



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Etres vivants

MEMOIRE présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences biologiques

Option: Biotechnologie végétale

Thème :

**Isolement et caractérisation des rhizobiums nodulant les
deux espèces végétales *Retama retamet Retama monosperma*
dans la région de Tébessa**

❖ Présenté par :

Zemmali Sara

Chabou Amira

Devant le jury :

Mr. MEKAHLIA MedNacer MCA	Université de Tébessa	Président
Mr. Dekak Ahmed MAA	Université de Tébessa	Rapporteur
Mr. FatmiHindelMAA	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance :29/05/2018

Note :..... Mention :.....



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents

Mes chères frères

Mes chères soeurs

Tous mes amies

A tous ceux qui me sont chères

Tous mes enseignantssans exception.

Sara Zemmali

AmiraChabou

Remerciements :

Avant tout nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement, à **Mr. DekakAhmed** qui nous assistées et guidées, nous le remercions d'avoir été toujours présent et nous avoir suivies régulièrement pour la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse, ces conseils précieux et ces encouragement.

Un grand merci aux membres du jury: **Mr. FatmiHindel** MAA à l'université de ChikhLaarbiTébessi- Tébessa et **Mr. MEKAHLIA Med Nacer** MCA Université de Tébessa Président à l'université de chikhlaarbiTébessi- Tébessa-pour 'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.

Nous remercions toute l'équipe du laboratoire sans exception surtout **Mr. Hamdi** pour son aide et sa gentillesse.

Nous n'oublions pas de présenter nos remerciements à tous qui ont contribué à la réalisation et l'accomplissement de ce travail.

المخلص

معظم الدراسات التي اجريت على **البكتيريا العنقودية** ركزت على تصنيف البكتيريا المتعايشة و المثبتة للنيروجين مع المزروعات البقولية بسبب الاهتمام في زيادة المردودة و في الوقت نفسه قليل من الدراسات خصت البكتيريا المتعايشة مع البقوليات البرية.

تهدف هذه الدراسة الى وصف البكتيريا المتعايشة و المعزولة من العقد الجذرية للبقوليات البرية **Retama Retama** و **Retama monosperma** التي تنمو في المناطق الشبه جافة و الجافة في شمال شرق الجزائر و ذلك بدراسة اختلافات نمو العزلات تحت ظروف بيئية مختلفة و مقارنتها بالسلالات المرجعية لتحديد موقعها التصنيفي الظاهري استنادا الى حدود التحمل و التكيف باستخدام التقنيات الاحصائية.

تم اجراء وصف ظاهري للعزلات باستخدام الاختبارات الفيزيولوجية (مستوى حموضة مختلفة تركيز كلوريد الصوديوم و اختلاف درجات الحرارة) و مصادر الكربون (استيعاب الكربوهيدرات المختلفة).

تم تحليل البيانات باستخدام ANOVA للكشف عن فروق النمو بين العزلات و البكتيريا المرجعية. بتقييم التشابه بين العزلات و البكتيريا المرجعية باستخدام التكتل الهرمي (CAH) و تحليل المكونات الاساسية لفهم العوامل المؤثرة على تكتل العزلات و البكتيريا المرجعية.

توضح دراسة العوامل اللاحيوية (مستوى حموضة مختلفة تركيز كلوريد الصوديوم و اختلاف درجات الحرارة) ان السلالات المعزولة من جذور **Retama monosperma** و **Retama Retama** اظهرت نموا معتبرا في الوسط القاعدي و تكون حساسة بشكل واضح في الوسط الحامضي كما اظهرت نموا ضعيفا في التركيزات العليا من تركيز كلوريد الصوديوم <4% مقابل السلالات المرجعية التي اظهرت نموا ثابتا بين 30° و 37° باستثناء العزلة RR21 التي لم تنمو عند درجة 30°.

تظهر اختبارات التغذية ان السلالات المرجعية تستخدم مجموعة واسعة من السكريات على عكس العزلات التي استخدمت السكروز و الغلكتوز كمصدر للكربون على غرار باقي السكريات المستخدمة.

و مع ذلك سجلت العزلات معدل تشابه يبلغ 28.38% مع السلالات المرجعية التي تجدها اقرب الى **البكتيريا العنقودية** مع وجود تنوع بيولوجي ملحوظ في مجموعتها.

:الكلمات المفتاحية

البكتيريا العنقودية. منطقة جافة و شبه جافة. التصنيف المظهري للبكتيريا. Retamaretam.R.monosperma.

Absrtract

Majority studies of rhizobia have focused on identification and systematics of symbionts nodulating crop legumes because of their interest in improving yield. However, few studies investigated the endosymbiotic nitrogen-fixing bacteria nodulating wild and spontaneous legume species, in particular in North Africa. This study aims to phenotypically characterize endosymbiotic bacteria isolated from root-nodules of a wild legume (*Retamaretam et R. monosperma*:Fabaceae) growing in semi arid and arid region of northeast Algeria. It examines growth variations of endosymbiont isolates under different environmental conditions including severe situations and compare them with reference strains (RS) to determine their phenotypic taxonomic position based on growth tolerance limits and potential adaptations, using advanced statistical techniques.

A phenotypic characterization was conducted using physiological tests (different pH levels, NaCl concentrations, and tolerance to temperature) and nutritional experiments (assimilation of different carbohydrates). Data were analyzed using ANOVA to detect growth differences between isolates and RS. Similarities between isolates and RS were assessed using agglomerative hierarchical clustering (AHC) and principal compound analyses (PCA), to understand factors influencing each group of isolates/RS.

The study of abiotic factors (NaCl, pH and temperature) shows that strains isolated from the roots of *R. retam* and *R. monosperma* and reference strains tolerate alkaline Ph and are clearly sensitive to acidic Ph, for salinity the isolates show a clear sensitivity to high concentrations of Nacl > 4%, against the reference strains showed a constant growth in the different concentrations used. most of the isolates and reference strains show optimal growth in the range of 30C ° to 37 C ° with the exception of isolate RR21 which did not develop at 30 C °. Nutritional tests show that the reference strains use a wide range of monosaccharids and disaccharids carbohydrates and in contrast to the isolates of the two host plants of the genus *Retama* showed a preference for sucrose and galactose as a carbon source. However, the isolates recorded a similarity rate of 29.38% with the reference strains that bring them closer to Rhizobia, with a remarkable biodiversity in their group.

Keywords: Rhizobia diversity; *Retamaretam and R.monosperma* (Fabaceae); phenotypic characterization of bacteria; drylands soils.

Résumé

La plupart des études sur les rhizobiums se sont concentrées sur l'identification et la systématique des symbiotes qui nodulent les légumineuses des cultures en raison de leur intérêt à améliorer le rendement. Cependant, peu d'études ont étudié les bactéries fixatrices d'azote endosymbiotiques qui nodulent des espèces de légumineuses sauvages et spontanées, en particulier en Afrique du Nord.

Cette étude vise à caractériser phénotypiquement les bactéries endosymbiotiques isolées à partir des nodosités des racines des deux légumineuse sauvage (*Retamaretam* et *R. monosperma*: Fabaceae) poussant dans la région semi-aride et aride du nord-est de l'Algérie. Examiner les variations de croissance des isolats d'endosymbiont dans différentes conditions environnementales, y compris des situations sévères et les comparer avec des souches de référence pour déterminer leur position taxonomique phénotypique basée sur des limites de tolérance de croissance et des adaptations potentielles, en utilisant des techniques statistiques avancées. Une caractérisation phénotypique a été réalisée en utilisant des tests physiologiques (différents niveaux de pH, concentrations de NaCl et tolérance à la température) et des expériences nutritionnelles (assimilation de différents glucides). Les données ont été analysées en utilisant ANOVA pour détecter les différences de croissance entre les isolats et SR. Les similitudes entre les isolats et SR ont été évaluées en utilisant la classification agglomérative hiérarchique (CAH) et les analyses des composantes principales (ACP), pour comprendre les facteurs influençant chaque groupe d'isolats / RS.

L'étude des facteurs abiotiques (NaCl, pH et température) fait ressortir que les souches isolées des racines des Légumineuses *R. retam* et *R. monosperma* et les souches de références tolèrent les Ph alcalin est elles sont clairement sensible aux Ph acides, quant a la salinité les isolats montrent une nette sensibilité aux concentrations élevées en NaCl > 4%, par contre les souches de références ont montré une croissance constante dans les différentes concentrations utilisées. la plupart des isolats et souches de références affiche une croissance optimale dans l'intervalle de 30° à 37°C à l'exception de l'isolat RR21 qui s'est pas développer à la température 30°C. Les tests nutritionnels montrent que les souches de références utilisent une large gamme de carbohydrates et préférentiellement les monosaccharides et les disaccharides contrairement aux isolats des deux plantes hôtes du genre *Retama* qui ont affiché une préférence aux Saccharose et Galactose comme source de carbone. Toutefois les isolats ont enregistré un taux de similarité de 29,38% avec les souches de référence qui les rapproche d'avantage des *Rhizobia*, avec une biodiversité marquante au sein de leur groupe.

Mots clés : Biodiversité des Rhizobia ; *Retamaretam* et *R. monosperma* (Fabaceae) ; Caractérisation phénotypique des bacteries ; Les régions arides et semi-arides

Table des Matières :

<i>Introduction</i>	01
<i>Chapitre I : Revue bibliographique</i>	
1-Généralité sur la fixation de l'Azote	05
2-l'Azote	06
3-Cycle de l'azote	06
3-1 Ammonification	07
3-2 Nitrification	07
3-3 Dénitrification	08
4-fixation biologique	08
4-1Les fixateurs libres	09
4-2Les fixateurs symbiotiques	09
4-2-1Genre Rhizobium	10
4-2-2 Le genre Bradyrhizobium	11
4-2-3 Le genre Mesorhizobium	11
4-2-4 Le genre Azorhizobium	11
4-2-5 Le genre Sinorhizobium	11
5-La symbiose	12
5-1 La symbiose (légumineuse – rhizobia)	12
5-2Les spécificités de la symbiose	12
5-3 L'infection et la nodulation	13
5-3-1 Le dialogue moléculaire	14
a-Les flavonoids	15
b-Les facteurs Nod	16
c-Les gènes nod	16
d- Les gènes de la fixation d'azote	17

1- Les gènes nif	17
2- Les gènes fix	18
5-3-2 Infection	18
5-3-3 développements de nodule	19
<i>Chapitre II : Matériels et méthodes</i>	
1- Isolement et identification des souches de rhizobium nodulant « <i>Retamamonosperma</i> » et « <i>Retamaraetam</i> »	21
1-1 Matériel végétal	21
1-1-1 Classification botanique	21
1-2 Isolement des bactéries à partir des nodules	22
1-2-1 Collecte des nodules	22
1-2-2 Isolement des Rhizobiums	24
a- Stérilisation des nodules	24
b- Ecrasement des nodules	24
c- Isolement de souches des Rhizobiums	24
2- Les caractères culturaux	25
2-1 Les milieux des cultures utilisées pour la croissance des <i>Rhizobiums</i>	25
2-1-1 Milieu liquide	25
a- Milieu YMB	25
2-1-2 Milieu solide	26
a- Milieu YMA-RC	26
b- Milieu YMA	26
3- Tests physiologiques	28
3-1 Effet de pH	28
3-2 Effet de la température	28
3-3 Effet de la salinité	28
4- Test biochimique	28
4-1 La source de carbone	28
5- Analyses statistiques	28

<i>Chapitre III : Résultats et discussion</i>	
1- Caractères culturaux	30
1-1 Croissance sur YMA. RC	30
1-2 Croissance sur YMB	30
1-3 Croissance sur YMA	31
2-Tests physiologiques	32
2-1 Effet de pH	32
2-2 Effet de la température	34
2-3 Effet de la salinité (Tolérance au NaCl)	35
3-Test biochimique	37
3-1 Utilisation des sources de carbone (sucres)	37
4-Biodiversité des isolats	39
<i>Conclusion general</i>	42
<i>Références bibliographique</i>	
<i>Annexes</i>	

Listes des figures :

Figure	Titre	Page
01	cycle de l'azote (Raven <i>et al.</i> 2007)	07
02	Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel chez <i>Medicago</i> . (http://www.isv.cnrs.gif.fr/ak/theme_symbios.html)	14
03	Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).	15
04	Structure de quelques flavonoïdes présents dans les exsudats de plantes hôtes (Bruneton, 1993)	16
05	la carte de la localisation géographique de deux zones de prélèvement (A) Bir el-Ater et (B) Tebessa (C) Hammamet (Unesco, 1960).	22
06	<i>Retamaraetam</i> . Photo «Hammamet»	23
07	<i>Retamamonosperma</i> Photo « Bir el ater»	23
08	nodule sur un pied de <i>Retamaraetam</i>	23
09	nodule de L'Espèce <i>Retamaraetam</i>	24
10	nodule de L'Espèce <i>Retama monosperma</i>	24
11	Isolement en quatre quadrants (Vincent, 1970)	25
12	Aspect morphologique d'isolat sur le milieu YMA.RC après 6 jours d'incubation 30°C	30
13	Apparition d'un trouble après incubation pendant 24h surbouillon YMB	31
14	Aspect morphologique d'isolat sur le milieu YMA	31
15	Courbes derégression de la croissance des isolats et souches de références sous l'effet d'un gradient croissant de Ph.	33
16	Courbes derégression de la croissance des isolats et souches de références sous l'effet d'un gradient croissant des concentrations en NaCl	36
17	Utilisation des sucres comme sources de carbone par les isolats et les souches de références	38

18	Projection des isolats, souches de références et paramètres étudiés sur un plan factoriel en utilisant l'analyse des composantes principale	39
19	Classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références.	40

Liste des Tableaux :

Tableau n=°	Titre	Page
01	exemples des différents types de micro-organismes libres fixateurs d'azote (Roger et <i>al</i> , 1996).	09
02	exemples des différents types de micro-organismes symbiotiques fixateurs d'azote (Roger et <i>al</i> , 1996).	10
03	Isolats et Souches de référence utilisés dans cette étude.	27
04	ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée des trois paramètres étudiés.	34
05	Effet de la température sur les isolats et les souches de référence.	35

Liste des abréviations :

A6	<i>Rhizobium sullaesp. Nov</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance
pH	Potentiel hydrique
T°	Température
NaCl	Chlorure de sodium
C	Carbone
CAH	Classification hiérarchique ascendante
CH4	Méthane
CO2	Dioxyde de carbone
DO	Densité optique
Fix	Gène fixateur d'azote
H2NO3	Acide nitrique
HgCl2	Chlorure de Mercure
M	Mol
N	Azote
N2	di azote
N2O	Oxyde d'azote
NO3	Nitrates
NH4	Ammonium
NH3	Ammoniac
Nif	Nitrogen fixation = gène de fixation d'azote
nifD	Nitrogénase molybdène-fer et chaîne protéine
nifH	Nitrogénase protéines de fer
nifA	Activateur de la transcription.
Nod	Gène de régulation de nodulation
Nod	Protéine régulatrice de nodulation
NO3	Nitrates
NO 2	Nitrites
RC	Rouge Congo

YMA	Yeast Mannitol agar
YMB	Yeast Mannitol broth
LPS	lipopolysaccharides
Rr	<i>Retamaretam</i>
Rm	<i>Retamamonosperma</i>
ACP	Analyses de composantes principes
SR	souche de reference

Introduction

Introduction

Introduction :

La rareté de l'eau caractérisant les environnements arides et semi-arides tout au long de l'année, les formes de vie, y compris les populations microbiennes, sont sélectionnées pour résister aux conditions stressantes (Zahran, 2017). Ces processus de sélection agissent à la fois sur la communauté et les populations, rendant les populations moins abondantes mais phylogénétiquement diverses, et forçant les populations à exprimer des caractéristiques leur permettant de faire face à des conditions défavorables telles que la chaleur et la sécheresse (Taketani et al. , 2017). À l'échelle mondiale, environ 60% des 150-190 millions de tonnes d'azote fixées par an sont produites par des organismes vivants. Ce processus est connu sous le nom de fixation biologique de l'azote (Hopkins, 2003). Les bactéries des nodosités des racines sont des micro-organismes du sol qui établissent une symbiose fixatrice d'azote avec divers arbres et plantes herbacées à croissance naturelle dans les terres cultivées et non cultivées. La plupart de ces plantes hôtes sont des légumineuses de la famille des légumineuses Fabaceae (alt. Leguminosae) originaire des régions arides et semi-arides (Vandamme et al., 2002, Azani et al., 2017).

Grâce à leur capacité à établir des symbioses rhizobienne et mycorhiziens, les légumineuses fixant l'azote sont des éléments clés dans la succession naturelle des écosystèmes arides ou semi-arides, car ils constituent une source fondamentale d'entrée de l'azote dans la rhizosphère (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2004; Pant et Pant, 2017). Par rapport aux hétérotrophes fixant l'azote et des bactéries associées, les symbioses rhizobium-légumineuse représentent le principal mécanisme de fixation biologique de l'azote dans différents biotopes, y compris les déserts chauds-aride (Zahran, 2017). Dans les symbioses légumineuses-rhizobium, des bactéries spécialisées du sol fixent l'azote atmosphérique dans les tissus des racines des plantes en échange de l'obtention de carbone de la plante hôte. Cependant, des souches bactériennes symbiotiques inefficaces peuvent apparaître, forçant ainsi la plante hôte à discriminer entre les microsymbiontes en sélectionnant le partenaire le plus efficace. Dans le processus de choix des partenaires, les légumineuses peuvent empêcher complètement les souches inefficaces d'établir une symbiose, ou de fournir moins de ressources nutritionnelles et sanctionnant ainsi des souches moins efficaces (Westhoek et al., 2017). Les facteurs Nod (NFs), précédemment considérés comme absolument essentiels pour cette symbiose, se sont avérés être dispensables dans des conditions particulières. De même, le récepteur NF, précédemment considéré comme uniquement impliqué dans la symbiose, est déclenché lors d'infections par des phytopathogènes. En effet, on comprend de plus en plus que l'immunité innée de la plante est un élément crucial dans l'établissement et le maintien de la symbiose (Gourion et al., 2015).

Introduction

Les rhizobiums ou bactéries qui nodulent les légumineuses (BNL) ou les bactéries du nodule racinaire (BNR) sont définies comme des bactéries fixatrices d'azote qui forment des nodules sur les plantes légumineuses. Des études de séquençage génomique *Rhizobia* ont révélé de nouveaux taxons, qui ont provoqué de profonds changements dans la taxonomie de ces bactéries. Les *Rhizobia* sont actuellement constitués de plus de 128 espèces connues appartenant à 13 genres, établissant une symbiose avec les plantes cultivées (légumineuses fourragères et à grains) et les plantes sauvages (Velázquez et al., 2017). Les symbiotes bactériens prédominent pour la plupart des espèces de légumineuses dans divers habitats à travers le monde et appartiennent principalement à la classe des protéobactéries qui comprend les genres *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Methylobacterium* (Weir, 2006) et deuxièmement aux γ -protéobactéries, bien que leur capacité de nodulation n'ait pas été clairement démontrée (Benhizia et al., 2004). *Rhizobium* (rhizobia au pluriel) peut être utilisé comme un nom commun pour les bactéries de nodulation des légumineuses ou de fixation de l'azote indépendamment du genre impliqué dans la symbiose. Cependant, la nomenclature de l'alpha-rhizobia et de la bêta-rhizobia est utilisée pour distinguer les rhizobiums associés aux alpha-protéobactéries des bêta-protéobactéries, respectivement (de Lajudie et Martinez-Romero, 2017).

La plupart des études taxonomiques des rhizobiums se sont concentrées sur les symbiotes des légumineuses cultivées d'importance agricole (de Lajudie et Martinez-Romero, 2017), mais des études récentes dans ce domaine de recherche ont étudié la diversité des bactéries en tant que plantes écologiquement importantes (Gnat et al., 2014), en particulier dans les régions arides (Taketani et al., 2017). Shamseldin et al. (2016), décrit environ 238 espèces de BNL réparties sur 18 genres. Cependant, le sujet n'est pas terminé et d'autres études sont nécessaires pour étudier les espèces végétales négligées dans les régions reculées du monde et / ou se développer dans des conditions arides telles que les déserts, y compris les zones arides d'Afrique du Nord. Ceci est dû en grande partie à notre manque de compréhension des interactions légumineuses-rhizobium (Janczarek et al., 2015). Par exemple, la description des espèces de rhizobiums ci-dessus ne représente qu'environ 23% des légumineuses, et il a été estimé qu'il y a environ 19 000 espèces de légumineuses. Espérons que la découverte et la désignation de nouvelles espèces de bactéries qui nodulent les légumineuses comestibles peuvent contribuer à améliorer la productivité et le rendement des cultures (Polhill, 1981), en particulier dans les pays en développement qui souffrent de mauvaises conditions environnementales (Shamseldin et al. 2016).

Les grandes variations climatiques Nord-Sud dans les régions nord-africaines donnent lieu à des formes de végétation très diverses qui présentent une richesse extraordinaire avec plus de 500

Introduction

espèces végétales pastorales endémiques (Quézel et Santa, 1962, Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2004). En Algérie, les espèces végétales des systèmes pastoraux et fourragers sont remarquablement diversifiées avec un fort endémisme chez les Fabacées et les Poacées (Kazi Tani et al., 2009). Les légumineuses sauvages sont d'importantes plantes fourragères et / ou de pâturage qui jouent un rôle fondamental dans le processus de restauration de l'équilibre écologique de leur environnement (Pant et Pant, 2017). Le genre *Retama* appartient à la tribu des Genisteeae de la sous famille des Faboideés et contiennent trois espèces *Retama monosperma*, *R. raetam* et *R. sphaerocarpa* (Ozenda, 1977). Ces trois espèces sont endémiques des régions méditerranéen, largement reparti sous forme de peuplements spontanés dans les dunes côtières et désertiques ayant d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques. Vu sa capacité de développer des stratégies d'adaptation morphologique, physiologique et biochimique vis à vis de différents degrés de contraintes hydriques et Par leur aptitude a établir des association avec les Rhizobia , les espèces du genre *Retama* constituent donc un élément important à prendre en compte pour introduire l'azote combiné dans les sols pauvres et arides et joue un rôle cruciale dans la formation des îles de fertilité "island of fertility" où peuvent se développer plusieurs espèces annuelles et d'autres espèces ligneuses (Pugnaire et al., 1996).

Puisque les ressources biologiques des régions arides chaudes sont peu connues et parfois complètement inexploitées (Bradai et al., 2015; Laalam et al., 2015), la présente étude se limite à la caractérisation des rhizobia nodulant les deux espèces *R. retam* et *R. monosperma* appartenant à deux étages bioclimatiques différents . Cette recherche vise à caractériser phénotypiquement une dizaines d'isolats en utilisant des tests physiologiques et des expériences nutritionnelles, comparer les taux de croissance de ces isolats et estimer la diversité des BNL en étudiant le lien entre les isolats d'étude et les souches de référence en utilisant des méthodes de regroupement basées sur la croissance de bactéries dans différentes conditions de cultures, ce qui devrait éclaircir et comprendre la niche écologique des isolats.

Chapitre I :

Revue

Bibliographique

1-Généralité sur la fixation de l'Azote :

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes. Ce nom est paradoxal, d'ailleurs : il vient du préfixe « a- » Privatif et du radical grec « ζωο » (zoot) vivant - alors que l'azote est nécessaire à la vie (Pujic et Normand, 2009).

La vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone CO₂ et du méthane CH₄ à travers les processus de la respiration et de la fermentation reliés au recyclage du carbone. La vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N) (Newton, 1998).

L'azote révèle comme l'agent principal de la croissance des végétaux (Gautier, 1993). La majeure partie de l'azote se trouve sous forme de di azote (N₂) atmosphérique (Péret, 2007), un gaz incolore et inodore. L'azote est un facteur limitant majeur des productions végétales (Renier, 2008), et agricole (Wade et Krasova, 1998).

Chez les végétaux, on le rencontre sous formes minérales ou organiques (Claude et al, 2011). Si, sous forme minérale, l'azote est représenté par les nitrates, l'ammoniac et quelquefois les nitrites, la majeure partie de cet élément est retrouvée sous forme organique dans des molécules de complexité variable (Hopkins, 2003). Nous pouvons aussi dans le cas de nutrition azotée, distinguer des organismes autotrophes et des organismes hétérotrophes.

Les premières cités sont capables d'exploiter l'azote inorganique, tandis que les organismes hétérotrophes sont dépendants de l'azote organique (Nultsch, 1998).

En effet, l'azote s'unit, dans les feuilles et dans les racines (Soltner, 2005), aux acides dérivés des glucides avec lesquels il forme les acides aminés, éléments constructifs des protéines; constituant essentiel du cytoplasme et de ses inclusions (chloroplastes, mitochondries, ADN du noyau...) (Madigan et al, 2007), aux acides nucléiques, enzymes et les cofacteurs (Tortora et al, 2003). La transformation de l'azote atmosphérique en ammoniac repose sur le pouvoir des bactéries à réduire le di azote (Hopkins, 2003).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone (Calvet, 2003), stimule le développement et l'activité racinaire, favorise ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Bado, 2003), il est essentiel pour la synthèse des 3 enzymes de la photosynthèse (Lamaze et col, 1990). Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO₃⁻) et d'ammonium (NH₄⁺) (Hageman, 1984). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Bado, 2003).

La concentration requise en azote pour une croissance optimale des plantes varie entre 2 et 7% sur une base de matière sèche (Parent, 1999). Et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle

végétatif (floraison), L'insuffisance ou la carence de cet élément se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (Tourte et *al*, 2005). Les feuilles matures entrent sénescence puisque leur azote est redirigé vers les feuilles croissantes. S'il y a excès, l'élongation des tiges est favorisée au détriment de la maturation et le développement racinaire est inhibé, pouvant mener à un approvisionnement inadéquat en eau et en éléments minéraux (Parent, 1999).

2- l'azote :

C'est l'élément essentiel pour tous les formes de vie découvertes sur notre plante. On le rencontre sous formes minérales ou organiques. Si se forme minérale, l'azote est représenté par les nitrates, l'ammoniac et quelquefois les nitrites, la majeure partie de cet élément est retrouvée sous forme organique dans des molécules de complexité variable (Hopkins, 2003). L'azote est cependant abondant dans l'atmosphère que contient 78% de diazote (N_2) (Renier, 2008), un gaz incolore et inodore (Hopkins, 2003). L'azote est un facteur limitant majeur des productions végétales (Renier, 2008), et agricole (wade et krasova, 1998) .

Par rapport à leur masse de la matière sèche, l'azote est le 4ème élément nutritif des plantes, c'est un constituant essentiel des protéines, des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et d'une foule des composés primaires et secondaires des plantes (Hopkins, 2003).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorise ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Les plantes assimilent l'azote sous forme NO_3^- et NH_4^+ . L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions de milieu (bado, 2002).

3-Cycle d'azote :

La fixation biologique de l'azote est l'une des fonctions accessoires les plus répandues dans le monde vivant (Renier, 2008). Le terme cycle d'azote désigne l'ensemble des transformations que subit l'azote dans la biosphère (Dommergue, 1970), est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et soumis de nouveau dans la nature (Torche, 2006). Les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé Par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-) ou, parfois, d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (Saoudi, 2008).

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des microorganismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines Pour fabriquer de la matière organique azotée ; et le cycle recommence

(Saoudi, 2008), Les trois principales étapes de ce cycle sont (Figure1) : l'ammonification, la nitrification et l'assimilation (Raven *et al*, 2007).

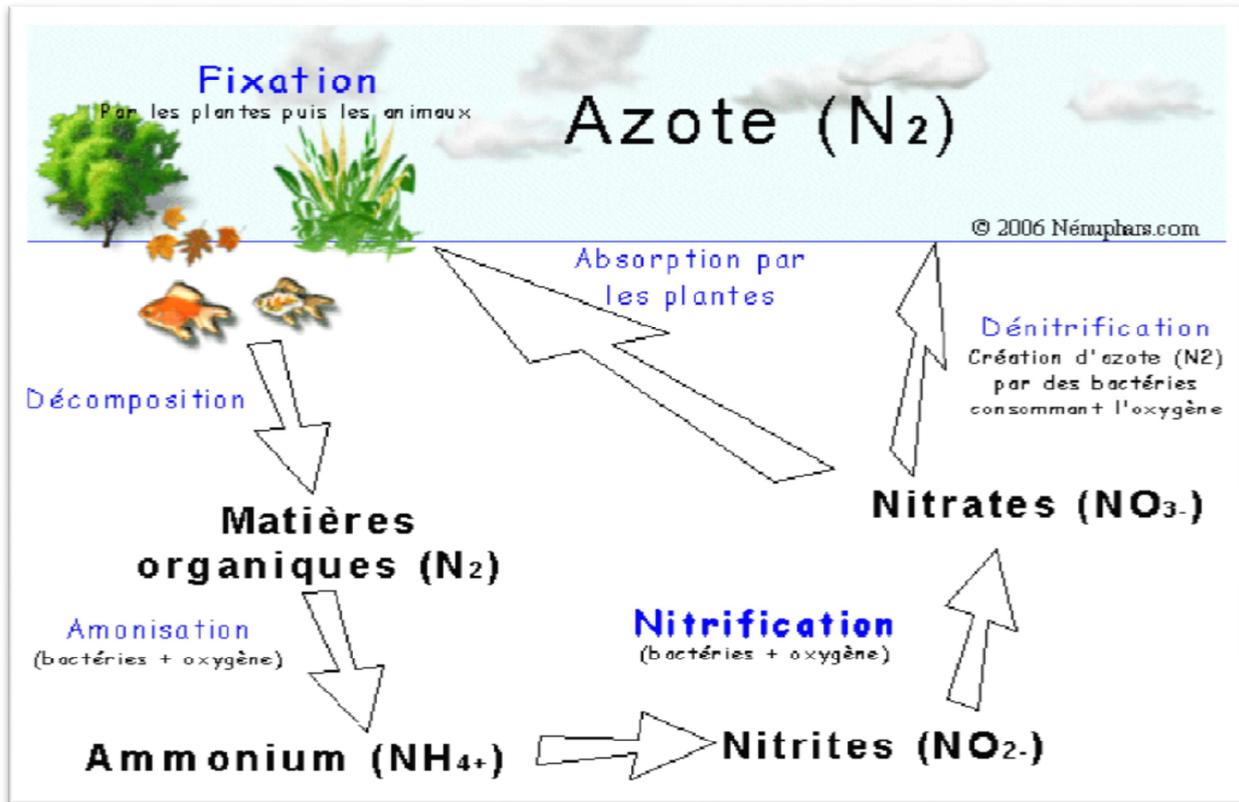


Figure1 : cycle de l'azote (Raven et al. 2007)

3-1 Ammonification :

Un très grand nombre des bactéries et des champignons sont capable de transformer l'azote de la matière organique (Raven *et al*, 2007). L'ammonification est le processus inverse de la réaction d'assimilation de l'ammonium, soit la transformation d'azote organique en NH_4^+ cette réaction est essentiellement assurée par les bactéries hétérotrophes qui utilisent l'oxydation du carbone organique en CO_2 comme source d'énergie et relèguent l'azote sous forme NH_4^+ (Quéguiner,2005).

3-2 la nitrification :

Chez la majorité des plantes supérieures, la source d'azote est représentée par le nitrate contenu dans les sols, venant soit de la minéralisation par décomposition des matières organiques par l'apport de nitrates par l'intermédiaire d'engrais azotés (Chabbi ,2010),cette réaction passe par deux étapes, la production de nitrites (NO_2^-) et de nitrates (NO_3^-) par oxydation des ions ammonium (NH_4^+). Au cours de la première étape de cette réaction, le genre *Nitrosomonas* oxyde les ions ammonium en nitrites. Dans la deuxième étape, des microorganismes dont le genre *Nitrobacter*, oxydent les nitrites en nitrates (Raven *et al*, 2007).

3-3 La dénitrification :

Le processus bactérien de dénitrification est réalisé en condition d'anoxie par une grande variété de germes hétérotrophes anaérobies facultatifs (Teissier, 2001) , au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux N_2 et l'oxyde d'azote NO, qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al* ; 2007). C'est la principale voie de formation biologique de N_2 . De nombreux micro-organismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Pracoccus*, *Pseudomonas*. (Chabbi, 2010).

4-Fixation biologique d'azote :

La fixation biologique de l'azote est une réduction enzymatique de N_2 (azote Moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH_3) ; Cette forme de N combiné, appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction De fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. Dans le système biologique fixateur de N_2 les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N_2 et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères (pression de 250- 1.000 atm de N_2 et température de 450°C (Saoudi, 2008) , Mais, seul un nombre réduit de genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphère (Bado, 2002), Pour certains groupes de végétaux, l'association avec ce type de bactérie leur permet d'améliorer leur nutrition azoté (Svistoonoff ,2003) .

La fixation biologique de N_2 est une activité microbienne importante Pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. Dans les écosystèmes cultivés, la fixation de N_2 et les apports d'engrais azoté constituent les apports pouvant compenser les exportations par les récoltes et les pertes dues à des activités microbiennes (volatilisation et dénitrification). En absence de fertilisation, la fixation de N_2 est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (Roger P, 1996).

Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote parce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée. La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes, simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Hopkin, 2003).

4-1 Les fixateurs libres :

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophe (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*) (Sbihi, 2008).

La majorité des bactéries libres fixatrices d'azote sont capables de fixer des grandes quantités de cet élément en laboratoire. Toutefois, dans le sol la réduction de l'azote en ammoniac est limitée par la quantité de glucide disponible. Le rôle de ces bactéries dans la fixation biologique de l'azote dans les prairies, les forêts et la toundra arctique est néanmoins considérable (Tortora *et al.*, 2003).

Tableau1 : exemples des différents types de micro-organismes libres fixateurs d'azote (Roger *et al.*, 1996).

Micro-organismes libres				
Aérobies	Hétérotrophe	<i>Azotobacter spp ; Klebstella pneumontae</i>		
		<i>Beijerinckia indica ; Azospirillum lipoferum</i>		
	Phototrophe : Cyanobactéries	<i>Hétérocystées</i>	<i>Nostoc ; Anabaen ; Calothrix ; Tolypothrix</i>	
		<i>Homocystées</i>	Trichodesmium ; Oscillatoria	
		<i>Unicellulaire</i>	<i>Gloeothece ; Gloeocapsa</i>	
Anaérobies	Hétérotrophe	<i>Clostridium pasteurianum ; Deulfovibrio vulgarus</i>		
		<i>Desulfotomaculum spp ; Methanobacterium spp</i>		
	Phototrophe	<i>Rhodospirillum rubrum ; Rhodobacter capsulata</i>		
		<i>Chromatium vinosum</i>		

4-2 Les fixateurs symbiotiques :

Les espèces fixatrices d'azote réellement symbiotique sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les rhizobiums des actinomycètes (*Frankia*) bactérie filamenteuse (Hopkins, 1999), et des cyanobactéries (Pelmont, 1995). Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent les associations bien connues entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses. Quelques-unes de ces associations. Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote.

La forme la plus commune d'association symbiotique que provoque la formation sur la de la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules ;(Hopkins, 1999).

La symbiote est une bactérie appartenant à l'un des genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium*. *Mesorhizobium* curieusement on ne connaît qu'un seul genre n'appartenant pas aux légumineuses : *Parasponia* (famille des *Ulmaceae*), qui forme des nodules avec un symbiote du genre rhizobium.(Hopkins, 1999).

Tableau02: exemples des différents types de micro-organismes symbiotiques fixateurs d'azote (Roger et al, 1996).

Micro-organisme symbiotique		
Légumineuses	A nodules racinaires	<i>Rhizobium meliloto</i>
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	A nodules caulinaires	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
Symbiose actinorhiziennes		<i>Franki</i>
Symbiose à cyanobactéries	Azolla	<i>Anabaena azollae</i>
	Cycas	<i>Anabaena cycadeae</i>
	Lichens	<i>Nostoc</i>
	Mousses et hépatique	<i>Nostoc</i>

4-2-1 Genre *Rhizobium* :

Le genre *rhizobium* regroupe des bactéries dites à croissance rapide (temps de génération inférieur à six heures), chimio-organotrophes, aérobies ou micro-aérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm), gram négatifs, non sporulant, on distingue deux formes : la forme végétative, et la forme bactéroïde (Perry et al, 2004; Somasegaran et Hoben, 1994). et comporte quatre espèces définies : *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium tropici*, et *rhizobium etli* (Segovia et al, 1993). Ce genre infecte principalement les légumineuses des régions tempérées (Blandreau, 1996).

Parmi les proches parents des *Rhizobium*, il faut citer diverses protéobactéries de la classe α telles que *Sphingomonas* et surtout, *Azotspirillum*; dans la classe β on trouve des *Alcaligenes*, des *Herbaspirillum* et des *Burkholderia* (Sivistoonoff, 2003); la classe γ est représentée par diverses entérobactéries (Blandreau, 1996).

4-2-2 Le genre *Bradyrhizobium* :

L'identification de souches à croissance lente remonte à 1932 mais leur classification en un seul genre *Bradyrhizobium* a été établie par Jordan en 1982 (El-Hilali, 2006). Depuis sa caractérisation ce genre ne comprenait qu'une seule espèce définie *Bradyrhizobium japonicum* nodulant le soja (*Glycine max*) et le siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Récemment deux nouvelles espèces, *Bradyrhizobium elkanii* (Kluykendale et al, 1992) et *Bradyrhizobium liaoningensis* (Xu et al, 1995) ont été définies. Les bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* infectent de nombreuses légumineuses tropicales

La caractérisation de différentes souches de *Bradyrhizobium* par la comparaison de plusieurs techniques moléculaires a révélé l'existence de 11 génotypes différents dont trois correspondent aux souches reconnues, alors que les 8 génotypes restants sont très distincts (Dommergues et al, 1998).

4-2-3 Le genre *Mesorhizobium* :

Les *Rhizobium* étant très hétérogène, plusieurs branches divergentes ont été taxonomiquement identifiées. Donc la description d'un troisième genre qui a été appelé *Mesorhizobium* et où seront regroupées au moins six espèces : *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium mediterraneum* (De lajudie et al, 1994), *Mesorhizobium tianshanense*, *Mesorhizobium plurifarum*, *Mesorhizobium huakii* (Maougal, 2004), *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al, 1982)

4-2-4 Le genre *Azorhizobium* :

Comprend une seule espèce définie, *Azorhizobium caulinodans*, qui nodule les tiges et les racines de *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al, 1988). Le genre *Azorhizobium* est taxonomiquement éloigné des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium*, mais extrêmement proche des bactéries aquatiques appartenant aux genres *Xanthobacter* et *Aquabacter*. Ainsi, les *Azorhizobium* seraient des bactéries aquatiques ayant reçu par conjugaison avec des *Rhizobium* du sol (peut être des *Sinorhizobium*) des gènes de nodulation, et qui seraient devenus spécifiques de la nodulation de tige de la légumineuse aquatique *Sesbania rostrata*. Contrairement aux bactéries du genre *Sinorhizobium* qui forment des nodules effectifs sur les racines de nombreuses espèces de *Sesbania*, les *Azorhizobium* ne fixent l'azote qu'avec *Sesbania rostrata* (Wade, 1998).

4-2-5 Le genre *Sinorhizobium* :

Le genre de *Sinorhizobium* a été décrit par Chen et al., (1988). Toutefois quelques études récentes montrent ce *Sinorhizobium* et le genre *Ensifer* (Casida, 1982) appartient à un taxon simple. *Ensifer* est le synonyme hétérotypique plus tôt (il a été appelé d'abord) et prend ainsi la priorité (Young, 2003). Ceci signifie que toutes les espèces de *Sinorhizobium* doivent être retirées comme espèces d'*Ensifer* selon le code bactériologique que la taxonomie de ce genre a été vérifiée dans 2007 par Martens et al.

qui rajoute l'espèce *S. mexicanus* à la liste des espèces étudiées. Ce genre se compose actuellement de 15 espèces (Lortet et *al.*, 1996).

5-La symbiose :

Elle permet à deux espèces différentes de vivre ensemble, chacun tirant profit de l'autre. La symbiose est souvent une relation régulière et obligatoire entre des partenaires bien spécifiques (Sablonniere, 2006 ; Brogton, 2000). Il est y à deux types de la symbiose Endo- et Ecto Selon la position relative des partenaires, on parlera d'endo- ou ecto-symbiose. Si le symbiote se trouve à l'extérieur de l'hôte, on parle d'ecto-symbiose ; sinon, on parle d'endosymbiose. L'endosymbiose peut être intra- ou extra-cellulaire (Brogton, 2000).

5-1 La symbiose (*Rhizobium*- légumineuses) :

lors de la symbiose *Rhizobium*- légumineuses, la fixation de l'azote atmosphérique s'effectue au niveau de la rhizosphère : volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes qui se caractérise par des compositions chimiques et biologiques différentes de celles du sol qui n'est pas sous l'influence directe des racines (Alami et *al.*, 1999) et par la présence des exsudats racinaires (Moënnelocoz Yvan et *al.*, 2005). La légumineuse hôte fournit l'énergie nécessaire à cette fixation en capturant l'énergie du soleil par le phénomène de la photosynthèse. Le rendement global de cette symbiose complexe dépend donc du rendement de chacun des deux organismes associés. Leurs caractéristiques génétiques revêtent donc une très grande importance, de même que la façon dont s'exerce leur interaction. En outre, tout facteur nutritionnel ou environnemental influant soit sur la bactérie, soit sur la légumineuse, se répercute sur le rendement global de la symbiose. La complexité de cette dernière impose

Absolument que l'on effectue des recherches sur le terrain, où tous les facteurs peuvent être pris en considération (Danso et Esker, 1981).

5-2 Spécificité de la symbiose :

La symbiose légumineuse – *Rhizobium* est très spécifique, un *Rhizobium* donné n'est capable d'effectuer une symbiose fixatrice d'azote que si l'autre partenaire appartient au son spectre d'hôte (Dreyfus et *col.*, 1988). Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire, c'est à dire un échange de signaux flavonoïdes excrétés par la racine de la plante hôte. Chez les bactéries, les gènes de la nodulation (gène *nod*) sont induits par le signal flavonoïde, et cette induction mène à la production et à l'excrétion des signaux de nodulation, les facteurs Nod.

La structure de base des lipochitoooligosaccharides est modifiée chez les différentes espèces de *Rhizobium*. Donc, la structure spécifique des facteurs Nod produits par chaque espèce de *Rhizobium* sert comme signal permettant la reconnaissance de la présence de la bactérie par sa plante hôte (Simms., 2002).

5-3 L'infection et la nodulation :

En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation (Anonyme e, 2004), Le développement du nodule est un processus complexe impliquant la différenciation de plusieurs types de cellules spécialisées comme résultat d'une série d'échanges de signaux entre la plante et les partenaires microbiens (Brewin *et al*, 1992).

La formation du nodule peut se résumer en trois étapes clés : **le dialogue moléculaire**, se mettant en place entre les deux partenaires symbiotiques, **l'infection**, correspondant à l'entrée des bactéries libres dans la légumineuse, et **le développement** proprement dit du nodule (Renier, 2008). (Figure 2).

En effet, les légumineuses peuvent en général s'alimenter en azote par deux voies :

-Assimiler l'azote du sol : l'absorption des nitrates (engrais ou matière organique nitrifiée) se fait par les racines. Ces nitrates sont réduits par la nitrate réductase, enzyme essentiellement située dans les feuilles, pour donner de l'ammoniac qui participe ensuite à la formation des acides aminés et des protéines. Toutes les légumineuses possèdent cette enzyme. (Henzell et Wallis, 1977).

-Fixer l'azote de l'air : l'azote de l'atmosphère pénètre par le sol jusqu'aux nodosités où il est réduit en ammoniac par la nitrogénase des bactéroïdes de rhizobium. Cet ammoniac est ensuite incorporé à des chaînes carbonées pour donner des acides aminés et protéines comme dans le cas précédent. Seules les légumineuses portant des nodosités fixatrices. (Henzell et Wallis, 1977).

Bien que la symbiose Légumineuse-Rhizobium, soit une interaction hautement adaptée et régulée, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente. En effet, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment de manière autonome et chaque nouvelle génération de plante doit être infectée par de nouvelles bactéries. Il est cependant intéressant de noter que seules les bactéries différenciées (bactéroïdes) fixent l'azote ; en culture libre, les bactéries n'expriment pas la nitrogénase (Kneip *et al.*, 2007).

L'interaction Rhizobium / Légumineuse est caractérisée par la spécificité avec laquelle, elle s'établit. En général, chaque Légumineuse ne peut être infectée que par un nombre restreint de souches de rhizobia et réciproquement, chaque souche de rhizobia ne peut infecter qu'un nombre limité de genres de Légumineuses. (Kneip *et al.*, 2007).

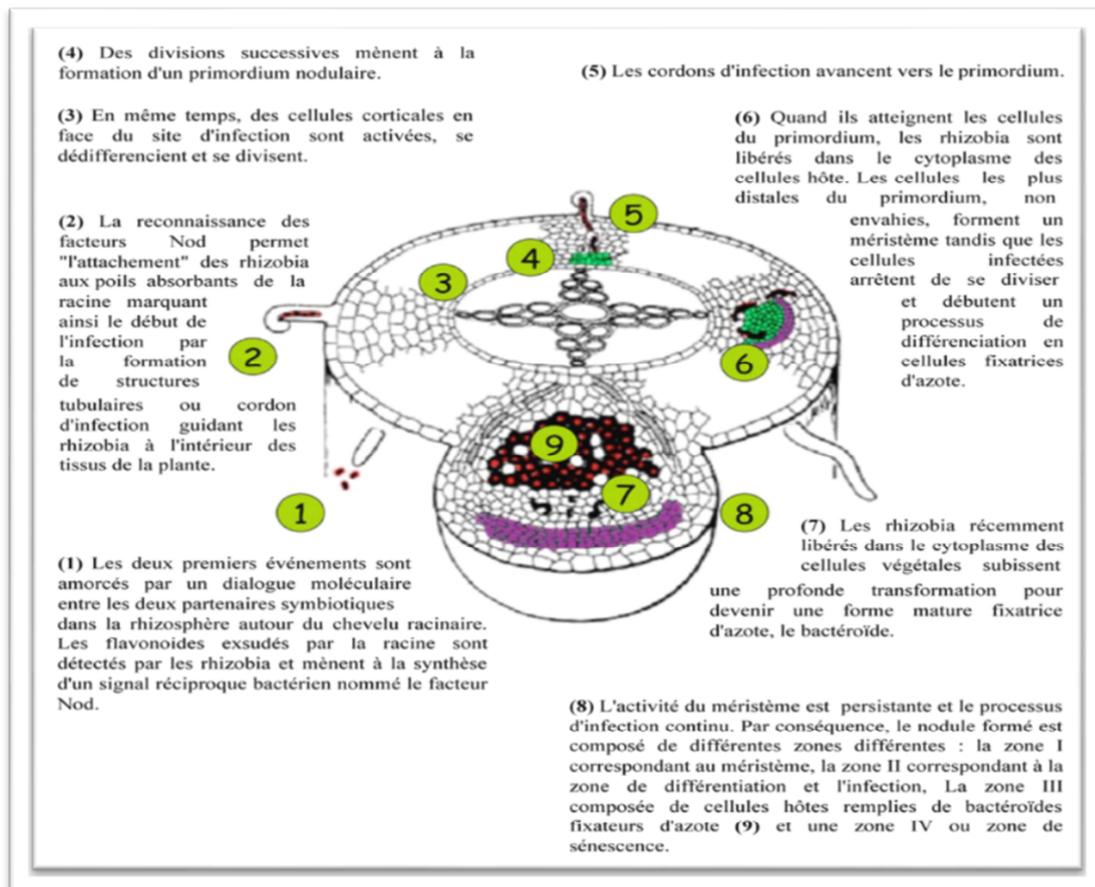


Figure 2 : Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel chez *Medicago*. (http://www.isv.cnrs-gif.fr/ak/theme_symbios.html)

5-3-1 Le dialogue moléculaire :

Les interactions symbiotiques sont contrôlées par des échanges de signaux entre les deux partenaires (Figure3). Les récents progrès dans la connaissance des mécanismes aboutissant à l'infection et à la formation d'un nodule ont montré qu'un dialogue moléculaire était à l'origine de la reconnaissance entre la bactérie et sa plante hôte. Les racines de la plante excretent dans la rhizosphère des composés phénoliques généralement de type flavonoïdes, agissant comme inducteurs des gènes *nod* bactériens impliqués dans la nodulation, par l'intermédiaire de protéines régulatrices *nod D* qui sont des activateurs transcriptionnels de ces gènes (Peters et Verma, 1990; Fischer *et al.*, 1992).

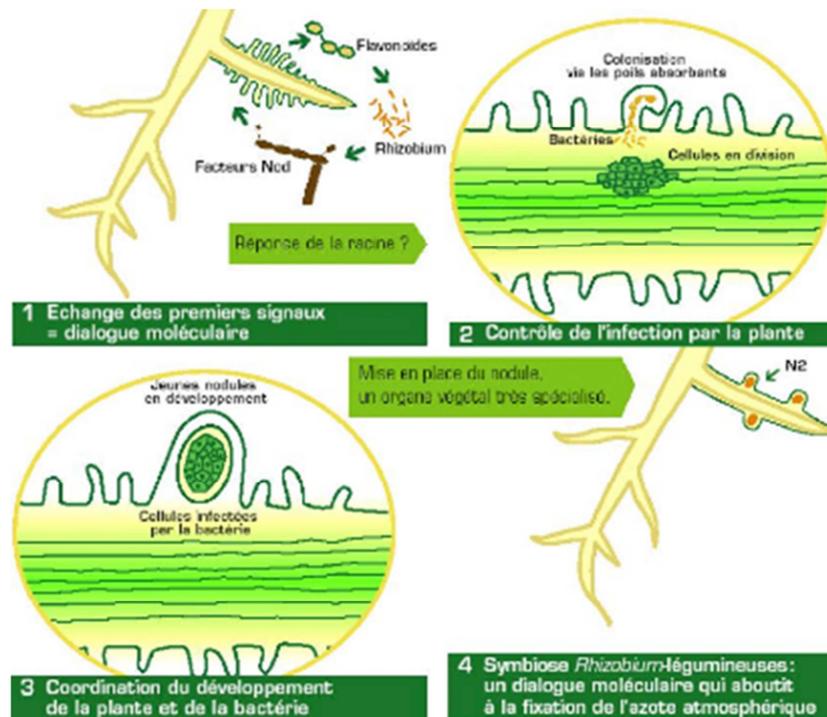


Figure3 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).

a-Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés principalement excrétés au niveau des pointes racinaires. Ils constituent les premiers signaux échangés entre la plante et la bactérie. Chaque plante produit une mixture de flavonoïdes (Figure 4) qui peut varier selon son état physiologique. Ces sont des dérivés du 2-phenyl-1,4-benzopyrone avec une structure définie par deux anneaux aromatiques et un cycle propane ou pyrène. Selon les modifications de cette structure, plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes, parmi lesquels les isoflavonoïdes sont spécifiques des Légumineuses (Brenic et Winans, 2005). Certains de ces flavonoïdes ont la capacité d'induire les gènes *nod* des bactéries requis pour la nodulation. Ces capacités varient selon les flavonoïdes et selon les rhizobia. Certains flavonoïdes peuvent même inhiber l'expression des gènes *nod*. (Brenic et Winans, 2005). Interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les bactéries du groupe *Rhizobium*. Ces exsudats qui sont émis par les cellules des racines de légumineuses vont attirer la bactérie, qui en retour relâche des lipopolysaccharides (LPS) provenant de sa membrane. Ces LPS ont une structure antigénique spécifique, reconnue par la plante, la bactérie peut lyser la paroi de la cellule végétale et s'y introduire. Il y a formation d'un cordon infectieux, qui se ramifie au fur et à mesure de son passage dans d'autres cellules végétales (Saoudi, 2008).

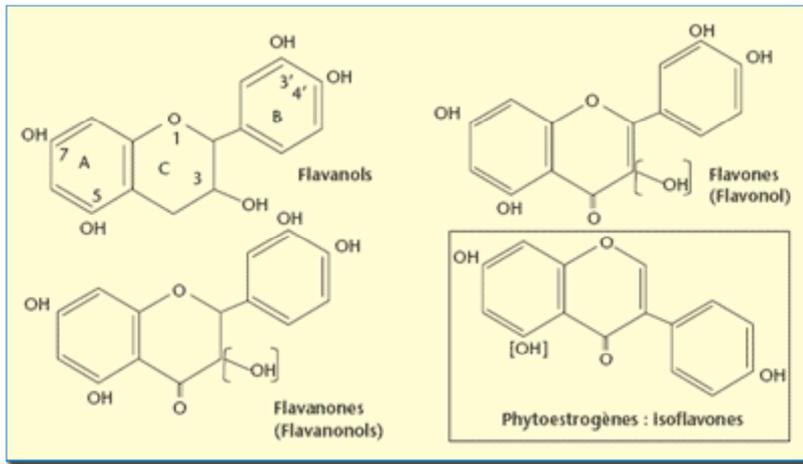


Figure 4: Structure de quelques flavonoïdes présents dans les exsudats de plantes hôtes (Bruneton, 1993).

b- Facteur *nod* :

Tous les facteurs *nod* issus des rhizobia ont la même structure chimique basique, consistant en un squelette oligomérique de trois à cinq résidus de *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) liés en *B*-1,4 et au niveau de l'extrémité non réductrice du squelette la présence d'une chaîne d'acide gras (de 16 à 18 atomes de carbone) généralement saturée et plus rarement insaturée, Les facteurs *nod* diffèrent selon les espèces par les groupements (dits décorations ou substitutions) accrochés à leur chaîne oligosaccharidique, la longueur de la chaîne et le degré de saturation de la chaîne d'acides gras.

La synthèse du squelette d'oligomères de chitine des facteurs *nod* requiert l'activité de trois enzymes codées par les gènes *nodABC*, présents chez tous les rhizobia caractérisés jusqu'ici exceptés deux souches de *Bradyrhizobium* (Giraud et al., 2007). Le gène *nodC* codant pour une *N*-acetyl glucosamyltransférase permet l'élongation de la chaîne, puis le gène *nodB* codant pour une *N*-de acetylase entraîne la suppression du résidu *N*-acetyl de l'extrémité de la chaîne ce qui permet au produit du gène *nodA*, une *N*-acyl-transférase d'y ajouter une chaîne d'acides gras. Ces gènes sont nécessaires à la synthèse des facteurs *nod*, l'inactivation de l'un d'entre eux entraîne une incapacité à noduler toute plante (Perret et al., 2000).

c- Les gènes *Nod* :

Les gènes de nodulation ou gènes *nod* incluent des gènes communs et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hsn*) (Broughtho et al., 2000 ; Spaink, 2000). En 2000, au total 13 gènes de nodulation étaient déjà connus. Il s'agit des opérons *nod ABCIJ*, *nod FEL*, *nod MNT*, du *nod O* et du *nod D* (Perret et al., 2000).

Le gène *nod D* négocie les premières étapes de la nodulation chez la bactérie. Il est par conséquent le premier gène *nod* transcrit lors du processus de nodulation. Sa transcription se fait de manière constitutive (Geurts et Bissed, 2002) et l'activation de son produit, le *nod D*, est réalisée par les flavonoïdes qui sont des molécules émises par les racines des légumineuses. Une fois activé, le *nod D* se lie aux sites régulateurs des opérons porteurs des autres gènes *nod* et active leur transcription. La Figure ci-après illustre ce rôle régulateur du *nod D* et présente les autres gènes de nodulation.

Les gènes *nod* communs (*nod A*, *B*, *C*, *I* et *J*) sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse (*curling*) et inciter les cellules végétales à se diviser (Brewin *et al.*, 1992 ; Pelmont, 1995).

Les flavonoïdes compatibles activent la protéine *nod D*, qui est un senseur de l'environnement et un activateur des gènes *nod*. Les protéines *nod D* synthétisées vont se lier à la *nod*-box, lieu de régulation des gènes *nod A*, *B* et *C*. Avec la coopération des flavonoïdes, les protéines *nod D* vont pouvoir promouvoir l'expression des gènes *nod A*, *B* et *C* : les protéines *nod D* ont un site de liaison pour les flavonoïdes ; une fois les flavonoïdes liées aux protéines *nod D*, ces dernières, liées à la *nod*-box, sont capable d'induire la transcription de ces gènes. Les vingt polymérases se fixent alors sur le promoteur de ces gènes. (Brewin *et al.*, 1992 ; Pelmont, 1995). ces derniers sont transcrits, et les protéines *nod A*, *B* et *C* sont traduites.(Saoudi, 2008).

d-Les gènes de la fixation :

1-Les gènes *nif* :

La transcription des gènes de la fixation de l'azote (gènes *nif*) n'a lieu que dans des conditions physiologiques bien définies qui dépendent des propriétés des bactéries concernées. Les signaux majeurs intervenant dans cette régulation sont l'ammoniaque et l'oxygène. Plus de vingt gènes *nif* organisés en opérons interviennent dans la synthèse et le fonctionnement du complexe nitrogénase, dont les gènes *nifHDK* qui représentent les gènes de structure (*nifH* code pour la réductase, *nifDK* pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo). La biosynthèse du cofacteur FeMo requiert l'assemblage des produits des gènes *nifB*, *nifE* et *nifN*. La majorité des autres gènes jouent un rôle dans la synthèse et la maturation des groupements prosthétiques ; certains interviennent dans la synthèse de transporteurs d'électrons et de protéines de régulation. Bien que très conservés chez les micro-organismes fixateurs d'azote, les gènes *nif* diffèrent au niveau de leur localisation : soit plasmidique ou chromosomique ; de leur organisation et de la régulation de leur expression (Fischer, 1994).

2-Les gènes *fix* :

gènes *fix* sont des gènes additionnels, propres aux fixateurs symbiotiques et impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules lors de la fixation symbiotique azotée (Brewin *et al.*, 1992 ; Hopkins, 2003 ; Noel, 2009). Certains de ces gènes (*fix L*, *fix J*) sont des régulateurs de la synthèse du gène *nif A*, intervenant dans la régulation de la synthèse de la nitrogénase (Noel, 2009). Le système de régulation *fixLJ* joue un rôle très important dans l'expression des gènes *nif* et *fix* et particulièrement dans la régulation du gène *nifA* (David *et al.*, 1988). La protéine régulatrice *fixL*, située sur la membrane des bactéroïdes, est sensible à l'oxygène. En condition d'anoxie, *fixL* s'autophosphoryle et la protéine *fixJ* est phosphorylée à son tour, par utilisation de *fixL*-Phosphate comme donneur. Ceci permet l'activation de la transcription des différents gènes et particulièrement celle de *nifA*, qui code pour un activateur de transcription spécifique à l'opéron *nif*. Il existe également une protéine de régulation négative (*nifL*) avec une activité antagoniste à celle de *nifA*, qui inhibe la synthèse des gènes *nif* en condition aérobie (Spaink *et al.*, 1998).

5-3-2 L'infection :

L'infection débute juste après que le rhizobium s'adsorbe par chimiotactisme au poil racinaire (Hirsch, 1992). (Figure 2) Après avoir pénétration, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection (Hopkins, 1999).

Au bout du cordon d'infection, les bactéries deviennent des bactéroïdes (augmentation de leur taille et déformation) (Selosse, 2006), alors que les tissus de la plante développent les nodules. Des échanges de matériaux carbonés et azotés s'établissent alors entre les deux parties (Pelmout, 1993).

Il existe trois modalités d'infection que distincts. Par voie intracellulaire: dans ce cas, la pénétration de bactérie dans le poil absorbant provoque la formation d'un Cordon d'infection contenant les bactéries disposées en file, puis les bactéries sont libérés dans les cellules de l'hôte suivant un mécanisme se rapprochant de l'endocytose. Les bactéries subissent alors des transformations morphologiques et leur enzyme d'assimilation de l'ammonium sont réprimées et ils commencent à fixer N₂, ou bien l'infection par voie inter cellulaire. Dans ce cas, l'infection s'effectue directement par pénétration intercellulaire au niveau des cellules du rhizoderme (appelé epiderm en anglais) (Dommergues *et al.*, 1998).

5-3-3 Le développement des nodules :

Le processus d'infection intracellulaire, impliquant l'infection de poil racinaire. le première signe du processus symbiotique est une déformation des poils absorbants, induite par des molécules de nature inconnue secrétées par la Frankia lors du contact avec les racines de la plantes hôte (Dommergues et *al*, 1998).

Les hyphes pénètrent ensuite dans la zone de courbure d'un poil racinaire, puis sont encapsulés dans une structure équivalente au cordon d'infection des légumineuses. Suite, des divisions dans le cortex de la racine infectée, une structure appelée prénodule. Ce prénodule contient larges cellules corticales infectées par Rhizobium qui fixent l'azote (Benabdoun et *al*, 2012). Le primordiales nodulaire est ensuite initié à partir de divisions observées dans e péricycle de la racine (Selosse, 2006), en face d'un pôle de protoxylème, dans une zone proche du prénodule. Les hyphes vont ensuite progresser du prénodule vers les cellules corticales du lobe nodulaire en formation.

Un nodule mature est constitué de plusieurs lobes nodulaires (Macheix et *al*, 2005), chacun possédant une vascularisation centrale, et un cortex organisé en plusieurs zone: zone méristimatique, d'infection et zone de fixation d'azote ; dans les nodules âgés, une zone de sénescence est observée. Des couches de cellule non infectées et induisent une compartimentation du lobe nodulaire (Pelmout, 1993).Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristimatique est persistante ce qui traduit par une forme allongée (Dommergues et *al*, 1998).

Chapitre II :

Matériels et

Méthodes

1-Isolement et identification des souches de rhizobium nodulant «*Retamamonosperma*» et «*Retamaretam*» :

1-1 Matériel végétal :

1-1-1 Description générale du genre «*RetamaRetam*» et «*Retamamonosperma*» :

-***Retamaretam*** : est un arbuste ou arbrisseau de un à quatre mètres, portant de longs rameaux "joncailles" dépourvus ou avec peu de feuilles dans le but de s'adapter au milieu désertique où l'eau est rare. La chlorophylle se trouve dans l'écorce des rameaux qu'ils sont donc verts et remplacent les feuilles dans le phénomène d'assimilation chlorophyllienne. Les stomates sont rares et sont confinés dans des cryptes revêtues entourées de poils où l'air y est toujours humide et l'évaporation est fortement réduite. Les tiges sont rigides et leurs parois externes sont épaisses et l'épiderme est recouvert d'une épaisse cuticule (Shalaby et al., 1972). Les fleurs sont en grappe de couleur blanche ou jaune selon les espèces (Shalaby et al., 1972) (Figure 5).

Les gousses sont sub-globuleuses ou ovoïdes et indéhiscentes (Maire, 1952-1987). Les racines sont profondes et touchent en permanence les couches humides du sol. Elles peuvent accéder dix mètres (Zohary, 1962) et même vingt-cinq mètres de longueur pour les trois espèces : *R. retam*, *R. monosperma* et *R. sphaerocarpa* (Haase et al., 1996).

-***Retama monosperma*** : C'est un arbuste dressé pouvant atteindre trois à quatre mètres de hauteur (Figure 6), à tiges ligneuses portant de longs rameaux verts, flexibles et soyeux, d'un vert argenté à un gris argenté, fortement sillonnés. Les feuilles minuscules sont alternes, caduques, de forme linéaire, lancéolée. Leur durée de vie est brève, de quelques jours à quelques semaines, ce qui constitue une bonne adaptation à la sécheresse estivale.

1-1-2 Classification botanique :

- **Systematique de *Retamaretam*** : Selon Quezel et Santa (1962) les rétames sont classés dans le taxon suivant

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Fabales
Super famille	Légumineuses
Famille	Fabacées
Sous famille	Papilionacées
Genre	Rétama
Espèces	<i>R. retam</i>

-Systématique de *Retama monosperma* :

Classe	Magnoliopsida
Famille	Fabaceae
Genre	Retama
Espèce	Retama monosperma
Sous-Espèce	Retama monosperma subsp. Monosperma

1.2. Isolement des bactéries à partir des nodules :**1-2-1 Collecte des nodules :**

La collecte des nodules sont réalisées à partir des racines de la plante *Retama retamsi* située dans la région de Hammamet-tebessa, et les racines de la plante *Retama monosperma* située dans la région de Bir el Ater.

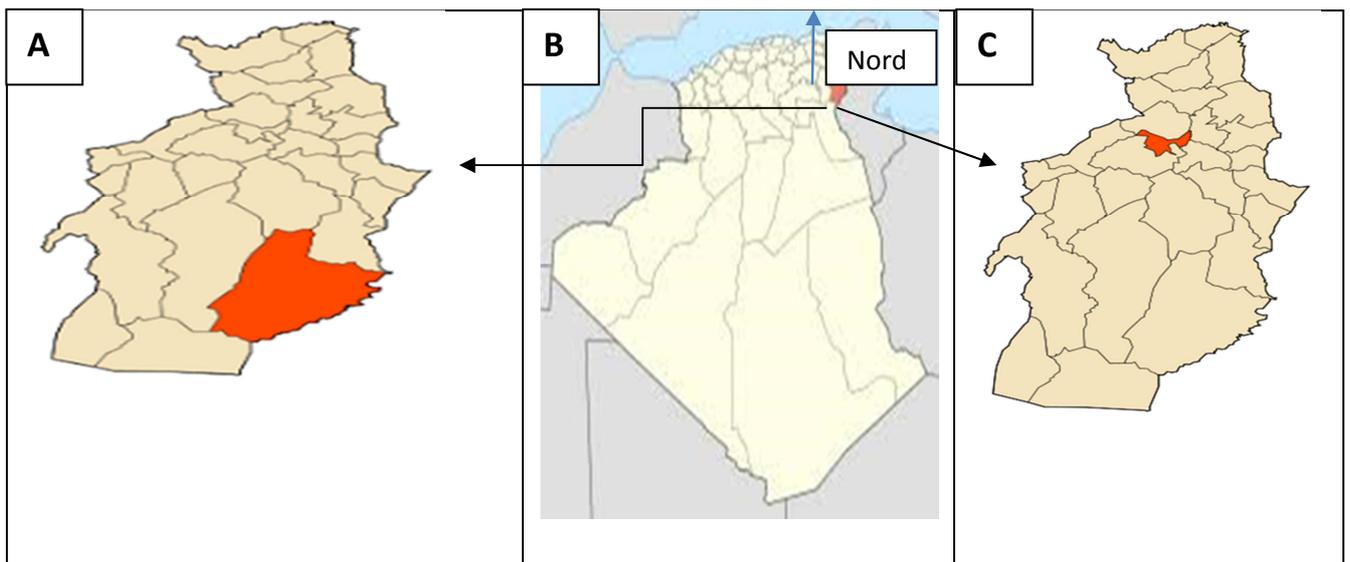


Figure 5: la carte de la localisation géographique de deux zones de prélèvement (A) : Bir el-Ater et (B) Tebessa (C) Hammamet (Unesco, 1960).



Figure 6: *Retamaretam*. Photo «Hammamet». **Figure 7 :** *Retama monosperma* Photo « Bir el ater».



Figure 8 : nodule sur un pied de *Retamaretam*



Figure 9 : nodule de L'Espèce
Retama retam

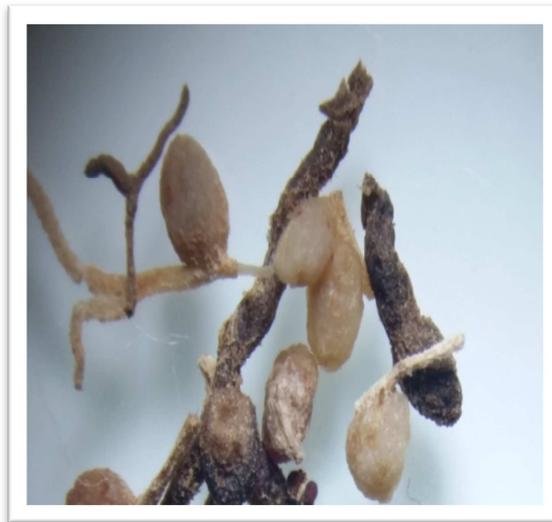


Figure 10 : no
L'Espèce *Retama*

1-2-2 Isolement des Rhizobiums :

a-Stérilisation des nodules :

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol 95% puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié à 1% ($0.1\text{gHgCl}_2+0.5\text{mlHCl}+100\text{ml}$) pendant 3mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

b-Ecrasement des nodules :

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent, J.M. (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri à l'aide d'une pince stérile, flambée au bec Bunsen. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale.

c-Isolement de souches de Rhizobium :

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrons sur gélose coulé en boîte (YMA+RC), puis incubé dans une étuve à 30C° Pendant 48h (Vincent, 1970).

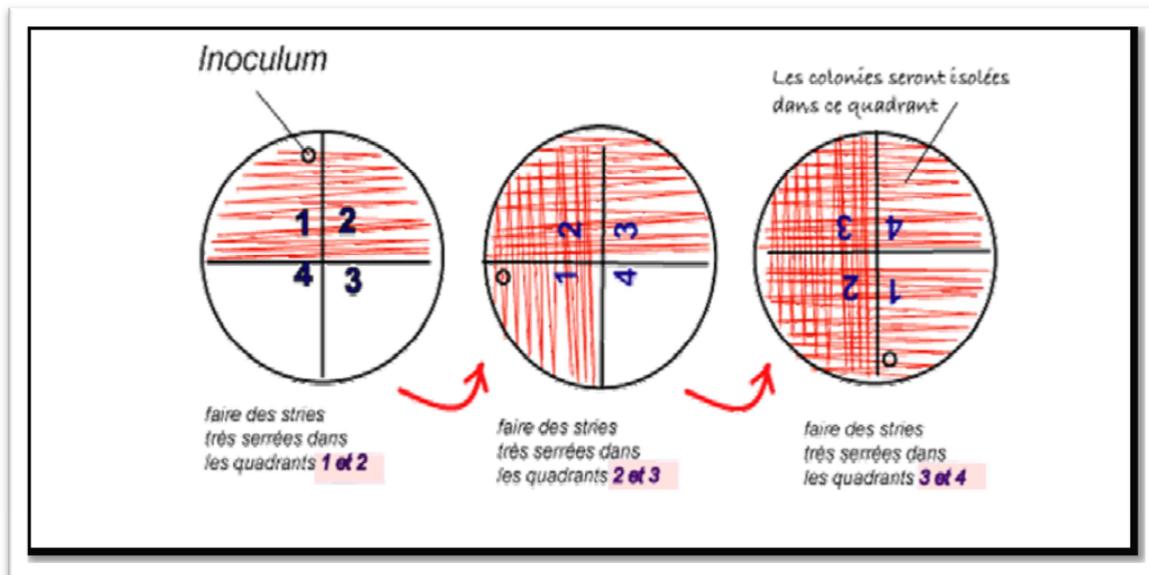


Figure 11: Isolement en quatre quadrants (Vincent, 1970).

2-Les caractères cultureux :

2-1 Les milieux de culture utilisés pour la croissance des *Rhizobiums* :

Milieu adapté à l'étude des caractères nutritionnels de la croissance de toutes les souches de *Rhizobium* (Ndoye, 1990), Ce milieu à base d'extrait de levure et de mannitol avec ou sans agar (YMB ou YMA), (Vincent, 1970), est utilisé pour l'identification et la conservation des souches de *Rhizobium*.

2-1-1 Milieu liquide :

a-Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) :

Les souches sont mise en culture dans des tubes sur milieu YMB, incubé 28°C dans un bain marie agitateur pendant 24h (Vincent, 1970).

milieu de culture ne contienne pas d'agar –agar, il est totalement liquide, Ce milieu a la composition suivante en gramme/litre:

Mannitol 10 g

K₂HPO₄ 0.5 g

MgSO₄ 7 H₂O 0.2 g

Na Cl 0.1 g

Extrait de levure 0.5 g

L'eau distillé 1 litre

Le milieu ajusté à pH 6,8 est autoclave à 120°C pendant 20 mn.

2-1-2 Milieu solide :

a-Milieu YMA-RC : A l'aide d'une anse de platine, la suspension bactérienne (isolat cultivé dans YMB) est prélevé et ensemencé dans des boîtes de pétri contenant le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) + rouge de congo RC, incubé dans une étuve à 30°C pendant 3 jours à une semaine (Vincent, 1970).

le milieu nutritif contient de l'agar, mais ce milieu contient la solution de rouge Congo. Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée) (Vincent 1970), la composition du milieu est la suivante :

YMB 1 litre.

Solution stock de rouge Congo 1ml

Le pH étant ajusté à 6.8, le milieu est autoclavé pendant 20 mn à 120°C.

b- Milieu YMA : (Yeast Manitol Agar) :

L'ensemencement sur le milieu YMA se fait à partir de sa culture sur YMB incubé dans une étuve à 30°C pendant 48 h (Vincent, 1970).

Le milieu nutritif est un milieu de culture solide, mis au point par Vincent (1970). Ce milieu est utilisé pour isoler et conserver les souches de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, Ce milieu à la composition suivante en

gramme/litre :

YMB 1.0 litre

Agar 15 g

PH 6.8

Ajouter l'agar, autoclave à 120°C pendant 20 minutes

Tableau 03 : Isolats et Souches de référence utilisés dans cette étude

Code des S de Réfs. et isolats	Souches de Réf. et isolats	Plante-hôte	Origine géographique	Sources
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp. novRHA6	<i>Hedysarum coronariuim</i>	Constantine Algérie	A.Bengueouar, (2006) UNV. Constantine
HS1	<i>PseuomonasHedysarum</i>	<i>capitatum</i> sp.NZ096	Constantine Algérie	Y. Benhizia, (2006) Constantine
HnA	<i>Panotoea Agglomerans</i>	<i>Hedysarum naudinianum</i>	Sétif Algérie	A. Troche, (2006) Constantine
Hca1	<i>Pseuomonas</i> sp. KD	<i>Hedysarumcarnosom</i>	Constantine Algérie	Y. Benhizia, (2006) Constantine
HP7	<i>Enterobacter kob</i>	<i>Hedysarum pallidum</i>	Sétif Algérie	A. Troche, (2006) Constantine
RR11	Isolat	<i>Retamaretam</i>	Hammamet Tébessa	Notre étude
RR 12	Isolat	<i>Retamaretam</i>	Hammamet Tébessa	Notre étude
RR 21	Isolat	<i>Retamaretam</i>	Hammamet Tébessa	Notre étude
RR13	Isolat	<i>Retamaretam</i>	Hammamet Tébessa	Notre étude
RR23	Isolat	<i>Retamaretam</i>	Hammamet Tébessa	Notre étude
RM11	Isolat	<i>Retama monosperma</i>	Bir el-Ater Tébessa	Notre étude
RM12	Isolat	<i>Retama monosperma</i>	Bir el-Ater Tébessa	Notre étude
RM21	Isolat	<i>Retama monosperma</i>	Bir el-Ater Tébessa	Notre étude
RM13	Isolat	<i>Retama monosperma</i>	Bir el-Ater Tébessa	Notre étude
RM23	Isolat	<i>Retama monosperma</i>	Bir el-Ater Tébessa	Notre étude

3- Tests physiologiques :

3-1 Effet de pH :

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB liquide à différents pH (2, 4, 8 et 10). La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 680 nm après incubation à 30°C dans un bain-marie agitateur pendant 24h.

3-2 Effet de la salinité (Tolérance du NaCl) :

Le milieu utilisé pour réaliser ce test est le milieu YMB contenant des concentrations en NaCl (2%, 4%, 6%, 8% et 10%), le pH du milieu de culture est 6.8. les taux de croissances sont enregistrés en mesurant la densité optique des cultures bactériennes à 680 nm après incubation à 30°C dans un bain-marie agitateur pendant 24h.

3-3 Effet de la température :

L'ensemble des souches sont mises en culture sur le milieu YMA solide dans des boites de Pétris et incubées à différentes températures : 4°C, 30°C, 37°C et 44°C à l'étuve pendant une semaine.

4-Tests biochimiques:

4-1 La source de carbone :

L'utilisation des sucres comme une seule source de carbone. Le test est réalisé sur le milieu YMB où le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D-saccharose, D- Fructose, D- Glucose, D- Galactose et D-Xylose, et la quantité de l'extrait de levure est réduite à 0.05g/l. Les tubes sontensemencés et incubés au bain-marie agitateur à 30°C pendant 24 heures. L'estimation de la croissance est réalisée en mesurant la densité optique à 680 nm (Jordan, 1984).

5- Analyses statistiques :

L'exploitation des données obtenues a été réalisée par l'utilisation des logiciels MINITAB 16 commençant par une ANOVA à deux facteurs avec quatre répétitions par échantillon, suivi par un test de comparaison multiple de DUNNETT tenant en compte la souche de référence (A6) *Rhizobium sultae* comme témoin à un seuil de signification ($\alpha=0,05$), ainsi que pour la classification hiérarchique (CAH). Tant que la projection des isolats et les facteurs étudiés sur les plans factoriels est réalisée par une analyse des composantes principales (ACP) en utilisant le logiciel Excel stat 2014.

Chapitre III :

Résultats et

Discussion

1- Caractères culturels :

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de la plante *Retama retam* et *Retama monosperma* nous avons tenu compte 10 isolats avec cinq souches de références A6, HS1, HnA, HCa1, Hp7. La sélection des isolats se fait selon les deux critères : pour leur vitesse de croissance et les isolats qui n'absorbent pas ou peu le rouge Congo.

1-1 Croissance sur YMA. RC :

La Croissance sur YMA. RC des souches isolées à partir des nodules *Retama retam* et *Retama monosperma* a donné au bout de 24 à 72h, des colonies absorbant très peu ou pas le Rouge Congo restant ainsi rose à blanchâtre sur le milieu YMA-RC. Ceci est observé chez la majorité des rhizobies (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

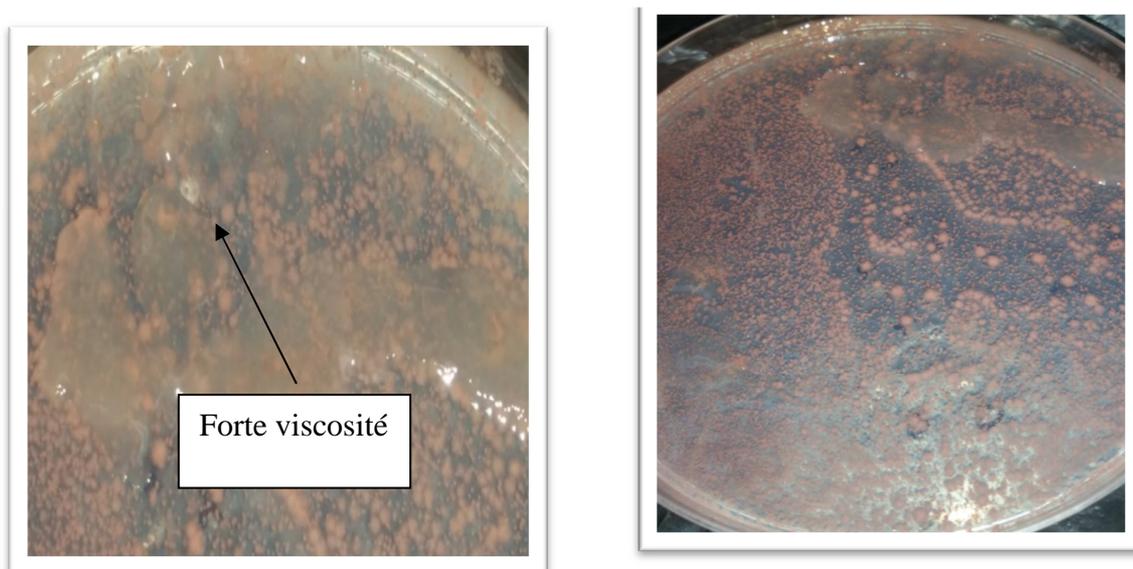


Figure 12: Aspect morphologique d'isolat sur le milieu

YMA.RC après 6 jours d'incubation à 30°C.

1-2 Croissance sur bouillon YMB :

Le bouillon YMB est utilisé comme support de repiquage d'un milieu à un autre. Une fois ensemencé et après 24h d'incubation à 30°C, il se caractérise par l'apparition d'un trouble. Ce qui a été observé au niveau de tous nos isolats. Les mêmes résultats avancés par Vincent, (1970) ; Jordan, (1984).

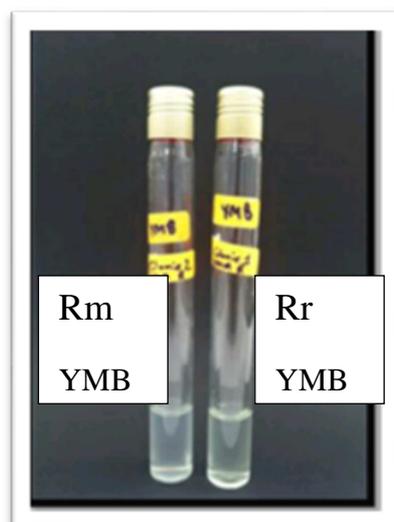


Figure 13: Apparition d'un trouble après incubation pendant 24h surbouillon YMB

1-3Croissance sur YMA:

L'ensemble des isolats présent des colonies, après 24 à 72 heures d'incubation dans une étuve à 30° C. Les colonies obtenues présentent quatre aspects macroscopiques de couleur blanchâtre, translucides, lisses et visqueuse .Les isolats se caractérisent par une forte viscosité due à une production excessive et abondante des exopolysaccharides et de Poly β -hydroxybutyrate (Zahran, 1999 et Bouras, 2006).



Figure 14: Aspect morphologique d'isolat sur le milieu YMA.

-Il y a une différence dans la vitesse de croissance, entre les colonies des différents isolats. L'ensemble des isolats de nodule de la plante *Retama monosperma* présentent une croissance rapide et pour les isolats de nodule de la plante *Retama retam* présentent une croissance lente.

Cette propriété montre qu'il y a une biodiversité entre les isolats (Ndoy, 2005)

La première classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* s'était basée sur ce critère (Jordan, 1982, 1984). En fait, les souches à croissance rapide (du genre *Rhizobium* possèdent un taux de régénération inférieur à six heures) (Perry et al., 2004, Somasegran et Hoben, 1994).

2-Tests physiologiques :

2-1 Effet de pH :

Généralement, les souches de *Rhizobium* possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans les zones arides et semi-arides. Les principaux facteurs limitant de l'activité biologique sont: les températures élevées, les pH extrêmes et la salinité élevée (Cacciari et al., 2003).

Il ressort de la Figure 17 que l'ensemble des isolats et souches de références tolèrent les Ph alcalin (Ph8 et Ph10), et leurs croissances est étroitement altérées par les Ph acide (Ph2 et Ph4) à l'instar des deux souches de référence HCa1 et HP7 qui ont montrées des taux de croissances presque constante dans les différents Ph utilisés.

Ces résultats concordent ceux de Raza et al. (2001), qui ont trouvé que les *Rhizobium* sp du lupin tolèrent les variations du pH (de 04 à 10). Selon Jordan, (1984), les souches à croissance lente semblent être plus tolérantes aux pH faible que les souches à croissance rapide (plus sensibles à l'acidité) et Rai et al. (2012) a également signalé que les *rhizobia* à croissance rapide sont capables de croître à un pH de 4.

En général, les rhizobiums sont des bactéries neutrophiles, cependant leur pH optimal

de croissance peut varier (El-Hilali, 2006), et la croissance des isolats dans pH 6.8 présente une bonne croissance.

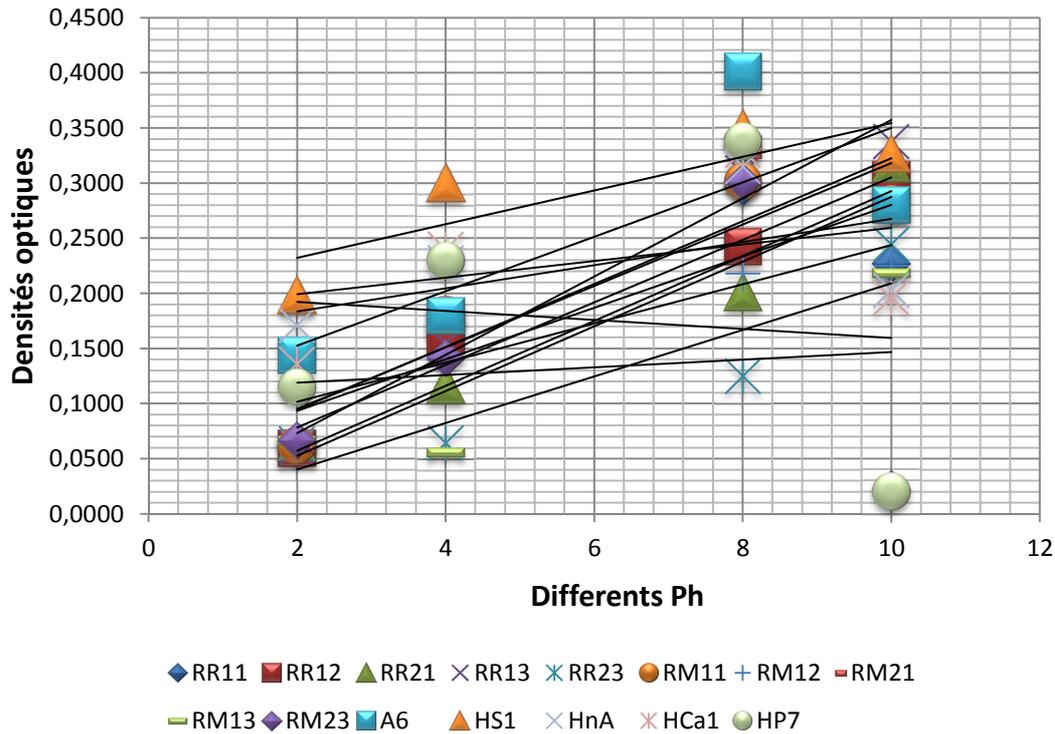


Figure 15 : Courbes de régression de la croissance des isolats et souches de références sous l'effet d'un gradient croissant de Ph.

L'analyse statistique des données fait montrer une différence très hautement significative entre les isolats, les pH utilisés et l'interaction entre les pH et isolats ($p < \alpha = 0.001$). Les résultats enregistrés (Tableau 3) sont en concordance avec celles avancées par Maatallah *et al.* (2002), qui ont détecté une croissance de leurs isolats à des valeurs de pH comprises entre 4 et 7.5 et plus. Une croissance optimale de la majorité des isolats est observée au pH neutre, ainsi qu'au pH alcalin (8.0 et 10).

Le test de comparaison multiple des moyennes de Dunnett (Annexe 03) en comparant les isolats et les souches de références avec la souche A6, divise les bactéries en deux groupes distincts. Le premier groupe est formé par les deux souches RR11 et HnA qui ont enregistré une différence significative avec le deuxième groupe qui renferme la souche de A6 et le reste des isolats et souches de références.

Tableau 4 : ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée des trois paramètres étudiés.

Paramètre	source	DL	SC	SEM	CM	F	P
PH	Isolats	14	0,114545	0,114545	0,008182	4,34	0,0001
	Ph	3	0,136044	0,136044	0,045348	24,07	0,0001
	Interaction	42	1,825819	1,825819	0,043472	23,08	0,0001
	Erreur	180	0,339092	0,339092	0,001884		
	Total	239	2,415499				
NaCl	Isolats	14	1,198551	1,198551	0,085611	18,48	0,0001
	NaCl	4	0,195267	0,195267	0,048817	10,54	0,0001
	Interaction	56	1,310008	1,310008	0,023393	5,05	0,0001
	Erreur	225	1,042484	1,042484	0,004633		
	Total	299	3,746310				
Sucres	Isolats	14	0,233674	0,233674	0,016691	13,58	0,0001
	Sucres	4	3,661026	3,661026	0,915256	744,39	0,0001
	Interaction	56	1,656773	1,656773	0,029585	24,06	0,0001
	Erreur	225	0,276645	0,276645	0,001230		
	Total	299	5,828118				

P < 0,001

2-2 Effet de la température :

Les résultats obtenus (Tableau 4), montrent que toutes les souches testées sont capable de croître entre 4°C et 44°C à l'exception des souches de références HS1, HnA, Hca1 qui n'ont pas poussés à la température 44°C avec les deux isolats RR12 et RR23 qui n'ont pas poussés à la même température. La plupart des isolats sont capables de croître à une température de 4°C à l'instar des isolats de *R.retamain* ainsi que RM12.

Toutefois la plupart des isolats et souches de références affiche une croissance optimale dans l'intervalle de 30° à 37°C à l'exception de l'isolat RR21 qui s'est pas développer à la température 30°C . Ces résultats rejoignent ceux de Jordan, (1984) et Graham, (1992) qui montrent que l'espèce *Rhizobium* se développe mieux entre 20°C et 40°C. L'action de la température n'a pas d'effet de la même manière sur les bactéries dans leur habitat naturel, dans la mesure où les composants du sol exercent une action protectrice

Tableau 5 : Effet de la température sur les isolats et les souches de référence.

T° Les souches et les isolats	04°C	30°C	37°C	44°C
A6	+	+	+	+
HS1	+	+	+	-
HnA	+	+	+	-
Hca1	+	+	+	-
HP7	+	+	+	+
RR11	-	+	+	+
RR12	-	+	+	-
RR21	-	-	+	+
RR13	-	+	+	+
RR23	-	+	+	-
RM11	+	+	+	+
RM12	-	+	+	+
RM21	+	+	+	+
RM13	+	+	+	+
RM23	+	+	+	+

(-) pas de croissance, (+) croissance normale

2-3 Effet de la salinité :

Les résultats obtenus rapportés dans la (Figure 18), pour les isolats et les souches de références montre que la plus part des isolats et souches de références sont altérés par le gradient croissant des concentrations de NaCl variant de 2% à 10%, ils sont considérés comme sensible aux fortes concentrations en NaCl. D'autre part les bactéries HS1 et HP7 ont montré une croissance constante dans les différentes concentrations utilisées. En effet, des résultats équivalents sont notés par Jebara et *al.* (2001) et Abbas et *al.*(2001) sur le fait que les *Rhizobia* à croissance rapide peuvent tolérer des concentrations

supérieures à 2%, ainsi qu'à partir du graphe obtenu on observe que tous les isolats ne supportent plus les concentrations de NaCl supérieur à 2%, qui est illustré sur le graphe par la diminution du taux de croissance des isolats et souches de références au gradient ascendant des concentrations du NaCl. Ce qui est au contraire des résultats de Gaur et Sen, (1981) affirmant que plusieurs souches de *Mesorhizobium ciceri* (d'origine indienne) tolèrent plus de 2% de NaCl.

Selon Miller et Wood, (1996) ont rapportés que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs (Csonka et Hanson, 1991).

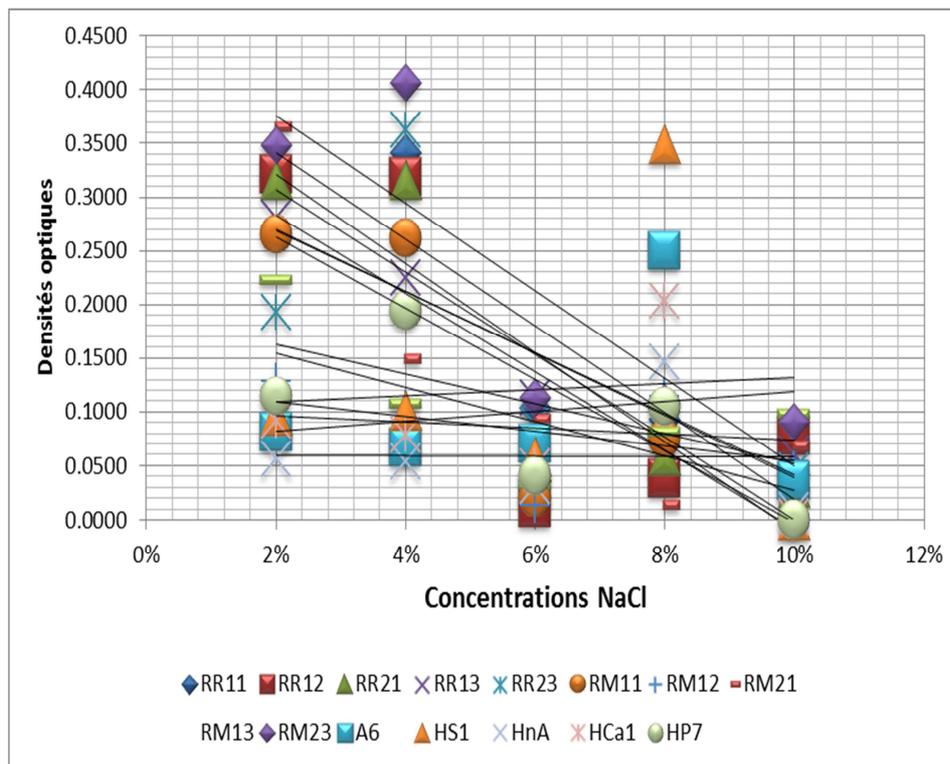


Figure 16 : Courbes de régression de la croissance des isolats et souches de références sous l'effet d'un gradient croissant des concentrations en NaCl.

Le teste de Dunet fait ressortir que les isolats et souches de références se répartissent en deux groupes le premier groupe formé de (A6, RR12, HS1, RR11, RM11, RM12, RM13, HCa1) et le deuxième groupe qui enregistre une différence significative avec la souche de référence A6 constitué du reste des isolats et souches de références. Des résultats rapportés par Merabet et al. (2006), montrent que les *rhizobia* tolèrent une salinité allant jusqu'à 5% de NaCl in vitro.

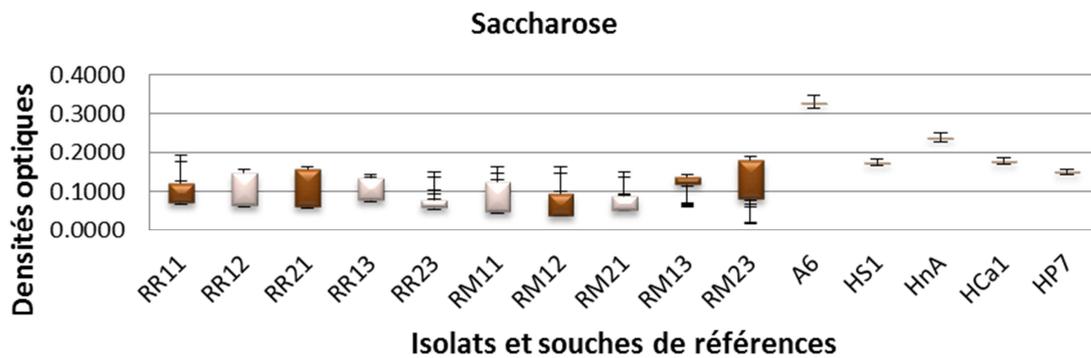
3-Test biochimique :

3-1 Utilisation des sources de carbone (sucres) :

La représentation graphique des mesures de la densité optique (Figure19), nous indique clairement la différence d'assimilation des sucres par les isolats, le galactose et le Saccharose présentent une bonne source de carbone. Par contre les souches de référence assimilent bien les sucres qui sont utilisés (mono et disaccharides).

Ce résultat est confirmé avec la bibliographie sur les *rhizobia* selon Jordan, (1984) ; Vincent, (1982), ils utilisent faiblement les monosaccharides (Glucose, Xylose et Fructose) et di saccharides (Lactose).

Les *rhizobi* présentent un large spectre d'assimilation vis-à-vis des hydrates de carbone. Les *rhizobia* à croissance rapide ont la capacité de produire l'enzyme NADP-6 phosphogluconate déshydrogénase qui leur permet d'utiliser une large gamme de sucres par rapport aux bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*). (Martinez-Romero et al., 1991). Les *Rhizobiums* ont une aptitude à assimiler les mono- saccharide comme le fructose, galactose, par contre Les *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides (Graham, 1964).



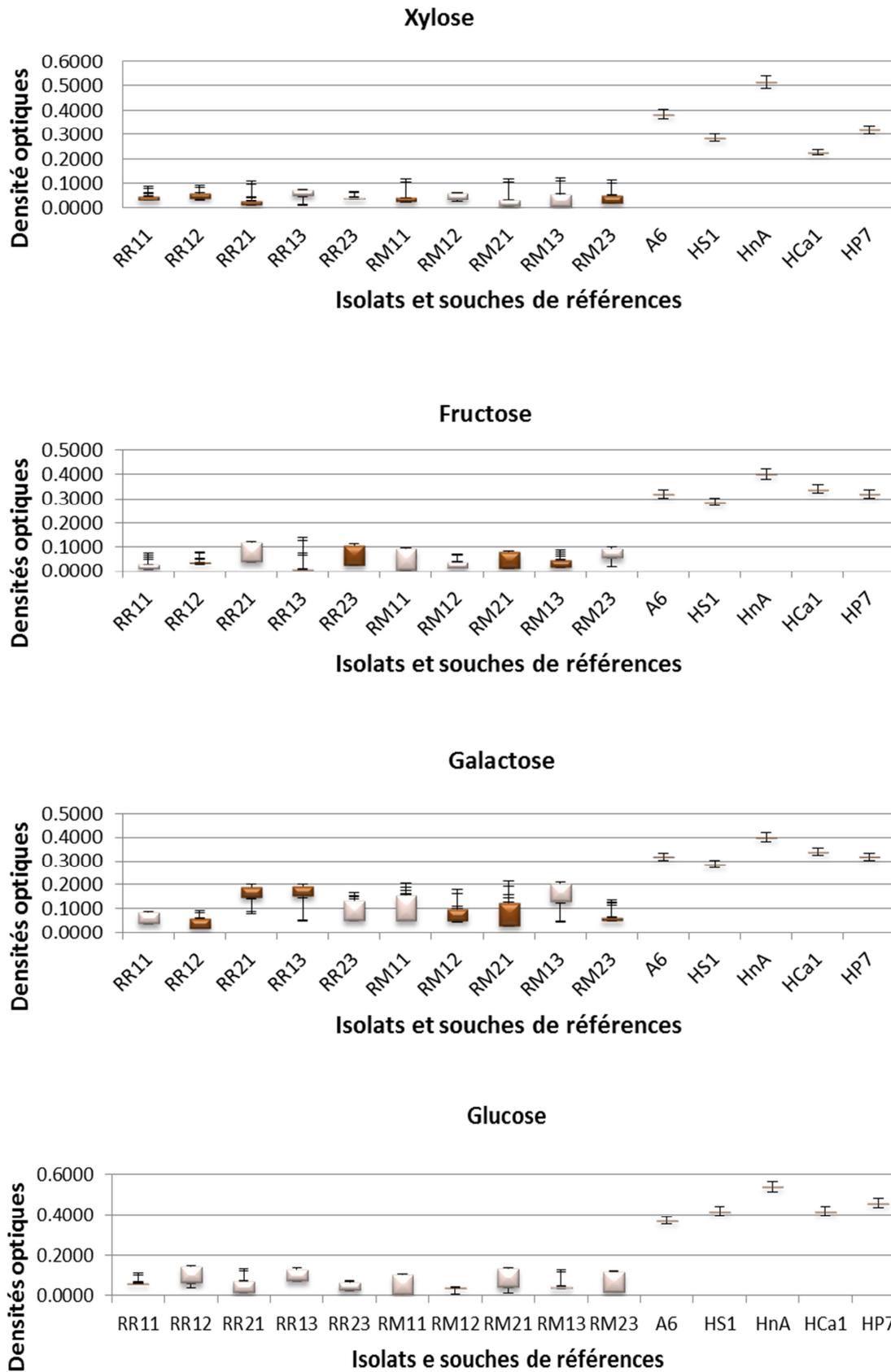


Figure 17 : Utilisation des sucres comme sources de carbone par les isolats et les souches de références.

L'étude statistique ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée selon la source de carbone (DO en fonction des sucres et isolats) (Tableau 3), montre une différence très hautement significatives entres les sucres utilisées, isolats et interaction isolats sucres ($P < \alpha = 0,001$). D'autres auteurs constatent également un degré de différence dans l'assimilation des hydrates de carbone (Struffi et al., 1998, Rodriguez et al., 1987).

Le test de Dunnett a scindé les isolats et souches de références en deux groupes différents, le premier groupe (A6, HP7, HS1, RM12,RR12,RR11, RR23) a enregistré une différence non significative avec la souche A6, par contre le deuxième (HCa1,Hna,RM13,RM21,RM23,RR21,RR13,RM11) groupe à montré une différence significative avec la souche contrôle au seuil de signification ($\alpha = 0,05$)

4-Biodiversité des isolats :

L'analyse des composantes principales avec des taux d'inerties F1 et F2 respectivement 59,04% et 28,84%, nous permet de projeter les isolats et les souches de références sur les plans factoriels avec en taux d'information de 87,88%. L'ACP (Figure 20) fait ressortir que les isolats se regroupe dans le même groupe qui est sensible au Ph acide ainsi aux concentrations élevée en $NaCl > 4\%$ avec une préférence aux sources de carbone Saccharose et Galactose. Les souches de référence se distingues dans un autre groupe en utilisant la gamme des sucres utilisés.

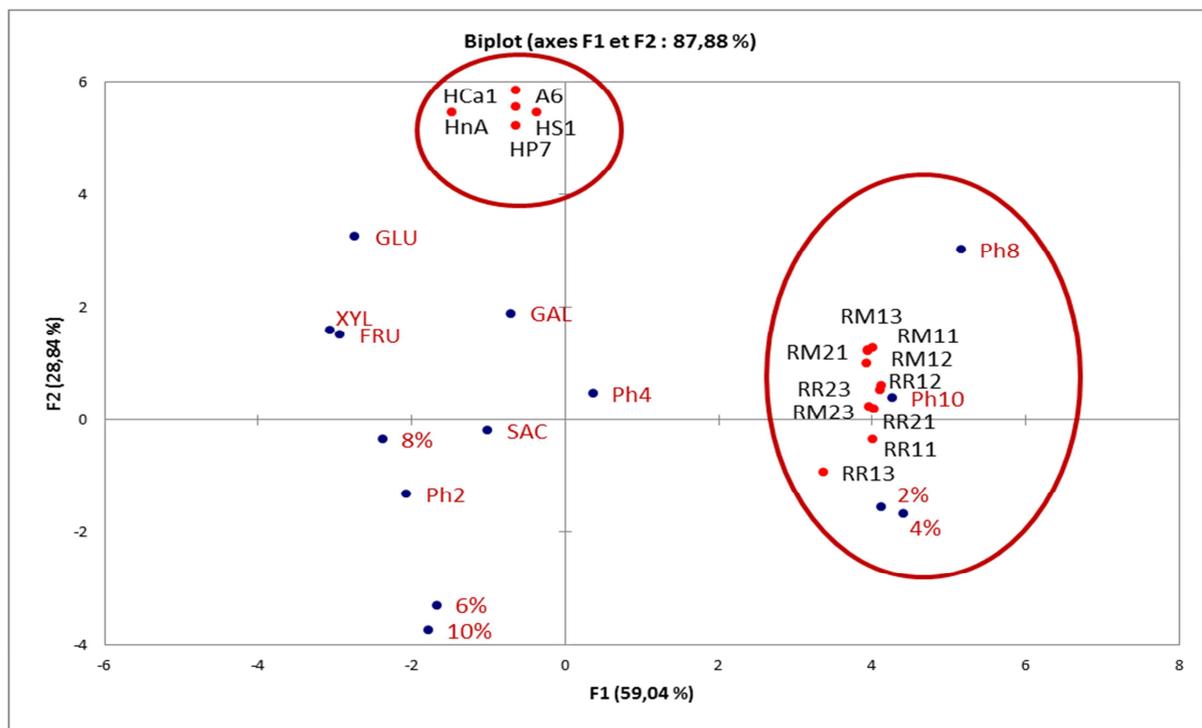


Figure18: Projection des isolats, souches de références et paramètres étudiés sur un plan factoriel en utilisant l'analyse des composantes principale

La classification hiérarchique ascendante des isolats à partir des résultats obtenus, permet d’avoir une première indication sur la biodiversité des isolats nodulant les légumineuses *Retama retam* et *R. monosperma* (Figure 21). A partir de laquelle on peut avancer que les isolats regroupés dans un seul cluster lié au cluster des souches de références avec un taux de similarité égale à 29.38%, ainsi les clusters des isolats présentent un taux de similarité de 82.67% entre eux. Par ailleurs il existe également une biodiversité au sein des micro-symbiotes des plantes hôtes, formant ainsi trois sous cluster différents SCI : (RR11,RR21,RR23,RR12 et RR23)=94.92%, SCII:(RM11,RM21,RM13 et RM12)= 94.92%, SCIII :(RR13) relié aux précédant sous claustre avec un taux similarité de 82.67%

D’autre part le les souches de références se distingue dans un autre groupe avec un pourcentage de similarité égale à 82,60%. Ces résultats sont en accorde avec de nombreux auteurs qui ont montré qu’il existe une grand diversité parmi les souches isolée des nodules d’une même légumineuse (Prescott et *al.*,2006) ; (Dib, 2013) et (Merabet et *al.*, 2006).

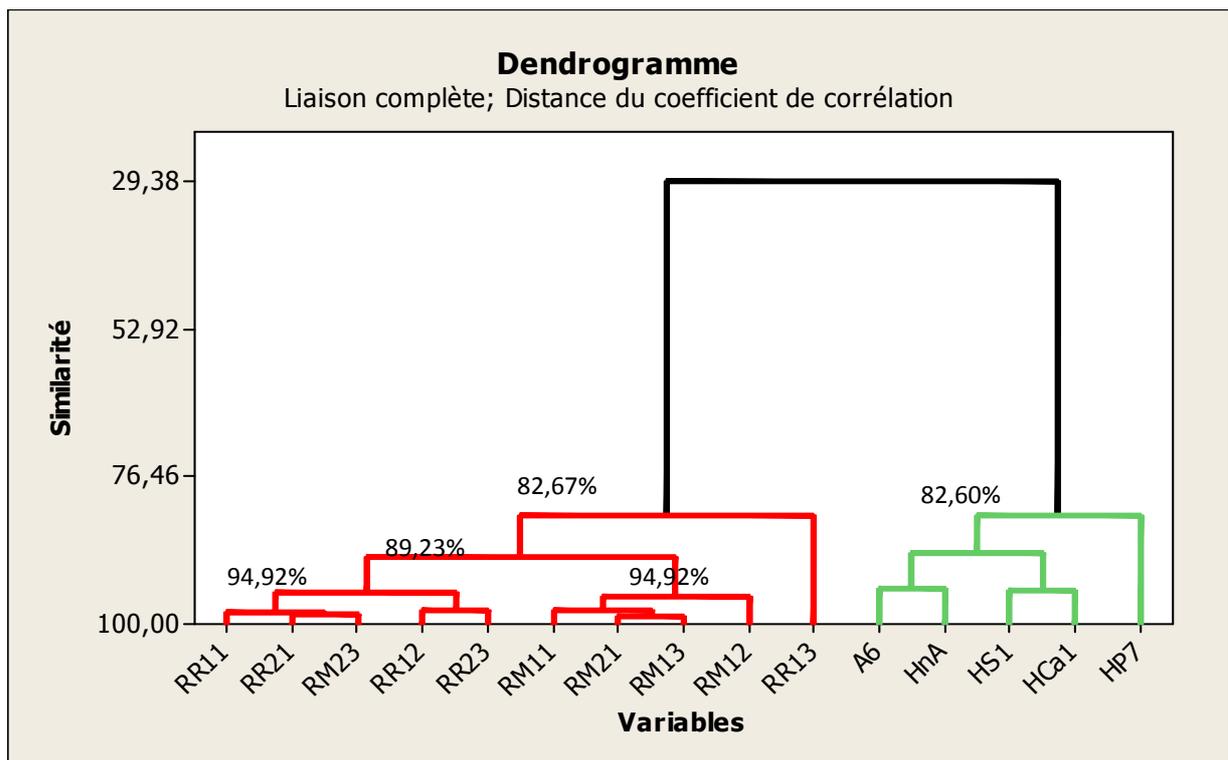


Figure19 :Classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les travaux menés au cours de cette étude sur la symbiose entre les Légumineuses du genre *Retama*, (*R. retam* et *R. monosperma*) avec les bactéries symbiotiques et fixatrices d'azote, nous ont permis d'une part, d'aborder la compréhension de la mise en place de cette association originale du fait de ses partenaires et, d'autre part, d'établir des hypothèses quant à la caractérisation phénotypique de ces isolats en les comparant à des souches de références.

Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux *rhizobia* selon Vincent, (1970) ; Somasegaran et Hoben, (1994) et Jordan, (1984). Cette caractérisation a pour but l'étude de la biodiversité des isolats, par une approche phénotypique, physiologique et biochimique en présence des souches de référence dont leur position taxonomique est connue. *Rhizobium sullae* (Benguedouar, 2000) et des souches appartenant à la classe des *Gamma protéobactéria* isolées et caractérisées par Benhizia et *al.*(2004).

Les dix isolats absorbent peu le Rouge Congo restant ainsi rose à blanchâtre sur le milieu YMA-RC, ayant une vitesse de croissance lente avec des aspects macroscopique différentes couleur blanchâtre, translucides, visqueuse et circulaires sur le milieu de culture YMA. Ces aspects qui rapprochent nos isolats à des caractéristiques des *Rhizobia*.

L'étude des facteurs abiotiques (NaCl, pH et température) fait ressortir que les souches isolées des racines des Légumineuses *R. retam* et *R. monosperma* et les souches de références tolèrent les Ph alcalin est elles sont clairement sensible aux Ph acides, quant à la salinité les isolats montrent une nette sensibilité aux concentrations élevées en NaCl > 4%, par contre les souches de références ont montré une croissance constante dans les différentes concentrations utilisées. la plupart des isolats et souches de références affiche une croissance optimale dans l'intervalle de 30° à 37°C à l'exception de l'isolat RR21 qui s'est pas développer à la température 30°C.

Les tests nutritionnels montrent que les souches de références utilisent une large gamme de carbohydrates et préférentiellement les monosaccharides et les disaccharides contrairement aux isolats des deux plantes hôtes du genre *Retama* qui ont affiché une préférence aux Saccharose et Galactose comme source de carbone.

Toutefois les isolats ont enregistré un taux de similarité de 29,38% avec les souches de référence qui les rapproche d'avantage des *Rhizobia*, avec une biodiversité marquante au sein de leur groupe.

En perspective il est nécessaire de procéder par des inoculations croisées entre les isolats des deux plantes hôtes pour la compréhension de la spécificité plante et le partenaire symbiotique. Une étude moléculaire par un séquençage des gènes de nodulation, 16SrRNA et les gènes de ménages est obligatoire pour élucider la position taxonomique exacte des isolats.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

-A-

-Amarger, N., & Laguerre, G. (1995). Caractérisation des Rhizobium. *COLLOQUES-INRA*, 193-204.

-Abdelguerfi, A., and M. Abdelguerfi-Laouar. "Les ressources génétiques d'interet fourrager et/ou pastoral: diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen." *Options Méditerranéennes* 62 (2004): 29.

-Archambeaud, F., Galinat, S., Regouby, Y., Magy, L., Rebeyrotte, I., Vallat, J. M., & Teissier, M. P. (2001). Encéphalopathie de Hashimoto. Analyse de quatre observations. *La Revue de médecine interne*, 22(7), 653-659.

-Attard, E., Le Roux, X., Laurent, F., Chabbi, A., Nicolardot, B., & Recous, S. (2011). Impacts de changements d'occupation et de gestion des sols sur la dynamique des matières organiques, les communautés microbiennes et les flux de carbone et d'azote. *Etude et gestion des sols*, 18(3), 147-160.

-Allen, J., & Annells, M. (2009). A literature review of the application of the Geriatric Depression Scale, Depression Anxiety Stress Scales and Post-traumatic Stress Disorder Checklist to community nursing cohorts. *Journal of clinical nursing*, 18(7), 949-959.

-B-

-Benabdoun, F. M. (2012). *Étude moléculaire des étapes précoces de la symbiose actinorhizienne Casuarina-Frankia: analyse fonctionnelle des gènes de la plante hôte contrôlant l'infection* (Doctoral dissertation, Montpellier 2).

-Buchanan, R. W., Kreyenbuhl, J., Kelly, D. L., Noel, J. M., Boggs, D. L., Fischer, B. A., ... & Keller, W. (2009). The 2009 schizophrenia PORT psychopharmacological treatment recommendations and summary statements. *Schizophrenia bulletin*, 36(1), 71-93.

Références bibliographiques

- Brennic, A., & Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 155-194.
- Brennic, A., & Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 155-194.
- BREWIN, N., & DALE NOEL, K. (1992). Rhizobium leguminosarum CFGN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. *Journal of bacteriology*, 174(7), 2222-2229.
- Bourguignon, D. (2017). *A la recherche de collectifs pour faire face à la stigmatisation* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Boulton, G. S., Harris, P. W. V., & Jarvis, J. (1982). Stratigraphy and structure of a coastal sediment wedge of glacial origin inferred from sparker measurements in glacial Lake Jökulsárlón in southeastern Iceland. *Jökull*, (32), 37-47.
- Bertotti, B., Iess, L., & Tortora, P. (2003). A test of general relativity using radio links with the Cassini spacecraft. *Nature*, 425(6956), 374.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., & Squartini, A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and applied microbiology*, 27(4), 462-468.
- Bajracharya, S., Yuliasni, R., Vanbroekhoven, K., Buisman, C. J., Strik, D. P., & Pant, D. (2017). Long-term operation of microbial electrosynthesis cell reducing CO₂ to multi-carbon chemicals with a mixed culture avoiding methanogenesis. *Bioelectrochemistry*, 113, 26-34.

Références bibliographiques

-Bouaziz, N., &Melbouci, B. (2017). Characterization of the Illilten earth flow (Algeria) Caractérisation de la coulée boueuse d'Illilten (Algérie). *Bulletin of Engineering Geology and the Environment*, 1-21.

-C-

-Calvet, R. (2003). *Le sol: propriétés et fonctions* (Vol. 2). France Agricole Editions.

- Calatayud, P. A., Llovera, E., Bois, J. F., & Lamaze, T. (2000). Photosynthesis in drought-adapted cassava. *Photosynthetica*, 38(1), 97-104.

- Chapman, P. G., & Norton, B. W. (1982). The effect of sample preparation on the digestion of chopped, masticated and ground Siratro and Pangola grass in nylon bags. *Anim. Prod.*, 14, 580-583.

- Choi, H. K., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J. H., ...& Roe, B. A. (2004). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics*, 166(3), 1463-1502.

- Chaïch, K., Bekki, A., Bouras, N., Holtz, M. D., Soussou, S., Mauré, L., ... & Cleyet-Marel, J. C. (2017). Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genistasaharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis*, 71(2), 111-120.

- Constantine, M., Constantine, F. M., & Hadjer, B. Contribution à l'étude des certaines activités enzymatiques et l'effet du PH chez les bactéries nodulant les légumineuses du genre *Phaseolus*.

- Charron, D., Pingret, J. L., Chabaud, M., Journet, E. P., & Barker, D. G. (2004). Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and specific ENOD gene expression. *Plant physiology*, 136(3), 3582-3593.

-D-

Références bibliographiques

- David, F. (1988). Conformal field theories coupled to 2-D gravity in the conformal gauge. *Modern Physics Letters A*, 3(17), 1651-1656.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J. M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., ... &Astarie-Dequeker, C. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature genetics*, 26(2), 207.
- Dromey, B., Kar, S., Bellei, C., Carroll, D. C., Clarke, R. J., Green, J. S., ...&Willingale, L. (2007). Bright multi-keV harmonic generation from relativistically oscillating plasma surfaces. *PhysicalReviewLetters*, 99(8), 085001.
- Dreyfus, J. C. (1988). Des souris transgéniques porteuses d'un gène muté de collagène, un modèle d'Osteogenesisimperfecta.
- Deroo, E., Champeaux, A., Milleliri, J. M., &Queguiner, P. L. (2005). L'Ecole du Pharo. *Cent ans de Médecine outre-mer*.
- Dellacherie, C., & Meyer, P. A. (2011). *Probabilities and potential, c: potential theory for discrete and continuous semigroups* (Vol. 151). Elsevier.
- D. H., Barbe, M. C., Seth, R. S., & Jordan, B. D. (1984). The mechanism of curl creation, removal and retention in pulp fibres. *Journal of pulp and paper science*, 10(3), J74-J79.

-E-

- El Hilali, I. (2006). La Symbiose Rhizobium–Lupin: Biodiversité des Microsymbiotes et Mise en Evidence d'une Multi-Infection Nodulaire chez LupinusLuteus.
- Ekouevi, Didier K., et al. "Low retention of HIV □infected patients on antiretroviral therapy in 11 clinical centres in West Africa." *Tropical Medicine & International Health* 15 (2010): 34-42.

-F-

Références bibliographiques

- Furr, B. J. A., & Jordan, V. C. (1984). The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacology & therapeutics*, 25(2), 127-205.
- Fischer, J. M. (1994). *The metaphysics of free will* (Vol. 1). Oxford: Blackwell.
- Fournet, A., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cavé, A., Richomme, P., & Bruneton, J. (1993). Les chimanines, nouvelles quinoléines substituées en 2, isolées d'une plante bolivienne antiparasitaire: Galipea Longiflora. *Journal of natural products*, 56(9), 1547-1552.

-G-

- Guichet, J. M., Deromedis, B., Donnan, L. T., Peretti, G., Lascombes, P., & Bado, F. (2003). Gradual femoral lengthening with the Albizzia intramedullary nail. *JBJS*, 85(5), 838-848.
- Gosselin, a., chalifour, f. p., trudel, m. j., & gendron, g. (1984). influence de la temperature du substrat et de la fertilisation azotee sur la croissance, le developpement, la teneur en azote et l'activite de la nitrate reductase chez la tomate. *canadian journal of plant science*, 64(1), 181-191.
- Gros, P. (1996). *L'architecture romaine: du début du IIIe siècle av. J.-C. à la fin du Haut-Empire* (Vol. 1). Editions A&J Picard.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., ...& Bena, G. (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, 316(5829), 1307-1312.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., & Stacey, G. (2015). Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in plant science*, 20(3), 186-194.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., & Stacey, G. (2015). Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in plant science*, 20(3), 186-194.
- Gnat, S., Wójcik, M., Wdowiak-Wróbel, S., Kalita, M., Ptaszyńska, A., & Małek, W. (2014). Phenotypic characterization of Astragalus glycyphyllosymbionts and their phylogeny based on

Références bibliographiques

the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(6), 1033-1048.

-Guo, C. J., Chang, F. Y., Wyche, T. P., Backus, K. M., Acker, T. M., Funabashi, M., ...& Craik, C. S. (2017). Discovery of reactive microbiota-derived metabolites that inhibit host proteases. *Cell*, 168(3), 517-526.

- Guo, Chun-Jun, et al. "Discovery of reactive microbiota-derived metabolites that inhibit host proteases." *Cell* 168.3 (2017): 517-526.

-H-

- Hilkens, J., Buijs, F., Hilgers, J., Hageman, P., Calafat, J., Sonnenberg, A., ...& Der, M. (1984). Monoclonal antibodies against human milk fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *International journal of cancer*, 34(2), 197-206.

- Hauke-Pacewiczowa, T., Balandreau, J., & Dommergues, Y. (1970). Fixation microbienne de l'azote dans un sol salin tunisien. *Soil Biology and Biochemistry*, 2(1), 47-53.

- Helsel, D. R., & Hirsch, R. M. (1992). *Statistical methods in water resources* (Vol. 49). Elsevier.

- Hopkins, David. *School improvement for real*. routledge, 2003.

-J-

- Jordan, J. M. (1984). *Paul Klee and cubism*. Princeton University Press.

- Joulain, C., Ollivier, B., Neue, H. U., & Roger, P. A. (1996). Microbiological aspects of methane emission by a ricefield soil from the Camargue (France): 1. Methanogenesis and related microflora. *European journal of soil biology*, 32(2), 61-70.

Références bibliographiques

-K-

- Krasova Wade, T. (1998). Etude de la photosynthèse bactérienne chez un Bradyrhizobium d'Aeschynomene: photoactivité et caractérisation du complexe capteur de lumière.
- Khater, Mostafa MA, Emad HM Zahran, and Maha SM Shehata. "Solitary wave solution of the generalized Hirota–Satsuma coupled KdV system." *Journal of the Egyptian Mathematical Society* 25.1 (2017): 8-12.

-L-

- Lachkar, N., Dommergues, J. L., Meister, C., Neige, P., Izart, A., & Lang, J. (1998). Les ammonites du Sinémuriensupérieur du Jebel-Bou-Hamid (Haut-Atlas central, Rich, Maroc). Approches paléontologique et biostratigraphique. *Geobios*, 31(5), 587-619.
- Lebeltel, O. (1999). *Programmation bayésienne des robots*(Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Grenoble-INPG).
- Lortet, G., Méar, N., Lorquin, J., Dreyfus, B., De Lajudie, P., Rosenberg, C., & Boivin, C. (1996). Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to Sinorhizobiumsaheli, S. teranga, and Rhizobium sp. strains isolated from Acacia and Sesbania. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 9(8), 736-747.

-M-

- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- Mathesius, U., Schlaman, H. R., Spaink, H. P., Of Sautter, C., Rolfe, B. G., & Djordjevic, M. A. (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is

Références bibliographiques

regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant Journal*, 14(1), 23-34.

- Maddux, J. E. (1995). Self-efficacy theory. In *Self-efficacy, adaptation, and adjustment* (pp. 3-33). Springer, Boston, MA.

- Moulin, J., Carol, B., Nicholas, B., Vincent, B., Alex, D., Antony, E., ... & Marie-Jeanne, O. (1999). Lire Ted Hughes: New selected poems, 1957-1994.

- Maougal, M. L. (2004). *KatebYacine: l'indomptable démocrate*. Apic.

- Moss, E., St-Laurent, D., Rousseau, D., Parent, S., Gosselin, C., & Saintonge, J. (1999). L'attachement à l'âge scolaire et le développement des troubles de comportement. *Canadian Journal of Behavioural Science/Revue canadienne des sciences du comportement*, 31(2), 107.

- Murphy-Bokern, D., Peeters, A., & Westhoek, H. (2017). The role of legumes in bringing protein to the table. *Legumes in cropping systems*, 18-36.

- MICHALET, R., PAGÈS, J. P., SACCONI, P., & BRUN, J. J. (2008). Les interactions entre espèces d'arbres dans les mélanges illustrées par le cas des feuillus et des conifères dans les forêts de montagne.

- Madelain, F. (1970). Influence de la topographie du fond sur l'écoulement méditerranéen entre le Détroit de Gibraltar et le Cap Saint-Vincent. *Cah. Oceanogr*, 22(1), 43-61.

-N-

- Ndoye, I., Tomekpe, K., Dreyfus, B., & Dommergues, Y. R. (1990). Sesbania and Rhizobium symbiosis: nodulation and nitrogen fixation. *Perennial Sesbania species in agroforestry systems. Nitrogen fixing Tree Association, Wamanalo*, 31-38.

- NAITO, M., HOTTA, T., ABE, H., SHINOHARA, N., OKUMIYA, M., & UEMATSU, K. (2000). Optical characterisation of strength-limiting flaws in silicon nitride ceramics prepared

Références bibliographiques

with different slurry flocculation conditions. In *British ceramic proceedings* (pp. 119-132). Institute of Materials.

- Nultsch, W. (1998). *Botanique générale*.

- Newton, I. (1998). *Population limitation in birds*. Academic press.

-O-

-Ozenda, P. (1977). *Flora of the Sahara*. Flora of the Sahara., (ed. 2).

-P-

- Pasquali, R., Pelusi, C., Genghini, S., Cacciari, M., & Gambineri, A. (2003). Obesity and reproductive disorders in women. *Human reproduction update*, 9(4), 359-372.

- Pugnaire, F. I., Haase, P., & Puigdefabregas, J. (1996). Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology*, 77(5), 1420-1426.

- Pelmont, J. (1995). Inhibitions compétitives et non compétitives. *Enzymes, catalyseurs du monde vivant*. Grenoble, Presses universitaires de Grenoble, 387.

- Péret, B., Swarup, R., Jansen, L., Devos, G., Auguy, F., Collin, M., ... & Bennett, M. (2007). Auxin influx activity is associated with Frankia infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarinaglauca*. *Plant physiology*, 144(4), 1852-1862.

- PUJIC, P., & NORMAND, P. (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*, (298), 26-29.

- Polhill, R. M. (1981). Raven PH (ed.). 1981 Advances in legume systematics: parts 1 & 2. *Kew, Royal Botanic Gardens*, 2, 1-7.

- PUGNAIRE, F. I., & HAASE, P. (1996). Comparative physiology and growth of two perennial tussock grass species in a semi-arid environment. *Annals of Botany*, 77(1), 81-86.

Références bibliographiques

-Q-

- Quezel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2.

-R-

- Rénier, A. (2008). Les espaces opérateurs de la sémiotique architecturale. *AS-Actes Sémiotiques*.
- Raynal, J. P., Amani, F., Geraads, D., El Graoui, M., Magoga, L., Texier, J. P., & Sbihi-Alaoui, F. Z. (2008). La grotte des Félines, site paléolithique du Pléistocène supérieur à Dar Bouazza (Maroc). *l'Anthropologie*, 112(2), 182-200.
- Raven, J. P. (2007). *Generation, flow and manipulation of a microfoam* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- Rénier, A. (2008). Les espaces opérateurs de la sémiotique architecturale. *AS-Actes Sémiotiques*.
- Rayene, K. L., & Imene, B. R. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara à Constantine.
- Raven, R. P. J. M., & Gregersen, K. H. (2007). Biogas plants in Denmark: successes and setbacks. *Renewable and sustainable energy reviews*, 11(1), 116-132.

-S-

- Saoudi, M. (2008). Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL): Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*.
- Sabin, R. (1996). *Comics, comix & graphic novels* (p. 62). London: Phaidon.

Références bibliographiques

- Svistoonoff, S. (2003). *Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes* (Doctoral dissertation, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc).
- SAMAKE, F., NEYRA, M., YATTARA, I., & LAHBIB, M. (2009). Diversité génétique et distribution des Rhizobia sous l'influence de certaines espèces ligneuses dans les agroécosystèmes du Mali. *REVUE MALIENNE DE SCIENCE ET DE TECHNOLOGIE*.
- Sy, A., Giraud, É., Samba, R., Lajudie, P. D., Gillis, M., & Dreyfus, B. (2001). Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6), 503-508.
- Siarry, P., & Dreyfus, G. (1988). *La méthode du recuit simulé: théorie et applications*. IDSET.
- Svistoonoff, S. (2003). *Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes* (Doctoral dissertation, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc).
- SIMMS, M., & Zieske, F. (2002). *Cézanne in focus: watercolors from the Henry and Rose Pearlman collection*. Princeton University Art Museum, Princeton, NJ.
- Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 257-288.
- Selosse, M. A., Richard, F., He, X., & Simard, S. W. (2006). Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses?. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11), 621-628.
- Shapiro, H. L. (1960). *The Jewish people: A biological history* (Vol. 10). Paris, Unesco.
- Shamseldin, H. E., Tulbah, M., Kurdi, W., Nemer, M., Alsahan, N., Al Mardawi, E., ... & Bubshait, D. K. (2015). Identification of embryonic lethal genes in humans by autozygosity mapping and exome sequencing in consanguineous families. *Genome biology*, 16(1), 116.

Références bibliographiques

- Tsui, S., &Shalaby, A. (2006). Enhanced system for link and mode identification for personal travel surveys based on global positioning systems. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, (1972), 38-45.
- Thérenty, M. È., Vaillant, A., &Aurenche, M. L. (2004). *Presse et plumes: journalisme et littérature au XIXe siècle*. Nouveau monde.
- Tortora, V. (2003). *Étude de la production d'eau chaude sanitaire du bâtiment François Mitterrand. Prévention du risque légionellose. Application de la circulaire du 22 avril 2002*(Doctoral dissertation).
- Torche, N., Bomel, D., Langevin, L., Thivolet, C., Aptel, F., & Denis, P. (2006). Retinopathiediabetique, la prise en charge infirmiere. *SOINS*, 703, 15.
- Tani, H., Mizutani, R., Salam, K. A., Tano, K., Ijiri, K., Wakamatsu, A., ... & Akimitsu, N. (2012). Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome research*, 22(5), 947-956.
- Torche, A., Benhizia, Y., Benguedouar, A., Gharzouli, R., Benhizia, H., Khelifi, D., &Squartini, A. (2010). CARACTERISATION DES BACTERIES ISOLEES A PARTIR DES NODULES DES ESPECES DE LEGUMINEUSES DU GENRE HEDYSARUM: H. pallidum desf., H. spinosissimumsubsp. capitatum, H. carnosumdesf. et H. naudinianumcoss.*Sciences & Technologie C*, (32), 43-50.
- Taketani .Guo, C. J., Chang, F. Y., Wyche, T. P., Backus, K. M., Acker, T. M., Funabashi, M., ... & Craik, C. S. (2017). Discovery of reactive microbiota-derived metabolites that inhibit host proteases. *Cell*, 168(3), 517-526.

-V-

- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*.

Références bibliographiques

- Viguié-Vallanet, C., Serre, M., Masliah, L., & Tourte-Schaefer, C. (2005, May). Épidémie de teignes à Trichophyton tonsurans dans une école maternelle de la région parisienne. In *Annales de dermatologie et de vénéréologie* (Vol. 132, No. 5, pp. 432-438). Elsevier Masson.

- Visee, S., Soltner, C., Rialland, X., Machet, M. C., Loussouarn, D., Milinkevitch, S., ...&Rousselet, M. C. (2005). Supratentorial primitive neuroectodermaltumours of the brain: multidirectional differentiation does not influence prognosis. A clinicopathological report of 18 patients. *Histopathology*, 46(4), 403-412.

-W-

- West, S. E., & Wade, K. (1998). *A corpus of Anglo-Saxon material from Suffolk*. Ipswich: Suffolk County Council.

- Walstra, P. (2003). *Physical chemistry of foods*.

- Wood, Laura D., et al. "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." *Science* 318.5853 (2007): 1108-1113.

-Wollenberg, Eva, et al. "Reducing emissions from agriculture to meet the 2 C target." *Global Change Biology* 22.12 (2016): 3859-3864.

- Westhoek, H. Murphy-Bokern, D., Peeters, A., (2017). The role of legumes in bringing protein to the table. *Legumes in cropping systems*, 18-36.

-X-

-Xu, X. J., Day, D. E., Brow, R. K., & Callahan, P. M. (1995). Structure of tin fluorophosphate glasses containing PbO or B₂O₃. *Physics and chemistry of glasses*, 36(6), 264-271.

-y-

- Young, J. M. (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of

Références bibliographiques

Ensiferadhaerens Casida 1982. Is the combination 'Sinorhizobium adhaerens' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an opinion. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 2107-2110.

- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.

-Z-

- Zhai, J., Shao, Q., & Wang, X. (2016). Improvements for P-ELM1 and P-ELM2 Pruning Algorithms in Extreme Learning Machines. *International Journal of Uncertainty, Fuzziness and Knowledge-Based Systems*, 24(03), 327-345.

- Zahran, F. El-Maghrabi, H. H., Abdelmaged, S. M., Nada, A. A. El-Wahab, S. A., Yahea, D., ... & Atrees, M. S. (2017). Magnetic graphene based nanocomposite for uranium scavenging. *Journal of hazardous materials*, 322, 370-379.

Références bibliographiques

Annexe

Annexe 01 : Tableau des résultats de la mesure des densités optiques des différents tests.

Paramètres		RR11	RR12	RR21	RR13	RR23	RM11	RM12	RM21	RM13	RM23
PH	PH 2	0.0614	0.0598	0.0647	0.0597	0.0638	0.0624	0.0653	0.0601	0.0663	0.0668
		0.0719	0.0609	0.0538	0.0621	0.0673	0.0631	0.0627	0.0594	0.0641	0.0671
		0.0627	0.0656	0.0681	0.0687	0.0699	0.0619	0.0646	0.0658	0.0670	0.0586
		0.0554	0.0681	0.0663	0.0605	0.0663	0.0649	0.0643	0.0681	0.0591	0.0654
	PH 4	0.1620	0.1617	0.1172	0.1547	0.0647	0.1813	0.1824	0.1768	0.0562	0.1418
		0.1208	0.0325	0.1240	0.1588	0.1171	0.1720	0.1115	0.0901	0.1628	0.1726
		0.1434	0.1185	0.2260	0.0250	0.1257	0.1770	0.1711	0.172	0.1158	0.1002
		0.0619	0.1173	0.1570	0.1332	0.1510	0.1871	0.1450	0.1173	0.1439	0.1234
	PH 8	0.2968	0.2423	0.2009	0.3093	0.1250	0.3018	0.2181	0.3263	0.3390	0.3008
		0.2271	0.2820	0.2598	0.3009	0.2850	0.3185	0.2356	0.2258	0.3060	0.2709
		0.2892	0.2618	0.2834	0.2831	0.3257	0.2865	0.3374	0.2271	0.3020	0.2433
		0.1081	0.3091	0.2214	0.3318	0.3191	0.2439	0.2820	0.2603	0.2758	0.2848
	PH 10	0.2272	0.3029	0.3170	0.3375	0.2446	0.2811	0.2250	0.2703	0.2185	0.0220
		0.2521	0.1141	0.2056	0.3000	0.3002	0.0957	0.2734	0.2380	0.2754	0.3159
		0.1910	0.3159	0.1741	0.2961	0.3192	0.1870	0.3540	0.2992	0.1892	0.2596
		0.3288	0.2570	0.2281	0.3304	0.2673	0.2670	0.3220	0.0232	0.0624	0.1804
Nacl	Nacl 2%	0.3199	0.3210	0.3160	0.2810	0.1930	0.2653	0.1278	0.3650	0.2219	0.3478
		0.2611	0.1874	0.1958	0.3173	0.2858	0.2130	0.3262	0.1622	0.2250	0.1283
		0.2283	0.1602	0.1555	0.1707	0.1470	0.2150	0.2164	0.2505	0.3250	0.2551
		0.1751	0.2867	0.3520	0.1757	0.2316	0.2059	0.1090	0.1520	0.1079	0.1660
	Nacl 4%	0.3414	0.3184	0.3156	0.2244	0.3621	0.2617	0.1030	0.1483	0.1070	0.4068
		0.3633	0.1874	0.2722	0.3685	0.2228	0.1992	0.1259	0.1229	0.2740	0.2720
		0.2756	0.1602	0.3715	0.1395	0.3096	0.1742	0.1252	0.0740	0.1100	0.2700
		0.3872	0.2867	0.4840	0.3080	0.1230	0.1606	0.2500	0.1970	0.1550	0.3550
	Nacl 6%	0.1028	0.0105	0.0540	0.1130	0.0880	0.0204	0.0126	0.0931	0.0320	0.1125
		0.0260	0.0340	0.0680	0.1120	0.0543	0.0490	0.0208	0.0630	0.0700	0.0030
		0.0640	0.0880	0.0130	0.9900	0.0220	0.0520	0.0778	0.0692	0.0826	0.0343
		0.0524	0.0540	0.0170	0.0585	0.0140	0.0039	0.0536	0.0060	0.0784	0.0625
	Nacl 8%	0.0928	0.0385	0.0590	0.0950	0.0840	0.0750	0.1144	0.0130	0.0803	0.1080
		0.0740	0.0800	0.0975	0.0980	0.0550	0.0720	0.0455	0.0160	0.0209	0.0675
		0.0198	0.0770	0.0645	0.0775	0.0808	0.0128	0.0192	0.0972	0.0860	0.0090
		0.0400	0.0166	0.0230	0.0680	0.0800	0.0480	0.0210	0.0650	0.0240	0.0345
	Nacl 10%	0.0420	0.0770	0.0300	0.0609	0.0450	0.0276	0.0530	0.0680	0.0970	0.0900
		0.0555	0.0500	0.0410	0.0758	0.0625	0.0505	0.0720	0.0510	0.0505	0.0702
		0.0750	0.0656	0.0780	0.0960	0.0920	0.0310	0.0630	0.0720	0.0480	0.0490
		0.0790	0.0765	0.0455	0.0850	0.0790	0.0780	0.0410	0.0400	0.0990	0.0840
Sucres	Saccaros e	0.1201	0.0652	0.1563	0.0792	0.0583	0.0472	0.0948	0.0517	0.1375	0.1798
		0.1838	0.0775	0.0605	0.1283	0.0994	0.0510	0.0574	0.1432	0.0662	0.0625

		0.0719	0.1229	0.1345	0.0774	0.1428	0.1539	0.1554	0.0845	0.0654	0.0203
		0.0708	0.1482	0.0612	0.1349	0.0778	0.1230	0.0381	0.0883	0.1182	0.0807
	Xylose	0.0495	0.0599	0.0273	0.0503	0.0339	0.0413	0.0338	0.0060	0.0028	0.0536
		0.0846	0.0886	0.1038	0.0653	0.0652	0.1140	0.0253	0.0265	0.1163	0.1073
		0.0618	0.0305	0.0448	0.0109	0.0380	0.0231	0.0592	0.1125	0.0359	0.0271
		0.0305	0.0383	0.0101	0.0748	0.0430	0.0217	0.0623	0.0326	0.0555	0.0183
	Galactose	0.0350	0.0600	0.1900	0.1920	0.0505	0.0490	0.0980	0.1230	0.1272	0.0624
		0.0605	0.0858	0.1510	0.0500	0.1600	0.1675	0.1060	0.1505	0.1570	0.1277
		0.0760	0.0450	0.0815	0.1930	0.1570	0.1975	0.1720	0.2039	0.0443	0.1221
		0.0825	0.0172	0.146	0.1520	0.1330	0.1560	0.0480	0.0289	0.2018	0.0491
	Glucose	0.0610	0.0620	0.0134	0.0713	0.0238	0.0032	0.0406	0.0386	0.0343	0.0157
		0.1080	0.0380	0.0443	0.0776	0.0491	0.0016	0.0424	0.0109	0.1252	0.1145
		0.0635	0.1027	0.1298	0.0701	0.0718	0.0608	0.0074	0.0867	0.0402	0.0483
		0.0601	0.1435	0.0701	0.1306	0.0629	0.1045	0.0371	0.1335	0.0449	0.1182
	Fructose	0.0090	0.0370	0.0392	0.0098	0.1083	0.0059	0.0143	0.0796	0.0472	0.0566
		0.0714	0.0776	0.0551	0.1320	0.0571	0.0662	0.0293	0.0122	0.0682	0.0555
		0.0547	0.0535	0.0503	0.0717	0.0942	0.0035	0.0687	0.0719	0.0841	0.0208
		0.0284	0.0317	0.1182	0.0061	0.0261	0.0942	0.0394	0.0120	0.0173	0.0952

Annexe 02 :

Modèle linéaire général : D.O. en fonction de Isolats; Ph

Facteur Type Niveaux Valeurs

Isolats fixe 15 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15

Ph fixe 4 1; 2; 3; 4

Analyse de la variance pour D.O., avec utilisation de la somme des carrés

ajustée pour les tests

Source	DL	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Isolats	14	0,114545	0,114545	0,008182	4,34	0,000***
Ph	3	0,136044	0,136044	0,045348	24,07	0,000***
Isolats*Ph	42	1,825819	1,825819	0,043472	23,08	0,000***
Erreur	180	0,339092	0,339092	0,001884		
Total	239	2,415499				

Modèle linéaire général : D.O.NaCl en fonction de Isolats1; Niv NaCl

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
Isolats1	fixe	15	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15
Niv NaCl	fixe	5	1; 2; 3; 4; 5

Analyse de la variance pour D.O.NaCl, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

Source	DL	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Isolats1	14	1,198551	1,198551	0,085611	18,48	0,000***
Niv NaCl	4	0,195267	0,195267	0,048817	10,54	0,000***
Isolats1*Niv NaCl	56	1,310008	1,310008	0,023393	5,05	0,000***
Erreur	225	1,042484	1,042484	0,004633		
Total	299	3,746310				

Modèle linéaire général : D.O.S. en fonction de Isolats1; Sucres

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
Isolats1	fixe	15	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15
Sucres	fixe	5	1; 2; 3; 4; 5

Analyse de la variance pour D.O.S., avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

Source	DL	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Isolats1	14	0,233674	0,233674	0,016691	13,58	0,000***
Sucres	4	3,661026	3,661026	0,915256	744,39	0,000***
Isolats1*Sucres	56	1,656773	1,656773	0,029585	24,06	0,000***
Erreur	225	0,276645	0,276645	0,001230		
Total	299	5,828118				

Annexe 03 : Informations de groupement avec la méthode de Dunnett et un niveau de confiance

de 95,0%

Isolats	N	Moyenne	Groupement
11 (contrôle)	16	0,1835	A
13	16	0,2468	
1	16	0,2347	
5	16	0,2200	A
8	16	0,2014	A
4	16	0,2010	A
14	16	0,1998	A
12	16	0,1986	A
9	16	0,1965	A
2	16	0,1864	A
10	16	0,1862	A
3	16	0,1838	A
7	16	0,1802	A
6	16	0,1680	A
15	16	0,1659	A

Annexe 04 :

Informations de groupement avec la méthode de Dunnett et un niveau de confiance de 95,0%

Isolats	N	Moyenne	Groupement
11 (contrôle)	20	0,18192	A
2	20	0,22639	A
12	20	0,20325	A
1	20	0,19148	A
6	20	0,17172	A
7	20	0,15462	A
9	20	0,12575	A

14	20	0,12375	A
3	20	0,10099	
4	20	0,07841	
5	20	0,05617	
8	20	0,05361	
13	20	0,04661	
10	20	0,04633	
15	20	0,03381	

Annexe 05:

Informations de groupement avec la méthode de Dunnett et un niveau de confiance de 95,0%

Isolats1 N Moyenne Groupement

11 (contrôle)	20	0,1233	A
14	20	0,2088	
13	20	0,2046	
9	20	0,1992	
8	20	0,1923	
10	20	0,1647	
3	20	0,1615	
4	20	0,1609	
6	20	0,1594	
15	20	0,1537	A
12	20	0,1510	A
7	20	0,1510	A
2	20	0,1435	A
1	20	0,1258	A
5	20	0,1183	A