**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L' ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHESCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DE MEDEA**

**FACULTE DES SCIENCES**

**Mémoire**

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master** En Biologie

Spécialité: Microbiologie Appliquée

**Par**

**M^ME OURTEMACHEHAKIMA**

**M^ME MAKHLOUFISIHAM**

**Thème**

# Isolement et caractérisation de quelques souches de *Sinorhizobiummeliloti* de la région de Médéa et étude de l'effet du pH,température et NaCl sur leur croissance.

Soutenue publiquement le: 21/06/2018 ., devant le jury composé de:

Président: M^R GHENNAM. K MCB àUniversité de Médéa

Examinateur 1: M^MEHOCEINI. A MCB à Université de Médéa

Examinateur 2: M^RCHAMI. B MAA à Université de Médéa

Encadreur: M^RATSAMNIA. D MCB à Université de Médéa

**Année universitaire:2017/2018**

# Remerciements

**Tout d'abord nous remercions le bon Dieu tout puissant de la bonne santé, la volonté et la patience qu'il nous a donné pour réaliser ce modeste travail.**

**Nous exprimons nos profondes reconnaissances et gratitude à toutes les personnes qui ont apporté leur aimable contribution à ce travail par leurs remarques, leurs conseils, leurs encouragements et leurs compétences et en particulier :**

**M$^{r}$ Atsamnia Djamel, d' avoir accepter d'être notre promoteur, et pour son confiance et compréhension.**

**M$^{r}$ Ghennam Kamel qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.**

**ainsi que**

**M$^{me}$ Hoceini Amina et M$^{r}$ Chami Bouazza**

**pour avoir accepter l'évaluation de ce mémoire et d'en être des examinateurs.**

**M$^{r}$ Ainas Mahfoud ,non seulement pour l'aide très précieuse qu'il nous a apporté, mais aussi pour son enthousiasme communicatif, sa patience et sa totale disponibilité .**

**Nos remerciements vont également à M$^{r}$ Boulala larbi, M$^{r}$ Azzi Omar et M$^{ME}$ Brahim Belhawari Nacira, pour leurs aides, qu'ils nous ont apportées.**

**Nous remercions tous les travailleurs de laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie sans exception, ainsi que les travailleurs de laboratoire physico-chimique de Saidal.**

**Enfin nous remercions, toutes les personnes qui nous ont aidé, de près ou de loin.**

# Dédicace

**C'est avec un cœur remplie**

**de joie que je dédie ce modeste travail**

**A mes très chers et adorables parents qui m'ont toujours fort**

**encouragé, aidé dans la recherche du savoir durant**

**tout mon parcours avec beaucoup de tendresse, de dévouement,**

**de gentillesse et d'amour.**

**A mon très cher mari Mahfoud qui a sacrifié son temps pour m'aider**

**et orienter, pour son soutien moral et ses encouragements permanents.**

**A mes précieuses et adorables filles Lina, Sara ,Aya et**

**mon bébé Serine pour leur patience et leur compréhension.**

**A mes tendres sœurs Ghania et Karima et leurs petites**

**familles pour leurs amours et leurs générosités.**

**A mes frères Mouloud et Abdenour et leurs petites familles**

**qui m'ont toujours encouragé afin d'aller toujours plus loin.**

**A mes belles sœurs surtout Lynda.**

**A tous mes beaux frères chacun avec son nom.**

**A mon très cher binôme Siham avec laquelle**

**j'ai partagé tout les moments de ce travail.**

**A tous ceux qui me connaissent.**

**Merci**

**Hakima**

# Dédicace

**Je dédie ce modeste travail à la mémoire de ma défunte mère,**

**à mon père pour son aide, que dieu le procure bonne santé et longue vie.**

**Ce mémoire dédie à mon mari et mon fils zinedine, à mes frères et ma sœur Lamia**

**Egalement à ma collègue Hakima et à son mari**

**et je tiens à les remercier pour leurs aides et encouragements**

**et à mes copines: M$^{me}$ Brahim Belhouari Nacira, M$^{me}$ Dahmani Fatima Zohra et**

**M$^{me}$ Chergui Hania.**

**Enfin à tous les étudiants de la promotion 2017**

**de la microbiologie appliquée.**

**Bien amicalement**

**SIHAM**

**Résumé**

Huit souches de *Sinorhizobium* ont été purifiées à partir des nodules de *Medicago (M. arabica et M. polymorpha)* collectées dans la région de Médéa. Des échantillons de sol ont été prélevés des sites de collecte des végétaux et analysés pour la détermination de leur pH et de leur salinité. Après le test d'authentification par nodulation du végétal hôte, nous avons procédé à la caractérisation phénotypique des souches (cellulaire, culturale, biochimique et physiologique).

Les colonies des *Sinorhizobium* apparaissent après 24h d'incubation et elles acidifient le milieu YMA +BBT, ces résultats indiquent donc que ce sont des bactéries acidifiantes à croissance rapide. En outre, l'effet du pH, température et NaCl sur leur croissance a été recherché. Les souches testées ont présenté une bonne croissance, entre 20 et 35°C avec une gamme optimale de 27 - 35°C, et entre pH 6 et 8 aussi ont une tolérance modérée pour la salinité.

la résistance des souches vis-à-vis des différents antibiotiques testés montre que la majorités sont sensibles à la Cefotaxine et résistantes à la Pénicilline G. les souches isolées présentent des caractères phénotypiques de faible variation reflétant un indice de ressemblance modéré.

**Mots clés:** *Sinorhizobium*, *Medicago*, nodulation, pH , température, la salinité.

**Abstract**

Eight strains of *Sinorhizobium* were purified from *Medicago* nodules (*M. arabica and M. polymorpha*) collected in the region of Medea. Soil samples were taken from plant collection sites and analyzed for pH and salinity .After the nodulation authentication test of the host plant, we proceeded to the phenotypic characterization of the strains (cellular, cultural, biochemical and physiological).

The *Sinorhizobium* colonies appear after 24 hours of incubation and they acidify the YMA + BBT medium, these results indicate that they are fast-growing acidifying bacteria. ). In addition, the effect of pH, temperature and NaCl on their growth was investigated.

The strains tested showed good growth, between 20 and 35 ° C with an optimal range of 27 - 35 ° C, and between pH 6 and 8 also have a moderate tolerance for salinity. the resistance of the strains towards the various antibiotics tested shows that the majority are sensitive to Cefotaxin and resistant to Penicillin G. the isolated strains have low variation phenotypic characters reflecting a moderate sign of resemblance.

**Key words:** *Sinorhizobium* , *Medicago*, nodulation, pH, temperature, salinity.

**الملخص**

تم انتقاء ثمانية سلالات من *السينورزوبيا* من عقد جذور نبات *المديكاغو*( م. *عربيكا* و م. *بوليمورفا)* التي تم جمعها من منطقة المدية. كما تم اخذ عينات من التربة من مواقع جمع النباتات وتحليلها من اجل معرفة درجة حموضتها وملوحتها. بعد اختبار التوثيق العقدي للنباتات المضيفة, تم الشروع في توصيف المظاهر (الخلوية, الزراعية, البيوكيميائية و الفيزيولوجية).

تظهر مستعمرات *السينورزوبيا* بعد 24 ساعة من الحضن كما أنها تسبب حموضة الوسط ي م أ +ب ب ت هذه النتائج تشير إلى أن البكتيريا محمضة و سريعة النمو بالإضافة إلى ذلك تم دراسة تأثير درجة الحموضة , الحرارة و الملوحة على نموها. أظهرت السلالات المختبرة نموا جيدا يتراوح بين 20 و 35 درجة مئوية مع نطاق أمثل من 27 إلى 35 درجة مئوية, وبين درجة الحموضة 6 و8 وأيضا تحمل متوسط للملوحة.

تظهر مقاومة السلالات تجاه المضادات الحيوية المختلفة التي تم اختبارها أن الأغلبية منها حساسة للسيفو تاكسين ومقاومة للبنسيلين ج. السلالات المعزولة لها مؤشرات ظاهرية قليلة الاختلاف تعكس علامة متوسطة من التشابه.

**الكلمات المفتاحية:** *السينورزوبيا , المديكاغو, العقدي, الحموضة, الحرارة, الملوحة*.

**SOMMAIRE**

**Liste des abréviations.**

**Liste des figures.**

**Liste des tableaux.**

**Introduction générale** ..... 01

**CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

I. Généralités..... 03

I.1. Le cycle de l'azote..... 03

I.2. La symbiose……...…...…... 04

I.2.1. Les différentes symbioses fixatrices d'azote chez les plantes…… 04

I.2.1.a. La symbiose actinorhizienne ……..…… 04

I.2.1.b. La symbiose avec les cyanobactéries……..... 05

I.2.1.c. La symbiose rhizobienne……..……. 05

II. L'interaction symbiotique Légumineuses-Rhizobia……..…….…….…. 06

II.1. Macrosymbiote……...…….....… 07

II.1.1. Généralités sur les légumineuses…….. 07

II.1.2.Taxonomie des légumineuses…….……. 08

II.1.3. Intérêt des légumineuses…….…..... 09

II.1.4. Les Légumineuses fourragères…….……...…..... 09

II.1.4.a . Le genre *Medicago*…….…….. 09

II.1.4.b. Taxonomie du genre *Medicago*……. 10

II.1.4.c. Origine géographique des *Medicago*…….……..…...…... 10

II.1.4.d. Les différentes espèces du genre *Medicago*…….…….... 11

II.1.5. Les espèces étudiées: *Medicago arabica et Medicago polymorpha*……...…..…….…. 11

II.1.5.a. *Medicago arabica* ( Luzerne d'Arabie, Luzerne tachetée)……..…….. 11

A)- Généralités……..……..…. 11

B)- Description de la plante……..……..…...…… 12

C)- La position taxonomique de *Medicago arabica*…….... 13

D)- Intérêt de *Medicago arabica*…….…..... 13

II.1.5.b. *Medicago polymorpha*……...…… 13
A)- Généralités……...…...…. 13
B)- Description de la plante……...……..... 14
C)- Arbre taxonomique de *Medicago polymorpha*……....…… 15
D)- La variabilité génétique de *Medicago polymorpha* ……..…… 15
E)- *M. polymorpha* et apport Nutritionnel……..…….... 15
II.2. Microsymbiote…….…...…. 16
II.2.1. Taxonomie des rhizobia……...…. 17
II.2.2. Le genre *Sinorhizobium meliloti*……..……...…. 18
II.2.3. Taxonomie du *Sinorhizobium meliloti*……...…. 18
II.2.4. Caractères morphologiques des *Sinorhizobium meliloti* ……..…... 19
II.2.5. Caractères biochimiques et physiologiques des *Sinorhizobium meliloti* ……. 19
II.2.6. Caractères culturaux des *Sinorhizobium meliloti* …….……...…… 20
II.3. La nodulation……..…….…… 20
II.3.1. Les différents types de nodules……...……. 21
II.3.2. Les différences principales entre les nodules déterminés et indéterminés……...… 22
II.3.3. Le processus de nodulation……...…… 22
II.3.4. Les paramètres affectant la réussite de la nodulation……...…… 24
III. Les bases moléculaires de la symbiose…….…… 26
III.1. Les flavonoïdes ……..….. 27
III.2. Les facteurs Nod …….……...…… 27
III.3. La Leghémoglobine……..…….……...….. 28
III.4. La nitrogénase……..……...…... 29
VI. La résistance des rhizobia aux antibiotiques…….…… 29

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Matériels biologiques…….…….. 30
II. Méthodes…… 31
II.1. Analyse des sols……... 31
II.1.1. Le pH des sols…….……..…… 31
II.1.2. La conductivité des sols…….…... 31
II.2. Isolement et collection des souches de *Sinorhizobium*……...……. 31

II.2.1. Collecte des nodules racinaires…….…….. 32
II.2.2. La conservation des nodules…….... 32
II.2.3. La morphologie des nodules……...…. 33
II.2.4. Extraction des bactéroïdes……..…….…… 33
II.2.5. Technique d'isolement…… 34
II.2.6. Conservation des isolats……..……. 34
II.2.7. Test d'authentification (test de nodulation)…….…… 35
II.2.7.a. Germination aseptique ……..... 35
II.2.7.b. Culture et inoculation des plantules…….……. 35
II.3. Identification des souches de *Sinorhizobium*…….. 36
II.3.1. Identification morphologique des bactéries…….……. 36
A/ Etat frais…….... 36
B/ Coloration de Gram……...…….…….…… 37
II.3.2. Identification morphologique des colonies…….... 37
II.3.3. Test de mobilité……...……. 37
II.3.3. Recherche de la catalase…….. 38
II.3.4. Recherche de l'oxydase……...……..... 38
II.3.5. Le type respiratoire……...…….…….... 38
II.3. 5. Vitesse de croissance sur milieu YMA+ Bleu de bromothymol……. 39
II.4. Caractères biochimiques des souches de *Sinorhizobium*……. 39
II.5. Caractères physiologiques…….…….…... 42
II.5.1. Effet du pH……...…… 42
II.5.2. Effet de la température……...…….. 42
II.5.3. Effet de NaCl…… 43
II.5.4. Sensibilité des souches aux antibiotiques……. 43
III. Analyse numérique des caractères phénotypiques des souches…… 44

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Le pH et la salinité des sols……...……..……. 45
II. Isolement des microsymbiotes……..…….. 45
III. Test d'authentification des souches de *Sinorhizobium*….…….…… 46
III.1. La morphologie des nodules…….……..... 47

IV. Caractérisation phénotypique des souches de *Sinorhizobium*…….. 48
IV.1. Caractérisation morphologique……..…….…….... 48
IV.1.1. Les Caractéristiques morphologiques des cellules…….…… 48
IV.1.2. Les Caractéristiques morphologiques des colonies…..…….. 49
IV.2. Caractérisation biochimique…….. 50
IV.2.1. Mesure de la vitesse de croissance…….…….... 50
IV.2.2. Les tests biochimiques……... 51
IV.2.3. Le type respiratoire…….…… 53
IV.3. Caractérisation physiologique …….…….... 54
IV.3.1. L'effet du pH sur la croissance des souches isolées ……...…… 54
IV.3.2. L'effet de la température sur la croissance des souches isolées…….……. 54
IV.3.3. L'effet de la salinité sur la croissance des souches isolées….…… 55
IV.4. Test de résistance et de sensibilité aux antibiotiques ……..... 56
V. Analyse numérique des caractères phénotypiques…….….. 57

**Conclusion générale**……...…... 61
**Références bibliographiques.**
**Annexes.**

**Liste des Abréviations**

| | |
|---|---|
| **ADH** | Arginine dihydrolase |
| **ADI** | Acide adipique |
| **ADN** | Acide désoxyribonucléique |
| **ARA** | Arabinose |
| **ARN** | Acide ribonucléique |
| **ATP** | Adénosine triphosphates |
| **BBT** | Bleu de bromothymol |
| **°C** | Degré Celsius |
| **$Ca^{2+}$** | Ion de calcium |
| **CAP** | Acide caprique |
| **CIT** | Trisodium citrate |
| **cm** | Centimètre |
| **$CO_2$** | Dioxyde de carbone |
| **DO** | Densité optique |
| **EPS** | Exo polysaccharides |
| **ESC** | Esculine |
| **g** | Gramme |
| **GEL** | Gélatine |
| **Glu** | Glucose |
| **GNT** | Potassium gluconate |
| **h** | Heure |
| **HCl** | Acide chlorhydrique |
| **$H_2 SO_4$** | Acide sulfurique |
| **$HgCl_2$** | Chlorure de mercure |
| **j** | Jours |
| **K** | Potassium |
| **KCl** | Chlorure de potassium |
| **KDa** | Kilo dalton |
| **$Khi^2$** | Distance euclidienne |
| **LPS** | Lipopolysaccharides |
| **MAL** | Maltose |

| | |
|---|---|
| **MAN** | Mannitol |
| **$Mg^{2+}$** | Ion de magnésium |
| **mg** | Milligramme |
| **Min** | Minute |
| **ml** | Millilitre |
| **MLT** | Acide malique |
| **mm** | Millimètre |
| **MNE** | Mannose |
| **$N_2$** | Azote gazeux |
| **NaCl** | Chlorure de sodium |
| **NAG** | N-acétyle-glucosamine |
| **NaOH** | Hydroxyde de sodium |
| **NE** | Non entérobactéries |
| **$NH_4^+$** | Ammoniaque |
| **nm** | Nanomètre |
| **$NO_3^+$** | Nitrate |
| **nod** | Nodulation |
| **$O_2$** | Oxygène |
| **PAC** | Acide phenylacétique |
| **pb** | paire de bases |
| **pH** | Potentiel hydrogène |
| **PNPG** | Para-NitroPhenyl-βD-Galactopyranoside |
| **TRP** | Tryptophane |
| **URE** | Urée |
| **YMA** | Yeast Mannitol Agar |
| **YMB** | Yeast Mannitol Broth |
| **µl** | Microlitre |
| **µm** | micromètre |
| **µS** | micro Siemens |
| **%** | Pourcentage |

## Liste des figures


**Figure 01 :** Cycle de l'azote……..... 03

**Figure 02 :** Nodules racinaires (A) et nodules caulinaires (B) ..... 06

**Figure 03 :** Invasion d'une poile racinaire de légumineuse par Rhizobia..... 07

**Figure 04 :** Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques de légumineuses *Papilionoideae* ..... 08

**Figure 05 :** Origine géographique des *Medicago* ……..……..... 11

**Figure 06 :** *Medicago arabica* ..... 12

**Figure 07 :** Les fruits de *Medicago arabica*..... 12

**Figure 08 :** *Medicago polymorpha* ..... 14

**Figure 09 : :** La morphologie des *Sinorhizobium* à l'état libre et à l'état symbiotique……..…. 19

**Figure 10 :** Coupe longitudinale schématique d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B)…….. 21

**Figure 11 :** Différentes étapes permettant la formation des nodules racinaires…….…… 24

**Figure 12 :** Dialogue moléculaire entre la plante ( *Medicago*) et la bactérie (Rhizobia)…..…. 26

**Figure 13 :** Structure moléculaire sensu stricto de flavonoïde à droite et de isoflavonoïde à gauche..... 27

**Figure 14 :** Structure moléculaire de facteur Nod ……..…… 28

**Figure 15:** Représentation générique d'une molécule de leghémoglobine…….…….... 28

**Figure 16 :** Les deux métalloprotéines de la nitrogenase……. 29

**Figure 17: :** Les deux espèces de *Medicago* étudiées, A) *Medicago arabica* et *B) Medicago polymorpha* ……..... 30

**Figure18:** Récolte frais des nodules racinaires……..…… 32

**Figure 19:** Conservation des nodules…….……. 33

**Figure 20:** Extraction des bactéroïdes……..……..…… 34

**Figure 21:** Ensemencement des extraits nodulaires par étalement……..…….. 34

**Figure 22:** Germination des graines……. 35

**Figure 23:** Inoculation des plantules……..……. 36

**Figure 24 :** Lecture des résultats du milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate ……..……...…...…… 38

**Figure 25 :** Virage de couleur du milieu BBT selon la valeur du pH…….……..... 39

**Figure 26:** La galerie API20 NE stérile……..…… 40

**Figure 27:** Aspect des nodules sous la loupe binoculaire…….……..…… 47

**Figure 28:** Résultats du test Mannitol -mobilité -Nitrate……..…….. 48

**Figure 29:** Observation microscopique à immersion……..……...…. 48
**Figure 30:** Aspect coloniale d'une souche de *Sinorhizobium* sur milieu YMA (A) et sur milieu YMA au Rouge de Congo (B)……...……..…….. 49
**Figure 31:** Croissance de *Sinorhizobium* sur milieu YMA+BBT……...…..……...… 50
**Figure 32:** Lecture de résultat sur la galerie API 20 NE……....…… 51
**Figure 33:** Résultats du test oxydase…….……. 52
**Figure 34:** Résultat montrant le type respiratoire……..…...……..… 53
**Figure 35:** L'effet du pH sur la croissance ……...…….…… 54
**Figure 36:** L'effet de la température sur la croissance ……. 55
**Figure 37:** L'effet de la salinité sur la croissance ……....……...…….…….. 55
**Figure 38:** Résultats du l'antibiogramme de la souche P2…….……....….. 57
**Figure 39:** Dendrogramme de regroupement des souches de *Rhizobium* isolées de genre *Medicago (M. arabica et M. polymorpha)*……..…….. 59

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** Taxonomie des légumineuses…… 08
**Tableau 2:** Taxonomie de genre *Medicago*…… 10
**Tableau 3:** Taxonomie de *Medicago arabica*…… 13
**Tableau 4:** Taxonomie de *Medicago polymorpha*…… 15
**Tableau 5:** Exemples d'associations entre rhizobia et légumineuses…… 17
**Tableau 6:** Taxonomie de *Sinorhizobium meliloti*…… 18
**Tableau 7:** Différences principales entre les nodules déterminé et indéterminé…… 22
**Tableau 8:** pH, conductivité et salinité des sols collectés…… 45
**Tableau 9:** Souches isolées des nodules de plantes provenant des différents sites…… 46
**Tableau 10:** Résultats des tests d'authentification…… 46
**Tableau 11:** Nouveau codage des souches…… 47
**Tableau 12:** Caractères morphologiques et culturaux des isolats…… 49
**Tableau 13:** Résultats des tests biochimiques…… 52
**Tableau 14:** Résultats de l'antibiogramme sur les souches isolées…… 56
**Tableau 15:** Matrice des caractères phénotypiques…… 58
**Tableau 16:** Résultats du calcul des coefficients de similitude…… 60

## Introduction générale

Les animaux et les humains sont hétérotrophes pour le carbone et l'azote. Ils ne peuvent pas produire des sucres ou des acides aminés directement à partir des formes minérales de ces éléments ($CO_2$ pour le carbone, $NH_4^+$ ou $NO_3^-$ ou $N_2$ pour l'azote). C'est pourquoi ils ont besoin de trouver dans leur alimentation des sucres, acides aminés ou protéines déjà formées pour satisfaire leurs besoins. Le règne animal est donc très dépendant du monde végétal. L'azote est par conséquent un élément à la base de la chaîne alimentaire.

L'azote joue un rôle primordial dans le métabolisme des plantes. C'est le constituant numéro "un" des protéines et composants essentiels de la matière vivante (Il rentre dans la structure des bases puriques et pyrimidiques, chlorophylles, cytochromes, phytohormones (auxines, cytokinines..) et de plusieurs enzymes et vitamines...).

En outre, une alimentation azotée insuffisante perturbe profondément le développement des plantes. La carence azotée conduit à une plus faible densité de peuplement, à une fructification précoce et à une teneur réduite en protéines. Une telle situation se marque par un jaunissement des feuilles (la chlorose) lié à un déficit de synthèse de la chlorophylle. Il s'agit donc d'un facteur de croissance, mais aussi de qualité (teneur en protéines des céréales par exemple) et cela explique l'importance de l'apport azoté dans la nutrition végétale (Zaid, 2006).

L'azote est présent dans la nature sous deux états:

- à l'état moléculaire, sous forme de $N_2$, où il constitue 78 % de l'air que nous respirons.
- à l'état combiné, sous forme minérale ( Ammoniaque, nitrite, nitrate ) ou sous forme organique.

Pour la plupart des plantes, l'azote est prélevé dans le sol sous forme minérale (très majoritairement sous forme nitrique $NO_3^-$ (80-90%) et accessoirement sous forme ammoniacale $NH_4^+$ (10-20%). Seules les cultures légumineuses (luzerne, trèfle, petit pois…) ont la faculté de fixer l'azote gazeux par leurs nodosités (fixation de l'azote de l'air $N_2$ par leur symbiose avec les Rhizobia (diazotrophie)) (Hopkins, 2003).

La découverte de la fixation d'azote par les légumineuses remonte au XIXème siècle. Il a fallu plus de cinquante ans, entre les travaux du français Jean-Baptiste Boussingault et ceux des allemands Hermann Hellriegel et Hermann Wilfarth, pour établir, en 1886, que l'aptitude des légumineuses à utiliser l'azote de l'air était due à la présence de nodosités, sur les racines, induites par des "ferments" contenus dans le sol. Cette découverte fut rapidement suivie par

l'isolement des Rhizobia par Beijerinck, puis de plusieurs autres bactéries fixatrices d'azote non associées aux plantes comme *Azotobacter* et *Clostridium pasteurianum* (Frank, 1889). Cette fixation est catalysée par un complexe enzymatique connu sous le nom de nitrogénase qui réduit l'azote atmosphérique (azote moléculaire) en ammonium, cette forme d'azote combinée étant ensuite assimilée par la plante hôte suivant des voies métaboliques bien connues.

L'intérêt majeur des symbioses fixatrices d'azote réside dans le fait qu'elles permettent aux légumineuses et plantes actinorhiziennes de croître normalement dans des sols carencés en azote, sans qu'il soit nécessaire d'apporter des engrais azotés coûteux et souvent source de pollution. L'exploitation intense agricole est à l'origine d'épuisement du sol en éléments nutritif surtout l'azote, les plantes fixatrices d'azote à leur tour restaurent la fertilité des sols et enrichissent suffisamment ces derniers en azote qui conduit à l´augmentation du rendement des cultures (Boussaïd et al, 1995).

Toutefois, le rendement de la fixation biologique de l'azote, la survie des Rhizobia, l'établissement de la symbiose ainsi que la physiologie des végétaux, sont des phénomènes très sensibles aux facteurs du milieu, tels que le pH, la température et la salinité, lors ce que s'écartant de l'optimum requis, peuvent provoquer un stress chez les organismes vivants. C'est dans ce contexte s'inscrit notre travail qui consiste à:

- Isoler, identifier et caractériser quelques souches de *Sinorhizobium* isolées de nodules de *Medicago* de la région de Médéa, les espèces impliquées sont : *Medicago arabica* et *Medicago polymorpha*.
- Déterminer l'infectivité (aptitude à noduler) des souches testées.
- Déterminer l'effet du pH, température et salinité sur la croissance des souches isolées à partir de *Medicago*.

Ce modeste travail se structure en trois chapitres:

- **Premier chapitre**: Synthèse Bibliographique.
- **Deuxième chapitre**: Nous présenterons les matériaux est les méthodologies de travail.
- **Troisième chapitre**: Sera consacré à l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

En fin une conclusion générale est établie pour ressortir l'apport de notre approche.

# CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. Généralités

### I.1. Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substances organiques et de nouveau à l'azote dans la nature. C'est un cycle continu, fermé, très complet, mais relativement simple qui est maintenu par les décomposeurs et les bactéries azotées **(Figure1).**

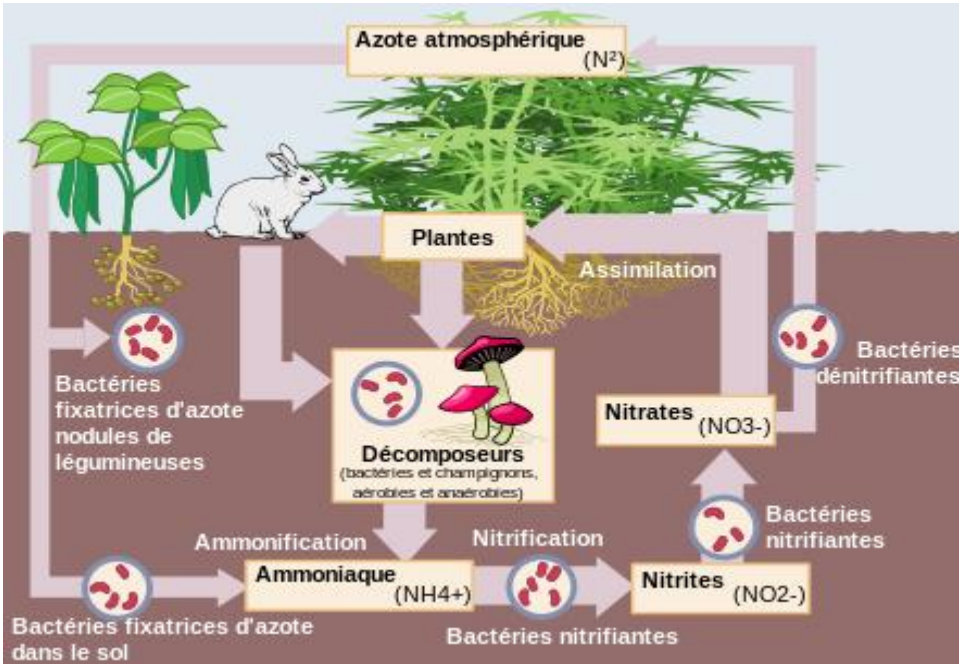



**Figure 1:** Cycle de l'azote (Peret, 2007).

Les produits azotés sont en très grande partie produits par les plantes qui, après avoir absorber des nitrates dans la solution du sol et à partir des cupules glucidiques issues de la photosynthèse, fabriquent des protides, des acides aminés et des acides nucléiques utilisables par les animaux qui excrètent leurs déchets azotés sous forme d'urée, d'acide urique ou d'allantoïne.

Les déchets végétaux ou les cadavres animaux subissent une protéolyse qui conduit à la fabrication d'Ammoniaque. Cette ammonification se fait avec le concours de divers microorganismes des sols et des eaux: bactéries aérobies, bactéries anaérobies strictes ou facultatives, moisissures…etc.

L'Ammoniaque produit est rapidement oxydé par des bactéries du genre *Nitrosomas* qui transforment l'Ammoniaque en nitrite (nitrification), des bactéries du genre *Nitrobacter* poursuivent cette oxydation des nitrites pour former des nitrates (nitratation). C'est surtout sous cette forme que l'azote est réutilisé par les plantes, les algues ou les cyanobactéries.

L'azote nitrique peut être réduit sous l'action de certaines bactéries dénitrifiantes qui restituent l'azote sous forme gazeuse, cette dernière forme d'azote ($N_2$) est inutilisable que par certaines microorganismes diazotrophes, capables de fixer l'azote gazeux atmosphérique et de fabriquer de $NH_4^+$, directement utilisables par les végétaux à l'état symbiotique avec les bactéries dans les nodules (Rhizobia (légumineuse), *Frankia* (non légumineuse)) ou à l'état libre (*Azotobacter, Clostridium, Cyanobactéries*) (Day et al, 2001 ., Downie, 2005 ).

## I.2. La symbiose

La **symbiose** (du grec **sym**, *ensemble* et **biose**, *vivre*) est une association intime, durable entre deux organismes hétérospécifiques (appartenant à des espèces différentes), les organismes impliqués sont qualifiés de symbiotes, le plus gros peut être nommé hôte.
La durabilité de l'association est une notion relative qui est caractérisée par une association recouvrant une part significative de la durée de vie de l'un des deux organismes.

### I.2.1. 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, 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 symbiotes fixateurs d'azote sont divers: bactéries telluriques, épiphytes ou endophytes, Cyanobactéries ou encore Actinomycètes.

#### I. 2.1.a. La symbiose actinorhizienne

Les Actinomycètes, maintenant appelés Actinobactéries, sont des Procaryotes telluriques Gram positive. 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 nouveau 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, reparties en 8 familles regroupées sous le terme de plantes actinorhiziennes: les *Betulaceae*, les *Casuarinaceae*, les *Coriaroaceae*, les *atiscaceae*, *Elaegaceae*, *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. 2.1.b. La symbiose avec les Cyanobactéries**

Les Cyanobactéries constituent un des groupes les plus vastes et variés de bactéries filamenteuses Gram négative, photosynthétiques, et fixatrices d'azote. Parmi ces bactéries, le genre *Anabaena*, symbiote des fougères d'eau du genre *Azolla* et pour le genre *Nostoc*, symbiote des Angiospermes du genre *Gunnera* (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 anaérobique, nécessaire au bon fonctionnement de leur nitrogénase. Le type d'association symbiotique avec les plantes hôtes peut être extracellulaire ou intracellulaire, mais ces bactéries n'induisent pas la différenciation d'organes spécifiques.

**I.2.1.c. La symbiose rhizobienne**

La symbiose rhizobienne est une association entre les plantes de la famille des légumineuses (*Fabaceae)* et des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes, à bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, un nouvel organe , le nodule, est formé sur les racines (**Figure 2A)** ou plus rarement sur les tiges à partir de primordiaux racinaires dormants et disposés en rang le long de la tige appelés nodules caulinaires **(Figure 2B)** ( Giraud et Fleischman, 2004) .

C'est au sein de cet organe protecteur que l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries.

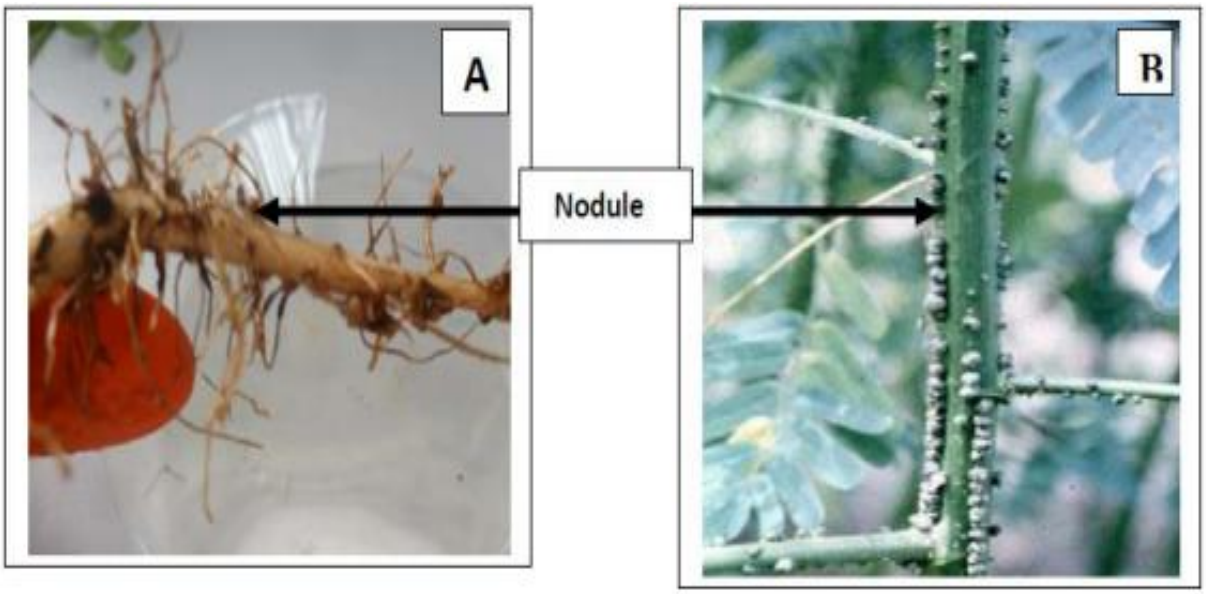



**Figure 2:** Nodules racinaires (A) et nodules caulinaires (B).

## II. L'interaction symbiotique Légumineuses-Rhizobia

Les cellules pilifères des racines de Fabacées (*Fabaceae*) émettent des substances chimiques de reconnaissance (type flavonoïdes/ isoflavonoïdes). Ces exsudats attirent la bactérie qui ,en retour, synthétise et sécrète des facteurs de nodulation (facteurs Nod). Ces « facteurs Nod » diffèrent selon l'espèce rhizobienne et ont une structure antigénique spécifique, reconnue par la plante (Rogel et al, 2011).

La bactérie est reconnue spécifiquement par l'Angiosperme qui forme un cordon infectieux par invagination de la membrane plasmique. Celui-ci se forme toujours d'abord à l'apex d'un poil absorbant et se développe ensuite pour atteindre les cellules du cortex racinaire. En même temps, cette zone du cortex racinaire se développe et forme un nodule **(Figure 3).** Lorsque les bactéries atteignent cette zone, elles infectent les cellules. Dans le cytoplasme, les bactéries ne sont pas libres, elles sont regroupées dans des vésicules appelées symbiosomes.

Dans les cellules colonisées, les bactéries se transforment en bactéroïdes qui fixent l'azote atmosphérique ($N_2$) au bénéfice de la plante et en échange la plante leur fournis l'énergie et les nutriments nécessaires à leur métabolisme (Bacle et Tailliez, 2017).

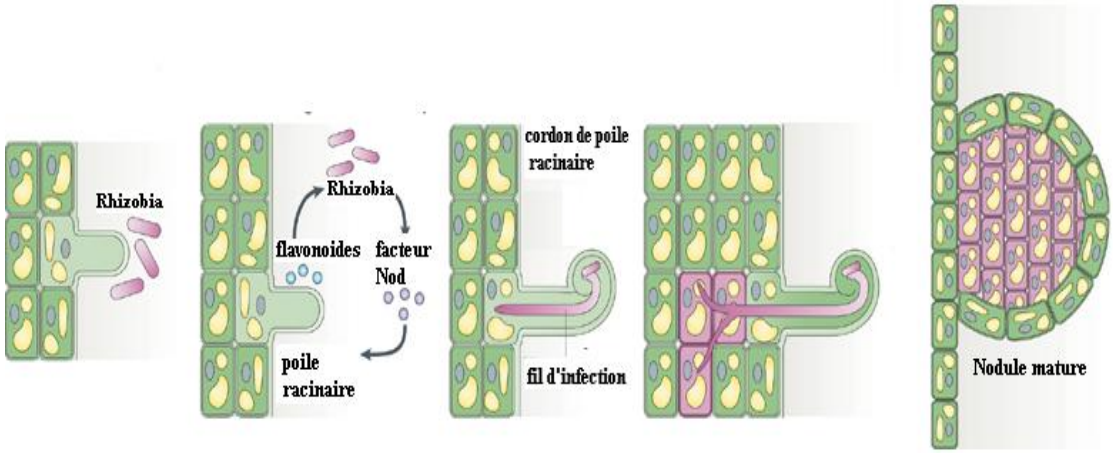



**Figure 3:** Invasion d'une poile racinaire de légumineuse par les rhizobia .

**(** Deakin et Broughton, 2009)

## II.1. Macrosymbiote

### II.1.1. Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses (Luzerne, trèfle, pois, soja, sulla, lupin,…) sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des *Fabaceae* (Dreyfus, 1997 ., Lewis et al, 2005), qui représentent la troisième famille des plantes supérieures après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* et la plus importante en genre avec plus de 720 genres et 20 000 espèces (Duhoux et Nicole, 2004).

Elles se répartissent en trois sous familles:

*Caesalpinioideae* avec une fleure pseudo-papilionacée, *Mimosoideae* avec une fleure régulière et *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleure typique en papillon (Dreyfus et al, 1997., Brunton, 2002), ces dernières constituent la sous-famille la plus grande avec 476 genres et environ 14000 espèces (Doyle et Luckow, 2003).

A l'exception de l'arachide, les légumineuses d'intérêt agronomique appartiennent aux clades des Galégoïdes (tempérées) comme le genre *Medicago* (luzerne) et Phaséolides ( tropicales) comme notamment les genres *Cajanus*, *Glycine* (soja), *Phaseolus* (haricot) de la sous-famille des *Papilionoideae* (Choi et al, 2004) **(Figure 4).**

Les *Papilionoideae* ont une grande importance au niveau de l'agriculture. Elles sont cultivées pour leurs graines riches en protéines ou pour leurs propriétés fourragères (Jim smith, 2005).

La nodulation par les rhizobia est plus fréquente chez les deux sous-familles des Mimosacées et des Papilionacées (plus de 90% des espèces) (Doyle, 2011).

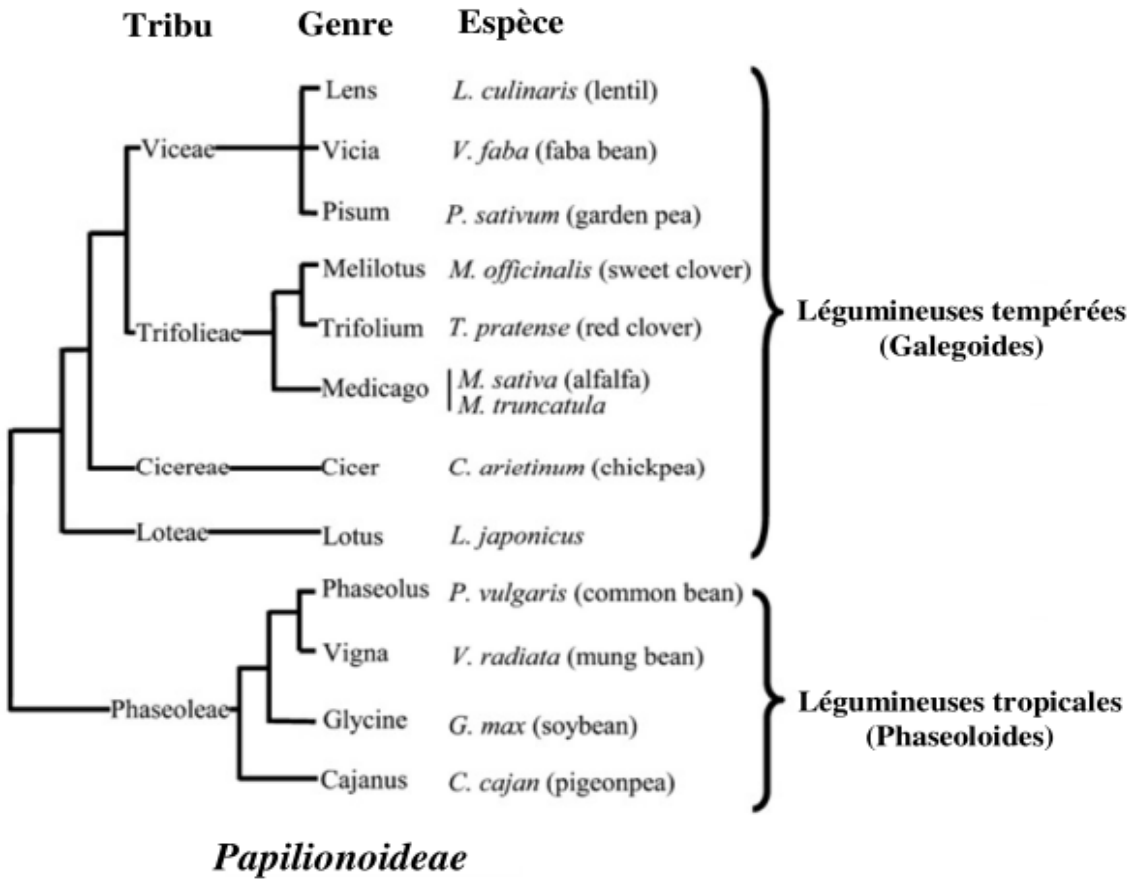



**Figure 4:** Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques des légumineuses. *Papilionoideae* (Zhu et al, 2005)

### II.1.2. Taxonomie des légumineuses

La taxonomie des légumineuses est représentée dans le **tableau 1** (Doyle et Luckow, 2003).

**Tableau 1:** Taxonomie des légumineuses.

| **Taxonomie** | **Nomenclature** |
|---|---|
| Règne | *Plantea* |
| Embranchement | *Spermatophyta* |
| Sous-embranchement | *Angiospermae* |
| Classe | *Dicotylédonae* |
| Sous-classe | *Rosidae* |
| Ordre | *Fabale* |
| Famille | *Fabaceae* |

### II.1.3. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses jouent un rôle très important dans la restauration des sols dégradés, elles sont considérées comme des plantes pionnières qui favorisent l'implantation d'autres espèces. Elles jouent aussi des rôles très importants dans la lutte contre l'érosion, la désertification et la dégradation des sols (Thami et El Mzouri, 2000).

La présence des légumineuses dans le système de production agricole jouent un rôle majeur dans l'augmentation de la diversité et l'équilibre des systèmes agro-écologiques (Schneider et Huyghe, 2015).

Les légumineuses sont des plantes de teneur élevée en protéines et en vitamines qui peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides grâce à leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique (Boussaïd et al, 1995).

### II.1.4. Les Légumineuses fourragères

Les Légumineuses fourragères sont des plantes utilisées dans l'alimentation des herbivores (pâturage, foin, ensilage), soit à l'état sauvage soit à l'état cultivé comme fourrage pour les animaux. On place dans ce groupe: la Luzerne (*Medicago*), le Sainfoin, le Lupin, le Lotier, les Trèfles et la Vesce.

### II.1.4.a. Le genre *Medicago*

Le nom scientifique du genre *Medicago* désignée souvent par le terme générique "luzerne", n'est pas lié à ses propriétés médicinales, mais au fait que la luzerne serait originaire de Médie. Quant au nom vernaculaire, il est emprunté à l'occitan « luserna », qui désigne aussi une partie lumière ou le ver luisant, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante.

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

Le genre *Medicago* fait partie de la famille des Fabacées. Comme beaucoup des espèces de cette famille, les espèces de *Medicago* fixent l'azote atmosphérique grâce à la symbiose.

### II.1.4.b. Taxonomie du genre *Medicago*

La position systématique du genre *Medicago* est représentée dans le **tableau 2** selon (Guignard, 1998).

**Tableau 2 :** Taxonomie de genre *Medicago*

| **Taxonomie** | **Nomenclature** |
|---|---|
| Règne | *Plantea* |
| Embranchement | *Spermatophyta* |
| Sous-embranchement | *Angiospermae* |
| Classe | *Dicotylédonae* |
| Sous-classe | *Rosidae* |
| Ordre | *Fabale* |
| Famille | *Fabaceae* |
| Sous-famille | *Faboideae* |
| Tribu | *Trifolieae* |
| Genre | *Medicago* |

### II.1.4.c. Origine géographique des *Medicago*

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 la 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 **(Figure 5).**

Au cours du XIXème siècle, elles ont 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 étages bioclimatiques.

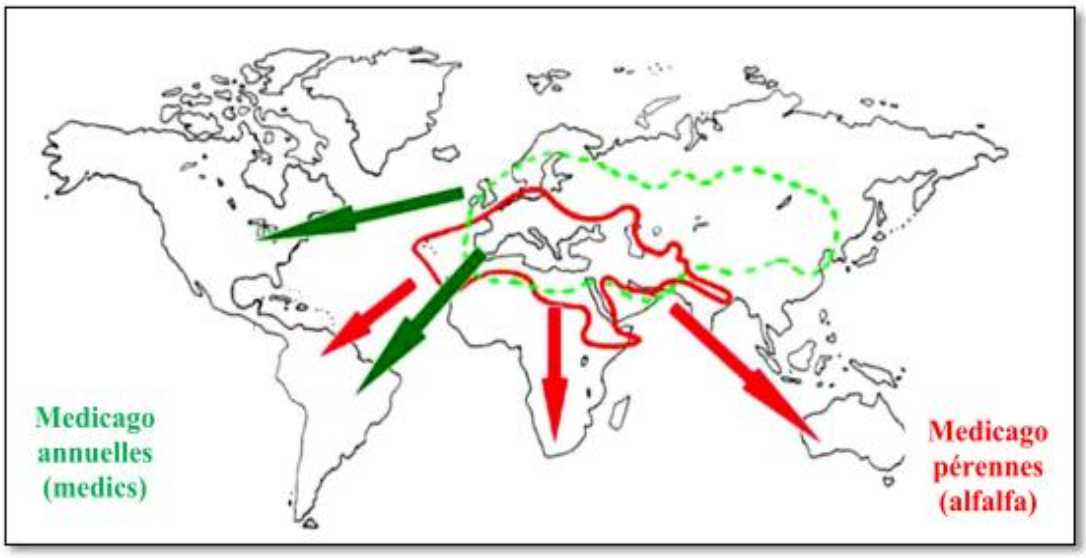



**Figure 05:** Origine géographique des *Medicago.*
(Delalande et al, 2007)

### II.1.4.d. Les différentes espèces du genre *Medicago*

D'après Lesins et Lesins (1979) le genre *Medicago* comprend 55 espèces herbacées parmi lesquelles 34 sont annuelles et 21 sont pérennes. Le genre *Medicago* présente des espèces annuelles diploïdes (2n=16) et pérennes tétraploïdes (2n=32) (Négre, 1959., Heyn, 1963 ., Lesins et Lesins, 1979 ., Small et Jomph, 1989).

Les formes annuelles sont réputées comme étant autogames, les formes pérennes sont préférentiellement allogames (Prosperi et al, 1993).

### II.1.5. Les espèces étudiées: *Medicago arabica et Medicago polymorpha*

Le nom *Medicago* renvoie à la Médie, une région d'Asie Mineure située au nord-ouest de l'Iran actuel, entre la mer Caspienne et le Golfe Persique, qui était habitée par les Mèdes pendant l'antiquité. *Medicago arabica* serait donc une étrangère originaire du bassin méditerranéen et *M. polymorpha* est très semblable à *M. arabica* et pousse souvent avec *M. arabica.*

### II.1.5.a. *Medicago arabica* ( Luzerne d'Arabie, Luzerne tachetée)

**A)-Généralités**

Cette petite luzerne est principalement caractérisée par la tache noirâtre ou tache rougeâtre (goutte de sang) qui orne le centre de chacune de ses folioles (chaque feuille est constituée de trois parties distinctes ou folioles) **(Figure 6)**.



**Figure 6:** *Medicago arabica.*

**B)-Description de la plante**

Selon Coste :

***Medicago arabica*** est une plante annuelle de 20-60 cm, couchée, presque glabre ; folioles obovales en coin, dentées au sommet, ordinairement tachées de noir ou de rouge au milieu; stipules incisées-dentées; fleurs jaunes, petites (4-5 mm), 2-5 sur des pédoncules aristés plus courts que la feuille; pédicelles plus courts que le tube du calice; ailes plus courtes que la carène; gousse glabre, assez grande, subglobuleuse, à faces planes, à peine veinées, à 4 ou 6 tours de spire très rapprochés **(Figure7)**, un peu lâches, hérissés d'épines distiques, entrecroisées, fortement divergentes, arquées en dehors, non crochues; graines oblongues en rein (Flora Gallica, 2013).



**Figure 7:** Les fruits de *Medicago arabica.*

**C)- La position taxonomique de *Medicago arabica***

La taxonomie de l'espèce *Medicago arabica* est présentée dans **le tableau 3** ci-dessous .

**Tableau 3 :** Taxonomie de *Medicago arabica* selon (Guignard, 1998).

| **Taxonomie** | **Nomenclature** |
|---|---|
| Règne | *Plantea* |
| Embranchement | *Spermatophyta* |
| Sous-embranchement | *Angiospermae* |
| Classe | *Dicotylédonae* |
| Sous-classe | *Rosidae* |
| Ordre | *Fabale* |
| Famille | *Fabaceae* |
| Sous-famille | *Faboideae* |
| Tribu | *Trifolieae* |
| Genre | *Medicago* |
| Espèce | *Medicago arabica* |

**D)- Intérêt de *Medicago arabica***

Comme toutes les légumineuses, *Medicago arabica* est riche, mais aussi généreuse, de petites boules blanches (nodosités) sur ses racines abritent des bactéries locataires, ces dernières sont capables d'utiliser l'azote atmosphérique pour fabriquer des ressources qu'elles partagent volontiers avec la plante hôte. *Medicago arabica* est donc un bon engrais vert, une fois fauchée, elle laisse racines, nodosités et (surtout) parties aériennes comme autant de provisions d'azote dont profitent les plantes alentours.

*Medicago arabica* fait un bon fourrage pour le bétail, mais comme bon nombre de légumineuses, elle est impropre à la consommation pour l'homme ( Carcaillet, 1993).

**II.1.5.b. *Medicago polymorpha***

**A)-Généralités**

***Medicago polymorpha* (Figure 8)** est une légumineuse herbacée du genre *Medicago* originaire d'Asie occidentale et centrale et des pays méditerranéens. Elle a été largement introduite dans le monde entier. On la trouve en particulier dans les régions à climat méditerranéen, mais elle ne s'y limite nullement. Elle pousse sur un large éventail de sols,

mais elle pousse mieux dans les sols alcalins, se développant le plus abondamment sur les argiles lourdes (pier, 2013).



**Figure 8:** *Medicago polymorpha.*

**B)-Description de la plante**

La description suivante provient de Flora (2013):

'Herbes annuelles ou bisannuelles, 20-90 cm. Tiges couchée ou ascendante, anguleuse, sans poils ou plus rarement avec de petits poils peu abondants. Feuilles vraies rappelant celles du trèfle, avec pétiole long et mince de 1 à 5cm, simple, arrondie. Folioles dentées dans leur moitié supérieure, présentant parfois une tache brune ou noirâtre vers leur base. Stipules découpées en lanières aiguës. Fleurs jaunes solitaires ou plus souvent groupées par 2 à 8 sur des rameaux florifères, non prolongés en arête au sommet, et à peu près de même longueur que la feuille. Étendard plus long que la carène. Fruit gousse en forme de disque contourné en un tour et demi à 3 tours et demi d'hélice, tournant dans le sens des aiguilles d'une montre, ayant 4 à 6 mm de diamètre. Faces à peu près planes, ornées de nervures en réseau, à bord extérieur aminci portant de chaque côté un sillon interrompu par des épines crochues qui rendent les gousses collent aux fibres animales ou aux vêtements. Les gousses ne s'ouvrent jamais et lorsque certaines graines germent, d'autres restent dormantes dans la gousse' .

### C)- Arbre taxonomique de *Medicago polymorpha*

La taxonomie de l'espèce *Medicago polymorpha* est présentée dans **le tableau 4** ci-dessous.

**Tableau 4 :** Taxonomie de *Medicago polymorpha* (Guignard, 1998).

| **Taxonomie** | **Nomenclature** |
|---|---|
| Règne | *Plantae* |
| Embranchement | *Spermatophyta* |
| Sous-embranchement | *Angiospermae* |
| Classe | *Dicotyledonae* |
| Sous-classe | *Rosidae* |
| Ordre | *Fabales* |
| Famille | *Fabaceae* |
| Sous-famille | *Faboideae* |
| Tribu | *Trifolieae* |
| Genre | *Medicago* |
| Espèce | *Medicago polymorpha* |

### D)- La variabilité génétique de *Medicago polymorpha*

Le genre de *M. polymorpha* est diploïdes (2n = 16). Comme son nom botanique l'indique, *M. polymorpha* présente une grande variété de caractères phénotypiques, souvent liés à des facteurs écologiques. Des études de variabilité phénotypique et génétique ont été menées au Chili ( Pozo et al, 2002., Paredes et al, 2002 ), en Tunisie ( Hannachi et al, 1998 ), en Sardaigne ( Bullitta et al, 1994 ) et ailleurs, souvent dans la recherche de cultivars améliorés à usage agricole. Bien qu'il semble y avoir une variation appréciable des génotypes de l'espèce en Tunisie, ce n'est pas le cas au Chili, une raison pour laquelle, selon Paredes et al (2002) supposent que seul un petit nombre d'individus ont été introduits au Chili.

### E)- *M. polymorpha* et apport nutritionnel

*M. polymorpha* forme une relation symbiotique avec la bactérie *Ensifer meliloti* (= *Sinorhizobium meliloti* ), qui envahissent les racines des plantes et forment des nodosités racinaires. Dans ces derniers, les bactéries obtiennent la nutrition de la plante et fixent l'azote atmosphérique pour aider à maintenir la plante. La quantité d'azote fixée peut être

substantielle (environ 25 kg par tonne de matière sèche de légumineuse) selon Peoples et Baldock (2001) dans une étude sur les légumineuses de pâturage Australiennes en général.

De nombreux pays ayant des climats méditerranéens, comme le Chili, l'Australie et les pays méditerranéens, considèrent *M. polymorpha* comme une composante précieuse des prairies, fournissant à la fois du fourrage au bétail et améliorant l'apport d'azote pour la croissance des graminées ( Haan et al, 2002 ).

**II.2. Microsymbiote**

La microsymbiote est une bactérie capable d'établir une association symbiotique avec les plantes de la famille des légumineuses (Doyle et Luckow, 2003). Ces bactéries sont appelées **rhizobia** ( Du grec **rhiza**: racine et **bios**: vie) et il en a été dénombré 12 genres regroupant 44 espèces dont la capacité à noduler a été démontrée (Sawada et al, 2003). Il s'agit des genres: *Sinorhizobium, Ensifer, Rhizobium, Ralstonia, Burkholderia, Devosia, Azorhizobium, Methylobactérium, Bradyrhizobium, Blastobacter, Mesorhizobium et Allorhizobium.*

Contrairement à ce qui est observé dans la symbiose actinorhizienne, ces associations entre l'hôte et le microsymbiote sont spécifiques et dans certains cas exclusives **(Tableau 5)**, par exemple, la légumineuse *Sesbania rostrata* n'établit cette symbiose qu'avec *Azorhizobium caulinodans* et d'autres légumineuses peuvent entrer en symbiose avec plusieurs espèces de bactéries, comme *Phaseolus vulgaris* (haricot) avec les microsymbiotes *Rhizobium tropicii* et *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* .

La réciproque est aussi vraie avec par exemple le cas de *R. leguminosarum* biovar *vicieae* qui peut noduler la vesce et le pois (*Vicia sativa* et *Pisum sativum*) (Doyle, 1998). Seules exceptions à cette règle, les souches de *Rhizobium* NGR234 et *R. fredii* USDA257 possèdent un spectre d'hôte étendu (Pueppke et Broughton, 1999). NGR234 est en effet capable de noduler 112 genres de légumineuses ainsi que la seule non-légumineuse *Parasponia andersonii*. Quant à *R. fredii* USDA257, cette souche bactérienne peut noduler 79 genres de légumineuses (Pueppke et Broughton, 1999).

**Tableau 5:** Exemples d'associations entre rhizobia et légumineuses d'après ( Dénarié et al, 1996., Sawada et al, 2003).

| ***Rhizobia*** | **Plantes hôtes** |
|---|---|
| *Sinorhizobium meliloti* | Luzerne (*Medicago sp*) |
| *Rhizobium leguminosarum*<br>*biovar viciae*<br>*biovar trifolii*<br>*biovar phaseoli* | <br>Pois (*Pisum* ), Vesce (*Vicia*)<br>Trêfle (*Trifolium*)<br>Haricot (*Phaseolus*) |
| *Mesorhizobium loti* | Lotier (*Lotus*) |
| *Sinorhizobium fredii* | Soja (*Glycine*) |
| *Rhizobium sp. NGR234* | Large spectre et *Parasponia* (non légumineuse) |
| *Rhizobium tropicii* | Haricot (*Phaseolus*) |
| *Bradyrhizobium japonicum* | Soja (*Glycine*) |
| *Azorhizobium caulinodans* | *Sesbania* |

### II.2.1. Taxonomie des rhizobia

La taxonomie des rhizobia est continuellement en changement. Selon ( Bergey, 2007), les rhizobia appartiennent au domaine des Eubacteria, au phylum (embranchement) des Proteobacteria et à la classe des Alpha et bêta, ordre des rhizobial et famille des Rhizobiaceae.

D'après (Weir, 2016), les rhizobia sont répartis en 13 genres et plus de 98 espèces. Parmi les α-Proteobacteria, on distingue plusieurs genres entre autre : *Rhizobium* (Frank,1889), *Ensifer* plus communément appelé *Sinorhizobium* (Chen et al, 1988), Les espèces du genre *Sinorhizobium* ont été transférées dans le genre *Ensifer* par décision de la Commission judiciaire du Comité international sur la systématique des procaryotes (Tindall, 2008), *Mesorhizobium* (Jarvis et al, 1997), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus et al, 1988), *Methylobacterium* (Sy et al, 2001), *Phyllobacterium* (Valverde et al, 2005), *Ochrobacterium* (Trujillo et al, 2005), *Devosia* (Rivas et al, 2002), *Shinella* (Lin et al, 2008) et *Microvirga* (Ardley et al, 2012).

Les β-Proteobacteria beaucoup plus rares en symbiose, on retrouve le genre *Burkholderia* (Moulin et al, 2001) et *Cupriavidus* ( anciennement appelé *Ralstonia*) (Chen et al, 2001).

L'arbre phylogénétique basé sur la séquence de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S montre que les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires, Archaebactéries et Eubactéries (Young, 1992), et sont présents chez les grands groupes bactériens.

Chez les eubactéries la fixation d'azote est associée à une large diversité de métabolismes, bactéries anaérobies ou aérobies, bactéries photosynthétiques, Cyanobactéries et Actinomycètes (Blondeau, 1980).

### II.2.2. Le genre *Sinorhizobium meliloti*

*Sinorhizobium meliloti* est une bactérie Gram négative qui appartient à la sous-classe α des Protéobactéries. Cette bactérie, présente dans les sols, est capable de vivre soit libre soit en symbiose, en fixant l'azote atmosphérique, avec certaines plantes de la famille des Fabacées (*Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*) au travers de nodosités (Capela et al, 2001).

### II.2.3. Taxonomie du *Sinorhizobium meliloti*

La taxonomie de l'espèce *Sinorhizobium meliloti* est présentée dans **le tableau 6** ci-dessous.

**Tableau 6:** Taxonomie de *Sinorhizobium meliloti* (De Lajudie et al, 1994).

| **Taxonomie** | **Nomenclature** |
|---|---|
| Règne | *Bacteria* |
| Phylum | *Proteobacteria* |
| Classe | *Alpha Proteobacteria* |
| Ordre | *Rhizobiales* |
| Famille | *Rhizobiaceae* |
| Genre | *Sinorhizobium* |
| Espèce | *Sinorhizobium meliloti* |

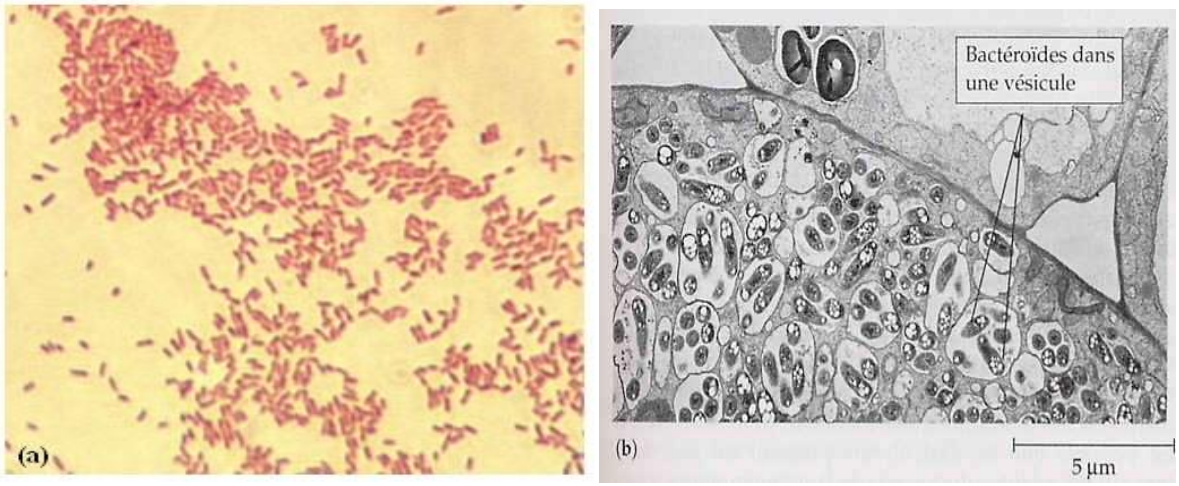
### II.2.4. Caractères morphologiques des *Sinorhizobium meliloti*

Elles sont soit sous forme végétatives ou sous forme bactéroïdes .

 **La forme végétative:** Les *Sinorhizobium* sont des bactéries à Gram négatif (Sato et al, 2005), strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulants (Jordan, 1984) **(Figure 9a ).** Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992).

 **La forme bactéroïde:** A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les *Sinorhizobium* se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue **(Figure 9b)**.

Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Sinorhizobium meliloti* ,*Rhizobium trifolii* et *Rhizobium leguminosarium*, la morphologie est irrégulière et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).




**(a)-** Forme végétative **(b)-** Forme bactéroïde

**Figure 9:** La morphologie des *Sinorhizobium* à l'état libre et à l'état symbiotique .

### II.2.5. Caractères biochimiques et physiologiques des *Sinorhizobium*

*Sinorhizobium* possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons dans les conditions d'aérobiose; alors que dans les conditions d'anaérobiose, les espèces *Sinorhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs finals

d'électrons (Werner,1992 et Benguedouar, 2000). La voie de Enter-Doudoroff est le mécanisme principal du métabolisme des carbohydrates (Werner, 1992).

Une croissance optimale de la plupart des souches *Sinorhizobium* 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. Des souches de *Sinorhizobium* peuvent se développer à un pH compris entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984).

### II.2.6. Caractères Culturaux des *Sinorhizobium*

Sur la base du temps de génération des *Sinorhizobium* on distingue deux groupes: Ceux à croissance rapide après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C et dont le temps de génération est entre 2 et 4 heures avec un diamètre des colonies allant de 2 à 4 mm et ceux à croissance lente, représentés par le genre *Bradyrhizobium*, après 3 à 10 jours d'incubation et dont la vitesse de dédoublement est située entre 6 et 8 heures avec un diamètre des colonies de 1 à 2 mm (Jordan, 1984).

Les *Sinorhizobium* se cultivent dans le milieu (YMA) que sa composition est mentionnée dans **l'Annexe 1**. Elles apparaissent sous forme circulaire, blanches, laiteuses-opaque à translucides, gommeuses, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes pâles sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

Il est admis que seules les souches non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson et al, 2009).

Un dernier caractère qui distingue les *Sinorhizobium* des autres familles bactériennes est leur capacité à induire la nodulation chez leur plante hôte. La symbiose « légumineuses-rhizobia» aboutit à la formation de nodules sur les racines des plantes hôtes (Prescott et al, 2007). La nodulation est un procédé hautement étudié à travers le monde.

## II.3. La nodulation

La mise en évidence des nodules sur les racines des légumineuses remonte au XVIIème siècle et ce n'est qu'en 1888 que Beijerinck a pu prouver que ce sont des bactéries qui sont à l'origine de la formation des nodules racinaires les " rhizobia", ce terme générique dérive du premier genre bactérien " *Rhizobium*" décrit au XIXème siècle comme étant des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel de noduler les légumineuses (Frank, 1889).

La formation des nodules est contrôlée par différents groupes de gènes appartenant aux deux partenaires symbiotiques, les gènes nod chez les bactéries et les gènes Nod chez les légumineuses.

### II.3.1. Les différents types de nodules

Chez les légumineuses se forment deux types majeures de nodules: les nodules déterminés et les nodules indéterminés.

**a. Nodules déterminés:** se développent sur des légumineuses tropicales telles que soja et haricot. Ils ont une forme sphérique et contiennent un méristème qui cesse de se diviser á la troisième semaine. Les cellules méristèmatiques, au lieu de se diviser, s'allongent et les nodules prennent la forme sphérique (Hirsch et al, 2001) **(Figure 10B).**

**b. Nodules indéterminés:** contrairement au précédant, ils contiennent un méristème qui persiste et se divise pendant plusieurs semaines, de nouvelles cellules sont continuellement produites á son extrémités distales. Ce type de nodule est rencontré chez les pois, le trèfle et la luzerne (Hirsch et al, 2001) **(Figure 10A).**

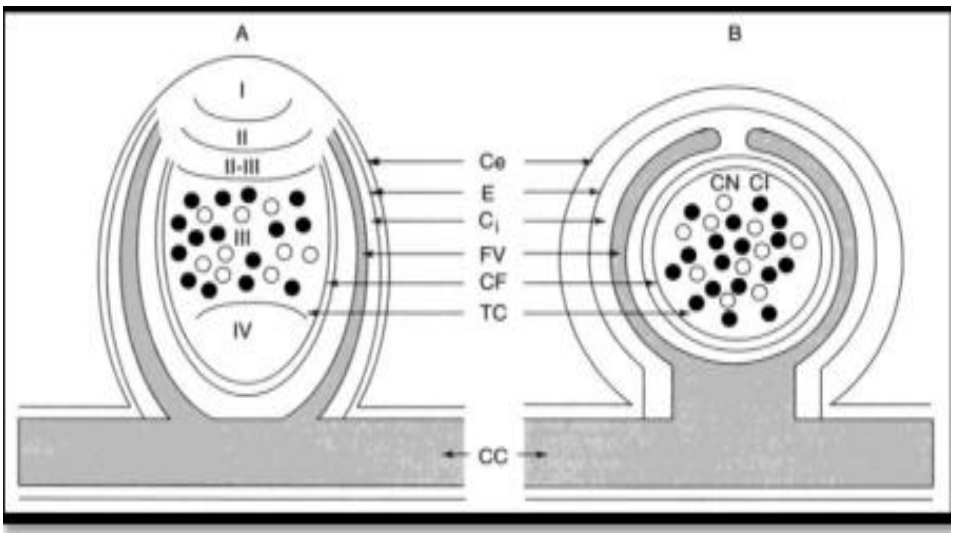



**Figure 10:** Coupe longitudinale schématique d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B). I = zone méristématique, Il = zone d'infection, II-III = inter-zone, III = zone fixatrice d'azote. IV = zone de sénescence. Ce = cortex externe, E = endoderme, Ci = cortex interne, FV = faisceau vasculaire, CF = cortex faisceau TC =Tissu conducteur, CC= Cortex conducteur.

(Jean-François, 1997)

### II.3.2. Les différences principales entre les nodules déterminés et indéterminés

Le tableau ci-dessous montre les différences principales entre les nodules de type déterminés et indéterminés.

**Tableau 7:** Différences principales entre les nodules déterminés et indéterminés (Hirsch, 1992).

| Type de nodosité | Indéterminée | Déterminée |
|---|---|---|
| **Exemples** | *Acacia, Medicago, Trifolium, Pisum* | *Glycine, Phaseolus, Vigna, Lotus* |
| **Cordon d'infection** | Large | Etroit |
| **Site d'initiation du primordium nodulaire** | Cortex interne | Cortex externe |
| **Méristème nodulaire** | Apical et persistant | Activité limitée |
| **Croissance nodulaire** | Expansion cellulaire | Division cellulaire |
| **Morphologie** | Allongée, ramifiée | Circulaire |
| **Cellules infectées matures** | Petites vacuoles | Non vacuolisées |
| **Forme d'exportation de l'azote fixé** | Acides aminés (asparagine, glutamine) | Uréides (allantoïnes...) |

### II.3.3. Le processus de nodulation

Ce processus est contrôlé par un ensemble de gènes spécifiques au rhizobia pour infecter une plante donnée. Les différentes étapes de nodulation **(Figure 11)** sont:

#### 1ère étape: Pré-infection

La fixation du rhizobia aux poils absorbants fait intervenir des protéines bactériennes spécifiques, les rhicadhésines, et des lectines de la plante hôte (Hirsch et al, 2001., Prescott, 2007., Madigan et Marilinko, 2007). Dés la reconnaissance du rhizobia spécifique acquise, des modifications structurales apparaissent dans les toutes premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologiques du poil absorbant : dépolarisations membranaires, modification de concentration du $Ca^{2+}$ intracellulaire, augmentation de pH et fragmentation de l'actine. Des modifications concernent également les 20 microtubules du cytosquelette des cellules de péricycle situé en face des pôles de protoxylème de la racine (Lea et Morot-Gaudry, 2001., D'haeze et Holsters, 2002).

#### 2ème étape: L'infection et la genèse du nodule

Les poils absorbants infectés se courbent et forment une «crosse de berger» (Morot-Gaudry,1997). Les bactéries emprisonnées à l'intérieur de cette crosse vont alors pénétrer à

l'intérieur du poil absorbant (Nultsch et Miesch, 1998). La plante réagit en formant autour des bactéries un cordon amorphe, contenant des mucilages, limité par des fibrilles cellulosiques d'origine végétale, c'est le filament d'infection (Dupuy et Nougier, 2005). Ces filaments d'infection progressives à l'intérieur des poils absorbants, puis à travers le cortex de la racine (Pelmont, 1995).

Simultanément et sous l'action des facteurs Nod, des cellules de cortex interne, situées à proximité des filaments d'infection, se différencient et se divisent activement, conduisant à l'édification progressive d'un méristème nodulaire qui sera à l'origine du futur nodule (Hopkins et Evrard, 2003).

**3ème étape: Phase de maturité nodulaire**

Les rhizobia se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte (Hopkins et Evrard, 2003). Ils s'arrêtent leurs divisions et commencent à produire des enzymes et d'autres molécules nécessaires à la fixation d'azote, ils se développent en bactéroïdes (Lea et Morot-Gaudry, 2001., Chrispeels et Sadava, 2003).

La prolifération des bactéroïdes enfermée dans leur membrane (symbiosomes) qui s'accompagne d'une division mitotique des cellules corticales de la racine conduit à la formation de nodosités racinaires fonctionnelles (Madigan et Marilinko, 2007).

**4ème étape: Phase de dégénérescence**

Lorsque la plante vient à mourir, le nodule se détériore, libérant les micro-organismes dans le sol. Même si les bactéroïdes sont incapable de se multiplier, il y a toujours quelques cellules de rhizobia en dormance au sein du nodule. Ces bactéries peuvent, à leur tour, aller coloniser d'autres racines ou bien se maintenir dans le sol à l'état libre (Madigan et Marilinko, 2007).

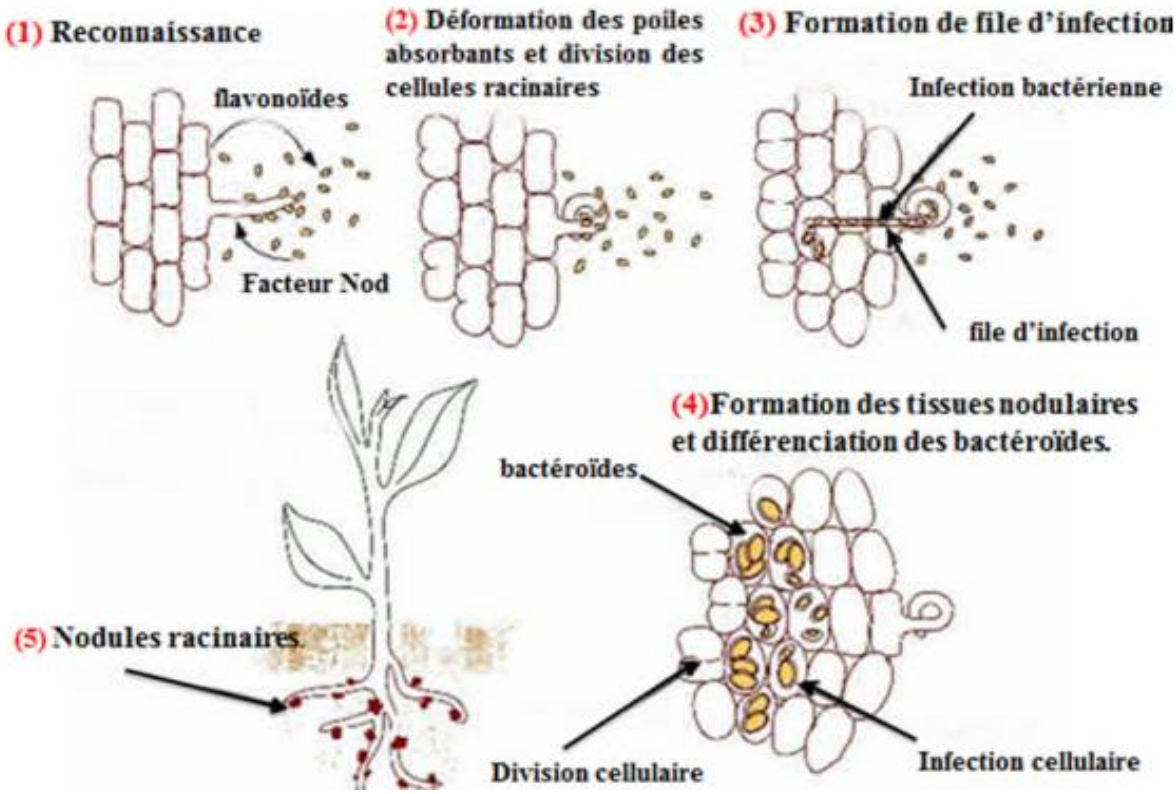



**Figure 11:** Différentes étapes permettant la formation des nodules racinaires.

(Heulin et al, 2014)

### II.3.4. Les paramètres affectant la réussite de la nodulation

Généralement, les souches tropicales de rhizobia possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans les milieux arides et semi-arides. Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont: le stress hydrique, le stress thermique, le stress salin et osmotique, le pH extrême, la carence en éléments nutritionnels ainsi que les maladies et les ravageurs.

Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose.

La quantité d'azote fixée par une légumineuse peut largement varier sous l'influence de plusieurs facteurs tels que:

- **Stress hydrique**

Un excès d'humidité ou une sécheresse prolongée affecte négativement les deux partenaires et toutes les étapes de l'établissement et de fonctionnement de la symbiose légumineuse-rhizobia (Serraj et al , 1999 ., Reddy et al , 2003).

Les luzernes s'accommodent des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides (Lapeyronie, 1982). L'augmentation du niveau d'eau dans le sol réduit le nombre et la taille des nodules et inhibe l'infection de la plante par les rhizobia (Hamdi, 1999).

**Stress thermique**

La température affecte directement la symbiose légumineuse-rhizobia en limitant la croissance du microsymbiote et/ou indirectement en régulant la croissance de la macro-symbiote, même avant l'établissement du nodule. La température a un effet inhibiteur sur l'adhérence des bactéries aux poils absorbants, la formation des poils racinaires et du fil d'infection (Reddell, 1993).

L'augmentation de la température provoque le disfonctionnement des protéines LPS et l'inhibition de la mobilité des bactéries et leur attachement aux poils absorbants (Hamdi, 1999).

Les basses températures augmentent le délai entre l'infection et l'apparition des nodosités (Schneider et Huyghe, 2015).

**Stress salinet osmotique**

La salinité des sols et des eaux d'irrigation demeure dans les écosystèmes arides et semi arides, un obstacle majeur au développement et à la croissance des végétaux.

La salinité des sols conduit à des perturbations enzymatiques, des modifications morphologiques, biochimiques, physiologiques et minérales au niveau de la plante en inhibant la phase initiale de la nodulation (Hamdi, 1999).

Cette contrainte sur la symbiose légumineuses-rhizobia se manifeste par un effet osmotique et/ou ionique inhibant les différents processus physiologiques et biochimiques gouvernant la croissance de la plante hôte, la survie et la prolifération des rhizobia et par la suite l'inhibition des processus d'infection et de la fixation biologique de l'azote. (Farissi et al, 2014).

**Le PH du sol**

L'acidité du sol réduit la fixation d'azote atmosphérique en limitant la survie ainsi que la persistance des rhizobia et engendre une diminution de la nodulation. L'alcalinité du sol provoque l'affaiblissement de la nodulation (Hamdi, 1999).

**Carence en éléments nutritionnels**

Le manque de nutriments tels que le calcium, le zinc, le manganèse et le potassium inhibe l'attachement des rhizobia sur les poils absorbant et la formation des nodosités (Schneider et Huyghe, 2015).

**Maladies et ravageurs**

Les agents pathogènes et les ravageurs s'attachent aux nodosités et provoquent des pourritures du système racinaire ce qui limite leur croissance et indirectement la fixation symbiotique (Schneider et Huyghe, 2015).

## III. 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 ).

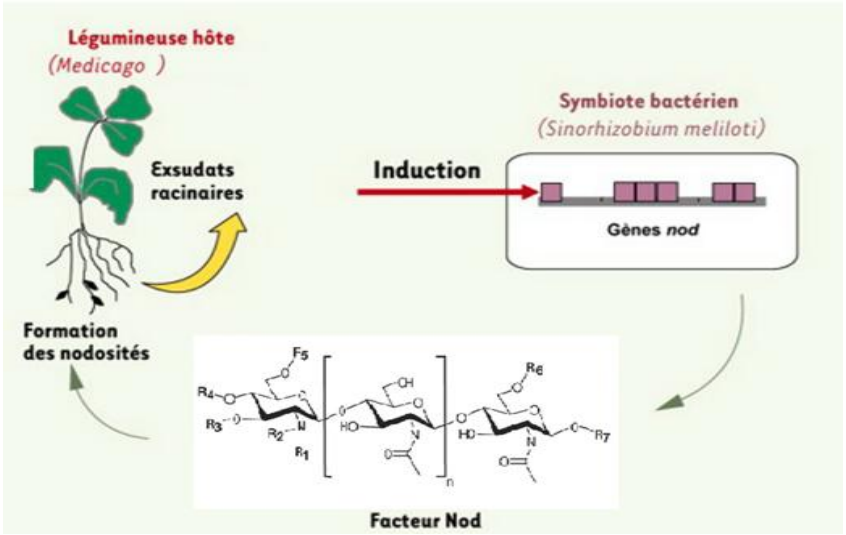



**Figure 12:** Dialogue moléculaire entre la plante ( *Medicago*) et la bactérie (Rhizobia).

### III.1. Les flavonoïdes

Les **flavonoïdes** sont des métabolites de phénylpropanoïdes exsudés à partir des racines de plantes, souvent en réponse à des éliciteurs générés par des microorganismes présents dans la rhizosphère, Ces molécules sont des composés antimicrobiens qui inhibent la croissance des agents pathogènes bactériens et fongiques.

Cependant, chez les rhizobia, les flavonoïdes **(Figure 13)** agissent comme des promoteurs de croissance bactérienne, des chimio-attracteurs, des inducteurs de gènes de nodulation, des déterminants de la spécificité de l'hôte et des régulateurs de la résistance aux phytoaléxines.

Les rhizobia établit des associations symbiotiques avec les légumineuses et évolue des événements de réglage fin qui aboutissent à la formation de nodules et à la fixation de l'azote atmosphérique ($N_2$) en ammonium (Del Cerro et al, 2017).

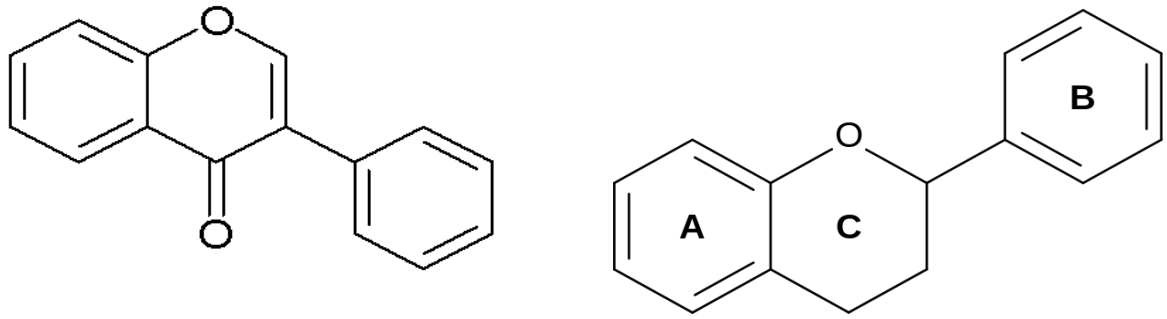



**Figure 13:** Structure moléculaire sensu stricto de flavonoïde à droite et de isoflavonoïde à gauche.

( Bruneton, 2009)

### III.2. Les facteurs Nod

Les facteurs Nod **(Figure 14)** sont constitués d'un squelette de 3 à 6 résidus N-acétyl-D glucosamine, substitué par une chaîne d'acyl au niveau de l'extrémité non réductrice et portant diverses décorations aux deux extrémités de la chaîne oligo-saccharidique.

La nature de l'acide gras et des autres substitutions varie selon la souche ou l'espèce rhizobia et joue un rôle déterminant dans la spécificité d'hôte de la bactérie.

La protéine NodD active la transcription des gènes impliqués dans le processus de nodulation, y compris ceux requis pour produire les facteurs Nod, les molécules signales produites par les rhizobia et détectées par la plante, qui induisent l'organogenèse des nodules (Andrews et al, 2013).

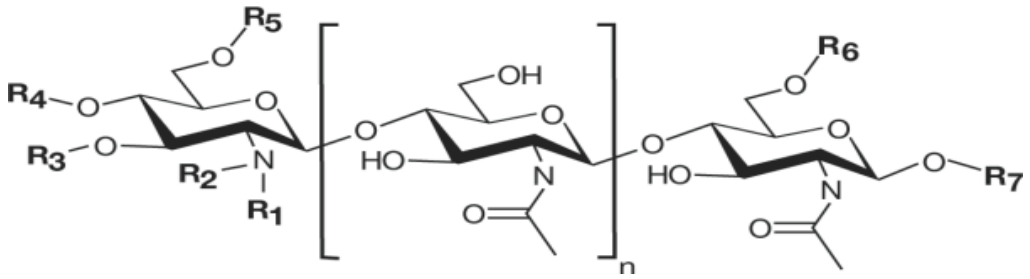



**Figure 14:** Structure moléculaire de facteur Nod .

( Varki R et al, 2009)

### III.3. La leghémoglobine

La leghémoglobine végétale présente dans les nodosités des légumineuses est très proche des hémoglobines animales **(Figure 15)** (Dajoz, 2012); rouge comme le sang, apporte de l'oxygène à la bactérie (Fleurentin, 2004). Dans les nodules fixateurs d'azote, la leghémoglobine peut représenter jusqu'à 20 à 25% des protéines cytoplasmiques.

La fixation biologique de l'azote est principalement un processus anaérobique, le nodule doit posséder un mécanisme qui exclut l'oxygène du bactéroïde. Cette tâche est accomplie grâce à la présence de leghémoglobine autour des bactéroïdes qui sont enfermés par une enveloppe membranaire. Ce pigment (leghémoglobine) limite l'approvisionnement en oxygène près des bactéroïdes permettant ainsi de protéger la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène, mais fournissant suffisamment de cet élément ($O_2$) afin de permettre la génération d'ATP (Denison et Okano, 2003., Subba Rao, 1993).

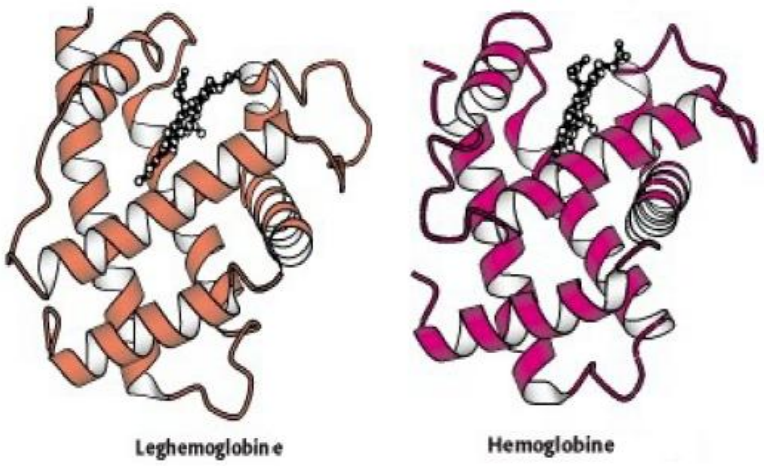



**Figure 15:** Représentation générique des deux molécules de leghémoglobine et d'hémoglobine.

( Varki R et al, 2009)

### III.4. La nitrogénase

La conversion de l'azote gazeux en ammonium est réalisée grâce à un complexe enzymatique nommé nitrogénase (Duhoux et Nicole, 2004). La nitrogénase est une enzyme très conservée tant au niveau biochimique que génétique (Morot-Gaudry, 1997). Cette enzyme comprend deux métalloprotéines **(Figure 16)** de poids moléculaire très différents:

- **La protéine II** ou dinitrogénase réductase, est un homodimère de 64 KDa. Chaque sous-unité possède un site de fixation pour une molécule de $Mg^{2+}$-ATP.
- **La protéine I** ou dinitrogénase, est un tétramère d'environ 220 KDa formé de deux sous-unités α et deux sous-unités β de poids moléculaires voisins, et possède un cofacteur à molybdène et fer appelé FeMo-co au niveau duquel l'azote moléculaire est réduit en Ammoniaque (Duhoux et Nicole, 2004).

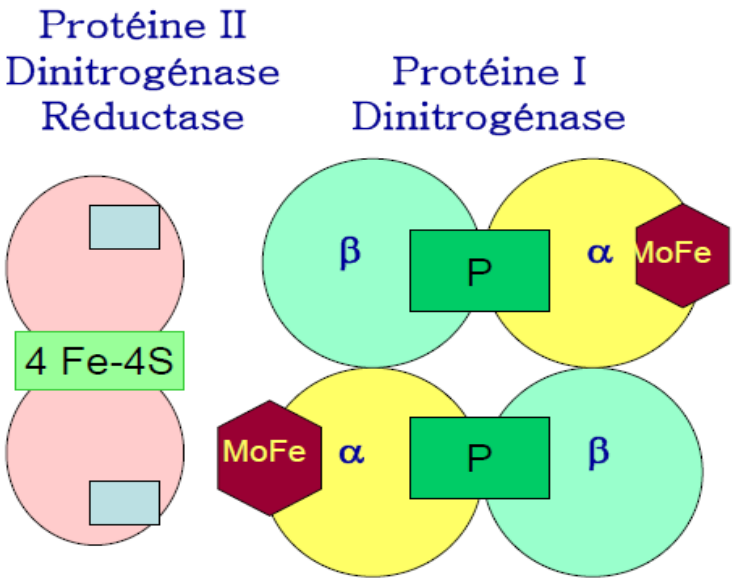



**Figure 16:** Les deux métalloprotéines de la nitrogénase.

### VI. La résistance des rhizobia aux antibiotiques

Une résistance intrinsèque aux antibiotiques peut donc être importante, du point de vue écologique, pour les micro-organismes du sol, en raison d'une compétitivité plus élevée et d'une plus grande aptitude à survivre, principalement dans les sites arides où la sécheresse et le pH alcalin favorisent la croissance d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques.

Plusieurs études ont indiqué que les isolats provenant des sites Tunisiens sont, globalement, tolérants à tous les antibiotiques, bien qu'à différents degrés. Par contre, les isolats provenant des sites Sénégalais ne présentent que de faibles niveaux de résistance (GREGO et al, 1995).

# CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

Pour des raisons pratiques nous avons réalisé nos expérimentations au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université de Médéa afin d'étudier les endosymbiotes de la plante *Medicago*, pour cela on a effectué une caractérisation phénotypique des souches isolées.

## I. Matériels biologiques

Les nodules et les gousses ont été collectés à la même période durant le mois de Février et le début du mois de Mars ( 2018) à partir de différents sites de la région de Médéa (Ain Dheb, Université Yahia Farés (le pôle universitaire), Kouala, Benchicao et Draa Samar).

- **Les souches bactériennes**

Les souches bactériennes sont isolées de nodules frais prélevés sur les racines de deux espèces de *Medicago* (*Medicago arabica* et *Medicago polymorpha*) récoltées dans les différents sites suscités.



**-A-** **-B-**

**Figure 17:** Les deux espèces de *Medicago* étudiées, A) *Medicago arabica* et *B) Medicago polymorpha.*

- **Les graines**

Les graines de *Medicago* sont extraites à partir des gousses accolées aux racines des plantes collectées. Ces graines seront utilisées pour l'obtention des plantules par culture in vitro en conditions stériles dans des tubes à essais.

## II. Méthodes

### II.1. Analyse des sols

Deux tests ont été effectués sur les sols collectés, le pH et la conductivité électrique, à fin de voir la relation qui existe entre les souches isolées et leurs environnements.

#### II.1.1. Le pH des sols

Le pH du sol est mesuré par un pH-mètre à partir d'une solution aqueuse préparée avec un rapport pondéral terre/eau de 1/2,5.
On détermine le pH (eau) et le pH (KCl) (Soltner, 2003).

- **Le pH (eau):** l'échantillon du sol a été mis en suspension dans un bécher (20g pour 50ml d'eau distillé). Ce mélange est agité pendant une heure puis laissé en repos quelques minutes avant la première lecture qui correspond à l'acidité actuelle (pH eau ).

- **Le pH (KCl):** une deuxième lecture a été effectuée après l'ajout de 3.72g de KCl. L'acidité potentielle (pH KCl ), correspond au déplacement des ions acides fixés sur le complexe colloïdal du sol selon la réaction suivante:

$$\text{Colloïde-}H^{+} + KCl \longrightarrow \text{Colloïde-K} + HCl$$ (Denis, 2000).

#### II.1.2. La conductivité des sols

La conductivité du sol reflète le niveau de la salinité; elle est mesurée par le conductimètre. La salinité globale est déterminée par la mesure de la conductivité électrique (C.E) de la solution terre / eau d'une proportion pondérale de 1/2,5.

La conductivité est exprimée en µS/ cm, les valeurs de salinités obtenues sont données par le conductimètre en mg/l.

### II.2. Isolement et collection des souches de *Sinorhizobium*

Les souches de *Sinorhizobium* sont isolées à partir des deux espèces de *Medicago* (*M. arabica* et *M. polymorpha*) le choix de ces deux espèces est due à leur bonne prolifération dans la région de Médéa.

### II.2.1. Collecte des nodules racinaires

La sélection des échantillonnages des nodules doit être réaliser durant une période bien précise où la plante est en pleine activité; la récolte est effectuée durant le mois de Février et le début du mois de Mars, à cette période les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines.

La récolte est réalisée selon la technique préconisée par Vincent (1970), il s'agit de :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm de profondeur dans le sol pour extraire la plante avec son appareil racinaire sans l'abimer.
- Se débarrasser de la terre manuellement au niveau des racines sans endommager les nodules.
- Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique étiqueté.
- Au laboratoire; enlever la partie aérienne et laver la partie racinaire soigneusement à l'eau courante.
- Couper les nodules à 2mm du site d'attachement et sécher les avec papier absorbant.



**Figure18:** Récolte frais des nodules racinaires.

### II.2.2. La conservation des nodules

Les nodules séchés au papier absorbant sont conservés immédiatement au réfrigérateur à +4C° pour un usage ultérieur.

Pour une longue conservation **(Figure 19)**; il est recommandé d'utiliser un dessiccateur, le chlorure de calcium ($CaCl_2$) (Vincent, J.M 1970).

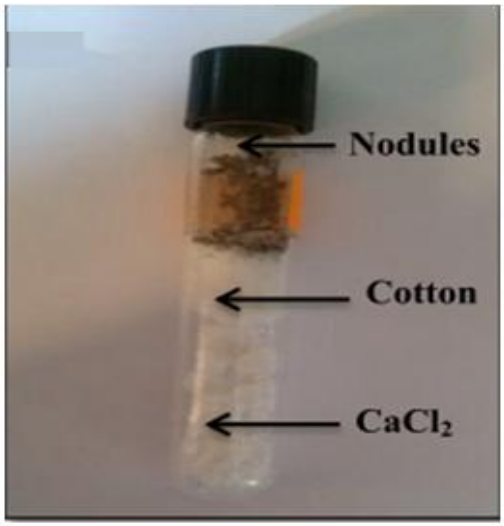



**Figure 19:** Conservation des nodules.

### II.2.3. La morphologie des nodules

La morphologie des nodules est déterminée à l'aide d'une loupe binoculaire qui permet leur observation en détail avec un agrandissement X40 et de vérifier l'intégrité des enveloppes de nodosités.

### II.2.4. Extraction des bactéroïdes

Les bactéroïdes sont extraits à partir de 7 à 10 nodules dans des conditions stériles à l'aide d'une lame stérile **(Figure 20)**. Si les nodules sont conservés dans un agent dessiccatif, il est recommandé de les mettre auparavant dans l'eau au réfrigérateur toute la nuit.

Les nodules subissent les traitements suivants (Vincent, 1970):

- Immersion dans de l'éthanol 90° pendant 30 secondes.
- Traitement des nodules dans une solution de $HgCl_2$ à 0.1% pendant trois minutes.
- Lavage des nodules par dix bains d'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces de $HgCl_2$ hautement toxique.
- Ecrasement des nodules dans un mortier stérile en ajoutant 0.5 ml d'eau physiologique stérile à 0.85% de NaCl. L'extrait est utilisé tel quel ou dilué à 1/10 s'il présente un aspect laiteux .

Il est à noter que toutes les manipulations microbiologiques sont effectuées dans des conditions d'asepsies.



**Figure 20:** Extraction des bactéroïdes.

### II.2.5. Technique d'isolement

L'extrait nodulaire obtenu est ensemencé à l'aide d'une anse en verre sous forme d'un râteau dans des boites de pétri contenant le milieu YMA (Yest Mannitol Agar) additionné de Rouge Congo **(Figure 21).** Les boites sont incubées à 28°C pendant la période de 24 heures à 48 heures; la pureté des souches est vérifiée par repiquage successif sur milieu YMA au Rouge Congo.



**Figure 21 :** Ensemencement des extraits nodulaires par étalement.

### II.2.6. Conservation des isolats

Les souches ainsi purifiées sont ensemencées sur milieu YMA en tubes inclinés étiquetés par région et espèce hôte, *Medicago,* les tubes sont incubés à 28C° pendant 24 heures; puis conservés à +4C° pour une utilisation ultérieure.

### II.2.7. Test d'authentification (test de nodulation)

Ce test est une première approche pour authentifier les souches; il permet d'évaluer leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte.

### II.2.7.a. Germination aseptique

Les graines de *Medicago polymorpha* et *Medicago arabica* récupérées à partir des gousses; sont traitées avec l'acide sulfurique concentré ( $H_2SO_4$ ) pendant 30 min et rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile, puis déposées stérilement dans des boites de pétri stériles, tapissées du coton humidifié avec de l'eau distillée stérile. Les boites sont enveloppées avec du papier aluminium et incubées à 25C° à l'obscurité, jusqu'à germination des graines **(Figure 22)** (Tillad et Drevon , 1988).

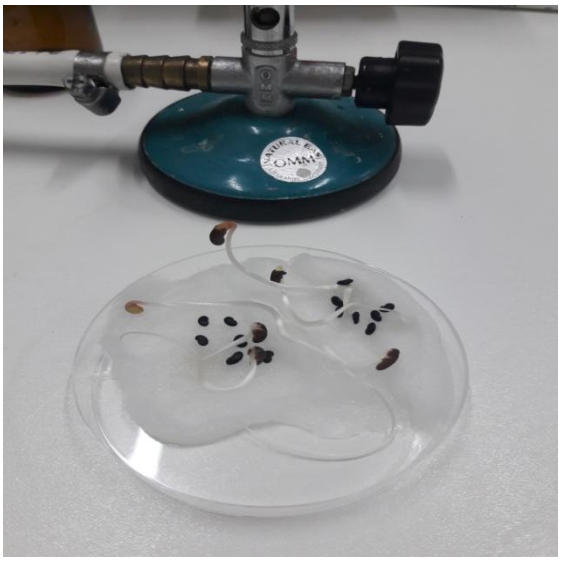


**Figure 22:** Germination des graines.

### II.2.7.b. Culture et inoculation des plantules

Les graines bien germées et dont la longueur de la radicelle est environ 2.5 cm de long ont été transférées dans des tubes à essais contenant le milieu Fahraeus **(Annexe 1)**, chaque plantule a été inoculée par 0.3 ml d'une suspension bactérienne de $10^6$ cellule/ml **(Annexe 2).**

Trois essais ont été effectués pour chaque souche de *Sinorhizobium* avec la plante hôte et des plantes non inoculées ont été utilisées comme témoin **(Figure 23)**.



**Figure 23:** Inoculation des plantules.

### II.3. Identification des souches de *Sinorhizobium*

#### II.3.1. Identification morphologique des bactéries

La morphologie de la bactérie est déterminée à l'état frais et à l'état de frotti.

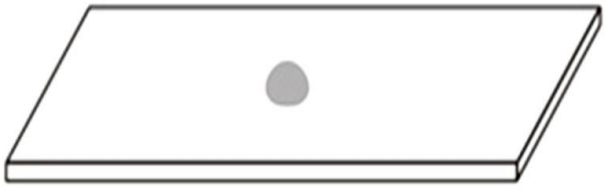
**A/ Etat frais**

Le test à l'état frais permet d'observer les bactéries vivantes. Ce qui permet de mettre en évidence la mobilité, le mode de groupement et une approche sur la morphologie d'une culture jeune en milieu liquide (48 heures).

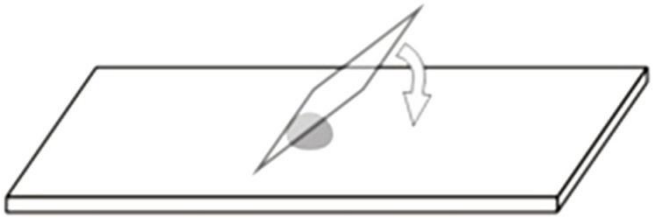
Le protocole à suivre est comme suite:

- Homogénéisation de la culture liquide à prélever.

- Prélèvement d'une goutte de culture liquide (à l'aide d'une pipette Pasteur ou à l'anse de platine) et dépôt sur une lame propre.



Pose de la lamelle, en partant d'une position inclinée à 45°.



Les observations sont obtenues au microscope optique de grossissement X40.

**B/ Coloration de Gram**

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste Danois *Hans Christian* ***Gram*** 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier. A cet effet, il faut suivre le protocole suivant:

- Frottis et fixation ;
- Coloration au violet de gentiane des bactéries (1 min) ;
- Rinçage à l'eau distillée ;
- Ajout du réactif de lugol (30 sec) accentuant la coloration ;
- Rinçage à l'eau distillée ;
- Epreuve alcoolo résistance : Plonger 3 ou 4 fois pendant une demi-seconde dans un pot d'alcool puis rincer à l'eau distillée immédiatement. Pendant cette étape, les lipides de la paroi des $Gram^-$ sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer dans le corps bactérien et expulser le violet de gentiane. Les bactéries $Gram^-$ sont alcoolo-sensibles et elles sont donc décolorées. La paroi des $Gram^+$ ne laisse pas passer l'alcool, elles sont dites alcoolo-résistantes et restent colorées en violet ;
- Contre coloration : safranine pendant 1 min. Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuschine. Les « Gram positives » apparaissent donc violettes, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses ;
- Rinçage à l'eau distillée et séchage entre deux feuilles de papier absorbant ;
- Observation à l'objectif 10 ; 40 et 100 à immersion, à pleine lumière.

### II.3.2. Identification morphologique des colonies

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu YMA, après 2 jours d'incubation à 28°C. Ce test vise à étudier les caractères suivants : l'aspect, la forme, la couleur, l'élévation, la taille et la mucoïdité.

### II.3.3. Test de mobilité

La recherche de la mobilité est réalisé sur des tubes contenant le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate **(Annexe 1)** par piqure centrale jusqu'au fond de tube de gélose; les tubes ensemencés sont incubés à 28C° pendant 24 heures.

Le milieu **Mannitol-Mobilité-Nitrate** est un milieu de culture caractérisé par l'utilisation de mannitol et de Nitrate et permet la mise en évidence (ou non) de la mobilité bactérienne, il permet aussi de voir le métabolisme énergétique des bactéries **(Figure 24).**

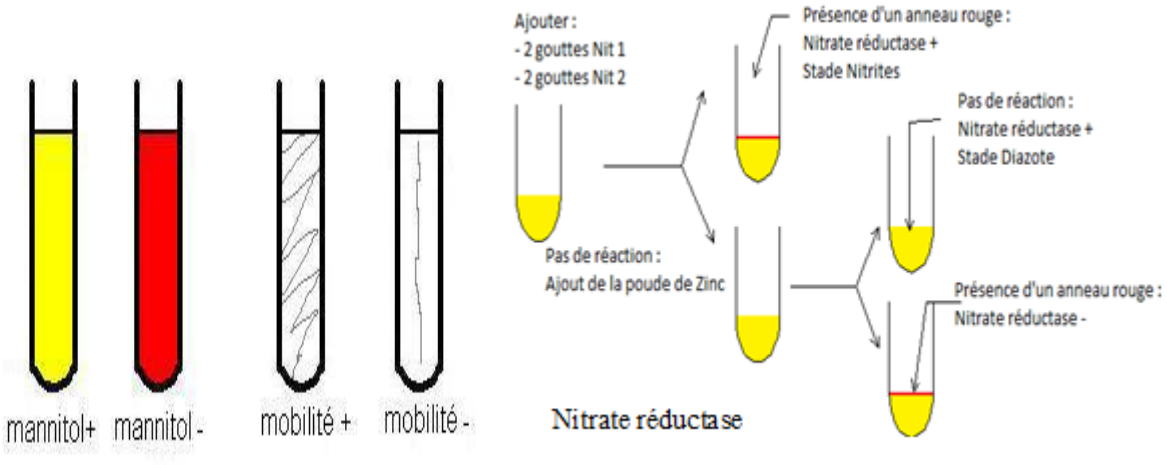



**Figure 24 :** Lecture des résultats du milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate.

### II.3.3. Recherche de la catalase

Les colonies des souches isolées sur milieu YMA sont prélevées à l'aide d'une anse de platine et mises sur des lames additionnées d'une goutte d'eau oxygéné à 10 volume; la présence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat des petites bulles gazeuses.

### II.3.4. Recherche de l'oxydase

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore d'oxalate de N-diméthyl paraphénylènediamine par une enzyme qui est la phénylène diamine oxydase.

A l'aide d'une pince flambée on dépose un disque d'oxydase, préalablement imbibé d'eau physiologique stérile sur une lame, ensuite on utilisant une pipette Pasteur stérile ,on prélève une colonie à partir du milieu YMA et on la dépose sur le disque d'oxydase. Une réaction oxydase positive se traduit par l'apparition d'une tache violette, si le disque reste incolore c'est une réaction oxydase négative (Joseph-pierre Guiraud, 2012).

### II.3.5. Le type respiratoire

Il a été déterminé sur milieu YMA additionné de rouge de Congo **(Annexe1),** l'ensemencement se fait dans des tubes selon la technique dite de gélose en surfusion par piqûre centrale et profonde, selon le protocole suivent:

Ensemencer à la pipette pasteur scellée par flambage l'effilure chargé d' inoculum jusqu' au fond de tube puis remonter en décrivant des tours de spire très serrés; enfin sortir verticalement à 0,5cm de la surface (Joseph-pierre Guiraud, 2012).

Après 24 h d'incubation à 28°C; on peut déterminer le type respiratoire selon le type de croissance:

- Aérobie stricte : en surface.
- Micro aérophile : au dessous de 0.5cm de la surface de la gélose.
- Aéro-anaérobie facultatif : sur tout le long de tube.
- Anaérobie stricte: au fond de tube.

### II.3.5. Vitesse de croissance sur milieu YMA+ Bleu de bromothymol

Nos isolats sont ensemencés sur milieu YMA + Bleu de bromothymol (BBT) **(Annexe 1)** (Vincent, 1970 et Jordan, 1984) pour mettre en évidence leur vitesse de croissance.

Ce colorant étant un indicateur de pH mettant en évidence l'acidification du milieu par un virage au jaune, ce virage permet de distinguer les souches à croissance rapide (notamment les genres (*Rhizobium*, *Sinorhizobium et Mesorhizobium*,) qui poussent au bout de 24 heure d'incubation (bactérie acidifiantes) des autres souches à croissance lente (notamment *Bradyrhizobium*) (bacteries alcalinisantes) dont l'alcalinisation du milieu se traduite par le virage du milieu au bleu ( Jordan,1984 ., Beck et al,1993 ., Pagano,2008).

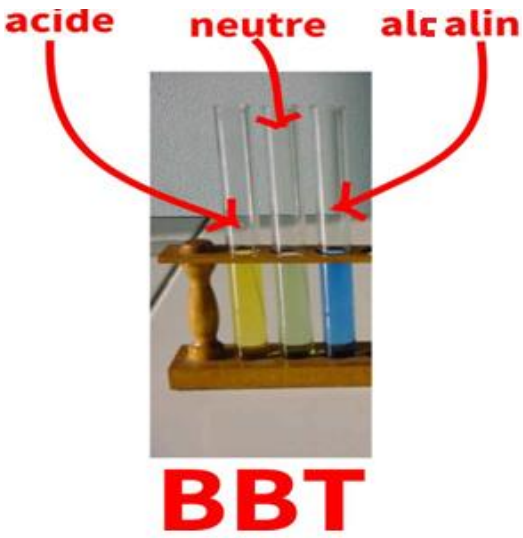



**Figure 25 :** Virage de couleur du milieu BBT selon la valeur du pH.

### II.4. Caractères biochimiques des souches de *Sinorhizobium*

La caractérisation biochimique est réalisée on utilisant la galerie API 20 NE **(Figure 26)** (bioMerieux®SA-FR,2006).

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données. La galerie API 20 NE comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés.



**Figure 26:** La galerie API20 NE stérile.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline (0.85%) 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 poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide de tableau de lecture **(Annexe 4)** .

**A/ Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boite d'incubation, mettre environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (EX: $Cl_2$,$CO_2$)) dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boite d'incubation.

**B/ Préparation de l'inoculum**

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0.85 % Medium (2ml) comme indiqué dans 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 Pasteur, prélever 1 à 4 colonies de culture jeunes ( 18-24 heures) et de morphologie identique.

- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0.5 Mc Farland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**C/ Inoculation de la galerie**

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests $NO_3$ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.
- Transférer environ 200 µl de la suspension précédente dans une ampoule d'API aux Medium.
- Remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés GLU, ADH, URE pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boite d'incubation et incuber à 28C°±1C° pendant 24 heures .

**D/ Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture **(Annexe 4).**
- 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.

➢ **Test $NO_3$**

- Ajouter une goutte de réactifs $NIT_1$ et $NIT_2$ dans la cupule $NO_3$.
- Après 5 min, une couleur rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultat.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote ; ajouter 2-3 mg de réactif de Zn dans la cupule $NO_3$.
- Après 5min, 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 présent dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.
- La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réaction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des réactions précédentes produisent de ($NO_2$ ou de $N_2$) est positive.

- **Test TRP**

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

- **Tests d'assimilation**

  Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive; des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et noter ± .

Une réincubation est nécessaire dans le cas d'une faible discrimination ou d'un profil inacceptable ou douteux.

**NB:** Toutes les manipulations sont effectuées dans des conditions stériles.

### II.5. Caractères physiologiques

Les caractères physiologiques étudiés dans ce travail sont : l'effet du pH, de la température et de NaCl sur la croissance des isolats ,ainsi que la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

#### II.5.1. Effet du pH

L'effet du pH du milieu sur la croissance des isolats a été étudié dans des tubes à essai contenant 9 ml de milieu YMB ajustés à des valeurs de pH allant de 4 à 10 par l'ajout de quelques gouttes de NaOH (10%) ou de HCl (1N), ces tubes sont ensemencés par 1ml de chaque suspension bactérienne, de concentration $10^6$ cellule/ml, obtenue par inoculation des colonies des cultures jeunes âgées de 24 heures dans de l'eau physiologique. Les tubes sont ensuite incubés à 28°C pendants 24h.

La croissance bactérienne a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda$=620 nm.

#### II.5.2. Effet de la température

Des tubes de 9 ml de milieu YMB sont ensemencés par 1ml des suspensions bactériennes, de charge $10^6$ cellule/ml, préalablement préparées par des colonies des cultures jeunes âgées de 24 heures, ensuite ces tubes sont incubés à différentes températures : 10°C, 20°C ,30°C, et 40°C.

Après 24 heures d'incubation, la croissance bactérienne des souches testées est estimée par mesure de la densité optique à $\lambda$= 620nm.

### II.5.3. Effet de NaCl

Des tubes contenant 9ml de milieu YMB sans NaCl comme témoin, et d'autres tubes de 9ml à des différentes concentrations de NaCl (0.5%, 1%, 2%, 3% ) sont ensemencés par 1ml des suspensions bactériennes obtenues préalablement par inoculation des colonies des cultures jeunes âgées de 24 heures dans de l'eau physiologique jusqu'à la charge $10^6$ cellule/ml .

Les tubes sont incubés à 28°C pendant 24 heures et la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à $\lambda$=620nm.

### II.5.4. Sensibilité des souches aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude des *Sinorhizobium*, comme un moyen d'identification (Vincent, 1970 .,Beck et al, 1993), du fait de la possession ou non de facteurs de résistance.

**Le mode opératoire**

Des boites de Pétri contenant le milieu Muller Hinton sont ensemencées par inondation avec 0,5 ml de chaque suspension bactérienne ($10^6$ cellule/ml) des souches cultivées sur milieu YMB.

Après un temps de décantation des cellules on élimine l'excès de la suspension, en aspirant avec une pipette Pasteur munie d'un dispositif d'aspiration, dans un bac à eau de javel, on laisse les boites se sèchent à température du laboratoire pendant 10 à 15 minutes.

A l'aide d'une pince stérilisée, par passage dans la flamme du bec Bunsen, on dépose stérilement les disques d'antibiotiques à la surface des boites en appuyant très légèrement sur chacun des disques pour le faire adhérer à la gélose ensuite on laisse nos boites 30 minutes à température ambiante (ce délai permet à l'antibiotique de diffuser avant le démarrage de la culture), puis on incube ces boites à 28°C durant 18 heures. Après incubation des zones d'inhibitions peuvent être observées autour de certains disques.

La lecture des résultats consiste à mesurer, à l'aide du papier millimétrique, le diamètre des zones d'inhibition pour chaque antibiotique.

**Interprétation simplifiée** (Marie et Christian , 2000)

En fonction du diamètre d'inhibition on peut distinguer :

- Diamètre d'inhibition supérieur ou égal à 25mm: la bactérie est dite **« sensible»** à l'antibiotique.
- Diamètre d'inhibition inferieur ou égal a 8mm: la bactérie est dite **«résistante»** à l'antibiotique.

- Dans les autres cas, la sensibilité de la bactérie est dite **« intermédiaire»**.

Les souches sont classées en souches sensibles (S), intermédiaires (I) et résistantes (R) .

**III. Analyse numérique des caractères phénotypiques des souches**

les caractères phénotypiques des souches ont été codés (+) pour positive ou présent et (-) pour négative ou absent.

La matrice contient huit souches et 40 caractères. Pour le calcul des distances entre les souches, les données ont été traitées en utilisant les distances $Khi^2$ qui ne tiennent pas compte des réponses négatives.

Dans cette analyse nous avons utilisées la classification ascendante et hiérarchique (C.A.H) qui permet de classer nos souches par le degré de similitude ou distance entre souche lors de formation des classes. Dans notre cas nous avons utilisé la distance $Khi^2$ calculée par un logiciel STATISF version 1986, nous avons également calculé les coefficients de similitude des souches selon la formule de Smith et Colin (1974).

$$\boldsymbol{Cs = \frac{A + C}{A + B + C} * 100}$$

Tel que:

**Cs**: Coefficient de similitude entre deux souches.

**A**: nombre de tests positifs communs aux deux souches.

**B**: nombre de tests différents entre deux souches.

**C**: nombre de tests négatifs chez les deux souches.

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

### I. Le pH et la salinité des sols

Le pH (eau) mesure l'acidité du sol et le pH (KCl) mesure l'acidité en réserve sur le complexe argilo-humique; toujours inférieur à celui de pH (eau). Alors que la salinité est mesurée à partir de la conductivité électrique.

Les résultats de pH, de la conductivité et de la salinité des sols étudiés sont représentés dans le **tableau 8.**

**Tableau 8:** pH, conductivité et salinité des sols collectés.

| Origine des sols | pH (eau) | pH (KCl) | conductivité ( mmhos /cm) | Teneur en sel (g/l) |
|---|---|---|---|---|
| Benchicao | 7.50 | 6.98 | 0.22 | 0.11 |
| Ain Dhab | 8.04 | 7.90 | 0.16 | 0.08 |
| Université | 7.59 | 7.27 | 0.23 | 0.12 |
| Draa Samar | 7.61 | 7.58 | 0.21 | 0.10 |
| kouala | 7.47 | 7.04 | 0.22 | 0.11 |

**Le pH** des sols est au voisinage de pH=8 pour tous les échantillons étudiés; la version du référentiel pédologique français ( AFES-INRA, 1988) nous permet de classer nos échantillons.
Selon cette échelle; les sols collectés sont considérés basiques voir l'**Annexe 3**.

**La salinité** globale d'un sol correspond à des teneurs en sels dissous (anion et cation) présent dans la solution; elle est exprimé en g/l.
L'échelle U.S salinity laboratory (1954) classe les sols selon les teneurs en sels qu'ils contiennent. Lorsque la teneur en sel est inferieure à 1.5g/l ( la conductivité < 2.5 mmhos/cm) **(Annexe 3)**; ce sol est classé parmi les non salés (Danis, 2000), les conductivités de nos sols varient entre (0.16 - 0.23 mmhos/cm), ils sont considérés non salés.
Selon les résultats obtenus, les sols collectés de différents sites sont considérés basiques et non salés.

### II. Isolement des microsymbiotes

A partir des nodules de *Medicago arabica* et de *Medicago polymorpha* minutieusement déterrés et fraichement conservés, nous avons isolé et purifié selon la méthode de Vincent (1970), dix (10) souches bactériennes présumées appartiennent au genre *Sinorhizobium*.

Ces souches sont repiquées sur le milieu YMA dans des tubes inclinés et conservées au réfrigérateur à +4°C. Pour éviter le vieillissement et la mort des souches, il est nécessaire de procéder à un repiquage chaque trois (03) mois.

**Le tableau 9** présente les cinq (05) sites de collection des plantes de *Medicago* dans la région de Médéa et le nombre de souches isolées des nodules de chaque plante ainsi que le code préliminaire affecté pour chaque souche.

**Tableau 9:** Souches isolées des nodules de plantes provenant de différents sites.

| Sites d'échantillonnage | Nombre de souches | Code des souches | Plantes hôtes |
|---|---|---|---|
| Benchacao | 02 | 01,06 | *M. arabica M. polymorpha,* |
| Aindheb | 02 | 02,07 | *M. arabica M. polymorpha,* |
| Kouala | 02 | 03,08 | *M. arabica M. polymorpha,* |
| Université | 02 | 04,09 | *M. arabica M. polymorpha,* |
| Draa Samar | 02 | 05,10 | *M. arabica M .polymorpha,* |

**NB:** Codage des souches :

-le premier chiffre correspond au numéro de la plante *M. arabica.*

-le deuxième chiffre correspond au numéro de la plante *M. polymorpha* .

### III. Test d'authentification des souches de Sinor*hizobium*

les résultats de test d'authentification **(tableau 10)** indiquent que, parmi les dix (10) souches isolées des nodosités des *Medicago*, seules huit (08) souches ont déclenché la nodulation. Ceci confirme l'appartenance de ces huit souches au genre *Sinorhizobium.*

**Tableau 10:** Résultats des tests d'authentification.

| Souches | Hôtes d'origine | Sites échantillonnage | Nodulation |
|---|---|---|---|
| 01 | *M. arabica* | Benchacao | + |
| 02 | *M. arabica* | Aindheb | + |
| 03 | *M. arabica* | Kouala | + |
| 04 | *M. arabica* | Université | + |
| 05 | *M. arabica* | Draa Samar | + |
| 06 | *M. polymorpha* | Benchacao | - |
| 07 | *M. polymorpha* | Aindheb | + |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 08 | *M. polymorpha* | Kouala | + |
| 09 | *M. polymorpha* | Université | + |
| 10 | *M. polymorpha* | Draa Samar | - |

### III.1. La morphologie des nodules

Les nodules obtenus, observés à la loupe binoculaire **(Figure 27)**, ont des formes cylindriques, bilobés ou trilobés, étant de couleur rose due à la présence de leghémoglobine, protéine transporteur d'oxygène qui facilite la diffusion d'$O_2$ aux bactéroïdes car la nitrogénase bactérienne est très sensible à une concentration élevée d'oxygène.

Ces critères indiquent que ces nodules appartiennent au type indéterminés (Vincent, 1970).



**Figure 27:** Aspect des nodules sous la loupe binoculaire.

Le tableau ci-dessous indique les souches qui ont nodulé leurs plantes hôtes. Un nouveau code a été attribué à ces souches **(tableau 11) .**

**Tableau 11 :** Nouveau codage des souches.

| Souches | Codes |
|---|---|
| 01 | A1 |
| 02 | A2 |
| 03 | A3 |
| 04 | A4 |
| 05 | A5 |
| 07 | P1 |
| 08 | P2 |
| 09 | P3 |

**P**: Polymorpha ; **A**: Arabica

## IV. Caractérisation phénotypique des souches de *Sinorhizobium*

Cette caractérisation phénotypique concerne les huit souches qui ont permis le développement de nodules. Elle comporte l'étude de la morphologie cellulaire et coloniale ainsi que les tests biochimiques et physiologiques.

### IV.1. Caractérisation morphologique

#### IV.1.1. Les caractéristiques morphologiques des cellules

- L'observation microscopique à l'état frais des différentes suspensions bactériennes prélevées sur milieu YMB a montré que toutes les souches isolées à partir des nodules racinaires du *Medicago arabica* et *Medicago polymorpha* sont de petits bâtonnets mobiles .

La mobilité des souches est aussi confirmée par le test Mannitol-mobilité-Nitate dont les résultats obtenus sont illustrées dans la **figure 28.**

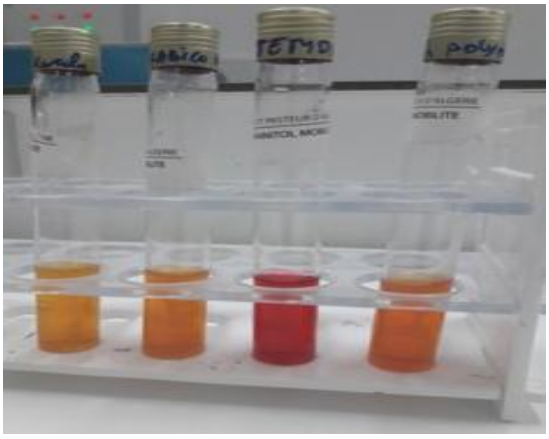


**Figure 28:** Résultats du test Mannitol -mobilité -Nitrate.

- L'observation au microscopique optique à l'état de frotti des souches montre des cellules ayant une forme de petits bâtonnets ( coccobacille) Gram négatifs **(Figure 29).**

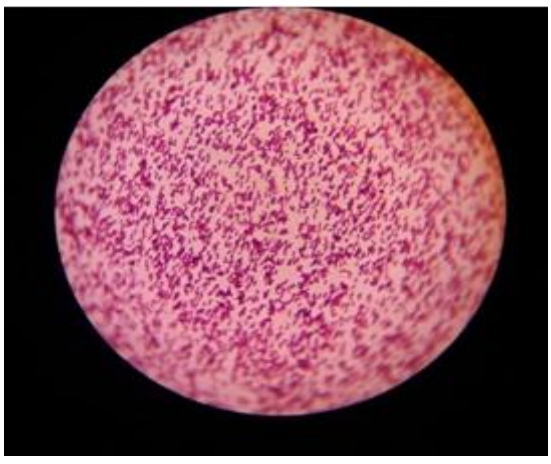


**Figure 29:** Observation microscopique à immersion.

### IV.1.2. Les caractéristiques morphologiques des colonies

Les souches de Sinorhizobium sont ensemencées sur milieu YMA, des colonies blanchâtres sont visible après 24 heures d'incubation à 28°C; ceci indique que les souches sont à croissance rapide (Tan et al, 1999), aussi sur milieu YMA au Rouge de Congo Les colonies apparaissent blanchâtres ou rose claire **(Figure 30)**. La couleur rose est due à la légère absorption de ce colorant (Vincent,1970).

Par ailleurs la synthèse des exopolysaccharides est estimé par la mucoïdité des colonies observées chez toutes les souches et en excès chez les souches A2, A3, P1 et P2.

Les colonies formées sont circulaires à bord régulier , bombées ou plates . L'aspect est lisse pour la plupart des souches. La taille des colonies est mesuré après deux jours de croissance à 28°C, elle est en moyenne de 2mm, Les caractéristiques morphologiques et culturaux des isolats sont résumés dans le **tableau 12.**

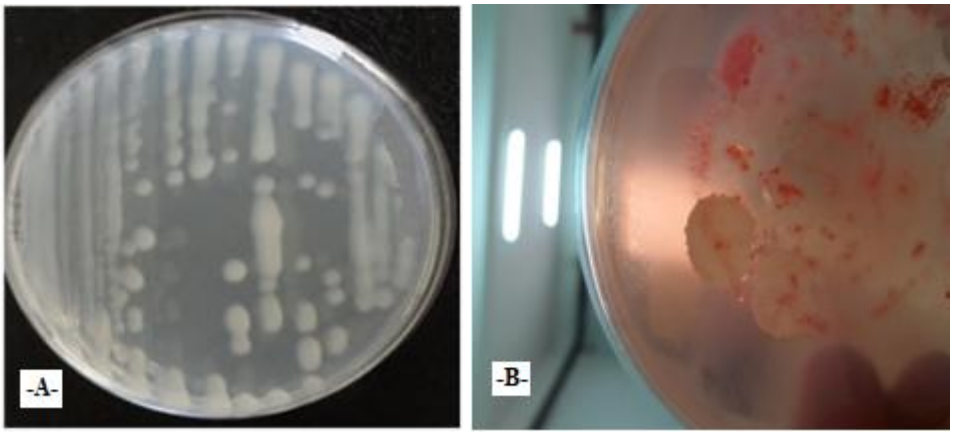



**Figure 30:** Aspect coloniale d'une souche de *Sinorhizobium* sur milieu YMA (A) et sur milieu YMA au Rouge de Congo (B).

**Tableau 12:** Caractères morphologiques et culturaux des isolats.

| Isolat | Aspect macroscopique des colonies | | | | | Aspect microscopique | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dimension des colonies (Ø en mm) | Pourtour de la colonie | Production des EPS | Opacité | Elévation de la colonie | Mobilité | Coloration de Gram et la forme cellulaire |
| A1 | 3 | régulier | faiblement productrice | Opaque | Plat | mobile | Coccobacille Gram- |
| A2 | < 2 | régulier | Très productrice | Opaque | Bombé | très mobile | coccobacille Gram- |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A3 | > 2 | régulier | Très productrice | Opaque | Plat | mobile | Coccobacille |
| A4 | 2 | régulier | faiblement productrice | Opaque | Bombé | mobile | coccobacille Gram- |
| A5 | 3 | régulier | Moyennement productrice | Opaque | Bombé | mobile | coccobacille Gram- |
| P1 | < 2 | régulier | Très productrice | Opaque | Bombé | très mobile | coccobacille Gram- |
| P2 | >2 | régulier | Très productrice | Opaque | Bombé | très mobile | coccobacille Gram- |
| P3 | 2 | régulier | faiblement productrice | Opaque | Bombé | très mobile | coccobacille Gram- |

L'ensemble des résultats relatifs à l'aspect macroscopique et microscopique suggèrent que les isolats ont la même description des Sinorhizobium.

## IV.2. Caractérisation biochimique

### IV.2.1. Mesure de la vitesse de croissance

Le bleu de bromothymol (BBT) est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique.

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BBT vers le jaune) **(Figure 31)**, contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donne un virage de couleur vers le bleu (Jordan, 1984., Beck et al, 1993.,Pagano, 2008., Boakye et al, 2016).

Pratiquement tous nos isolats modifient le pH sur le milieu YMA+BBT après 24 à 48 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boites de pétri, ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide.

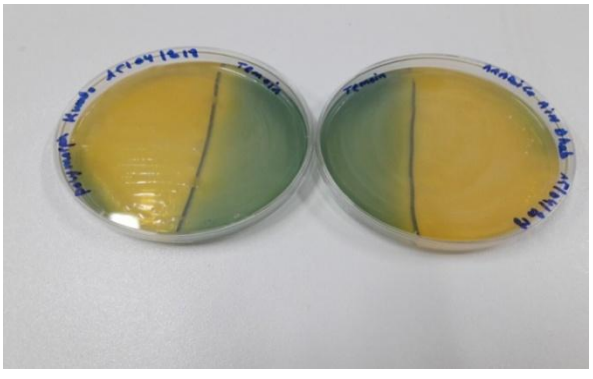


**Figure 31:** Croissance de *Sinorhizobium* sur milieu YMA+BBT.

**IV.2.2. Les tests biochimiques**

L'examen biochimique révèle les différentes réactions enzymatiques de nos isolats; dont on a utilisé la galerie API 20 NE (bioMerieux®SA-FR, 2006). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 13** .

Ce test a été réalisé dans le but de pouvoir déterminer la source carbonée assimilée, ainsi que les autres caractéristiques enzyymatiques des différentes souches étudiées, c'est une base de l'identification biochimique.

La **figure 32** montre un résultat d'identification par la galerie APi 20 NE.



**Figure 32:** Lecture du résultat sur la galerie API 20 NE.

Les résultats de la galerie montrent une réponse assez variable des souches. En effet, ils indiquent que toutes les souches testées réduisent le nitrate en (nitrites et azote) .

En ce qui concerne le test de TRP (Tryptophane), toutes les souches ne produisent pas d'indole .

Tous les isolats présentent une réaction positive concernant la PNPG (β-galactosidase) à l'exception de la souche P3.

Cependant que l'arginine dihydrolase (ADH), l'uréase (URE), l'ESC (β-glucosidase) et la gélatinase (GEL) présentent des réactions variables d'une souche à une autre et que la souche A5 montre une réponse positives pour les 4 tests suscités.

Les observations montrent également que la plupart des souches testées se développent en présence du glucose (GLU), l'arabinose (ARA), le mannose (MNE), le mannitol (MAN), le N-acétyle-glucosamine (NAG) et le maltose (MAL) à l'exception de quelques isolats.

Concernant le potassium gluconate (GNT), toutes les souches utilisent ce substrat comme source de carbone sauf la souche P1. Pour l'acide caprique (CAP) et l'acide adipique (ADI) Les résultats montrent une réponse assez variable des souches, par contre l'assimilation de malate (MLT)et de citrate trisodique (CIT) est positive pour tout nos isolats à l'exception de la souche P3 qui présente une citrate négative.

La consommation du substrats était absente pour l'acide phénylacétique (PAC) à l'exception de la souche P2 qui montre un résultat positif.

Les deux tests oxydase et catalase ont été effectués séparément avec les autres tests biochimiques; les résultats obtenus montrent que nos isolats sont tous oxydase positive **(Figure 33)**; également pour le test catalase dont le test où le dégagement des bulles gazeuses est important se représente avec +++ ; alors que moyen++ et faible +.

Ceci traduit la présence de ressemblances plus ou moins remarquées par les isolats nodulant la plante *Medicago.*

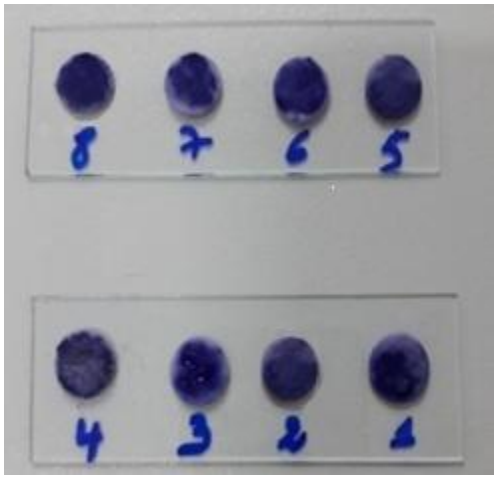



**Figure 33:** Résultats du test oxydase.

**Tableau 13:** Résultats des tests biochimiques.

| Tests | Isolats issus à partir des plantes récoltes du diffèrent site d'échantillonnage | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | P1 | P2 | P3 |
| Réduction des Nitrates en nitrites | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Réduction des Nitrates en azote | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Formation d'indole (tryptophane) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fermentation(Glucose) | - | + | - | - | - | - | + | - |
| Arginine Di hydrolase | + | + | - | - | + | - | - | + |
| Urease | + | + | - | + | + | + | - | + |
| Hydrolyse (ß-glucosidase) (Esculine) | - | + | + | + | + | + | - | - |
| Hydrolyse(protéase ) (Gélatine) | + | - | + | + | + | - | + | + |
| ß-galactosidase (para-Nitrophényl-ß-D-Galactopyranosidase) | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Assimilation(Glucose) | + | + | + | + | + | + | + | + |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Assimilation (Arabinose) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Assimilation (mannose) | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Assimilation (mannitol) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Assimilation (N-Acétyl-Glucos-amine) | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Assimilation (maltose) | - | + | + | + | - | + | + | + |
| Assimilation (potassium Gluconate) | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Assimilation (acide Caprique) | + | - | - | - | + | - | + | - |
| Assimilation (acide Adipique) | - | - | - | + | - | + | - | + |
| Assimilation (Malate) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Assimilation (Trisodium Citrate) | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Assimilation (Acide phenylAcetique) | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Catalase | + | + | ++ | + | +++ | + | +++ | ++ |
| Oxydase | + | + | + | + | + | + | + | + |

### IV.2.3. Le type respiratoire

Toutes les souches testées présentent le même type respiratoire, elles sont toutes aérobie stricte du fait que les colonies croient sur la surface de la gélose comme le montre la **(Figure 34).**

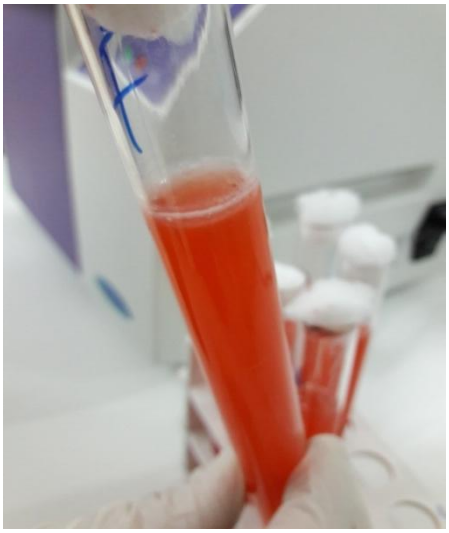


**Figure 34:** Résultat montrant le type respiratoire.

Les résultats des caractères cellulaires , culturaux et biochimiques des huit souches étudiées reflètent ceux des *Sinorhizobium* décrits dans la littérature (De Lajudie et al,1998., Kejdar, 2000 ., Sebbane ,2001), l'ensemble de ces résultats permettent une approche statistique pour déterminer leur diversité.

### IV.3. Caractérisation physiologique

#### IV.3.1. L'effet du pH sur la croissance des souches isolées

Les résultats obtenus sur l'effet du pH sur la croissance des *Sinorhizobium* sont présents dans la **figure 35** ci-dessous. D'après ces résultats, le pH optimal de la croissance des isolats est dans la gamme située entre pH6 et pH7 avec un pic à pH=7 sauf la souche P2 qui est capable de proliférer à pH=8. Une bonne croissance à pH neutre est constaté pour l'ensemble des souches testées de rhizobia ce qui indique qu'elles sont neutrophiles.

Les travaux de Brock et Anyango cités par Ballen et al (1998) ont montré que le pH optimum de la croissance des *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobizobium etli* sont respictivement 6.8 et 7.

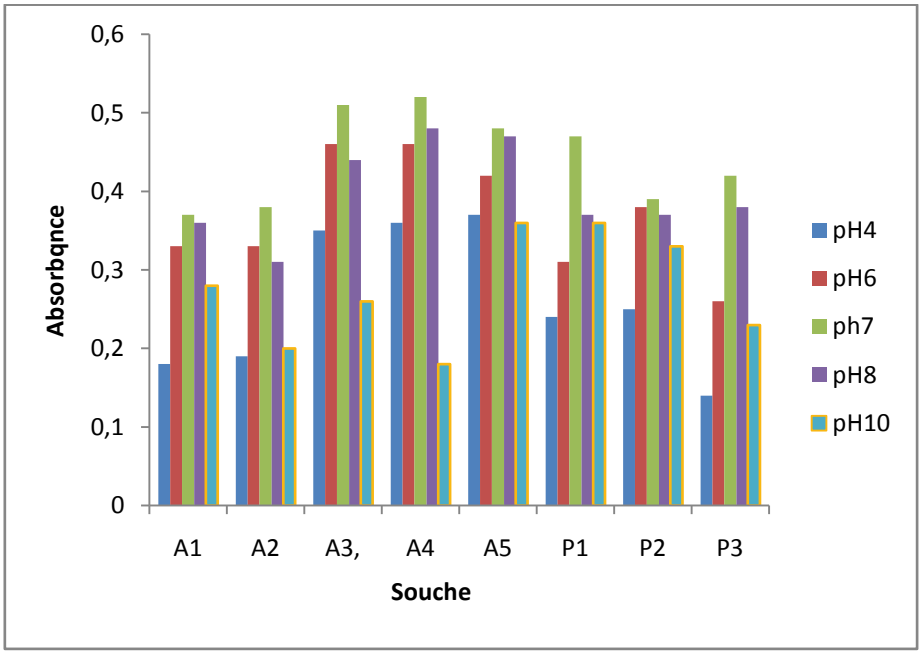



**Figure 35:** L'effet du pH sur la croissance.

#### IV.3.2. L'effet de la température sur la croissance des souches isolées

Les résultats montrent que nos isolats peuvent croitre à des température entre 27°C et 30°C ; à l'exception des deux souches A1 et P3 qui montre une croissance optimale à 35°C, à 40°C une réduction de 66 % de croissance à noter **(Figure 36).**

Le comportement de nos souches aux températures est en accord avec la littérature, Robert (1976) estime que les rhizobia à croissance lente étaient beaucoup plus tolérant au température élevée que les rhizobia à croissance rapide.

Chen et al (1997), ont trouvé que l'optimum de croissance des souches de *Sinorhizobium* se situe entre 25 et 30°C. Cependant les souches isolées de Cow-pea provenant du Sahel Savannah, montrent une légère croissance à 40°C (Zahran,1999).

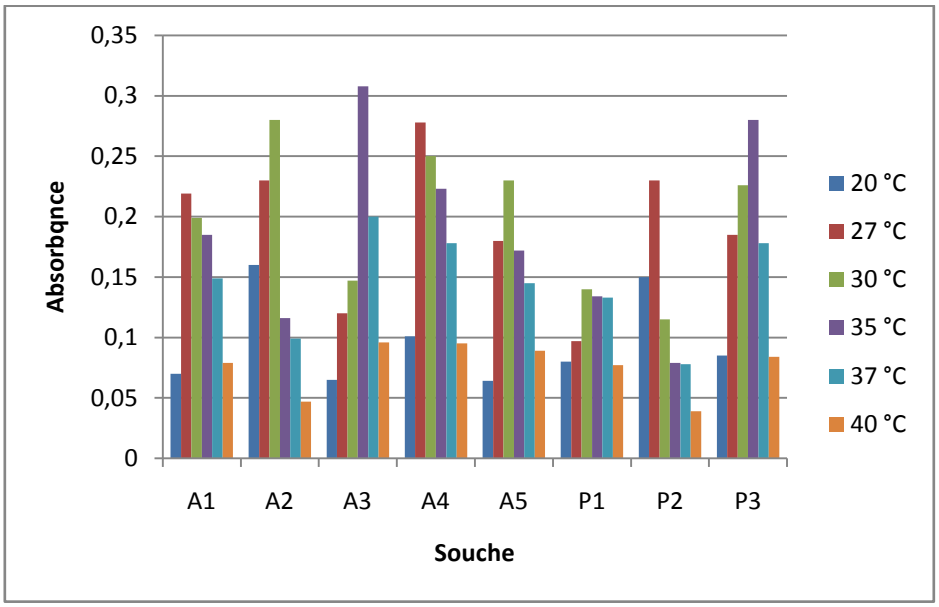



**Figure 36:** L'effet de la température sur la croissance.

### IV.3.3. L'effet de la salinité sur la croissance des souches isolées

Les souches testées tolèrent une concentration de chlorure de sodium (NaCl) de 0.5% à 1%, des résultats similaire ont également été signalés par Vishal et Abhishek (2014), c'est (Zahran,1999., Maatallah et al ,2002) 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 ou indirecte par le stress osmotique; ce qui explique les résultats obtenu à une concentration 3% de NaCl dont les densités optiques obtenues sont très faible pour toutes les souches testées.

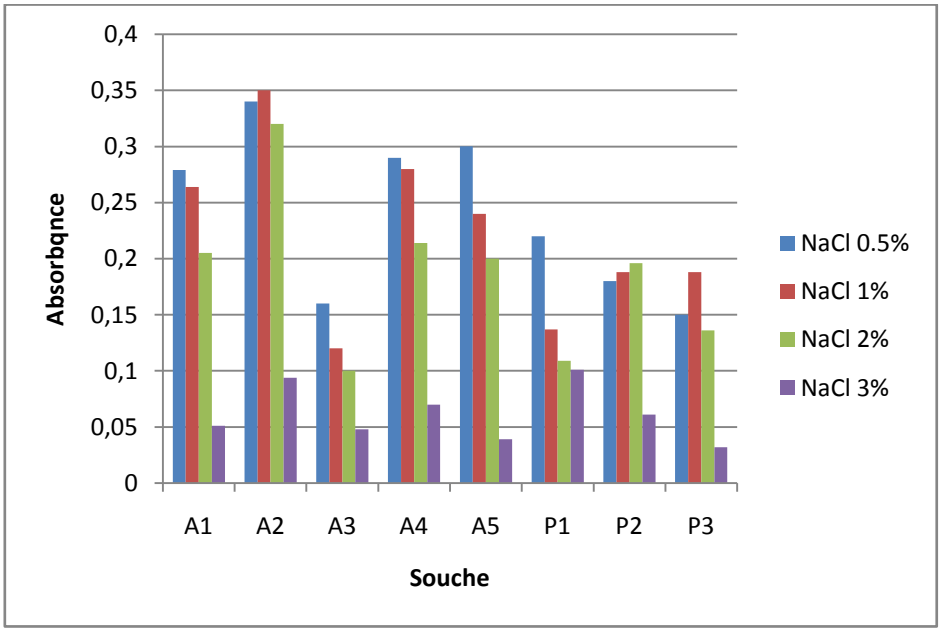



**Figure 37:** L'effet de la salinité sur la croissance des souches isolées.

### IV.4. Test de résistance et de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats obtenus de la mesure du diamètre de la zone d'inhibition suite à la manipulation effectuée sur milieu solide Mueller Hinton sont récapitulés dant le **tableau 14** qui montre la résistance ou la sensibilité des différentes souches isolées de *M. arabica* et *M. polymorpha* aux différents antibiotiques utilisés.

**Tableau 14:** Résultats de l'antibiogramme sur les souches isolées.

| Souches / Antibiotiques | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | P1 | P2 | P3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kanamycine 30µg | S | S | R | S | S | S | S | S |
| Pénicilline G 10µg | S | R | R | I | R | R | R | R |
| Ampicilline 10µg | S | I | R | S | I | R | S | S |
| Cefotaxine 30µg | I | S | I | S | S | S | S | I |
| Gentamycine 10µg | R | S | R | S | S | R | S | S |
| Néomycine 30µg | S | I | R | S | S | I | S | S |

A partir de ce tableau on note que toutes les souches sont sensibles à la Kanamycine sauf la souche A3 qui est résistante. Par contre, elles sont toutes résistantes à la pénicilline G à l'exception de la souche A1 qui est sensible et A4 qui présente une sensibilité intermédiaire.

La majorité des souches sont sensibles à l'Ampicilline à l'exception des souches A3 et P1 qui sont résistantes alors que les deux souches A2 et A5 ont une sensibilité intermédiaire à cet antibiotique.

Toutes les souches présentent une sensibilité à la Cefotaxine, par contre les souches A1,A3 et P3 présentent une sensibilité intermédiaire .

Pour la Gentamycine seulement les souches A1, A3 et P1 qui sont résistantes, par contre, les autres souches restantes sont sensibles à cet antibiotique.

Pour le dernier antibiotique testé qui est la Néomycine seul la souche A3 qui est résistante, les autres souches comme A1, A4, A5, P2 et P3 sont sensibles alors que les souches A2 et P1 ont une sensibilité intermédiaire à cet antibiotique .

Les études réalisées par Aarons et Graham (1991) ont montré que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.

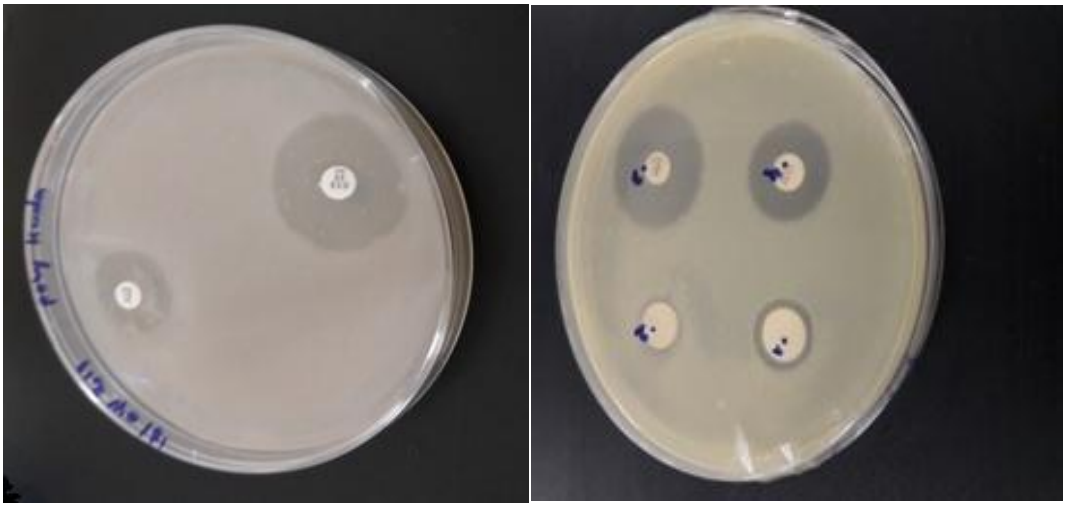


**Figure 38:** Résultats du l'antibiogramme de la souche P2.

## V. Analyse numérique des caractères phénotypiques

La taxonomie numérique est une méthode de classement des souches isolées. Elle représente un appui important pour les techniques de biologie moléculaire (hybridation ADN\ ADN, PCR-RELP de l'ADNr 16S...) ainsi que pour la caractérisation phénotypique, biochimique et physiologique.

Dans notre cas, nous sommes limités à l'étude des caractères phénotypiques des souches isolées des nodules racinaires de *Medicago* qui est basée sur 40 caractères discriminants, les résultats obtenus sont représentés sous forme de matrice (**Tableau 15)**.

A partir de cette matrice, nous avons fait une approche statistique en utilisant le logiciel STATISTCF, qui nous a permis de regrouper nos souches par la classification ascendante hiérarchique (C.A.H) basée sur le calcul de distance de $Khi^2$.

Nous avons également calculé le niveau de similitude inter souches à l'aide de coefficient de similitude selon la formule de Sneath et Colin (1974). les résultats obtenus sont consignés dans la **figure 39** et le **tableau 16**.

**Tableau 15:** Matrice des caractères phénotypiques.

| N° | Souches / Caractères | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | P1 | P2 | P3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **01** | Mobilité | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **02** | Production EPS | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **03** | Croissance rapide | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **04** | Nitrate réductase | + | + | + | - | + | - | + | - |
| **05** | Nitrite réductase | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **06** | Indole | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **07** | Fermentation du Glucose | - | + | - | - | - | - | + | - |
| **08** | ADH | + | + | - | - | + | - | - | + |
| **09** | Gaz | - | - | + | - | - | - | - | + |
| **10** | Urease | + | + | - | + | + | + | - | + |
| **11** | Esculine | - | + | + | + | + | + | - | - |
| **12** | Gélatinase | + | - | + | + | + | - | + | + |
| **13** | PNPG | + | + | + | + | + | + | + | - |
| **14** | Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **15** | Mannose | + | + | + | - | + | + | + | + |
| **16** | Mannitol | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **17** | NAG | + | + | + | + | + | + | + | - |
| **18** | Maltose | - | + | + | + | - | + | + | + |
| **19** | GNT | + | + | + | + | + | - | + | + |
| **20** | CAP | + | - | - | - | + | - | + | - |
| **21** | ADI | - | - | - | + | - | + | - | + |
| **22** | MLT | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **23** | CIT | + | + | + | + | + | + | + | - |
| **24** | PAC | - | - | - | - | - | - | + | - |
| **24** | CAT | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **25** | OX | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **26** | Aérobie stricte | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **27** | Optimal à 27 °C | + | - | - | + | - | - | + | - |
| **28** | Optimal à 30 °C | - | + | - | - | + | + | - | - |
| **29** | Optimal à 35 | - | - | + | - | - | - | - | + |
| **30** | Optimal pH7 | + | + | + | + | + | - | + | + |
| **31** | Optimal pH8 | - | - | - | - | - | - | + | - |
| **32** | 0ptimal 0,5% D'NaCl | + | - | + | + | + | + | - | - |
| **33** | 0ptimal 1 % D'NaCl | - | + | - | - | - | - | - | + |
| **34** | 0ptimal 2 % D'NaCl | - | - | - | - | - | - | + | - |
| **35** | Ampicilline | - | - | + | - | - | + | - | - |
| **36** | Pénicilline G | - | + | + | - | + | + | - | + |
| **37** | Kanamycine | - | - | + | - | - | - | - | - |
| **38** | Néomycine | - | - | + | - | - | - | - | - |
| **39** | Gentamycine | + | - | + | - | - | + | - | - |
| **40** | Céfotaxine | - | - | - | - | - | - | - | - |

Pour les antibiotiques : (+) résistance et (-) sensible

La classification ascendante hiérarchique basée sur le calcul de distance $Khi^2$ entre les souches, nous a permis d'établir le dendrogramme suivant **(figure 39).**

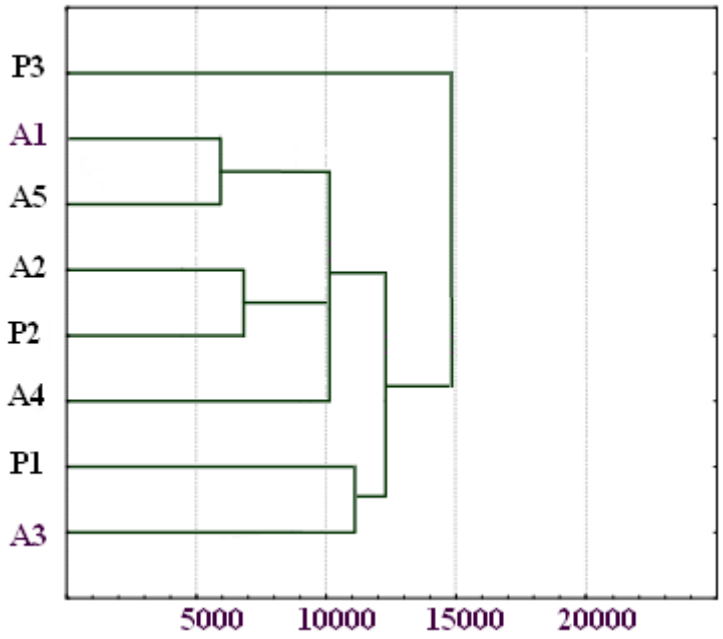



**Figure 39:** Dendrogramme de regroupement des souches de *Sinorhizobium* isolées de genre *Medicago ( M. arabica* et *M. polymorpha).*

Une première lecture du dendrogramme fait ressortir que la plupart des souches sont regroupées dans un cluster, tandis que la souche P3 est bien individualisée.

- Le premier cluster renferme la souche P3 qui est distinguée des autres surtout par l'absence de deux enzymes (PNPG et Gélatinase), par son métabolisme carboné (Esculine -, NAG -, mannitol-, PAC- et par sa croissance optimale à 35°C et à 1% d' NaCl.
- Le deuxième cluster regroupe les 7 souches (P1, A4, A3, P2, A2, A1 et A5) est lui-même subdivise en deux clusters :

- Le **1er** cluster, se compose de deux souches P1 et A3, ces dernières sont distinguées des autres par leurs résistance à trois molécules d'antibiotiques: Gentamycine, Ampicilline et Pénicilline G.

- Le **2ème** cluster, regroupe les cinq souches (A4, A2, P2, A1, et A5), il est subdivisé en trois classes :

- La première classe, représente la souche A4 qui se distingue du reste des souches par assimilation de l'acide adipique et non pour le mannose et par absence de l'arginine dihyrolase (ADH) ainsi que sa croissance optimale à 27°C.

- La deuxième classe , renferme les souches (A2, P2, A1, et A5), qui sont réparties en deux groupes :

1- Les souche A2 et P2 forme un groupe, elles sont distinguées des souches (A1et A5) par leur pouvoir à fermenter le glucose .

2- Les deux souches A1 et A5 sont distinguées par l'assimilation d'acide caprique comme seule source de carbone (CAP +), maltose négative et ne fermentent pas le glucose.

les résultats obtenus par le calcul des coefficients de similitude sont consignés dans le **tableau 16**.

**Tableau 16:** Résultats du calcul des coefficients de similitude.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A1** | 1 | | | | | | | |
| **A2** | 0.75 | 1 | | | | | | |
| **A3** | 0.60 | 0.725 | 1 | | | | | |
| **A4** | 0.825 | 0.70 | 0.725 | 1 | | | | |
| **A5** | 0.90 | 0.875 | 0.75 | 0.75 | 1 | | | |
| **P1** | 0.70 | 0.775 | 0.750 | 0.80 | 0.775 | 1 | | |
| **P2** | 0.80 | 0.725 | 0.725 | 0.75 | 0.675 | 0.575 | 1 | |
| **P3** | 0.675 | 0.725 | 0.65 | 0.725 | 0.675 | 0.65 | 0.575 | 1 |
| **Souches** | **A1** | **A2** | **A3** | **A4** | **A5** | **P1** | **P2** | **P3** |

La lecture des valeurs des indices de similitude montre que les souches étudiées ont une homologie supérieure à 55 % . On remarque sur 36 indices de similitude, 20 sont compris entre 70-89% .

La classe la plus représentative des valeurs de similitude est comprise entre 70-79% .

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons dégager la conclusion suivante :

les souches isolées de *Medicago* (*M. arabica* et *M. polymorpha*) de différentes régions de Médéa présentent des caractères phénotypiques de faible variation reflétant un indice de ressemblance modéré.

**Conclusion générale**

Cette étude réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie de l'université Yahia Farés de Médéa sur la symbiose des isolats de *Medicago arabica* et *Medicago polymorpha*. Le choix des deux espèces *Medicago* revient à leur abondance dans la région de Médéa, comme une plante fourragère d'un apport nutritionnel protéique.

à partir des nodules des deux espèces *M. arabica* et *M. polymorpha*, nous avons isolé et purifié dix (10) souches dont cinq ( 05) prélevées de *M arabica* et cinq (05) *M. polymorpha.*

Les tests d'authentification nous ont permis d'en obtenir huit (08) souches capables de noduler leurs plantes hôtes d'origine confirmant ainsi leur appartenance à la famille des *Rhizobiaceae.*

Les huit isolats ont été caractérisés phénotypiquement, on se basant sur les caractères morphologiques (cellulaires et culturales), biochimiques, et physiologiques.

En effet, les caractères cellulaires et culturales de ces souches indiquent que se sont des coccobacilles à Gram négatif, mobiles, formant des colonies circulaires de 1.5 à 3 mm, d'un aspect bombé pour la majorité, de couleur crème ou blanchâtre et productrices d'EPS.

La caractérisation physiologique de ces isolats a permis la mise en évidence d'un caractère mésophile et une croissance entre des pH situés entre 6 et 8, en outre ces souches ont une tolérance structurale de 0.5 -1% vis- à -vis de NaCl.

La caractérisation biochimique montre que toutes les souches étudiées possèdent une nitrate réductase et non formatrice d'indole (Tryptophane). L'utilisation des différents substrats carbonés a montré également un profil d'assimilation variable. Ces souches ont un pouvoir acidifiant sur milieu YMA-BBT ce qui confirme leur croissance rapide.

En outre, ces isolats présentent une sensibilité importante à la Cefotaxine et une moindre tolérance à la Gentamycine, Néomycine, Kanamycine, Pénicilline G et à l'Ampicilline.

Les souches isolées de *Medicago* (*M. arabica* et *M. polymorpha*) de différentes régions de Médéa présentent des caractères phénotypiques de faible variation reflétant un indice de ressemblance modéré.

En perspectives, il est intéressant:

- D'élargir la collection à d'autres espèces et à différents sites écologiques et géographiques pour apporter d'autres informations et enrichir la base de données actuelles sur

les *Medicago* ainsi que de protéger et de sauvegarder ces deux partenaires symbiotiques pour une éventuelle application dans le futur.

❖ De vérifier les souches par des méthodes moléculaires comme électrophorèse PAGE, SDS et séquençage ARNr 16S.

❖ D'élargir le nombre de caractères phénotypiques pour une étude plus avancée ainsi que l'optimisation de la production des EPS en jouant sur l'influence des facteurs physiologiques tel que: source de carbone, d'azote…etc.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


**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.

**Ardley J K., De Trengove R D., Dilworth M J., Howieson J G., Meyer S E., O'Hara G W.,Parker M A.,Reeve W G., Willems A., Yates R J. 2012.** Microvirga lupini sp. nov., Microvirga lotononidis sp. nov., and Microvirga zambiensis sp. nov. are Alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. IJSEM. 62 (11), 2579-2588.

**Bacle E B B et Tailliez R. 2017.** Etude de la symbiose rhizobium-legumineuse: Préparation de cellules isolées pour l'étude invitro / Study of the symbiosis rhizobium-legume : Preparation of isolated cells for invitro study. 88, 223-230.

**Beck DP., Materon LA ., Afandi F. 1993**. Practical Rhizobium -legume. technical manual N°9.

**Ballen K G., Graham P H.,Jones R K ., Bowers J H. 1998.** Acidity and calcium interaction affecting cell enveloppe slability in *Rhizobium Canadian journal of Microbiological.44:582-587*

**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.

**Benguedouar A. 2000.** Etude de la symbiose : Rhizobium – Hedysarum coronarium. Essai de la caractérisation de l'espèce Rhizobium hedysary. Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie.

**Blondeau R. 1980.** Fixation biologique de l'azote. Thèmes Vuibert Université Biologie. Série animée par Guy Marchal. Université de Lille. p102.

**Boussaid M., Ben Fadhel N., Trifi-Farah N., Abdelguerfi A., Marrakchi M. 1995.** Les espèces méditerranéennes du genre hedysarum L. In : Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. BRG/INRA. France, 115-130.

**Bruneton J. 2009.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.

**Brunton J. 2002.** Plantes toxiques, végétaux toxiques pour l'hommes et les animaux. TD.Paris, 618.

**Chen W X., Li J L., Yan G H. 1988.** Numerical taxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to Sinorhizobium gen. IJEM. 38, 392-397.

**Chen W M., Coenye T., DeVos P., Laevens S., Lee T M., Mergeay M., Vandamme P. 2001.** Ralstonia taiwanensis sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of acystic fibrosis patient. IJSEM. 51, 1729-1735.

**Choi H K., Mun J H., Kim D J., Zhu H., Baek J M., Mudge J., Roe B., Ellis, N., Doyle, J., Kiss, G B., Young, N D., Cook D R. 2004.** Estimating genome conservation between crop and model legume species. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 15289-15294.

**Chrispeels M J and Sadava D E. 2003.** Plants, Genes, and Crop Biotechnology. Educational fondational of the American society of plant biologists. London.

**Dajoz R. 2012.** L'évolution biologique au XXI e siècle, les faits, les théories. Ed Lavoisier. Paris. 40p.

**Day D A., Poole P S., Tyerman S D., Rosendahl L. 2001.** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. Cellular and Molecular Life Sciences. 58: 61–71.

**Deakin W J and Broughton W J. 2009.** Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. Nature Reviews Microbiology 7(4), 312-320.

**De Lajudie p., Willems A., Nick G., Moreiraf Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M D., Lindstrom k., Dreyfus B et Gillis M. 1998.** Caracterization of tropical tree rhizobia and description *Mesorhizobium plusiforium sp. International of Microbiological journal of systematic Bacteriology.48:369-382.*

**Delalande M., Greene S., Hughes S., Nair R., Huguet T., Aouani M E., Prosperi J M. 2007.** Wild accessions / populations. Medicago truncatula handbook 1-27.

**Dénarié J., Debelle F., Prome J C. 1996.** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors : Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. ARB. 65, 503-535.

**Denis Baise. 2000.** Guide des analyse en pédologie , édition INRA, Paris, p.245.

**Denison R F and Okano Y. 2003.** Leghaemoglobin oxygenation gradients in alfalfa and yellow sweetclover nodules. Journal of Experimental Bolany. 54: 1085-1091.

**D'Haeze W and Holsters M. 2002.** Nod factor structures, responces, and percepting during initiation of nodule development. Glycobiology.vol.12 no. 6: 79-105.

**Downie J A. 2005.** Legume Haemoglobins: Symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. Current Biology. 15: 196-198.

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

**Doyle J J. 2011.** Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. Molecular Plant-Microbe Interactions. 24: 1289–1295.

**Doyle J J. 1998.** Phylogenetic perspectives on nodulation: Evolving views of plants and symbiotic bacteria.Trends in plant science 3,473-478p.

**Dreyfus B., Garcia J L., Gillis M. 1988.** Characterization of Azorhizobium caulinodans gen.nov, sp.nov, a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. International Journal of Systematic Bacteriology. 38: 89-98.

**Dreyfus B. 1997.** Sesbania rostrata et Medicago arborea : des légumineuses fixatrices d'azote. Dossiers thématiques de l'IRD 'Le jardin planétaire'.
www.orstom.fr/fr/inst/actualites/dossiers/jardin/legume.shtml. Lewis, G.P., Lock, M.

**Duhoux E et Nicole M. 2004.** Atlas de biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes à fleurs. Ed. Dunod. Paris. 166 p.

**Dupuy Y et Nougier P. 2005.** Les micro-organismes-Du gène à la biosphère. Ellipes Editions Marquetting. Paris.

**Fleurentin J. 2004.** Guérisseurs et plates médicinales du Yémen, au pays de l'encens, de l'aloès et du café. Ed Karthala, Paris. 156 p.

**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. 1889.** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschast. 7, 332-346.

**Giraud E and Fleischman D. 2004.** Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. Photosynthesis Research. 82: 115–130.

**Grego S., Quatrini P., Badalucco L., De Cesare R., Zanotti C., Cacciari I. 1995.** « Souches résistantes de Rhizobium dans une rhizosphère caractérisée d'Acacia au nord et au sud du Sahara ». In Pontanier R., M'Hiri A.,Akrimi N., Aronson J., Le Floc'h E., éd. : L'homme peut-il refaire ce qu'il a défait ?, Paris, John Libbey Eurotext : 201-210.

**Hamdi H Z. 1999.** Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogèn Fixation Under severe Conditions and in an AridеClimate.in :MMBR. beni-suef,62511 egypt, 63(4), 968–989.

**Heulin T and Vriet C. 2014.** Symbiosis plantes-Microorganismes.LGBP.95.

**Hirsch A M. 1992.** Developmental biology of legume nodulation. New Phytologist. 122: 211–237.

**Hirsch A M., Lum M R., et J A., Downie . 2001.**What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? Plant Physiology. 127: 1484–1492.

**Hopkins G. 2003.** Physiologie végétale, Révision scientifique de Charles-Marie Evrard, Bibliotheque Royale albert, Bruxelle : 2003/0074/19, ISBN 2-7445-0089-5.

**Hopkins W G et Evrard C M. 2003.** Physiologie végétale. Université des sciences et technologie de Lile. Edition de Boek.

**Jean-François M G. 1997.** Assimilation de l'azote chez les plantes Aspects physiologique, biochimique et moléculaire : P. 264

**Jim smith .2005.** technology of reduced additif foods. edition blackwell, p240.

**Jordan D C. 1982.** Transfer of Rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. International journal of systematic bacteriology. 32: 136–139.

**Jordan D C. 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 & Wlikins Co. Baltimore.

**Joseph-pierre Guiraud. 2012.** Microbiologie alimentaire, édition Dunod, Paris, p 655.

**Kejdar F. 2000.** Caractérisation phénotypique et analyse des protéines en SDS-PAGE de souches de *Rhizobium meliloti* isolées de la région de Bejaia, Memoire de magister Bejaia

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

**Lapeyronie A. 1982.** Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. Maisonneuve et Larose. Paris. Pp 307-315.

**Lea P J and Morot-Gaudry J F. 2001.** Plant Nitrogen, INRA, Springer. France.

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

**Lewis G P., Lock M., Mackinder B., Schrire B. 2005.** Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, UK. 577.

**Lin D X., Wang E T., Tang H., Han T X., He Y R., Guan S H., Chen W X. 2008.** Shinella kummerowiae sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume Kummerowia stipulacea. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 58: 1409–1413.

**Maatallah J., Berraho E B., 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

**Marie N et Christian D. 2000 .** Activité technologique en microbiologie, technique de base et méthodologique. édition CRDP, Bordeaux, p140.

**Madigan M et Marilinko J. 2007.** Brock Biologie des micro-organismes. Pearson Education. France.

**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.

**Morot-Gaudry J F. 1997.** Assimilation de l'azote chez les plantes Aspects physiologique, biochimiqye et moleculaire, Editions Quae, Plant physiology,INRA. France.

**Pelmont J. 1995.** Bactérie et environnement, Adaptation physiologique. Vol 2.office des publications universitaires. Presses universitaire de Grenoble.

**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).

**Prescott L M ., Harley J P ., Klein D A ., Claire-Michèle ., Bacq-Calberg ., Dusart J. 2007.** Microbiologie, chapitre .22.les bactéries. Les protéobactérie, .Edition. De Boeck université.p.492.

**Prosperi J M., Guy P., Genier G., Angervian M. 1995.** Ressources génétiques des plantes fourragères et gazon, éd INRA.Paris.

**Prosperi J M., Isabelle O., Angevain M., Génier G., Nansat P. 1993.** Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes. INRA. Mauguio. N°4 : 1-5.

**Pueppke S G and Broughton WJ. 1999.** Rhizobium sp. strain NGR234 and R.fredii USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Molecular Plant-Microbe Interactions. 12: 293–318.

**Reddell P. 1993.** Soil constraints to the growth of nitrogen-fixing trees in tropical environment. In: Subba Rao N.S., Roddriguez-Barrueco C. (Eds): Symbioses in nitrogen-fixing trees. Oxford IBH.New Delhi,65-83.

**Reddy T Y., Reddy V R., Anbumozhi V. 2003.** Phisiological responses of groundnut (Arachis hypogaea L.) to drought stress and its amelioration: acritical review. Plant growth Regul, 41: 75-88.

**Richards L A. 1954.** United States Salinity Laboratory Staff Agriculture UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE Handbook No. 60 Issued February p166.

**Rivas R., Velazquez E., Willems A., Vizcaino N., Subba-Rao N S., Mateos P F., Gillis M., Dazzo F B., Martı´nez-Molina E. 2002.** A new species of Devosia that forms a unique nitrogen-fixing root nodule symbiosis with the aquatic legume Neptunia natans (L.f.) Druce. Applied and Environmental Microbiology. 68: 5217–5222.

**Rogel M A., Ormeño-Orrillo E., Martinez Romero E. 2011.** Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. Systematic and Applied Microbiology. 34: 96–104.

**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.

**Serraj R., Sinclair TR., Purcell L C. 1999.** Symbiotic nitrogen fixation response to drought. J Exp botan, 50:143-155.

**Sawada H .,Young J M., Kuykendall L D .,Martinez-Romero E., Ker E. 2003.** Classification and nomenclature of Agrobacterium and Rhizobium: 53: 1689–1695.

**Sebbane N. 2001.** Caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *Rhizobia* isolées de la région de Bejaia, Mémoire de magister Bejaia.

**Shneider A et Huyghe C. 2015.** les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Quae RD10, 78026.

**Soltner D. 2005.** Les bases de la production végétale. Tome I: Le sol et son amélioration Science et techniques agricoles**,** p472.

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

**Smith H A and Colin V G .1974.** A study in test reproducibility between laboratories: Pseudomonas working party: Anatomy Van leeuwenkoek. journal of microbiology.40:4812-527.

**Somasegaran P and Hoben H J. 1994.** Handbook for *Rhizobia*. Springer-Verlag, Berlin.

**Subba Rao N S. 1993.** Biofertilizers in agriculture and forestry. New Hampshire: Science Publishers, Inc. 3e edition. 242 pp.

**Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., Dreyfus B. 2001.** Methylotrophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. Journal of Bacteriology. 183: 214–220.

**Thami Alami I et El-Mzouri E H. 2000.** Etude de l'efficacité et de la persistance des souches de Rhizobium de Sulla. CIHEAM - Options Méditerranéennes. 2: 321-325.

**Tan Z Y., Wang T E., Peng X W.1999.** Caracterization of bacteria isolated from wind legumes' in the north-western regions of China. *International of Microbiological journal of systematic Bacteriology.*

**Tillad P and Drevon J J. 1988**. Nodulation and nitrogenae activity of chickpea cultivar INRA 199 inoculated with different strains *Rhizobium* . Agronomie, 8 : 387-392pp.

**Trujillo M E., Willems A., Abril A., Planchuelo A M., Rivas R., Ludena D., Mateos PF., Martinez-Molina E., Velazquez E. 2005.** Nodulation of Lupinus albus by strains of Ochrobactrum lupine sp. nov. Applied and Environmental Microbiology.71: 1318–1327.

**Valverde A., Velazquez E., Fernandez-Santos F., Vizcaino N., Rivas R., Mateos P F., Martinez-Molina E., Igual J M., Willems A. 2005.** Phyllobacterium trifolii sp. nov. nodulating Trifolium and Lupinus in Spanish soils. International Journal of Food Microbiology. 55:1985–1989

**Varki R D., Cummings J D., Hudson H F., Stanley P., Bertozzi R C., Hart G W et Etzler E M. 2009.** Essentials of Glycobiology. Second Edition Chapter 37

**Vincent J M. 1970.** A manuel for the practicol stude of rootnodule bacteria. IBP handbook, 15 : blackwell, oxford.

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

**Werner D. 1992.** Symbiosis of plants and cell proteins analysis from Rhizobium fredii. BBAS. 39, 261-267.

**Young J. 1992.** Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. Biological nitrogen fixation. p 43–86.

**Zaid E. 2006.** La physiologie végétale, Faculté des Sciences Rabat.

**Zhu H., Choi HK., Cook DR., Shoemaker RC. 2005.** Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. Plant Physiology. 137: 1189–1196.

# Annexe 1

**1-Milieux de culture utilisés pour la croissance des rhizobia**

**1-1- Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)**

**Composition**

Mannitol…….……10g

Extrait de levure……...…….….....0.4g

$K_2HPO_4$……...……..…0.5g

$MgSO_4$, 7 $H_2O$…….…..…0.2g

NaCl…….….0.1g

Agar…….…….….15g

Eau distillée……..……..1000ml

PH ajusté à 6.8. Autoclavage 120°C pendant 20min.

**1-2- Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)**

Mannitol…..……...10g

Extrait de levure…….... 0.4g

$K_2HP$..……...0.5g

$MgSO_4$, 7 $H_2O$……..…0.2g

NaCl…….…....0.1g

Eau distillée……..……...1000ml

PH ajusté à 6.8. Autoclavage 120°C pendant 20min.

**1-3- Milieu YMA +Rouge Congo en g/**l

**Composition**

YMA…….…...1000ml

Solution de Rouge Congo……..…..10ml

Après l'ajustement du PH 6.8 on ajoute 10ml de Rouge Congo(0.25g Rouge Congo dans 100ml d'eau distillée).

Autoclavage 120°C pendant 20min.

**1-4- Milieu YMA+ BBT (bleu de bromothymol) en g/l**

**Composition**

YMA……..…….….1000ml

Solution de bleu de bromothymol…….….....5ml

Après l'ajustement du PH 6.8 on ajoute 5ml de bleu de bromothymol (0.5g BBT dans 100ml d'éthanol). Autoclavage 120°C pendant 20min.

**1-5- Milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone de caséine……..…… 10,00g

Mannitol…… 7,50g

Nitrate de potassium…….…….. 1,00g

Rouge de phénol……..…... 0,04 g

Agar…….... 3,50 g

Eau distillée……..……..…….....1000ml

pH final à 25°C : 7,6 ± 0,2 .

**1-6-Milieu de culture de la légumineuse**

**Milieu Fahraeus**

- Macroéléments :

$KH_2PO_4$…….……100mg

$NaH_2PO_4$…….....150mg

$CaCl_2$……...…100mg

$MgSO_4$ (H 2 O)……..120mg

Citrate de fer……..….5mg

Eau distillée…….....**.....**1000ml

la solution d'oligoéléments……1ml

- La solution d'oligoéléments

$H_3BO_3$……...2.86g

$MnSO_4$ (H 2 O)……...2.08g

$ZnSO_4$ (7H 2 O)……..0.22g

$CuSO_4$ (5H 2 O……...…0.08g

$Na_2MOPO$ 4…….…..0.11g

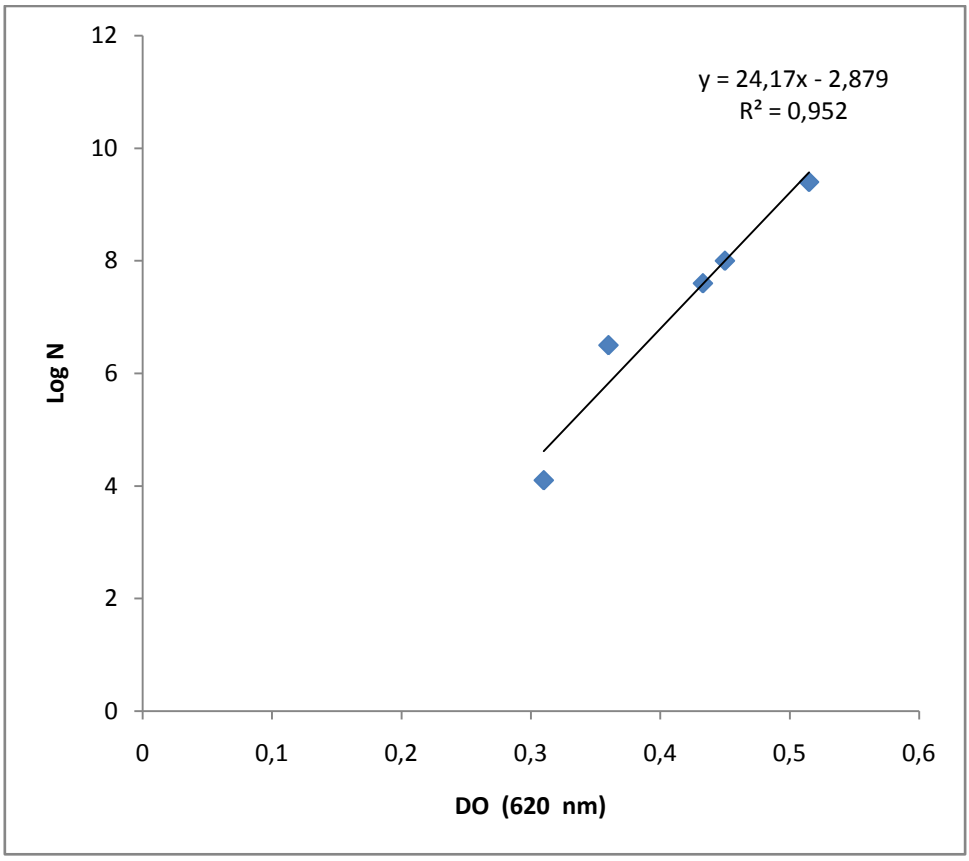
Eau distillée……..…1000 ml

# Annexe 2

## 2- Courbe étalon de croissance

| Dilution | 0 | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Absorbance (DO) | 0,515 | 0,45 | 0,433 | 0,36 | 0.31 |
| Log(N) | 4.1 | 6.5 | 7.6 | 8 | 9.4 |

**LogN = (24.17 * DO) - 2.879**




Courbe étalon de croissance

## Annexe 3

### 3- Les résultats de la mesure de la densité optique ʎ =620 des différents tests

### 3-1- Effet du NaCl

| Les souches | Concentration du NaCl dans 10ml de milieu YEMB | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.5% | 1% | 2% | 3% |
| A1 | 0.279 | 0.264 | 0.209 | 0.051 |
| A2 | 0.340 | 0.350 | 0.329 | 0.094 |
| A3 | 0.160 | 0.120 | 0.100 | 0.048 |
| A4 | 0.292 | 0.280 | 0.214 | 0.074 |
| A5 | 0.300 | 0.240 | 0.200 | 0.039 |
| P1 | 0.220 | 0.137 | 0.110 | 0.100 |
| P2 | 0.180 | 0.188 | 0.190 | 0.061 |
| P3 | 0.150 | 0.188 | 0.136 | 0.032 |

### 3-2- Effet de la température

| Les souches | Les différentes températures d'incubation | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20°C | 27°C | 30°C | 35°C | 37°C | 40°C |
| A1 | 0.071 | 0.219 | 0.199 | 0.207 | 0.149 | 0.079 |
| A2 | 0.160 | 0.230 | 0.280 | 0.160 | 0.160 | 0.047 |
| A3 | 0.065 | 0.120 | 0.147 | 0.308 | 0.200 | 0.096 |
| A4 | 0.101 | 0.278 | 0.250 | 0.223 | 0.178 | 0.095 |
| A5 | 0.064 | 0.180 | 0.225 | 0.172 | 0.145 | 0.089 |
| P1 | 0.080 | 0.097 | 0.140 | 0.134 | 0.133 | 0.077 |
| P2 | 0.150 | 0.230 | 0.115 | 0.079 | 0.078 | 0.039 |
| P3 | 0.085 | 0.185 | 0.226 | 0.280 | 0.178 | 0.084 |

**3-3- Effet du PH**

| Les souches | Le PH du milieu YEMB | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | PH=4 | PH=6 | PH=7 | PH=8 | PH=10 |
| A1 | 0.180 | 0.330 | 0.370 | 0.360 | 0.280 |
| A2 | 0.350 | 0.460 | 0.510 | 0.440 | 0.260 |
| A3 | 0.360 | 0.460 | 0.520 | 0.480 | 0.180 |
| A4 | 0.190 | 0.330 | 0.380 | 0.310 | 0.200 |
| A5 | 0.370 | 0.420 | 0.480 | 0.470 | 0.360 |
| P1 | 0.140 | 0.260 | 0.400 | 0.380 | 0.230 |
| P2 | 0.250 | 0.380 | 0.390 | 0.370 | 0.330 |
| P3 | 0.240 | 0.310 | 0.470 | 0.370 | 0.360 |

**3-4- Normes de $PH_{eau}$ du sol (rapport sol/eau =2/5) (AFES-INRA, 1988 *in* Hamouni et *al*, 2004**).

| $PH_{eau}$ | <3.5 | 3.5-5 | 5-6.5 | 6.5-7.5 | 7.5-8.7 | >8.7 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Qualificatif | Hyperacide | Très acide | Acide | Neutre | Basique | Très basique |

**3-5- Classe de salinité en fonction de la conductivité électrique (Danis, 2000).**

| **Classe** | **Désignation** | **Conductivité électrique (mmhos / cm) à 25°C** |
|---|---|---|
| **0** | Non salé | <2.5 |
| **1** | Faiblement salé | 2.5-5 |
| **2** | Moyennement salé | 5-10 |
| **3** | Salé | 10-15 |
| **4** | Fortement salé | 15-20 |
| **5** | Très fortement salé | 20-27.5 |
| **6** | Excessivement salé | 27.5-40 |
| **7** | Hyper salé | >40 |

# Annexe 4

## 4- Tableau de lecture des résultats de la galerie API 20 NE

**TABLEAU DE LECTURE**

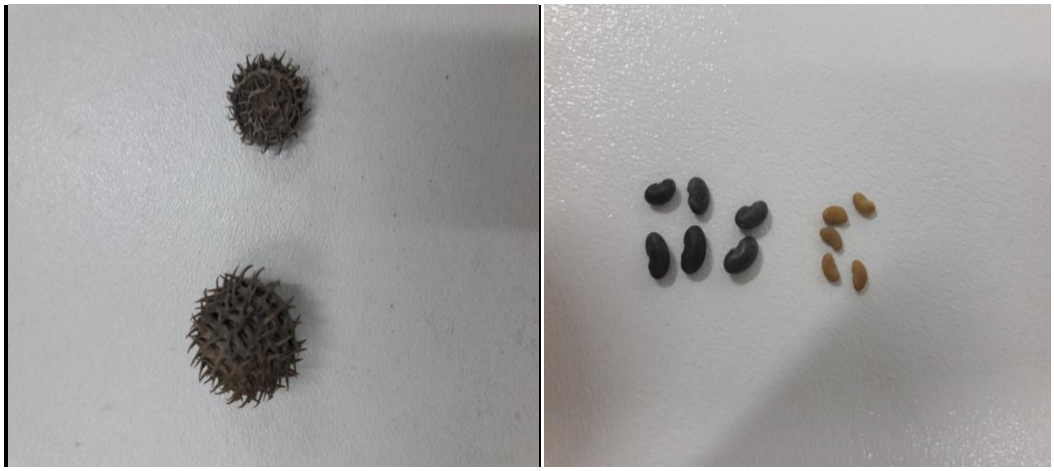
| TESTS | COMPOSANTS ACTIFS | QTE (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES | RESULTATS | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | NEGATIF | POSITIF |
| $NO_3$ | potassium nitrate | 0,136 | réduction des Nitrates en nitrites | NIT 1 + NIT 2 / 5 min incolore | rose-rouge |
| | | | réduction desNitrates en azote | Zn / 5 min rose | incolore |
| TRP | L-tryptophane | 0,2 | formation d'indole (TRyptoPhane) | JAMES / immédiat incolore vert pâle / jaune | rose |
| GLU | D-glucose | 1,92 | fermentation (GLUcose) | bleu à vert | jaune |
| ADH | L-arginine | 1,92 | Arginine DiHydrolase | jaune | orange / rose / rouge |
| URE | urée | 0,76 | UREase | jaune | orange / rose / rouge |
| ESC | esculine citrate de fer | 0,56 0,072 | hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline) | jaune | gris / marron / noir |
| GEL | gélatine (origine bovine) | 0,6 | hydrolyse (protéase) (GELatine) | pas de diffusion du pigment | diffusion du pigment noir |
| PNPG | 4-nitrophényl-βD-galactopyranoside | 0,22 | β-galactosidase (Para-NitroPhényl-ßD-Galactopyranosidase) | incolore | jaune |
| GLU | D-glucose | 1,56 | assimilation (GLUcose) | transparence | trouble |
| ARA | L-arabinose | 1,4 | assimilation (ARAbinose) | transparence | trouble |
| MNE | D-mannose | 1,4 | assimilation (MaNosE) | transparence | trouble |
| MAN | D-mannitol | 1,36 | assimilation (MANnitol) | transparence | trouble |
| NAG | N-acétyl-glucosamine | 1,28 | assimilation (N-Acétyl-Glucosamine) | transparence | trouble |
| MAL | D-maltose | 1,4 | assimilation (MALtose) | transparence | trouble |
| GNT | potassium gluconate | 1,84 | assimilation (potassium GlucoNaTe) | transparence | trouble |
| CAP | acide caprique | 0,78 | assimilation (acide CAPrique) | transparence | trouble |
| ADI | acide adipique | 1,12 | assimilation (acide ADIpique) | transparence | trouble |
| MLT | acide malique | 1,56 | assimilation (MaLaTe) | transparence | trouble |
| CIT | trisodium citrate | 2,28 | assimilation (trisodium CITrate) | transparence | trouble |
| PAC | acide phénylacétique | 0,8 | assimilation (acide PhénylACétique) | transparence | trouble |
| OX | (voir notice du test oxydase) | - | cytochrome-oxydase | (voir notice du test oxydase) | |

• Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
• Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale notamment peptone bovine/porcine.

# Annexe 5

## 5- Quelques photos des produits et matériaux utilisés

### 5-1- Photos des produits utilisés

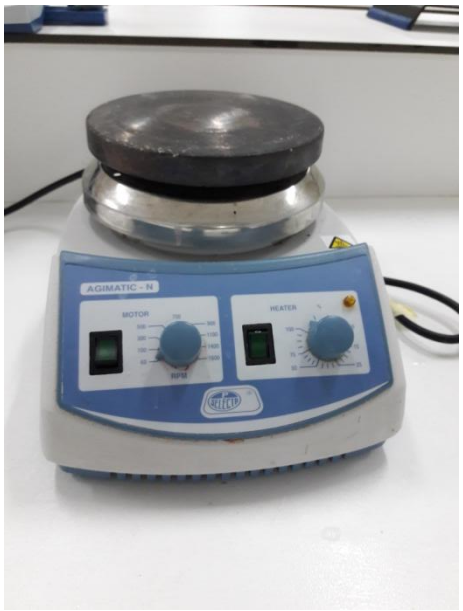


**Gousse et grains récoltés de *Medicago* étudiée**

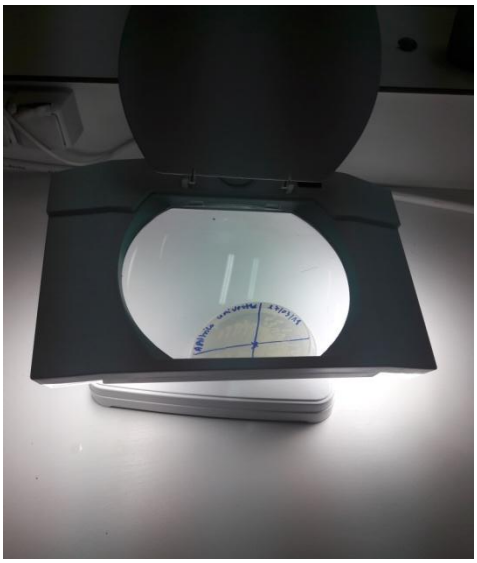
### 5-2-Photos des matériaux utilisés



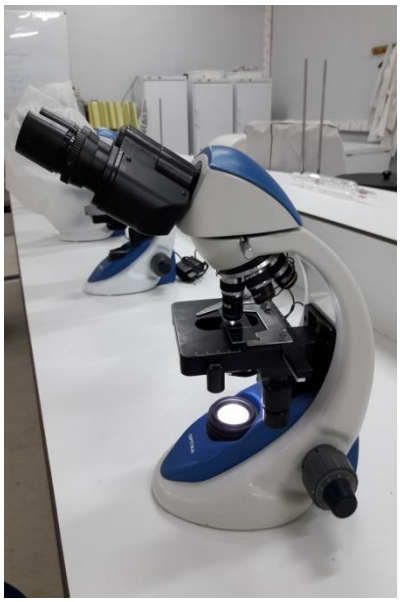

**Balance**



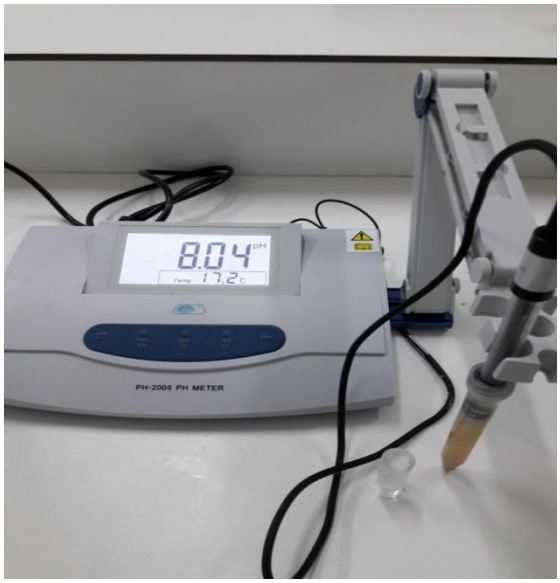

**Plaque chauffante + Agitateur magnétique**



**Loupe**



**Microscope optique**



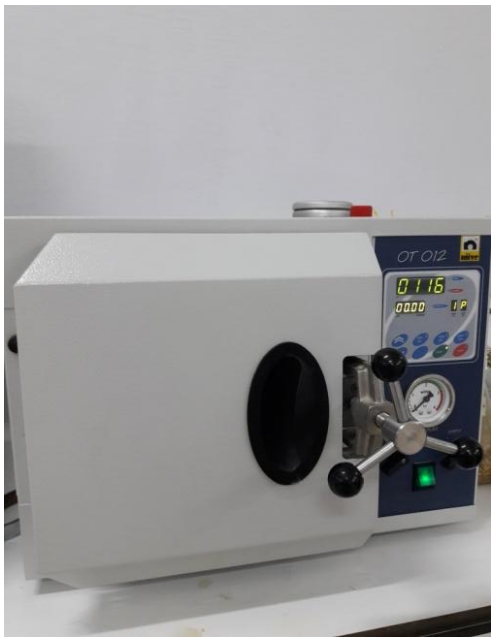

**pH-mètre**



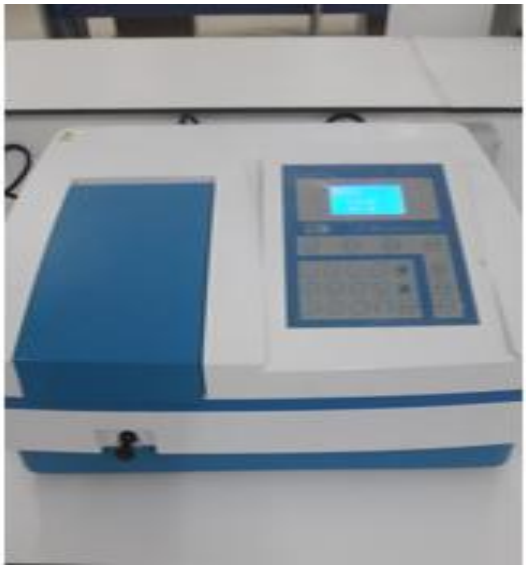

**Conductimètre**



**Etuve**



**Autoclave**



**Spectrophotomètre UV/visible**



**Bain Marie**

# Annexe 6

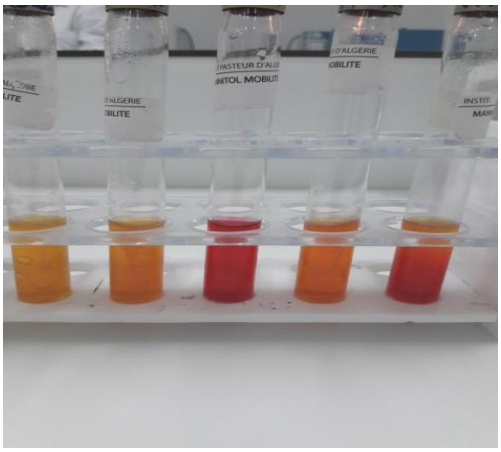
## 6- Quelques résultats obtenus

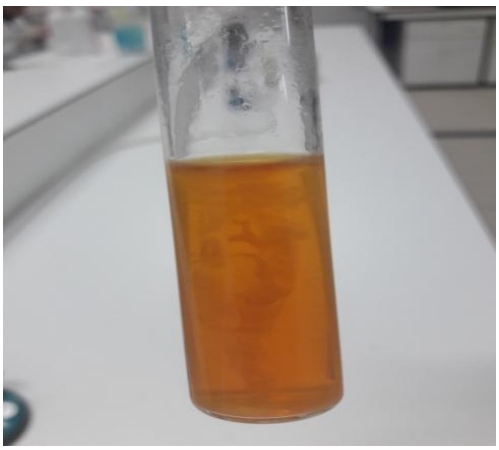
### 6-1- Résultats des galeries API20 NE



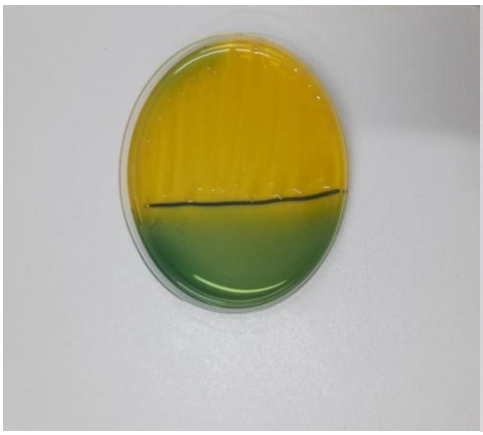


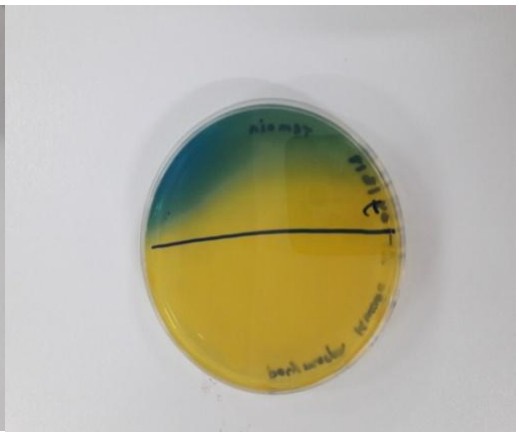

### 6-2- Résultats du test Mannitol- Mobilité- Agar



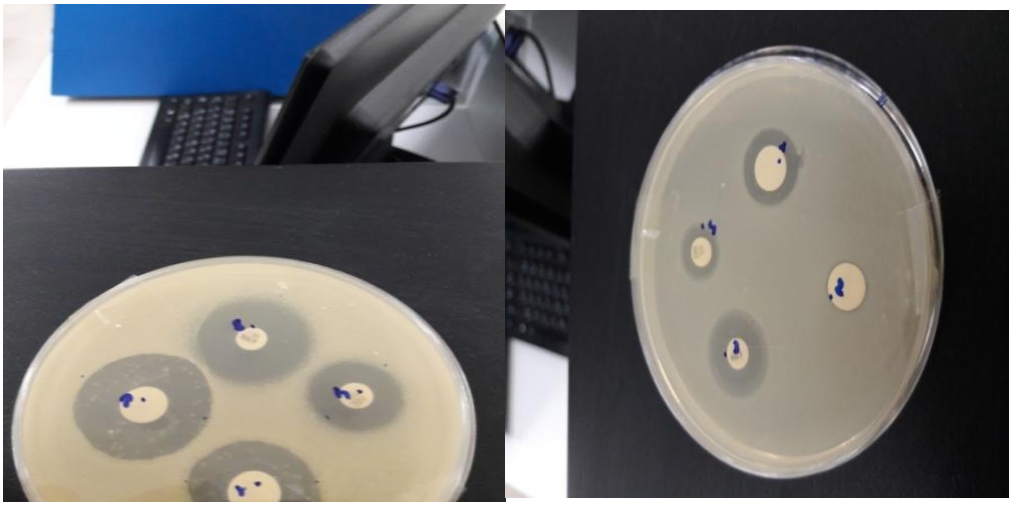


### 6-3- Résultats de culture de rizobia sur milieu BBT

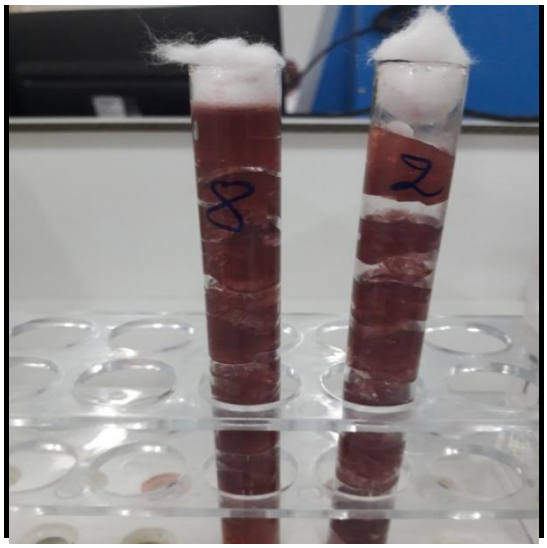




## 6- 4 - Résultats de l'antibiogramme



## 6-5-Production de gaz




## 6-6- Coloration de Gram

