plantes associées (Sawada *et al.*, 2003 et weir 2011)

| Genres et espèces | Références | Plantes hôte |
|-----------------------------|--|--|
| <i>Ensifer</i> | Ancien nom <i>Sinorhizobium</i> Willems <i>et al.</i> , 2003; Young, 2003 | |
| <i>Ensifer abri</i> | Ogasawara <i>et al.</i> , 2003 | |
| <i>Ensifer adhaerens</i> | "Sinorhizobium morelense" Wang <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003 | |
| <i>Ensifer americanum</i> | Toledo <i>et al.</i> , 2003 | |
| <i>Ensifer arboris</i> | Nick <i>et al.</i> , 1999 ; Young, 2003 | |
| <i>Ensifer fredii</i> | "Rhizobium fredii" Scholla <i>et al.</i> , 1984; Young, 2003 | Glycine soja |
| <i>Ensifer garamanticus</i> | Merabet <i>et al.</i> , 2010 | |
| <i>Ensifer indiaense</i> | Ogasawara <i>et al.</i> , 2003 | |
| <i>Ensifer kostiense</i> | Nick <i>et al.</i> , 1999; Young, 2003 | |
| <i>Ensifer kummerowiae</i> | Wei <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003 | |
| <i>Ensifer medicae</i> | Rome <i>et al.</i> , 1996; Young, 2003 | <i>Medicago polymorpha</i> ; <i>M.rugosa</i> , <i>M.truncatula</i> |
| <i>Ensifer meliloti</i> | "Rhizobium meliloti" Dangeard, 1926; Young, 2003 | <i>Medicago spp.</i> |
| <i>Ensifer mexicanus</i> | Lloret <i>et al.</i> , 2007 | |
| <i>Ensifer morelense</i> | Cette espèce se distingue de <i>Ensifer adhaerens</i> mais pas encore nommé <i>Ensifer</i> . Voir Martens <i>et al.</i> , 2007 pour détails, "Sinorhizobium morelense" Wang <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003. | <i>Leucaena leucocephala</i> |
| <i>Ensifer numidicus</i> | Merabet <i>et al.</i> , 2010 | |
| <i>Ensifer saheli</i> | Young, 2003 | <i>Sesbania rostrata</i> |
| <i>Ensifer sojae</i> | Li <i>et al.</i> , 2010 | |
| <i>Ensifer terangae</i> | de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003 | |
| <i>Ensifer xinjiangense</i> | Chen <i>et al.</i> , 1988; Young, 2003 | |

IV. L'association symbiotique entre les genres *Medicago* et leurs microsymbiotes

Le genre *Sinorhizobium* appartient à la famille des *Rhizobiaceae*, à l'ordre des *Rhizobiales*, à la classe des *alphaproteobacteria*. Il est actuellement composé de 18 espèces (*S. arboris*, *S. americanum*, *S. fredii*, *S. kostiensis*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. morelense*, *S. sahari*, *S. terangaet* *S. xinjiangense*). Ces espèces présentent des spectres d'hôtes différents, plus ou moins restreints. Seules les espèces *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996) et *S. meliloti* (De Lajudie *et al.*, 1994) ont été décrites capables d'entrer en symbiose avec les plantes du genre *Medicago*. L'espèce *Sinorhizobium meliloti* présente un spectre d'hôte « modérément » spécifique puisque cette espèce peut s'associer avec les espèces végétales des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (Krishnan, Pueppke, 1991) ainsi que *Phaseolus* (Mnasri *et al.*, 2007). Du fait de sa variation de spécificité, trois biovars ont été décrits pour *S. meliloti*, les biovars *S. Meliloti* bv. *meliloti*, *S. meliloti* bv. *medicaginis* (Villegas *et al.*, 2006) et *S. meliloti* bv. *mediterranense* (Mnasri *et al.*, 2007) étant respectivement efficaces avec *M. truncatula*, *M. laciniata* et *Phaseolus vulgaris*. Le spectre d'hôte de *S. medicae* peut apparaître plus restreint car limité à certaines espèces du genre *Medicago*, comme *M. polymorpha*, *M. ciliaris*, *M. polymorpha* ou *M. arabica* (Béna *et al.*, 2005; Rome *et al.*, 1996).

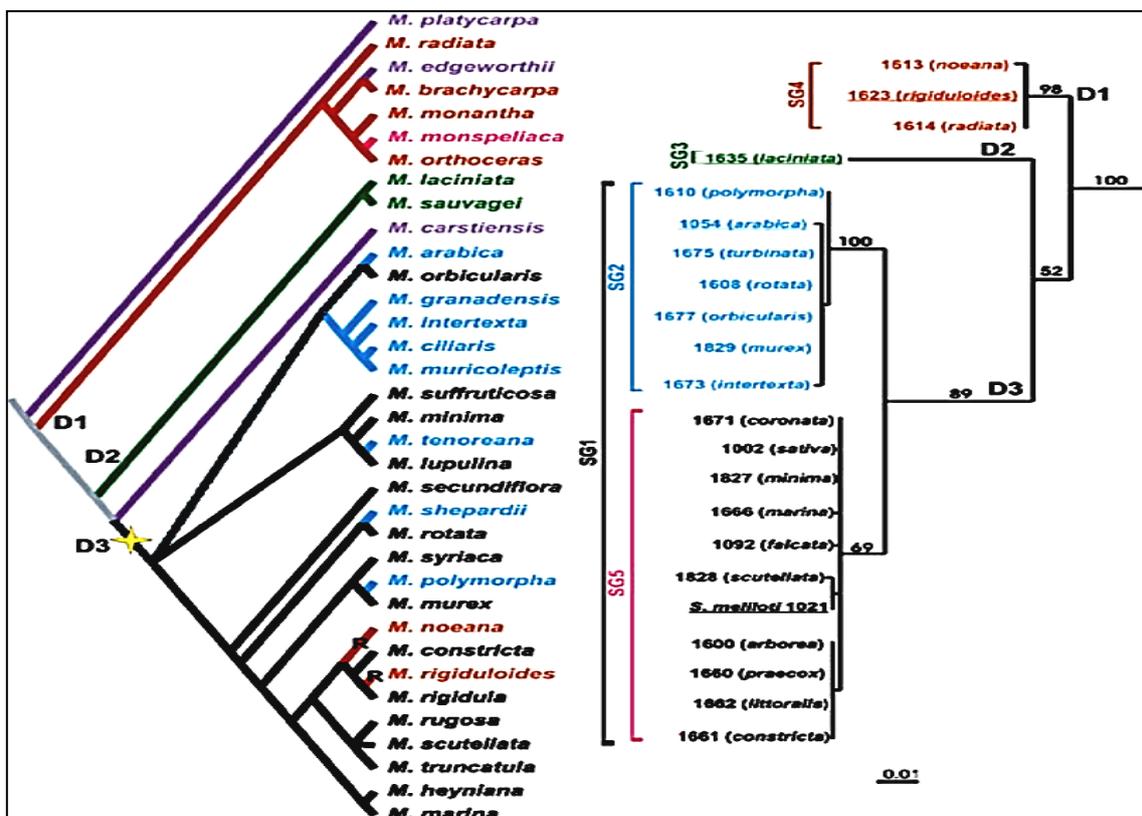


Figure 08 : Association symbiotique entre les espèces de *Medicago* et les souches de *Sinorhizobium* (Béna *et al.* 2005).

V. Les bases moléculaires de la symbiose

Au cours de l'établissement de la symbiose entre les rhizobia et les légumineuses, la bactérie, qui vit à l'état libre dans le sol, est attirée par la présence de la plante. En réponse à l'émission par les racines de la plante de flavonoïdes qui constitue le premier signal moléculaire. La reconnaissance spécifique de ces flavonoïdes par des protéines régulatrices bactériennes, les protéines NodD, l'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol* collectivement appelés gènes *nod*) qui reconnaît une séquence d'ADN de 47pb, la « nodbox ». Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochito-oligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire (Dénarié et *al.*, 1996).

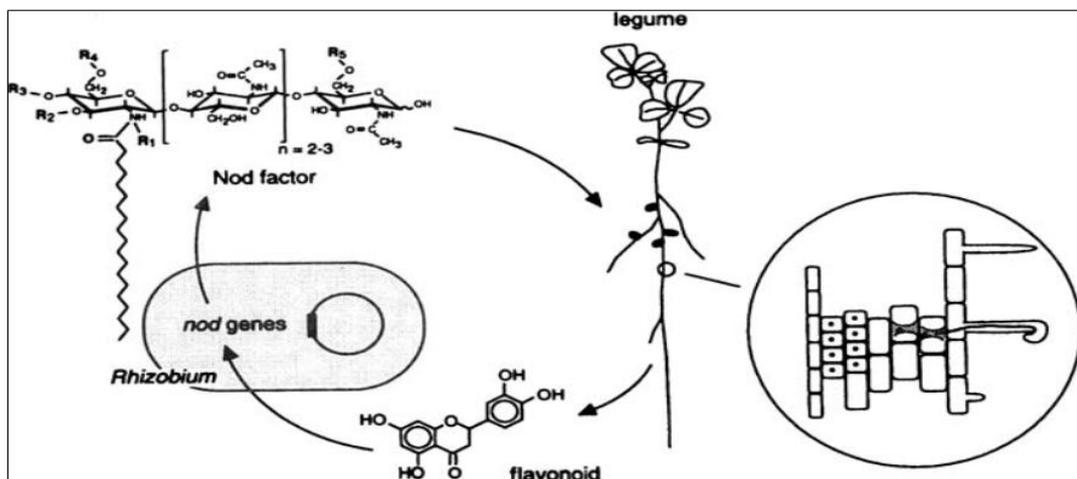


Figure 09 : Le dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Lindström et *al.*, 2010).

V.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe de molécules omniprésentes et diverses qui sont synthétisés par l'intermédiaire de la voie de phénylpropanoïde et de la voie d'acétate malonate. La biosynthèse de ces molécules se produit dans la plupart des organes des plantes et ont des rôles très variés comprenant la protection contre les dommages ultra-violet, la défense en réponse aux pathogènes, agissant en tant que colorant ou co-colorant en influençant la couleur des fleurs (anthocyanines), la distribution de modulation d'auxine, leur principal rôle dans la signalisation au cours de la symbiose (Cooper 2007).

Selon les modifications de cette structure, plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes tel que les flavonols, les flavanols, les flavanones, les flavonols, les anthocyanidines et les phényl-propanoïdes, parmi lesquels les isoflavonoïdes sont spécifiques des légumineuses (Brenicic et Winans, 2005).

V.2. Les facteurs de nodulation, ou facteurs Nod

Les facteurs Nod (LCO), produits par les rhizobia en réponse à la présence d'une plante hôte, sont des molécules diffusibles synthétisées et sécrétées spécifiquement au cours de l'établissement de la symbiose. Ces molécules sont de nature lipo-chito-oligosaccharidique. Elles sont constituées de 3 à 5 résidus de N-acétylglucosamine associés par des liaisons β 1-4 (oligomère de chitine) et substitués par une chaîne d'acide gras du côté non-réducteur.

Chaque espèce de rhizobium produit une famille de facteurs Nod spécifiques qui diffèrent des facteurs Nod d'une autre espèce par différents groupements chimiques au niveau des sucres ainsi que par la nature de l'acide gras, notamment sa longueur et son niveau d'insaturation (Dénarié et Cullimore, 1993 ; Dénarié, et *al.*, 1996 ; Lerouge, et *al.*, 1990) .

Les facteurs Nod sont produits par une voie métabolique spécifique dont les enzymes sont codées par les gènes *nod*, *nol* et *noe* présents, chez *Sinorhizobium meliloti*, sur un mégaplasme symbiotique.

Les gènes responsables de la synthèse des facteurs Nod se répartissent en trois classes (1) les gènes de régulation de la synthèse dont font partie les gènes *nodD*, (2) les trois gènes communs, *nodA*, *nodB*, et *nodC* qui permettent la synthèse du squelette lipo-chito-oligosaccharidique et (3) les gènes spécifiques tels que *nodE*, *nodF*, *nodH*, *noeE*, ou *nolL*, qui sont impliqués dans la mise en place des décorations spécifiques propres à chaque espèce bactérienne (Perret et *al.*, 2000).

VI. La fixation azotée via le complexe nitrogénase

Dans les nodules indéterminés la voie principale d'assimilation a lieu via la glutamine synthétase, mais deux autres voies métaboliques alternatives sont possibles via l'asparagine synthétase et la glutamate déshydrogénase (Barsch et *al.*, 2006). Le complexe de nitrogénase est comporté de deux sous-unités fonctionnelles principales, dinitrogénase réductase

(azoferredoxine) et dinitrogénase (molybdoferredoxine). Les composants structuraux de ces sous-unités sont les protéines NifH ($\gamma 2$ de Nif (fixation de l'azote) azoferredoxine homodimérique) et NifD/K ($\alpha 2\beta 2$ hétérotétramérique molybdoferredoxine).

Trois types de nitrogénases sont connus selon la composition de leur centre métallique : fer et molybdène (Fe/Mo), fer et vanadium (Fe/V) ou fer seulement (Fe). La forme la plus courante présente chez les rhizobia est le type fer / molybdène (Fe/Mo) (Kneip *et al.*, 2007) (Figure10).

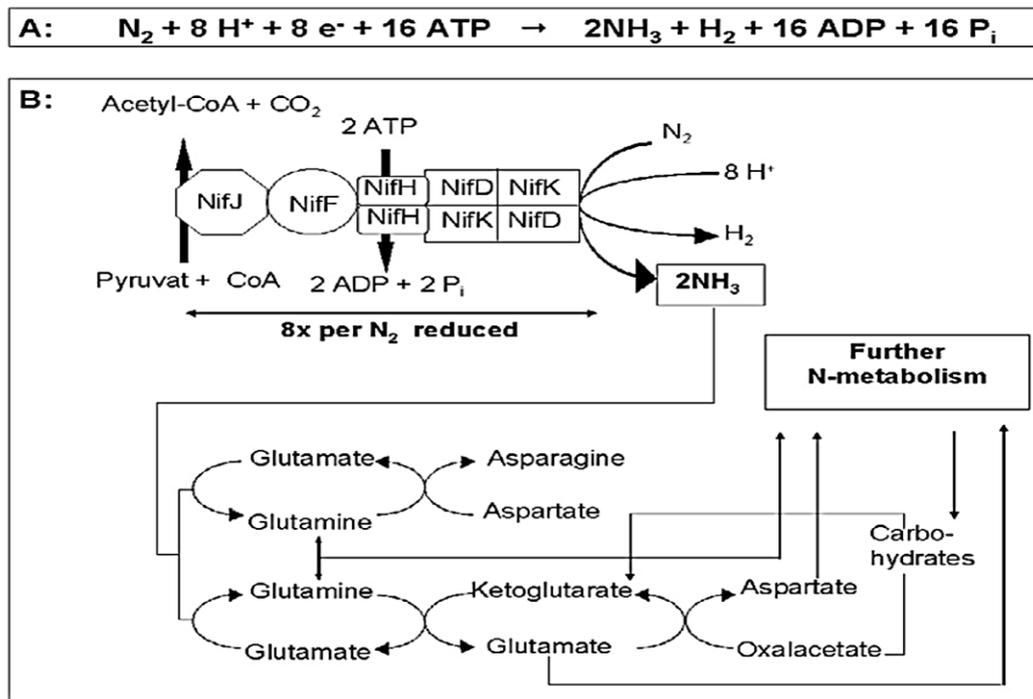


Figure 10 : La fixation de l'azote via le complexe nitrogénase (Kneip *et al.*, 2007).

A. Réaction chimique conduisant à la fixation de l'azote.

B. Représentation schématique du mode opératoire du complexe enzymatique de la nitrogénase. Les électrons sont transférés de la ferredoxine (ou flavodoxine) réduite via l'azoferredoxine vers la molybdoferredoxine. Chaque molécule d'azote fixée nécessite 16 molécules d'ATP hydrolysées par la protéine NifH. NifJ, pyruvate flavodoxine / ferredoxine oxidoreductase; NifF, flavodoxine /ferredoxine.

Chapitre II

MATERIELS ET METHODES

I. Constitution d'une collection de rhizobia nodulant *Medicago ciliaris* L.

I.1 Site d'échantillonnage des plantes de *Medicago ciliaris* L.

La commune de Zerizer s'étend sur une superficie de 29.3 Km², située dans la daïra de Besbes et la wilaya d'El Tarf. La commune de Zerizer a pour coordonnées géographiques : l'altitude 36° 43' 38'' Nord ; longitude 7° 53' 41'' Est (Figure 11).



Figure 11 : Localisation géographique du site d'échantillonnage (Zerizer Wilaya d'El Tarf).

I.2 Collecte des plantes de *Medicago ciliaris* L.

Les prospections et collectes des plants de *Medicago ciliaris* ont été réalisées en période de floraison des plantes durant les années 2010, 2011 ; au mois de mars et avril selon les techniques préconisées par Vincent, (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Les plants de *Medicago ciliaris* L. sont collectés, en creusant environ 15 cm au tour de la plante et 20 cm de profondeur à l'aide d'une pioche afin de récupérer tout l'appareil racinaire; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains et les transporter immédiatement au laboratoire.

Les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, à l'aide d'un couteau, les nodules sont détachées à 0.5 cm du site d'attache, en fin séchées avec du papier filtre avant leur conservation. Les nodosités racinaires prélevées sur les 30 plants (nombre de nodules / plant et leurs tailles sont variables).

I.3 Conservation des nodules

Les nodules prélevés sont conservés selon deux procédés :

Pour une conservation courte durée et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 h (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace).

Pour une période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Somasegaran et Hoben (1994). Qui consiste à remplir $\frac{1}{4}$ des flacons stériles par du CaCl_2 . Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules et refermer hermétiquement jusqu'à l'utilisation.

Il est recommandé de placer dans un seul tube les nodosités issues d'une même plante. Les flacons sont étiquetés en indiquant l'espèce du plant, le lieu de récolte, le numéro du plant récolté la date de conservation (Figure 12)

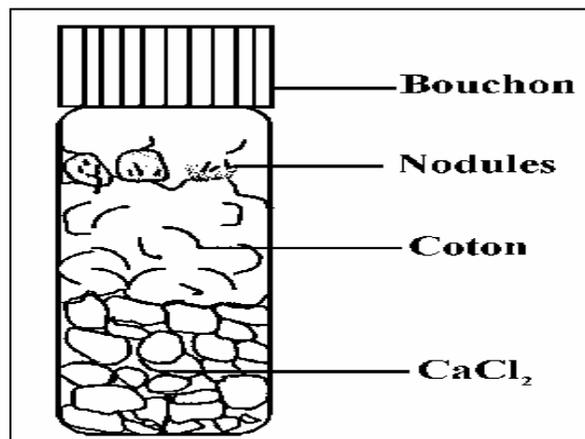


Figure 12 : Conservation des nodules avec CaCl_2 (Somasegaran et Hoben ,1994).

I.4 Constitution d'une collection de rhizobia

Nos isolats sont constitués de deux collections de souches : souches isolées à partir des nodules récoltés directement du site d'échantillonnage et souches isolées à partir des nodules récoltés du piégeage.

I.4.1 Isolement direct des souches

Les nodosités prélevées sur les différentes plantes collectées du site d'échantillonnage ont servi à l'isolement direct des bactéries symbiotiques. Les différents isolats ont été désignés par le code **Med** suivi de la lettre (**s**) utilisé pour les souches qui ont été isolées à partir des nodules issues de la récolte direct du site d'échantillonnage suivit par un chiffre désignant le numéro de la souche.

I.4.2 Isolement des souches après le piégeage

Un échantillon du sol a été également utilisé pour piéger les bactéries par l'intermédiaire des plantules de *Medicago ciliaris* L. mise en culture en pots contenant le sol provenant du site de prélèvement.

L'ensemble des nodosités ont été récoltées afin de pouvoir constituer après l'isolement. Le code **Med** suivi de la lettre (**p**) utilisé pour les souches qui ont été isolé à partir des nodules issues du piégeage suivit par un chiffre désignant le numéro de la souche.

I.4.3 Milieu d'isolement

Afin de sélectionner un milieu de culture qui favorise la sélection des rhizobia, nous avons testé plusieurs milieux, et parmi ses derniers le milieu solide Tryptone Agar (TA) à base d'extrait de levure de tryptone et d'agar, est un milieu qui a présenté meilleur résultats. Parmi ces milieux, le milieu 4 a été sélectionné pour l'isolement et la purification des isolats (Annexe 1).

I.4.4 Préparation du broyat nodulaire

Les nodosités collectées directement du site d'échantillonnage ou par piégeage et conservées par la dessiccation sont réhydratées 24 h dans de l'eau distillée, puis rincées à l'eau afin d'éliminer les résidus du sol, désinfectées par une solution d'hypochlorite de sodium à 3% pendant 10 min puis rincées deux fois avec de l'eau distillée stérile.

Immerger les nodosités pendant 5 min dans l'éthanol à 90⁰, rincées 5 fois avec de l'eau distillée stérile. Transférer les nodosités dans un autre récipient contenant une solution peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 5 min. rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile.

Les nodules ainsi préparés sont placés dans des tubes à hémolyse stériles contenant 1mL d'eau distillée stérile puis écrasés jusqu'à l'obtention d'un broyat nodulaire.

I.4.5 Ensemencement et incubation

L'ensemencement du broyat nodulaire sur des boîtes contenant le milieu TA solide additionné au rouge Congo à 0,25%, selon la méthode des trois quadrants. Les différentes boîtes ont été incubées pendant 24 à 72h à 28°C pour l'obtention de colonies isolées (annexe 01).

Les colonies obtenues ont été repiquées sur le même milieu suivant quatre à dix repiquages successifs afin de les purifier en vérifiant la pureté des colonies par des observations microscopiques en passant d'un repiquage à l'autre.

I.4.6 Caractérisation morphologique des colonies

Après purification des bactéries selon la technique de Vincent (1970) et incubation à 28°C pendant 4 à 5 jours, une analyse visuelle de l'aspect des colonies a été faite comme celle décrite par Jordan (1982). Les critères choisis sont relatifs à la forme, la taille et la consistance des colonies.

I.4.7 Vérification de la pureté des souches

➤ Examen microscopique des souches isolées : coloration à la fuchsine

Cette coloration a pour but la vérification de la forme et de la taille des isolats. Elle nous permet de sélectionner à la fois les souches ayant une forme typique des rhizobia (des bâtonnets très courts, courts, et de taille moyenne) en éliminant les formes non typiques à savoir : long et gros bâtonnets ; cocci ; coccobacilles.

Le frottis est préparé en étalant une goutte de suspension bactérienne sur la lame, et le recouvrir de fuchsine pendant 30 secondes. Après rinçage à l'eau distillée et séchage l'observation se fait à l'objectif à immersion (×100).

➤ **Vérification de la pureté des souches par Coloration Gram**

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec Bensen.
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram⁺ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram⁻ qui apparaissent distinctement rosâtres.

I.4.8 Stockage des isolats

Les isolats purifiés après plusieurs cycle de repiquages, examinées au microscope ont été maintenus à 4°C dans des tubes contenant du milieu Tryptone Agar (Ty) dépourvu de rouge Congo à gélose inclinée, et ont été également mis en conservation à -18°C dans des éppendorfs contenant chaque isolat mélangé avec une solution de glycérol à 20 % et à 50 %.

II. Caractérisation symbiotique des isolats

II.1 Test de nodulation *in vitro*

La capacité d'induire la formation de nodosités sur les racines de *Medicago ciliaris* L. est un critère de base dans la caractérisation des isolats. L'authentification nous permet d'évaluer le pouvoir infectieux des isolats et les souches de références vis-à-vis les plantules de *Medicago ciliaris* L.

II.1.1 Germination aseptique des graines

Les graines ont été scarifiées et désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 50% pendant 30 min avec agitation, rincées plusieurs fois rapidement avec de l'eau distillée stérile puis réalisé deux cycles de rinçages a raison de 10 min pour chaque cycle ; réalisé le dernier rinçage avec agitation pendant une heure . Les graines bien imbibées ont été transférées dans des boites de Pétri contenant de l'eau gélosée à 0,7 % (w/v), les boites sont incubées à la température ambiante pendant 48h. Le taux de germination est de 100 %

II.1.2 Conditions de culture des plantules de *Medicago ciliaris* L.

Les pots et les tubes sont placés dans des conditions de culture bien déterminées avec une photopériode lumière/obscurité de 16h / 8h et un cycle de température jour/nuit. Deux pots et trois tubes sont prévus pour chaque condition testée.

II.1.3 Culture et inoculation des plantules de *Medicago ciliaris* L.

Les graines bien germées et dont la longueur de la radicule varie de 2.5 cm de long ont été transférées dans des tubes contenant le milieu BNM (buffered nod medium). Chaque plantule a été inoculée par 0.3 ml d'une suspension bactérienne fraîchement préparée. Les compositions des solutions stocks et du milieu utilisé sont présentées (Annexe 03).

L'évaluation de la croissance des isolats et les souches de référence : *Sinorhizobium meliloti* (Rm41), *Sinorhizobium meliloti* (Rm1021), *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium medicae*, *Agrobacterium tumefaciens* (C58), *Rhizobium leguminosarum* (biovar. *Viciae*) (Annexe 04) a été estimé par la lecture de la densité optique (DO) à 600 nm, trois tubes ont été utilisés pour chaque souche. Des plantes non inoculées ont été utilisées comme témoin (T₀).

II.2 Test de nodulation en pot

II.2.1 Préparation des pots et du substrat

Nous avons lavé du sable à grande eau jusqu'à ce qu'il soit débarrassé de toutes impuretés et débris végétaux. Du gravier a été lavé de la même manière. Le sable et le gravier sont laissés à égoutter pendant une nuit. En parallèle, des pots de cultures sont nettoyés avec de l'eau javellisée pour éliminer toutes traces de bactéries.

Les graines bien germées ont été transférées aseptiquement dans des pots remplis de sable stérile imbibé de 10 ml de la solution de Fahræus modifiée (Barker *et al.*, 2006) (annexe 04) ; à raison de deux graines par pot. Les pots ont été ensuite placés sous les mêmes conditions décrites précédemment pour le test d'authentification des isolats.

Chaque plantule a été inoculée par 0.5 ml d'une suspension bactérienne fraîchement préparée. Les pots sont inoculés deux fois séparé par une période d'une semaine à partir de la première inoculation. Deux pots ont été utilisés pour chaque souche. Après l'inoculation, les plantes ont été arrosées 3 fois par semaine alternativement avec de la solution nutritive dépourvue d'azote et de l'eau distillée stérile. Des plantes non inoculées ont été utilisées comme témoin (T₀) et les souches de référence présentées précédemment comme témoin positif.

II.2.2 Récolte des nodules

II.2.2.1 Culture en milieu liquide en tube

L'apparition des nodosités et le développement de la partie aérienne et racinaire est suivie. Après quarante cinq jours après l'inoculation, les plantes ont été enlevées.

II.2.2.2 Culture en pot

Après deux mois de culture, les plantes ont été déterrées. Les nodosités formées sur les racines de chaque plante ont été dénombrées et le poids sec de la partie aérienne a été mesuré après séchage à 50°C pendant 48 heures.

II.2.3 Caractéristiques symbiotiques : Infectivité et Efficience.

La mesure de l'infectivité se fait par le dénombrement des nodules produits sur les racines de la plante par chaque souche. L'efficience est estimée par la mesure du poids de la matière sèche des parties aériennes des plantes, exprimée en indice relative. Elle représente le pourcentage de gain en matière sèche des parties aériennes des plantes inoculées par rapport aux plantes témoins non inoculés selon la formule suivante:

Indexe relatif d'augmentation du poids sec :
$$\frac{\text{(Poids sec du plant inoculé)}}{\text{(Poids sec du plant non inoculé (T}_0\text{))}}$$

III. Caractérisation préliminaire des isolats

III.1 Croissance sur milieu Tryptone agar additionné de rouge Congo

Ce milieu permet de mettre en évidence la morphologie et les caractéristiques des colonies (couleur, dimension, texture,..). Le milieu utilisé est le Tryptone Agar auquel nous avons additionné le rouge Congo à raison de 0,25 % (P/V), l'incubation a été effectuée à 28°C 72 heures ont suffi pour voir apparaître les colonies bactériennes.

Le rouge Congo est un colorant utilisé à 0.25 % dilué dans de l'eau distillée stérile.

III.2 Croissance sur milieu YEMA au glutamate FeCl₃ et bleu de bromothymol

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YEMA a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré le bleu de bromothymol à une concentration de 0,5 % (P/V) Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 24 heures (Annexe 01).

Le virage a été identifié par le changement de la coloration du milieu. Une coloration jaune indique une acidification et une coloration bleu foncé indique une alcalinisation.

Le bleu de bromothymol ou BTB est un colorant utilisé à 0.5 % d'éthanol (P/V).

III.3 Croissance sur milieu Peptone Glucose Agar GPA au pourpre de bromocrésol

Le milieu utilisé est le Peptone Glucose Agar (GPA) auquel nous avons additionné 10 ml par litre d'une solution alcoolique de pourpre de bromocrésol à une concentration de 1% (P/V) (Singh *et al.*, 2008), l'incubation a été effectuée 28 °C ; la lecture se fait à partir de 24 heures allant jusqu'à 5 jours d'incubation (Vincent 1970) (Annexe 02).

Le pourpre de bromocrésol 1g BCP dans 100 ml d'éthanol (p/v).

III.4 Test distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Le test distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (3 - cétolactose) : Ce test qui permet de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium*. Le test 3-cétolactose se base sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides et la recherche de l'enzyme 3 céto-glucosidase sur milieu lactosé (Bernaerts et De Ley, 1963).

La présence du 3-cétolactose se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu_2O autour des colonies. Seules les souches d'*Agrobacterium spp.* produisent l'enzyme 3-cétoglucosidase.

Les souches sont mises en culture à 28°C pendant trois jours sur le milieu contenant du glucose et carbonate de calcium; ensuite une anse de ce milieu est repiquée sur milieu solide contenant le lactose, enfin la révélation est mise en évidence par l'inondation des boîtes avec le réactif de Benedict à température ambiante (Annexe 02).

La présence de l'enzyme 3 cétoglucosidase se manifeste après environ 1 heure par la formation d'un halo jaune de Cu_2O de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict.

IV Caractérisation phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique des différentes souches nodulant *Medicago ciliaris* L. nous permettra d'une part de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches. Différents tests phénotypiques ont été réalisés sur 37 souches nodulant *Medicago ciliaris* L. et les 6 souches de références.

Le milieu YEM solide est utilisé pour l'ensemble des tests entrepris. Les boîtes de Pétri sont subdivisées en petits secteurs (9 carrés) dont chacun estensemencé avec 10 μl d'une préculture fraîchement préparée, de densité optique voisine de 1, à raison d'une souche par secteur. Les cultures sont incubées à 28°C pendant une semaine et la lecture est effectuée par comparaison de la croissance aux témoins.

IV.1 Tolérance à la salinité

La tolérance des souches à la salinité est évaluée par détermination de la croissance sur milieu YEM solide additionné de NaCl à des concentrations 0 ; 0.01 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4%, (P/V). Les boîtes de Pétri sont inoculées à partir des précultures bactériennes préparées sur milieu Tryptone agar.

La croissance des bactéries est estimée par l'importance du diamètre de la colonie en comparaison à des témoins sans sel.

IV.2 Tolérance à la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YEM solide à différentes températures : 28 ; 37 ; 40 ; 42 et 45⁰C (Hung et *al.*, 2005).

IV.3 Tolérance au stress hydrique

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance au stress hydrique osmotique. Le produit utilisé à ce propos est le polyéthylène glycol (PEG 4000). Les potentiels osmotiques testés sont : 10 ; 15 ; 20 et 25% (P/V).

IV.4 Tolérance au pH

La tolérance des souches bactériennes aux pHs acides et alcalins est réalisée sur milieu YEM solide à 0,1% NaCl. Le pH a été ajusté aux valeurs suivantes : 4.5 ; 5.5 ; 6.8 ; 8 et 9 (kucuk et *al.*, 2006).

IV.5 Résistance intrinsèque aux antibiotiques

La résistance intrinsèque des souches bactériennes est déterminée sur le milieu YEM solide nous avons utilisé les antibiotiques sous formes de disque suivants: streptomycine 10 µg ; acide nalidixique 30 µg ; kanamycine 30 µg ; ampicilline 10 µg ; chloramphénicol 30 µg ; tétracycline 30 µg.

La résistance des souches à trois antibiotiques a été testée sur le milieu YMA solide, auquel des antibiotiques ont été ajoutés à une dose de (30 µg /ml). Les antibiotiques utilisés sont : Néomycine ; Erythromycine ; Rifampicine. Les antibiotiques ont été stérilisés par filtration.

V. Caractérisation biochimique

V.1 Test Oxydase

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, une colonie est déposée sur des disques. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive.

V.2 Test de la catalase

Il s'agit de la recherche de la catalase : enzyme importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le principe consiste à prélever une colonie à partir du milieu solide et de la mettre sur une lame stérile, puis ajouter une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 à 10 volumes. La mise en évidence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (Graham et Parker 1964).

V.3 Test sur galerie API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux. La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

V.3.1 Mode opératoire

V.3.1.1 Sélection des colonies

API 20 NE doit être utilisé avec des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux. Certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*...) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE.

Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de

données API 20 NE. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

V.3.1.2 Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

V.3.1.3 Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSIPette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée et emporanément.

V.3.1.4 Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSIPette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente.
- Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.

- Refermer la boîte d'incubation et incuber à $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures (± 2 heures).

V.3.1.5 Lecture et interprétation

V.3.1.5.1 Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO_3 et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO_3 et TRP.

V.3.1.5.2 Test NO_3

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO_3 .
- Après 5 mn, une couleur **rouge** indique une réaction **positive**, à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO_3 .
- Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO_2 ou de N_2) est positive.

La production de N_2 peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

V.3.1.5.3 Test TRP

Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

V.3.1.5.4 Tests d'assimilation

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive.

Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées \rightarrow ou \leftarrow .

V.3.1.5.5 Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21° test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

V.4 Test sur galerie API 50 CH

API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimique permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. L'assimilation de différents substrats carbonés a été testée en utilisant les galeries API (API 50 CH, BioMérieux, France) selon la procédure décrite par Kersters *et al.*, (1984).

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, du a une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur du pH du milieu choisi. Le premier tube sans principe actif, sert de témoin négatif.

La galerie API 50 CH peut être utilisée pour étudiée deux autres voies :

- **L'oxydation** : se traduit par un changement de couleur dans le tube, du a une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur du pH du milieu choisi.
- **L'assimilation** : se traduit par une croissance du microorganisme dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.

Dans ce cas le milieu employé pour l'inoculation des galeries doit être choisi en fonction du métabolisme et des exigences du groupe microbien étudiés

V.4.1 Mode opératoire

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisé dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Compléter la galerie avec la bande 40-49.

V.4.2 Inoculation des galeries

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Éviter la formation des bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- Lorsque le tube seul doit être inoculé, ne pas dépasser la limite supérieure du tube afin de conserver une bonne anaérobiose.
- Lorsque le tube et la cupule doivent être complètement remplis éviter la formation d'un ménisque concave ou convexe.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance du groupe de microorganismes étudiés.

V.4.3 Interprétation

Interpréter chaque test positif (+), négatif (-).

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Isolement des rhizobia sur les différents milieux de culture

Cette étude a pour but de sélectionner le milieu de culture qui favorise la croissance des rhizobia nodulant *Medicago ciliaris* L. Les différentes observations macroscopique et microscopique des isolats sur les milieux testés additionné au rouge Congo sont décrites dans le tableau ci dessus.

Tableau 02 : La croissance des rhizobia sur différents milieux de culture testés

| Milieux de culture | Temps d'incubation | Observation macroscopique des colonies | Observation microscopique des isolats |
|--|--------------------|---|---|
| Milieu n° 01 YEMA classique | 72 h | Absence de croissance | - |
| Milieu n° 02 YEMA au glutamate et FeCl ₃ | 48-72 h | Apparition des colonies bien isolées au bout de 72 h Des colonies mucilagineuses, brillantes, légèrement rose, d'autres colonies rougeâtres. | Majorité de cocci Minorité des courts bâtonnets |
| Milieu n° 03 AS au Chlorure de sodium | 72 h | Croissance faible, apparition de quelques colonies à partir de 72 h Des colonies légèrement roses | Bâtonnets de taille moyenne Observation de quelques bacilles filamenteux |
| Milieu n° 04 TA Tryptone Agar | 72 h | Colonie légèrement rose brillante Colonie blanchâtre, mucilagineuse et brillante. | Majorité court bâtonnets et bâtonnets de taille moyenne Minorité des cocci |

Selon les observations microscopiques des colonies nous avons constaté que le milieu N° 04 montre une meilleure croissance court bâtonnets rosâtre et moins de formes non rhizobial par rapport aux autres milieux testés.

I.1 Caractéristiques morphologiques des isolats

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de *Medicago ciliaris* L., nous avons tenu compte de 37 souches isolés à partir des plants récolté du site

d'échantillonnage et du piégeage dont les colonies absorbent très peu le rouge Congo. Les autres colonies fortement colorées ont été éliminées dont les résultats se trouvent au niveau du tableau 03.

Tableau 03 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats.

| Isolats issus à partir des plants récoltés du site d'échantillonnage | | | | |
|--|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Isolats | Aspect Macroscopique des colonies | Dimension des colonies Ø | Aspect microscopique des isolats | Temps d'incubation |
| Meds01 | Colonie circulaire légèrement rose bombé mucilagineuse | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets un peu gonflés | 72 h |
| Meds02 | Très petite colonie circulaire blanchâtre bombé et brillante | 1 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds04 | Colonie circulaire laiteuse translucide | 1 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds07 | Très petite colonie circulaire blanchâtre | Inférieur à 1 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds08 | Petite colonie circulaire légèrement rose bombé mucilagineuse | 1 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds09 | Très petite colonie circulaire translucide | Inférieur à 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Meds10 | Petite colonie circulaire blanchâtre brillante | Inférieur à 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Meds11 | Colonie circulaire légèrement rose bombé et mucilagineuse | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds12 | Colonie circulaire rose mucilagineuse | 2 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Meds13 | Très petite colonie circulaire transparente | 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Meds14 | Colonie circulaire blanchâtre plate | 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |

Suite du tableau 03 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats.

| Isolats issus à partir des plants récoltés du site d'échantillonnage | | | | |
|--|---|--------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Isolats | Aspect Macroscopique des colonies | Dimension des colonies Ø | Aspect microscopique des isolats | Temps d'incubation |
| Meds15 | Colonie circulaire laiteuse gommeuse | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds16 | Petite colonie circulaire légèrement rose mucilagineuse | 1 mm | très courts bâtonnets un peu gonflés | 72 h |
| Meds18 | Colonie circulaire transparente mucilagineuse | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds20 | Colonie circulaire laiteuse mucilagineuse | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds23 | Colonie circulaire rose mucilagineuse | 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Meds24 | Colonie circulaire blanchâtre plate | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 48 h |
| Meds25 | Colonie circulaire laiteuse translucide | 1 mm | très courts bâtonnets un peu gonflés | 48 h |
| Meds26 | Colonie circulaire légèrement rose opaque | 1 mm | courts bâtonnets | 48 h |
| Meds28 | Colonie circulaire blanchâtre plate | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Meds29 | Colonie circulaire blanchâtre opaque bombe et brillante | 2 mm | courts bâtonnets | 48 h |
| Meds30 | Très petite colonie circulaire translucide | Inférieur à 1 mm | bâtonnets de taille moyenne | 72 h |
| Meds31 | Colonie circulaire rose gommeuse | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 48 h |

Suite du tableau 03 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats.

| Isolats issus à partir des plants récoltés après piégeage | | | | |
|---|--|--------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Isolats | Aspect Macroscopique des colonies | Dimension des colonies Ø | Aspect microscopique des isolats | Temps d'incubation |
| Medp01 | Colonie circulaire légèrement rose opaque gommeuse | Inférieur à 3 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Medp03 | Colonie circulaire transparente mucilagineuse | Inférieur à 2 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Medp04 | Colonie circulaire légèrement rose gommeuse | 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Medp05 | Petite colonie circulaire blanchâtre plate | 1 mm | très courts bâtonnets un peu gonflés | 72 h |
| Medp06 | Colonie circulaire transparente plate | 1 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Medp07 | Petite colonie circulaire légèrement rose mucilagineuse | 1 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Medp09 | Petite colonie circulaire blanchâtre plate | 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Medp10 | Colonie circulaire légèrement rose gommeuse | Inférieur à 3 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Medp12 | Colonie circulaire légèrement rose gommeuse opaque | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Medp13 | Colonie circulaire légèrement rose mucilagineuse à contour lisse | 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |

Suite du tableau 03 : Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats.

| Isolats issus à partir des plants récoltés après piégeage | | | | |
|---|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Isolats | Aspect Macroscopique des colonies | Dimension des colonies Ø | Aspect microscopique des isolats | Temps d'incubation |
| Medp14 | Petite colonie circulaire laiteuse bombé et brillante | 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Medp17 | Très petite colonie circulaire translucide | 1 mm | très courts bâtonnets | 72 h |
| Medp18 | Colonie circulaire laiteuse opaque | Inférieur à 2 mm | courts bâtonnets | 72 h |
| Medp19 | Très petite colonie transparente | Inférieur à 1mm | très courts bâtonnets | 72 h |

La majorité des souches purifiées présentaient une couleur blanchâtre, transparente, légèrement rose, un aspect muqueux. Freitas et *al.*, (2014) ont rapporté que des colonies blanches et crémeuses également prédominé . Les colonies isolées avaient un contour régulier, et étaient plus au moins bombées. Sous le microscope, elles se présentent sous forme de court et très court batonnets ce qui est en accord avec les caractères morphologiques déjà décrit pour les rhizobia dans la littérature (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

II. Caractérisation symbiotique des isolats

II.1 Test de nodulation *in vitro*

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 nodosités formées 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 par rapport au témoin non inoculé. L'expérience a été menée en tube sous des conditions contrôlées au laboratoire.

Ce premier test est un essai pour évaluer la capacité de nos isolats d'infecter les racines de *Medicago ciliaris* L. de former des nodules à partir de laquelle ont été isolées.

Après une période de culture de 45 jours sous des conditions contrôlées, les plants sont prélevés pour évaluer la formation des nodules. La partie aérienne est bien développée avec des feuilles bien formées vertes

Les résultats obtenus montrent que *Medicago ciliaris* L. a pu être nodulé par tous les isolats testés. La localisation des nodosités sur le système racinaire des plants a montré également une grande variabilité. Les nodosités ont été localisées en grande majorité sur les racines secondaires. La forme des nodosités s'est révélée également très diversifiée tout en reflétant les deux formes des nodosités connues : déterminée ou indéterminées.

L'étude de l'infectivité révèle un nombre particulièrement élevé des nodules sur les racines de *Medicago ciliaris* L. inoculé par des souches isolées à partir des nodules issues du site d'échantillonnage, contrairement aux racines de plants inoculés par des souches isolées à partir des nodules issues du piégeage est nettement moins nodulé à l'exception la souche Medp 25 qui a donné de bon résultat (tableau 04).

Nous avons observé des nodules de couleur rosâtre par la plupart des souches testées. Cette couleur est due à la présence d'un pigment, la leghémoglobine ; l'apparition de ce pigment dans le nodule indique la fixation d'azote.

Concernant les souches de références, nous avons constaté un nombre élevé de nodules sur les racines de *Medicago ciliaris* L. inoculé par les souches *Sinorhizobium meliloti* (Rm41) et *Sinorhizobium meliloti* (Rm 1021).

Bien que la plupart des espèces de *Medicago* forment des symbioses avec les deux espèces *S. meliloti* et *S. medicae* (Brunel et al., 1996., Rome et al., 1996), il devient évident que plusieurs espèces de *Medicago* peuvent avoir des affinités différentes pour des infections par ces deux espèces de rhizobia.

La réponse des plantes à l'inoculation montre différentes efficacités. L'augmentation du poids de la matière sèche de la partie aérienne des plants inoculés par nos isolats a dépassé celui des plants non inoculé (T0) sauf pour la souche Medp 31.

Les plus grandes valeurs ont été obtenues avec les souches Meds1 et Meds12 avec 28.34 et 32.42 mg respectivement.

Tableau 04: Dénombrement des nodules de *M. ciliaris* issues de la nodulation *in vitro*

| Isolats | Nombre moyen de nodosités / plant | Poids sec de la partie aérienne (mg) | Aspect des nodosités | Indexe relative | Infectivité et effectivité |
|---------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| To | 0.00 | 12,30 ± 3,54 | Aucun nodule | - | Nod ⁺ Fix ⁻ |
| MedS01 | 4.33 ± 0.50 | 28,34 ± 7,18 | Det et Indet RS | 2,30 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS02 | 7.60 ± 1.35 | 20,69 ± 4,12 | Det et Indet RS et BL | 1,68 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS04 | 4.33 ± 0.95 | 19,73 ± 6,28 | Indet RS | 1,60 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS07 | 9.33 ± 1.21 | 12,76 ± 2,96 | Det et Indet RS | 1,04 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS08 | 3.67 ± 1.87 | 18,34 ± 6,42 | Indet RS | 1,49 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS09 | 3.67 ± 0.92 | 17,19 ± 2,77 | Indet RS | 1,40 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS10 | 2.33 ± 0.95 | 19,68 ± 3,34 | Det et Indet , Mas RS BL | 1,60 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS11 | 4.67 ± 0.92 | 16,98 ± 1,16 | Det et Indet RS et BL | 1,38 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS12 | 4.33 ± 1.89 | 18,76 ± 5,25 | Det et Indet RS | 1,53 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS13 | 9.00 ± 2.82 | 16,63 ± 2,96 | Det et Indet RS | 1,35 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS14 | 6.00 ± 0.81 | 14,97 ± 0,99 | Det et Indet RS | 1,22 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS15 | 7.67 ± 2.48 | 32,42 ± 3,87 | Det et Indet RS et BL | 2,64 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS16 | 4.00 ± 2.16 | 15,61 ± 2,65 | Indet RS | 1,27 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS20 | 2.67 ± 2,04 | 17,39 ± 0,92 | Indet RS | 1,41 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS23 | 6,00 ± 0,81 | 20,90 ± 4,47 | Det et Indet RS | 1,70 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS24 | 5,80 ± 1,16 | 16,75 ± 3,38 | Det et Indet RS et BL | 1,36 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS25 | 4,33 ± 0,95 | 15,48 ± 6,68 | Det et Indet RS | 1,26 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS26 | 3,67 ± 5,18 | 13,67 ± 5,1 | Indet RS | 1,11 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS28 | 3,83 ± 2,48 | 12,84 ± 2,45 | Det et Indet, Mas RS BL | 1,04 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS29 | 2,66 ± 2,29 | 17,54 ± 8,44 | Det et Indet RS et BL | 1,43 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS30 | 5,33 ± 2,06 | 15,78 ± 3,55 | Det et Indet RS | 1,28 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS31 | 4,16 ± 3,89 | 11,54 ± 5,08 | Det et Indet RS et BL | 0,94 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS32 | 5,00 ± 2,00 | 22,42 ± 7,3 | Det et Indet RS et BL | 1,82 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP01 | 4,00 ± 2,51 | 15,49 ± 5,22 | Det et Indet RS et BL | 1,26 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP03 | 9,33 ± 1,27 | 14,20 ± 3,91 | Det et Indet RS | 1,15 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP04 | 3,00 ± 0,81 | 15,14 ± 2,76 | Indet RS | 1,23 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP05 | 2,67 ± 1,24 | 11,82 ± 2,16 | Det et Indet RS | 0,96 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP06 | 2,67 ± 1,24 | 22,00 ± 6,39 | Indet RS | 1,79 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP07 | 7,00 ± 0,00 | 25,41 ± 1,55 | Det et Indet RS et BL | 2,07 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP09 | 4,16 ± 3,81 | 19,71 ± 5,17 | Det et Indet, Mas RS BL | 1,60 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP10 | 2,33 ± 2,62 | 9,46 ± 6,8 | Det et Indet RS | 0,77 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP12 | 6,67 ± 0,42 | 19,80 ± 5,29 | Det et Indet RS | 1,61 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP13 | 4,00 ± 3,05 | 14,01 ± 2,93 | Det et Indet, Mas RS | 1,14 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP14 | 4,67 ± 2,04 | 13,18 ± 3,25 | Det et Indet RS et BL | 1,07 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP17 | 3,20 ± 1,93 | 15,50 ± 6,32 | Det et Indet RS et BL | 1,26 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP18 | 3,67 ± 2,35 | 13,53 ± 3,06 | Det et Indet RS et BL | 1,10 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP19 | 3,67 ± 3,08 | 18,71 ± 8,99 | Det et Indet RS et BL | 1,52 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Rm 41 | 13,67 ± 3,28 | 14,87 ± 2,22 | Det et Indet, Mas RS | 1,21 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Rm1021 | 12,67 ± 3,38 | 18,16 ± 3,16 | Det et Indet, Mas RS | 1,48 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Sin 01 | 5,67 ± 2,86 | 15,20 ± 4,44 | Det et Indet RS | 1,24 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Sin 02 | 6,67 ± 3,08 | 13,41 ± 3,8 | Det et Indet, Mas RS | 1,09 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| C58 | 3,00 ± 2,16 | 17,13 ± 2,71 | Indet RS | 1,39 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| R05 | 4,67 ± 2,04 | 14,38 ± 3,18 | Det et Indet RS | 1,17 | Nod ⁺ Fix ⁺ |

RS : rose, BL : blanche, Det : Déterminé, Indet : Indéterminé, Mas : Massue ^a une moyenne ± écart-type

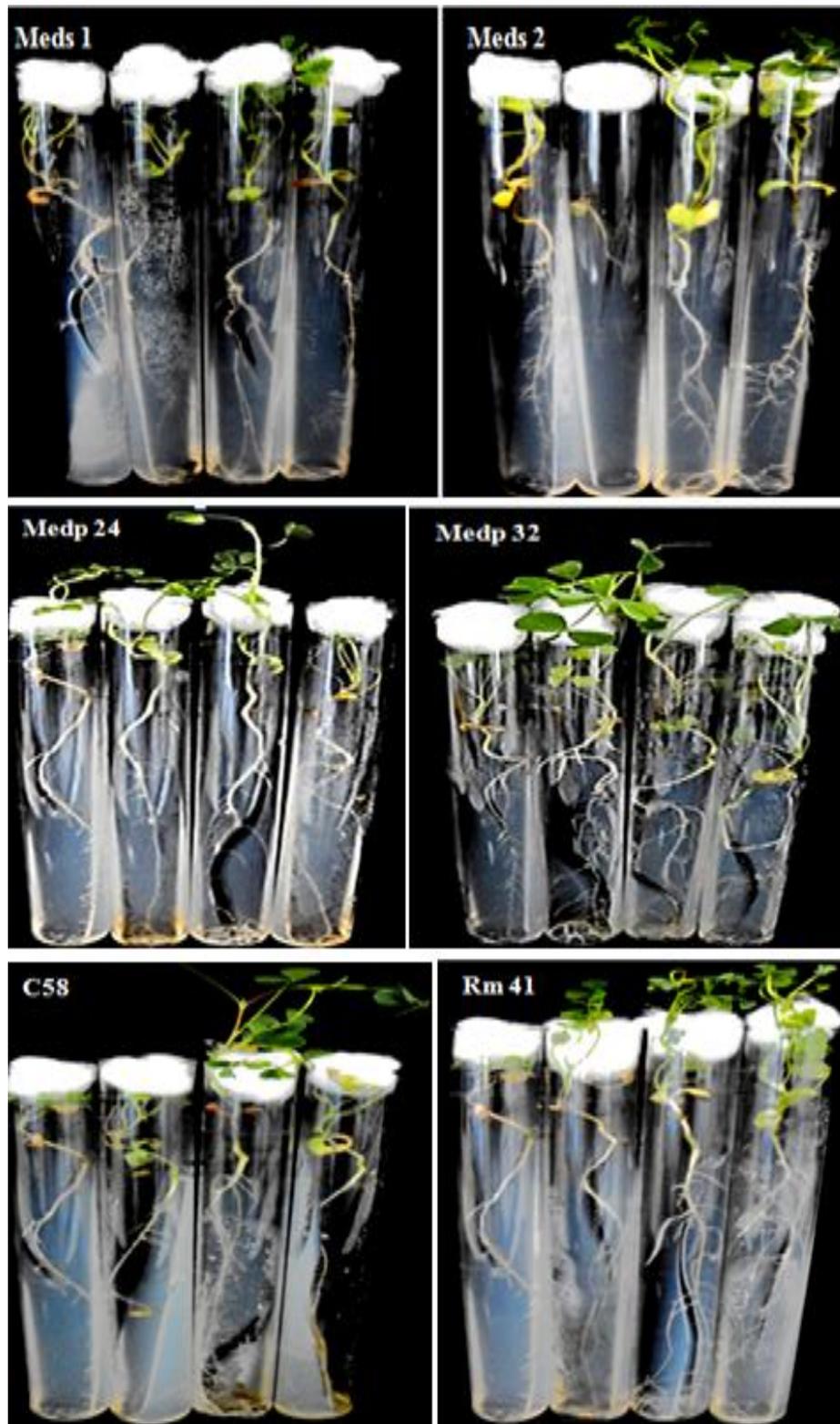


Figure 13: La nodulation *in vitro*.

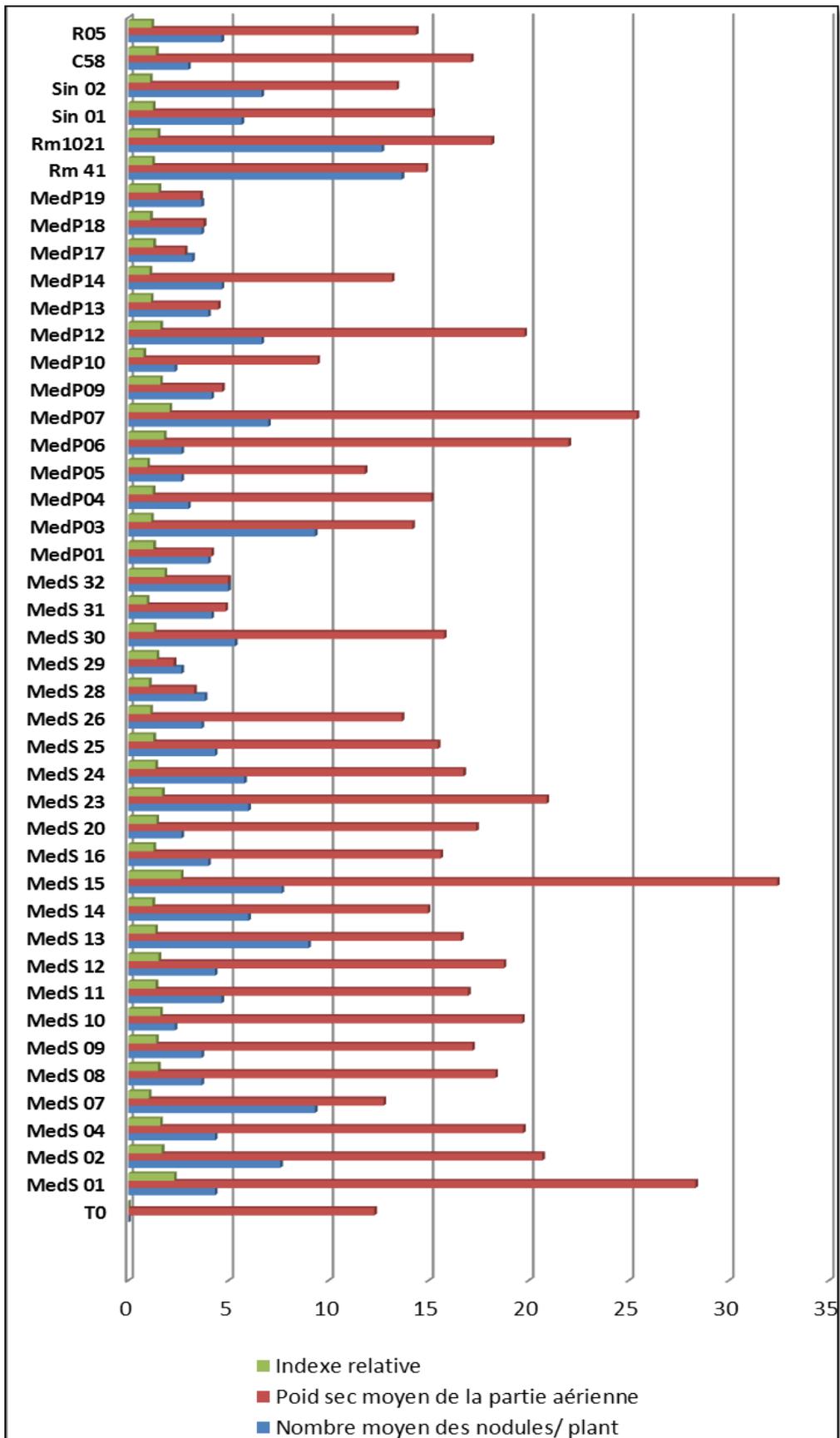


Figure 14: Infectivité et effectivité et l'indexe relative des isolats nodulant *M. ciliaris* L. issus de la nodulation *in vitro*.

II. 2 Test de nodulation en pot

II. 2. 1 Premier essai de nodulation

Tableau 05 : Liste des souches nodulantes *M. ciliaris* L. du 1^{er} essai de la nodulation *in vivo*

| Isolats | Nombre moyen de nodosités / plant | Aspect des nodosités | Infectivité et effectivité |
|---------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| T0 | 2.75 | Det et Indet RS et BL | Nod+Fix+ |
| MedS01 | 4.00 | Indet et Mas RS, et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS02 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS04 | 1.25 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS07 | 1.00 | Det et Indet BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS08 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS09 | 1.00 | Indet RS | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS10 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS11 | 2.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS12 | 2.25 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS13 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS14 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS15 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS16 | 1.67 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS20 | 2.50 | Det et Indet, BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS23 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS24 | 1.00 | ND | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS25 | 2.67 | Det et Mas BL | Nod+Fix+ |
| MedS26 | 1.00 | Indet, RS et BL | Nod+Fix+ |
| MedS28 | 0.50 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS29 | 3.50 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS30 | 3.00 | Det et Mas BL | Nod+Fix+ |
| MedS31 | 1.25 | Det et Indet, BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS32 | 1.75 | Indet, Mas RS | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP01 | 2.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP03 | 4.75 | Det et Indet BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP04 | 2.67 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP05 | 2.00 | Det BL | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP06 | 6.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP07 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP09 | 5.50 | Indet, BL | Nod+Fix+ |
| MedP10 | 3.75 | Det et Mas RS et BL | Nod+Fix+ |
| MedP12 | 4.00 | Indet, BL | Nod+Fix+ |
| MedP13 | 2.50 | Det et Indet, Mas RS | Nod+Fix+ |
| MedP14 | 1.50 | Indet, BL | Nod+Fix+ |
| MedP17 | 1.75 | Det et Indet BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP18 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP19 | 11.50 | Det et Mas RS et BL | Nod+Fix+ |
| Sm | 2.00 | Indet et Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| 1SR | 4.25 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| 2SR | 4.00 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |

RS : rose, BL : blanche, Det : Déterminé, Indet : Indéterminé, Mas : En Massue, ND : non développé

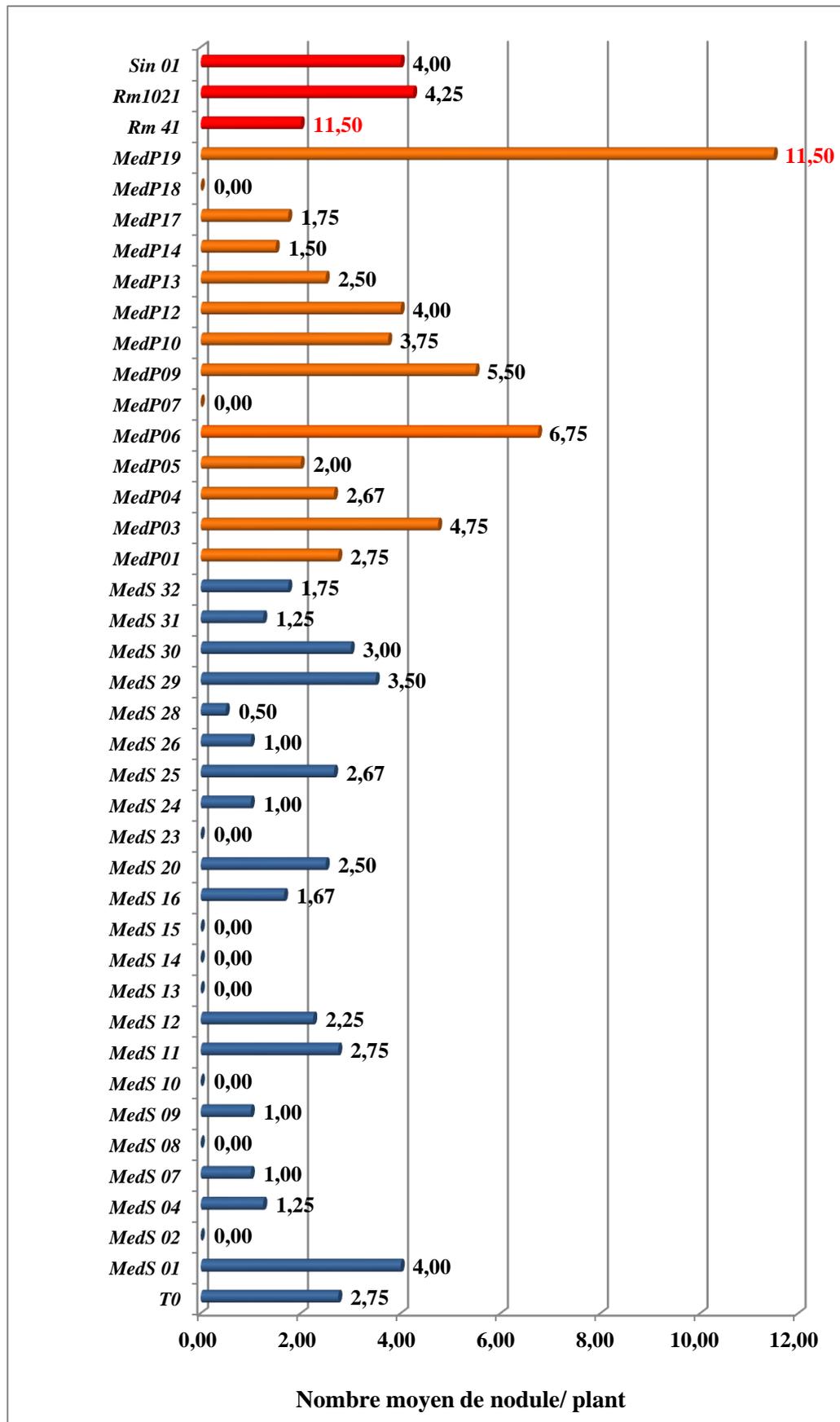


Figure 15: Infectivité des isolats nodulant *M. ciliaris* issus du 1^{er} essai de nodulation

II. 2. 2 deuxième essai de nodulation

Le tableau suivant présente les résultats du deuxième essai de la nodulation

Tableau 06 : liste des souches nodulantes *M. ciliaris* L. du 2^{ème} essai de la nodulation

| Isolats | Nombre moyen de nodosités / plant | Aspect des nodosités | Infectivité et effectivité |
|---------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| To | 0.00 | - | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS01 | 7.25 | Det et Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS02 | 12.50 | Det et Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS04 | 8.25 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS07 | 6.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS08 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS09 | 13.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS10 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS11 | 21.00 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS12 | 16.50 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS13 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS14 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS15 | 10.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS16 | 1.75 | Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS20 | 13.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS23 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS24 | 19.00 | Det et Indet, RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS25 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS26 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS28 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS29 | 12.00 | Det et Indet, RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS30 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedS31 | 14.00 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS32 | 13.25 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP01 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP03 | 9.50 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP04 | 9.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP05 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP06 | 14.50 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP07 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP09 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP10 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP12 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP13 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP14 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP17 | 7.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP18 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| MedP19 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |
| Rm 41 | 14.75 | Det et Indet, RS | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Rm1021 | 8.25 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Sin 01 | 5.25 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Sin 02 | 7.75 | Det et Indet, Mas RS et BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| C58 | 4.50 | Det, Mas BL | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| R05 | 0.00 | ND | Nod ⁻ Fix ⁻ |

RS : rose, BL : blanche, Det : Déterminé, Indet : Indéterminé, Mas : En Massue, ND : non développé

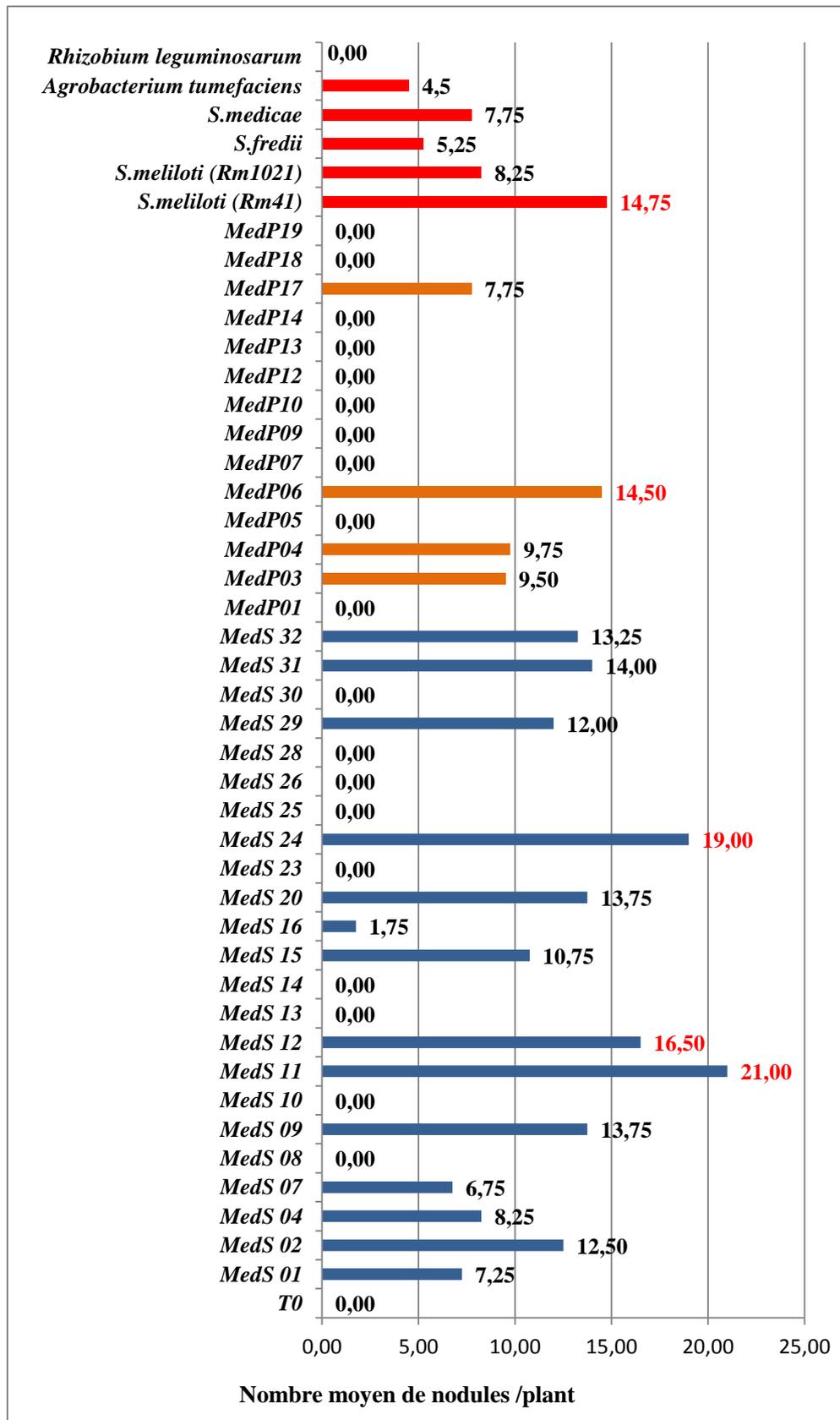


Figure 16: Infectivite des isolats nodulant *M. ciliaris* issus du 2^{eme} essai de nodulation

II. 2. 3 Troisième essai de nodulation

Tableau 07 : liste des souches nodulantes *Medicago ciliaris* L. du 3^{ème} essai de nodulation

| Isolats | Nombre moyen de nodosités / plant | Poids sec de la partie aérienne (mg) | Aspect des nodosités | Indexe relative | Infectivité et effectivité |
|---------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| To | 00 | 37,34 ± 17,94 ^a | Aucun nodule | - | Nod ⁺ Fix ⁻ |
| MedS01 | 12.5 ± 1.11 ^a | 58,61 ± 16,81 | Det et Indet RS | 1,56 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS02 | 13 ± 1.22 | 52,79 ± 9,27 | Det et Indet RS | 1,41 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS04 | 13 ± 1.58 | 52,44 ± 16,73 | Det et Indet RS | 1,40 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS07 | 11.25 ± 4.81 | 66,13 ± 18,49 | Det et Indet RS | 1,77 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS08 | 13.5 ± 4.76 | 49,25 ± 9,37 | Det et Indet RS | 1,31 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS09 | 12.25 ± 3.96 | 66,33 ± 7,12 | Indet RS | 1,77 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS10 | 15.75 ± 1.29 | 86,67 ± 33,39 | Det et Indet RS | 2,32 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS11 | 12.5 ± 1.50 | 51,35 ± 2,43 | Det et Indet , Mas RS | 1,37 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS12 | 13.75 ± 7.29 | 51,71 ± 16,76 | Det et Indet , Mas RS | 1,38 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS13 | 12.75 ± 4.86 | 47,80 ± 8,51 | Det et Indet , Mas RS | 1,28 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS14 | 16 ± 3.08 | 72,02 ± 24,77 | Det et Indet , Mas RS | 1,92 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS15 | 15.25 ± 1.78 | 74,75 ± 12,40 | Det et Indet , Mas RS | 2,00 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS16 | 11 ± 3.08 | 47,91 ± 8,76 | Det et Indet , Mas RS | 1,28 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS20 | 14 ± 2.54 | 63.51 ± 10.78 | Det et Indet RS | 1.70 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS23 | 12 ± 2.91 | 91.77 ± 30.88 | Det et Indet , Mas RS | 2.45 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS24 | 14 ± 4.30 | 88.90 ± 39.91 | Det et Indet RS | 2.38 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS25 | 7.25 ± 1.29 | 61.85 ± 10.61 | Det et Indet RS | 1.65 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS26 | 16.5 ± 2.59 | 79.45 ± 9.24 | Det et Indet RS | 2.12 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS28 | 6.25 ± 0.82 | 42.69 ± 5.43 | Det et Indet RS | 1.14 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS29 | 9.5 ± 5.17 | 44.73 ± 7.87 | Det et Indet , Mas RS | 1.19 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS30 | 5.50 ± 2.06 | 39.57 ± 2.75 | Det et Indet , Mas RS | 1.05 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS31 | 19 ± 2.73 | 67.65 ± 18.15 | Det et Indet RS | 1.81 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedS32 | 19 ± 2.73 | 67.65 ± 18.15 | Det et Indet RS | 1.81 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP01 | 12.25 ± 4.81 | 45.73 ± 16.19 | Det et Indet RS | 1.22 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP03 | 12 ± 5.61 | 40.96 ± 12.11 | Det et Indet RS | 1.09 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP04 | 6 ± 3.08 | 58.61 ± 3.81 | Det et Indet , Mas RS | 1.56 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP05 | 12.25 ± 4.96 | 64.44 ± 11.82 | Det et Indet , Mas RS | 1.72 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP06 | 12 ± 4.06 | 48.13 ± 26.49 | Det et Indet RS | 1.28 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP07 | 9.25 ± 2.38 | 37.57 ± 7.32 | Det et Indet RS | 1.00 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP09 | 4.25 ± 1.47 | 62.73 ± 5.19 | Indet , Mas RS | 1.67 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP10 | 12.25 ± 1.47 | 44.98 ± 4.03 | Det et Indet , Mas RS | 1.20 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP12 | 12.75 ± 2.38 | 44.62 ± 6.49 | Det et Indet , Mas RS | 1.19 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP13 | 13.75 ± 3.11 | 54.38 ± 5.26 | Det et Indet RS | 1.45 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP14 | 7.25 ± 3.96 | 32.77 ± 11.23 | Det et Indet RS | 0.87 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP17 | 7.25 ± 0.82 | 61.52 ± 15.86 | Det et Indet , Mas RS | 1.64 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP18 | 9.75 ± 2.16 | 59.55 ± 13.61 | Det et Indet RS | 1.59 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| MedP19 | 8.25 ± 4.14 | 40.93 ± 11.49 | Det et Indet , Mas RS | 1.09 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Rm 41 | 19.5 ± 6.5 | 78.51 ± 17.61 | Det et Indet , Mas RS | 2.10 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Rm1021 | 19 ± 4.63 | 81.75 ± 13 | Det et Indet RS | 2.18 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Sin 01 | 5.25 ± 0.82 | 71.95 ± 27.91 | Det et Indet , Mas RS | 1.92 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| Sin 02 | 12.25 ± 2.77 | 64.40 ± 20.37 | Det et Indet , Mas RS | 1.72 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| C58 | 2.25 ± 1.78 | 43.61 ± 8.35 | Det et Indet RS | 1.16 | Nod ⁺ Fix ⁺ |
| R05 | 5.25 ± 2.86 | 61.70 ± 11.49 | Det et Indet RS | 1.65 | Nod ⁺ Fix ⁺ |

RS : rose, BL : blanche, Det : Déterminé, Indet : Indéterminé, Mas : Massue ^a une moyenne ± écart-type

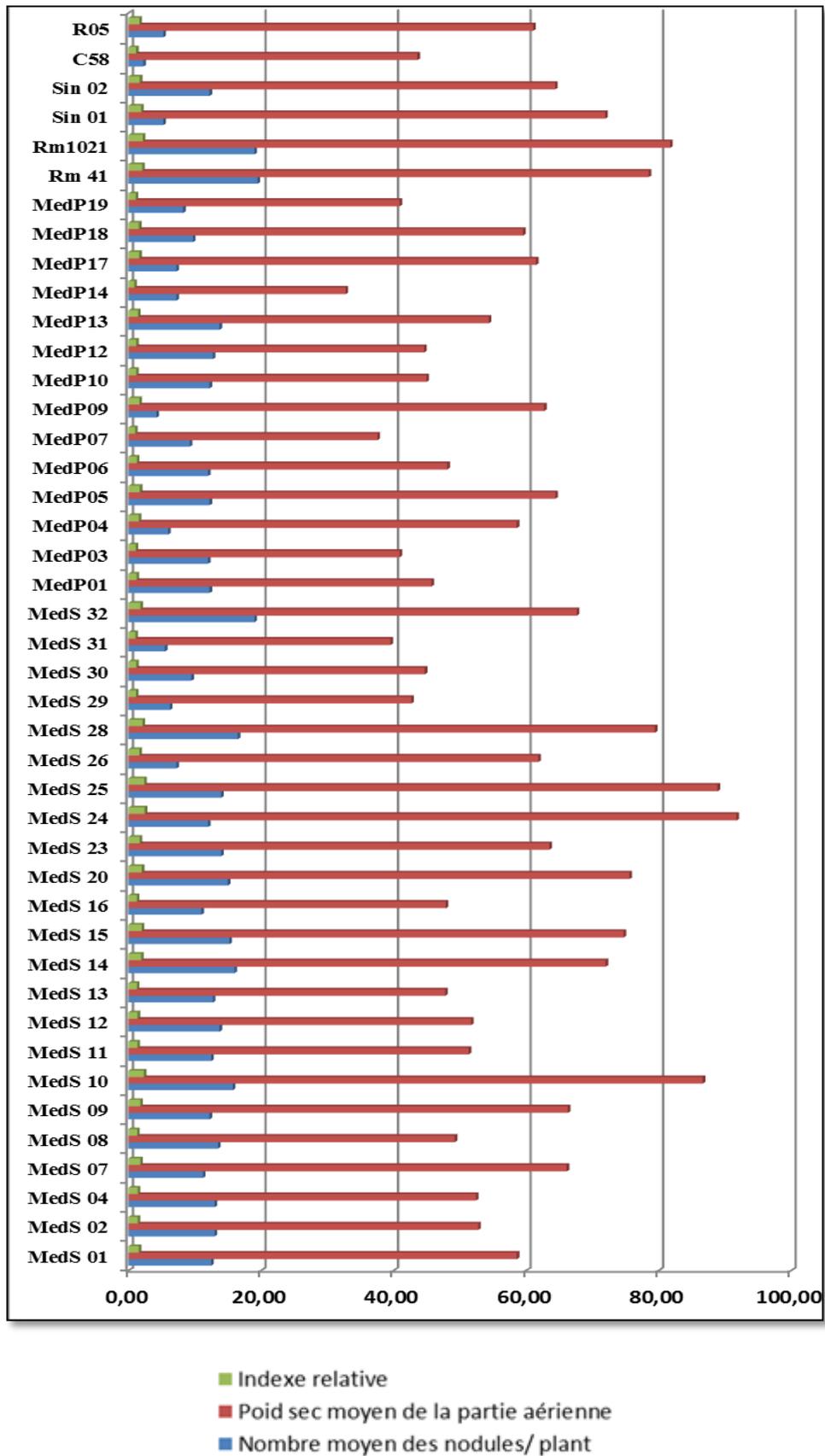


Figure 17: Infectivité et effectivité et l'indexe relative des isolats nodulant *M. ciliaris* L. issus de troisième essai de la nodulation *in vivo*.

II. 2. 4 Discussion générale des trois essais de nodulation en pot

Nous avons réalisé le premier essai de nodulation en utilisant un mélange de substrat constitué de sable /argile et une photosynthèse artificielle de 16/8 h de lumière /obscurité. Deux mois après l'inoculation, toutes les plantes se portent bien avec une partie aérienne bien verte, elles sont déracinées pour effectuer le dénombrement des nodosités.

L'échec de cet essai, nous avons remarqué un bon développement de la partie aérienne tandis que la partie racinaire n'a été pas bien développée. Les souches induisent une nodulation, mais celle-ci est très faible. En effet 8 souches testées n'ont pas nodulé, et seulement 29 souches ont nodulé et les nodosités sont peu nombreuses et recouvertes d'un champignon à la surface (1 à 20 par plant) .Nous avons noté une nodulation positive du témoin non inoculé. Ce résultat est surprenant car le témoin ne devrait pas noduler.

Ce résultat pourrait être expliqué par la présence d'azote dans le sable ou une contamination par l'azote des produits composant la solution nutritive. Nous avons suggéré que l'échec de cet essai est dû aussi à la période pendant laquelle a été lancé puisque durant cette période on a rencontré un problème concernant la croissance des plantules à cause de la haute température au laboratoire. La contamination des parties racinaires par le champignon peut être due à la mauvaise qualité des graines. L'observation de graines testées sous la loupe binoculaire nous a confirmé que les surfaces des graines ont été abîmées. Différentes hypothèses peuvent expliquer les résultats de nos expériences d'inoculation. La présence de l'azote dans le milieu de culture (sable ou solution nutritive) permettrait à la plante de se trouver dans de bonnes conditions de culture et ainsi la symbiose serait inhibée.

Une autre possibilité serait que les bactéries, qui à l'origine sont infectives, perdent leurs informations symbiotiques dans le nodule ou lors de leur isolement ou leur culture comme ce qui a pu être montré par Valérie Macheret (Macheret, 1997) pour *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Afin de répondre à ces hypothèses, la solution nutritive aurait dû être dosée pour s'assurer de l'absence de contamination par l'azote qui interférerait avec l'inoculation. Les résultats obtenus montrent une large variabilité de la capacité infective des souches a été mise en évidence. (tableau 05).

Nous avons réalisé un deuxième essai de nodulation en utilisant uniquement le sable et une photosynthèse naturelle. Les isolats testés de *Medicago ciliaris* L. ont montré une grande diversité dans leur capacité à infecter la plante hôte et de fixer l'azote atmosphérique. Le nombre moyen de nodule par plant variait de 1.75 pour la souche Meds16 à 21 pour la souche Meds11, étant la souche la plus infective. Nous avons noté que beaucoup des plantes n'ont pas développé nous avons suggère que l'échec de ce test est dû aussi à la période pendant laquelle a été lancé l'essai, puisque durant le mois de mai nous avons rencontré un problème concernant la croissance des plantules à cause de la haute température au laboratoire.

Etant donné que les expériences précédente n'a pas eu le succès escompté, nous avons voulu vérifier l'efficacité et l'infectivité des souches en prenant en considération le facteur température dans laquelle nous avons réalisé la nodulation afin d'obtenir un grand nombre de nodules. Ce troisième essai a été lancé en février 2013.

Six semaine après l'inoculation, toutes les plantes se portent bien avec une partie aérienne bien verte elles sont déracinées pour effectuer le dénombrement des nodosités et pour déterminer le poids de la matière sèche des parties aériennes dont les résultats sont présentés dans le tableau 07. Les 37 isolats et les 6 souches de référence ont été testés pour leur capacité à former des nodules sur les racines de la plante hôtes *Medicago ciliaris* L. sous des conditions de laboratoire contrôlé. Toutes les souches étaient capables de nodulé et les plantes non inoculées utilisés comme control négatifs n'ont pas été nodulés représenté sur la Figure. 17.

Les nodosités se présentaient sous une forme déterminée (ronde) ou indéterminé (allongée) et leur couleur variait de rose à blanche. La couleur rose révélant la présence de la leghémoglobine, un pigment transporteur d'oxygène et un élément indispensable à l'activité de la nitrogénase.

Les souches Meds31 et Meds29 étaient moins infectives, avec une moyenne respective de 5.50 et 6.25 nodules formés par plant pour les souches isolées à partir des nodules issues directement du site d'échantillonnage, tandis que les souches Meds14 et Meds28, Meds32 ont été les plus infectives avec 16 et 16.5, 19 nodules formés par plante respectivement. La souche Medp 09 été moins infective, avec une moyenne de 4.25 nodules formés par plant pour les souches isolées à partir des nodules issues du piégeage, tandis que la souche Medp13 été la plus infective avec une moyenne de 13.75 nodules formés par plante.

Concernant les souches de référence nous avons noté que Rm41 été la souche la plus infective le nombre moyen des nodosités formées par plant est 19.50, La souche C58 la moins infective, a pu induire la formation de 2.25 nodosités. Le rendement de la matière sèche en mg de la partie aérienne le plus élevé a été enregistré pour la souche Meds13 et Medp05 ; Rm41 avec 88.90 et 64.44, 81.75 respectivement le plus faible était de 37.34 pour le control. Les souches les plus infectives étaient aussi les plus efficaces (tableau 07). Pour chaque isolat, l'effet de l'inoculation a été estimé par la détermination de l'indice relative (tableau 07).

Ce résultat montre que la capacité symbiotique de la souche C58 (souches de référence) a formé des nodules racinaire est significativement inférieur à celui de la souche de référence Rm41. Le nombre de nodules racinaires inoculés avec les souches isolées à partir des nodules issues du piégeage est nettement inférieur à celle inoculés avec des souches isolées à partir des nodules issues du site d'échantillonnage. Sullivan et Ronson (1998) a signalé qu'un élément symbiotique de *Mesorhizobium loti* a été transféré dans trois espèces non symbiotiques. Bailly et al., (2007) ont rapporté que plusieurs transferts horizontaux de gènes interspécifiques ont eu lieu au cours de la diversification des symbiotes de *Medicago*. De même, Wong et Golding (2003) ont rapporté qu'une grande partie des gènes *pSym B* à *E. meliloti* sont plus étroitement liés à des gènes dans *Agrobacterium tumefaciens* chromosomes linéaires. Ces rapports soutiennent l'existence des isolats symbiotique appartenant au genre *Agrobacterium* produite par transfert horizontal de gènes symbiotiques.

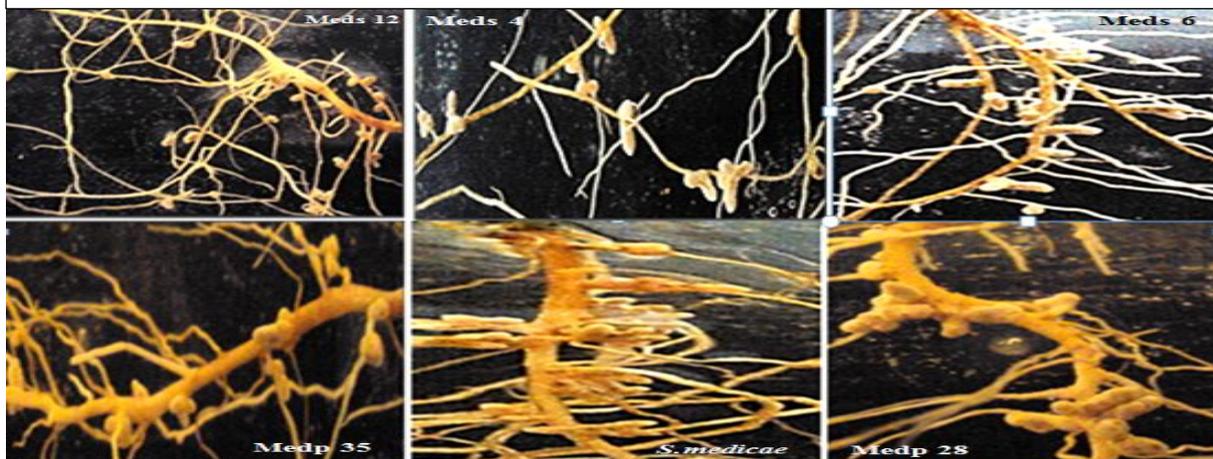
Bien que la plupart des espèces de *Medicago* forment des symbioses avec les deux espèces *S.meliloti* et *S. medicae* (Brunel et al 1996; Rome et al., 1996), il devient évident que plusieurs espèces du genre *Medicago* peuvent avoir des affinités différentes pour des infections par ces deux espèces. Par exemple, Garau et al., (2005) ont démontré que *S. medicae* souvent nodule les genres *Medicago* qui sont adaptées aux sols acides, tandis que *S. meliloti* induit des symbioses avec celles qui poussent au plus alcalin pour les sols neutres. Bena et al., (2005) ont indiqué que la répartition géographique de ces espèces de Rhizobia est apparue lié à l'incidence de l'espèce du genre *Medicago* résultant des caractéristiques des sols.



Premier essai de nodulation



Deuxième essai de nodulation



Troisième essai de nodulation



Figure 18 : Les différents essais de la nodulation en pot

III. Caractérisation préliminaire des isolats sur les différents milieux de culture

III.1 Croissance sur milieu Tryptone agar additionné de rouge Congo

Les isolats absorbent très peu le rouge Congo sur milieu Tryptone Agar. Ceci est observé chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970). Cette propriété est commune avec le genre *Bradyrhizobium* ; par contre le genre *Agrobacterium* absorbe fortement ce colorant (Jordan, 1984). De même Shetta et *al.*, (2011); Vishal et Abhishek, (2014) ont mentionné que les souches de Rhizobia n'absorbent pas le rouge Congo. Selon Somasegaran et Hoben (1994), l'absorption du rouge Congo est le caractère distinctif de LNB (en anglais **symbiotic nitrogen fixation, ou biological nitrogen fixation, BNF**) avec seulement quelques exceptions.

Ces caractères, propres aux bactéries nodulant les légumineuses, en particulier le genre appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Vincent, 1970; Somasegaran et Hoben., 1994) (Figure 19).

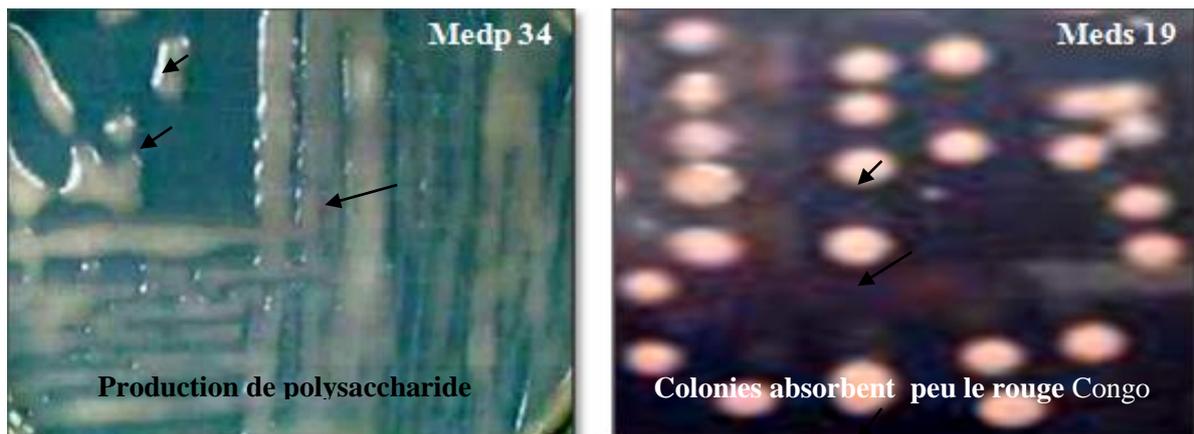


Figure 19: Aspect macroscopique des isolats sur le milieu Tryptone Agar

III.2 Croissance sur milieu YEMA au bleu de bromothymol

Les résultats de ce test sont indiqués dans le tableau 10. En fait, le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6.

Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du bleu vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleue (Figure 20).



Figure 20 : Aspect des isolats sur milieu YMA additionné bleu de bromothymol

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984). Dans notre cas, les souches sont à croissance rapide. Toutefois, 32 souches ont produit des réactions acides sur le YEM solide au BTB alors que les 11 souches restantes ont produit une légère alcalinisation du pH du milieu. Dans cette étude, la majorité des isolats ont changé la couleur de YEMA additionné au BTB pendant les 3 premiers jours d'incubation indiquant qu'ils sont des producteurs d'acide et donc possible de les classer comme des rhizobia à croissance rapide (Jida et *al.*, 2012). D'autres travaux qui ont montré que les rhizobia à croissance rapide sont capables d'acidifier le milieu de culture (Lyra et *al.*, 2013.)

III. 3 Croissance sur milieu GPA au pourpre de bromocrésol

Nos isolats ne modifient pas le pH sur le milieu Glucose Peptone Agar (GPA) additionné de Pourpre de Bromocrésol (BCP) à l'exception des certaines souches, ce qui est le cas des contaminants après 24h dont les résultats se trouvent au niveau du tableau 08 (Somasegaran and Hoben, 1994).

Tableau 08 : La caractérisation des isolats

| Isolate | Coloration de Gram | YMA+BTB | GPA+BCP |
|---------|--------------------|---------|---------|
| To | Gram ⁻ | + | - |
| MedS01 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedS02 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS04 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedS07 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS08 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS09 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS10 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS11 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedS12 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS13 | Gram ⁻ | + | + |
| MedS14 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedS15 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedS16 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedS20 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS23 | Gram ⁻ | + | + |
| MedS24 | Gram ⁻ | + | + |
| MedS25 | Gram ⁻ | + | + |
| MedS26 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS29 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS30 | Gram ⁻ | + | - |
| MedS31 | Gram ⁻ | + | + |
| MedS32 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP01 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedP03 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedP04 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedP05 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP06 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP07 | Gram ⁻ | + | + |
| MedP09 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP10 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP12 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedP13 | Gram ⁻ | ± | - |
| MedP14 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP17 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP18 | Gram ⁻ | + | - |
| MedP19 | Gram ⁻ | + | - |
| Rm 41 | Gram ⁻ | + | NT |
| Rm1021 | Gram ⁻ | + | NT |
| Sin 01 | Gram ⁻ | + | NT |
| Sin 02 | Gram ⁻ | + | NT |
| C58 | Gram ⁻ | + | NT |
| R05 | Gram ⁻ | + | NT |

YMA+BTB : (+) : représente une réaction acide, (±) : légèrement acide, GPA+BCP : (+) : réaction positive, (-) : réaction négative, NT : non testé

III. 4 Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Le test discriminant les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* est à l'avantage du second. Le genre *Agrobacterium* produit l'enzyme 3- céto lactose. Après l'addition du réactif de Benedict, un halo jaune est formé autour des colonies de quelques souches ce qui signifie que ses souches produisent la 3-céto glucosidase et donc oxydent le C3 du glycosyl des saccharides dont les résultats se trouvent au niveau du tableau 09 (Figure 21).

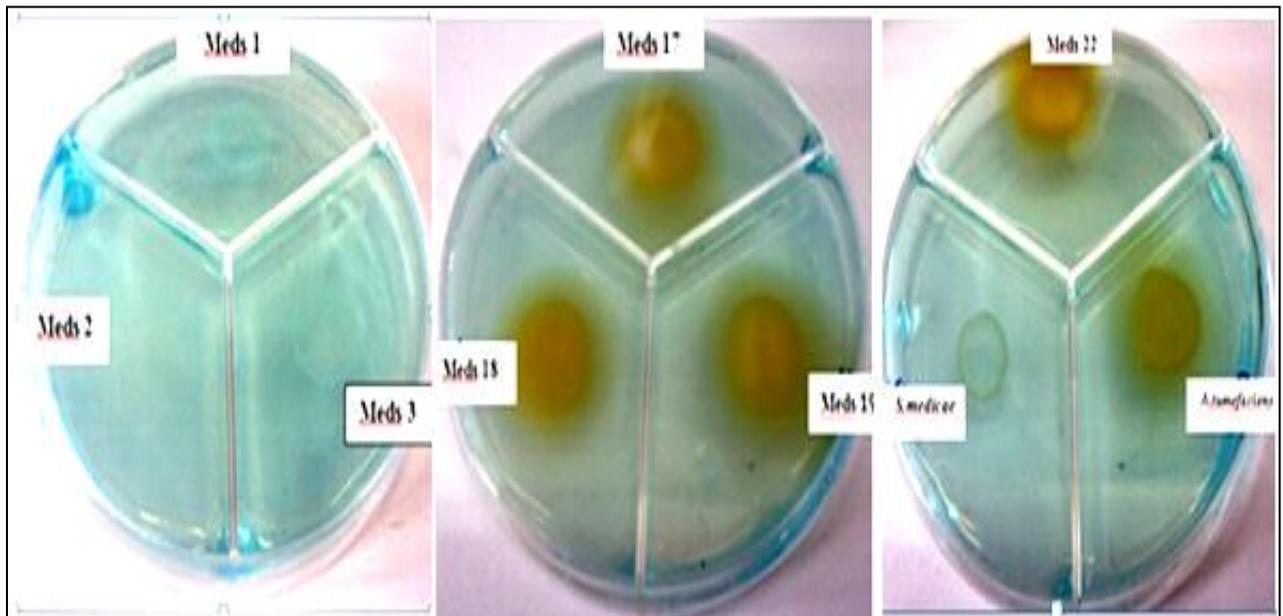


Figure 21: Réaction des isolats du test 3- céto lactose

Tableau 09 : Résultats du test de 3-cétolactose.

| Isolats | Croissance sur milieu de base | 3-cétolactose 1 ^{er} essai | 3- cétolactose 2 ^{ème} essai |
|---------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| MedS01 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS02 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS04 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS07 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS08 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS09 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS10 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS11 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS12 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS13 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS14 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| MedS15 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS16 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS20 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS23 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS24 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| MedS25 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| MedS26 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| MedS28 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS29 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| MedS30 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedS31 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| MedS32 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP01 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP03 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP04 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP05 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP06 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP07 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| MedP09 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP10 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP12 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP13 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP14 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP17 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP18 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| MedP19 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| Rm 41 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| Rm1021 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| Sin 01 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| Sin 02 | +++ | réaction négative | réaction négative |
| C58 | +++ | réaction positive | réaction positive |
| R05 | +++ | réaction positive | réaction positive |

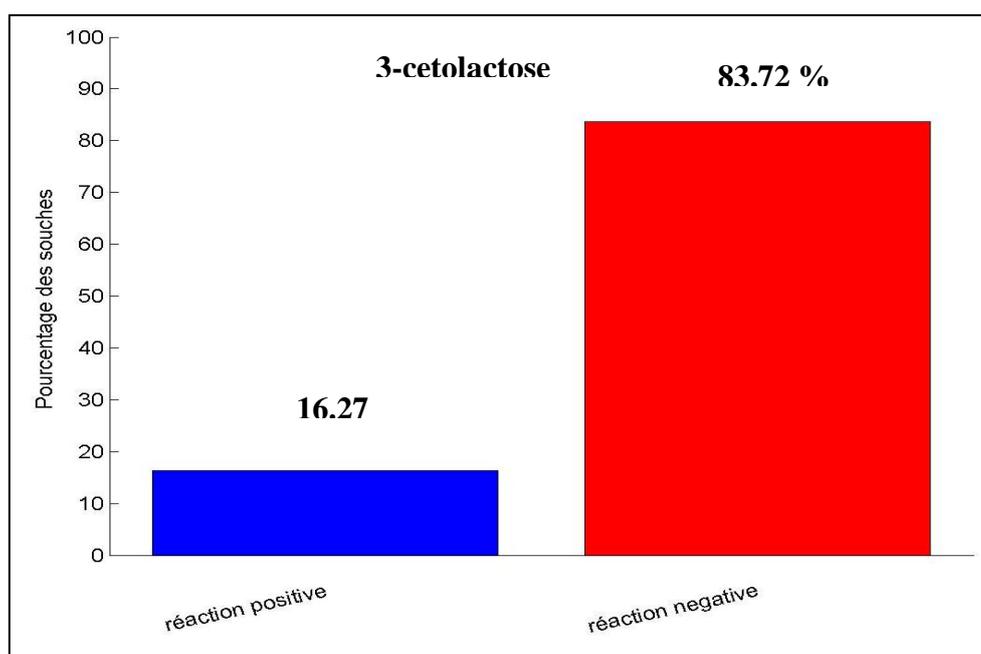


Figure 22: Pourcentage des isolats selon le test de 3-cétolactose

IV. Caractérisation phénotypique des isolats

IV.1 Tolérance à la salinité et la température

Dans ce test nous avons testé à la fois la température et la résistance au stress salin en parallèle. Les isolats provenant de *Medicago ciliaris* L. et 6 souches de référence ont d'abord été évaluées pour leur résistance à la salinité élevée, un pH alcalin, la sécheresse et des conditions de haute température. Selon cette caractérisation, nous avons noté une grande diversité dans la résistance au stress.

Les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (Elsheikh et Wood, 1989 ; Rai, 2012) et même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985).

Les données dans le tableau 10 montrent que les rhizobia nodulant *Medicago ciliaris* L. présentaient une grande diversité dans leur tolérance au sel. Les concentrations inhibitrices de sel varient entre les souches et la nature du sel.

En effet, la quasi-totalité des souches testées tolèrent une concentration de chlorure de sodium (NaCl) de 1% de NaCl. Des résultats similaires ont également été signalés par Vishal et Abhishek (2014), Maatallah et *al.*, (2002). Zahran (1999) qui ont rapporté que l'augmentation de la concentration en sel pourrait avoir une incidence défavorable sur la population rhizobienne en raison de la toxicité directe et indirectement par le stress osmotique. Cependant, à des concentrations plus élevées, le pourcentage de souches tolérantes diminue rapidement et que six isolats de la totalité testée ont pu croître à 4% de NaCl.

Küçük et *al.*, (2006) ont également rapporté que les souches obtenues à partir de nodules racinaires de haricots pourraient survivre à 4% de NaCl. Cette capacité de croissance des souches de rhizobia indigènes dans des concentrations élevées de solution de chlorure de sodium peut donner valeur concurrentielle forte dans la rhizosphère de survivre et de nodulation des plantes hôtes en particulier à des concentrations élevées de sel dans le sol, cette étude est compatible avec les travaux de Hung et *al.*, (2005), Singh et *al.*, (2008).

Tandis qu'à 3% de NaCl deux isolats ont pu se développer aussi. Tous les isolats étaient sensibles à la salinité élevée de 3 et de 4% de NaCl, cependant, ils ont montré une croissance assez bonne de 2% de NaCl.

La tolérance au concentrationen NaCl élevé de certaines souches de rhizobia a été associée à leur capacité à limiter les effets négatifs causés par l'accumulation de osmolytes organiques de protection tels que des acides aminés (proline, la bétaïne et glutamate) ou les hydrates de carbone (Vriezen et *al.*, 2007).

En ce qui concerne la résistance à haute température, à des températures extrêmes la réponse été positive pour toutes les souches. La température optimale pour la croissance des rhizobia est de 28 à 30⁰C. 100% des isolats étaient capables de croître à 37 ° C. Au-dessous de ces valeurs, le pourcentage des isolats qui a grandi a diminué pour atteindre 69,76% à 42 ° C et 27,90% à 45° C.

La croissance de certains des isolats à 40 °C a été confirmée par des études ont pu montrer que les isolats de pois chiches et de la luzerne peuvent croître à 40 ° C (Shimekite, 2006; Jida et Assefa, 2012).

La caractérisation phénotypique des 37 isolats testés ainsi les 6 souches de référence pour les caractères ci-dessus a révélé un grand degré de variation. En ce qui concerne le

partenaire symbiotique de *M. ciliaris* L. a une préférence pour *E. medicae*. Dans le cas d'une résistance élevée en sel, Meds 6, Meds7, Meds 19, Medp 28 et Medp 30 et Medp 31 ont survécu à 4% de NaCl.

Shamseldin et al. (2009) ont rapporté que les souches d'*E. Meliloti* obtenus à partir des nodules racinaires de *faba bean* ont survécu à 3% de NaCl. Payakapong et al., (2006) ont également rapporté qu'une souche *Ensifer* BL3 obtenu à partir de nodules racinaires de *Phaseolus lathyroides* pourrait survivre à 3,5% de NaCl. Shamseldin et al., (2006) ont signalé la caractérisation protéomique de *Rhizobium etli* à 4% de NaCl.

Dans le cas de résistance aux températures élevées, des 37 isolats, et six des souches de référence treize isolats et deux des souches de référence *S. meliloti* et *S. fredii* ont survécu à 45°C, comme indiqué dans le tableau 10. En ce qui concerne la résistance à haute température, certains isolats tolérants ont été décrits. Par exemple, Fall et al., (2008) a rapporté que les rhizobia obtenus à partir des nodules racinaires d'*Acacia Senegal* ont montré une bonne croissance à 45 ° C.

Cependant, il n'existe pas de rapport sur *E. meliloti* survivant à 45 ° C. En outre, deux isolats, Meds10 et Meds11 survécu à la fois à 45 ° C et 2% de NaCl. Néanmoins, nous n'avons pas pu trouver un isolat capable de croître à une température de 45 ° C et une concentration de 3% de NaCl.

Sur la totalité des isolats, seulement 2 (5,40% du total) peut survivre à la fois à 45 ° C et 2% de NaCl comme le montre Tableau 10. Ceci montre que la fréquence des isolats ayant à la fois la résistance à la température élevée et une résistance élevée en sel est faible. Pour la tolérance à la salinité, nous avons observé une grande variabilité de la tolérance (0-4%).

En effet, une étude faite par (Shimekite, 2006) a montré que des rhizobia isolés à partir des nodules de la luzerne ont toléré des concentrations de NaCl qui varient de 1-5%

Les isolats ont montré une variation de la tolérance NaCl, indiquant que les rhizobia nodulant *Medicago spp.* sont plus tolérants par rapport à d'autres espèces de rhizobia (Struffi et al., 1998; Zahran, 1999). Cependant, comme suggéré par El Sheikh et Wood (1989) et Odee et al., (1997), nous avons constaté que les souches à croissance rapide sont généralement plus tolérantes à des concentrations élevées de sel que les souches à croissance lente.

De nombreuses études ont rapporté que la plupart des endophytes symbiotiques sont sensibles à des concentrations de sel supérieures à 1.5% (Graham et Parker, 1964; Batzli et al., 1992). Au-delà de cette concentration, une grande diversité dans l'osmotolérance des souches, est observée par plusieurs auteurs.

En effet, la croissance des espèces *R. galegae*, *M. loti* et *S. fredii* était totalement inhibée en présence de 2% de NaCl, et seule *R. leguminosarum* et *S.melitoti* tolèrent cette concentration (Lindström et Lehttomäki, 1988).

Dans cette étude, nous avons noté que la majorité des souches présentent une bonne tolérance à la salinité. Le dendrogramme obtenu (Figure 23) montre la diversité de ces rhizobia réparties en 3 groupes.

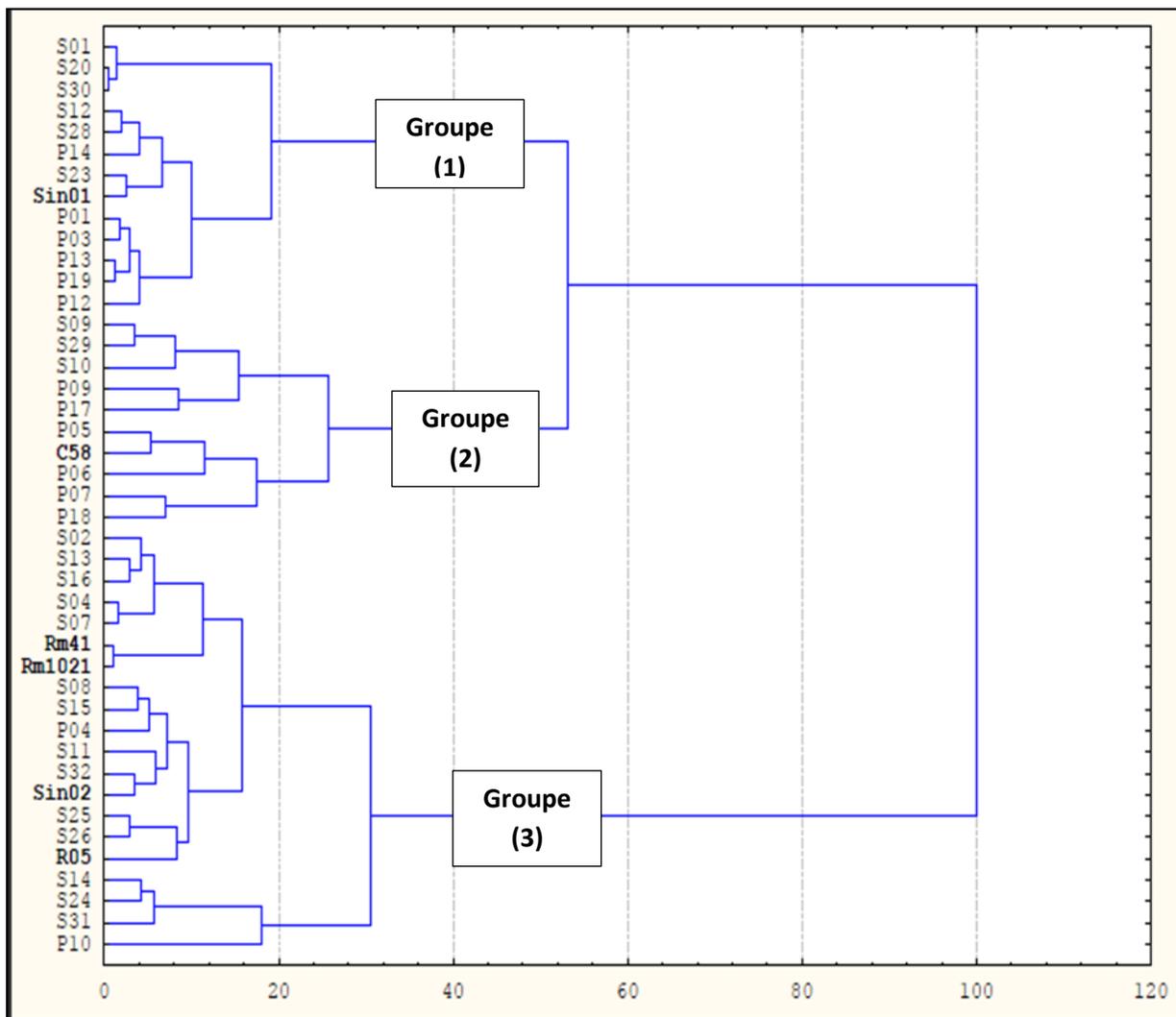


Figure 23 : Dendrogramme indiquant la résistance des isolats à la température et aux différentes concentrations de NaCl.

Tableau 10 : Marge de tolérance des rhizobia nodulant *Medicago ciliaris* a la température, au NaCl.

| Isolates | Intervalle de température | NaCl (%)* | Taux de croissance |
|----------|---------------------------|-----------|--------------------|
| MedS01 | 28-42 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedS02 | 28-45 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedS04 | 28-45 ⁰ C | 0.01% | croissance moyenne |
| MedS07 | 28-45 ⁰ C | 0.01% | croissance moyenne |
| MedS08 | 28-42 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedS09 | 28-42 ⁰ C | 4% | croissance moyenne |
| MedS10 | 28-42 ⁰ C | 4% | croissance moyenne |
| MedS11 | 28-45 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedS12 | 28-40 ⁰ C | 0.01% | croissance moyenne |
| MedS13 | 28-45 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedS14 | 28-45 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedS15 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedS16 | 28-45 ⁰ C | 0.01% | faible croissance |
| MedS20 | 28-40 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedS23 | 28-45 ⁰ C | 1% | faible croissance |
| MedS24 | 28-45 ⁰ C | 0% | faible croissance |
| MedS25 | 28-45 ⁰ C | 0.01% | faible croissance |
| MedS26 | 28-40 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedS28 | 28-42 ⁰ C | 4% | faible croissance |
| MedS29 | 28-40 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedS30 | 28-45 ⁰ C | 1% | faible croissance |
| MedS31 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedS32 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP01 | 28-40 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP03 | 28-40 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP04 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP05 | 28-42 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| MedP06 | 28-45 ⁰ C | 4% | faible croissance |
| MedP07 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP09 | 28-42 ⁰ C | 4% | croissance moyenne |
| MedP10 | 28-45 ⁰ C | 4% | faible croissance |
| MedP12 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP13 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP14 | 28-37 ⁰ C | 3% | croissance moyenne |
| MedP17 | 28-40 ⁰ C | 3% | croissance moyenne |
| MedP18 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| MedP19 | 28-42 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| Rm 41 | 28-37 ⁰ C | 3% | croissance moyenne |
| Rm1021 | 28-45 ⁰ C | 1% | faible croissance |
| Sin 01 | 28-45 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| Sin 02 | 28-40 ⁰ C | 1% | croissance moyenne |
| C58 | 28-42 ⁰ C | 2% | croissance moyenne |
| R05 | 28-42 ⁰ C | 3% | croissance moyenne |

IV.2 Tolérance au stress hydrique

La sécheresse est le facteur environnemental majeur limitant la production des cultures et a un impact particulièrement négatif sur la fixation symbiotique de l'azote (Zahran, 1999; Arrese-Igor *et al.*, 2011).

L'osmotolérance de tous les isolats a été testée sur le milieu YMA additionné avec des concentrations de PEG 4000. La quasi-totalité des isolats ont survécu à 25% de PEG 4000 à l'exception de Medp 01.

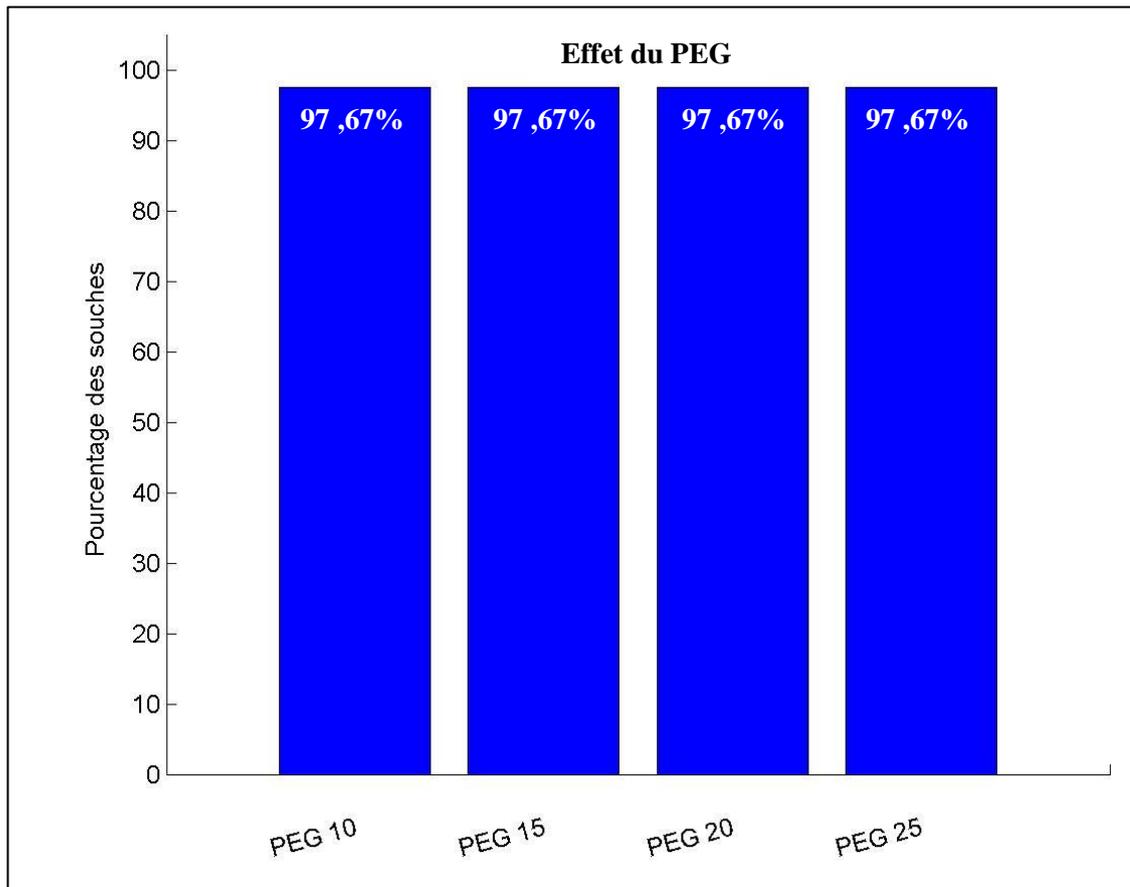


Figure 24: Effet du PEG 4000 sur la croissance des isolats à partir de nodules de *Medicago ciliaris* L.

La salinité impose deux contraintes ioniques et osmotiques. En effet, l'imposition d'une contrainte aux résultats des rhizobia dans les réponses adaptatives, qui conduisent à des changements dans les processus métaboliques réguliers qui sont ensuite pris en compte dans les profils protéiques.

Les rhizobia tolérant au stress osmotique accumuler les osmolytes, et modifie leur morphologie et la déshydratation des cellules (Buss et Bottomley, 1989). Il y avait une bonne corrélation entre les tolérances et les facteurs de stress à la fois ; les souches qui étaient halotolérante étaient en général aussi tolérant au PEG, ce qui suggère que les mécanismes d'osmoadaptation communes opéraient.

Le stress hyper concentrée, conduit les bactéries a synthétisées et accumuler de petites molécules organiques appelées solutés compatibles, car ils compensent le stress hyper osmotique sans interférer avec le métabolisme cellulaire. Comme la sécheresse impose aussi un stress osmotique, il est plausible qu'au moins une partie de la réponse des cellules à la sécheresse implique la synthèse et l'accumulation de solutés compatibles.

Nos résultats ont montré que tous les isolats ont pu résister jusqu' à 25% de PEG 4000. (Tableau11) (Figure 25).

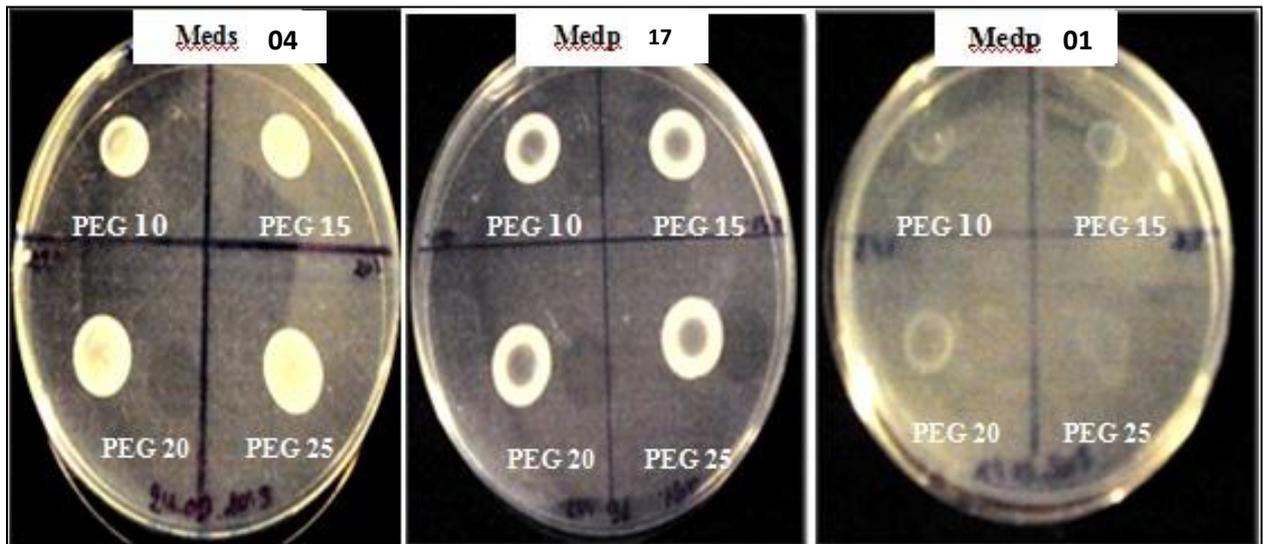


Figure 25: La résistance des souches sur le milieu YEMA aux différentes concentrations de PEG

Tableau 11: La résistance des isolats à la sécheresse

| Isolats | Les différentes concentrations de PEG 4000 | | | | |
|---------|--|-----|-----|-----|-----|
| | control | 10% | 15% | 20% | 25% |
| MedS01 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS02 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS04 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS07 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS08 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS09 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS10 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS11 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS12 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS13 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS14 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS15 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS16 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS20 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS23 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS24 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS25 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS26 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS28 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS29 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS30 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedS31 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS32 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedP01 | 3+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| MedP03 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedP04 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedP05 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 2+ |
| MedP06 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP07 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP09 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP10 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP12 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP13 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP14 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP17 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP18 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP19 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Rm 41 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Rm1021 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Sin 01 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Sin 02 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| C58 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| R05 | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |

3+ : très bonne croissance 2+ : croissance moyenne 1+ : faible croissance - : pas de croissance

IV.3 Tolérance au pH

Les résultats de la tolérance aux pH acides et alcalins de l'ensemble des souches sont présentés dans le tableau 13. Les pH alcalins sont plus tolérés que les pH acides. Les souches ont pu toutes tolérer la grande valeur de pH testée qui est de 9.

La figure 26 représente le pourcentage de souches tolérantes aux différents pH testés. Aux pH neutres et alcalins, toutes les souches présentent un développement optimal. 100% des souches testées sont même capables de pousser au pH 8.

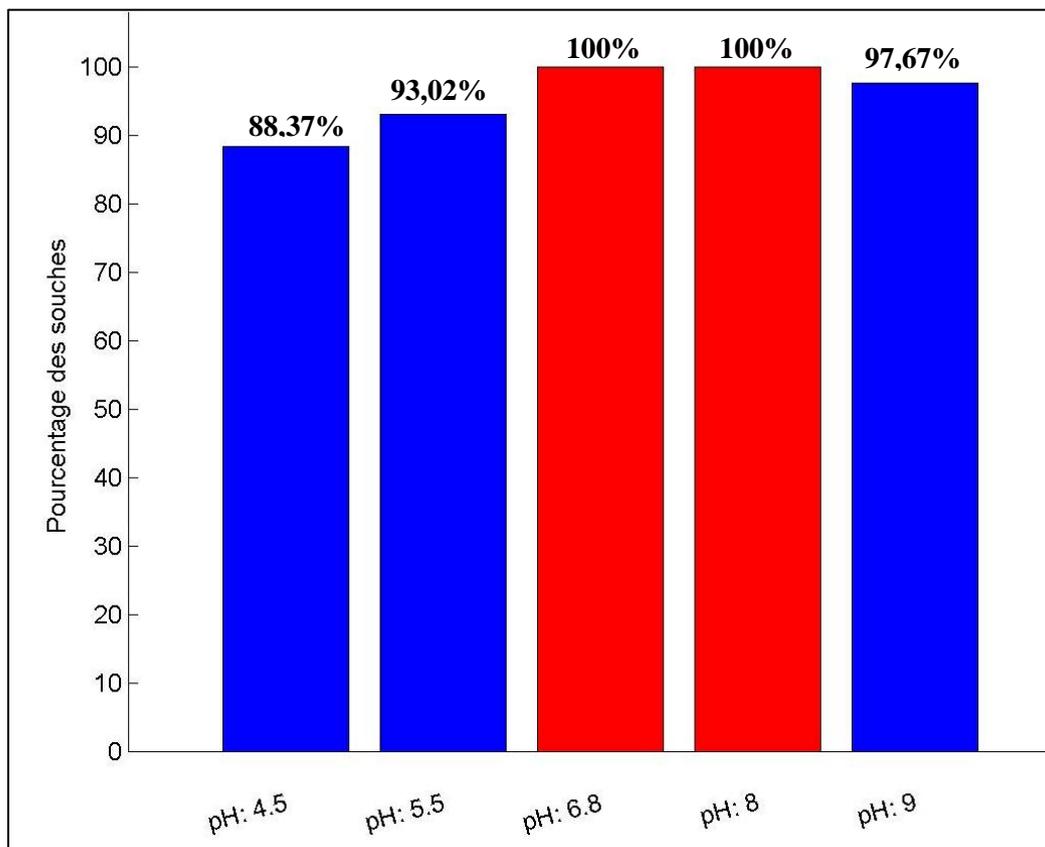


Figure 26 : Effet du pH sur la croissance des isolats à partir de nodules de *Medicago ciliaris* L.

Tableau 12 : Tolérance des souches testées aux pHs

| isolats | Les différentes gammes de pH | | | | |
|---------|------------------------------|----------|----------|------|--------|
| | pH : 4.5 | pH : 5.5 | pH : 6.8 | pH:8 | pH : 9 |
| MedS01 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS02 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS04 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS07 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS08 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS09 | - | 1+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS10 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS11 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS12 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS13 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS14 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS15 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS16 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS20 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS23 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS24 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS25 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS26 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS28 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS29 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS30 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS31 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedS32 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP01 | 1+ | 1+ | 3+ | 2+ | 1+ |
| MedP03 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP04 | 1+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP05 | 1+ | 1+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP06 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP07 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP09 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP10 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP12 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP13 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP14 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP17 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP18 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| MedP19 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Rm 41 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Rm1021 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Sin 01 | 1+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| Sin 02 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| C58 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |
| R05 | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ | 2+ |

3+ : très bonne croissance 2+ : croissance moyenne 1+ : faible croissance - : pas de croissance

Aux pH acides, une sensibilité variable des souches de *Medicago ciliaris* L. a été notée. La figure 26 montre une diminution de la tolérance en partant de la neutralité vers l'acidité. Toutefois, 88.37 % des souches peuvent croître au pH 4.5 à l'exception de Meds6. Medp 24. Medp 27. 93.02 % des souches peuvent croître au pH 5.5. Il y avait une réponse variée des isolats testés à pH.

Rai et *al.*, (2012) a également signalé que les rhizobia à croissance rapide sont capables de croître à un pH de 4.

Selon Rodrigues et *al.*, (2006) cité que le pH de 6,5 à 7,0 est la valeur du pH la plus optimale pour la croissance des bactéries nodulant les légumineuses (LBN) . Des constatations similaires ont été faites par Baoling et *al.*, (2007).

Selon la Jordan (1984), les souches à croissance lente semblent être plus tolérantes aux pH faible que les souches à croissance rapide. Une autre *S. medicae* et *S. medicae* qui nodulent *Medicago spp.* peuvent se développer à un pH de 5,0-10,0 (Rome et *al.*, 1996). La croissance à pH 5,0 a été enregistrée pour seulement certaines souches (Jordan, 1984) dans les sols acides. D'après nos résultats, les souches étudiées ont un taux de croissance rapide et sont globalement tolérantes à l'acidité et majoritairement tolérantes à l'alcalinité.

De manière générale, ces résultats sont cohérent avec les résultats de Berrada et *al.*, (2012), Küçük et *al.*, (2006), et concordent parfaitement avec ce qui a été rapporté par Jordan (1984) qui a constaté que les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, tolèrent parfaitement les pHs allant de 4.5 à 9.

IV.4 Résistance intrinsèque aux antibiotiques

De manière générale, nos isolats ont exhibé une grande résistance aux antibiotiques testés. Graham et *al.* (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.

Les marges de résistance des souches aux différents antibiotiques testés sont représentées dans le tableau 13. Les résultats indiquent que les souches montrent des réponses variables aux différents antibiotiques testés. De forte résistance a été notée avec l'érythromycine alors qu'une faible résistance a été notée avec le chloramphénicol.

La figure 27 indique que les souches de *Medicago ciliaris* L. ont montré une résistance de 100% à l'érythromycine. L'ampicilline qui est un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire n'a présenté qu'un moindre effet sur l'inhibition de la croissance des souches, environ 69.76 % ont pu se développer.

Les souches se sont montrées plus résistantes à la néomycine, à l'acide nalidixique et à la streptomycine. Les pourcentages de résistance de 93.02%, 55.81% et 51.16% ont été respectivement notés pour les trois antibiotiques. Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines et de membrane plasmique tels que la kanamycine, la tétracycline et rifampicine se sont révélés les plus néfastes sur la croissance des souches. En effet, 100% des souches présentent une sensibilité pour les trois antibiotiques à la concentration de 30 µg/ml (Figure27).

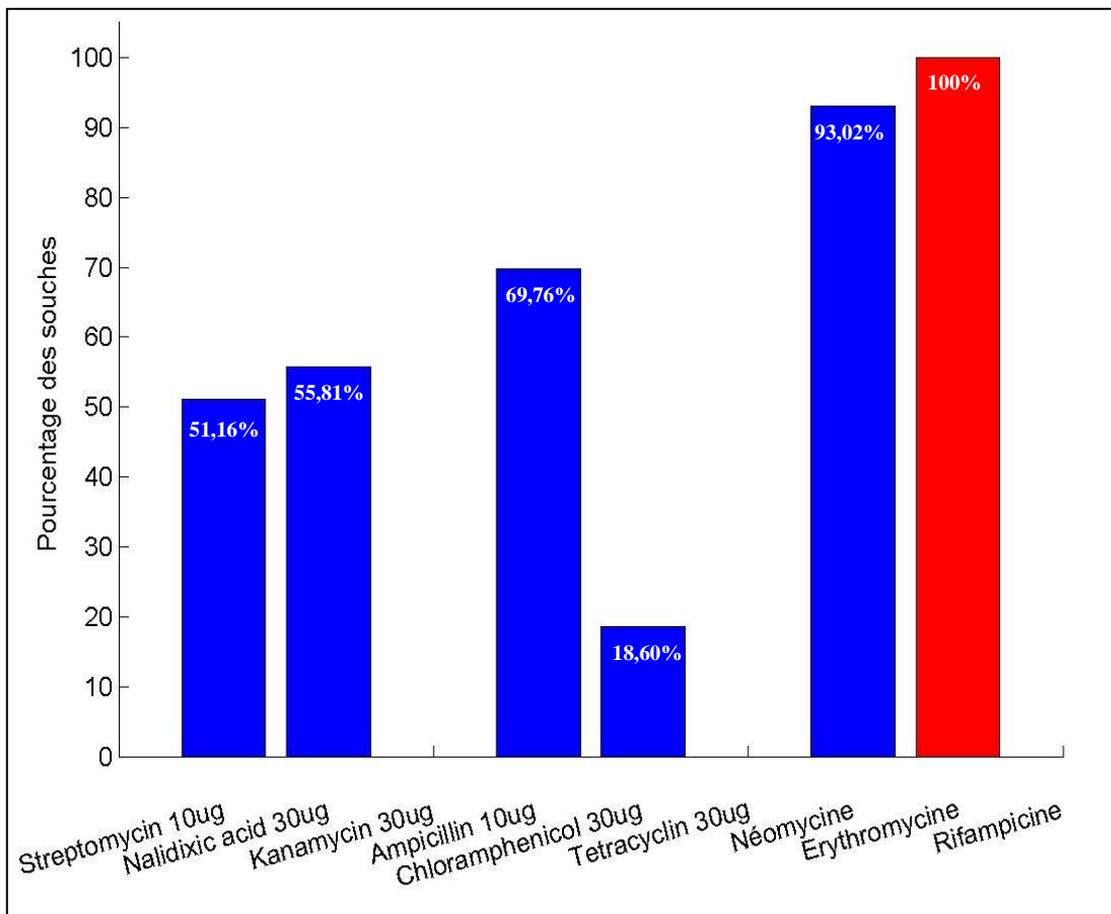


Figure 27 : Effet des antibiotiques sur la croissance des souches nodulant *Medicago ciliaris* L.

Tableau 13 : Résistance intrinsèque des souches nodulant *Medicago ciliaris* L à différents types d'antibiotiques testés.

| isolats | Str 10 µg | Ac.Nal 30 µg | Km 30 µg | Amp 10 µg | Chl 30 µg | Tetr 30 µg | Rif | Neo | Ery |
|---------|--------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|---------------|-----|-----|-----|
| MedS01 | R | R | S | R | R | S | S | R | R |
| MedS02 | R | R | S | R | R | S | S | R | R |
| MedS04 | R | R | S | S | R | S | S | R | R |
| MedS07 | R | R | S | R | R | S | S | R | R |
| MedS08 | R | R | S | R | R | S | S | R | R |
| MedS09 | S | S | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS10 | S | R | S | R | R | S | S | R | R |
| MedS11 | R | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS12 | R | R | S | R | S | S | S | S | R |
| MedS13 | S | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS14 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS15 | S | R | S | R | R | S | S | R | R |
| MedS16 | S | R | S | S | S | S | S | R | R |
| MedS20 | S | R | S | S | S | S | S | R | R |
| MedS23 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS24 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS25 | R | S | S | R | S | S | S | S | R |
| MedS26 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS28 | S | S | S | S | S | S | S | R | R |
| MedS29 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS30 | S | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS31 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| MedS32 | R | S | S | S | S | S | S | R | R |
| MedP01 | S | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedP03 | R | S | S | S | S | S | S | R | R |
| MedP04 | R | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedP05 | S | S | S | S | S | S | S | R | R |
| MedP06 | S | S | S | R | R | S | S | R | R |
| MedP07 | S | S | S | S | S | S | S | S | R |
| MedP09 | S | S | S | S | S | S | S | R | R |
| MedP10 | R | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedP12 | S | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedP13 | R | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedP14 | S | R | S | R | S | S | S | R | R |
| MedP17 | S | R | S | S | S | S | S | R | R |
| MedP18 | S | R | S | S | S | S | S | R | R |
| MedP19 | S | S | S | R | S | S | S | R | R |
| Rm 41 | S | R | S | R | S | S | S | R | R |
| Rm1021 | R | S | S | S | S | S | S | R | R |
| Sin 01 | S | R | S | S | S | S | S | R | R |
| Sin 02 | S | R | S | R | S | S | S | R | R |
| C58 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| R05 | R | S | S | R | S | S | S | R | R |

R: resistente S: sensible, Str: Streptomycine, Nal. Ac: acide nalidixique, Km: kanamycine Amp: Ampicilline, Chl: chloramphenicol, Tetr: Tetracycline, Rif: Rifampicine, Neo: Neomycine Ery: Erythromycine.

Jordan (1984) a montré que les souches à croissance rapide sont plus sensibles à la tétracycline et à la streptomycine. Notre résultat s'accorde beaucoup avec certains travaux réalisés sur d'autres bactéries endophytiques d'origine symbiotique ou associative.

Il ressort de cette étude qu'aucun antibiotique n'entrave totalement la croissance de l'ensemble des souches testées. Elle nous a permis également d'identifier, au sein de ma totalité des isolats testées, des souches ayant un caractère de multiple résistance ou sensibles.

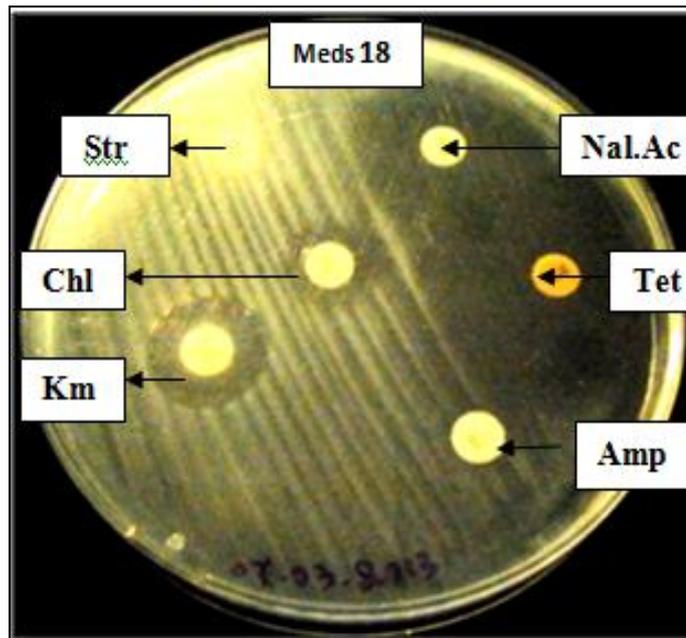


Figure 28 : Résistance intrinsèque de la souche Meds 18 à différents antibiotiques testés.

V. Caractères biochimiques des isolats

V.1 Test de l'oxydase et catalase

Il faut noter que l'ensemble des isolats étudiés sont catalase et oxydase positives à l'exception quelques souches sont effectivement des caractères des rhizobia (Jordan, 1984), la catalase est un enzyme qui joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre les radicaux libres toxiques qui sont générés en particulier sous stress environnementaux. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment (Kravchenko et *al.*, 2004; Bumunang et Babalola, 2014), dont les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 14: Résultats des tests catalase et oxydase

| Isolats | Test de catalase | Test d'oxydase | Isolats | Test de catalase | Test d'oxydase |
|---------|------------------|----------------|---------|------------------|----------------|
| MedS01 | + | + | MedS32 | + | + |
| MedS02 | + | + | MedP01 | + | + |
| MedS04 | + | - | MedP03 | + | + |
| MedS07 | + | - | MedP04 | + | + |
| MedS08 | + | - | MedP05 | + | - |
| MedS09 | + | + | MedP06 | + | + |
| MedS10 | + | + | MedP07 | + | - |
| MedS11 | + | + | MedP09 | + | + |
| MedS12 | + | + | MedP10 | + | + |
| MedS13 | + | + | MedP12 | + | + |
| MedS14 | + | + | MedP13 | + | + |
| MedS15 | + | + | MedP14 | + | - |
| MedS16 | + | + | MedP17 | + | + |
| MedS20 | + | + | MedP18 | + | + |
| MedS23 | + | - | MedP19 | + | + |
| MedS24 | + | - | Rm 41 | + | + |
| MedS25 | + | + | Rm1021 | + | + |
| MedS26 | + | + | Sin 01 | + | + |
| MedS28 | + | + | Sin 02 | + | + |
| MedS29 | + | + | C58 | + | + |
| MedS30 | + | + | R05 | + | + |
| MedS31 | + | + | | | |

Durant toute la durée de la symbiose, de son établissement a sa fin avec la dégénérescence des nodules, *S.meliloti* (modèle des études réalisées sur le stress oxydatif) subi un stress oxydatif important, néanmoins indispensable a l'établissement optimal d'une symbiose (Jamet *et al*, 2007 ; Lohar *et al*, 2006).

Ce stress oxydatif semble également avoir un rôle signalétique pour l'expression des gènes de la plante impliqués dans la symbiose. En effet, Ramu *et al*. (2002) ont rapportés que l'expression d'une peroxydase indispensable a l'organogénèse du nodule était régulée par les ROS et par les facteurs Nod produits par la bactérie.

Le H₂O₂ et cette peroxydase pourraient être impliqués dans la régulation de l'infection, par exemple en facilitant la dissolution de la matrice glycoprotéique durant la progression du cordon d'infection, comme suggéré par Jamet *et al*., (2007).



Figure 29 : photographie du test de catalase

L'enzyme qui permet la fixation de l'azote est la nitrogénase. Cette enzyme peut être inactivée de façon rapide et irréversible par l'oxygène ou ses espèces réactives, c'est pourquoi il existe une barrière de diffusion de l'oxygène dans le cortex du nodule ; de plus, la plante synthétise la légghémoglobine, une molécule capable de sequestrer l'oxygène pour empêcher sa diffusion sous forme libre et délivrer l'oxygène nécessaire aux bactéroïdes (Jones *et al.*, 2007).

Cependant, l'activité nitrogénase nécessite une grande quantité d'énergie (16 molécules d'ATP et 8 électrons pour la réduction d'un N_2 en deux NH_4^+ selon les estimations de (Poole et Allaway, 2000), impliquant une respiration aérobie intensive, ce qui produit une grande quantité de ROS, comme les radicaux superoxydes (O_2°) et le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée (H_2O_2). La légghémoglobine est également capable de s'auto-oxyder, produisant ainsi de grandes quantités de ROS. (Puppo *et al.*, 1981).

Ces ROS ont été détectés dans les nodules ; l'accumulation de H_2O_2 tout autour des bactéries a été observée dans certains cordons d'infection mais jamais à l'intérieur des bactéries ou des bactéroïdes, ce qui indique qu'elles possèdent un système de détoxification de l' H_2O_2 efficace.

La bactérie est donc reconnue initialement comme un pathogène, mais il a été constaté que la réponse de la plante se limite à ce burst et ne mène pas à la destruction de la zone infectée et au rejet de la bactérie.

La persistance du burst oxydatif pourrait être une manière pour la plante de conserver l'option de défense au cas où il n'y aurait pas de réponse appropriée de la part de la bactérie, l'identifiant comme le symbionte et non un pathogène (Santos *et al.*, 2001).

La bactérie *Sinorhizobium meliloti*, possède 3gènes codant pour 3 catalases: *Kat A*, *Kat B* et *Kat C*. Différentes expressions des gènes *Kat* ont été observées lors du développement nodulaire.

En effet, une forte expression du gène *Kat A* a été détectée dans les bactéroïdes suggérant que le processus de la fixation de l'azote induit un stress oxydatif important.

Par contre, au moment de l'infection, dans la bactérie; seules les gènes *Kat B* et *Kat C* sont exprimés. Ces données montrent que ces deux gènes sont indispensables lors de la symbiose (Figure 29).

V. 2 Test sur galerie API 20 NE

Ce test est réalisé dans le but de voir la source carbonée préférée par les différentes souches étudiées, c'est une base de l'identification biochimique. Nous avons testé 24 isolats et *S. meliloti* (Rm 1021) comme souche de référence.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau suivant :

Les réponses des souches sont variées (tableau 15). Les résultats indiquent que, toutes les souches testées utilisaient le nitrate de potassium (en nitrites et azote) à l'exception des souches suivantes (Meds02, Meds08, Meds13, Meds15, Meds30, Medp07).

En ce qui concerne le test de TRP (de tryptophane), toutes les souches ne produisent pas d'indole, par contre les isolats présentaient une réaction variable concernant l'arginine et l'acidification.

Pour la réaction d'hydrolyse, toutes les souches présentent une réaction positive pareille pour la B-galactosidase, sauf pour la souche Medp09.

Tableau 15 : Identification des isolats en utilisant système l'API 20 NE

| Test | composants actifs | Souches testées | | | | |
|-------------|---|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| | | Meds1 | Meds2 | Meds7 | Meds8 | Meds10 |
| NO3 | nitrate de potassium nitrate réduction des Nitrates en nitrites réduction des Nitrates en azote | + | - | + | - | + |
| TRP | L-tryptophane (formation d'indole) | - | - | - | - | - |
| GLU | D-glucose (fermentation (GLUcose)) | - | - | - | - | - |
| ADH | L-arginine (Arginine DiHydrolase) | - | - | - | - | - |
| URE | Urée (UREase) | - | + | + | + | - |
| ESC | Esculine (Citrates de fer) hydrolyse (β -glucosidase) | + | + | + | + | + |
| GEL | Gélatine (hydrolyse (protéase)) | - | - | - | - | - |
| PNPG | 4-nitrophényl- β dgalactopyranoside β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase) | + | + | + | + | + |
| | | Meds11 | Meds13 | Meds14 | Meds15 | Meds16 |
| NO3 | nitrate de potassium nitrate réduction des Nitrates en nitrites réduction des Nitrates en azote | + | - | + | - | + |
| TRP | L-tryptophane (formation d'indole) | - | - | - | - | - |
| GLU | D-glucose (fermentation (GLUcose)) | - | + | - | + | + |
| ADH | L-arginine (Arginine DiHydrolase) | - | - | + | - | + |
| URE | Urée (UREase) | + | + | + | + | + |
| ESC | Esculine (Citrates de fer) hydrolyse (β -glucosidase) | + | + | + | + | + |
| GEL | Gélatine (hydrolyse (protéase)) | - | - | - | - | - |
| PNPG | 4-nitrophényl- β dgalactopyranoside β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase) | + | + | + | + | + |
| | | Meds20 | Meds26 | Meds28 | Meds30 | Meds31 |
| NO3 | nitrate de potassium nitrate réduction des Nitrates en nitrites réduction des Nitrates en azote | + | + | + | - | + |
| TRP | L-tryptophane (formation d'indole) | - | - | - | - | - |
| GLU | D-glucose (fermentation (GLUcose)) | + | - | + | - | + |
| ADH | L-arginine (Arginine DiHydrolase) | + | + | + | + | + |
| URE | Urée (UREase) | + | + | + | - | + |
| ESC | Esculine (Citrates de fer) hydrolyse (β -glucosidase) | + | + | + | + | + |
| GEL | Gélatine (hydrolyse (protéase)) | - | - | - | - | - |
| PNPG | 4-nitrophényl- β dgalactopyranoside β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase) | + | + | + | + | + |

Suite du tableau 15 : Identification des isolats en utilisant système l'API 20 NE

| Test | composants actifs | Souches testées | | | | |
|-------------|---|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| | | Medp32 | Medp1 | Medp4 | Medp5 | Medp7 |
| NO3 | nitrate de potassium nitrate réduction des Nitrates en nitrites réduction des Nitrates en azote | + | + | + | + | - |
| TRP | L-tryptophane (formation d'indole) | - | - | - | - | - |
| GLU | D-glucose (fermentation (GLUcose)) | - | - | - | - | + |
| ADH | L-arginine (Arginine DiHydrolase) | + | - | + | - | + |
| URE | Urée (UREase) | + | + | + | - | + |
| ESC | Esculine (Citrate de fer) hydrolyse (β -glucosidase) | + | + | + | + | + |
| GEL | Gélatine (hydrolyse (protéase)) | - | - | - | + | - |
| PNPG | 4-nitrophényl- β dgalactopyranoside β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase) | + | + | + | + | + |
| | | Medp9 | Medp14 | Medp18 | Medp19 | Rm1021 |
| NO3 | nitrate de potassium nitrate réduction des Nitrates en nitrites réduction des Nitrates en azote | + | + | + | + | + |
| TRP | L-tryptophane (formation d'indole) | - | - | - | - | - |
| GLU | D-glucose (fermentation (GLUcose)) | - | - | - | - | - |
| ADH | L-arginine (Arginine DiHydrolase) | + | + | - | - | - |
| URE | Urée (UREase) | + | + | + | - | + |
| ESC | Esculine (Citrate de fer) hydrolyse (β -glucosidase) | + | + | + | + | + |
| GEL | Gélatine (hydrolyse (protéase)) | + | + | - | - | - |
| PNPG | 4-nitrophényl- β dgalactopyranoside β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β DGalactopyranosidase) | - | + | + | + | + |

Les données présentées dans le tableau 15 et 16 indiquent que tous les isolats présentent une réaction positive concernant la PNPG (β -galactosidase), la production de l'indole (TRP) a été négative pour la quasi-totalité des isolats. En ce qui concerne la Gélatinase (GEL) et l'arginine dihydrolase (ADH) nous avons noté des réactions variables d'une souche à autre. La réaction été positive pour l'Uréease (URE), la totalité des isolats présentent une réaction positive pour le test ESC (β -glucosidase).

Tous les sucres testés sont assimilés par les isolats à un niveau différent. Les observations montrent que la plupart des souches testées donnent un bon développement pour le glucose (GLU), arabinose (ARA), mannose (MNE), mannitol (MAN), N-acétyl-glucosamine (NAG) et le maltose (MAL) à l'exception de quelques isolats. La consommation des substrats été variable pour le potassium gluconate (GNT), l'acide caprique (CAP), l'acide adipique (ADI). Pour l'acide malique (MLT). Concernant le citrate trisodique (CIT) et l'acide malique (MLT),

citrate trisodique (CIT) et l'acide phénylacétique (PAC) les réactions été variables. De nombreux auteurs confirment nos résultats (Hussain et *al.*, 2002 et Ramírez-Bahena et *al.*, 2009).

Tableau 16 : L'utilisation des glucides par les isolats

| Tests | composants actifs | Souches testées | | | | |
|-------|----------------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| | | Meds1 | Meds2 | Meds7 | Meds8 | Meds10 |
| GLU | D-glucose | + | + | + | + | + |
| ARA | L-arabinose | + | + | + | + | - |
| MNE | D-mannose | + | + | + | + | + |
| MAN | D-mannitol | + | + | + | + | + |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | + | + | + | + | + |
| MAL | D-maltose | + | + | + | + | + |
| GNT | potassium gluconate | - | - | - | - | - |
| CAP | acide caprique | - | - | - | - | - |
| ADI | acide adipique | - | - | - | - | - |
| MLT | acide malique | + | - | - | - | + |
| CIT | trisodium citrate | - | - | - | - | - |
| PAC | acide phénylacétique | - | - | - | - | - |
| | | Meds11 | Meds13 | Meds14 | Meds15 | Meds16 |
| GLU | D-glucose | + | + | + | + | + |
| ARA | L-arabinose | + | + | + | + | + |
| MNE | D-mannose | + | + | + | + | + |
| MAN | D-mannitol | + | + | + | + | + |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | + | + | + | + | + |
| MAL | D-maltose | + | + | + | + | + |
| GNT | potassium gluconate | + | - | + | - | + |
| CAP | acide caprique | + | - | - | - | - |
| ADI | acide adipique | - | - | - | - | - |
| MLT | acide malique | + | + | + | + | + |
| CIT | trisodium citrate | - | - | - | - | - |
| PAC | acide phénylacétique | - | - | - | - | - |
| | | Meds20 | Meds26 | Meds28 | Meds30 | Meds31 |
| GLU | D-glucose | + | + | + | + | + |
| ARA | L-arabinose | + | + | + | + | + |
| MNE | D-mannose | + | + | + | + | + |
| MAN | D-mannitol | + | + | + | + | + |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | + | + | + | + | + |
| MAL | D-maltose | + | + | + | + | + |
| GNT | potassium gluconate | - | + | + | - | + |
| CAP | acide caprique | - | + | - | - | + |
| ADI | acide adipique | - | + | - | - | - |
| MLT | acide malique | + | + | + | + | + |
| CIT | trisodium citrate | - | + | - | - | + |
| PAC | acide phénylacétique | - | + | - | - | - |

Suite du tableau 16: l'utilisation des glucides par les isolats

| Tests | composants actifs | Souches testées | | | | |
|-------|----------------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| | | Medp32 | Medp1 | Medp4 | Medp5 | Medp7 |
| GLU | D-glucose | + | + | + | + | - |
| ARA | L-arabinose | + | + | + | + | - |
| MNE | D-mannose | + | + | + | + | - |
| MAN | D-mannitol | + | + | + | + | - |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | + | + | + | + | - |
| MAL | D-maltose | + | + | + | + | - |
| GNT | potassium gluconate | - | - | + | + | - |
| CAP | acide caprique | - | - | - | - | - |
| ADI | acide adipique | - | - | - | - | - |
| MLT | acide malique | + | + | + | + | + |
| CIT | trisodium citrate | - | - | - | - | - |
| PAC | acide phénylacétique | - | - | - | - | - |
| | | Medp9 | Medp14 | Medp18 | Medp19 | Rm1021 |
| GLU | D-glucose | - | + | - | - | + |
| ARA | L-arabinose | - | + | - | - | + |
| MNE | D-mannose | - | + | - | - | + |
| MAN | D-mannitol | - | + | - | - | + |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | - | + | - | - | + |
| MAL | D-maltose | - | + | - | - | + |
| GNT | potassium gluconate | - | + | - | - | - |
| CAP | acide caprique | - | + | - | - | - |
| ADI | acide adipique | - | + | - | - | - |
| MLT | acide malique | - | + | - | - | + |
| CIT | trisodium citrate | - | + | - | - | - |
| PAC | acide phénylacétique | - | + | - | - | - |

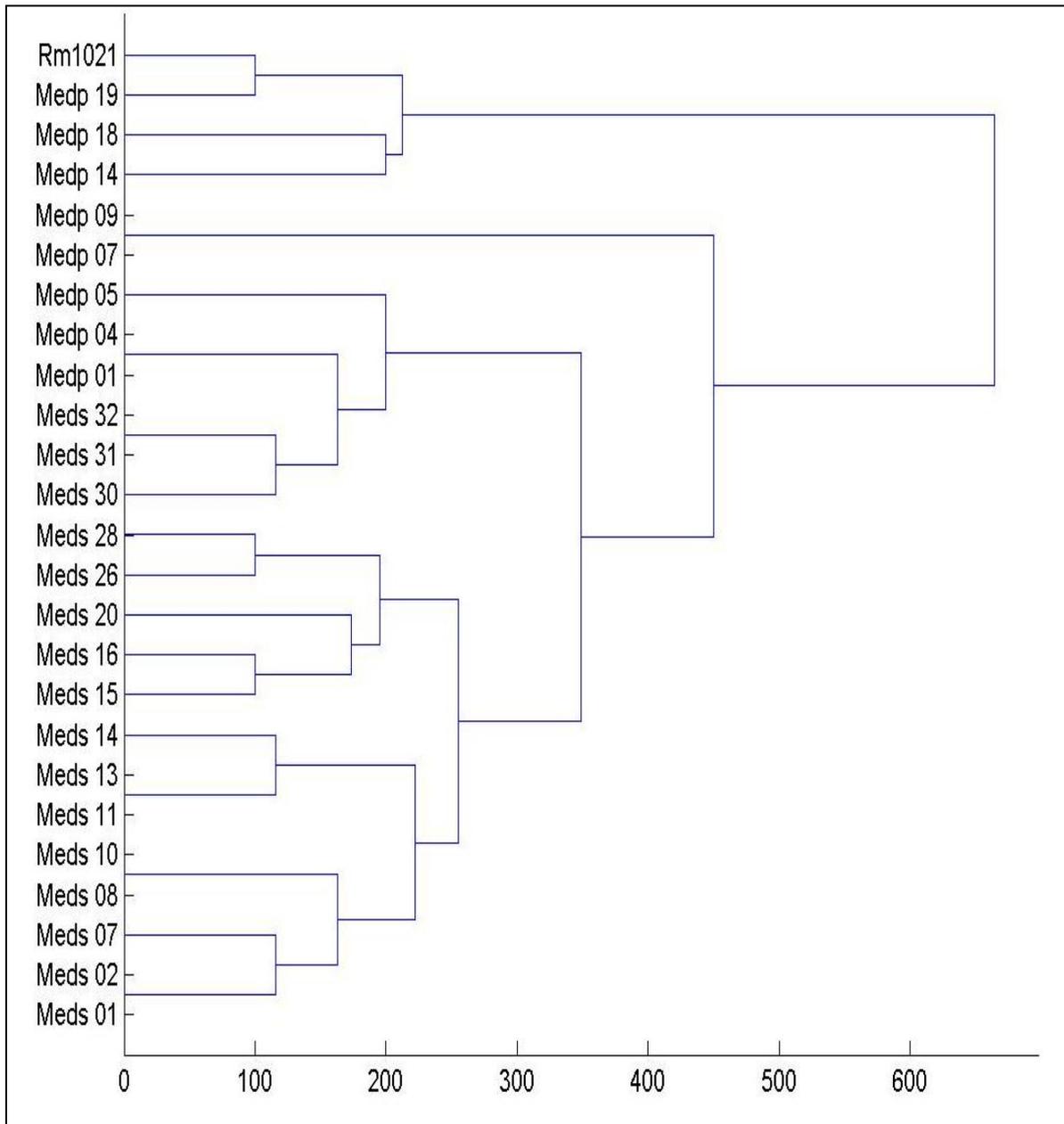


Figure 30 : Dendrogramme indiquant les résultats des tests API 20NE

V.3 Test sur galerie API 50

Tableau 17 : Résultats de l'Api 50 CH

| Substrats | Souches testées | | | | | | | | |
|---------------|-----------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
| | Meds1 | Meds2 | Meds7 | Meds11 | Meds23 | Medp26 | Medp27 | Medp36 | <i>S.meliloti</i> * |
| Témoin | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-GLY | + | + | + | + | - | + | - | - | + |
| D-ERY | + | - | + | + | - | - | - | - | + |
| D-DARA | + | - | + | + | - | - | + | - | + |
| D-LARA | + | + | - | + | + | - | - | - | + |
| D-RIB | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D-DXYL | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| D-LXYL | + | + | + | - | + | + | - | - | + |
| D-ADO | + | + | + | - | + | + | - | - | + |
| D-MDX | - | - | + | - | + | + | + | - | + |
| D-GAL | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| D-GLU | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| D-FRU | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| D-MNE | + | - | + | + | + | + | + | - | + |
| D-SBE | + | - | - | + | + | - | - | - | + |
| D-RHA | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| D-DUL | + | + | + | + | + | - | - | - | + |
| D-INO | + | + | + | + | + | - | - | - | + |
| D-MAN | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| D-SOR | + | + | + | + | + | - | - | - | + |
| D-MDM | - | - | - | + | - | - | + | - | + |
| D-MDG | - | - | - | + | + | + | + | - | + |

Suite du tableau 17: Résultats de l'Api 50 CH

| Substrats | Souches testées | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
| | Meds1 | Meds2 | Meds10 | Meds14 | Meds32 | Medp4 | Medp5 | Medp18 | Rm1021 |
| D-NAG | + | - | + | + | + | + | - | - | + |
| D-AMY | - | + | + | + | + | + | + | - | + |
| D-ARB | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| D-ESC | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-SAL | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D-CEL | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D-MAL | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| D-LAC | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D-MEL | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D-SAC | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| D-TRE | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| D-INU | - | + | - | + | + | - | + | - | + |
| D-MLZ | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D-RAF | + | + | + | + | + | - | - | - | + |
| D-AMD | - | - | - | + | + | - | + | - | + |
| D-GLYG | - | - | - | + | + | - | - | - | + |
| D-XLT | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| D-GEN | + | - | + | + | + | - | + | - | + |
| D-TUR | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| D-LYX | + | + | + | + | + | - | - | - | + |
| D-TAG | + | + | + | + | + | - | - | - | + |
| D-DFUC | + | - | - | + | + | - | - | - | + |
| D-LFUC | + | + | + | + | + | - | - | - | + |

Suite du tableau 17: Résultats de l'Api 50 CH

| Substrats | Souches testées | | | | | | | | |
|---------------|-----------------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
| | Meds1 | Meds2 | Meds10 | Meds14 | Meds32 | Medp4 | Medp5 | Medp18 | Rm1021 |
| D-DARL | + | + | + | + | + | - | - | - | + |
| D-LARL | + | + | + | - | + | - | - | - | + |
| D-GNT | + | + | - | - | - | - | + | - | + |
| 2KG | + | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 5KG | + | + | + | + | - | + | + | - | - |

(+) : Réaction positive

(-) : Réaction négative

Les galeries API50CH ont été utilisées afin d'évaluer l'aptitude des souches à assimiler chacun des 49 substrats comme seule source de carbone.

Nous avons testées les souches suivantes : Meds1, Meds2, Meds10, Meds32, Medp4, Medp5, Medp18 et une souche de référence *S. meliloti* (Rm1021). Selon le type du substrat, l'assimilation peut également être répartie comme l'indique le tableau 17.

Les résultats montrent que les souches assimilent préférentiellement les mono et les disaccharides mais on peut noter également que les souches peuvent se développer sur différentes sources de carbones.

La plupart des souches n'ont pas pu utiliser le L-sorbose, par contre 100% de souches ont pu assimiler le glycérol et le mannitol : substrats communément utilisés pour la culture et le stockage des rhizobia. Une assimilation variable a été aussi obtenue avec le gluconate, le N-acetyl-glucosamine et l'arabinose.

Certaines souches de *Medicago ciliaris* L. étudiées ont pu également assimiler les polysaccharides complexes de type hexosans.

Cependant, l'incapacité de différentes souches de rhizobia à assimiler ces substrats a été rapportée par Rome et al., (1996) pour des souches de *Sinorhizobium* nodulant le genre *Medicago*.

Plusieurs études ont rapporté la variabilité de la nutrition carbonée chez les rhizobia (Graham, 1964 ; Zhang et al., 1991 ; Stowers et Eaglesham, 1985). Ces mêmes auteurs ont

confirmé l'existence de la variabilité de l'utilisation des substrats carbonés entre les *rhizobia* et les *bradyrhizobia*.

Les souches à croissance rapide possèdent une préférence pour les hexoses, les pentoses, les disaccharides ainsi que les acides organiques (Stowers, 1985 ; van Rossum *et al.*,1995).

L'utilisation des sucres et des acides organiques par les rhizobia représente un aspect intéressant et essentiel pour la culture au laboratoire. Cependant dans le sol, la croissance des rhizobia dépend principalement de composés aromatiques.

L'utilisation de ces derniers comme seule source de carbone a été rapportée aussi bien chez les souches à croissance rapide que chez les souches à croissance lente.

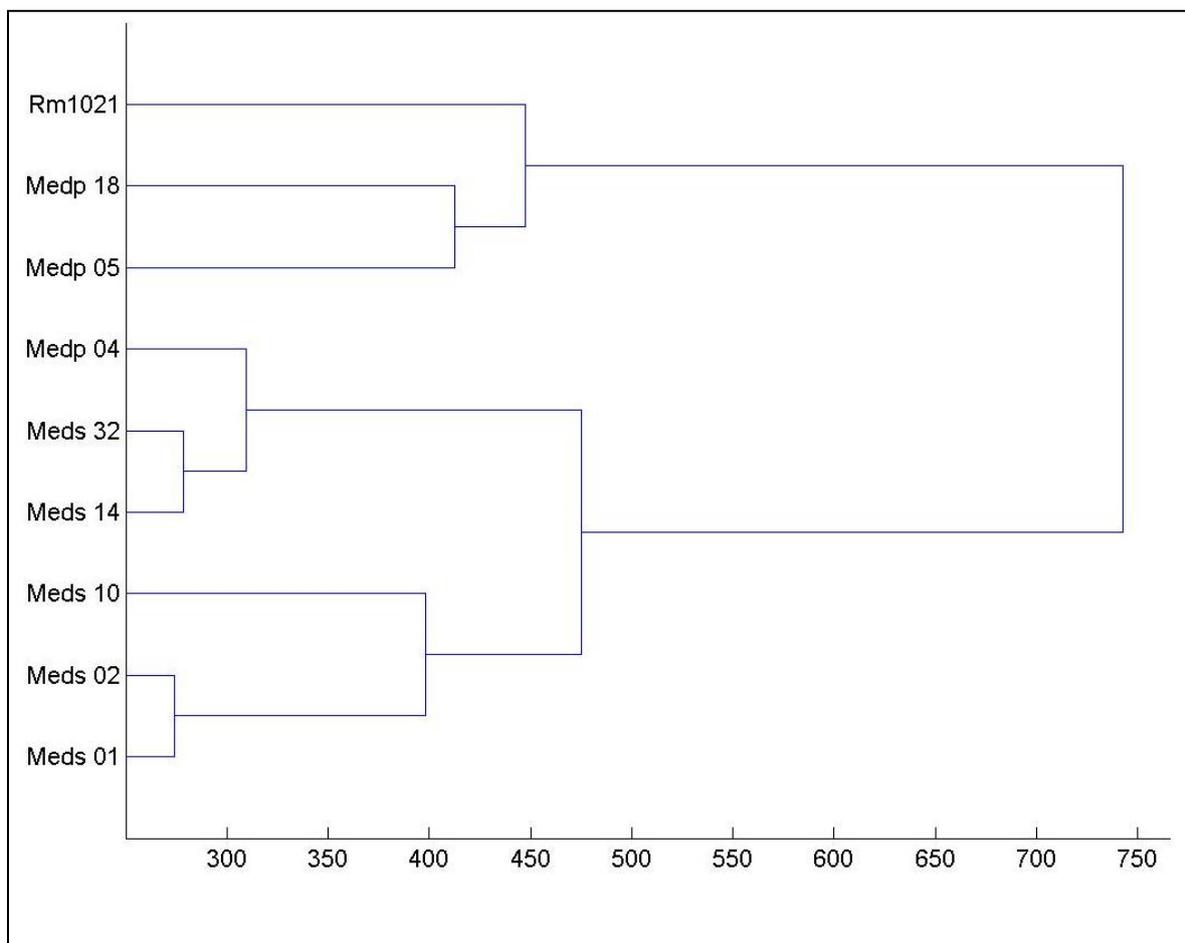


Figure 31 : Dendrogramme indiquant les résultats des tests API 50 CH

Conclusion

Conclusion générale

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluants et qui permettent de réduire l'usage d'engrais notamment riches en azote a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote.

En effet, la reconnaissance de l'importance de la symbiose rhizobia – légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des bactéries symbiotiques nodulant *Medicago ciliaris* L. récoltés dans la région de Zerizer. Les résultats des tests d'authentification montrent que les isolats ont une grande compatibilité d'infection et d'induction du développement nodulaire chez la même plante.

L'étude des caractéristiques phénotypiques et symbiotiques a permis, d'une part, de montrer que ces isolats sont des rhizobia et d'autre part, de repérer des souches plus tolérantes aux différents stress environnementaux.

En effet, parmi ces souches Gram négatives, treize isolats du total pourraient croître à 45 °C. Cependant seuls six isolats ont pu croître à 4% de NaCl. Les souches ont montré une forte tolérance variable au sel NaCl et au pH.

En effet, elles sont capables de tolérer et de croître en présence de concentrations en sels de l'ordre de 4% et un pH compris entre 4.5 et 9. Concernant leur résistance aux antibiotiques, nos isolats se sont révélés sensibles à la tétracycline, la kanamycine et la Rifampicine. Cependant, elles ont montré une résistance variable vis-à-vis de l'acide nalidixique, l'ampicilline, le chloramphénicol, l'érythromycine et la streptomycine.

L'utilisation des différents substrats carbonés a montré également un profil d'assimilation très variable.

Perspectives

Perspectives

Le présent travail a permis de mettre en exergue la diversité phénotypique et symbiotique des bactéries fixatrices d'azote, ce qui constitue une valeur scientifique considérable et prometteuse. Cependant, l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations, reste judicieuse:

- Réaliser de nouveaux tests tels que la résistance aux métaux lourds, la solubilisation du phosphore.
- Exploiter leur grande tolérance aux différents stress environnementaux ainsi que leur potentiel fixateur d'azote à travers des essais d'inoculation sous serre puis en champ.
- Préciser la position taxonomique de nos isolats via un séquençage complet de l'ADNr 16S. L'hybridation ADN/ADN pourrait préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi un tout autre genre des protéobactéries.

Bibliographie

Bibliographie

Abdelguerfi A, Chapot JY, Conesa AP. 1988a. Contribution à l'étude de la répartition des luzernes annuelles spontanées en Algérie selon certains facteurs du milieu. *Fourrages*, 113, 89-106.

Abdelguerfi A, Chapot JY, Conesa AP, Roseau R. 1988b. Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* L. en Algérie. I -Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*, 12 (1), 304-328.

Abdelguerfi A. (2003). Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Rapport de Synthèse sur « La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31 Tome IX.

Amarger N, Macheret V, Laguerre G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:996-1006.

Andrews, M.; Raven, J.A.; Lea, P.J. 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology* 163 : 174-199.

Arrese-Igor, C., Gonzalez, E.M., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E. and Gil Quintana, E. 2011. Physiological response of legumes nodules to drought. *Pl. Stress.* 5: 24-31.

Badri DV, Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell and Environment.* 32: 666–681.

Bailly X, Olivieri I, Brunel B, Cleyet-Marel JC, and Bena G. 2007. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J. Bacteriol.* 189:5223–5236.

BaoLing H, ChengQun L, Bo W, LiQin F. 2007. A rhizobia strain isolated from root nodule of gymnosperm *Podocarpus macrophyllus*. *Science in China Series C-Life Science* 50: 1-6.

Barker D.G. 2006. Rhizobial inoculation and nodulation of *Medicago truncatula* *Medicago truncatula* handbook.

Batzli J. M. C., Graves W. R. and Berkum P. V. 1992. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2137-2143.

Beatty, P.H.; Good, A.G. 2011. Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science*, 333, 416-417.

Bena G, Lyet A, Huguet T, Olivieri I. 2005. *Medicago*--*Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 1547-1559.

- Benhizia Y, Goudjil H, Benguedouar A, Rosella M, Giacomini A, Squartini A. 2004.** *Gamma proteobacteria* can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol.* **27**:462-468.
- Bernaerts MJ & de Ley J. 1963.** A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature.* **197** : 406-407, ISSN 0028-0836.
- Bernaerts, M.J. and de Ley, J. 1963.** A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 197, 406_7.
- Berrada H, Nouioui I, Iraqui Houssaini M, Elghachtouli N, Gtari M, Fikri Benbrahim, K.2012.** Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco; *African Journal of Microbiology Research.* **6(25)**:5314-5324.
- Brencic A, and Winans SC. 2005.** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:155-194.
- Brewin NJ. 2004.** Plant cell wall remodeling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **23**: 293–316.
- Broughton, W. J., Hanin, M., Reli', B., Kopcińska, J., Golinowski, W., Simšek, S., C, S. 2006.** Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. *J. Bacteriol.* **188**, 3654–3663. doi: 10.1128/JB.188.10.3654-3663.2006.
- Brunel B, Rome S, Ziani R, Cleyet-Marel JC. 1996.** Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual *Medicago* species. *FEMS Microbiology Ecology* **19**, 71-82. doi: 10.1111/j.1574-6941.1996.tb00200.x
- Bumunang, E.W., Babalola, O.O. 2014.** Characterization of Rhizobacteria from field grown genetically modified GM and non-GM maizes. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **57**, 1–8.
- Buss MD, and Bottomley PJ. 1989.** Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55** : 2431- 2436.
- Cameron, S.G.; Schipper, L.A. 2010.** Nitrate removal and hydraulic performance of organic carbon for use in denitrification beds. *Ecol. Eng.* **36**, 1588-1595.
- Chebbi H, Pascual-Villalobos MJ, Cenis JL, Correal E (1995).** Caractérisation morphologique et moléculaire des espèces ligneuses du genre *Medicago* Fourrages. **142** : 191-206.
- Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P. (2001.** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; **51**:1729-35.
- Chen WX, Yan GH, Li JL. 1988.** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*; **38**: 392-397.

- Cooper JE. 2007.** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*. **103**: 1355–1365.
- Crespi M, Galvez S. 2000.** Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *J Plant Growth Regul* **19**, 155-166.
- Cronk Q, Ojeda I, Pennington R T. 2006.** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 99-103.
- de Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins MD, Kersters K, Gillis M. 1998.** *Allorhizobium undicola* gen. Nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* ;**48**:1277- 1290.
- de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira A, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindstrom K, Dreyfus B, Gillis M. 1998b.** Characterisation of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.***48**:369-382.
- De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettnick D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins M D, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M. 1994.** Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium meliloti* comb.nov., *S. Saheli* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 715-733.
- De-la-Peña, C., Badri, D. V., Lei, Z., Watson, B. S., Brandão, M. M., Silva-Filho, M. C. 2010.** Root secretion of defense-related proteins is development dependent and correlated with flowering time. *J. Biol. Chem.* **285**, 30654–30665. doi: 10.1074/jbc.M110.119040
- De-la-Peña, C., Lei, Z., Watson, B. S., Sumner, L. W., and Vivanco, J. M. 2008.** Root-Microbe Communication through Protein Secretion. *J. Biol. Chem.* **283**, 25247–25255. doi: 10.1074/jbc.M801967200
- Dénarié J, Cullimore J V. 1993.** Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, **74** (6): 951-954.
- Dénarié J, Debellé F, Promé J C. 1996.** *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.***65**: 503-535.
- Downie JA. 2005.** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology*. **15**: 6.
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900–10.
- Doyle JJ. 2011.** Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **24**: 1289–1295.

- Duc G., Mignolet C., Carrouée B., Huyghe C. 2010.** Importance économique passée et présente des légumineuses : rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Innovations Agronomiques*, 11, 1-24.
- Duhoux M, Nicole M. 2004. Biologie Végétale. Associations et Interactions chez les plantes. Dunod.**
- Efron, B. 1979.** Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annals of Statistics*. 7: 1–26.
- Dupuy N, Willems A, Pot B , Dewettinck D, Vandebrouaene I, Maestrojuan G, Dreyfus B, Kersters K, Collins M D, Gillis M. 1994.** Phenotypic and genotypic characterization of *bradyrhizobia* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst.Bacteriol.* **44** : 461-473.
- Ejigui J, Desrosiers T, Savoie L, Marin J. 2007.** Improvement of the nutritional quality of a traditional complementary porridge made of fermented yellow maize (*Zea mays*): Effect of Maize-legume combinations and traditional processing methods. *Food Nutr Bull* 28(1):23–34.
- El-sheikh, EAE, Wood M. 1989.** Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* 21, 889-895.
- Euzéby JP , Findall BJ. 2004.** Status of strains that contravene rules 27 (3) and 30 of the Bacteriological Code. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:293-301.
- Fall D, Diouf D, Ourarhi M, Faye A, Abdelmounen H, Neyra M, Sylla SN, El Idrissi MM. 2008 .** Phenotypic and genotypic characteristics of *Acacia senegal* (L.) Wild. root-nodulating bacteria isolated from soils in the dryland part of Senegal. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**:85–97.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M H, Lin Y H, Reid D E, Gresshoff PM. 2010.** Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology* **52**, 61-76.
- Franche C, Lindstrom K, Elmerich C. 2009.** « Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. » *Plant and Soil* 321(1-2): 35-59.
- Frank B.1989.** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsc. Bot. Ges.* 7:332- 346.
- Freitas ADS, Borges WL, Andrade MMM, Sampaio EVSB, Santos CERS, Passos SR, Xavier GR, Mulato BM, Lyra MCCP. 2014).** Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8 (8): 788-796.
- Gage DJ. 2004.** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 68: 280–300
- Galloway, J.N.; Townsend, A.R.; Erisman, J.W.; Bekunda, M.; Cai, Z.; Freney, J.R.; Martinelli, L.A.; Seitzinger, S.P.; Sutton, M.A .2008.** Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889-892.

Garau G, Reeve WG, Brau L, Deiana P, Yates RJ, James D, Tiwari R, O'Hara GW, Howieson JG. 2005. The symbiotic requirements of different *Medicago* spp. suggest the evolution of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* with hosts differentially adapted to soil pH. *Plant and Soil* 276, 263-277. doi: 10.1007/s11104-005-0374-0

Germon JC. 2013. Quelques apports de la microbiologie des sols à l'agronomie et au développement des plantes cultivées. Académie d'agriculture de France.

Gillis M, Van TV, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* ;**45**:274- 289.

Goormachtig, S., Capoen, W. and Holsters, M. 2004. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends in Plant Science*, 9 (11): 518-522.

Graham PH. 1964. Studies on the utilization of carbo-hydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek*. **30**: 68-72.

Graham PH , Sadowsky M J, Keyser H H , Barnet Y M, Bradley RS , Cooper JE, Deley DJ, Jarvis BDW, RoslyCcky EB, Strijdom BW, Young JPW. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stemnodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 582-587.

Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology* **131**:872-87.

Heyn CC. 1963. The annual species of *Medicago*. *Scripta hierosolymitana*, 12, 1-154.

Hirsch AM. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol* **2**:320-326.

Hirsch, A. M., and Fujishige, N. A. 2012. "Molecular signals and receptors: communication between nitrogen-fixing bacteria and their plant hosts," in *Biocommunication of Plants*, eds G. Witzany and F. Baluška (Berlin: Springer Berlin Heidelberg), 255–280.

Hollis AB, Kloos WE, Elkan GH . 1981. Hybridization studies of *rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. *J. Gen. Microbiol.* **123**:215-222.

Hopkins W G. 2003. Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. Edition de boeck. P 99-120.

Hrish AM .1992 .Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* . **122**: 211-237.

- Hung MH, Bhagwath AA, Shen FT, Devasya RP, Young CC. 2005.** Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiology*, 49(6): 577- 584.
- Hussain M, Ashraf M, Saleem M, Hafeez FY. 2002.** Isolation and characterization of rhizobial strains from alfalfa (*Medicago* sp.). *Pak. J. Agri. Sci.* **39**:32-34.
- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Herouart D. 2007.** H₂O₂ is required for an optimal establishment of the *Medicago* / *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *JB Accepts*, 2007 (non publie)
- Jarvis , BDW, pankhurst CE, et Patel JJ. 1982.** *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.***32**: 378-380.
- Jarvis BDW, van Berkum P, Chen WX, Nour S, Fernandez MP, Cleyet Marrel JC, Gillis M. 1997.** Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobiummediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst.Bacteriol.***47**:895-898.
- Jida M, Assefa F. 2012.** Phenotypic diversity and plant growth promoting characteristics of *mesorhizobium* species isolated from chickpea (*cicerarietinum l.*) growing areas of ethiopia. *Afr. J. Biotech* **11**, 7483-7493.
- Jida M, Assefa F. 2012.** Phenotypic diversity and plant growth promoting characteristics of *mesorhizobium* species isolated from chickpea (*cicerarietinum l.*) growing areas of ethiopia. *Afr. J. Biotech* **11**, 7483-7493.
- Jones K. M., Kobayashi H., Davies B. W., Taga M. E., Walker G. C. 2007.** How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium* -*Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5** 619–633.
- Jordan DC. 1982.** transfert of *Rhizobium japonicum* b Buchanan to *Bradyrhizobium* gen. nov. A genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int.J. syst. Bacteriol.***32**: 136-139.
- Jordan DC.1984** .Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In: N.R. Kreig et J.H. Holt (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.1 the Williams & Wlkins Co. Baltimore.
- Jourand P, Giraud E, Bena G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004.** *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume rootnodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.***54**:2269-2273.
- Kassem, M., Cappelano, A., Gounot, A.M. 1985** Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficience de *Rhizobium meliloti*. *Mircen Journal*, **1**, 63 75.
- Kersters K, Hinz K H, Hertle A, Sergers P, Lievens A, Siegmann O et De Ley J. 1984.** *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:56-70.

Kneip C, Lockhart P, Voss C, Maier UG. 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis. *BMC Evol Biol* 7, 55.

Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Makarova, N.M., Tikhonovich, I.A. 2004. The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. *Microbiology* 73, 156–158.

Krishnan H B, Pueppke S G. 1991. Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 512-520.

Küçük C, Kivanc M, Kinaci E. 2006. Characterization of *Rhizobium* sp. Isolated from Bean. *Turk. J. Biol.* 30: 127-132.

Kuykendall LD. 2004. Genus *Azorhizobium* of the family *Hypomicrobiaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, 2nd Volume.

LaBauer DS & Treseder KK . 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89: 371–379.

Labreuche J., Lellahi A., Malaval C., Germon J.C. 2011. Impact des techniques culturales sans labou (TCSL) sur le bilan énergétique et le bilan des gaz à effet de serre des systèmes de culture. *Cah. Agric.* 20, 204-215.

Lesins KA, Lesins I. 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae): A Taxogenetic Study. The Hague, The Netherlands.

Li Q Q, Wang E T, Chang Y L, Zhang Y Z, Zhang YM, Sui X H, Chen W F, Chen W X. 2010. *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *sojiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils in Hebei province of China. *Int J Syst Evol Microbiol* .61(PT8): 1981-1988.

Lin DX, Wang ET, Tang H, Han T X, He Y R, Guan S H, Chen WX. 2008. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herballegume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*;58:1409-1413.

Lindstrom K, Lehtomaki S .1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galega) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiology Letters* 50, 277–287.

Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*. 161: 453–463.

Liu J, You L, Amini M, Obersteiner M, Herrero M, Zehnder AJB & Yang E. 2010. A high-resolution assessment on global nitrogen flows in cropland. *P Natl Acad Sci USA* 107: 8035–8040.

Liu, Y.Y.; Wu, L.H.; Baddeley, J.A.; Watson, C.A. 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 31, 155-172.

- Lloret L, Ormeno-Orrillo E, Rincon R, Martinez-Romero J, Rogel-Hernandez MA, Martinez-Romero E. 2007.** *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:280-290.
- Lohar DP, Sharopova N, Endre G, Penuela S, Samac D, Town C, Silverstein KA, VandenBosch KA. 2006.** Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 140:221–234.
- London, J.G. 2005.** Nitrogen study fertilizes fears of pollution. *Nature* , 433, 791.
- Lu YL, Chen WF, Han LL, Wang ET, and Chen WX. 2009.** *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 3006-3011.
- Lyra MCCP, Freitas ADS, Silva TA, Santos CERS. 2013.** Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. *Afr. J. Biotechnol.* 12: 2147-2156.
- Maatallah J, Berraho EB, Munoz S, Sanjuan J, Lluch C. 2002.** Phenotypic and molecular characterization of chickpea Rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 531- 540
- Macheret, V. 1997.** Mise au point de sondes ADN pour la détection et la caractérisation des *Rhizobium* : application à l'isolement à partir du sol des *Rhizobium* symbiotes du haricot. Dijon, Université de Dijon. **Doctorat.**
- Martens, Miet, Delaere, Manuel, Coopman, Renata, De Vos, Paul, Gillis, Monique, Willems, Anne. 2007.** Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 489-503.
- Martinez-Romero E, Segovia L, Martins F, Franco AA, Graham P, Pardo MA(1991).** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. *Beans* and *Leucaena* sp. *Trees. Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 17: 458–466.
- Merabet C, Martens M, Mahdhi M, Zakhia F, Sy A, Le Roux C, Domergue O, Coopman R, Bekki A, Mars M, Willems A, de Lajudie P. 2010.** Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010 60: 664-674 .
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset A E, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A , Kondorosi E. 2006.** Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(13): 5230-523.
- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani M E, Mhamdi R. 2007.** Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N(2)-fixation with

Phaseolus vulgaris constitute a novel biovar (bv. mediterraneense) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology* **187**: 79-85.

Moreira F M S, Gillis M, Pot B, Kersters K, Franco A .1993. Characterisation of rhizobia isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 135- 146.

Moreira FMS, Cruz L, de Faria SM. 2006. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Syst. Appl. Microbiol.*; **29**:197– 206.

Nègre R. 1959. Révision des Medicago d'Afrique du Nord. *Bull. Soc. Hist. Nat. De l'Afrique du Nord* **50**,267-3 14.

Nick G, de Lajudie P, Eardly BD, Suomalainen S, Plin L, Zhang X, Gillis M, Lindstrom K. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. Nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. Nov. isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1359-1368.

Nogom A, Nakagawa Y, Sawada H, Tsukahara J, wakabayashi S, Uchiumi T, Nuntagij A, kotepong S, Suzuki A, Higashi S, Abe M. 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobacterium* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50**:17-27.

Odee DW, Sutherland JM ,Makatiani ET, McInroy SG, Sprent JI. 1997. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil* **188**: 65–75.

Ogasawara M, Suzuki T, Mutoh I, Annapurna K, Arora NK, Nishimura Y, et Maheshwari DK. 2003. *Sinorhizobium indiaense* sp.nov. and *Sinorhizobium abri* sp.nov.isolated from tropical legumes *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. *Symbiosis*.34(1): 53-68.

Oldroyd G, Murray J, Poole P, Downie J, Bassler B, Lichten M, Schupbach G .2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review Genetics.* **45**:119-144.

Oldroyd, G. E. D., and Downie, J. A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 519–546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839.

Ollivier J, Kleineidam K, Reichel R, Thiele-Bruhn S, Kotzerke A,Kindler R, Wilke BM & Schloter M . 2011. Effect of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundances of genes and transcripts involved in nitrogen transformation in the root-rhizosphere complexes of maize and clover. *Appl Environ Microb* **76**: 7903–7909.

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

-
- Parker, M.A. 2002.** *Bradyrhizobia* from wild Phaseolus, Des modium, and *Macroptilium* species in northern Mexico. Appl Environ Microbiol 68, 2044–2048.
- Paul, K. H., Dickin, K.L, Ali, N. S., Monterrosa, E. C., Stoltzfus, R. J. 2008.** Soy and rice-based processed complementary food increases nutrient intakes in infants and is equally acceptable with or without added milk powder. J Nutr 138 ,1963-1968.
- Pawlowski K, Demchenko KN .2012.**The diversity of actinorhizal symbiosis.Protoplasma 249, 967-97.
- Payakapong W, Tittabutr P, Teaumroong N, Boonkerd N, Singleton PW, Borthakur D. 2006.** Identification of two clusters of genes involved in salt tolerance in Sinorhizobium sp. strain BL3. Symbiosis 41:47–51.
- Peoples M.B., Brockwell J., Herridge D.F., Rochester I.J., Alves S., Urquiaga S., Boddey R.M., Dakora F.D., Bhattarai S., Maskey S.L., Sampet C., Rerkasem B., Khan D.F., Haug-gaard-Nielsen H., Jensen E.S. 2009.** The contribution of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. Symbiosis, 48, 1-17.
- Peret B. 2007 .** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III (France).
- Perret X, Staehe Lin, C, Selander RK. 2000.** Molecular basis of symbiostic promiscuity.Mcrobiol. Mol.Biol. Rev. 64: 180-201.
- Prosperi JM,Guy P,Genier G,Angervian M. 1995 .**Ressources génétiques des plantes fourragères et gazon, éd INRA.Paris.
- Puppo, A., Rigaud, J., and Job, D. 1981.** Role of superoxide anionin leghemoglobin autoxidation. Plant Science Let.22,353–360.
- Rai R, Dash PK, Mohapatra T, Singh A. 2012.** Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. Indian J. Exp. Biol. 50: 340-350.
- Ramirez-Bahena M H, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodriguez-Navarro D N., Mateos PF, Martinez-Molina E, Willems A, Velazquez E. 2009.** *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. Int J Syst Evol Microbiol 59: 1929-1934
- Ramos, C.1996.** Effect of agricultural practices on the nitrogen losses to the environment. Fertilizer Res. 43,183-189.
- Reganold, J.P.; Papendick, R.I.; Parr, F.F.1990.** Sustainable agriculture. Sci. Am. 262,112-120.
- Rivas R, Willems A, Palomo JL, Garcia-Benavides P, Mateos PF, Martinez-Molina E, Gillis M. et Velazquez E. 2004.**"*Bradyrhizobium betae* sp. nov. isolated from roots of *Betavulgaris* affected by tumor-like deformations." Int. J. Syst. Evol. Microbiol.54:1271-1275.

- Rodrigues CS, Laranjo M, Oliveira S. 2006.** Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. *Curr. Microbiol.* 53 (1): 1-7.
- Rome S, Fernandez MP, Brunel B, Normand P, Cleyet-Marel JC. 1996.** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*;46:972-980.
- Rüberg S, Tian ZX, Krol E, Linke B, Meyer F, Wang Y, Pühler A, Weidner S, Becker A. 2003.** Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.* 106:25-56.
- Ryu, H., Cho, H., Choi, D., and Hwang, I. 2012.** Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis. *Mol. Cells* 34, 117–126. doi: 10.1007/s10059-012-0131-131
- Santos R, Herouart D , Puppo A et Touati D. 2001.**Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in Rhizobium -legume symbiosis . *Molecular Microbiology* 38 (4) : 750-759
- Saoudi M. 2008.** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L): Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Mentouri University of Constantine. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Algérie.
- Sato Y., Monincová M., Chaloupková R., Prokop Z., Ohtsubo Y., Minamisawa K. 2005.** Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Appl. Environ. Microb.* 71 4372–4379 10.1128/AEM.71.8.4372-4379.2005
- Sawada, H., Kuykendall, L.D., and Young, J.M. 2003.** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* 49, 155-179.
- Schneider et Huyghe (2015).** Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durable. Éditions Quæ RD 10, 78026 Versailles Cedex
- Scholla MH , Elkan GH. 1984.***Rhizobium fredii* sp. nov. a fast growing species that effectively nodulates soybean. *Int. J. System. Bacteriol.* 34:484-486.
- Segovia, L., Young, J. P. W. & Martinez-Romero, E. 1993.** Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strain as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43, 374±377.
- Shamseldin A, El-Saadani M, Sadowsky MJ, An CS. 2009.** Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating *faba bean* (*Vicia faba* L.) by analysis of nodC, ARDRA, and rDNA sequence analysis. *Soil Biol. Biochem.* 41:45–53.

Shamseldin A, Nyalwidhe J, Werner D. 2006. A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* strains. *Curr. Microbiol.* **52**:333–339.

Shetta ND, Al-Shaharani TS, Abdel-Aal M. 2011. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* **10** (3): 410-418.

Shimekite F. 2006. Pattern of nodulation and nitrogen fixing performance of introduced legumes in some parts of north gondar, ethiopia MSc Thesis, Addis Ababa University, Ethiopia.

Singh, B., Kaur, R. and Singh, K. 2008. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). *Afr. J. Biotechnol.* **7**(20): 3671-3676.

Singh, B., Kaur, R. and Singh, K. 2008. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). *Afr. J. Biotechnol.* **7**(20): 3671-3676.

Small E, Jomph M. 1989. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Can. J. Bot.* **67**:3260-3294.

Somasegaran P, Hoben HJ. 1994 Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. New York: Springer-Verlag, pp 240-58.

Stoate C., Báldi A., Beja P., Boatman N.D., Herzon I., van Doorn A., de Snoo G.R., Rakosy L. and Ramwell C. 2009. Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe — A review. *Journal of Environmental Management*, **91**, 22–46.

Stowers MD, Eaglesham ARJ. 1984. Physiological and symbiotic characteristics strains nodulating Peanut (*Arachis hypogae* L.) roots. *Appl. Env. Microbiol.* **61**: 1599-1609.

Struffi P, Corich V, Giacomini A, Benguedouar A, Squartini A, Casella S, Nuti MP. 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. In: *J. Appl. Microbiol.*, **84**, p. 81-89.

Sullivan GT, Ronson CW. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:5145–5149.

Sy A. 2001. Caractérisation de *Methylobacterium* nodulants: une nouvelle espèce bactérienne nodulant les crotalaires. Université Claude Bernard-Lyon1 .193.

Tan ZY, Kan FL, Peng GX Wang ET, Reinholdt-Hurek B, et Chen WX. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp.nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**:909-914.

Timmers A C, Soupene E, Auriac M C, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G. 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in *alfalfa* nodules. *Mol Plant Microbe Interact*, Vol. **13**, No. **11**, pp. 1204-1213

Toledo I, Lloret L and Martí'nez-Romero E. 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 54–64.

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

Trüper HG, de Clari L .1997. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in “apposition”. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:908- 909.

Udvardi MK, Tabata S, Parniske Met Stougaard J. 2005. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* **10**: 222-228.

Udvardi, M., and Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 781–805. doi: 10.1146/annurev-arplant- 050312-120235

Umar, A.S.; Iqbal, M. 2007. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **27**, 45-57.

Van Berkum P, Beyene D, Campbell T A, Bao G, Eardly . 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. in one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48**:13-22.

Van Rossum, D., Schuurmans, F.P., Gillis, M., Muyotcha, A.M., Van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H., Boogerd, F.C.1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 1599–1609

Vasse J, de Billy F, Camut S , Truchet G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in *alfalfa* nodules. *J Bacteriol.* **172** (8): 4295-4306.

Villegas M D C, Rome S, Maure L. 2006. Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. medicaginis) of *S. meliloti*. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 526-538.

Vincent JM. 1970. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. IBP Handbook, No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd.

Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez Galdona R, Werner D, Martinez-Romero E. 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:569-575.

Vishal KD, Abhishek C. 2014. Isolation and characterization of *Rhizobium leguminosarum* from root nodule of *Pisum sativum* L. J. Acad. Indus. Res. **2**: 464-467.

Vriezen JAC, de Bruijn JF, Nusslein K. 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 3451-3459.

Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. 2012. Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. Cellular Microbiology **14** : 334-342.

Wang E, Tan Z Y, Willems A, Ferna´ ndez-Lo´ pez M, Reinhold- Hurek B and Martinez-Romero E. 2002. *Sinorhizobium morelense*, sp. nov. a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 1687–1693.

Wei GH, Wang ET, Tan ZY, Zhu ME et Chen WX. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *sinorhizobium Kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from indigofera spp. And *Kummerowia stipulacae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 2231-2239.

Weir BS 2011. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>

Willems A, Fernandez-Lopez M, Munoz-Adelantado E, Goris J, De Vos P, Martinez-Romero E, Toro N and Gillis M. 2003. Description of New Ensifer strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Cassida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**, 1207–1217.

Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, Russo DM, Zorreguieta A, Downie JA. 2008. Glucomanan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. Journal of Bacteriology. **190**: 4706–4715.

Wong K and Golding GB. 2003. A phylogenetic analysis of the pSymb replicon from the *Sinorhizobium meliloti* genome reveals a complex evolutionary history. Can. J. Microbiol. **49**: 269–280.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) com. nov. Microbiology and Immunology. **36**: 1251-1275.

Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **52**: 2219-2230.

Young JM. 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen, et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang, et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination “*Sinorhizobium adhaerens*” (Casida 1982)

Willems 2003. legitimate? Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 2107–2110.

Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:89–103.

Young ND, Debelle F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Bedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H. 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480, 520–524.

Zahran HH. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. In: *Micobiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968–989.

Zakhia F, deLajudie P (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21:569–576.

Zhang X X, Harper R, Karsisto M, Lindström K. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 104–113.

ANNEXES

Annexe 01

Tableau 01 : composition des milieux de culture utilisés pour l'isolement des rhizobia

| Milieux | N° du milieu | Composition | g/L |
|---|--------------|---------------------------------------|-----------|
| YEMA (Vincent,1970) | 1 | K ₂ H PO ₄ | 0.5 |
| | | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0.2 |
| | | NaCl | 0.1 |
| | | Extrait de levure | 1 |
| | | Mannitol | 10 |
| | | Agar | 20 |
| | | Eau distillée | 1 L |
| | | pH = 6.9 | |
| YEMA au glutamate et FeCl₃ (de Lajudie et al., 1998) | 2 | K ₂ HPO ₄ | 0.5 |
| | | MgSO ₄ | 0.2 |
| | | NaCl | 0.05 |
| | | CaCl ₂ | 0.04 |
| | | FeCl ₃ | 0.004 |
| | | Glutamate de sodium | 0.5 |
| | | Mannitol | 10 |
| | | Extrait de levure | 1 |
| | | Eau distillée | 1 L |
| | | Agar | 20 |
| pH = 6.8 | | | |
| AS au Chlorure de sodium (Bromfield et al.,1993) | 3 | Tryptone | 0.4 |
| | | Chlorure de sodium | 5 |
| | | Extrait de levure | 0.1 |
| | | CaCl ₂ | 0.1 |
| | | Eau distillée | 1 L |
| | | Agar | 15 |
| TA Tryptone Agar | 4 | Tryptone | 10 |
| | | Chlorure de sodium | 5 |
| | | Extrait de levure | 1 |
| | | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 1 ml a 1M |
| | | CaCl ₂ | 1 ml a 1M |
| | | Eau distillée | 1L |
| | | Agar | 15 |
| | | pH = 7.4 | |

Annexe 02 :

Tableau 02: composition du milieu Peptone Glucose Agar

| | |
|-------------|-----|
| Composition | g/L |
| Glucose | 10 |
| Peptone | 5 |
| Agar | 15 |
| pH = 6.8 | |

Tableau 03 : Composition du milieu distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Milieu 01 :

| | |
|----------------------|-----|
| Composition | g/L |
| Extrait de levure | 10 |
| Glucose | 20 |
| Carbonate de calcium | 20 |
| Agar | 18 |

Milieu 02 :

| | |
|-------------------|-----|
| Composition | g/L |
| Lactose | 10 |
| Extrait de levure | 1 |
| Agar | 18 |

Réactif de Benedict :

| | |
|--------------------------------------|------|
| Composition | g/L |
| Citrate de sodium | 173 |
| Carbonate de sodium anhydre | 100 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 17.3 |

Annexe 03 :

Tableau 04 : Solutions stocks utilisée pour le test de nodulation *in vitro*

| Solutions stocks | | Composition |
|--|-------------|-------------|
| | Solution 01 | |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | | 2.44 g |
| KH ₂ PO ₄ | | 1.36 g |
| | Solution 02 | |
| ZnSO ₄ , 7H ₂ O | | 0.184 g |
| H ₃ BO ₃ | | 0.124 g |
| MnSO ₄ , 2H ₂ O | | 0.338 g |
| | Solution 03 | |
| Na ₂ MOO ₄ , 2H ₂ O | | 50 mg |
| CuSO ₄ , 5H ₂ O | | 3.2 mg |
| Co Cl ₂ , 6 H ₂ O | | 5 mg |
| | Solution 04 | |
| | Fe-EDTA* | |
| EDTA | | 0.774 g |
| FeSo ₄ , 7H ₂ O | | 0.556 g |

*la solution deFe-EDTA doit être stockée à l'obscurité

Tableau 05 : composition du milieu BNM (buffered nod medium)

| BNMAK | |
|---------------------------------------|---------------------|
| Composants | Composition en (mg) |
| CaSo ₄ , 2H ₂ O | 344 mg |
| MES Buffer | 390 mg |
| Agar Kalys | 10 g |
| Solutions stocks | Volume par (ml) |
| Solution 01 | 5 ml |
| Solution 02 | 2.5 ml |
| Solution 03 | 2.5 ml |
| Solution 04 | 2.5 ml |

Le pH doit être ajusté entre 6,5 avec du KOH2N.

Annexe 04 :

Tableau 06 : Composition de la solution nutritive sans azote utilisée pour le test de nodulation *in vivo*

| Solutions stock de | Concentration (M) |
|--|------------------------|
| macroéléments | |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0.5M |
| KH ₂ PO ₄ | 0.7M |
| Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O | 0.4M |
| Fe- EDTA * | 20mM |
| CaCl ₂ | 1M |
| Solutions stock de micro- | Concentration (mg/ ml) |
| éléments | |
| H ₃ BO ₃ | 1 |
| CuSO ₄ , 5H ₂ O | 1 |
| ZnSO ₄ , 7H ₂ O | 1 |
| MnSO ₄ , 2H ₂ O | 1 |
| Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O | 1 |

* Préparation de la solution FeSO₄ 5.6 g / l et 7.4 g / l de Na₂EDTA

Le pH doit être ajusté entre 6,5 avec du KOH 2N.

Pour la solution nutritive azotée, ajouter du NH₄NO₃ à 1 ml / L.

Tableau 07 : souches de références.

| Code des souches | Nom des souches | Source |
|------------------|----------------------------------|---|
| Rm 41 | <i>Sinorhizobium meliloti</i> | Young, 2003 |
| Rm 1021 | <i>Sinorhizobium meliloti</i> | Young, 2003 |
| Sin 01 | <i>Sinorhizobium fredii</i> | Scholla <i>et al.</i> , 1984; Young, 2003 |
| Sin 02 | <i>Sinorhizobium medicae</i> | Rome <i>et al.</i> , 1996; Young, 2003 |
| C 58 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Smith et Towsnd, 1907 |
| R 05 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | - |

Annexe 05 :

Tableau : Nombre des isolats obtenus à partir de chaque plant de *Medicago ciliaris* L.

| Plante hôtes <i>M. ciliaris</i> L. | isolats | source |
|---|------------------------------|---------------|
| Plant 01 | Meds 1 et Meds 2 | Notre étude |
| Plant 02 | Meds 4 | Notre étude |
| Plant 03 | Meds 4 et Meds 5 | Notre étude |
| Plant 04 | Meds 6 et Meds 7 | Notre étude |
| Plant 05 | Meds 8 et Meds 9, Meds 10 | Notre étude |
| Plant 06 | Meds 11 | Notre étude |
| Plant 07 | Meds 12 | Notre étude |
| Plant 08 | Meds 13 | Notre étude |
| Plant 09 | Meds 14 | Notre étude |
| Plant 10 | Meds 15 | Notre étude |
| Plant 11 | Meds 16 | Notre étude |
| Plant 12 | Meds 17 | Notre étude |
| Plant 13 | Meds 18 et Meds 19 | Notre étude |
| Plant 14 | Meds 20 | Notre étude |
| Plant 15 | Meds 21 et Meds 22 , Meds 23 | Notre étude |
| Plant 16* | Meds 24, Meds 25 , Meds 26 | Notre étude |
| Plant 17* | Medp 01 et Medp 06 , Medp 07 | Notre étude |
| Plant 18* | Medp 09 et Medp10 , Medp 12 | Notre étude |
| Plant 19* | Medp13 et Medp 14 | Notre étude |
| Plant 20* | Medp 17 | Notre étude |
| Plant 21* | Medp 18 et Medp 19 | Notre étude |

* : souches isolées à partir des nodosités récoltées après piégeage.

Résumés

Medicago ciliaris L. est une légumineuse établissant une interaction symbiotique avec une bactérie tellurique de la famille des Rhizobiacées. Cette interaction induit l'organogénèse racinaire d'un nouvel organe, la nodosité dans laquelle s'établit un microenvironnement propice à la différenciation des rhizobia en bactéroïdes fixateurs du diazote atmosphérique. Ces derniers réduisent ainsi le N₂ atmosphérique en ammonium, assimilé ensuite par la plante hôte. Cette réduction étant très endergonique *M. ciliaris* L. fournit aux bactéroïdes des substrats carbonés issus de la photosynthèse.

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer la diversité phénotypique et symbiotique qui existe au sein d'une collection de trente-sept symbiotes isolés à partir des nodosités de vingt un plants de *Medicago ciliaris* issues de la récolte direct du site d'échantillonnage et du piégeage de la commune de Zerizer (l'est de l'Algérie) et six souches de référence .

Les caractéristiques phénotypiques des souches de rhizobium ont été étudiés la tolérance à la salinité, températures élevées, pH acides et alcalines, la sécheresse et la résistance aux antibiotiques ainsi que des caractéristiques symbiotiques et culturels a permis de décrire une grande diversité physiologique chez les isolats testés. Treize isolats du total pourrait croître à 45 ° C. Seuls six isolats ont pu croître à 4% de NaCl. En outre, les isolats qui ont montré la tolérance à la salinité ont également montré la tolérance au stress hydrique, ce qui indique une relation directe entre ces deux voies physiologiques. Les isolats ont été testés pour leur capacité à la fixation biologique de l'azote. Cependant, sept isolats ont été classés comme étant *Agrobacterium*.

Mots clés: Rhizobia, symbiose, *Medicago ciliaris* L., fixation biologique d'azote, nodulation.

Summary:

Medicago ciliaris L. is a legume establishing a symbiotic interaction with soil bacteria of the family Rhizobiaceae. This interaction induces organogenesis root of a new organ, the nodule in which establishes a microenvironment conducive to the differentiation of rhizobia into bacteroids fixing atmospheric dinitrogen. These and réduient ammonium atmospheric N₂, then assimilated by the host plant. This reduction is very endergonic *M. ciliaris* provides Bacteroides carbon substrates produced by photosynthesis.

This work was carried out to assess the phenotypic and symbiotic diversity that exists within a collection of thirty-seven symbionts isolated from nodules twenty one plants *Medicago ciliaris* from the live harvesting of the sampling site trapping of the common Zerizer (eastern Algeria) and six reference strains.

Phenotypic characteristics of thirty seven rhizobia strains isolated from root nodules of *Medicago ciliaris* L. growing in soils collected from Zerizer (north eastern Algeria), were studied. Tolerance to salinity, high temperatures, acid and alkaline pHs, drought and to antibiotics as well as symbiotic and cultural characteristics allowed the description of a wide physiological diversity among tested isolates. Thirteen isolates from the total could grow at 45°C. Only six isolates grew at 4% NaCl. Furthermore, the isolates which showed tolerance to salinity stress also showed tolerance to water stress, indicating direct relationships between these two physiological pathways. High salt and water stress tolerant strains were isolated and tested for their ability to biological nitrogen fixation. However, seven isolates were categorized into *Agrobacterium*.

Key words: rhizobia symbiosis, *Medicago ciliaris* L, biological nitrogen fixation, nodulation.

ملخص :

يؤدي التعايش الريزوبيوم و البقوليات إلى تشكيل عقد جذرية مثبتة لنتروجين الغلاف الجوي ، هذه الظاهرة تمثل فائدة اقتصادية و زراعية معتبرة.

في هذه الدراسة تم عزل 37 عن أحد وعشرين نبتة ميديكو من منطقة زريزر شرق الجزائر. تم دراسة خصائص المظهرية لسلاسل الريزوبيا من حيث درجة الحرارة، الحموضة، الجفاف، مقاومة المضادات الحيوية. ثلاثة عشر من بكتيريا تمكنت من نمو في درجة حرارة 45C°، ستة فقط من العزلات قد تنمو في 4% من NaCl.

أظهرت الدراسة أن هناك علاقة مباشرة بين مقاومة الجفاف و الحموضة.

كما أظهرت الدراسة أيضا أن 7 عزلات صنفت تنتمي إلى *Agrobacterium*

كلمات البحث: التعايش ، مديكو الهدي L، تثبيت النيتروجين البيولوجي.

ARTICLE