République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tebessi –Tébessa-

Isolement et caractérisation des bactéries fixatrices d'azote et symbiotiques de la légumineuse spontanée *Hedysarum spinosissimum ssp.capitatum*

REMERCIMENT

Tout d’abord, nous remercions le DIEU, notre créateur tout puissant de nous Avoir donné la force, la volonté et le courage de mener ce modeste travail à terme.

Nous adressant nos respects et reconnaissance à notre encadreur **Dr, DEKAK Ahmed**, pour son aide, ses précieux conseils, ses orientations et pour toute l’attention qu’il nous a prodigués tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions les honorables membres du jury **Mr, MEKAHLIA Mouhammed Enacer** et **Mr, FATMI Hindel** qui nous ont Font l'honneur de corriger et juger notre travail.

A tous les enseignants, à toute la promotion de 2éme Année Mastère en biotechnologie végétale, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

العنوان :عزل و تصنيف البكتيريا المثبة للنيتروجين و المتعايشة مع البقوليات الزراعية التلقائية

Hedysarum spinosissimum ssp.capitatum

الملخص

معظم الدراسات التي اجريت على بكتيريا العقد الجذرية ركزت على تصنيف البكتيريا المثبة للنيتروجين و المتعايشة مع البقوليات الزراعية، وذلك لزيادة المردود ،وفي الوقت نفسه قليل من الدراسات خصت البكتيريا المتعايشة مع البقوليات البرية.

تهدف هذه الدراسة الى الوصف المظهري للبكتيريا المتعايشة والمعزولة من العقد الجذرية لـ:

(Hedysarum spinosissimum ssp.capitatum) التي تنمو في المناطق الجافة والشبه جافة شمال شرق الجزائر وذلك عن طريق دراسة بعض الخصائص المظهرية ، الفيزيولوجية والبيو كيميائية. وذلك بغرض تحديد التنوع المظهري للعزلات استعمل خلال الدراسة الفيزيولوجية (مستويات حموضة مختلفة ، تركيز كلوريد الصوديوم ، درجات الحرارة) و مصادر الكربون(استيعاب الكربوهيدرات المختلفة) زيادة الى مصادر النيتروجين (استيعاب الاحماض الامينية) ثم تقييم اوجه التشابه بين العزلات باستخدام طريقة المجموعات الهرمية في حين تم تحليل تأثير العوامل المتعددة (AFC) لنفهم مدى تأثير العوامل المدروسة على كل مجموعة من العزلات

من جهة اخرى تم استعمال الخريطة الحرارية (Heat maps) وذلك للتأكد من التنوع المظهري للعازلات المدروسة ، انقسمت هذه الاخيرة الى مجموعتين حسب سرعة النمو (نمو بطيء ونمو سريع) اما التحليل الاحصائي فقد اظهر اختلاف متباين في استيعاب الكربوهيدرات كمصدر للكربون ونمو ملحوظ في وجود بعض الاحماض الامينية المستعملة

(B-alanine ,Lphenyalanine ,L-proline) و نقص في النمو مع (D-alanine , L-cysteine ,L-leucine) البكتيريا المعزولة اظهرت مقاومة الحموضة و حساسية للوسط القاعدي. استعمال تراكيز مرتفعة من الملوحة ثبط نمو العزلات مع اظهارها نمو في كافة درجات الحرارة المستعملة الى غاية ثلاث و أربعون درجة مئوية .

تم اظهار التنوع البيولوجي لبكتيريا المتعايشة مع (*Hedysarum spinossisimum ssp.capitatum*)

باستعمال طريقة المجموعات الهرمية فاظهرت لنا ثلاث مجموعات مختلفة اما طريقة التصنيف المزدوج (Heat maps) اظهر مجموعتين مظهرتين مختلفتين .

الكلمات المفتاحية : *Hedysarum spinossisimum ssp.capitatum*،بكتيريا العقد الجذرية، جافة والشبه الجافة

Titre : Isolement et caractérisation des bactéries fixatrices d'azote et symbiotiques de la légumineuse spontanée *Hedysarum spinosissimum ssp.capitatum*

Résumé :

La plupart des études sur les rhizobia concernant l'identification et la systématique des symbiotes qui nodulent les légumineuses des cultures en raison de leurs intérêts à améliorer le rendement. Cependant peu d'études sont axèes sur les bactéries fixatrices d'azote endosymbiotiques qui nodulent des espèces des légumineuses spontanées en particulier dans l'Algérie .Ce travail vis à caractériser phénotypiquement les bactéries symbiotiques et fixatrices d'azote isolées des nodosités des racines de la légumineuse spontanée et endémique de l'Algérie localisées dans les régions arides et semi-arides (*H spinosissimum ssp.capitatum*)par une étude des profils phénotypiques par examen des variations de croissance des isolats endosymbiotes dans différentes conditions environnementales. La caractérisation phénotypique a été réalisée à l'aide de tests physiologiques (pH différents , concentrations de NaCl et tolérance a la température), d'expériences nutritionnelles (assimilation de différentes glucides et acides aminées).les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de la variance suivi d'un test de comparaison multiple , la biodiversité des isolats a été testé par une analyse factorielle des correspondances (AFC) et la carte thermique qui associée un double clustering Les douze isolats isolés à partir des nodosités racinaires de la plante étudiée se divisent en deux groupes selon leur vitesse de croissance. Les mesures de la densité optique a montré une différence claire dans l'assimilation des carbohydrates .Les isolats ont montrés une croissance maximale en utilisant le L-leucine, D-alanine et L-cystéine alors que le B-alanine, L-phénylalanine et L-proline ont altérés le développement des isolats testés. Les BNL isolées ont montrées une certaine tolérance au pH acide et une nette sensibilité au pH alcalin, par contre les concentration élevées en NaCl on diminuées les taux de croissances des isolats avec un spectre de résistance au température large qui peut atteindre 43◦c.

Mots clés : *H spinosissimum ssp.capitatum*,BNL,semi-aride ,endémique.

Title: ***isolation and characterization of symbiotic and nitrogen-fixing bacteria from spontaneous legume nodules Hedysarum spinosissimum ssp.capitatum***

Abstract :

Most studies on rhizobia have focused on the identification and systematics of symbionts that nodulate crop legumes because of their improved yielding interests, however few studies have access to endosymbiotic nitrogen-fixing bacteria which nodulates species of spontaneous legumes bacteria isolated from the root nodules of endemic legume *(H spinosissimum ssp.capitatum*) located in the arid and semi-arid regions in Algeria by a study of the phenotypic profiles by the examination of growth variations of the endosymbiotic isolates under different environmental conditions. The phenotypic characterization was carried out using physiological tests (different pH, NaCl concentrations and temperature tolerance), nutritional experiments (assimilation of different carbohydrates and amino acids). datas were analyzed using an analysis of the variance followed by a multiple comparison test, the biodiversity of the isolates was tested by Correspondence factorial analysis (CFA) and the heat maps associated with double clustering . Optical density measurements showed a clear difference in carbohydrate uptake. They showed maximum growth using L-leucine, D-alanine and L-cysteine while B-alanine, L-phenylalanine and L-proline altered the development of the tested isolates. BNLs have shown some tolerance to acidic pH and distinct sensitivity to alkaline pH, otherwise high NaCl concentrations have decreased growth rates of isolates with a broad temperature resistance spectrum up to 43 ° C. Study of the BNLs biodiversity associated with *H spinosissimum ssp.capitatum* by the ascending hierarchical analysis revealed the presence of three different phenotype groups on the other hand the study of the biodiversity of the isolates using the double clustering method (heat maps) shows that the twelve bacteria isolated from the root nodules of the studied plant are phenotypicaly divided into two groups according to their growth rate.

Key words: ***H spinosissimum ssp.capitatum*****,BNL ,arid and semi-arid**

Liste d’abréviation

α Alpha

β Beta

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNr Acide désoxyribonucléique ribosomique

ANOVA Analyse de la variance

BNL Bactéries nodulant les légumineuses

BNR Bactéries du nodule racinaire

pH Potentiel hydrique

T° Température

NaCl Chlorure de sodium

C Carbone

CAH Classification hiérarchique ascendante

CH4 Méthane

CO2 Dioxyde de carbone

Cm Centimètre

DO Densité optique

Fix Gène fixateur d’azote

H2NO3 Acide nitrique

HgCl2 Chlorure de Mercure

K Kilogramme

KD Kilo Dalton

M Mol

Mo	Molybdène
N	Azote
N2	di azote
N2O	Oxyde d’azote
NO3	Nitrates
YMA	Yeast Mannitol agar
YMB	Yeast Mannitol broth
H	Hedysarum
g	gramme
AFC	analyse factorielle des correspondances
UMA	unité de masse moléculaire
(Fe)	Fer
(S)	Soufre
Na,	sodium
Ca	calcium
K	potassium
K2HPO4	Hydrogénophosphate de potassium
MgSO47H2O	Magnesium Sulfate Heptahydrate
NaCl	Chlorure de sodium
nm	nanométre
Ppm	particule par million
CO2	Dioxyde de carbone
N2O	Oxyde d’azote

NO3	Nitrates
NH4	Ammonium
NH3	Ammoniac
Nif	Nitrogen fixation = gène de fixation d’azote
NifD	Nitrogénase molybdène-fer et chaine 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

Liste des figures

Figure	titre	Page
01	Cycle de l'azote	**06**
02	Processus de minéralisation de l'azote	**07**
03	classification des légumineuses	**15**
04	Diversité des Légumineuses	**16**
05	les différents stades de l'organogenèse de la nodulaire	**18**
06	Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote	**21**
07	Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel	**23**
08	Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique l'action des facteurs Nod	**24**
09	Présentation simplifiée d'un facteur Nod	**25**
10	Différents types de gènes nod	**26**
11	la structure de nitrogénase	**29**
12	la carte de localisation du site de prélèvement (Bekkaria)	**35**
13	Hedysarum. spinosissimum.ssp.capitatum	**36**
14	Spectrophotomètre à flamme	**37**
15	racines nodulés de H.Spinosissimum	**38**
16	Conservation des nodules sous CaCl2	**39**
17	l'ensemencement par la méthode de 4 cadrons	**40**
18	Aspect morphologique d'isolat E3N1 sur le milieu YMA-RC	**47**

19	Aspect des isolats sur le milieu YMB	**47**
20	croissance des isolats sur le milieu YMA	**48**
21	Utilisation des sucres comme source de carbone par les isolats.	**49**
22	Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les isolats	**50**
23	Courbes de régression de la croissance des isolats sous l'effet d'un gradient croissant des concentrations en NaCl	**51**
24	Effet des différents pH sur la croissance des isolats	**52**
25	Dendrogramme montrant la biodiversité des isolats étudiés	**55**
26	Projection des isolats et paramètres étudiés sur un plan factoriel en utilisant l'analyse des composantes principales	**56**
27	La carte thermique (Heat maps) montrant le comportement des isolats vis-à-vis les paramètres étudiés (sucres) (acides aminées)(concentrations (NaCl)(pH)	**67**

Liste des tableaux :

Tableau n=°	Titre	
01	Généralité sur l'azote	04
02	Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote	09
03	La taxonomie actuelle des rhizobiums	33
04	les isolats utilisés dans cette étude	43
05	ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée des quatre paramètres étudiés	52
06	Effet de la température sur les isolats	54

Table des matières

Table des matières

Remerciement

الملخص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction **01**

Chapitre 01 : Etudes bibliographique

1. La fixation de l'azote **04**

1.1 L'azote **04**

1.1.1 L'azote minéral **05**

1.1.2 Azote ammoniacal ou ammonium **05**

1.1.3 Azote nitrique **05**

1.1.4 Azote nitrite **05**

1.2 Le cycle de l'azote **06**

1.2.1 Minéralisation de l'azote organique **07**

1.2.2 L'ammonification **07**

1.2.3 la nitrification **07**

1.2.4 La dénitrification **08**

2. La fixation biologique de l'azote **08**

2.1 Les microorganismes fixatrices d'azote **08**

2.1.1 Les fixateurs libres **10**

2.1.2 Les fixateurs symbiotiques **10**

a. Le genre rhizobium **10**

b. Le genre bradyrhizobium **11**

c. Le genre Sinorhizobium **11**

d. Le genre Mesorhizobium **11**

e. Le genre Azorhizobium **12**

3. La symbiose **12**

3.1 La symbiose Rhizobium/légumineuse **12**

3.2 Légumineuses **13**

3.2.1 Généralités et classification **13**

3.2.2 Classification des légumineuses **14**

a. Caesalpinoideae **14**

b. Mimosoideae **14**

c. Papilionoideae **14**

4. La nodulation

4.1 Historique de la nodulation 17

4.2 Formation de la nodosité 17

4.3 Les zones de la nodulation 18

4.4 Morphologie des nodules 19

4.4.1 Nodules déterminées 19

4.4.2 Nodules indéterminées 19

5. Les étapes de la nodulation 19

5.1 Le dialogue moléculaire 20

5.2 La spécificité de la hôte 21

5.3 Infection 22

5.4-Génétique de la fixation 24

5.4.1 Les flavonoïdes 24

5.4.2 Les facteurs Nod 25

5.4.3 Les gènes Nod 26

5.5 Les gènes de la fixation 27

27

5.5 1 Les gènes nif

5.5.2 Les génes fix 27

5.6 Biochimie de la fixation 28

5.6.1 La nitrogénase bactérienne : 28

5.6.2 La léghémoglobine 30

6. Taxonomie des rhizobiums 30

6.1 Les bactéries : rhizobia 30

6-2 Caractères morphologiques du genre Rhizobium 30

6.3 Caractères biochimiques 31

6.4 Caractères génétiques 31

6.5 Croissance des rhizobia 31

6.6 Classification des rhizobia 31

Chapitre 02 Matériel et méthode

1. Identification des souches de Rhizobia nodulant «*Hedysarum.spinosissimum ssp.capitatum*» 35

1.1 Zone de prélèvement 35

1.2 *Hedysarum. Spinosissimum. Ssp. capitatum* 36

1.2.1 Classification botanique (Quazel et Santa, 1962) 36

2. Analyse chimique du sol 37

3. Isolement des bactéries à partir des nodules 37

3.1 Collecte des nodules 37

3.2 La conservation des nodules 38

3.3 Isolement des bactéries à partir des nodules 39

3.3.1 Stérilisation des nodules **39**

3.3.2 Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés **39**

4. Purification des isolats **40**

4.1 Principaux milieux de culture utilisés **41**

4.1.1 Culture dans le milieu YMB **41**

4.1.2 Culture dans le milieu YMA+RC **41**

4.1.3 Culture dans le milieu YMA **42**

5. Purification des Rhizobiums et conservation des souches **42**

5.1 Tests physiologiques (effet des facteurs abiotiques) **44**

5.1.1 Effet de ph **44**

5.1.2 Effet de salinité (tolérance du NaCl) **44**

5.1.3 Etude la température **44**

5.2 Tests biochimiques (tests nutritionnels) **44**

5.2.1 La source de carbone **44**

5.2.2 Utilisation des acides aminés comme source d'azote **44**

6. Analyse statistique **44**

Résultats et discussion

1. Analyse chimique du sol **46**

2. Etude de partenaire bactérien isolé à partir des nodules de la plante légumineuse *Hedysarum.spinosissimum* **46**

2.1 La croissance sur YMA-RC **46**

2.2 La croissance sur le milieu YMB **47**

2.3 La croissance sur le milieu YMA **48**

2.4 Tests nutritionnels **48**

2.4.1 Sources de carbone **48**

2.4.2 Source de l'azote **49**

2.5 Tests physiologiques (Effet des facteurs abiotiques) **50**

2.5.1 Effet de la salinité (Tolérance au NaCl) **50**

2.5.2 Effet de pH **51**

2.5.3 La température de croissance **54**

3. Biodiversité des isolats **55**

Conclusion **59**

Références **62**

Annexes

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 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 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*).

Cette étude pionnière dans la caractérisation des rhizobia nodulant *Hedysarum spinosissimum ssp capitatum* pour la première fois tout au long de son aire de répartition. Cette étude vise à :

- ✓ caractériser phénotypiquement les isolats en utilisant des tests physiologiques et des expériences nutritionnelles.
- ✓ comparer les taux de croissance de ces isolats.
- ✓ estimer la diversité de BNL en étudiant le lien entre les isolats d'étude en utilisant des méthodes de regroupement basées sur la croissance de bactéries dans différentes conditions de culture, ce qui devrait éclaircir et comprendre la niche écologique des isolats.

Il est important d'identifier les organismes au niveau de la souche. Les effets bénéfiques des milieux des cultures dépendent souvent de la souche.

Chapitre 01
Synthèse Bibliographique

1. la fixation de l'azote

1.1 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 «ζωτ» (zoot) vivant –alors que l'azote est nécessaire à la vie (Pujic, 2009)

Tableau n°1 : Généralité sur l'azote (DAVID, 2009)

Nom, symbole, numéro	Azote, N, 7
Série Chimique	Non-métaux
Masse Volumique	1,2506g/l
Masse atomique	14,0067#177;0,0002 UMA
Coloration	Incolore
Odeur	Inodore
Saveur	Insipide

Dans notre vie, l'azote est présent dans les acides aminés, donc les protéines, l'ADN et la chlorophylle, Il est alors un des éléments clé pour le vivant. Etant le constituant essentiel des protéines, il intervient dans les principaux processus de développement de la plante (F.A.O., 2003). Sa forme la plus abondante, le diazote atmosphérique (N2. mais n'est pas directement assimilable par la majorité des êtres vivants.

Il est le seul élément nutritif qui n'est pas issu de la roche mère. On le trouve dans la nature sous deux états : à l'état libre où il constitue 80% de l'atmosphère terrestre et à l'état combiné, sous la forme organique ou minérale, Toutes les formes azotées soit minéral ou bien

organique font partie d'un cycle de transformation et de recyclage dont le bon déroulement est essentiel à l'équilibre des milieux naturels (DENIS, 2000).

1.1.1 L'azote minéral

La minéralisation est la réaction biologique conduisant à la formation de l'azote minérale (Nitrique et Ammoniacal) à partir de l'azote organique (Raven et al. ,2007).

1.1.2 Azote ammoniacal ou ammonium

L'azote ammoniacal résulte de la combinaison de l'azote (N) et de l'hydrogène (H). Sa formule chimique NH4+ est très proche de celle du gaz ammoniac (NH3) d'où elle dérive et qui se volatilise dans l'air. C'est une forme essentiellement transitoire et est le premier résultat de transformation dans le sol de l'azote organique (ammonification). Il est soluble dans l'eau mais bien retenu par le pouvoir sortant du sol (Raven et al. ,2007)

1.1.3 Azote nitrique

Il se forme naturellement par combinaison de l'azote (N) et de l'oxygène (O) du sol. Sa formule chimique est NO3-. C'est la forme la plus disponible pour les plantes qui provient de la transformation de l'azote ammoniacal (Nitrification. (Raven et al. , 2007)

1.1.4 Azote nitrite

Polluants chimiques les plus répandus, les nitrites sont produits par l'oxydation de l'ammoniaque ou proviennent de déchets agricoles, urbains et industriels. Les nitrites sont extrêmement toxiques et leur toxicité ne dépend pas du pH (PAGNI, 1998).

1.2 Le cycle de l'azote

Le terme cycle d'azote désigne l'ensemble des transformations que subit l'azote dans la biosphère, Le cycle de l'azote est le mouvement de l'azote entre la terre et l'atmosphère. Il consiste en une série de processus qui convertissent l'azote gazeux en substances organiques, puis en azote naturel (figure1). C'est un cycle continu entretenu par les décomposeurs et autres bactéries. Le cycle de l'azote peut être décomposé en quatre types de réaction (Dommergue et *al.*, 1999).

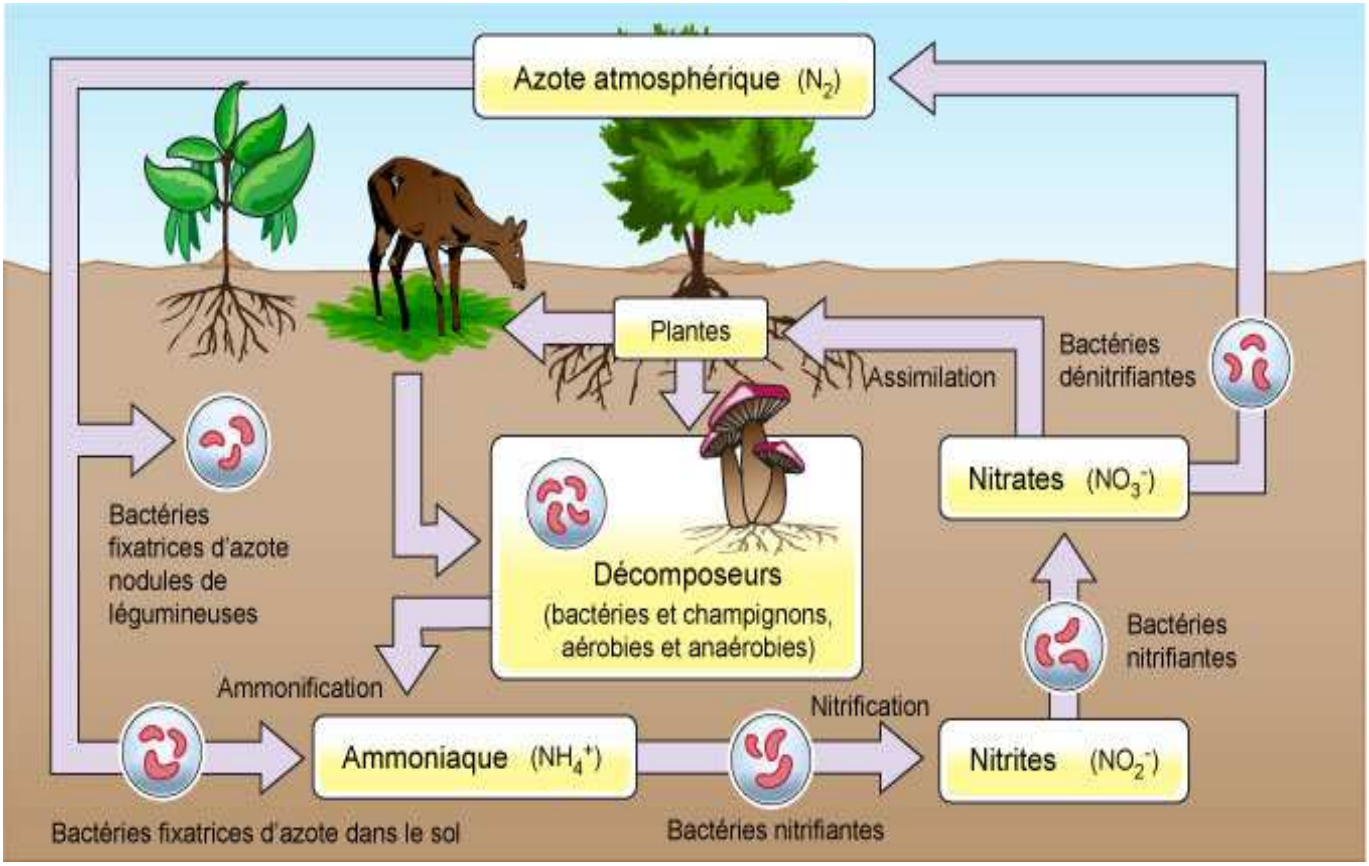


Figure 01 : Cycle de l'azote (Visionlearning 2000-2009.)

1.2.1 Minéralisation de l'azote organique

Après la fixation, l'azote moléculaire aboutit à la formation de substances azotées organiques qui, une fois au sol, subissent la minéralisation (Raven et *al, 2007*).

La minéralisation est la réaction biologique conduisant à la formation de l'azote minérale (Nitrique et Ammoniacal) à partir de l'azote organique (figure2). Les trois principales étapes de ce cycle sont: l'ammonification, la nitrification et la dénitrification (Raven et *al, 2007*).

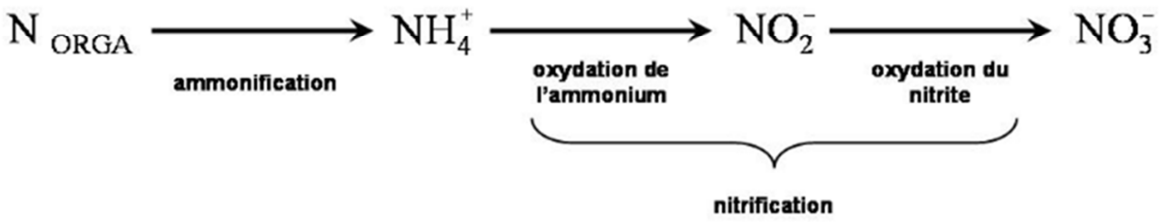


Figure 02 : Processus de minéralisation de l'azote (saoudi, 2008)

1.2.2 L'ammonification

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en ammonium (NH4+) sous l'action de micro-organismes hétérotrophes qui utilisent des substrats carbonés comme source d'énergie (VALE, 2006) car, elles n'ont pas la capacité d'oxyder le NO2- en NO3-. Cette forme est transitoire et sera transformé ensuite en azote nitrique.

1.2.3 La nitrification

La nitrification est la conversion biologique de l'azote minéral réduit (NH4+) en azote minéral oxydé sous forme de NO3- en passant par le NO2-.C'est un processus contrôlé par certains micro-organismes spécifiques, qui conduit la transformation de l'ion ammonium en nitrite puis celle de nitrite en nitrate (BARBAULT, 2009).

1.2.4 La dénitrification

La dénitrification est un processus microbien de respiration alternatif (anaérobie) .Elle est la principale voie de formation biologique de N2, au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux (N2) et l'oxyde d'azote (N2O), qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al.,2007*).

2. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est une activité microbienne très importante. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique (BARBAULT, 2009).

POSTGATE (1998) .La fixation biologique de l'azote est la transformation du N2 de l'atmosphère en ammoniac et son intégration directe dans le métabolisme de la plante.il s'agit d'un processus par lequel l'azote est pris de sa forme moléculaire normale et relativement inerte (N2) dans l'atmosphère et converti en composés d'azote (comme ammoniaque, nitrate et bioxyde d'azote).

La réaction catalysée est la suivante :

$N2+8\ H+ + 8\ é + 16\ Mg\ ATP \qquad 2NH3 + H2 + 16\ Mg\ ADP + 16Pi$

2.1 les microorganismes fixatrices d'azote

Deux groupes de microorganismes sont responsables de la fixation de l'azote atmosphérique, fixateurs symbiotiques et les fixateurs non symbiotiques (libres) .Le rôle des microorganismes dans ce phénomène ont été reconnu en 1888 par Hellriegel et Wilfart en constatant que des légumineuses non nodulées était incapable d'incorporer l'azote moléculaire.

Ces organismes présentent pratiquement tous les types de comportements en ce qui concerne les relations plante-micro-organisme, les relations avec l'oxygène et les modes trophiques comme le montre (tableau 02)

Tableau 02 : Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote (Roger et *al., 1996*)

Micro-organismes libres			
Aérobies	Hétérotrophes	Azotobacter spp.; Klebsiella pneumoniae;	
		Beijerinckia indica; Azospirillum lipoferum	
	Phototrophes: Cyanobactéries	Hétérocystées	Nostoc; Anabaena; Calothrix; Tolypothrix
		Homocystées	Trichodesmium; Oscillatoria
		Unicellulaires	Gloeothece; Gloeocapsa
Anaérobies	Hétérotrophes	Clostridium pasteurianum; Desulfovibrio vulgaris;	
		Desulfotomaculum spp. ; Methanobacterium spp.	
	Phototrophes	Rhodospirillum rubrum; Rhodobacter capsulata;	
		Chromatium vinosum	
Microorganismes symbiotiques			
Légumineuses	à nodules racinaires	Rhizobium meliloti	
		Bradyrhizobium japonicum	
	à nodules caulinaires	Azorhizobium caulinodans	
Symbioses actinorhiziennes		Frankia	

Symbioses à cyanobactéries	Azolla	Anabaena azollae
	Cycas	Anabaena cycadeae
	Lichens	Nostoc
	Mousses et hépatiques	Nostoc

2.1.1 Les fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres variés : bactéries aérobies chimioorganotrophes (Acetobacter, Azobacter, Azospirillum), bactéries anaérobies strictes (Clostridium) ou aérobies facultatives (Bacillus, Klebsiella, Pseudomonas), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (Rhodobacter, Rhodospirillum) et des cyanobactéries (Synechococcus) (Renier, 2008).

2.1.2 Les fixateurs symbiotiques

Malgré que les espèces fixatrices d'azote sont nettement moins nombreuses que les fixateurs libres mais ils sont le système fixateur de N2 le plus important. Celles-ci sont responsables chaque année de la réduction de 120 millions de tonnes d'azote atmosphérique en ammonium (FREIBERG et al., 1997)

On y rencontre essentiellement les rhizobiums des actinomycètes (Frankia) bactérie filamenteuse (Hopkins, 1999), et des cyanobactéries (Pelmont, 1995).Il s'agit notamment des genres rhizobium, sinorhizobium, azorhizobium, bradyrhizobium et le cinquième genre récemment découvert par Lindstrom et al. (1988) appelé Mesorhizobium (de Lajuide et al., 2000)

a. Le genre rhizobium

Les rhizobiums sont des bactéries du sol qui se caractérisent par leur faculté unique d'infecter les poils absorbants des légumineuses et de produire sur les racines des nodules, siège de la fixation d'azote atmosphérique (Franche et al., 2009).

Ils sont des micro-organismes en forme de bâtonnet qui existent uniquement à l'état végétatif. Ce sont des bactéries Gram négatif. A la différence de nombreux autres microorganismes du sol, les rhizobiums ne produisent pas de spores. Ils sont aérobies et

mobiles (Jordan, 1984). Le rhizobium est classé parmi les espèces économiquement importantes. Cet intérêt provient du fait de l'importance de la quantité d'azote dont il peut fixer. Cette fixation se déroule au sein des nodosités sur les racines des légumineuses (Gage, 2004)

Il regroupe des bactéries dites à croissance rapide (temps de génération inferieur à six heures), et comporte quatre espèces définies : Rhizobium leguminosarum, Rhizobium galegae (Lindstrom, 1989), Rhizobium tropici (Martinez-Romero et al., 1991), et Rhizobium etli (Segovia et al., 1992).

b. 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 1984 (El- Hilali, 2006), Comprenant les bactéries à croissance lente (Temps de génération supérieur à six heures). Ce genre ne comprenait qu'une seule espèce définie depuis son caractérisation par jordan et c'était Bradyrhizobium japonicum nodulant le soja (Glycine max) et le siratro (Macroptilium atropurpureum). Les deux nouvelles espèces, Bradyrhizobium elkanii (Kuykendal et al., 1992) et Bradyrhizobium liaoningensis (Xu et al.,1995) ont été récemment définies. Les bactéries appartenant au genre Bradyrhizobium infectent de nombreuses légumineuses tropicales.

c. Le genre Sinorhizobium

Sinorhizobium meliloti a été isole de meliloti et caractériser pour la première fois par Dangeard en 1926. Il est actuellement constitué de quatre espèces. Deux espèces, Sinorhizobium meliloti (Jordan, 1984; Eardly et al., 1990) et Sinorhizobium fredii (Schola et Elkan, 1984), qui appartenaient auparavant au genre Rhizobium sont incluses dans ce nouveau genre. Deux nouvelles espèces, Sinorhizobium saheli et Sinorhizobium teranga ont été décrites (De Lajudie et al., 1994). Elles ont été reclassées au sein de genre Sinorhizobium en tant que Sinorhizobium fredii (Chen et al. ,1988).

d. Le genre Mesorhizobium

Ce groupe se distingue des autres rhizobiums par une flagellation polaire ou subpolairepar des souches à croissance intermédiaire entre celles à croissance rapide et celles àcroissance lente et par la séquence de l'ADNr 16S. Les Rhizobium étant très hétérogène,

plusieurs branches divergentes ont été taxonomiquement identifiées. Celle de Rhizobium loti est très éloignée des autres branches et justifie donc la description d'un cinquième genre qui a été appelé Mesorhizobium et où seront regroupées au moins six espèces, Mesorhizobium loti (Jarvis et al, 1982), Mesorhizobium huakuii(Maougal, 2004), Mesorhizobium ciceri, Mesorhizobium tianshanense, Mesorhizobium mediterraneum, Mesorhizobium plurifarium (de Lajudie et al., 1994)

e. Le genre Azorhizobium

Comprend une seule espèce définit Azorhizobium caulinodans qui nodule les tiges et les racines de Sesbania rostrata (Dreyfus et al., 1988) , c'est cette bactérie qui une fois isolé de la nature est très utile pour fournir l'Azote nécessaire à la plante. Les Azorhizobium seraient des bactéries aquatiques ayant reçu par conjugaison avec des Rhizobium du sol (peut être desSinorhizobium) des gènes de nodulation, et qui seraient devenus spécifique de la nodulation de tige de la légumineuse aquatique Sesbania rostrata.

3. la symbiose

Elle permet à deux espèces différentes de vivre ensemble, chacun tirant profit de l'autre. La symbiose et souvent une relation régulière et obligatoire entre des partenaires bien spécifiques**.** Il est y a 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 (Broghton, 2000).

3.1 La symbiose Rhizobium/légumineuse

La symbiose légumineuse- Rhizobium est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. Après les mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, la bactérie induit chez la plante la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires (Campa, 1998).

Ce processus est indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi au rhizobium pour obtenir les nutrimentsnécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie,celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven et al., 2000). Grâce à cette symbiose, les légumineuses sont capables de pousser dans des sols pauvres en azote minéral ou organique (Gough, 2009).

3.2 Légumineuses

3.2.1 Généralités et classification

Les légumineuses constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun ayant un ovaire libre, constitué par un seul carpelle qui donne un fruit appelé gousseou légume (Come et *al.*, 2006). Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermesen nombre d'espèces après les Orchidaceae et les Asteraceae, avec 727 genres et près de 20000 espèces (Cronk et *al.*, 2006*).*

Cette famille comprend plus de plantes herbacées annuelles que de plantes ligneuses ; elle colonise aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques. Cette famille présente une importance économique majeure ; de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo) (Saoudi, 2008).

La nodulation des légumineuses par les Rhizobia est un phénomène très fréquent. En effet, parmi les 20% de légumineuses étudiées, 97% des espèces de la sous-famille des Papilionacés (Faboideae) (pois, haricot, fève, lentille, ...etc), 90% de la sous-famille des Mimosoideae (robinier, glycine, acacia, ...etc) et 30% de la sous-famille des Caesalpinioideae (flamboyant, barbade, séné d'Alexandrie,...etc) sont nodulées (De Faria et *al.*, 1989).

Les légumineuses entretiennent une relation très privilégiée avec la rhizosphère qui entoure leurs racines. L'effet rhizosphérique des légumineuses est 20 à 30 fois supérieur à celui d'une betterave ou d'un colza. On entend par effet rhizosphérique, le ratio entre la microflore rhizosphérique, à l'interface racine/sol et la microflore du sol située à distance des racines (Waligora et *al.*, 2008).

3.2.2 Classification des légumineuses

En se basant sur la forme florale, la famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (Papilionoideae et Mimosoideae) et la troisième paraphylétique (Caesalpinoideae) (figure3) **(Guignard et Dupont, 2005)**. Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven et *al.*, 2000).

a. Caesalpinoideae

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Judd et *al.*, 2001).

b. Mimosoideae

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd et *al.*, 2001).

c. Papilionoideae

Ils renferment plus de deux tiers des espèces et incluent presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995). Ils renferment les espèces cosmopolites et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus (Dhane Fitouri, 2011).

Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd et *al*., 2001).

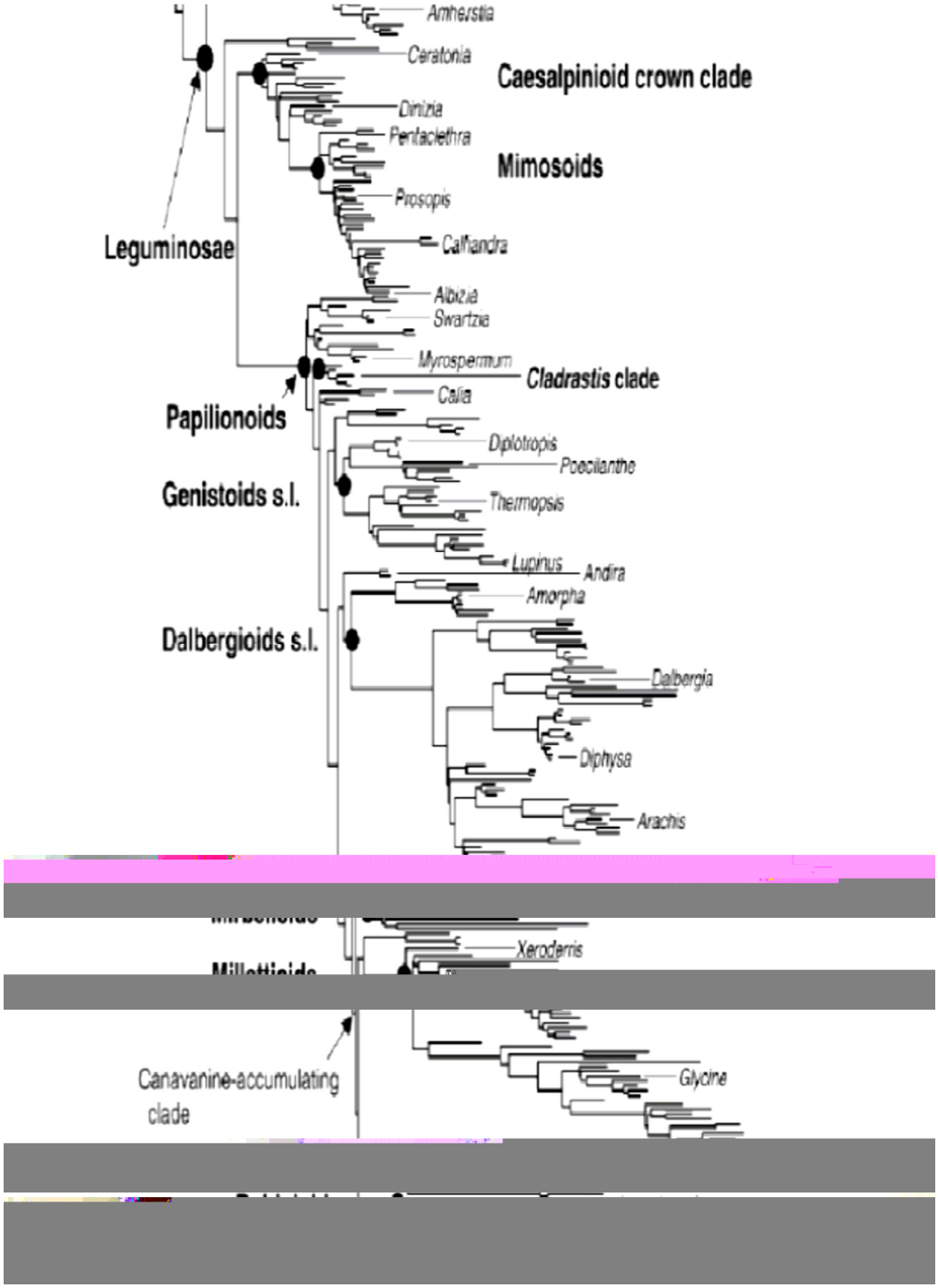


Figure 03 : classification des legumineuse (vernie 2006)

La figure 4 ci-après illustre de façon non exhaustive, la grande diversité biologique au sein de la famille des Légumineuses D'après VERNIE, 2006.

Figure 4 : Diversité des Légumineuse (VERNIE, 2006)

A. Glycine max, le soja (Papilionoideae);

B. Vigna unguiculata, le niébé (Papilionoideae) ;

C. Pisum sativum, le pois cultivé (Papilionoideae) ;

D. Cercis siliquastrum (Caesalpinoideae) ;

E. Albizia julibrissin (Mimosoideae);

F. Acacia albida (Mimosoideae).

bactérien, tel que Azorhizobium caulinodans qui ne s'associe qu'avec Sesbania rostrata (Dreyfus et *al.*, 1988), alors que cette légumineuse possède d'autres partenaires bactériens Sinorhizobium saheli et Sinorhizobium terangae (Boivin et *al.*, 1997).

5.3 Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques localisées à la surface des cellules (Dardanelli et *al.*, 2003; Perry et al., 2004). Les facteurs Nod émis par les rhizobiums, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de Ca2+. Cette étape se poursuit par une induction de l'expression de gènes spécifiques (Pelmont, 1995; Gage, 2004) et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger» qui enferme les rhizobiums (Esseling et *al.*, 2003).

L'infection qui s'accompagne d'une digestion d

5.4 Génétique de la fixation

5.4.1 Les flavonoïdes

Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des substances qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Certaines d'entre elles appartiennent aux groupes des flavonoïdes tels les flavones, isoflavones, flavonones …etc. Pour les bactéries fixatrices d'azote (Andiankaja, 2002). Les flavonoïdes sont des composés aromatiques, avec un squelette en C15, diversifiés en forme et en fonction avec l'évolution des plantes. Les principales sous-classes, déterminées selon les caractéristiques structurales des composés, sont : les chalcones, les flavones et flavanones, les isoflavones et isoflavanes et des formes polymérisées telles que les proanthocyanidines (Renier, 2008)

Le rôle principal des flavonoïdes dans le dialogue moléculaire est leur capacité à induire ou à inhiber la transcription des gènes de nodulation (Figure 08). Dans les phases les plus précoces de leur interaction avec des légumineuses, les rhizobia affichent une variété de réponses à la présence de flavonoïdes dans la rhizosphère. Pour ne citer que les principaux exemples, certains composés sont chimioattractants pour les rhizobia et peuvent stimuler leur croissance, d'autres, induisant les gènes nod (Cooper, 2004).

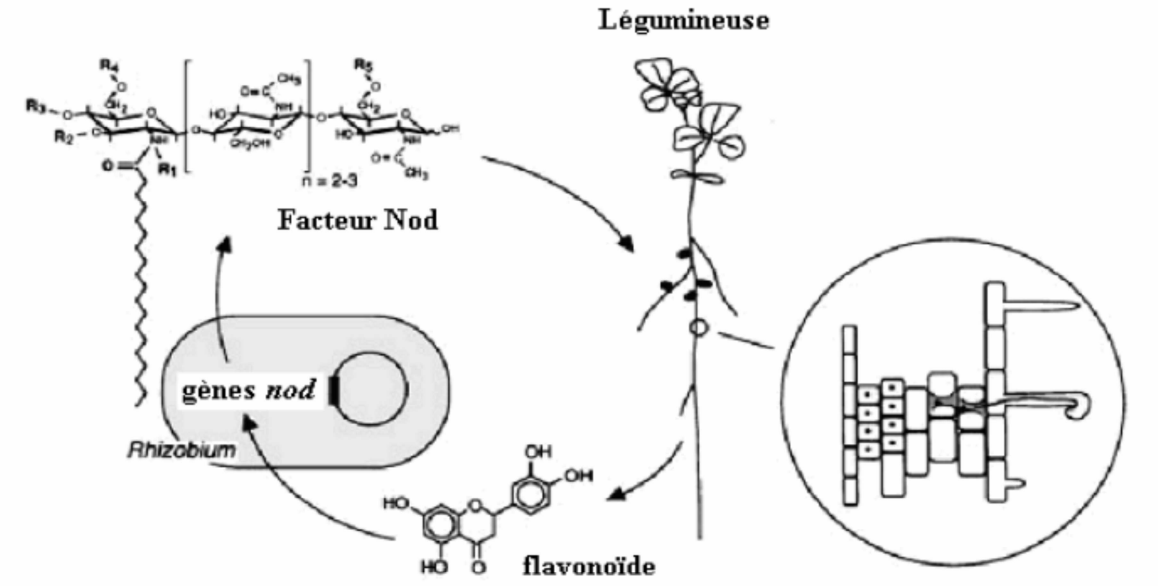


Figure 08 : Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique l'action des facteurs Nod (Shultze et Kondorosi, 1998).

5.4.2 Les facteurs Nod

Tous les facteurs Nod identifiés jusqu'à présent sont des oligomères de N-acétylglucosamine liés en β1, 4 et substitués par des groupes chimiques divers (Dénarié et *al.*, 1996; Lorquin et *al.*, 1997).D'autres parts tous les facteurs Nod décrits sont des lipochitooligosaccharides constitués de 3 à 5 résidus de N-acétyl-D-glucosamine, substituée par une chaîne d'acyle au niveau de la glucosamine terminale nonréductrice (Roche et *al.*, 1991). Selon la nature du rhizobium, le squelette de base est substitué par des groupements chimiques variés (fucose, arabinose, carbamoyl, méthyle, …), présents sur les glucosamines situées aux deux extrémités (Long, 1996 ; Perret et *al.*, 2000)(Figure 09). Ce sont ces différentes substitutions qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité et qui expliquent qu'une espèce de rhizobium donnée ne soit capable de noduler qu'un nombre limité de légumineuses. Les facteurs Nod purifiés provoquent, spécifiquement sur les plantes hôtes, et à de très faibles concentrations, des réactions voisines de celles induites par les rhizobiums vivants : déformations de poils absorbants, division des cellules corticales racinaires et, dans certains cas, formation de nodosités vides de bactéries (Dénarié et *al.*, 1996).

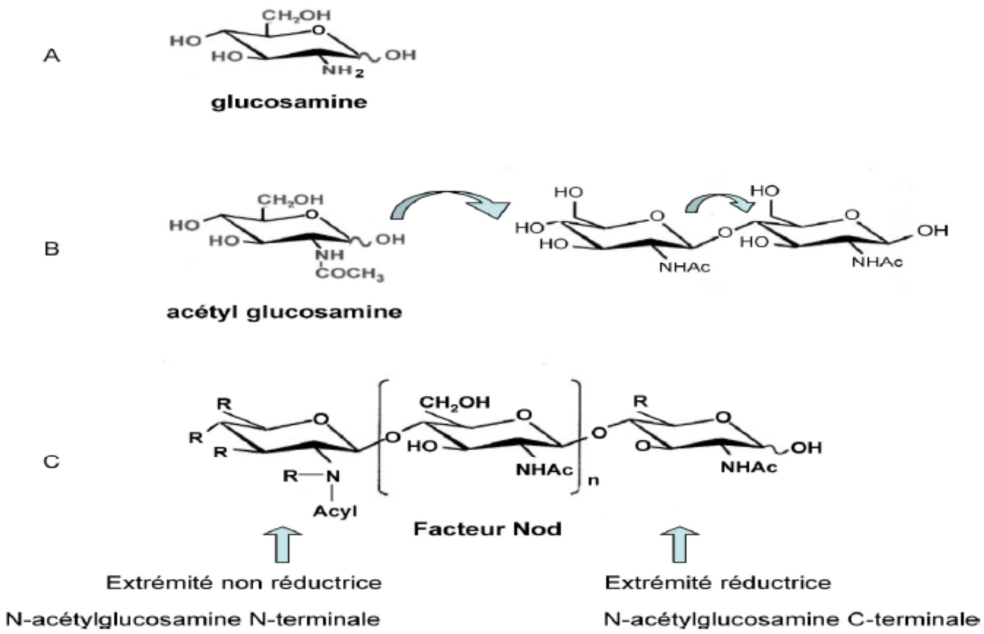


Figure 09: Présentation simplifiée d'un facteur Nod (Renier, 2008)

5.4.3 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) (Brougtho 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 Bisseling, 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. (Figure 10) ci-après illustre ce rôle régulateur du nod D et présente les autres gènes de nodulation.

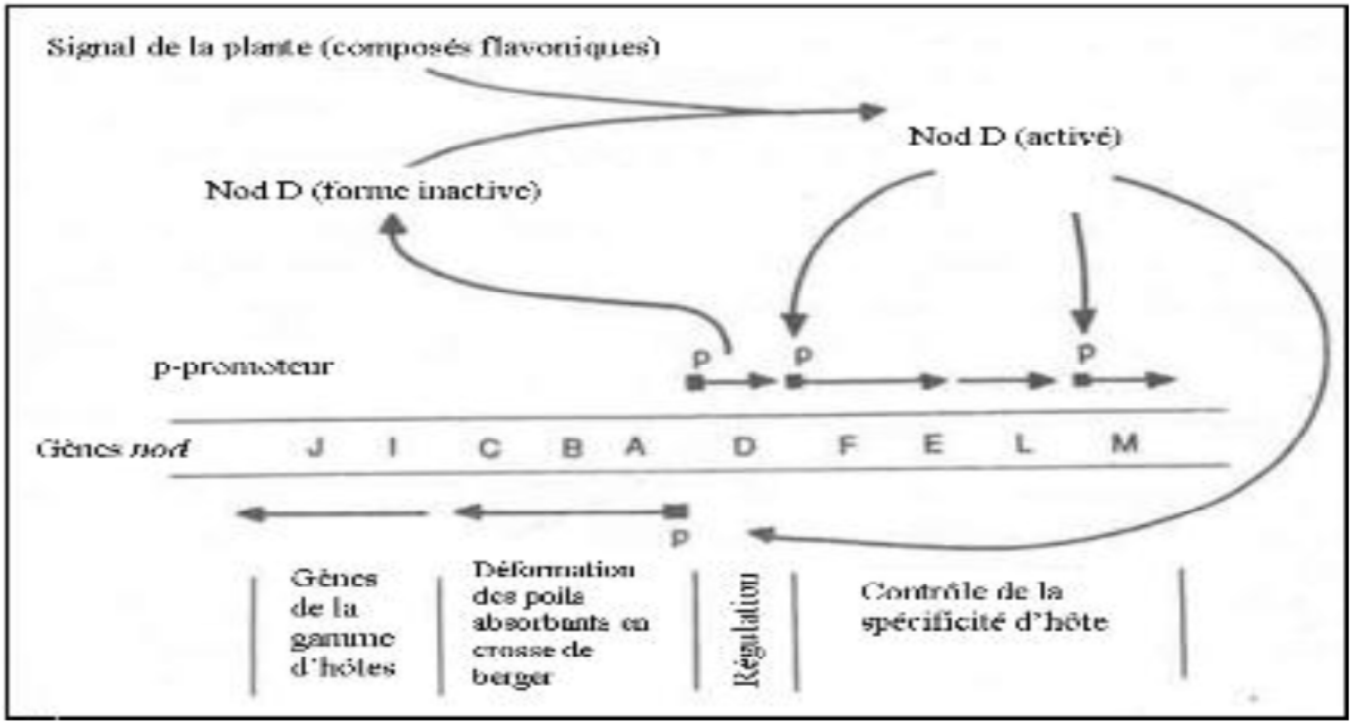


Figure 10 : Différents types de gènes nod (Kouakou 2011)

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 Dont 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).

5.5 Les gènes de la fixation

5.5.1 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, 1993).

5.5.2 Les gènes fix

Les 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). 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. 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.*, 1986). La protéine régulatrice fixL, située sur la membrane des bactéroïdes, est sensible à l'oxygène. En condition d'anoxie, fixL s'auto phosphoryle et la protéine fixJ est phosphorylée à son tour, par utilisation de fixL-Phos0phate 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.*, 1991).

5.6 Biochimie de la fixation

5.6.1 La nitrogénase bactérienne

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi, 2000). Les nodules de type indéterminé (Medicago truncatula, Pisum sativum) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (Lotus japonicus, Glycine max, Phaseolus vulgaris) sont formés à partir du cortex externe. La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique (Figure 11B). Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée (Dommergues et *al.* 1998) (Figure 11).

La structure de la nitrogénase a été largement étudiée. Elle comprend deux unités. Une unité avec le site actif de la réduction de l'azote atmosphérique : elle est aussi appelée dinitrogénase ou MoFe-protéine et une autre unité qui fournit des électrons à la première pour la réduction de l'azote moléculaire, elle est appelée dinitrogénase réductase ou Fe-protéine (Figure 11).

La dinitrogénase est un tétramère formée de deux sous-unités « alpha » codé par le gène nifD et de deux sous-unités « beta » codé par le gène nifK. Par contre, la dinitrogénase réductase est un homodimère codé par le gène nifH. Chaque composante de la nitrogénase est en fait une protéine contenant du fer (Fe) et du soufre (S) et pouvant comporter un site porteur

d'électrons. La dinitrogénase réductase ne peut transporter qu'un électron à la fois. Ainsi, on pense qu'elle sert probablement à l'emmagasinage temporaire de l'électron. Par contre, la dinitrogénase comporte deux autres sites métalliques (FeMoCo) qui sont considérés commeles véritables sites de la fixation d'azote. (Andiankaja, 2002)

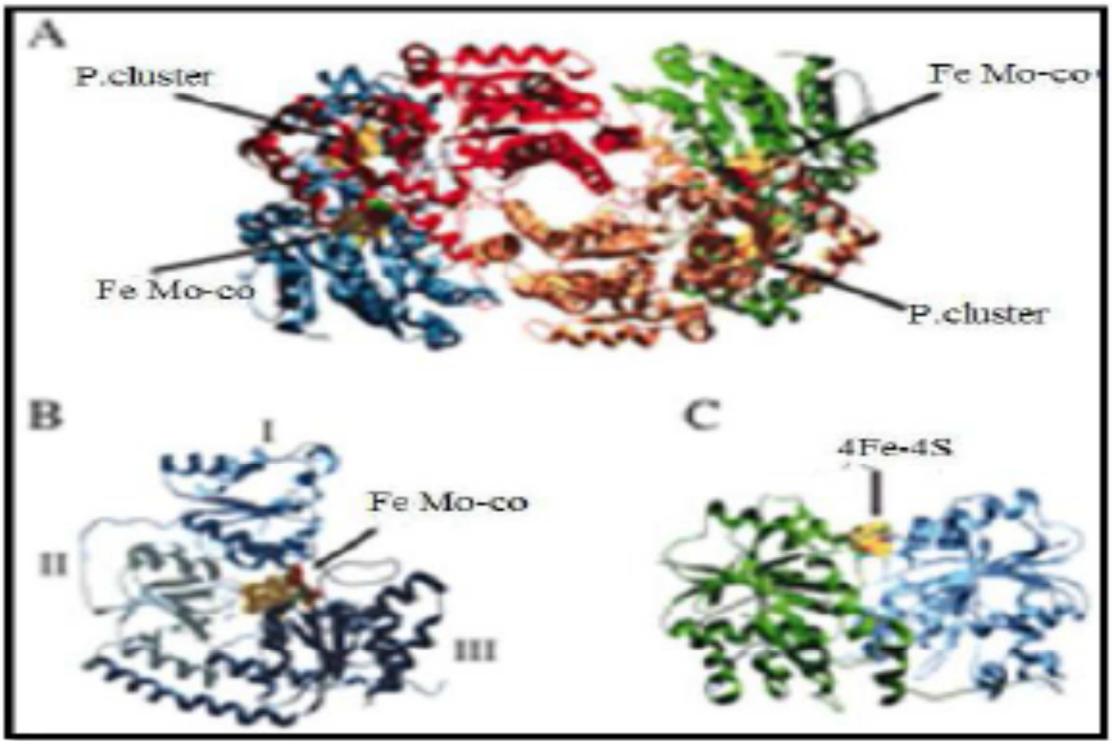


Figure 11 : la structure de nitrogénase (Rubio et Ludden, 2008).

Le complexe nitrogénase est constituée de deux composants : le composant I est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités représentées en bleu et vert et deux sous-unités représentées en rouge et orange (A), le détail de la sous-unité, est donné (B) et le composant II est un homodimère (C).

5.6.2 La léghémoglobine

La composante de la protection de la nitrogénase qui est extrêmement sensible et l'inactivation par les concentration élevée en O2 (noduline particulièrement affine pour l'oxygène, qui réduit la tension d'O2 dans la nodule, elle interviendrait aussi en facilitant le transport de l'O2 aux batéroïdes (Dommergues et *al.*,1998).

C'est une chromoprotéine formée de deux sous unités, de structure comparable aux globines ou de mycoglobine (Tourte et *al*, 2005; Hopkin, 2003). Synthétisée par la plante hôte, et peut constituer jusqu'à 30% des protéines de la cellule hôte (Hopkin, 2003).

Pour protéger la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène, la leghémoglobine de coloration rouge due à la présence du fer présente de similitudes avec les l'hémoglobine animales. Elle permet au *Rhizobium* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule (Kundu, 2003).

6. Taxonomie des rhizobiums

6.1 Les bactéries : rhizobia

Les rhizobia furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote, c'est Franck 1889 le premier a proposé le nom de Rhizobium (Gharzouli, 2006).

Du grec rhiza (qui signifie racine) et bio (vie), rhizobium signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Ces bactéries présentent la capacité de former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. (Benahmed, 2010). À la suite d'échanges de signaux moléculaires entre ces bactéries et leurs plantes hôtes, ces micro-organismes envahissent les racines et forment des nodules qui sont des structures fortement différenciées (Machrafi, 2001).

6.2 Caractères morphologiques du genre Rhizobium

Les rhizobia sont des cellules de taille moyenne en forme de bâtonnet, de 0,5- 0,9 µm de largeur et de 1,2-3,0 µm de longueur. Ils ne forment pas d'endospores, sont Gram négatif et sont mobiles (Somasegaram et Hoben, 1994).

6.3 Caractères biochimiques

Les rhizobia à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose (Grama, 2008). Des granules de poly-b-hydroxybutyrate sont souvent retrouvés à l'intérieur des cellules (Drouin, 1996).

6.4 Caractères génétiques

La génétique du Rhizobium n'est pas chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Gharzouli, 2006). La taille des génomes rhizobiens connus varie de 5,4 à 9,2 Mb et le nombre de plasmides varie entre 0 et 7 (laranjo et *al.,* 2014).

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de Rhizobium meliloti (Gharzouli, 2006).

6.5 Croissance des rhizobia

Sur le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), les formes à croissance rapide produisent des colonies blanches de 1 à 5 mm après 3 à 4 jours à 25 -28 °C, alors que les colonies à croissance lente sont détectables après 5 jours et n’excèdent pas 1 mm (Benahmed, 2010). Croissance des rhizobia Sur le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), les formes à croissance rapide produisent des colonies blanches de 1 à 5 mm après 3 à 4 jours à 25 -28 °C, alors que les colonies à croissance lente sont détectables après 5 jours et n’excèdent pas 1 mm (Benahmed, 2010).

6.6 Classification des rhizobia

La plupart de ces espèces bactériennes appartiennent à la famille des Rhizobiacae dans les alpha-protéobactéries et appartiennent aux genres Rhizobium, Mesorhizobium, Ensifer ou Bradyrhizobium. Cependant, des recherches récentes ont montré qu’ils existent de nombreuses autres espèces de rhizobium en plus de celles-ci. Dans certains cas, ces nouvelles espèces sont apparues par transfert latéral de gènes symbiotiques.

La progression de la taxonomie des rhizobiums est due à un nombre croissant de techniques efficaces disponibles dans la caractérisation bactérienne.

La classification des rhizobiums a subi de grands changements au cours des dernières années en raison de nouvelles données phylogénétiques et polyphasiques qui ont mené à la description de nouveaux taxons (Zahran, 2006).

Tableau 03 : La taxonomie actuelle des rhizobiums (Benselama, 2015).

Genres et espèces	Références
Rhizobium	Frank, 1889
Rhizobium alamii	New: Berge *et al.*, 2009
Rhizobium alkalisoli	New: Lu *et al.*, 2009b
Rhizobium cellulosilyticum	García-Fraile *et al.*, 2007
Rhizobium daejeonense	Quan *et al.*, 2005
Rhizobium etli	Segovia *et al.*, 1993
Rhizobium galegae	Lindstrom, 1989
Rhizobium gallicum	Amarger *et al.*, 1997
Rhizobium giardinii	Amarger *et al.*, 1997
Rhizobium hainanense	Chen *et al.*, 1997
Rhizobium huautlense	Wang *et al.*, 1997
Rhizobium indigoferae	Wei *et al.*, 2002
Rhizobium leguminosarum	Frank, 1879; Frank, 1889
Rhizobium loessense	Ancien nom "*Rhizobium huanglingense*" Weir *et al.*, 2003
Rhizobium lusitanum	Valverde, 2006
Rhizobium mesosinicum	Lin *et al.*, 2009
Rhizobium miluonense	Gu *et al.*, 2008
Rhizobium mongolense	Vanberkum *et al.*, 1998
Rhizobium multihospitium	Han *et al.*, 2008
Rhizobium oryzae	
Rhizobium phaseoli	Peng *et al.*, 2008
Rhizobium pisi	Confirmée comme une espèce. Ramirez-Bahena *et al.*, 2008
Rhizobium tibeticum	Ramirez-Bahena *et al.*, 2008
Rhizobium sullae	New: Hou *et al.*, 2009
Rhizobium tropici	Ancien nom "*Rhizobium hedysari*" Squartin *et al.*, 2002
Rhizobium tubonense	Martinez-romero *et al.*, 1991
Rhizobium undicola	Zhang *et al.*, 2011
	de Lajudie *et al.*, 1998a; Young *et al.*,2001
Rhizobium vignae	
Rhizobium yanglingense	Ren *et al.*, 2011
	Tan *et al.*, 2001
Mesorhizobium	
	Jarvis *et al.*, 1997
Mesorhizobium albiziae	
Mesorhizobium alhagi	Wang *et al.*, 2007
Mesorhizobium amorphae	Chen *et al.*, 2011
Mesorhizobium australicum	Wang *et al.*, 1999
Mesorhizobium camelthorni	Nandasena *et al.*, 2009
Mesorhizobium caraganae	Chen *et al.*, 2011
Mesorhizobium chacoense	Guan *et al.*, 2008
Mesorhizobium ciceri	Velazquez *et al.*, 2001
Mesorhizobium gobiense	"*Rhizobium ciceri*" Nour *et al.*, 1994; Jarvis *et al.*, 1997
Mesorhizobium huakuii	Han *et al.*, 2008b
Mesorhizobium loti	Chen *et al.*,1991; Jarvis *et al.*,1997
	Jarvis *et al.*, 1982; Javis *et al.*, 1997
Mesorhizobium mediterraneum	
Mesorhizobium metallidurans	Nour *et al.*, 1995; Javis *et al.*, 1997
Mesorhizobium opportunistum	Vidal *et al.*, 2009
Mesorhizobium plurifarium	Nandasena *et al.*, 2009
Mesorhizobium robiniae	de Lajudie *et al.*, 1998b
Mesorhizobium shangrilense	Zhou *et al.*, 2010
Mesorhizobium septentrionale	Lu *et al.*, 2009a
Mesorhizobium tarimense	Gao *et al.*, 2004
Meorhizobium temperatum	Han *et al.*, 2008b
Mesorhizobium tianshanense	Gao *et al.*, 2004
	Chen *et al.*, 1995; Jarvis *et al.*, 1997

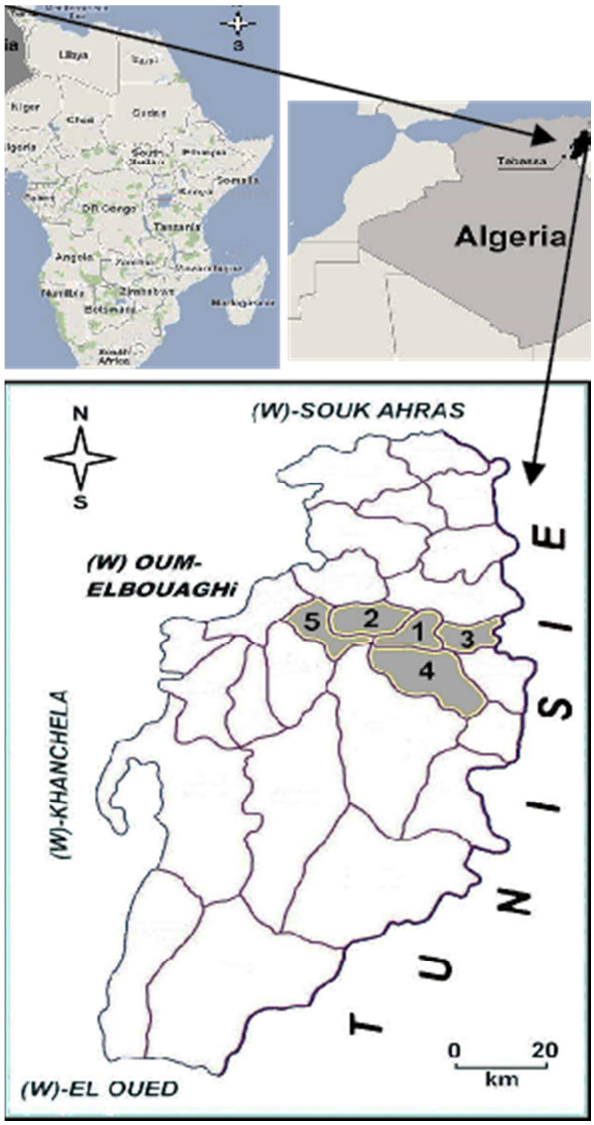
Ensifer	Ancien nom *Sinorhizobium* Willems *et al*., 2002; Young, 2003
Ensifer abri	Ogasawara *et al*., 2003
Ensifer americanum	Toledo *et al*., 2003
Ensifer arboris	Nick *et al*., 1999 ; Young, 2003
Ensifer fredii	"*Rhizobium fredii*" Scholla *et al*., 1984; Young, 2003
Ensifer garamanticus	Merabet *et al*., 2010
Ensifer indiaense	Ogasawara *et al*., 2003
Ensifer kostiense	Nick *et al*., 1999; Young, 2003
Ensifer kummerowiae	Wei *et al*., 2002; Young, 2003
Ensifer medicae	Rome *et al*., 1996; Young, 2003
Ensifer meliloti	"*Rhizobium meliloti*" Dangeard, 1926; Young, 2003
Ensifer mexicanus	Lloret *et al*.. 2007
Ensifer morelense	Cette espèce se distingue de *Ensifer adhaerens* mais pas encore nommé *Ensifer*. Voir Martens *et al*., 2007 pour détails.

Chapitre 02
Matériels et méthodes

1. Identification des souches de Rhizobia nodulant «*Hedysarum spinosissimum ssp.capitatum*»

1.1 Zone de prélèvement

Les nodules sont récupérés à partir des racines de la plante *H spinosissimum ssp.capitatum* située dans la région de Tébessa (Bekkaria). (Attitude N35◦, 33327. Longitude E8◦, 18603. Altitude 1084m) (figure12)



(3) Békkaria

Figure12 : la carte de localisation du site de prélèvement (www.researchgate.net)

1.2 *Hedysarum Spinosissimum. Ssp. capitatum*

Le matériel végétal retenu dans ce travail concerne une légumineuse spontanée de l'Algérie *H. spinosissimum ssp. capitatum* appartenant de la famille *Fabacae* ; Fleurs de 15-20 mm, purpurines ou blanches .Argiles commun dans le tell. Très rare ailleurs sous-secteur des hauts-plateaux constantinois (Quazel et Santa, 1962).

Figure13 : *H spinosissimum.ssp.capitatum*

1.2.1 Classification botanique (Quazel et Santa, 1962)

Règne : *Plantae*

Classe : *Equiseptopsida*

Sous classe : *Magnolidae*

Super classe : *Rosane*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Genre : *Hedysarum*

Espèce : *Spinosisimum*

Sous espèce : *Capitatum*

2. Analyse chimique du sol

Agiter trois échantillons de 10g du sol dans 100 ml d'eau distillée pendant 5 min, filtrer par papier filtre, récupérer le filtrat de chaque échantillons pour doser les minéraux (Na, Ca et K) et mesurer la conductivité et le pH en utilisant respectivement un spectrophotomètre à flamme et un pH mètre.

Figure14: Spectrophotomètre à flamme.

3. Isolement des bactéries à partir des nodules

3.1 Collecte des nodules

La collecte des nodules est effectuée au printemps dans le débuts du moins de mars selon les techniques préconisés par vincent, J.M.(1970) et somasegaran,P. et J.Hoben(1994). Selon les étapes suivantes :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm de profondeur
- Soulever lentement le bloc sol et racines
- Enlever soigneusement le sol et casser les blocs de sol avec précaution pour ne pas endommager les racines et les racines secondaires (Sites de nodulations).
- Placer délicatement toute la plante dans un sachet en plastique
- Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante et laver délicatement les racines sous l'eau courante

- Pour les nodules à stocker, les racines doivent être coupées 1 à 2 m de site d'attachement de nodule, ce qui assure une bonne conservation des nodules et l'obtention de cultures viables et propres de bactéries lors de l'isolement.
- Sécher les nodules avec du papier filtre avant le stockage.

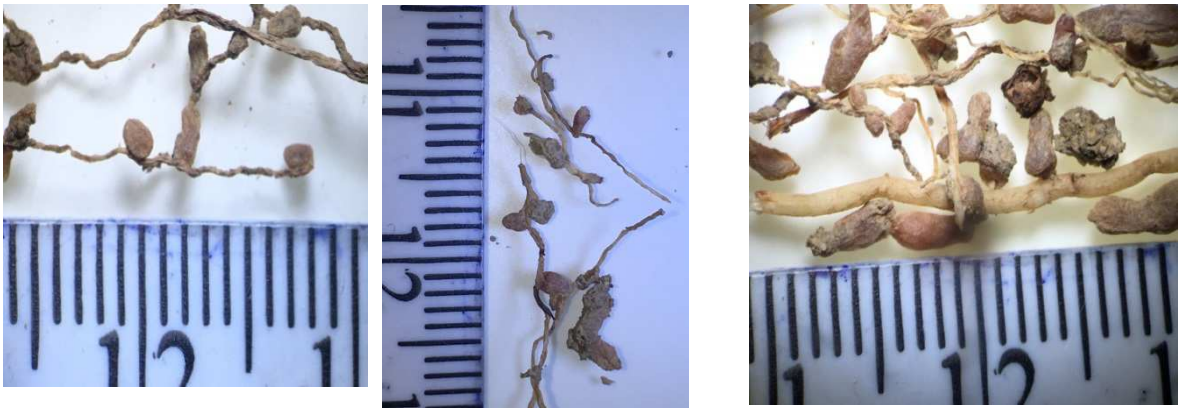


Figure15 : racines nodulés de *H.Spinosissimum.*

3.2 La conservation des nodules

Pour une durée de conservation (de 6à 12mois), il est nécessaire d'utiliser un dessiccateur (déshydratant) tel que le chlorure de calcium (CaCl2). La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre dont chaque flacon est rempli par un volume du CaCl2 (≤¼ de volume globale de flacon), une couche de coton sur laquelle sont déposés les nodules (nodosités) (figure16).

Le flacon est identifié par le nom de la plante, la date et le lieu de collecte, et la date de conservation.

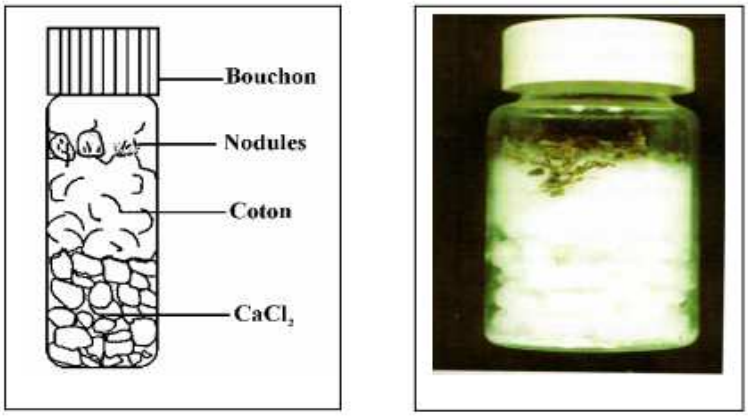


Figure 16 : Conservation des nodules sous CaCl2 (Vincent, 1970).

3.3 Isolement des bactéries à partir des nodules

3.3.1 Stérilisation des nodules (Vincent, 1970)

Les nodules conservés sont mis dans l'eau distillée stérile. En présence des conditions d'asepsie, les nodules sont immergés dans l'éthanol 95% de 5à10 secondes puis dans une solution de chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g HgCl2 + 5ml HCl+ 1l d'eau distillé) pendant 3min, après sont rincés 10 fois à l'eau distillé stérile.

3.3.2 Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés (Vincent, 1970)

Devant le bec bunsen, dans une boite de pétri stérile, chaque nodule stérilisé est écrasé à l'aide d'une pince stérile par l'éthanol et le flambage dans une goutte d'eau distillé stérile. Le jus nodulaire obtenu est étalé par une anse de platine à la surface des différents milieux spécifiques. (Figure17 B)

L'ensemencement est réalisé selon la méthode des quatre cadrans et les boites ensemencées sont incubées à 28◦c pendant 24heures à 15 jours. (Figure17 A)

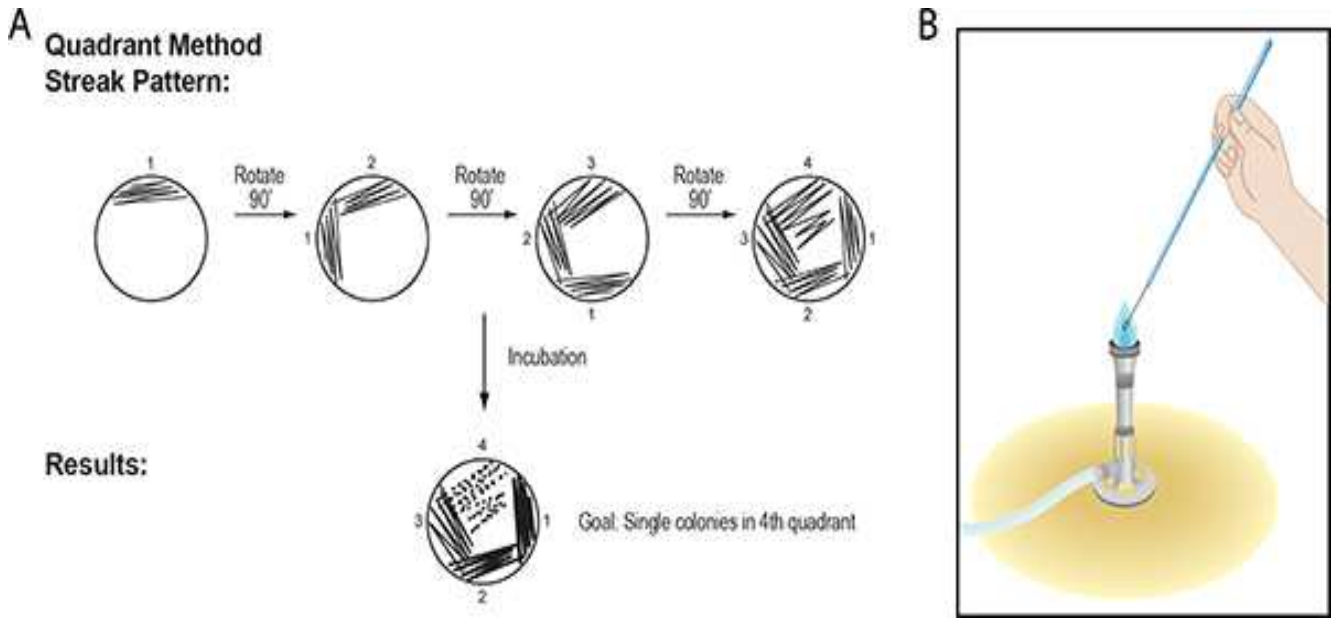


Figure17 : l'ensemencement par la méthode de 4 cadrons (Vincent, 1970)

4. Purification des isolats

Les manipulations se déroulent dans des conditions stériles c'est-à-dire autour de la flamme du bec bensen et sur payasse bien désinfecter par l'eau de javel.

4.1 Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries, pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants:

- **Milieu liquide**
    - YMB (Yeast Manitol Broth).
- **Milieux solides**
    - YMA (Yeast Manitol Agar).

- YMA + RC (Yeast Manitol Agar+ Rouge Congo).

4.1.1 Culture dans le milieu YMB

La méthode consiste l'ensemencement des isolats dans des tubes contenant le YMB puis les placer dans le bain marie agitateur à 28°C pendant 24 heures, jusqu'à L'obtention d'un trouble.

- Composition du milieu YMB en g/l (Vincent, 1970).

Mannitol	10.00
K2HPO4	0.50
MgSO47H2O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000 ml
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

4.1.2 Culture dans le milieu YMA+RC

La culture des isolats se fait sur des boites pétris contenant le milieu YMA+RC**.** Les colonies ayant absorbées peu de rouge Congo et n'ayant pas acidifié le milieu sont pris en compte comme isolats candidats à étudier. Ces colonies qui sont considérées comme bactéries nodulants des légumineuses de notre étude (Vincent, 1970)

- Composition du milieu YMA+ rouge Congo en g/l (Vincent, 1970).

YMB	1000 ml.
Solution stock de rouge Congo	10 ml.
Agar	15
Ph	6.8

Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

4.1.3 Culture dans le milieu YMA

Les colonies qui sont considérées comme bactéries nodulants notre légumineuse sont ensemencées dans des tubes contenant le YMB, puis placés dans le bain marie agitateur à 28°C pendant 24 heures, jusqu'à l'obtention d'un trouble, après ils sont ensemencées dans des boites de pétris contenants un milieu solide YMA a l'aide d'une anse de platine.

Le milieu YMA permet d'étudier les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des rhizobia (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben 1994).

- Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB	1000 ml.
Agar	15
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

5. Purification des Rhizobiums et conservation des souches

Après l'identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux, des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis incubées à 28°C pendant 24h à 48h. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC (Tableau 04)

La conservation des souches se fait sur milieu YMA additionné de 20 % glycérol comme agent neutralisant l'acidité. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle (18h), des repiquages sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 28°C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 3 à 4 ans (Vincent, 1970).

Tableau 04: les isolats utilisés dans cette étude

	Code des souches	**Souches**	**Plante-hôte**	**Origine Géographique**	**Sources**
Isolats	E1N1,1	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E3N2,1	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E2N3,2	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E1N1,2	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E3N1,3	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E1N4,1	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E3N1,1	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E3N1,2	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E3N2,2	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E2N2,2cl	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E2N2,1	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	E2N2,2 CL'	Isolat	***H spinosissimum***	Bakaria Tébéssa	Notre étude

E : enchantions ; N : nodules ; CL : croissance lente.

5.1 Tests physiologiques (effet des facteurs abiotiques)

5.1.1 Effet de ph :

Les souches sont cultivées sur milieu YMB liquide à différents pH (2/ 4/8et 10).La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 600 nm après incubation à 28◦C dans bain marie agitateur pendant 24h.

5.1.2 Effet de salinité (tolérance du NaCl)

Le milieu utilisé pour réaliser ce test est le milieu YMA contenant des concentrations en NaCl (2%, 4%, 6%,8%et 10%), le ph de milieu de culture est 6.8, les taux de croissance sont enregistrés en mesurent la densité optique des cultures bactériennes à 600nm après l'incubation à 28◦C dans un bain marie agitateur pendant 24h.

5.1.3 Et de la température :

L'ensemble des souches sont mises en cultures sur le milieu YMA solide dans des boites de pétris et incubées à différentes températures : 30◦C, 37◦C, 40◦C, et53◦C à l'étuve pendant une semaine.

5.2 Tests biochimiques (tests nutritionnels)

5.2.1 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 : lactose, fructose, glucose, galactose, xylose et sucrose. Les tubes sont ensemencés et incubés au bain marie agitateur à 28◦C pendant 24heures. L'estimation de la croissance est réalisée en mesurant la densité optique à 600nm. (jordan, 1984).

5.2.2 Utilisation des acides aminés comme source d'azote

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu défini8 (vincent, 1970). le glutamate de sodium et additionné chaque fois de divers acides aminés :D-alanine, L-leusine, B-alanine, L-proline, L-phenyl alanine, L-cystéine. Les tubes sont ensemencés puis incubés à 28◦C. la croissance est évaluée par la mesure de la densité optique à 600 nm. (vincent, 1970)(Annexe 01).

6. Analyse statistique

L'exploitation des données obtenues a été réalisée par l'utilisation le logiciel MINITAB 16, commençant par une ANOVA à deux facteurs avec trois répétitions par échantillons, ainsi que pour la classification hiérarchique ascendante (CAH) et les tests de comparaison multiples (test de Tukey). Par contre l'analyse factorielle des correspondances (AFC) et la carte thermique ont été réalisées avec le logiciel Excel stat 2014.

Résultats et Discussion

1. **Analyse chimique du sol**

   L'analyse chimique du sol, dosage Na, Ca et K on utilisant les équations de régressions affichés sur les courbes d'étalonnage (annex03) a révélé la richesse du sol on potassium (372.22ppm±68.29) suivi de la dose du calcium (79.03ppm±14.02)et on trouve à la fin une dose de sodium qui est égale a (54.01ppm±24.25).

2. **Etude de partenaire bactérien isolé à partir des nodules de la plante légumineuse *Hedysarum.spinosissimum***

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de *H spinosissimum*, nous avons tenu compte 12 isolats, 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.

Le premier isolement de bactéries à partir des nodules de sulla remonte au 19ème siècle (Mottareale, 1898).

2.1 La croissance sur YMA-RC

La Croissance sur YMA. RC des souches isolées à partir des nodules de *H spinosissimum* 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 (Figure18), Ceci est observé chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

Cette propriété est commune avec le genre Bradyrhizobium ; par contre le genre Agrobacterium et les formes contaminants absorbent fortement ce colorant (Jordan, 1984). Nos résultats sont convenables avec ceux de Benahmed, (2009. Les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le RC (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984 et Sebihi, 2008).

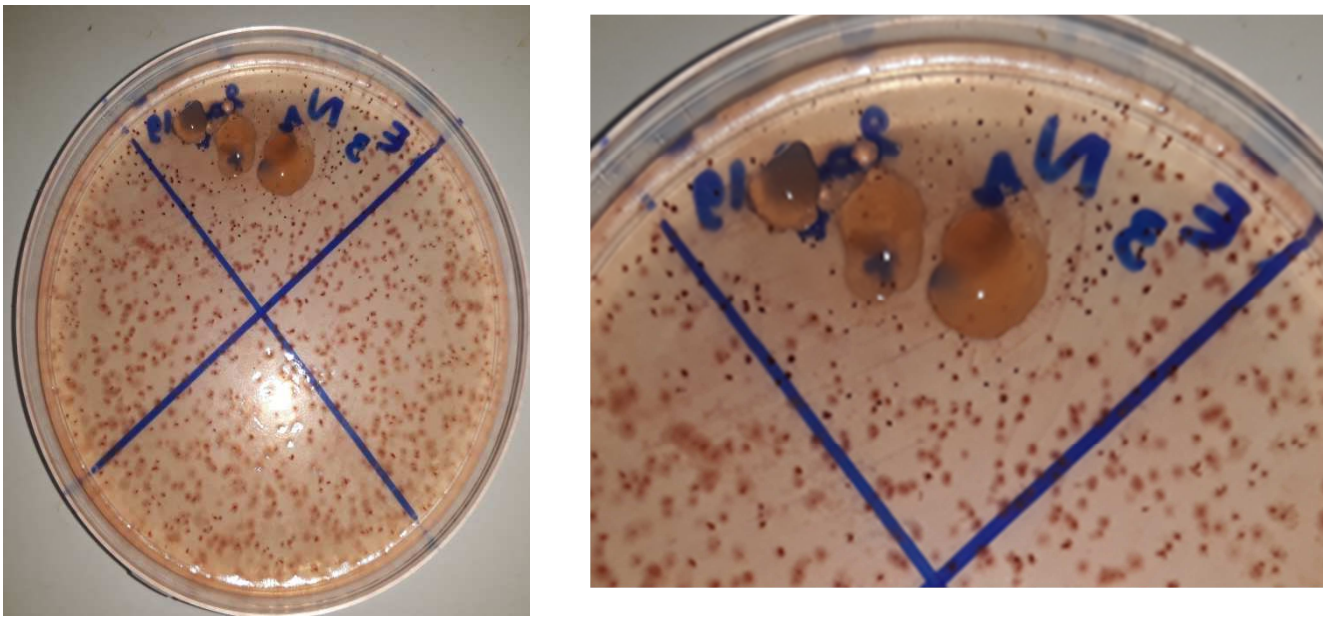


Figure18 : Aspect morphologique d'isolat E3N1 sur le milieu YMA-RC

2.2. La croissance sur le milieu YMB

La croissance sur le milieu liquide YMB pendant 24h, se traduire par l'apparition d'un trouble (figure19)

Figure19 : Aspect des isolats sur le milieu YMB.

2.3. La croissance sur le milieu YMA

Sur le milieu solide YMA, les différentes souches ont bien poussées au bout de 48 heures d'incubation sauf les isolats E1N4.1, E2N2.2CL, E2N2.2CL' qui n'a pas bien poussés sur ce milieu jusqu'à 72 heures. Les colonies apparaissent avec une couleur blanche ou crémé, lisses et elles ont une texture translucide. Ce qui est décrit par Vincent(1970) et Jordan (1984) pour les rhizobia (figure20)

Les souches isolées E1N1.2 et E3N1.3 sont plus visqueuses par rapport aux autres isolats.

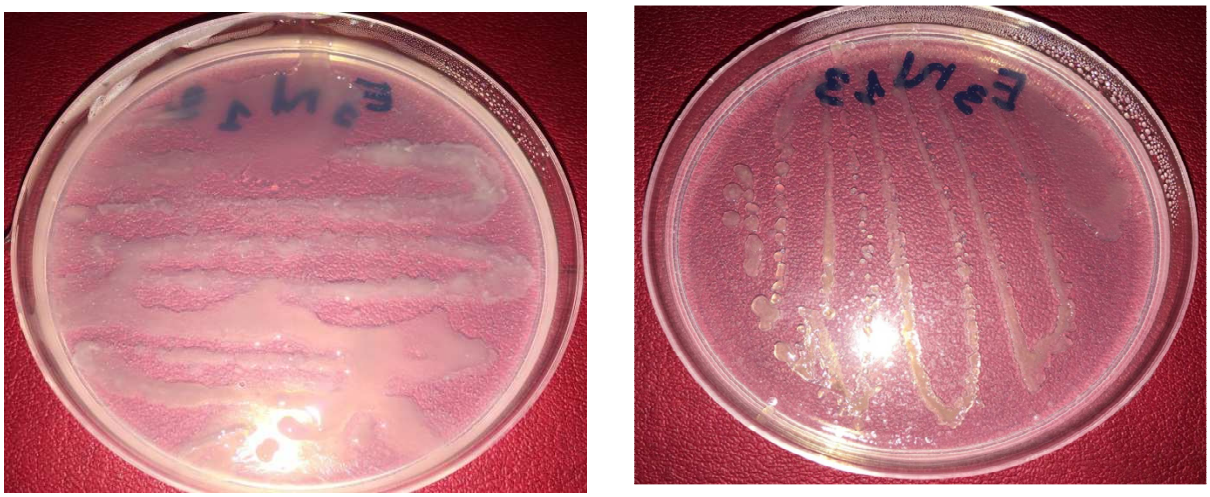


Figure20 : croissance des isolats sur le milieu YMA

2.4. Tests nutritionnels

2.4.1. Sources de carbone

Les valeurs de la Densité optique montrent une croissance importante de la plupart des Isolat en présence du glucose, sucrose, xylose, et galactose. Le sucrose présente une bonne source de carbone pour nos isolats alors que lactose et fructose sont les moins utilisé. On peut dire que les isolats peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates comme une source de carbone.

L'analyse de la variance fait ressortir une différence très hautement significative entre les carbohydrates utilisées, isolats et interaction isolats /source de carbone.

Le test de Tukey à partager les isolats en neuf groupes différents (annexe 04).

Ces résultats sont en concordance avec les travaux de **Somasegaran et Hoben (1994)** et **Benahmed (2010**). Le genre Rhizobium se caractérise par l'utilisation des sucres comme le mannitol, le glucose, l'arabinose, le fructose et le saccharose comme source de carbone. **(Vincent, 1970)** (figure21)

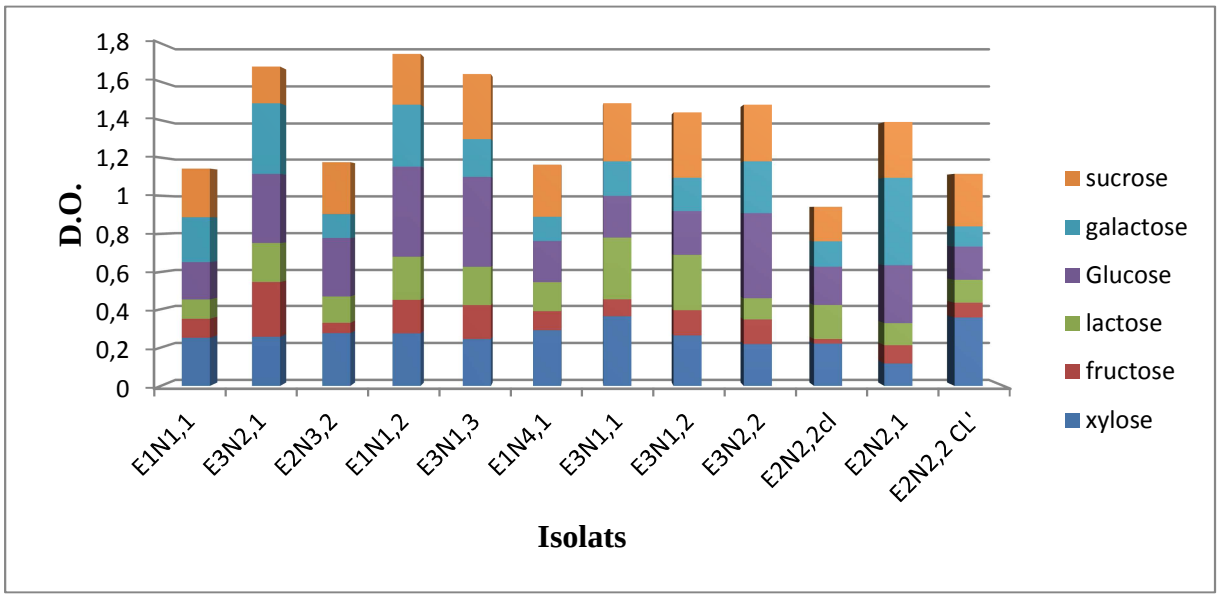


Figure21: Utilisation des sucres comme source de carbone par les isolats.

2.4.2. Source de l'azote

Les valeurs de la densité optique montrent une croissance importante de la plupart des Isolats en présence du L-leucine, D-alanine et L-cystéine présentent une bonne source d'azote pour nos isolats alors que le B-alanine , L-phénylalanine et L-proline sont les moins utilisée (figure 22) . On peut dire que les isolats peuvent utiliser une large gamme d'acide aminée comme une source d'azote.L'analyse statistique des D.O enregistrés a mis en exergue une différence très hautement significative entre les acides aminées utilisées, une différence très significative entre les isolats et une différence non significative pour l'interaction entre ces deux derniers .La comparaison multiple a divisée les isolats en trois groupes différents (tableau05).

Jordan, (1984) a pu mettre en évidence le pouvoir inhibiteur de croissance des Rhizobia parcertains acides aminés, et Struffi et al., (1998) ont illustré dans leurs travaux l'inhibition du développement des Rhizobia en présence de la thréonine.

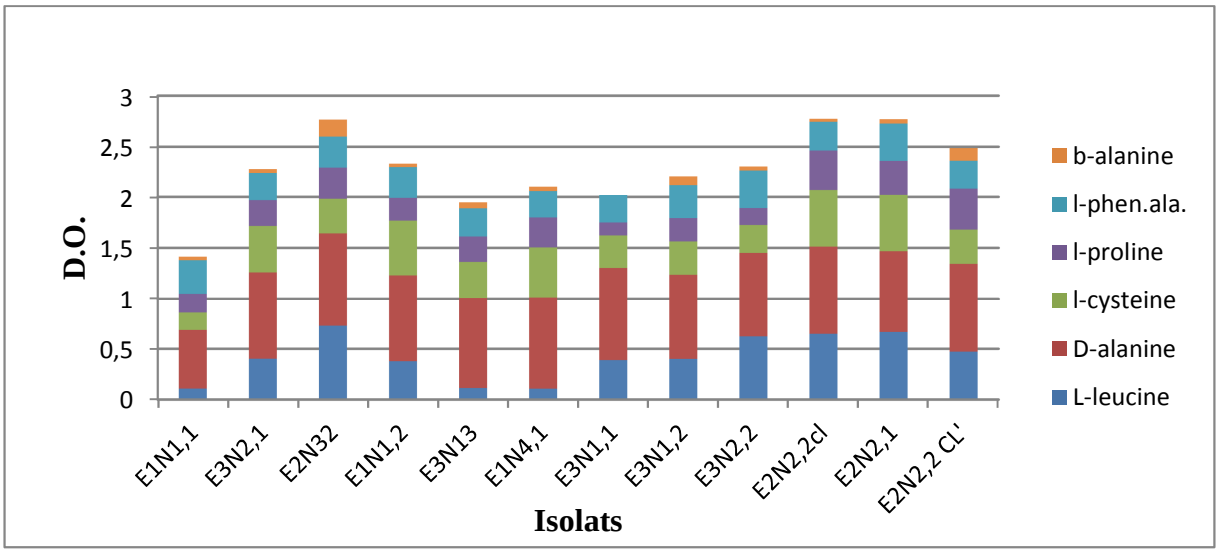


Figure22 : Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les isolats.

2.5 Tests physiologiques (Effet des facteurs abiotiques)

2.5.1 Effet de la salinité (Tolérance au NaCl)

Les résultats obtenus rapportés dans (Figure23) montrent que la plupart des isolats sont altérés par le gradient croissant des concentrations de NaCl variant de 2% à 10%, ils sont considérés comme sensible aux concentrations élevées en NaCl comme le démontre les courbes de régression rapportés sur l'histogramme.

L'analyse statistique des D.O enregistrées par les isolats montre une différence très hautement significative entre les concentrations de NaCl utilisées, une différence très significative entre les isolats et leurs interactions avec les différentes concentrations de NaCl. Le test de comparaison multiple (test de Tukey) à ceindre les isolats en trois groupes distincts (annexe 04).

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**).

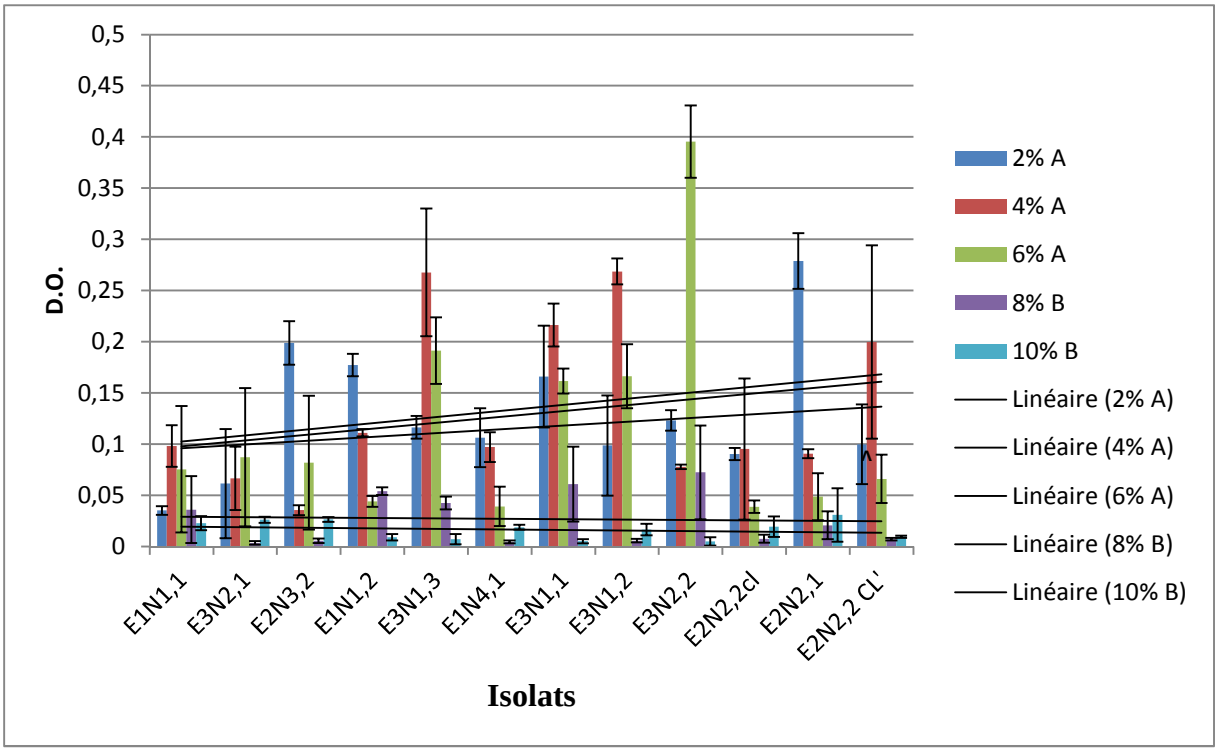


Figure23 : Courbes de régression de la croissance des isolats sous l'effet d'un gradient croissant des concentrations en NaCl.

2.5.2 Effet de pH

partir de l'histogramme on remarque un mauvais développement des isolats (E3N2,1/ E3N2,2/E2N,2cl/E3N2,1) dans les différents pH utilisées les courbes de tendance confirment l'altération du développement des isolats suivants le gradient ascendant du pH l'analyse statistique révèle une différence non significative entre les pH utilisés, les isolats et l'interaction isolat/pH (figure 24)

Cependant, Mohamed et al. (2000) ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la tolérance d'une souche BNL à pH acide du milieu et sa croissance. Shamseldin et Werner (2005) ont indiqué l'existence d'une variabilité de tolérance élevée à différents pH parmi les souches de Rhizobium etli isolées des sols égyptiens. La résistance des souches de Rhizobium à des températures élevées et à des niveaux de pH alcalins différents a récemment été confirmée (Shamseldin et *al*., 2017).

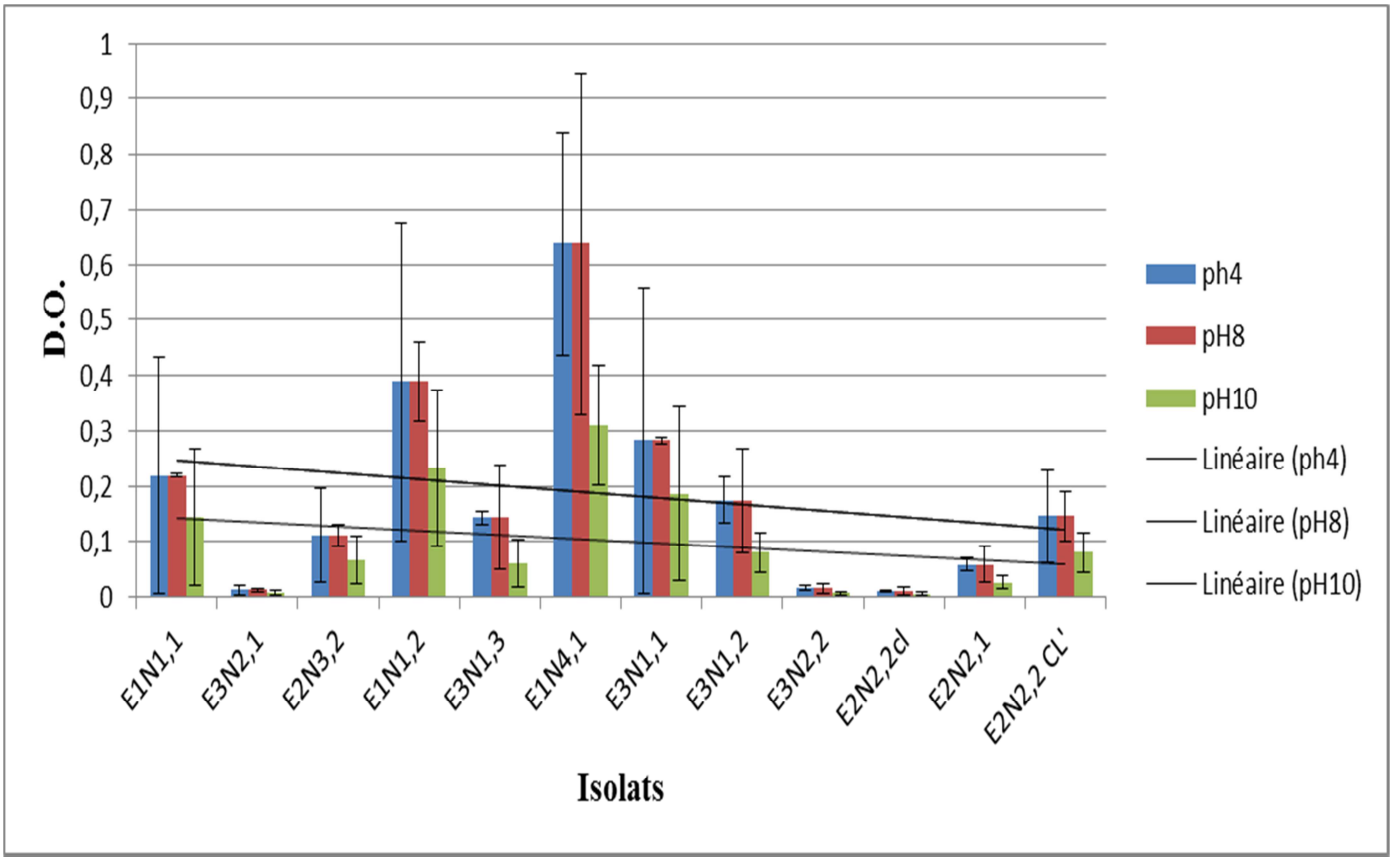


Figure 24: Effet des différents pH sur la croissance des isolats

Tableau5: ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée des quatre paramètres étudiés

Paramètre	Sources de la variation	DI	Som Car séq	Som Car ajust	CM ajust	F	P
Sources de carbone	isolats	11	0.360393	0.360393	0.032763	4.25	0.000***
	Isolats*sucres	55	1.018151	1.018151	0.018512	2.40	0.000***
	erreur	114	0.108975	0.108975	0.007701		
	total	215	3.307854				
Source d'azote	isolats	11	0.86290	0.86290	0.07845	2.59	0.005**
	Isolats*A.A	55	1.91877	1.91877	0.03489	1.15	0.253NS
	erreur	114	4.36502	4.36502	0.03031		
	total	215	19.35057				
pH	isolats	11	0.15060	0.15060	0.1369	1.23	0.283NS
	Isolats*pH	22	0.36597	0.36597	0.1664	1.50	0.103NS
	erreur	72	0.80067	0.80067	0.01112		
	total	107	1.33099				
NaCl	isolats	11	0.165891	0.165891	0.015081	2.19	0.019*
	Isolats*NaCl	44	0.561939	1.561939	0.012771	1.85	0.004**
	Erreur	120	0.826320	0.826320	0.006886		
	toatal	179	2.045301				

[(*) P < α= 0.05] : différence significative.

[(**) P< α= 0.01] : différence très significative.

[(***) P< α= 0.001] : différence très hautement significative.

[NS] : différence non significative

2.5.3 La température de croissance

Les résultats obtenus (Tableau06), montrent que toutes les souches testées sont capable de croître dans toutes les températures utilisées sans exception.

Ces résultats corroborent la grande variabilité de la thermo-tolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de rhizobia. Pour la plupart des Rhizobiums, l'intervalle de température de croissance est situé entre 28°C et 31°C et beaucoup d'entre elles sont capable de croître à 37°C (Zahran, 1999). Selon lindstrom et lehtomaki (1988), la température maximale de croissance serait de 35°C pour Rhizobium leguminosarum, 36°C pour Sinorhizobium fridii, 37°C pour Mesorhizobium loti et Rhizobium galegae, 41°C pour Sinorhizobium meliloti et de 40°C pour sinorhizobium medicae

Tableau 6: Effet de la température sur les isolats

Température / isolats	**30◦C**	**37◦C**	**43◦C**	**40◦C**
E1N1,1	+	+	+	+
E3N2,1	+	+	+	+
E2N3,2	+	+	+	+
E1N1,2	+	+	+	+
E3N1,3	+	+	+	+
E1N4,1	+	+	+	+
E3N1,1	+	+	+	+
E3N1,2	+	+	+	+
E3N2,2	+	+	+	+
E2N2,2cl	+	+	+	+

E2N2,1	+	+	+	+
E2N2,2 CL'	+	+	+	+

(+) croissance

3. Biodiversité des isolats

La classification hiérarchique des isolats en utilisant les D.O enregistrés dans les différents tests utilisés (figure25) montre une similarité 72,61% entre les isolats formants ainsi deux clusters différents, chaque cluster formé par deux groupes cluster 1 : 76,94% formé de deux groupes,(groupe 1:E1N1, 1 groupe 2 : 85,36% contient les isolats E3N2 ,1 /E1N1, 2 /E2N3,2/E2N2, 1) Cluster 2 : 81,69%formé de deux groupes (groupe 1 : 86,94% comporte E3N1, 3/E1N4, 1/E3N1, 2 groupe 2 :89.32% constitué de E3N1,1/E2N2 ,2cl'/E2N2 ,2cl).

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 (Merabet et al., 2006).

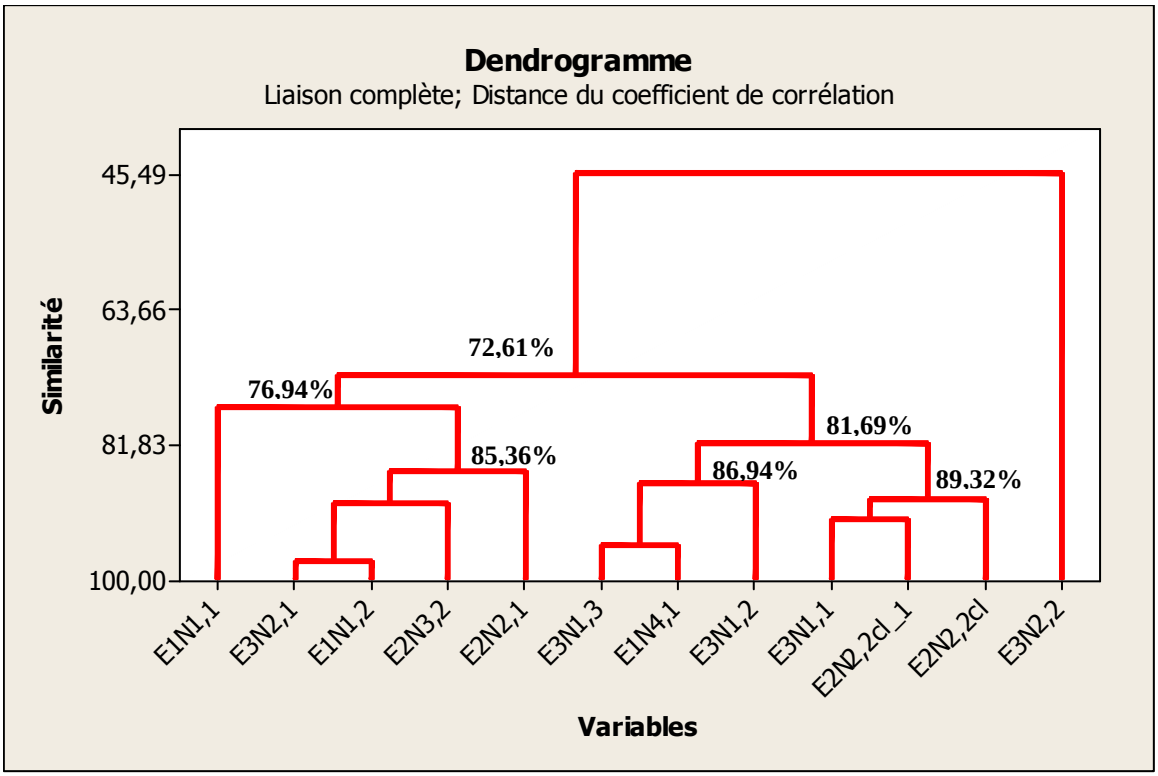


Figure 25 : Dendrogramme montrant la biodiversité des isolats étudiés

L'analyse des composantes principales (figure26) à scinder des isolats en trois groupes différents selon leurs correspondances aux paramètres étudiées .le premier groupe formé par les isolats (E2N2,2cl/ E2N2,2cl'/E2N3 ,2/E2N2 ,1) affectés par la concentration(NaCl 2% ,10%) et par la gamme des acides aminées (b-alanine,l-leucine,l-proline,l-cysteine et d-alanine),le deuxième groupe (E3N2,1/E3N1,2/E3N1,1/E3N1,3/E3N2,2/E1N1,2/E1N1,1)contrôlé par l'ensemble des sucres utilisés ,le l-phénylalanine et la concentration 4% de NaCl,le troisième groupe est étroitement lié a la variation du pH de milieu .le troisième groupe représenté par (E3N2,2)

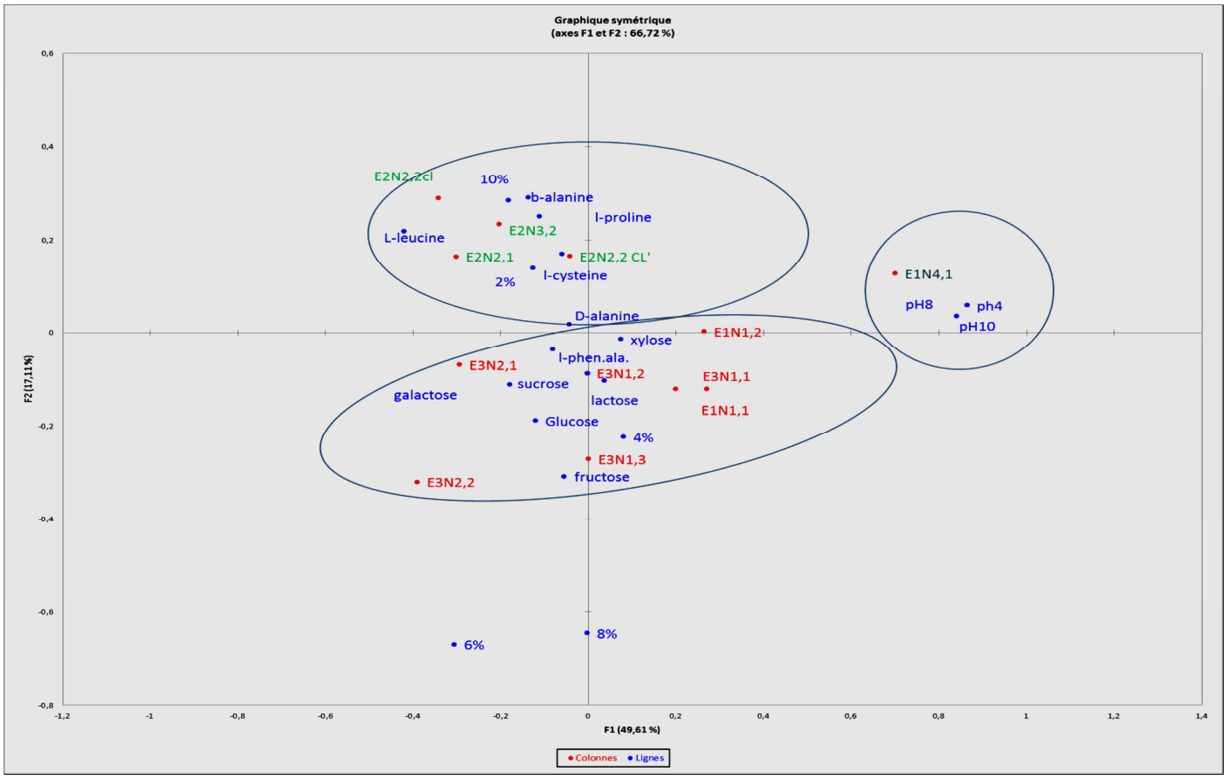


Figure 26 : Projection des isolats et paramètres étudiés sur un plan factoriel en utilisant l'analyse des composantes principale.

La carte thermique retrace la biodiversité des isolats dans une classification hiérarchique. Représentant l'effet du paramètre sur le développement des isolats par l'intensité de la couleur du carrée. Les mosaïques sont ordonnées de manière à ce que les

lignes (colonnes) similaires soit proches les unes des autres (Zhao et al.,2014) (willkinson et al 2009)

La carte thermique regroupe les isolats en deux clusters différents. Le premier cluster formé par les isolats E1N1,1/E1N4,1/E1N4,1/E3N2,2/E3N1,3/E3N1,2/E1N1,2/E3N1 ,1 qui ont les mêmes topologie des mosaïques des colonnes ils utilisent tous les acides aminées testés comme source d'azote ils se développent dans la concentration 10 % et le galactose , glucose et fructose comme source de carbone . Le deuxième cluster qui est constituée des isolats (E2N2,1 / E3N2,1/E2N2,2cl'/E2N3,2/E2N2,2cl caractérisé par un bon développement dans le NaCl 6% , 4% et 8% et comme source de carbone les carbohydrates glucose , fructose , lactose et sucrose elles montrent les meilleurs troubles comme signe de bon developpement dans l'ensemble des pH testés (figure 27) .

De meyer et al ,(2015)à utiliser la carte thermique pour l'étude de la présence de certains bactéries endophytes des nodules racinaires en qualifiant leurs présence par accidentelle et que leurs fonctions restent flou a ce stade .

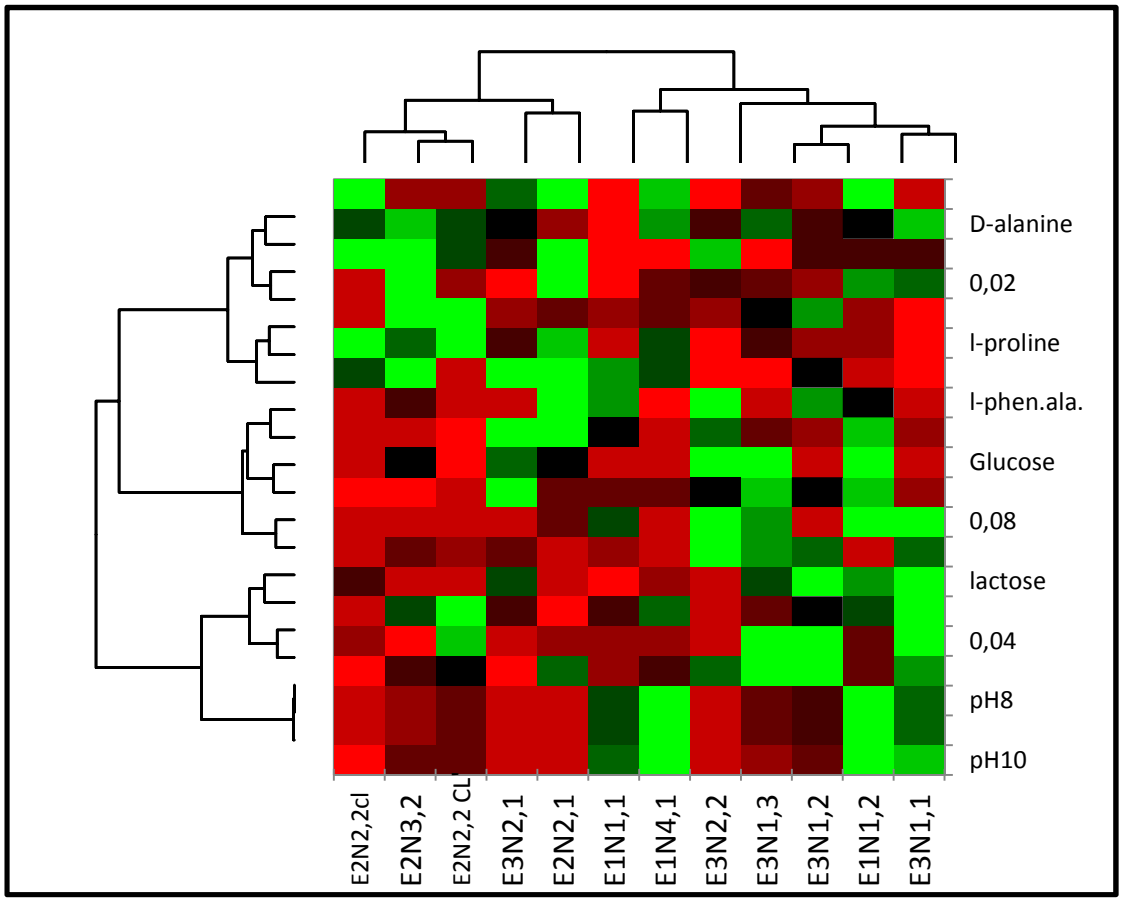


Figure 27 : La carte thermique (Heat maps) montrant le comportement des isolats vis-à-vis les paramètres étudiés (sucres) (l-acide aminés)(concentrations NaCl)(pH)

Conclusion

Conclusion

Les travaux menés au cours de cette étude pour la première fois sur la symbiose entre la légumineuse spontanée *H spinosissimum ssp.capitatum* appartenant aux fabacées nous ont permis d'une part d'aborder la compréhension de mis en place de cette association originale aves ses partenaires et la cratérisation phénotypique des isolats bactériens symbiotiques de cette légumineuse .

Nous avons procédé à un isolement et caractérisation selon la technique usuelle propre au rhizobium .cette caractérisation a pour but l'étude de la biodiversité des isolats par une approche phénotypique.

Les douze isolats isolés à partir des nodosités racinaires de la plante étudiée se divisent en deux groupes selon leur vitesse de croissance. Les mesure de la densité optique a montré une différence claire dans l'assimilation des carbohydrates .les isolats ont montrés une croissance maximale en utilisant le L-leucine, D-alanine et L-cystéine alors que le B-alanine, L-phénylalanine et L-proline ont altérés le développement des isolats testés.

Les BNL isolées ont montrées une certaine tolérance au pH acide et une nette sensibilité au pH alcalin, par contre les concentrations élevées en NaCl on diminuées les taux de croissances des isolats avec un spectre de résistance à une température large qui peut atteindre 43◦c.

L'étude de la biodiversité des BNL associées au *H spinosissimum ssp.capitatum* par l'analyse hiérarchique ascendante révèle la présence de trois groupes phénotypiques différents par contre l'étude de la biodiversité des isolats en utilisant la méthode de double clustering (heat maps) montre deux groupes phénotypiquement différents.

Il est intéressent a noté que nous sommes pleinement conscient que d'autre études sont nécessaire pour élucider la position taxonomique exacte des BNL associées au *H spinosissimum ssp.capitatum* par des recherches génomiques avancées comme le séquençage de l'unité ribosomale 16SrRNA ainsi nous jugeons souhaitable de mettre en valeur l'intérêt agricole de nos isolats en étudiant leurs traits stimulateurs de croissance des végétaux (PGPR) .

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

-Abdelguerfi, A., Abdelguerfi-Laouar, M. (2004). Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral: diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. Options Méditerranéennes, 62: 29. 550

-ANDRIANKAJA A.H. 2002. Mise en evidence des opportunites de developpement de la riziculture par adoption du sri, et evaluation de la fixation biologique de l'azote

-ANDRIANKAJA A.H. 2002. Mise en evidence des opportunites de developpement de la riziculture par adoption du sri, et evaluation de la fixation biologique de l'azote^.

-Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). Taxon, 66(1): 44–77. DOI: 10.12705/661.3

-B-

-BARBAULT Robert, (2009) : Ecologie Générale : structure et fonctionnement de la biosphère, 5ème édition, p32, ed. Dunod

-Benahmed, Amira., 2010. Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse Hedysarumcoronarium.Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine.Algérie. 128p.

-BenAhmed, H., Multon, B., Josset, C., Babarit, A., & Clement, A. (2010). Design methodology for a SEAREV wave energy converter. IEEE Transactions on Energy Conversion, 25(3), 760-767.

-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.

-Benselama, Amel.2015.Réhabilitation de la culture dulablabpurpureuxL.ExSweet et études de son partenaire symbiotique. Th. Doct 3ème cycle LMD en Biotechnologie. Université ES-SENIA. Oran. Algérie.p.133.

-Beyerinck M. W. 1888. Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. Bot. Zeitung 46, 725-804.

-Beyerinck M. W. 1890. Künstliche Infection von Vicia Faba mit Bacillus radicicola. Ernährungsbedingungen dieser Bacterie. Bot. Zeitung. 52: 837-843

-Biol. Biochem. 27.pp. 401-407.

-Boivin C., Ndoye I., Lortet G., Ndiaye A., De Lajudie P., Dreyfus B. 1997. The Sesbania root symbionts Sinorhizobium saheli and S. terangae bv. sesbania can form stem nodules on Sesbania rostrata, although they are less adapted to stem nodulation than Azorhizobium caulinodans. Applied and Environmental Microbiology 63, 1040-1047.

-Brewin, N., & Dale Noel, K. (1992). Rhizobium leguminosarum CFGN42 lipopolysaccharide antigenic changes induces by environmental conditions. Journal of bacteriology,174(7), 2222-2229.

-Brewin, N., & Dale Noel, K. (1992). Rhizobium leguminosarum CFGN42 lipopolysaccharide antigenic changes induces by environmental conditions. Journal of bacteriology,174(7), 2222-2229.

-Broughton W.J., Jabbouri S. and Perret X. 2000. Keys to Symbiotic Harmony. J.Bacteriol. 182(20): 5641-5652.

-Broughton, W. J., Jabbouri, S., & Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. Journal of bacteriology, 182(20), 5641-5652.

-C-

-Campa C, Grignon C, Gueye M et Hamou S. (1998) : L'Acacia au Sénégal. Edition :Orstom. 476p.

-Cermola M, Fedorova E, Tate R, Riccio A, Favre R et Patriarca EJ (2000). Nodule invasion and symbiosome differentiation during Rhizobiumetli-Phaseolusvulgaris symbiosis. Molecular Plant-Microbe Interaction, 13.pp. 733-41.

-Chen, W.X.,Yan, G.H. (1988). Numerical taxonomic study of fast – growing Soybean

Cite web: Visionlearning2000-2009.com

-Come D et Francoise C. (2006). Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes,

-Cooper JE. 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. Advances in Botanical Research 41, 1-62.

-Cronk Q, Ojeda I et Pennington R T. (2006). Legume comparative genomics: progress in

-Csonka, L. N., & Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. Annual review of microbiology, 45(1), 569-606.

-Cullimore, J V, Ranjeva R et Bono J J. (2001). Perception of lipochitooligosaccharidic Nod - factors in legumes. Trends Plant Sci. 6. pp.24- 30.

-D -

-Dangeard,P.A.(1926).Recherche sur les tubercules radicaux des légumineuses. Ed. Le botaniste. Paris 16.

-Dardanelli M., Angelini J. and Fabra A. 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. Canadian journal of microbiology 49: 399-405.

-Dart P. J. 1975. Legume root nodule initiation and development. p. 467-506. In J. G. Torrey and D. T. Clarkson (ed.), The development and function of roots. Academic Press, London, United Kingdom

-David, I., Robson, M. J, (1986). Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N2 fixation, nodulation and growth of white clover. Ed. Ann. Bot. 57,331-338p.

-De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI et Sutherland JM (1989).Occurence of nodulation

- DAVID R, (2009): handbook of chemistry and physics, crc press Inc., 90e éd., relié, 2804 p

-De Lajudie P, Dupuy N, Ndiaye A, Neyra M, Boivin C, Gillis M, Dreyfus B., 2000 .Acacia : nodulation et rhizobiums associés. Horizon documentation.Ird.fr/exldoc/pleins_texte/pleins_texte_7/divers 2/010016085.pdf. 360-375.

-DE LAJUDIE P., WILLEMS A., POT B.. DEWETTING, MAESTROJUAN G., NEYRA M., COLLINS M. D., DREYFUS B., KERSTERS K., GILLIS M. 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: Emendation of genus Sinorhizobium and description of Sinorhizobium meliloti comb nov., Sinorhizobium saheli sp. nov., and Sinorhizobium teranga sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:715-733.

-De Lajudie, P., Martinez-Romero, E. (2017). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Agrobacterium and Rhizobium Minutes of the meeting, 7 September 2014, Tenerife, Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(2): 516–520.

-De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). Soil Biology and Biochemistry, 83, 1-11.

-DENARIE, J., DEBELLE F., PROME J. C. 1996. Rhizobium Lipochitooligosaccharide nodulation and morphogenesis. 503-535.

-DENIS J.F, (2000) : la fertilisation de l'olivier : 1- l'Azote, Comité économique Agricole de l'Olivier.

-Dhane Fitouri S. (2011). Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla

Doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique de Tunisie. 149p.

-Domergue O. (2006). Diversité des Rhizobia associés à Ononis repens : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'école pratique des hautes études. p78.

-Dommergues Y., Dohoux E., Dien H. 1998. Les Arbres Fixateurs D'azote caractéristique fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Edition espaces 34: 15-16

-Dommergues Y., Dohoux E., Dien H. 1998. Les arbres fixateurs d'azote caractéristique fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Edition espaces 34: 15-16

-Dommergues, Y., Duhoux, E., & Diem, H. G. (1999). Les arbres fixateurs d'azote: caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides. Espaces 34.

-Dommerguesy.,Duhaux, E ., Hoang G. D. 1999. Les arbres fixateurs d'azote Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. 475

-Dreyfus B. L., Garcia J. L., Illis M. 1988. Characterization of Azorhizobium caulinaudans gen. nov., sp. nov., a Stern-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:89-98.

-Dreyfus B. L., Garcia J. L., Illis M. 1988. Characterization of Azorhizobium caulinaudans gen. nov., sp. nov., a Stern-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:89-98.

-Drouin,Pascal., 1996. Caractérisation phénotypique et génotypique et étude des mécanismes d'adaptation aux basses températures de souches de Rhizobium isolées de LathpusjaponicusetLathpspratensis.Thèse de doctorat en Philosophie.Université Laval. Québec. Canada. p.195.

du nord (Hedysarum coronarium L) et selection des souches rhizobiales efficientes. Thèse de

-Duhoux E et Nicole M. (2004). Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France. pp .1-20

-E-

- Eardly B. D., Mareron L. A., Smith N. H., Jonson D. A., Rumbaugh M.D., Selander R. K. 1990. Genetic structure of natural population of the nitrogen-fixing bacterium Rhizobium meliloti. Appl. Environ. Microbiol. 56:187-194.

- El Hilali, I. (2006). La Symbiose Rhizobium–Lupin: Biodiversité des Microsymbiotes et Mise en Evidence d'une Multi-Infection Nodulaire chez LupinusLuteus.

Ed : Tec et Doc. Lavoisier.

-Esseling J.J., Lhuissier FGP. and Emons AMC. 2003. Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. Plant Physiology 132: 1982-1988.

et de la vie, Canstantine. 99p.

-F-

-F.A.O., 2003 - Les engrais et leurs applications, Précis à l'usage des agents de vulgarisation agricole., Quatrième édition, Editions F.A.O., I.F.A. (Paris, France) et IMPHOS (Casablanca, Maroc)., 84 P.

-Figueiredo M.V.B., Martinez C.R., Burity H.A. and Chanway C.P. 2008 b. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (Phaseolus vulgaris L.). World. J. Microbiol. Biotechnol. 24:1187-1193.

-Fischer, H. M., Babst, M., Kaspar, T., Acuna, G., Arigoni, F., & Hennecke, H. (1993). One member of a gro-ESL-like chaperonin multigene family in Bradyrhizobium japonicum is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. The EMBO journal, 12(7), 2901-2912.

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

-Franche C., Lindstro·m K. et Elmerich C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil.321:35-59.

-Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., & Perret, X. (1997). Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. Nature, 387(6631), 394.

-G-

-Gage D J and Margolin W. (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia.Current Opinion in Microbiology3. 6. pp. 613-7.

-gage D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes» Microbiology and Molecular Biology Reviews 68(2): 280-300

-Gage D.J., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol Mol Biol.Rev..68. 2:280-300.

Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Faculté des sciences de la nature

-Geurts, R., & Bisseling, T. (2002). Rhizobium Nod factor perception and signalling. The Plant Cell, 14(suppl 1), S239-S249.

-Gharzouli, Razika., 2006. Influence d’agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de Rhizobium sp. Mémoire de Mgister en Génétique Moléculaire.UniversitéMentouri. Constantine. Algérie. p128.

-GIACOMINI, P. S. V. C. A., SaUARTINI, A. B. A., & CASELLA, S. (1998). Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating Hedysarum coronarium. Journal of applied microbiology, 81, 89.

-Gough C. (2009). Medicago truncatula un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. Biofutur.298. pp. 30-33.

-Grama, Borhane.S., 2008. Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Mémoire de Magister en GénétiqueetAmélioration des plantes. UniversitéMentouri .Constantine. Algérie.p93.

-Guignard J.L and Dupont F. (2005). Botanique. 13ème Edition Masson.Sprent : pp. 164-

-H-

-Hellriegel H., and Wilfarth H. 1888. Untersuchungen über die stickstoffnahrung der gramineon und leguminosen. Beilageheft zu der ztschr. Ver Rübenzucker - Industrie Deutchen Reichs.

-Hirsch A. M., Lum M. R. and Downie J. A. 2001. What makes the rhizobial-legume symbiosis so special? Plant Phisiol. 127: 1484- 1492

-Hirsch, P. R. (1996). Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. New Phytologist, 133(1), 159-171.

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

-Hopkins, W. G. (1999). Introduction to plant physiology (No. Ed. 2). John Wiley and Sons.

-Hopkins, W. G. (1999). Introduction to plant physiology (No. Ed. 2). John Wiley and Sons.

-Hopkins, W.G. (2003). Physiologie végétale. De Boeck, Bruxelles.

-Hopkins, W.G. (2003). Physiologie végétale. De Boeck, Bruxelles.

-I-

-Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., Palusińska-Szysz, M. (2015). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. Applied Soil Ecology, 85: 94–113.

-Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E.,Patel, J, (1982). Rhizobium loti, a new species of legumeroot nodule bacteria. Ed. Int. J. Syst. Bacteriol 32,378-380p.

-Jordan D.C., 1984. Rhizobiaceae. In: Kreig, N R (ed) Bergey's manual of systemic Bacteriology.1: 234-256

-Journet, E. P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., ... & Gianinazzi-Pearson, V. (2001). Medicago truncatula ENOD11: a novel RPRP-encoding early

nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(6), 737-748.

-Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. et Stevens P. (2001). Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Ed :de boeck. pp.415-418.

-J-

- JORDAN D. C. 1984. Familly III. Rhizobiaceae. In N.R.Krieg and J.G.Holt (ed). Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology, vol. 1. The Williams &Wilkins. Co. Baltimore : 234-245.

-K-

-Kazi Tani, C. (2010). Contribution à l'étude des communautés d'adventices des cultures du secteur phytogéographique Oranais (nord-ouest algérien): aspects botanique, agronomique et phyto-écologique. 642 Doctoral dissertation, University of Tlemcen, Algeria. URL: http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/5698

-Kezel et Senta, 1962 Quezel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales-v. 1-2.

-Kezel et Senta, 1962 Quezel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales-v. 1-2.

-Kouakou, K., Kébé, B. I., Kouassi, N., Anno, A. P., Aké, S., & Muller, E. (2011). Impact de la maladie virale du swollen shoot du cacaoyer sur la production de cacao en milieu paysan à Bazré (Côte d'Ivoire). Journal of Applied Biosciences, 43, 2947-2957.

-Kundu, S., & Hargrove, M. S. (2003). Distal heme pocket regulation of ligand binding and stability in soybean leghemoglobin. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 50(2), 239-248.

-KUYKENDALL L. D., SAXENA B., DEVINE T. E., UDELL S. E. 1992. Genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum (Jordan, 1982) and a proposa1 for Bradyrhizobium elkanii sp. Nov. Can. J. Microbiol. 38:501-505.

-L-

-Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S., 2014.Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. MicrobiologicalResearch. 169 (1): 2-17.

-LINDRSTROM K. 1989. Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. Int J. Syst Bacteriol. 39:365-367.

-Lindrstrom K., Lehtomaki S. (1988). Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of Rhizobium sp. (galega) compared with other fast-groing rhizobia FEMS Microbiol Lett. 50:277-287.

-LINDRSTROM K., LEHTOMAKI S. 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of Rhizobium sp. (galega) compared with other fast-groing rhizobia FEMS Microbiol Lett. 50:277-287.

-Lohar D., Stiller J., Kam J., Stacey G. and Gresshoff P.M. 2009. Ethylene insensitivity conferred by a mutated Arabidopsis ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic Lotus japonicus. Ann. Bot. 104: 277-285.

- LORQUIN J., LORTET G., FERRO M., MEAR N., DREYFUS B., PROME J. C., BOIVIN C. 1997c.Sinorhizobium teranga bv. acaciae ORS1073 and Rhizobium sp. ORSlOOl, two taxonomically distant related Acacia nodulating strains, produce similar Nod factors that are 0-carbamoylated, N-methylated and mainly sulfated. J. Bacteriol. 3079-3083

-LONG SR. 1996. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. Plant Cell 8, 1885-1898.

-LORQUIN J., LORTET G., FERRO M., MEAR N., DREYFUS B., PROME J. C., BOIVIN C. 1997a. Nod factors from Sinorhizobium saheli and S. teranga bv. sesbaniae are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to Sesbania rostrata symbionts. Mol. Plant- Microbe Int. 10:879-890.

-M-

- Maougal, M. L. (2004). KatebYacine: l'indomptabledémocrate. Apic.

-Machrafi, Younes., 2001.inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuses par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire de maître ès sciencesUniversité Laval. Canada. p.199.

-Martinez-romero e., Segova l., Mercante f. M., Franco A. A., Graham p., Pardo M. A.,(1991). Rhizobium tropici, a novel srecies nodulating Phaseolus vulgaris l. beans and Leucaeana spp. trees. Int. J. Syst Bacteriol. 41:417-426.

-Merabet C., Bekki A., Benrabah N., Baba Ahmed Bey M., Bouchentouf, I. Ameziane H., Rezki M.A., Domerg O., Cleyet-Marel J.C., Avarrej.C., Bèna G., Bailly X., De Lajudie P. (2006). Distribution of meicago spieces and their microsymbionts in a saline region of Algeria. Arid Land Research and management. 20: 1-13

-Miller, K.J., Wood, J.M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Annual Reviews in Microbiology, 50(1): 101–136.

-Mohamed, S.H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D., Filali-Maltouf, A. (2000). Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from Acacia spp. grown in Libya. Plant and Soil, 224(2): 171–183.

-Mottareale, G. (1898). Di alcuni organi particolari delle radici tubercolifere dello Hedysarum coronarium in relazione al Bacillus radicicola e alla Phytomyxa leguminosarum. Coop. tip..

-N-

-Newcomb W., Sippell D. and Peterson R. L. 1979. The early morphogenesis of Glycine max and Pisum sativum root nodules. Can. J. Bot. 57: 2603-2616.

-O-

-Obato,M. (1989). Généralités sur la symbiose fixatrice d‟azote rhizobium- legumineuse.Ed. Vuibert. Paris. 102 p.

-P-

-Pagni, (1998) : Les mécanismes de transformation de l'azote dans le sol. Perspectives Agricoles 115: 100-105

-Pant, P., Pant, P. (2017). Ecological restoration techniques for management of degraded, mined-out areas and the role played by rhizospheric microbial communities. In: Singh R., Kumar S. (eds) Green Technologies and 661 Environmental Sustainability. Springer, Cham, pp. 437–453.

-Pelmont J. 1995. Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2: 541-572.

-Pelmont, J. (1995). Bactéries et environnement. Adaptation physiologique.Office des Publications .Universitaires.255p.

-Pelmont, J. (1995). Bactéries et environnement. Adaptation physiologique.Office des Publications .Universitaires.255p.

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

Perret , X.; Staehe Lin, C., and Selander, R.K, (2000). Molecular basis of Symbiostic promiscuity.Mcrobiol. Mol.Biol. Rev. 64, 180-201 p.

-Perret X., Staehelin C., Broughton Wj. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 180–201.

-Perry J.J., Stalex J.T. et Lory S. 2004. Microbiologie cours et questions de revision. Edition Dunod. Paris. France-

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

phylonenetics and phylogenomics. Current Opinion in plant biology9.pp. 99-103.

-Polhill, R.M. (1981). Advances in legume systematics: Parts 1 & 2. Kew, Royal Botanic Gardens.

-POSTGATE J. (1998) : Fixation de l'azote, 3ème édition. Pression d'université de Cambridge, Cambridge R-U.

-Quézel, P., Santa, S. (1962). New flora of Algeria and southern desert regions. CNRS, Paris, France.

-R-

-Rasanen L. 2002. Biotic and abiotic factors infl uencing the development of N2-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan Oldroyd. 220p.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE, (2000): Biologie végétale. 2e édition. Edition. De boeck.Paris France.pp.653-660.

-Raven, J. P. (2007). Generation, flow and manipulation of a microfoam (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).

-Raven., Evert., Eichhorn. 2007. Biologie végétale. 2ieme édition. Edition de boeck. Paris - France: 653-660

-Renier A. 2008. Approche pluridisciplinaire de la symbiose Methylobacterium nodulans / Crotalaia podocarpa, Thèse de Doctorat de l'Universite Montpellier II – France.

-Renier A. 2008. Approche pluridisciplinaire de la symbiose Methylobacterium nodulans / Crotalaia podocarpa, Thèse de Doctorat de l'Universite Montpellier II – France.

-Renier A. 2008. Approche pluridisciplinaire de la symbiose Methylobacterium nodulans / Crotalaia podocarpa, Thèse de Doctorat de l'Universite Montpellier II – France.

-Renier A. 2008. Approche pluridisciplinaire de la symbiose Methylobacterium nodulans / Crotalaia podocarpa, Thèse de Doctorat de l'Universite Montpellier II – France.

Rhozobia and proposal that Rhizobium fredii be assigned to Sinorhizobium Ed. Gen.Nov.Int.J.Sy.Bacterial, 38. 392-397p.

-Roche P., LEROUGE P., PONTHUS C., PROME C. 1991b. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the Rhizobium melilotti alfalfa symbiosis. Journal of Biological Chemistry 266 : 10933-10940.

-Roger P., Dommergues Y., Balandreau J., Drefus B., Sougoufara B. 1996. La fixation biologique de l'azote, quelles potentialités pour le développement ? 2.

Rubio, L. M., & Ludden, P. W. (2008). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Annual review of microbiology, 62.

-S-

-Saoudi M. (2008). Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des

Saoudi, M. (2008). Les bactéries nodulant les legumineuses (BNL): Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse Astragalusarmatus.

-Schola M. H., Elkan G. H. 1984. Rhizobium fiedii sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulate soybeans. Int J. Syst. Bacteriol. 34: 484-486.

-Schultze M., Kondorosi A. 1998 Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. 32: 33-57.

-Sebihi, F. Z. (2008). Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL): caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, Hedysarum perrauderianum (Doctoral dissertation, Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri de Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie. 121p).

-SEGOVIA L., YOUNG J. P. W.,MARTINEZ -ROMERO E . 1992. Reclassification of American Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli type 1 strains as Rhizobium etli sp. nov. Int. J.Syst Bacteriol. 43: 374-377.

setbacks. Renewable and sustainable energy reviews, 11(1), 116-132.

-Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., Sadowsky, M.J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: à review. Symbiosis, 71(2): 91–109.

-Shamseldin, A., Carro, L., Peix, A., Velázquez, E., Moawad, H., Sadowsky, M.J. (2016). The symbiovar trifolii of Rhizobium bangladeshense and Rhizobium aegyptiacum sp. nov. nodulate Trifolium alexandrinum in Egypt. 685 Systematic and Applied Microbiology, 39(4): 275–279.

-Shamseldin, A., Carro, L., Peix, A., Velázquez, E., Moawad, H., Sadowsky, M.J. (2016). The symbiovar trifolii of Rhizobium bangladeshense and Rhizobium aegyptiacum sp. nov. nodulate Trifolium alexandrinum in Egypt. 685 Systematic and Applied Microbiology, 39(4): 275–279.

-Shamseldin, A., Werner, D. (2005). High salt and high pH tolerance of new isolated Rhizobium etli strains from Egyptian soils. Current Microbiology, 50(1): 11–16.

-Somasegaram, P., Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York.Inc p450.

-Somasegaran,P. et J.Hoben(1994) Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Quantifying the growth of rhizobia. In Handbook for Rhizobia (pp. 47-57). Springer, New York, NY.

-Somasegaran,P. et J.Hoben(1994) Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Quantifying the growth of rhizobia. In *Handbook for Rhizobia* (pp. 47-57). Springer, New York, NY.

-Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger,O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N., and Lugtenberg, B.J. (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of Rhizobium. Nature, 125-130p.

-Sprent J I. (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N2 fixation in perspective. Soil

-T-

-Taketani, R.G., Kavamura, V.N., dos Santos, S.N. (2017). Diversity and Technological Aspects of Microorganisms from Semiarid Environments. In: de Azevedo, J., Quecine, M. (eds) Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics, pp. 3–19. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-55804-2_1

techniques culturales simplifiée. 48. pp.12-22.

-Tourte, Y., Bordonneau, M., Henry, M., & Tourte, C. (2005). Le monde des végétaux: organisation, physiologie et génomique. Dunod.

-V-

-Vale Matthieu M., (2006) : Quantification et prédiction de la minéralisation nette de l'azote du sol in situ, sous divers pédoclimats et systèmes de culture français, thèse n° 2367, INRA-France

-Van de Wiel C., Scheres B., Franssen H., Van Lierop MJ., Van Kammen A. and Bisseling T. 1990. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inter cortex) of pea and soybean nodules.EMBO Journal 9:1-7.

-Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.M., De Vos, P., Willems, A. (2002). Burkholderia tuberum sp. nov. and Burkholderia phymatum sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Systematic and Applied Microbiology, 25(4), 507–512.

-Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Martínez-Molina, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: Zaidi A., Khan M., Musarrat J. (eds.). Microbes for Legume Improvement. Springer, Cham, pp. 1–43.

-Vernie, T. (2008). Analyse fonctionnelle d‟EFD, Un regulateur transcriptionnel de lanodulation au cours de l‟interaction symbiotique entre Medicago truncatula et Sinorhizobium meliloti . 125-145p.

-vincent, J.M.(1970) 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.

-Vincent, J.M.(1970) 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.*

-W-

-Waligora C. et Tetu T. (2008). Les légumineuses : il est temps de les réhabiliter. In :

-Weir, B.S. (2006). Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. PhD thesis, The University of Auckland, New Zealand.

-Westhoek, A., Field, E., Rehling, F., Mulley, G., Webb, I., Poole, P.S., Turnbull, L.A. (2017). Policing the legume-728 Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice. Scientific Reports, 7(1): 1419. DOI: 10.1038/s41598-729 017-01634-2 730

-Wilkinson, L., & Friendly, M. (2009). The history of the cluster heat map. The American Statistician, 63(2), 179-184.

-Woronin M. S. 1866. Über die bei der Schwarzerle (Alnus glutinosa) und bei der gewöhnlichen Gartenlupine (Lupinus mutabilis) auftretenden Wurzelanschwellungen. Mémoires de l'Academie Impériale des Sciences de St. Pétersbourg, VII Series, vol. X.

-X-

-XU L. M., GE C., CUI Z., LI J., FAN H. 1995. Bradyrhizobium liaonengense sp. nov., isolated from the nodules of Soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 706-711.

-Z-

-Zahran H.H. (1999). Rhizobium Legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in a arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63(4): 968-989.

-Zahran, H.H. (2017). Legumes-microbes interactions under stressed environments. In: Zaidi A., Khan M., Musarrat J. (eds.). Microbes for Legume Improvement. Springer, Cham, pp. 301–339. DOI: 10.1007/978-3-319-59174-2_13

-Zahran, H.H., 2006.Wild-Legumes Rhizobia: Biodiversity and Potential AsBiofertilizer. In: Rai, M.K. Handbook of Microbial Biofertilizers. New York. London. Oxford: The Haworth Press. Inc p.203-214.

-Zhao, L. D., Lo, S. H., Zhang, Y., Sun, H., Tan, G., Uher, C., ... & Kanatzidis, M. G. (2014). Ultralow thermal conductivity and high thermoelectric figure of merit in SnSe crystals. Nature, 508(7496), 373.

Site web

Www. Visionlearning.com

www.researchgate.net

Annexe 01

Composition du milieu défini8 en g/l (Vincent, 1970)

KH2PO4	0.3
Na2HPO4	0.3
MgSO4	0.21
CaCl2	0.21
Glutamate-Na	1
Mannitol	1
Solution stock vitamine	1ml
Oligoélements	1ml
Ph	6.9

Autoclavage à 120◦C pendant 20 minutes

Solution stock vitamines : (mg/l)

Acide nicotinique	100
Thiamine	100
Panthotenate-Ca	100
Dissoudre dans un tampon Na2HPO4	0.05M
PH	7

La stérilisation de la solution stock vitamines par filtration (0.022µm)

Solution oligoéléments (mg/l)

H3BO3	50
FeSO47H2O	35
CuSO45H2O	8
MnSO44H2O	40
ZnSO47H2O	16

Annexe 02

Les résultats de la mesure de la densité optique des différents tests :

1. **Sources de carbone**

Sources / isolats	xylose	fructose	Lactose	glucose	Galactose	sucrose
E1N1,1	0.251±0.076	0,099±0,087	0,101±0,023	0,200±0,048	0,235±0,156	0,255±0,110
E3N2,1	0.256±0.074	0,286±0,029	0,210±0,086	0,362±0,036	0,373±0,057	0,191±0,024
E2N3,2	0.276±0.159	0,054±0,064	0,137±0,059	0,312±0,037	0,125±0,021	0,272±0,099
E1N1,2	0.274±0.024	0,175±0,069	0,231±0,017	0,472±0,004	0,328±0,046	0,264±0,119
E3N1,3	0.245±0.167	0,177±0,040	0,205±0,081	0,472±0,132	0,203±0,027	0,339±0,067
E1N4,1	0.291±0.136	0,100±0,067	0,151±0,024	0,221±0,012	0,127±0,021	0,273±0,104
E3N1,1	0,364±0,022	0,088±0,026	0,328±0,016	0,218±0,033	0,182±0,010	0,308±0,068
E3N1,2	0,263±0,059	0,132±0,008	0,295±0,123	0,230±0,032	0,175±0,007	0,346±0,034
E3N2,2	0,218±0,103	0,129±0,034	0,111±0,035	0,451±0,117	0,272±0,106	0,300±0,108
E2N2,2cl	0,221±0,074	0,024±0,022	0,177±0,068	0,205±0,021	0,133±0,012	0,181±0,021
E2N2,1	0,117±0,036	0,095±0,042	0,115±0,019	0,308±0,010	0,458±0,460	0,297±0,016
E2N2,2cl	0,357±0,061	0,077±0,005	0,119±0,016	0,179±0,064	0,106±0,004	0,276±0,099

2. **Source d'azote**

Sources isolats	L.leusine	D.alanine	L.cysteine	L.proline	L.phy.alanine	B.alanine
E1N1,1	107,660±6,611	107,660±15,598	0,172±0,015	90,103±0,010	0,191±0,007	0,035±0,051
E3N2,1	104,910±9,125	104,910±1,469	0,455±0,056	85,787±0,021	0,253±0,049	0,039±0,022
E2N3,2	72,853±17,185	72,853±8,137	0,340±0,046	91,337±0,126	0,314±0,026	0,166±0,012
E1N1,2	101,807±10,243	101,807±9,044	0,537±0,079	85,310±0,044	0,223±0,063	0,033±0,006
E3N1,3	113,370±7,065	113,370±7,728	0,354±0,030	89,530±0,050	0,249±0,021	0,059±0,018
E1N4,1	107,350±10,275	107,350±1,596	0,491±0,172	90,630±0,070	0,293±0,009	0,043±0,035
E3N1,1	99,360±2,728	99,360±1,689	0,319±0,067	91,470±0,023	0,127±0,040	0,002±0,001
E3N1,2	102,827±4,225	102,827±4,140	0,327±0,083	83,623±0,096	0,228±0,025	0,086±0,059
E3N2,2	93,727±11,442	93,727±15,390	0,274±0,151	82,820±0,049	0,166±0,045	0,040±0,057
E2N2,2cl	97,133±9,383	97,133±4,469	0,564±0,122	86,497±0,025	0,387±0,004	0,029±0,035
E2N2,1	98,330±6,468	98,330±0,972	0,562±0,047	80,170±0,061	0,332±0,013	0,043±0,026
E2N2,2cl	78,06±122,513	78,061±3,123	0,336±0,075	87,197±0,095	0,410±0,015	0,124±0,066

3. L’effet de la NaCl

Sources isolats	2%	4%	6%	8%	10%
E1N1,1	0,035±0,042	0,098±0,020	0,075±0,062	0,036±0,033	0,023±0,007
E3N2,1	0,061±0,053	0,067±0,031	0,087±0,067	0,004±0,002	0,026±0,029
E2N3,2	0,199±0,212	0,036±0,050	0,082±0,065	0,006±0,002	0,026±0,023
E1N1,2	0,177±0,110	0,111±0,004	0,044±0,053	0,054±0,037	0,009±0,003
E3N1,3	0,116±0,111	0,268±0,062	0,191±0,033	0,043±0,006	0,007±0,005
E1N4,1	0,106±0,029	0,097±0,015	0,039±0,019	0,005±0,001	0,019±0,022
E3N1,1	0,166±0,050	0,216±0,021	0,162±0,012	0,061±0,037	0,005±0,002
E3N1,2	0,099±0,049	0,269±0,013	0,166±0,031	0,006±0,002	0,016±0,006
E3N2,2	0,123±0,100	0,078±0,002	0,395±0,435	0,072±0,046	0,005±0,004
E2N2,2cl	0,090±0,059	0,095±0,069	0,039±0,062	0,008±0,004	0,019±0,010
E2N2,1	0,279±0,273	0,091±0,004	0,049±0,023	0,021±0,014	0,031±0,026
E2N2,2cl	0,100±0,039	0,200±0,094	0,066±0,024	0,007±0,001	0,010±0,001

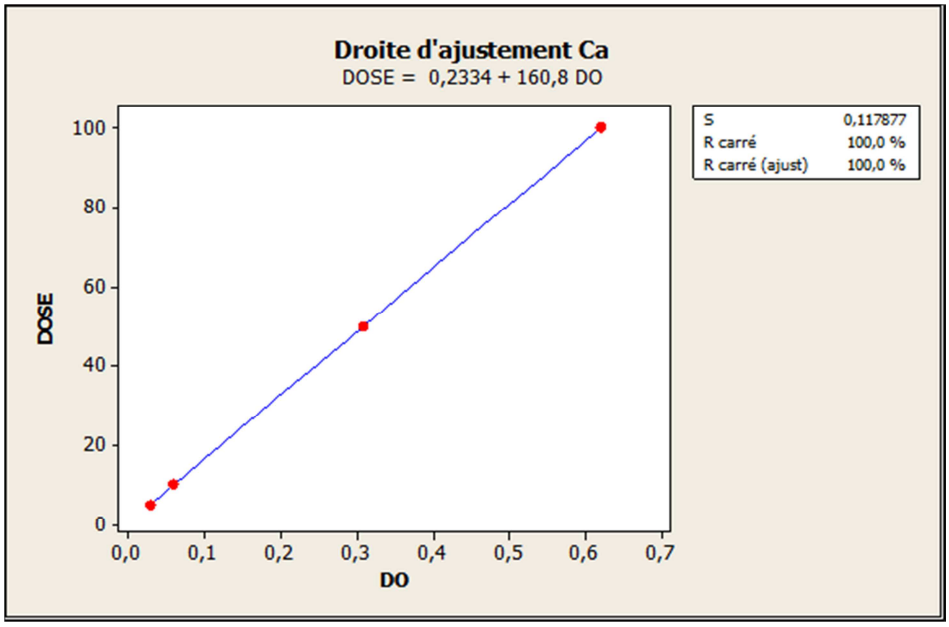
4. Effet de pH

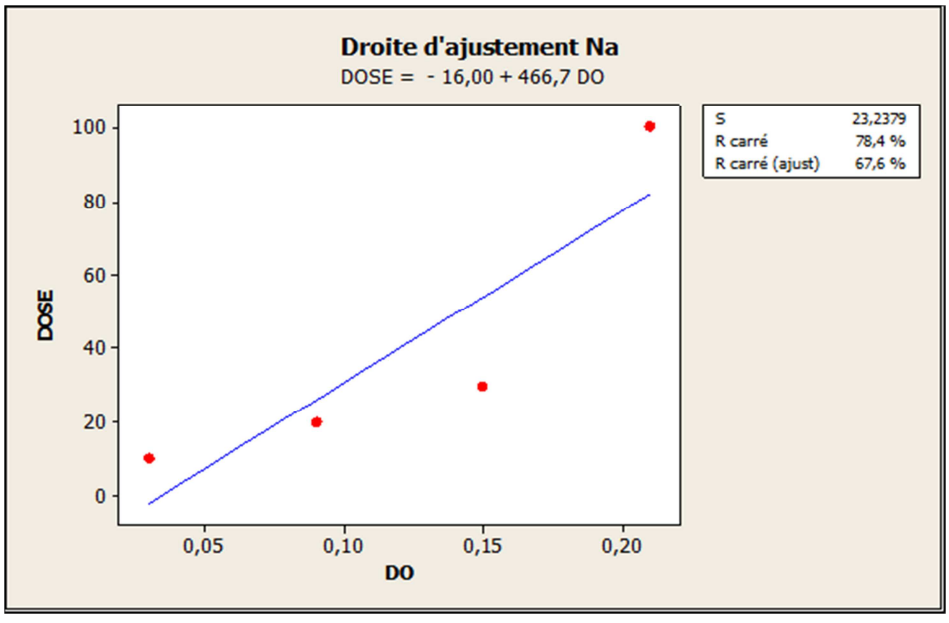
Ph isolats	4	8	10
E1N1,1	0,219±0,214	0,058±0,029	0,179±0,026
E3N2,1	0,013±0,009	0,201±0,056	0,100±0,015
E2N3,2	0,112±0,084	0,246±0,073	0,225±0,017
E1N1,2	0,154±0,201	0,157±0,152	0,183±0,150
E3N1,3	0,144±0,012	0,197±0,040	0,096±0,005
E1N4,1	0,179±0,298	0,106±0,114	0,111±0,059
E3N1,1	0,282±0,275	0,210±0,018	0,124±0,064
E3N1,2	0,174±0,042	0,063±0,065	0,267±0,024
E3N2,2	0,016±0,004	0,137±0,030	0,100±0,071
E2N2,2cl	0,012±0,002	0,247±0,017	0,067±0,041
E2N2,1	0,058±0,012	0,125±0,175	0,107±0,091
E2N2,2cl	0,146±0,084	0,093±0,044	0,104±0,032

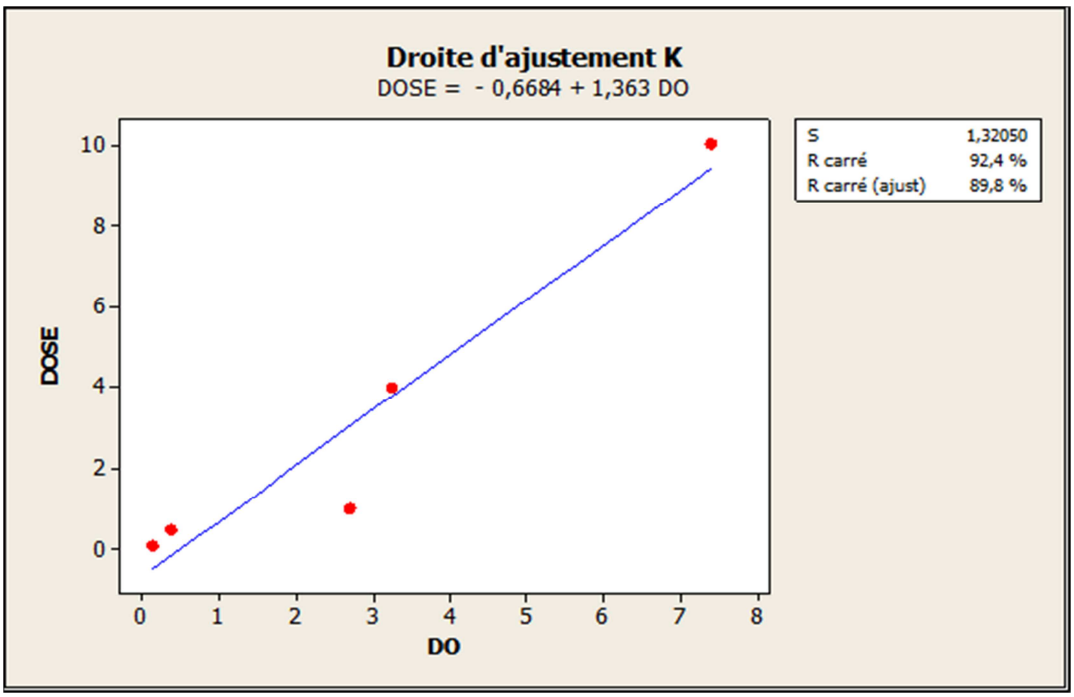
Annexe 03

Les paramètres chimiques du sol

	Na	Ca	K	pH	conductivité
R1	0.09	2.79	0.39	7.6	1126
R2	0.18	2.18	0.53	7.6	1277
R3	0.18	1.97	0.55	7.61	1321
	0.15±0.052	0.49±0.087	2.313±0.425	7.603±0.0057	1241.33±102.275






Droite d'ajustement K
DOSE = - 0,6684 + 1,363 DO
S 1,32050
R carré 92,4 %
R carré (ajust) 89,8 %
DOSE
DO
0
2
4
6
8
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8

Annexe 04

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

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
NaCl	fixe	5	1; 2; 3; 4; 5
Isolats	fixe	12	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12

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
NaCl	4	0,491151	0,491151	0,122788	17,83	0,000
Isolats	11	0,165891	0,165891	0,015081	2,19	0,019
NaCl*Isolats	44	0,561939	0,561939	0,012771	1,85	0,004
Erreur	120	0,826320	0,826320	0,006886		
Total	179	2,045301				

S = 0,0829819 R carré = 59,60 % R carré (ajust) = 39,74 %

Observations aberrantes pour D.O.NaCL

		Valeurs			
		Valeur	Valeur	résiduelles	
Observation	D.O.NaCL	ajustée	ErT ajust	résiduelle	normalisées
32	0,049400	0,198800	0,047910	-0,149400	-2,21 R
33	0,442000	0,198800	0,047910	0,243200	3,59 R
127	0,147000	0,395333	0,047910	-0,248333	-3,67 R
128	0,898000	0,395333	0,047910	0,502667	7,42 R
129	0,141000	0,395333	0,047910	-0,254333	-3,75 R
152	0,560000	0,278833	0,047910	0,281167	4,15 R
153	0,014500	0,278833	0,047910	-0,264333	-3,90 R

R indique une observation ayant des valeurs résiduelles normalisées importantes

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

NaCl	N	Moyenne	Groupement
2	36	0,138742	A
1	36	0,125972	A
3	36	0,116322	A
4	36	0,026769	B
5	36	0,016411	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

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

Isolats	N	Moyenne	Groupement
9	15	0,134707	A
5	15	0,125033	A
7	15	0,122047	A
8	15	0,111187	A
11	15	0,093953	A
4	15	0,079113	A
12	15	0,076440	A
3	15	0,069647	A
1	15	0,053560	A
6	15	0,053160	A
10	15	0,050300	A
2	15	0,048973	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

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

NaCl	Isolats	N	Moyenne	Groupement
3	9	3	0,395333	A
1	11	3	0,278833	A B
2	8	3	0,268667	A B
2	5	3	0,267667	A B
2	7	3	0,216333	A B
2	12	3	0,199667	A B
1	3	3	0,198800	A B
3	5	3	0,191333	A B
1	4	3	0,177233	A B
3	8	3	0,166333	A B
1	7	3	0,166000	A B
3	7	3	0,161667	A B
2	9	3	0,123067	A B
1	5	3	0,116433	A B
2	4	3	0,111000	B
1	6	3	0,106167	B
1	12	3	0,099833	B
1	8	3	0,098700	B
2	1	3	0,098267	B
2	6	3	0,097100	B
1	10	3	0,095233	B
2	11	3	0,090667	B
2	10	3	0,090367	B
3	2	3	0,087167	B
3	3	3	0,081900	B
1	9	3	0,077733	B
3	1	3	0,075400	B
4	9	3	0,072433	B
2	2	3	0,066600	B

3	12	3	0,066067	B
1	2	3	0,061433	B
4	7	3	0,061033	B
4	4	3	0,054200	B
3	11	3	0,048633	B
3	4	3	0,044000	B
4	5	3	0,042633	B
3	6	3	0,039167	B
3	10	3	0,038867	B
4	1	3	0,036067	B
2	3	3	0,035500	B
1	1	3	0,035267	B
5	11	3	0,030900	B
5	3	3	0,026433	B
5	2	3	0,026100	B
5	1	3	0,022800	B
4	11	3	0,020733	B
5	10	3	0,019400	B
5	6	3	0,018867	B
5	8	3	0,016467	B
5	12	3	0,009567	B
5	4	3	0,009133	B
4	10	3	0,007633	B
5	5	3	0,007100	B
4	12	3	0,007067	B
4	8	3	0,005767	B
4	3	3	0,005600	B
5	7	3	0,005200	B
5	9	3	0,004967	B
4	6	3	0,004500	B
4	2	3	0,003567	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

Modèle linéaire général : D.O. Sucres en fonction de Sucres; Isolats_1

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
Sucres	fixe	6	1; 2; 3; 4; 5; 6
Isolats_1	fixe	12	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12

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

Source	DL	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Sucres	5	0,820335	0,820335	0,164067	21,30	0,000
Isolats_1	11	0,360393	0,360393	0,032763	4,25	0,000
Sucres*Isolats_1	55	1,018151	1,018151	0,018512	2,40	0,000
Erreur	144	1,108975	1,108975	0,007701		
Total	215	3,307854				

S = 0,0877566 R carré = 66,47 % R carré (ajust) = 49,94 %

Observations aberrantes pour D.O. Sucres

		Valeurs			
		Valeur		Valeur résiduelles	
Observation	D.O. Sucres	ajustée	ErT ajust	résiduelle	normalisées
13	0,411000	0,235333	0,050666	0,175667	2,45 R
37	0,124000	0,275667	0,050666	-0,151667	-2,12 R
39	0,441000	0,275667	0,050666	0,165333	2,31 R
73	0,435000	0,245000	0,050666	0,190000	2,65 R
91	0,434000	0,290667	0,050666	0,143333	2,00 R
193	0,990000	0,458333	0,050666	0,531667	7,42 R
194	0,195000	0,458333	0,050666	-0,263333	-3,68 R
195	0,190000	0,458333	0,050666	-0,268333	-3,74 R

R indique une observation ayant des valeurs résiduelles normalisées importantes

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

Sucres	N	Moyenne	Groupement
4	36	0,30256	A
‘6	36	0,27528	A B
1	36	0,26114	A B
5	36	0,22653	B C
3	36	0,18175	C
2	36	0,11958	D

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

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

Isolats_1	N	Moyenne	Groupement
4	18	0,29078	A
2	18	0,27983	A B
5	18	0,27333	A B
7	18	0,24806	A B C
9	18	0,24678	A B C
8	18	0,24006	A B C
11	18	0,23178	A B C
3	18	0,19600	A B C
6	18	0,19383	A B C
1	18	0,19039	B C
12	18	0,18583	B C
10	18	0,15700	C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

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

Sucres	Isolats_1	N	Moyenne	Groupement
4	4	3	0,47233	A
4	5	3	0,47167	A
5	11	3	0,45833	A
4	9	3	0,45100	A B
5	2	3	0,37333	A B C
1	7	3	0,36367	A B C
4	2	3	0,36233	A B C
1	12	3	0,35700	A B C D
6	8	3	0,34600	A B C D
6	5	3	0,33867	A B C D
3	7	3	0,32833	A B C D E
5	4	3	0,32833	A B C D E
4	3	3	0,31167	A B C D E
6	7	3	0,30800	A B C D E
4	11	3	0,30767	A B C D E
6	9	3	0,30000	A B C D E
6	11	3	0,29700	A B C D E
3	8	3	0,29467	A B C D E
1	6	3	0,29067	A B C D E
2	2	3	0,28600	A B C D E
6	12	3	0,27600	A B C D E
1	3	3	0,27567	A B C D E
1	4	3	0,27433	A B C D E
6	6	3	0,27333	A B C D E
6	3	3	0,27233	A B C D E
5	9	3	0,27200	A B C D E
6	4	3	0,26400	A B C D E
1	8	3	0,26333	A B C D E
1	2	3	0,25633	A B C D E

6	1	3	0,25533	A B C D E
1	1	3	0,25133	A B C D E
1	5	3	0,24500	A B C D E
5	1	3	0,23533	A B C D E
3	4	3	0,23100	A B C D E
4	8	3	0,22967	A B C D E
4	6	3	0,22133	A B C D E
1	10	3	0,22100	A B C D E
1	9	3	0,21833	A B C D E
4	7	3	0,21833	A B C D E
3	2	3	0,20967	A B C D E
3	5	3	0,20533	A B C D E
4	10	3	0,20500	A B C D E
5	5	3	0,20267	A B C D E
4	1	3	0,20033	A B C D E
6	2	3	0,19133	A B C D E
5	7	3	0,18167	A B C D E
6	10	3	0,18133	A B C D E
4	12	3	0,17933	A B C D E
3	10	3	0,17733	A B C D E
2	5	3	0,17667	A B C D E
5	8	3	0,17500	A B C D E
2	4	3	0,17467	A B C D E
3	6	3	0,15100	B C D E
3	3	3	0,13733	C D E
5	10	3	0,13333	C D E
2	8	3	0,13167	C D E
2	9	3	0,12867	C D E
5	6	3	0,12700	C D E
5	3	3	0,12533	C D E
3	12	3	0,11933	C D E
1	11	3	0,11700	C D E
3	11	3	0,11533	C D E
3	9	3	0,11067	C D E
5	12	3	0,10600	C D E

3	1	3	0,10100	C D E
2	6	3	0,09967	C D E
2	1	3	0,09900	C D E
2	11	3	0,09533	C D E
2	7	3	0,08833	C D E
2	12	3	0,07733	C D E
2	3	3	0,05367	D E
2	10	3	0,02400	E

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.