

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Sciences Biologiques de l'Environnement
Spécialité : Toxicologie Industrielle et Environnemental



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Isolement, purification et caractérisation des
souches rhizobiennes de *Spartium junceum* L.

Présenté par :

M^r HAMDAOUI Abdelhak

M^{elle} HAMMICHE Massissilia

Soutenu le : **25/06/2019**

Devant le jury composé de :

M ^{me} BOUREBABA Yasmina	MCB	Présidente
M ^r MOUSSI Kamal	MCB	Examineur
Mme BOULILA Farida	MCA	Promotrice
M ^{elle} BOUKHEDAMI Safia	Doctorante	Co-Promotrice

Année universitaire : 2018 / 2019

REMERCIEMENTS

Nous tenons d'abord à remercier notre promotrice madame **BOULILA Farida** enseignante à l'Université de Bejaïa de nous avoir encadrés et orientés, ainsi que ces encouragements répétés.

Qu'elle puisse trouver ici nos plus profondes gratitudee.

Notre remerciement s'adresse également à notre Co-promotrice madame **BOUKHEDAMI Safia** pour son suivi continu, ses conseils, sa patience durant notre période de stage.

Nous tenons à exprimer notre grand respect au membre de jury :

Madame BOUREBABA Yasmina, qui nous a fait honneur de présider ce jury sans oublier l'aide qu'elle nous a apporté, tout en sachant transmettre le goût de l'exigence scientifique.

Monsieur MOUSSI Kamel d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions les plus vifs S'adressent à Monsieur **RAMDANI Nacer** de nous avoir accueilli et aidé dans son laboratoire pour la réalisation de la partie Pédologique.

Nous remercions le personnel du laboratoire d'écologie microbienne de nous avoir aidés à chaque fois qu'on en avait besoin, particulièrement Monsieur **BELHADI Djellali** pour ses nombreux conseils judicieux et avisés.

Nous tenons à remercier également **BENSAID Karim** de nous avoir aidés pour la confection du dendrogramme.

Nous n'oublions pas de remercier tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation durant tout notre cursus universitaire.

DEDICACES

Je dédie ce Mémoire à :

A mes chers parents à qui je dois tant et qui n'ont pas cessé de me témoigner affection, pour leurs amours, soutient, et leurs encouragements continue, mes sincères sentiments pour leur patience illimitée, mon profond amour pour leurs sacrifices.

A mes chers frères et sœurs pour leurs conseils et orientations, qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

A mes amis pour leurs aides et ambiances qui ont toujours régné entre nous.

Sans oublier mon binôme pour toute sa confiance. Et à toute sa famille.

A tous mes amis, mes collègues de promotion en souvenir de nos bons moments.

Ainsi qu'aux personnes que j'aime.

Abdelhak

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents, particulièrement ma mère, à tous ces sacrifices et aux valeurs qu'elle a su m'inculquer pour ces encouragements, sa tendresse, j'espère lui inspirer joie et fierté.

À celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de mon cursus universitaire : mon fiancé Bilal, et bien sûr ma sœur Célena et à mon frère Youba.

À tous mes proches ; Tante, oncles, cousins et cousines.

À mon binôme qui m'a toujours épaulé, aidé et en souvenir de nos bons moments amicaux.

À mes amies son exception.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tout allégué, et le fait de votre soutien infaillible, merci d'être là pour moi.

Massissilia

SOMMAIRE

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction01

Revue bibliographique

I. Azote.....	02
I.1. Cycle d'azote.....	02
I.2. Fixation biologique de l'azote.....	03
I.3. Molécules clés de la fixation biologique de l'azote.....	03
II. Légumineuse.....	04
II.1. Classifications des légumineuses.....	04
II.2. Importance des légumineuses.....	05
II.2.1. Intérêt agronomique des légumineuses	06
II.2.2. Intérêt économique des légumineuses.....	06
II.2.3. Intérêt écologique des légumineuses.....	06
II.3. <i>Spartium junceum</i> L.	06
II.3.1. Intérêt du genêt d'Espagne.....	07
III. Rhizobia	07
III.1. Taxonomie des rhizobia	08
IV. Interaction rhizobium-légumineuse	09
IV.1. Mécanismes moléculaires de la nodulation.....	09

Matériel et méthodes

I. Matériel biologique.....	11
I.1. Collecte des nodules	11
I.2. Prélèvement des nodules et leur transport.....	11
I.3. Souches de références	12
II. Méthodes	12

II.1. Analyse physico-chimique du sol.....	12
II.1.1. Dosage des carbonates (Calcaire total)	12
II.1.2. Mesure du pH du sol	13
II.1.3. Dosage de l'azote total.....	14
II.1.4. Mesure de la conductivité électrique	14
II.2. Isolement et purification des bactéries à partir des nodules	14
II.2.1. Stérilisation des nodules en surface	14
II.2.2. Isolement des bactéries	15
II.2.3. Purification des colonies	15
II.3. Stockage et conservation des isolats	15
II.4. Test de nodulation	15
II.4.1. Stérilisation et pré-germination des graines.....	15
II.4.2. Cultures des plantes dans des tubes	16
II.4.3. Inoculation des plantes.....	17
III. Caractérisation phénotypique des isolats bactériens.....	17
III.1. Caractérisation morphologique	17
III.2. Caractérisation biochimique	18
III.2.1. Test du bleu de bromothymol (BTB).....	18
III.2.2. Test du Citrate de Simmons.....	19
III.2.3. Test Urée-Indole	19
III.2.4. Réduction des nitrates	19
III.2.5. Test du 3-cetolactose	20
III.2.6. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	20
III.3. Caractères nutritionnels	20
III.3.1. Assimilation des sucres comme source de carbone.....	20
III.3.2. Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote.....	20
III.4. Caractères physiologique	21
III.4.1. Effets de la température	21
III.4.2. Effets du pH.....	21
III.4.3. Effets du NaCl	21
IV. Analyse numérique de la caractérisation phénotypique	21

Résultats et discussions

I. Analyse physico-chimique des sols	23
II. Collection d'isolats.....	23
III. Test nodulation simple et croisée	24
IV. Caractérisation phénotypique.....	26
IV.1. Caractérisation morphologique des colonies.....	26
IV.2. Caractérisation cellulaire des isolats.....	28
IV.3. Caractérisation biochimique des isolats	29
IV.3.1. Test de bleu de bromothymol	29
IV.3.2. Test de Citrats de Simmons	29
IV.3.3. Test d'urée d'indole	29
IV.3.4. Test de Nitrate.....	30
IV.3.5. Test 3-cetolactose	30
IV.3.6. Résistance et sensibilité aux antibiotiques.....	32
IV.4. Caractérisation nutritionnelle	33
IV.4.1. Assimilation des sucres.....	33
IV.4.2. Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote et de carbone	34
IV.5. Caractéristiques physiologiques	35
IV.5.1. Effet de température.....	36
IV.5.2. Effet du pH	37
IV.5.3. Effet du NaCl.....	39
V. Analyse numérique de la caractérisation phénotypique	40
Conclusion et perspectives	43
Références bibliographiques	45

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

A : Caractère communs positifs

ARN_r : Acide ribonucleique ribosomique

B : Caractères différents

BNL : Bactéries nodulant les Légumineuses

BTB : Bleu de Bromothymol

C : Caractère communs négatifs.

CE : Conductivité électrique

Cit : Citrate

DO : Densité optique

EPS : Exopolysaccharide.

In : Indole

Kana 10: Kanamycine 10

Kana 25: Kanamycine 25

N₂ : Diazote

N₂O : Protoxyde d'azote

NH₃ : Ammoniaque

NO: Oxyde nitreux

NO₂⁻ : Nitrite

NR : Nitrate réductase

O₂ : Oxygène

PHB : β-hydroxybutyrate

RB : Réactif de Benedict

Spectino 10: Spectinomycine 10

Spectino 50: Spectinomycine 50

Strepte 50: Streptomycine 50

Strepto 10: Streptomycine 10

Ur : Urée

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol brouth

λ : Longueur d'onde

Liste des figures

	Page
Figure 01 : Cycle d'azote	03
Figure 02 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur les séquences de l'ARNr 16s	08
Figure 03 : Schéma représentant le dialogue moléculaire entre les légumineuses et les rhizobia.....	10
Figure 04 : Carte de la localisation géographique de la région de Toudja	11
Figure 05 : Normes de classification des carbonates.....	13
Figure 06 : Normes mondiales pour la comparaison du pH du sol	13
Figure 07 : Graines de <i>Spartium junceum</i> mise en germination	16
Figure 08 : Graines de <i>Vigna unguiculata</i> mise en germination	16
Figure 09 : Dispositif de mise en culture du test nodulation	17
Figure 10 : Couleur du milieu en fonction du pH	18
Figure 11 : Différentes parties de la plante <i>Spartium junceum</i> L. (Racine, tige et feuilles, Nodule)	26
Figure 12 : Différentes parties de la plante <i>Vigna unguiculata</i> après le test de nodulation	26
Figure 13 : Aspect de quelques souches bactériennes sur YMA	27
Figure 14 : Gram négatif des souches sous microscope optique (Gr×1000).....	28
Figure 15 : Acidification et alcalinisation du milieu YMA par les souches	29
Figure 16 : Exemple de résultats de l' <i>Agrobacterium</i> de quelques souches obtenues, observés une heure après l'ajout du réactif de Benedict.....	31
Figure 17 : Histogramme représentatif de la résistance et sensibilité aux antibiotiques en pourcentage	33
Figure 18 : Effet des températures sur la croissance des souches testées du groupe 01 .	36
Figure 19 : Effet des températures sur la croissance des souches testées du groupe 02 .	36
Figure 20 : Effet des températures sur la croissance des souches testées du groupe 03 .	37
Figure 21 : Effet des pH sur la croissance des souches testées du groupe 01	38
Figure 22 : Effet des pH sur la croissance des souches testées du groupe 02	38
Figure 23 : Effet des pH sur la croissance des souches testées du groupe 03	38
Figure 24 : Effet de NaCl a des concentrations déférentes sur la croissance des souches testées du groupe 01	39

Figure 25: Effet de NaCL a des concentrations déférentes sur la croissance des souches testées du groupe 02	39
Figure 26: Effet de NaCL a des concentrations déférentes sur la croissance des souches testées du groupe 03	40
Figure 27 : Dendrogramme indiquant les similarités phénotypiques entre les souches nodulant <i>Spartium junceum</i> L. et les souches de références étudiées	41

Liste des tableaux

	Page
Tableau I : Répartition des 13 genres des rhizobiums selon les deux classes α -Protéobactérie et β - Protéobactérie	9
Tableau II : Résultats d'analyse physico-chimique des sols	23
Tableau III : Résultats du test de nodulation simple et croisée	24
Tableau IV : Caractères des nodules et des plantes nodulées	25
Tableau V : Caractères morphologiques des colonies. Les souches en gras indiquent les souches ayant nodulé.....	27
Tableau VI : Résultats des tests de la caractérisation biochimique	31
Tableau VII : Résultats des tests nutritionnels (assimilation des sucres et les acides aminés)	34
Tableau VIII : Différents groupes étudiés dans ces tests	35

L'Algérie, comme tous les pays de la méditerranée, est confrontée aux graves phénomènes de dégradation des terres, à la sécheresse et à la désertification. Malgré ces changements et les perturbations, l'Algérie abrite une grande diversité biologique animale et végétale. Le patrimoine floristique comprend plusieurs espèces spontanées et considérées comme une source de fourrage pour les animaux (**Benouaret et al., 2014a**), et des espèces cultivées qui occupent une place importante dans les systèmes de culture dans l'alimentation de la population (**Mazoyer et al., 2017**).

La famille des légumineuses est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'Homme, en occupant une place importante dans le domaine alimentaire, économique et agricole (**Mazoyer et al., 2017**). Dans la région méditerranéenne, les *Fabaceae* sont prédominantes et sont principalement représentées par des espèces herbacées ainsi que par un groupe mineur de genres ligneux (*Genista*, *Cytisus*, *Anthylli*, ...) (**Quatrini et al., 2002**). Parmi ces genres ligneux, le genêt d'Espagne ou bien *Spartium junceum* L., qui a un intérêt écologique dans la protection de l'environnement et dans la lutte contre la dégradation des écosystèmes en participant à la fixation de l'azote grâce à des bactéries du sol connues sous le nom de rhizobium ou Bactéries Nodulantes des Légumineuses (BNL) (**Benouaret et al., 2014**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui a pour objectif l'isolement, la purification et la caractérisation phénotypique des souches isolées de *Spartium junceum*. Cette étude est une partie du projet animé par l'équipe du laboratoire d'écologie microbienne (LEM) qui concerne l'identification et la sélection de rhizobiums isolés de légumineuses de la tribu de *Genisteeae* (*Spartium*, *Retama*, *Cytisus*, ...) afin de les utiliser dans la revégétalisation et la restauration des sols pauvres et ou dégradés.

Ce mémoire est structuré en plusieurs parties : une première partie de synthèse bibliographique où nous rapportons les travaux relatifs aux deux partenaires ; les légumineuses et les rhizobia. Une deuxième partie où nous exposons le matériel biologique, les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail. La troisième partie concerne les résultats obtenus et leurs discussions.

I. Azote

L'atmosphère contient une grande quantité de diazote (N_2) 78% du volume de l'atmosphère terrestre sous forme d'un gaz incolore et inodore (**Hopkins, 2003**). Cet élément considéré comme élément chimique essentiel pour toutes les formes de vie et un composé de base vital pour de nombreux processus biologiques dont la synthèse des acides aminés et des protéines (**Cleland et Harpole, 2010**). L'azote est un élément primordial du développement des plantes, représente que 2% des matières sèches totales de la plante qui pénètrent la chaîne alimentaire. Les plantes sont incapables d'utiliser le gaz di-nitrogène de l'atmosphère. En effet, elles absorbent l'azote à travers leurs racines dans le sol sous forme d'ammonium et de nitrates (**Santi et al., 2013**).

I.1. Cycle d'azote

Le cycle de l'azote est un processus cyclique naturel au cours duquel l'azote atmosphérique pénètre dans le sol. Il est l'un des cycles biogéochimiques les plus complexes (Figure 01).

L'azote joue un rôle déterminant sur le rendement des cultures et sur la qualité des productions. Les plantes puisent cet élément dans le sol sous forme minérale. A partir de l'azote atmosphérique, des bactéries fixatrices d'azote produisent de l'ammoniaque. Certaines de ces bactéries comme les rhizobiums, vivent en symbiose avec les légumineuses, produisant de l'ammoniaque.

L'azote prend de nombreuses formes dans son trajet à travers l'écosystème (Figure 01). La première étape est l'ammonification, la deuxième et la nitrification en suite dénitrification (**Roy, 2005**) :

- **Ammonification** : Les matières organiques azotées se transforment en sels ammoniacaux.
- **Nitrification** : L'oxydation de l'azote (consommation d'oxygène) Premièrement l'ammoniaque (NH_3) est transformée en nitrite (NO_2^-) par la nitrification, grâce à l'action des bactéries nitreuses : *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosospira*, *Nitrosoglea*,... (**Anonyme 01**). Deuxièmement les nitrites (NO_2^-) sont transformés en nitrate (NO_3^-) par la nitrification, grâce à l'action des bactéries nitriques : *Nitrobacter*, *Nitrocystis*, *Bactoderma*, *Macroderma*,... (**Anonyme 01**).
- **Dénitrification** : Cette étape produit principalement du diazote (N_2), mais de faible quantité d'oxyde nitreux (NO) sont aussi libérés dans l'atmosphère (**Anonyme 01**).

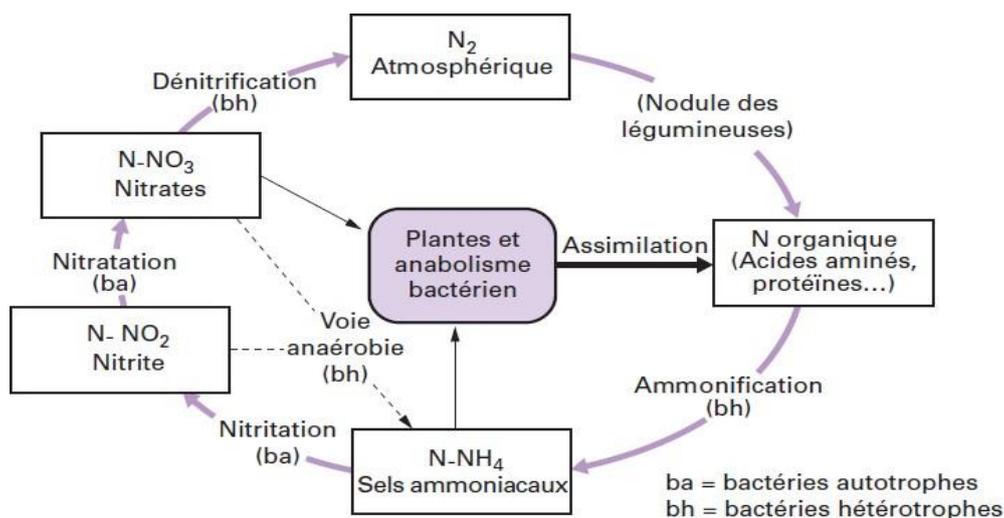


Figure 01 : Cycle d'azote (Anonyme 01).

I.2. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. Ce processus relève uniquement du domaine des procaryotes, parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Mahboub, 2018).

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azotes sont connues. Certaines d'entre elles englobent les associations entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses. L'association symbiotique est la forme la plus connue qui provoque la formation sur les racines de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules. La plante étant l'hôte et la bactérie est le microsymbiote (Hopkins, 2003). Dans ces associations fixatrices d'azote le partenaire végétal fournit à la bactérie de l'énergie et des produits de photosynthèse. En contrepartie, la bactérie fournit une grande partie de l'azote nécessaire à la croissance de la plante. C'est le cas des systèmes associant des plantes de la famille des légumineuses et certaines bactéries Gram négatif, communément appelées « rhizobia » ou « bactéries nodulant les légumineuses » (Sebihi, 2008).

I.3. Molécules clés de la fixation biologique de l'azote

- **Nitrogénase**

Dans le domaine de l'industrie, la fixation de l'azote est typiquement effectuée en présence de fer agissant comme catalyseur, et à des conditions bien définies de température et

de pression (environ 500°C avec une pression à 300 atm). Par contre la fixation biologique de l'azote nécessite une enzyme complexe : le complexe nitrogénase (**Sebihi, 2008**). La nitrogénase est une enzyme bactérienne, responsable de la fixation de l'azote et de sa transformation en ammonium directement assimilable par la plante qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines solubles des bactéroïdes (**Mahboub, 2018**).

- **Leghémoglobine**

Proche de l'hémoglobine animal, la leghémoglobine végétale est présente dans les nodosités (nodules) des légumineuses (**Dajoz, 2012**). Une protéine pigmentée de couleur rose foncé. Dans les nodules fixateurs d'azote, la leghémoglobine peut représenter 20 à 25% des protéines cytoplasmiques (**Ramdane et al., 2016**), elle abaisse la concentration d'O₂ libre dans les nodules de la plante en le fixant. L'oxygène fixé par la leghémoglobine n'est plus libre dans les nodules et ne peut donc plus interagir avec la nitrogénase pour l'inhiber (**Sebihi, 2008**).

II. Légumineuses

Les légumineuses ou *Fabaceae* constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes, comprenant environ 750 genres et près de 20 000 espèces. Les espèces sont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (**Nouar et al., 2014**), la plaçant en seconde position derrière les *Poaceae*, en termes de diversité (**Polhill et al., 1981**).

Cette super famille comprend plus de plantes herbacées annuelles que de plantes ligneuses. Celle-ci constitue de loin le groupe le plus important de plante participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (**Raven et al., 2000**). L'azote fixé par la plante peut être utilisé d'abord par elle-même, puis par les cultures suivantes qui peuvent bénéficier indirectement par l'entremise des résidus qu'elle laisse (**Iskounen, 2012**).

II.1. Classifications des légumineuses

Selon **Quezel et Santa (1962)**, la taxonomie des *Fabaceae* (*Leguminosae*) est classée comme suit :

Domaine : *Eucaryote*

Phylum : *Plantae*

Sous règne Végétaux (phanérogame)

Embranchement : Spermaphytes (plantes à graines)

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : *Rosida*

Ordre : *Fabales*

Super famille : *Leguminosae*

En se basant sur la forme florale, la famille de *Leguminosae* est divisée en trois familles, deux parmi elles sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième à savoir *Caesalpinoideae* est paraphylétique (Nouar et al., 2014).

- *Mimosoideae*

Ces légumineuses ont de très nombreuses petites fleurs en grappes à nombreux étamines saillants en dehors des petits pétales et symétriques, majoritairement des arbres et arbustes. La famille des *Mimosoideae* comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Environ 10% des ces espèces ont été déjà examinées et la majorité ont des nodules (Benouaret et al., 2014).

- *Caesalpinoideae*

Elle a une morphologie différente. En effet, ses fleurs sont irrégulières avec cinq pétales, sous forme des papillons à étamine unies, principalement des arbres et arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales à climat chaud. Cette famille comprend environ 150 genres et 2200 espèces, parmi ces espèces environ 23% examinée sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces nodulées se retrouvent majoritairement dans les tribus des *Caesalpiniées* et *Cassieae* ; les tribus *Cercideae* et *Amherstieae* étant très peu nodulées (Maxted et Bennett, 2001).

- *Papilionaceae*

C'est un groupe de légumineuses très diversifié à grande représentation principalement herbacée mais comprend aussi des arbres et arbustes. Elle compte environ 440 genres, regroupés en 31 tribus (Labat et al., 1996), et inclut les légumineuses à graines bien connues telles que les haricots et les pois. Cette famille a une morphologie bien définie, avec des fleurs en forme de papillon et un pétale supérieur appelé étendard, deux pétales latéraux, ou ailes et une carène formée par deux pétales inférieurs unis. Parmi les 21% d'espèces déjà examinées la grande majorité (97%) est nodulée (pois, haricot, fève, lentille...) par les rhizobia (Benouaret et al., 2014).

II.2. Importance des légumineuses

La famille des légumineuses présente un grand intérêt pour l'Homme qui utilise ses

produits comme aliments, gommés, teintures, résines, huiles et nombreux bois de construction. Aussi certaines espèces peuvent contracter une symbiose avec une bactérie du genre *rhizobium*, pour permettre un accès privilégié à l'azote de l'air (Sebihi, 2008).

II.2.1. Intérêt agronomique des légumineuses

Particulièrement liée à leur capacité à fixer l'azote dans leurs nodosités, les légumineuses ne nécessitent aucune fertilisation azotée et contribuent naturellement à enrichir le sol en azote. Cette capacité de fixer l'azote permet de réduire les coûts de production, et de diminuer les pertes dues à l'érosion (Lazrak, 2008).

II.2.2. Intérêt économique des légumineuses

En termes d'importance économique, de nombreuses espèces de légumineuse de la famille *Césalpiniciacées* et de *Mimosacées* sont considérées comme une source de fourrage et de bois à usage domestique (Zaidi et kaved, 2017). Elles sont également une source d'engrais vert et produisent un grand nombre de composés comme les médicaments, des poisons, des teintures, parfums et des substances antimicrobiennes (Iskounen, 2012).

II.2.3. Intérêt écologique des légumineuses

Elles permettent une conservation du sol et de sa fertilité, en raison de la grande quantité d'azote fixé, ce qui contribue à une agriculture durable (Belhadi et al., 2018). Les résidus des légumineuses sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent aussi bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse (Zaidi et kaved, 2017).

II.3. *Spartium junceum* L.

Spartium junceum L. est une légumineuse vivace, arbuste spontanée dans régions méditerranéennes. Elle se trouve dans des endroits ensoleillés, généralement sur des sols secs et sableux. Cette plante est peu adaptée aux sols alcalins et salés (Cerchiara et al., 2010). En Algérie connu sous le nom de « kessaba » en arabe et « Tartak » en kabyle. Classé dans la catégorie arbuste ou petit arbre à rameaux dressés, effilés, jonciformes. Feuilles rares ou nulles, foliolées, sans stipules. Fleurs grandes en grappes terminales pauciflores, pourvues de bractées et de bractéales très petites et caduques. Calice membraneux, en forme de gaine, à dents très courtes, les postérieures rejetées en avant et séparées par un sinus très profond, les antérieures séparées par des sinus très courts. Ce genre est constitué d'une seule et unique espèce à savoir *Spartium junceum* L. (Maire, 1987).

II.3.1. Intérêt du genêt d'Espagne

Spartium junceum L. a eu une large gamme d'applications, en Italie et en Espagne cette espèce pionnière a été utilisée pour restaurer les écosystèmes dégradés, pour réparer et fixer les pentes érodées et instables. De plus, en tant que plante fixatrice d'azote, elle pourrait être cultivée sur des terres agricoles en raison de sa tolérance à la sécheresse (Quatrini et al., 2002 ; Luciana et al., 2013). Ses fleurs sont utilisées pour la production de parfums et colorants, des paniers (Bischof et Kovačević, 2013).

La caractérisation de l'huile des graines de cette espèce montre la possibilité de son utilisation avec succès pour la fabrication de savon et de shampooing (Cerchiara et al., 2010).

Dans le domaine de la médecine et de la pharmacie traditionnelle *Spartium junceum* L. a été utilisée comme médicament traditionnel dans certains pays tels que l'Iran, la Turquie et la Syrie. Les fleurs sont des composants de la tisane connue sous le nom de «Zahraa», largement consommée en Syrie après les repas comme digestif et pour favoriser une bonne santé. En Italie, utilisé en médecine vétérinaire pour traiter les fractures des membres (comme plâtre utilisant les tiges). De plus, plusieurs études ont été rapportées sur les propriétés biologiques des fleurs de *Spartium junceum* L., il a été démontré qu'ils possèdent des activités sédatives, diurétiques, antiulcéreuses, anti-inflammatoires, analgésiques et antitumorales (Sofiane et al., 2016).

III. Rhizobia

Les bactéries appelées communément « rhizobia » ou « rhizobiums » nodulant les racines de plantes légumineuses ont été définies principalement sur la base de caractéristiques phénotypiques, à savoir la morphologie des colonies, leur croissance, et certains caractères métaboliques (Lorenzo et al., 1993).

Ces bactéries ont une forme bacille de 0,6 µm à 0,9 µm de largeur et d'une longueur d'environ 3 µm à Gram négatif et strictement aérobies. Leur principal rôle est la fixation d'azote atmosphérique en symbiose avec les légumineuses en formant des nodules soit au niveau des racines ou plus rarement sur les tiges de la plante (Boukechab et al., 2017).

La croissance optimale de la plupart des souches se situe entre 25°C et 30°C et un pH de 6 à 7 (Somasegaran et al., 1994). On les classe en trois catégories, celles à une croissance rapide tel que le genre *Rhizobium*, d'autres à croissance lente tel que le genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982) et enfin les *Mesorhizobium*, comportant actuellement 15 espèces qui ont été déplacées du genre *Rhizobium* vers ce genre dont la croissance est dite intermédiaire (Jarvis

et *al.*, 1997). Sur boîte de Pétri contenant du milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), les colonies de rhizobia sont d'une forme circulaire, convexe, blanche ou crèmes, opaque ou translucide, humide et brillante (Boukechab et *al.*, 2017).

III.1. Taxonomie des rhizobia

Selon le **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012)**, les rhizobia appartiennent au domaine des *Eubacteria*, au phylum des *Proteobacteria* et à la classe des *Alpha* et *bêta* (Figure 02).

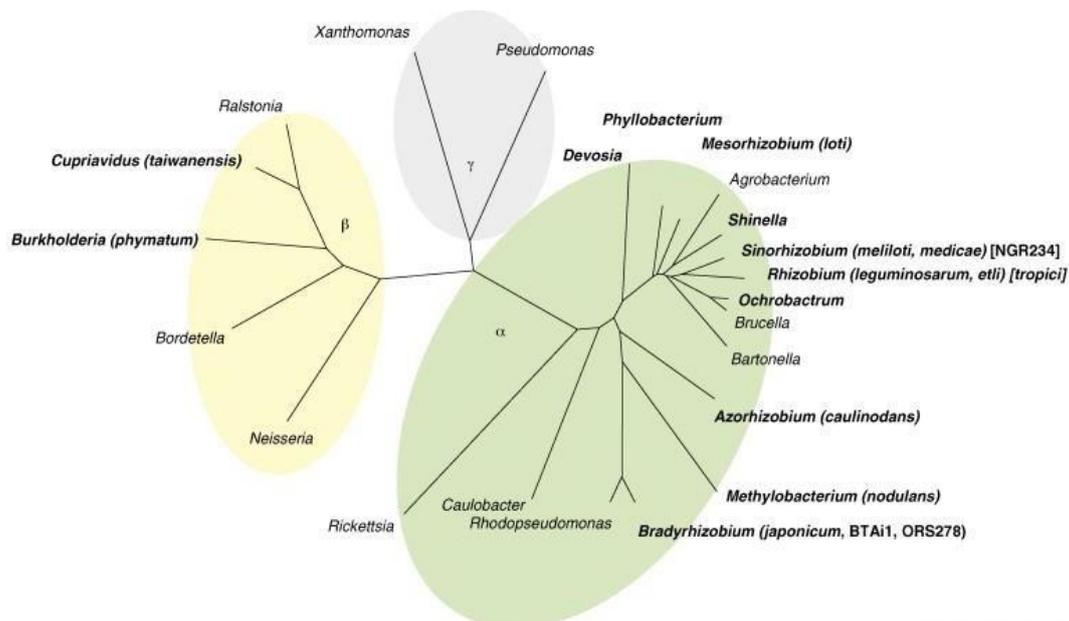


Figure 02 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur les séquences de l'ARNr 16s (Masson-Boivin et *al.*, 2009).

Les rhizobia comportent environ 13 genres (Tableau I) et plus d'une centaine espèces. Cette taxonomie est continuellement en évolution et en changement.

En Algérie, plusieurs rhizobia nodulant des légumineuses tel que le genre *Retama*, *Cytisus*, *Lupinus*, *Calicotome* appartenant à la tribu de *Geneistae* ont été décrits (Boulila et *al.*, 2009 ; Ahnia et *al.*, 2014 ; Bourebaba et *al.*, 2016 ; Salmi et *al.*, 2018).

Récemment, une nouvelle espèce *Bradyrhizobium algeriense* RST89^T nodulant *Retama sphaerocarpa* a été décrite par Ahnia et *al.* (2018). Cette description a été basée sur une caractérisation polyphasique, génomique et consensuelle.

Tableau I : Répartition des 13 genres des rhizobiums selon les deux classes α -Protéobactérie et β - Protéobactérie.

<i>α-Proteobacterie</i>	<i>β-Proteobacterie</i>
<i>Rhizobium</i>	
<i>Sinorhizobium</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Cupriavidus</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	
<i>Azorhizobium</i>	
<i>Methylobacterium</i>	
<i>Phyllobacterium</i>	
<i>Ochrobactrum</i>	
<i>Devosia</i>	
<i>Shinella</i>	
<i>Microvirga</i>	

IV. Interaction rhizobium-légumineuse

L'azote est un élément nutritif majeur pour la plante, il a une influence sur le rendement et la qualité du produit. Les plantes acquièrent l'azote sous forme minérale et pour certaines d'entre elles comme les légumineuses en mobilisant l'azote atmosphérique à travers leur interaction avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (Stougaard, 2000).

IV.1. Mécanismes moléculaires de la nodulation

Au niveau de la rhizosphère, de nombreuses substances organiques sont libérées par les racines de la plante d'un poids moléculaire faible et sont donc facilement décomposables par les micro-organismes. Cela conduit à l'existence d'une grande communauté microbienne autour de la racine (Figure 03). Parmi les molécules exsudées par les racines des légumineuses :

- Flavonoïdes

Ce sont des composés aromatiques diversifiés en forme et en fonction avec l'évolution des plantes. Bien que plus de 4000 flavonoïdes différents aient été identifiés chez les plantes vasculaires, seules quelques formes particulières de flavonoïdes sont impliquées dans la spécificité d'hôtes chez les légumineuses (Aoki et al., 2000), qui peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne pour constituer les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression du gène *nod* (Sousou, 2013).

- Facteur NOD

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**). En effet, la bactérie induit chez la légumineuse la formation d'un nouvel organe spécialisé sur les racines appelé : nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïdes capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant en ammoniacque (**Gibson et al., 2008**).

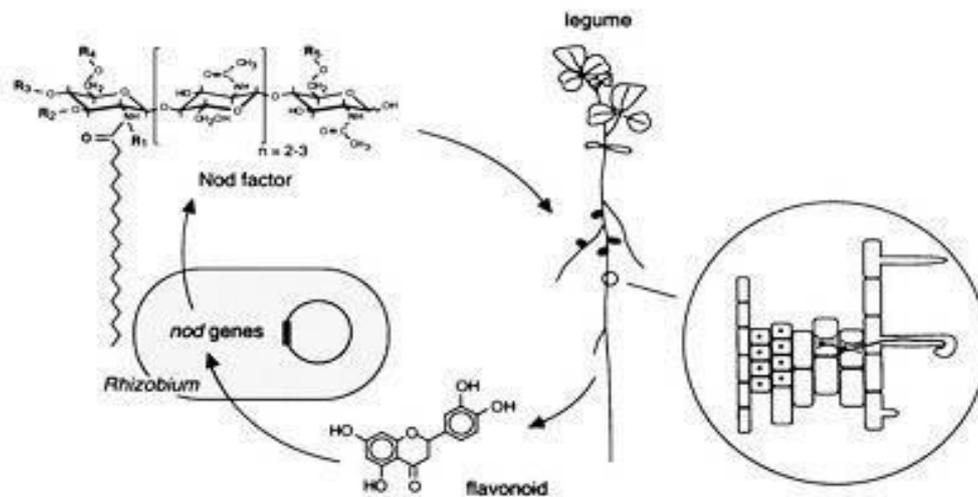


Figure 03 : Schéma représentant le dialogue moléculaire entre les légumineuses et les rhizobia (**Lindström et al., 2010**).

I. Matériel biologique

I.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules a été faite à partir des racines de la plante *Spartium junceum* L. située dans la zone Talla Hiba dite laazib n Bougie de la région de Toudja (Figure 04) wilaya de Bejaia (36°.758872 N, 4°.873990 E), à une altitude de 492 m au-dessus du niveau de la mer. La sortie sur terrain a été effectuée le 27 février de l'année 2019.

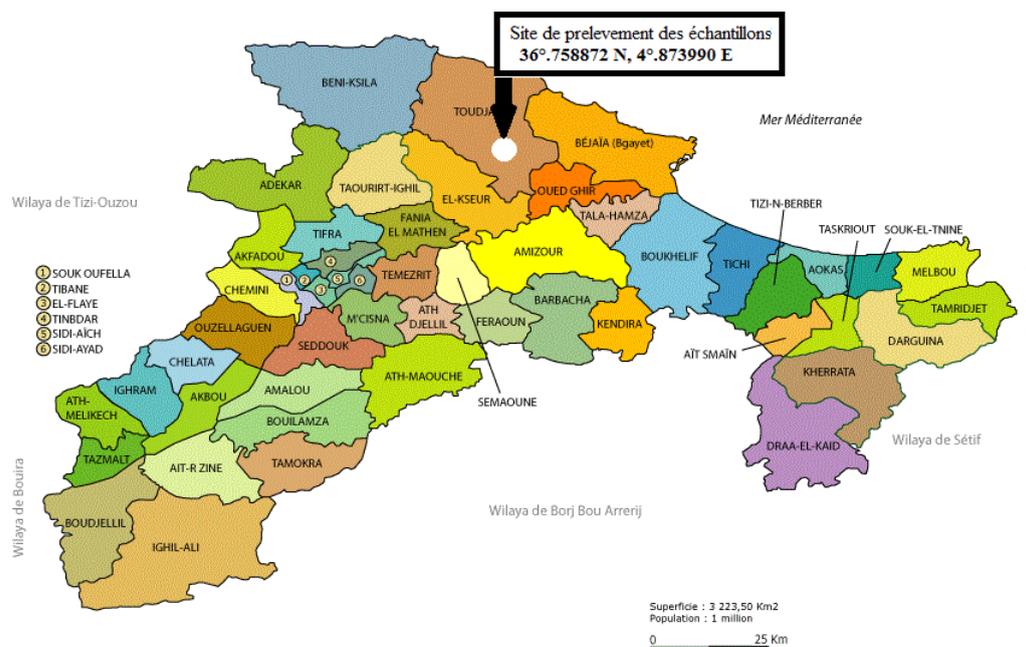


Figure 04 : Carte de la localisation géographique de la région Toudja.

I.2. Prélèvement des nodules et leur transport

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par **Vincent (1970)** et **Somasegaran et Hoben (1994)**. Il s'agit de :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.
- Récupérer l'appareil racinaire et laisser les racines avec le sol pour éviter que les nodules ne sèchent et les placer dans des boîtes de Pétri en verre.
- Après une conservation au congélateur à une température de 4°C environ 19^h les nodules sont transportés au laboratoire pour les traiter.
- Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau du robinet.

Des échantillons de sol ont également été prélevés au niveau des racines des plantes dans le site de collecte, afin de subir une analyse physico-chimique.

I.3. Souches de références

Huit souches de référence appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) ont été utilisées à titre comparatif il s'agit de :

- *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T
- *Bradyrhizobium canariense* BTA-1^T
- *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T
- *Bradyrhizobium cytisi* CTAW 11^T
- *Bradyrhizobium lupini* USDA 3051^T
- *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T
- *Microvirga Lupini* Lut 6^T
- *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T

II. Méthodes

II.1. Analyse physico-chimique du sol

L'analyse physico-chimique des échantillons du site de collecte ont permis de déterminer le carbonate, le pH, l'azote total, la conductivité selon les techniques utilisées par le centre d'études phyto-sociologiques et écologiques Louis Emberger de Montpellier, France (Emberger et Godron, 1983).

Ces analyses ont été effectuées dans le laboratoire de pédologie de l'université de Bejaia sur une terre fine (diamètre = 2 mm) après plusieurs traitements. Il s'agit de sécher le sol à l'air libre pendant plusieurs jours, et le tamiser à l'aide d'un tamis de 2 mm de diamètre. Enfin, la récupération et conservation de la terre fine dans des sachets en plastique.

II.1.1. Dosage des carbonates (Calcaire total)

Le calcaire total du sol a été déterminé par la méthode gazométrique (Annexe I) dans des sols fins grâce au calcimètre de Bernard. Le principe est de mesurer le volume de CO₂ produit par le CaCO₃ pure et comparé au volume de CO₂ dégagé par les carbonates contenus dans les sols décomposés sous l'action de l'acide chlorhydrique (HCl ½) sous la réaction suivante (Es-Skalli, 2015) :



La teneur en carbonates, exprimée en % est donnée par la formule suivante :

$$\text{CaCO}_3 (\%) = \frac{\text{P.v}}{\text{p.V}} \cdot 100$$

P : poids de CaCO_3 utilisé pour l'étalonnage

p : poids de la prise d'essai de sol

V : volume de CO_2 dégagé par le poids d'échantillon de sol

v : volume de CO_2 dégagé par le poids de CaCO_3 .

Après avoir calculé la valeur de CaCO_3 , nous l'avons comparé aux normes mondiales données dans la figure suivant :

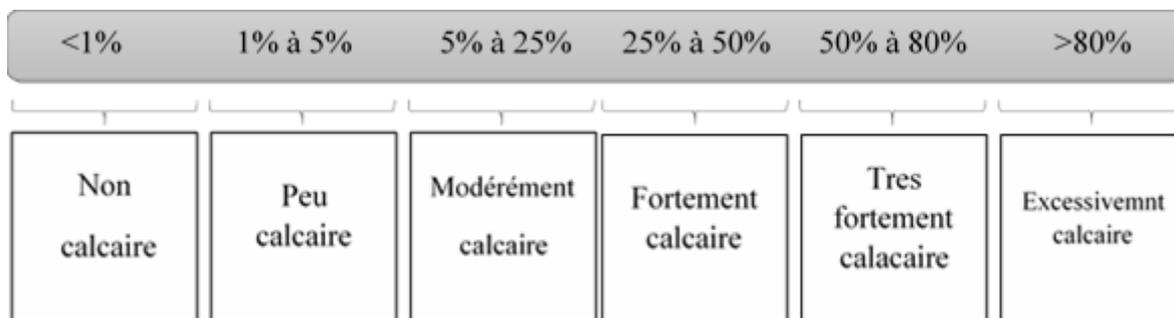


Figure 05 : Normes de classification des carbonates (Es-Skalli, 2015).

II.1.2. Mesure du pH du sol

Le pH du sol traduit le degré d'acidité ou d'alcalinité (basicité) de l'eau en contact avec le sol étudié, déterminé par l'emploi d'un pH-mètre à électrode de verre calibré à l'aide de deux solutions tampons (pH 4 et pH 7) (Annexe I).

Deux mesures de pH ont été déterminées, ce sont : pH_{eau} (acidité actuelle) et pH_{kcl} (acidité potentielle ou totale).

- pH_{eau} : Exprimée par la concentration en ions H^+ dissociés présents dans la solution (sol/eau) à un instant donné.
- pH_{kcl} : Exprimée par la quantité totale des ions H^+ dissociés présents dans la solution (sol/chlorure de potassium) à un instant donné.

La comparaison entre le pH est faite par rapport aux normes mondiales suivantes :

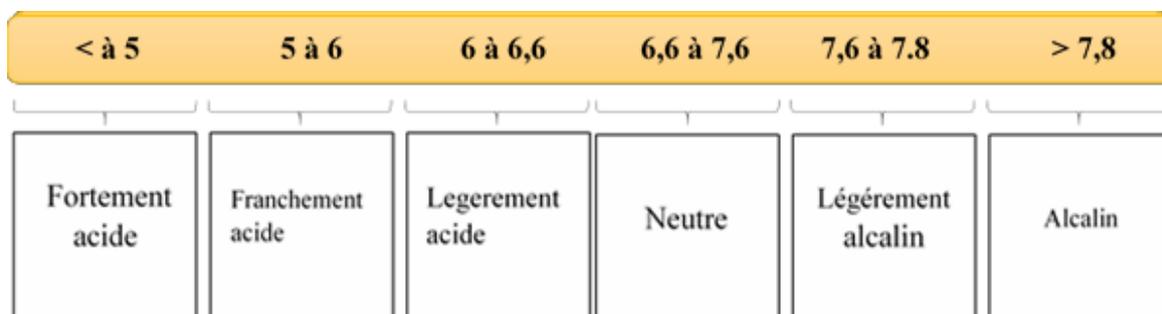


Figure 06 : Normes mondiales pour la comparaison de pH du sol (Es-Skalli A, 2015).

II.1.3. Dosage de l'azote total

L'azote total du sol est déterminé par la méthode de Kjeldahl. Le principe de cette méthode est basé sur trois étapes successivement réalisées. La minéralisation repose sur la transformation des composés organiques en azote ammoniacal sous l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant. Cette transformation faite en présence d'un catalyseur renfermant du sulfate de cuivre ainsi que du sulfate de potassium et de sélénium. L'azote organique du sol est transformé en azote ammoniacal. Ce dernier, libéré de sa forme combinée par distillation après alcalinisation à l'aide d'une base forte (NaOH) puis recueilli dans une solution borique qu'on dose avec du H₂SO₄.

II.1.4. Mesure de la conductivité électrique

La conductivité électrique (CE) est mesurée à l'aide d'un conductimètre, possédant une sonde permettant de mesurer la conductivité à 25°C. Les résultats sont lus directement et sont exprimés en µS/cm. La détermination de la salinité d'un sol est fondée sur le principe de l'extraction d'un électrolyte qui fournit les éléments nécessaires au calcul de la conductivité électrique.

L'échantillon de sol est extrait dans un rapport d'extraction de 1:5 (m/V) avec de l'eau distillée, afin de dissoudre les électrolytes (Djehiche et al., 2017).

II.2. Isolement et purification des bactéries à partir des nodules

L'isolement de bactéries à partir du *Spartium junceum* L. a été effectué en conditions stériles selon la technique de Vincent (1970). Cette technique nous permet d'obtenir une collection de bactéries pures à partir des nodosités racinaires en suivant les étapes ci-dessous :

- La stérilisation des nodules en surface.
- Encrassement des nodules pour donner du broyat nodulaire et en suite ensemencement sur boîtes de Pétri.
- Purification par repiquage successive sur milieu YMA (Annexe II).

II.2.1. Stérilisation des nodules en surface

Les nodosités racinaires récoltées sont immergées dans de l'eau pour éliminer le sol. Par la suite, on les découpe individuellement tout en les laissant liés avec un peu de la racine. Les nodosités sont immergées dans de l'éthanol à 96% durant 30 sec puis dans de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 3 min. Ceci est suivi par plusieurs rinçages successifs.

II.2.2. Isolement des bactéries

Les nodules stérilisés sont transféré individuellement dans des tubes eppendorfs stérile, à l'aide d'une tige métallique au bout arrondie. Les nodules sont écrasées, et les broyats sont ensemencés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA (Annexe II) puis incubé à 28°C pendant plusieurs jours jusqu'à l'apparition des colonies visibles. Cette opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (Vincent, 1970).

II.2.3. Purification des colonies

Les colonies bien isolées sont repiquées sur des nouvelles boîtes contenant de l'YMA et incubées à 28°C pendant quelque jour. La purification se fait par repiquage successive sur milieu YMA jusqu'à obtention d'isolats purs.

II.3. Stockage et conservation des isolats

Deux méthodes sont utilisées pour la conservation des souches bactériennes, il s'agit de la :

- Conservation sur YMA en tube à gélose inclinée à 4°C qui nous permet une conservation de 6 mois.
- Conservation sur YMB additionné de glycérol à une température de -80°C pour une conservation à long terme.

II.4. Test de nodulation

Ce test est le premier test préliminaire pour identifier les souches isolées des nodosités collectées avant leur mise en collection. Il nous permet de vérifier l'appartenance d'une souche aux rhizobia. Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des souches à réinfecter la plante hôte et à former des nodules au niveau des racines.

II.4.1. Stérilisation et pré-germination des graines

- **Pour les grains à tégument dure**

Pour lever l'inhibition tégumentaire, les graines de *Spartium junceum* sont placées dans un bécher contenant de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré à 96% pendant 3h et on procède par la suite au rinçage plusieurs fois à l'eau distillée stérile, puis on les laisse gonfler lors du dernier rinçage pendant 24h. Par la suite, les graines sont mises à germer sur boîtes de Pétri en verre stériles, tapissées de papier absorbant humidifié avec de l'eau distillée stérile. Les boîtes sont enveloppées avec du papier aluminium et incubées à 25°C à l'obscurité, jusqu'à

germination des graines.



Figure 07 : Graines de *Spartium junceum* mise en germination.

- **Pour les grains de tégument souple**

Sous une hotte à flux laminaire, une quantité de graines de *Vigna unguiculata*, sont immergées dans de l'alcool à 96% pendant 30 secondes. Par la suite, les transférer dans de l'eau de javel à 12% pendant 3 à 5 minutes, puis les rincer abondamment 10 fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont mise en germination dans des boîtes de Pétri contenant du papier absorbant imbibés d'eau distillée stérile (Figure 08) puis mises à l'obscurité à une température de 20°C.



Figure 08 : Graines de *Vigna unguiculata* mise en germination.

II.4. 2. Cultures des plantes

Après la germination des graines, les plantules ayant un radicule d'environ 1,5 à 2 cm sont transférées aseptiquement dans des tubes de culture remplis de milieu Jensen stérile dont la composition est indiquée en Annexe II.

Les tubes sont couverts de papier aluminium pour assurer l'obscurité de la partie

racinaire, puis sont placés dans des conditions ambiantes de température et de luminosité du laboratoire.



Figure 09 : Dispositif de mise en culture du test nodulation.

II.4.3. Inoculation des plantes

Cette phase a été réalisée par l'injection de 1 ml d'une suspension bactérienne, à une phase exponentielle contenant environ 10^8 cellules/ml ayant été cultivées dans le milieu de culture YMB liquide (Annexe II). Ainsi, les cultures sont placées dans des conditions ambiantes de température et de luminosité du laboratoire. Les plantules inoculées sont régulièrement contrôlées pour détecter l'apparition des nodules.

III. Caractérisation phénotypique des isolats bactériens

III.1. Caractérisation morphologique

- **Morphologie des colonies**

Ce test vise à étudier les caractères suivants : l'aspect, la forme, la couleur, l'élévation, la taille, la mucoïdité des colonies. Sur milieu YMA dans des boîtes de Pétri, après quelque jour d'incubation à 28°C.

- **Caractérisation cellulaire des bactéries**

L'observation morphologique des bactéries a été faite par observation au microscope optique (Grx40) à l'état frais d'une suspension bactérienne obtenue sur milieu YMB. Elle permet de déterminer la mobilité, la forme et la présence des granules de β -hydroxybutyrate (PHB).

La coloration de Gram est une coloration classique en microbiologie. Ce test a été effectué à partir des colonies bactériennes sur milieu YMB. C'est une coloration qui nous permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer les bactéries dites (Gram+) des bactéries dites (Gram-) (**Gram, 1984**). Le

protocole expérimental est comme suit :

A partir d'une culture sur boîte, réaliser une suspension avec de l'eau physiologique à partir d'une culture jeune, et prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une goutte de la suspension puis on étale sur la lame nettoyée avec de l'alcool, ensuite, l'étape suivante nécessite le séchage et la fixation par la chaleur.

Dans la seconde étape, déposer quelques gouttes de violet de gentiane et laisser agir pendant une minute, après rinçage, on ajoute de lugol sur le frottis et on laisse 30 sec. On rince puis décolorer leur cytoplasme, en faisant couler l'alcool à 90° pendant 10 à 15 secondes, puis on rince avec de l'eau distillé. Enfin, quelques gouttes de fushine sont versées sur la lame, pendant une minute, la lame est lavée à l'eau distillée.

Observation au microscope optique grossissement X1000 avec une goutte d'huile à immersion.

III.2. Caractérisation biochimique

Pour une caractérisation biochimique des isolats étudiés, nous avons recherché la présence ou l'absence de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme bactérien et la capacité de ces isolats à alcaliniser ou à acidifier le milieu de culture (**Marchal et al., 1982**).

III.2.1. Test du bleu de bromothymol (BTB)

C'est un test qui nous permet d'évaluer la capacité à acidifier ou à alcaliniser le milieu de nos isolats. En effet, le pH du milieu YMA additionné de bleu de bromothymol qui est utilisé comme un indicateur coloré, permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6 à une concentration de 0,0025% (w/v) (Annexe II).

Après quelque jour, l'apparition de virage de couleur du milieu sur les boîtes de Pétri inoculées par des colonies bactériennes au jaune indique l'acidification du milieu, alors que le virage du milieu au bleu foncé indique l'alcalinisation du milieu (**Marchal et al., 1982**).



Figure 10 : Couleur du milieu en fonction du pH.

III.2.2. Test du citrate de Simmons

Ce test est basé sur l'utilisation du citrate comme une source de carbone et d'énergie, et de la présence d'une citrate perméase et hydrolase, effectué sur milieu citrate de Simmons incliné (Annexe II). La pente du milieu a étéensemencée par stries longitudinales à partir d'une culture prélevée sur milieu YMB. Après incubation à 28°C, l'utilisation du citrate se manifeste par l'alcalinisation du milieu et l'apparition d'une couleur bleu du milieu (**Marchal et al., 1982**).

III.2.3. Test Urée-Indole

Pour la mise en évidence de l'uréase, nous avons utilisé des tubes contenant 5ml de milieu urée indole (Annexe II). Ce dernier comporte un indicateur de pH qui est le rouge de phénol. Après ensemencement à l'aide de colonies jeune des isolats, nous avons incubé ces cultures à 28°C entre 2 et 8 jours. La lecture des résultats du test se fait comme suit :

Une coloration rouge pouvant aller jusqu'au rose fuchsia indique l'hydrolyse de l'urée alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative.

Sur les mêmes cultures, nous avons recherché également la production d'indole à partir du tryptophane par une tryptophanase. En effet, la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface après ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs indique la présence d'indole (**Marchal et al., 1982**).

III.2.4. Réduction des nitrates

Ce test a été effectué sur des tubes à essaie contenant 5 ml de bouillon nitraté (Annexe II), aux qu'elle nous avons ajouté des colonies bactériennes, ces tubes ont été incubées à 28°C pendant 2 et 8 jours.

La réduction des nitrates a été mise en évidence par l'addition de 5 gouttes de réactif NR₁ (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et 5 autres gouttes de réactif NR₂ (α -naphtylamine dans l'acide acétique 5 M). Une réaction positive (NR⁺) se traduit par une coloration rose ou rouge du milieu. Si le milieu reste incolore, il n'indique pas forcément une réaction négative. Dans ce cas-là, on ajoute une pincé de poudre de zinc. Si le milieu devient donc rose ou rouge, il indique l'absence de la nitrate réductase (NR⁻), alors que si le milieu reste toujours incolore, il indique la présence de nitrate réductase (NR⁺) (**Marchal et al., 1982**).

III.2.5. Test du 3-cétolactose

D'après la méthode de **Bernaerts et De Ley (1963)**, le test du 3-Cétolactose nous permet de distinguer entre les deux genres bactériens *Rhizobium* et *Agrobacterium*. Le principe de ce test est basé sur l'utilisation de deux milieux dont le premier AB₁ (Annexe II) utilisée pendant 72^h et le deuxième milieu AB₂ (Annexe II) utilisé après 48h. La présence de l'enzyme 3- céto-glucosidase permet de distinguer *Rhizobium* de l'*Agrobacterium*. En effet, la présence de cette enzyme (3- céto-glucosidase), se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu₂O autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict (RB) (Annexe II) après une heure.

III.2.6. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques est testée sur milieu YMA additionné de concentrations d'antibiotique voulue à évaluer. Les antibiotiques utilisés sont : kanamycine a une concentration de 10 et 25 µg/ml, spectinomycine (10 et 50 µg/ml) et streptomycine (de 10 et 50 µg/ml). Des spots de 10 µl de la suspension bactérienne sont déposés sur un milieu gélosé YMA dans des boites de Pétris et incubé à 28°C pendant une durée de temps variant entre 2 et 8 jours.

La résistance aux antibiotiques a été évaluée par l'apparition et la croissance des colonies bactériennes, et leurs sensibilité par l'absence de croissance (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

III.3. Caractères nutritionnels

III.3.1. Assimilation des sucres comme source de carbone

Dans ce test, les suspensions bactériennes sont cultivées sur milieu YMA modifié, dont le mannitol est remplacé à raison de 0.1% par l'une des sources de carbone suivantes : arabinose, sorbitol, glucose, fructose, saccharose, maltose, lactose, galactose (**Somasegaran et Hoben, 1994**). L'extrait de levure est remplacé par le NH₄Cl et nous avons utilisé le rouge de phénol comme un indicateur de pH.

Les boites sontensemencées par spots de 10µl d'une suspension bactérienne. Les résultats ont été évalués après quelques jours d'incubation à 28°C. L'utilisation des sucres par les souches est estimée par l'apparition de colonies bactériennes.

III.3.2. Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu YMA modifié, ou le mannitol et l'extrait de levure ont été remplacé par l'un des acides aminée utilisée (Histidine, Glycine, Proline, Lysine

et Cystéine) à raison de 0.1%.

Dans des boîtes contenant le milieu, les suspensions bactériennes ensemencées par spots de 10µl puis incubés à 28 °C. La croissance des souches est évaluée par l'apparition des colonies qui indique l'utilisation d'acide amine comme source d'azote et de carbone.

III. 4. Caractères physiologique

Une série de tests est effectuée sur des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de *Spartium junceum* pour déterminer les caractères physiologiques. En l'occurrence l'effet de la température, l'effet du pH et l'effet du NaCl. Après incubation pendant plusieurs jours, la croissance bactérienne est estimée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Trois répétitions ont été prises en considération.

III.4.1. Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales sur la croissance des souches étudiées y compris les souches de références, des tubes à essai contenant 5ml d'YMB ont été inoculés. Les gammes de températures utilisées sont les suivantes : 20°C, 24°C, 28°C, 32°C et 37°C, dans un temps d'incubation variant entre 2 jours et 8 jours.

III.4.2. Effet du pH

Dans le but de déterminer l'effet du pH sur les souches isolées, nous avons préparé du milieu YMB ajusté à différents pH : 4, 6, 6.8, 8 et 10. Des tubes à essai de 5 ml de bouillon sont inoculés avec 100 µl de la suspension bactérienne et incubé à une température de 28°C pendant une durée de temps variant entre 2 et 8 jours.

III.4.3. Effet du NaCl

L'étude concernant l'effet de la salinité sur la croissance des souches a été réalisée sur le milieu YMB additionné de NaCl à différentes concentrations (0.5%, 1%, 1.5% et 2%).

Les tubes à essai contenant 5ml de bouillon YMB modifiée ont été inoculés avec 100 µl de la suspension bactérienne et incubée à une température de 28°C à un intervalle de temps compris entre 2 à 8 jours.

IV. Analyse numérique de la caractérisation phénotypique

Pour estimer et comparer le degré de similitude entre les souches de *S. junceum* y compris les souches de référence à savoir *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110^T, *Bradyrhizobium canariense* BTA-1^T, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T, *Bradyrhizobium cytisi* CTAW 11^T, *Bradyrhizobium lupini* USDA 3051^T, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T,

Microvirga lupini Lut 6^T, *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T, les résultats des tests phénotypiques effectués ont été convertis à des valeurs numériques (1, 0). Ces valeurs ont été utilisées pour construire une matrice (Annexe III voir le tableau A₃III) afin d'effectuer une analyse numérique : une classification ascendante hiérarchique CAH qui permet de calculer les distances de similarité réalisée avec XLStatPro version 2008.

I. Analyse physico-chimique du sol

Une série de tests ont été effectués pour une analyse physico-chimique du sol prélevé de site où les nodules de *Spartium junceum* L. ont été récoltés. Les résultats sont indiqués dans le tableau II.

Tableau II : Résultats d'analyse physico-chimique des sols

<i>Paramètres</i>	<i>Résultats</i>
CaCO ₃ total (%)	45
pH eau	7.37
pH Kcl	7.25
N (%)	0.0168
C E du sol (salinité) (μS/cm)	98.5

Ces résultats (Tableau II) montrent que le sol de Thala Hiba 'tizi n'bougie' prélevé au niveau de la rhizosphère de *Spartium junceum* à un pH eau de 7,37. Selon l'échelle donnée par **Gaucher** et les normes mondiale, ce sol est considéré comme neutre. Ces résultats montrent également que le calcaire est présent en proportion relativement importante. Il a été rapporté qu'une concentration élevée du calcaire dans le sol permet une perméabilité du sol ainsi sont réchauffement rapide. Toutefois, la présence de calcaire à des taux élevés peut bloquer certains éléments fertilisants qui deviennent alors non disponibles pour les plantes (**Pousset, 2002**).

Concernant le dosage en azote du sol étudié, les résultats montrent une valeur 0.0168%, ce qui nous permet de constater que le sol est pauvre en azote. Ceci favorise la nodulation de la plante par la bactérie d'après **Vincent (1970)**. La conductivité électrique du sol, nous renseigne sur la salinité **Pousset, (2002)**. En effet, la valeur de 98.5 μS/cm indique que le sol de Thala Hiba n'est pas salin.

II. Collection d'isolats

Cinquante nodules ont été prélevés sur les racines de la plante *Spartium junceum* L. après l'ensemencement sur boîte de Pétri contenant le milieu YMA, les colonies apparaissent au bout de 3 à 9 jours d'incubation à 28°C. Ensuite, la purification de ces colonies par repiquages successifs nous a permis d'obtenir trente souches pures.

III. Test de nodulation simple et croisé

Un test de nodulation simple a été effectué sur les 30 souches pour déterminer leur appartenance au rhizobia. Le test de nodulation croisé a permis d'évaluer l'aptitude d'isolats de *Spartium junceum* L. à infecter d'autres plantes que leur plante hôte d'origine. Après environ un mois d'inoculation, le test de nodulation (simple et croisée) nous a permis d'authentifier 4 souches comme appartenant au rhizobia. Il s'agit de P3.5.1', P2.1, P1.12 et P2.10.2 (tableau III).

Tableau III : Résultats du test de nodulation simple et croisé.

	<i>N° souches inoculées</i>	<i>N° de souches NOD⁺</i>	<i>Souches NOD⁺</i>
Inoculation sur la plante hôte (<i>S. junceum</i>)	30	3	P3.5.1' P2.1 P1.12
Inoculation sur <i>Vigna unguiculata</i>	30	1	P2.10.2

N° : Nombre

Trois souches bactériennes ont pu former des nodules visibles à l'œil nu sur la plante hôte et une souche bactérienne a nodulé sur *Vigna unguiculata*. La première souche qui a nodulé est la P2.10.2. Par la suite au bout de la cinquième semaine les souches P3.5.1', P2.1 et P1.12 ont induits des nodules sur leur plante hôte.

Le test de nodulation en cours pourrait authentifier encore d'autres souches. Grâce à la transparence du milieu Jensen, nous avons pu suivre et déterminer le nombre des nodules par plante.

Le tableau IV indique le nombre de nodules obtenus, leurs couleurs, la taille de la partie aérienne et racinaire, ainsi que le nombre de feuille par plante. En effet, la souche P2.1 a permis la nodulation de deux exemplaires de plante avec des nodules rouge, témoignant de leurs efficacités.

Toutes les souches ayant nodulé *Spartium junceum* ont permis un bon développement de la plante et une couleur verte vive de la partie aérienne (feuille et tige) (Figure 11). Ceci ne peut être dû qu'à la fixation d'azote atmosphérique par les souches symbiote de *Spartium junceum* L.

Tableau IV : Caractères des nodules et des plantes nodulées

<i>Souches nodulés</i>	<i>N° de nodule</i>	<i>Couleur de nodule</i>	<i>Taille de la partie aérienne</i>	<i>Taille de la partie racinaire</i>	<i>N° de feuilles</i>	<i>Couleur des feuilles (présence de chlorophylle)</i>
P3.5.1'	04 nodules	Rouge (efficient)	16 cm	11 cm	10 feuilles	+++
P2.1 1 ^{er} exemplaire	07 nodules (Bilobée)	Rouge (efficient)	14.5 cm	14 cm	12 feuilles	+++
P2.1 2 ^{eme} exemplaire	02 nodules	Rouge (efficient)	14 cm	17 cm	13 feuilles	+++
P1.12 1 ^{er} exemplaire	03 nodules	Rouge (efficient)	15.5 cm	14 cm	14 feuilles	+++
P1.12 2 ^{eme} exemplaire	01 nodules	blanc	12 cm	11 cm	12 feuilles	+++
2.10.2	14 nodules	brun	39.5 cm	18 cm	14 feuilles	+++
Contrôle Négatif	0	0	10 cm	11 cm	9 feuilles	+

Cependant, la souche P2.10.2 est la seule souche, à ce jour, qui a nodulé *Vigna unguiculata* avec des nodules de volume important de couleur brune permettant à la plante d'avoir une partie aérienne verte et bien développée (Figure 12). Tandis que l'incapacité à noduler pourrait être due aux conditions de cette expérience (luminosité, température, humidité, ...).

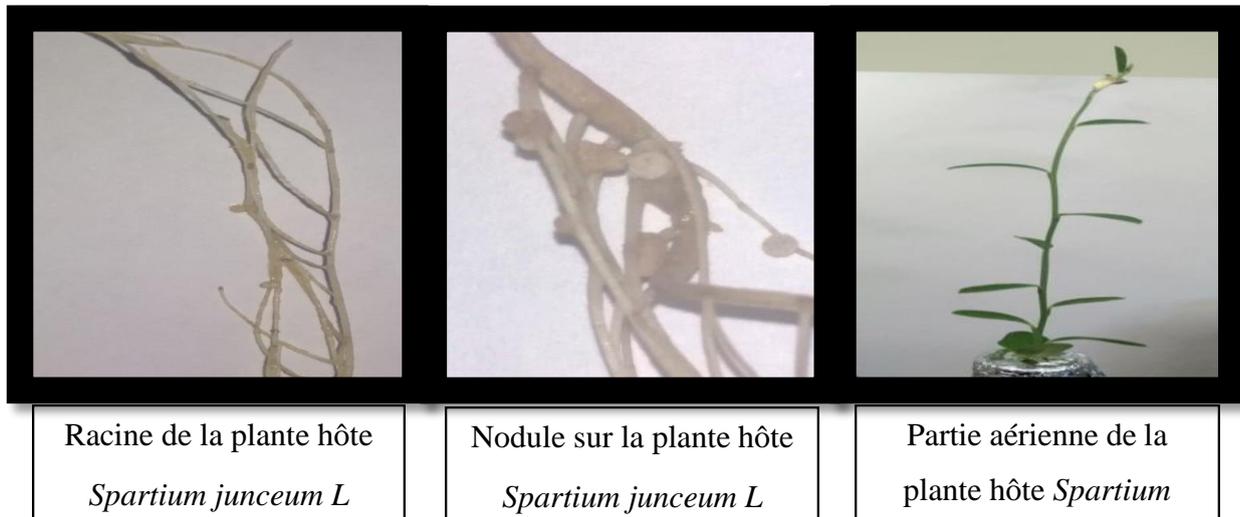


Figure 11 : Différentes parties de la plante *Spartium junceum L.* (Racine, tige et feuilles, Nodule).

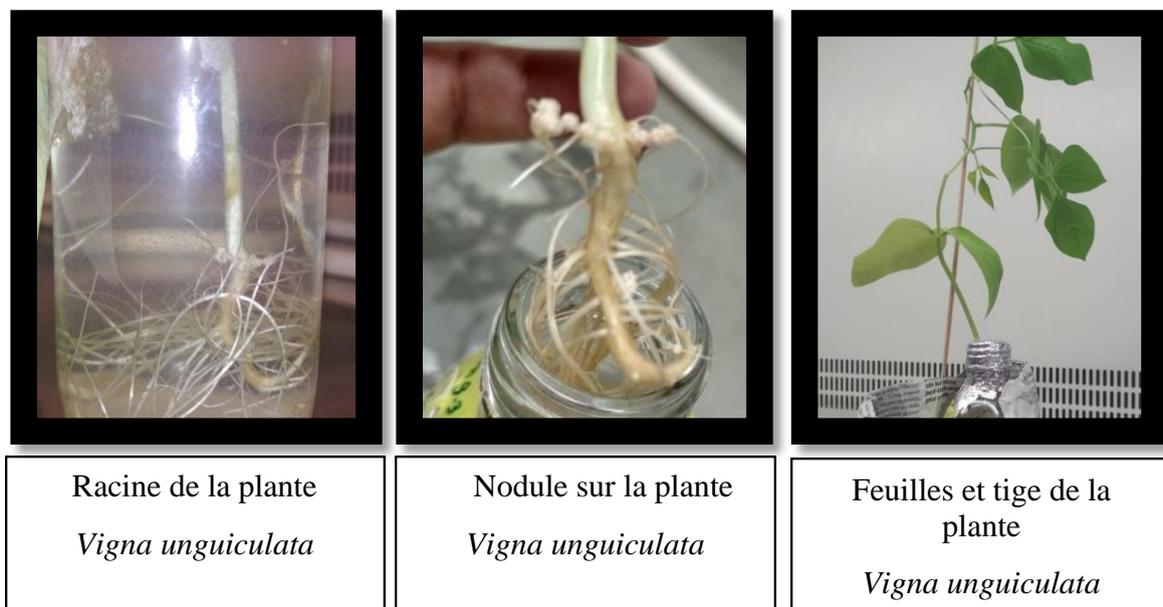


Figure 12 : Différentes parties de la plante *Vigna unguiculata* après le test de nodulation

IV. Caractérisation phénotypique

Les trente souches ainsi que les souches de référence ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique.

IV. 1. Caractérisation morphologiques des colonies :

L'observation des colonies des différents isolats de *Spartium junceum L.*, cultivés dans des boîtes de Pétri (Figure 13) contenant YMA, a permis de déterminer les caractères cultureux des souches étudiées.

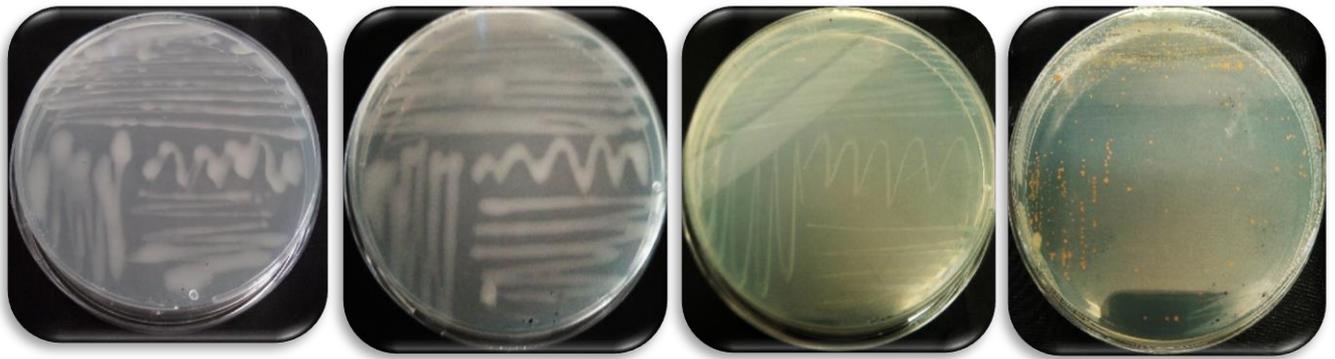


Figure 13 : Aspect de quelques souches bactériennes sur YMA.

En effet, la majorité des isolats obtenus présentent un aspect de colonie ronde, de couleur blanche, lisse, à bord régulier et translucide (tableau V). Ces critères correspondent à la caractérisation morphologique des rhizobia selon **Jordan, (1982)** et **Vinuesa et al., (2005)**.

Tableau V : Caractères morphologiques des colonies. Les souches en gras indiquent les souches ayant nodulé.

CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE

<i>Souches</i>	Forme	Couleur	Surface	Bord	Opacité	EPS	D.C
P2.2.1	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.13.2	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.7	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.10.2	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.6	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.8.1	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.1	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	++	2 J
P2.17	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.20	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P2.21	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P3.5.1'	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	2 J
P1.15.1	Ronde	Blanche	lisse	Régulier	Trans	+++	3 J
P2.15.2	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	3 J
P2.22	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	3 J
P1.3	Ronde	Blanche	lisse	Régulier	Trans	+++	6 J

P2.13	P-forme	Rose	Rugueux	Régulier	Opaque	---	5 J
P3.2	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	5 J
P2.11.2	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	5 J
P2.23	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	7 J
P1.12	Ronde	Blanche	lisse	Régulier	Trans	+++	6 J
P1.8.3	Ronde	Jaune	Rugueux	Irrégulier	Opaque	---	6 J
P1.7.1	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	6 J
P1.1.1	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	6 J
P1.17	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+++	6 J
P2.15.3.1	P-forme	Blanche	Lisse	Régulier	Opaque	+	7 J
P2.15.3.2	Ronde	Blanche	Lisse	Régulier	Opaque	+	7 J
P3.6.1	P-forme	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+	7 J
P3.5.4	P-forme	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+	8 J
P3.4.1	P-forme	Blanche	Lisse	Régulier	Trans	+	8 J
P3.5.3	P-forme	Rose	rugueux	regulier	opaque	+	8 j

EPS : Exopolysaccharide ; D.C : Durée de croissance; Trans : transparente ; (+) : Production des Exopolysaccharide (+++ : élevée ; + moyen ; --- : rien); (J) : jour ; P-forme : Punctiforme

IV. 2. Caractérisation cellulaire des isolats

A l'aide d'un microscope optique, l'observation des bactéries, à l'état frais des différentes suspensions bactériennes ont montré qu'elles sont mobiles. La coloration du Gram montre que les 30 souches sont d'une forme petite bâtonnet à extrémité arrondie et à Gram négatif (Figure 14). Ces résultats sont en accord avec la description donnée par **Jordan (1982)** et **Vinuesa et al., (2005)**.

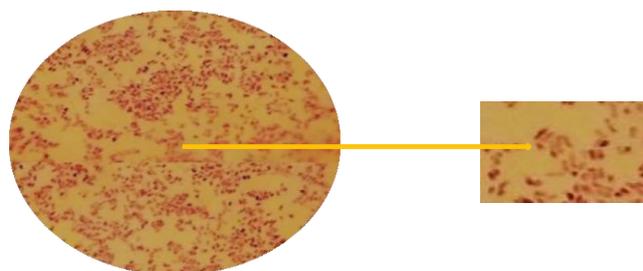


Figure 14 : Gram négatif des souches sous microscope optique (GrX1000).

IV.3. Caractérisation biochimique des isolats

IV.3.1. Test de bleu de bromothymol

Les résultats (Tableau VIII) obtenus sur milieu YMA-BTB montrent que toutes les souches acidifient le milieu à l'exception des souches : P2.15.3.1, P2.15.3.2, P2.13, P3.6.1, P3.5.4, P3.4.1 et P3.5.3. Cette acidification se traduit par un virage de couleur du milieu vers le jaune, alors que l'alcalinisation du milieu donne une couleur bleu (Figure 15).

D'après plusieurs travaux l'alcalinisation du milieu indique que les souches sont à croissance lente alors que l'acidification du milieu indique que les souches sont à croissance rapide (Norris, 1965 ; Moreira et al., 1993).



Figure 15 : Acidification et alcalinisation du milieu YMA par les souches.

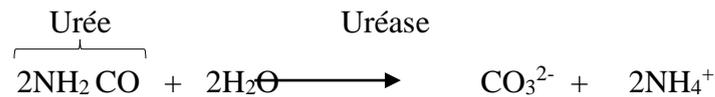
IV.3.2. Test du Citrate de Simmons

Ces résultats montrent une diversité d'utilisation du citrate par les souches. Certaines souches comme P1.3, P1.12, P1.15.1, P.1.1.1, P1.17, P2.10.2, P2.1, P2.17, ainsi que *Bradyrhizobium lupini*, *Bradyrhizobium elkanii* et *Bradyrhizobium canariense* utilisent le citrate alors que le reste des souches testées ne l'utilise pas.

Cette diversité d'utilisation de citrate par les rhizobia a été déjà constatée par plusieurs auteurs (Boulila, 2009 ; Benouaret et al., 2014).

IV.3.3. Test Urée-Indole

Les résultats tableau VIII indiquent que toutes les souches à l'exception de P1.1.1, P2.2.1, P2.15.3.1, P2.1, P2.23, P3.5.1', P3.6.1 et P3.5.4 qui ont marqué un résultat négatif (Ur) sont capable d'hydrolyser l'urée par une enzyme l'uréase. L'hydrolyse de l'urée par l'urease produit des ions d'ammonium (NH_4^+) provoquant une alcalinisation du milieu selon la réaction suivants :



Concernant la production d'indole, nous remarquons aussi une diversité de production d'indole à partir du tryptophane par les souches étudiées. En effet certains souches comme la P1.12, P1.7.1, P2.8.1 et P2.22 produisent d'indole alors que d'autres comme P1.15.1, P1.17 et P2.10.2ne le produisent pas. L'hydrolyse du tryptophane en indole se fait selon la réaction suivante :



IV.3.4. Test de Nitrate

Les résultats du tableau VIII concernant le test de nitrate montre que la majorité des souches ne sont pas capable de réduire le nitrate, ce qui indique l'absence de l'enzyme nitrate réductase.

Il y a lieu de signaler que parmi les souches de références *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T, *Bradyrhizobium lupini* USDA 3051^Tet *Bradyrhizobium canariense* BTA-1^T, et à l'exception de P1.12, P2.11.2, P2.2.1, P2.7, P2.10.2 réduisent les nitrates en nitrite ce qui se traduit par le virage de couleur vers le rouge indiquant une réaction positive (NR⁺).

IV.3.5. Test 3-cetolactose

Les souches P1.15.1, P1.8.3, P2.2.1, P2.13.2, P2.10.2, P2.6, P2.8.1, P2.15.2, P2.1, P2.17, P2.22, P2.21, P3.5.1' et rhizobium montrent un résultat négatif après l'addition du réactif de Benedict, aucun halo jaune n'est observé (Figure 16). De ce fait les isolats n'oxydent pas le C3 du glycosyl du Lactose et ne produisent pas de 3- cetoglucosidase. Les résultats de ce test sont indiquée dans le tableau VI après l'utilisation du milieu 1 et le milieu 2 par :

Selon **Bernaerts et De Ley (1963)**, la présence de 3- cetoglucosidase qui se manifeste au bout d'environ 1 heure par la formation d'un halo jaune de Cu₂O autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict, caractérise *Agrobacterium*.

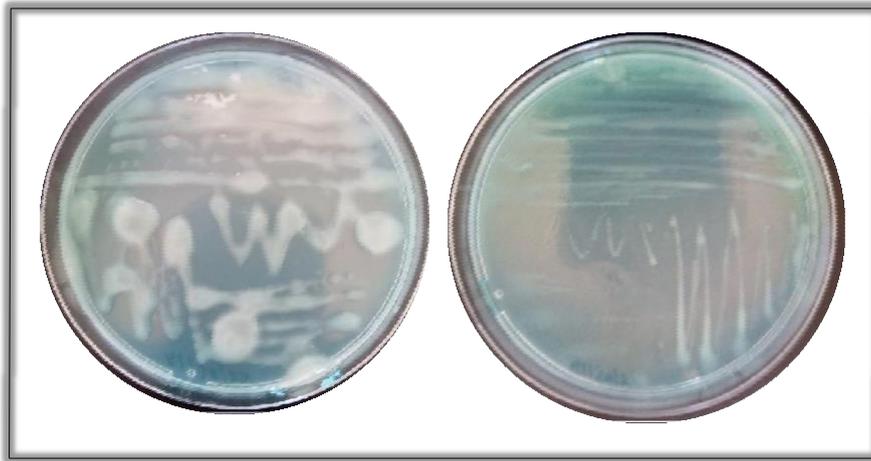


Figure 16 : Exemple de résultats de l'*Agrobacterium* de quelques souches obtenues, observé une heure après l'ajout de réactif de Benedict

Tableau VI : Résultats des tests de la caractérisation biochimique.

<i>Souches</i>	<i>BBT</i>	<i>Cit</i>	<i>Ur</i>	<i>In</i>	<i>NR</i>	<i>Rb</i>
P1.3	-	+	+	-	-	-
P1.12	-	+	+	+	+	-
P1.15.1	-	+	+	-	-	-
P1.8.3	-	-	+	-	-	-
P1.7.1	-	-	+	+	-	-
P1.1.1	-	+	-	+	-	-
P1.17	-	+	+	-	-	-
P2.11.2	-	-	+	+	+	-
P2.2.1	-	-	-	+	+	-
P2.13.2	-	-	+	+	-	-
P2.7	-	-	+	+	+	-
P2.10.2	-	+	+	-	+	-
P2.15.3.2	+	-	+	-	-	-
P2.6	-	-	+	+	-	-
P2.8.1	-	-	+	+	-	-
P2.15.2	-	-	+	+	-	-
P2.15.3.1	+	-	-	+	-	-
P2.1	-	+	-	+	-	-
P2.23	-	-	-	-	-	-
P2.17	-	+	+	-	-	-
P2.20	-	-	+	+	-	-
P2.22	-	-	+	+	-	-
P2.13	+	-	+	-	-	-

P2.21	-	-	+	+	-	-
P3.5.1'	-	-	-	+	-	-
P3.2	-	-	+	+	-	-
P3.6.1	+	-	-	+	-	-
P3.5.4	+	-	-	+	-	-
P3.4.1	+	-	+	+	-	-
P3.5.3	+	-	+	+	-	-
USDA 3051 ^T	+	+	+	+	-	-
CTAW 11 ^T	+	-	+	+	-	-
USDA 76 ^T	+	+	+	+	+	-
3841 ^T	-	-	+	+	-	-
Lut 6 ^T	+	-	+	+	+	-
USDA 110 ^T	+	-	+	+	-	-
BTA-1 ^T	+	+	+	+	+	-
USDA 6 ^T	+	-	+	+	-	-

bromothymol, **Cit**: Citrate, **Ur** : Urée, **In** : Indole, **NR** : Nitrate reductase, **RB** : reactif de benedict.

IV. 3.6. Résistance et sensibilité aux antibiotiques

La lecture des résultats de la figure et du tableau (voir l'Annexe III tableau A₁ III) a été faite pour comparer la résistance ou la sensibilité des souches testées aux antibiotiques à savoir (kanamycine, spectinomycine et streptomycine). Les résultats illustrés dans le tableau indiquent que 26% des souches testées sont résistante à la kanamycine 10 µg/ml et 5% résistante au kanamycine 50µg/ml. Par la suite, 39% résistante au antibiotique spectinomycine à 10 µg/ml. Et pour la Spéctinomycine à 50µg/ml est plus néfaste sur les souches. En effet, uniquement 16% des souches ont pu résister à cet antibiotique. Cet effet néfaste sur les rhizobia a été déjà signalé dans les travaux de **Salmi en 2019** qui a travaillé sur les souches de rhizobia isolés de *Calicotome spinosa*.

Il y a lieu de noter qu'environ 24% des souches présentent une résistance à la streptomycine 10 µg/ml, tandis que 8% sont résistante à la streptomycine à 50 µg/ml. La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée comme un moyen d'identification des souches et les considérés comme un bon trait pour comparer les différentes souches de rhizobia (**Bourebaba et al., 2016**). Ainsi le degré de la résistance varie d'une espèce à l'autre ou entre les souches de la même espèce (**Odee et al., 1997**).

Ce test est lancé en 1987 par **Eaglesham** pour l'étude des rhizobiums et leur résistance envers les antibiotiques, alors que la résistance des *Bradyrhizobium* aux antibiotiques a été

d'écrite pas **kuykendall et al., (1988)**.

La résistance des bactéries Gram négatif a été montrée par **Faune (2009)**. Il s'agit de deux types de résistances, naturelle et acquise. La résistance acquise résulte dans certains cas d'une modification génétique au niveau des gènes par mutation ou d'une acquisition de matériel génétique étranger. **Graham et al., (1991)** a expliquée ceci par l'effet inhibiteur qui est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre. En effet, le mode d'action de ces molécules inhibitrices varie en fonction du type d'antibiotique ainsi qu'en fonction de la concentration testée (**Graham, 1963, Lindström et al., 1988**).

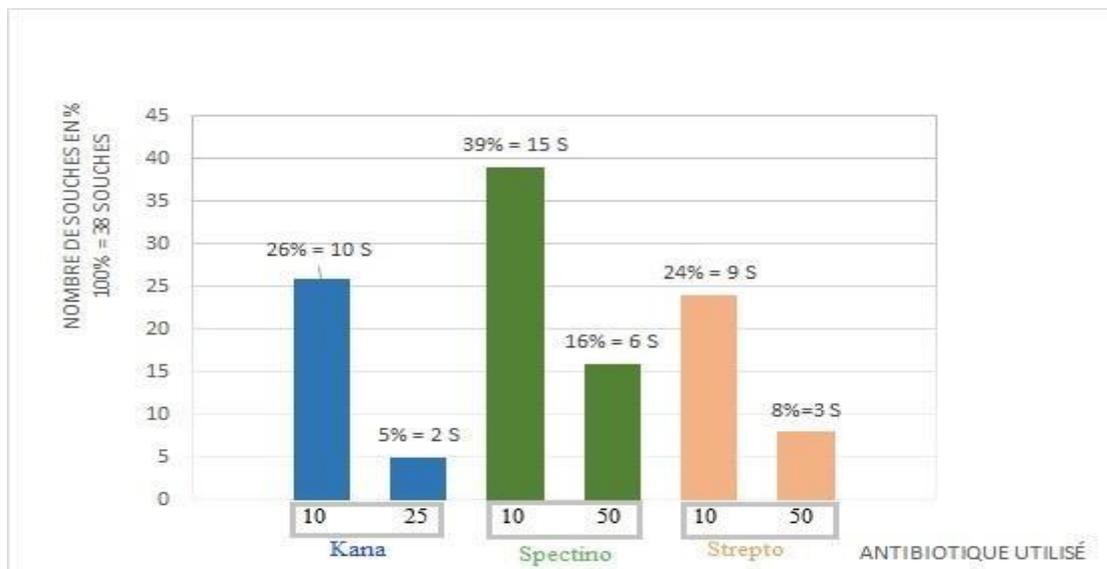


Figure 17 : Histogramme représentatif de la résistance et sensibilité aux antibiotiques en pourcentage.

IV.4. Caractérisation nutritionnelle

IV.4.1. Assimilation des sucres

Les résultats consignés dans le Tableau VII montrent une diversité d'utilisation des substrats carbonés (sucre) d'une souche à l'autre.

A partir de ces résultats, nous remarquons que tous les sucres testés sont utilisés par les souches : P2.11.2, P2.2.1, P2.13.2, P2.10.2, P2.8.1, P2.15.2, P2.23, P2.17, P2.13, P3.5.1', P3.2, P3.6.1, alors que certaines des souches comme P1.8.3 et P2.6 n'utilisent que le fructose et le galactose. Cette diversité d'utilisation des sucres a été déjà signalée par plusieurs travaux (**Bourbaba et al, 2016, Salmi, 2019**) qui ont montré que les souches de *Bradyrhizobium nodulans* *Lupinus micranthus* et *Calicotome spinosa* assimilent différents sucres comme source de carbone.

Il est important de signaler que l'assimilation des sucres peut fournir des caractères

discriminatifs pour l'identification des espèces (Allen et Allen, 1950).

IV.4.2. Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote et de carbone

Les résultats du test d'utilisation des acides aminée comme seule source d'azote (Tableau VII) montrent que toutes les souches étudiés utilisent l'histidine à l'exception des souches : P1.8.3, P2.7, P3.2. Concernant la proline et lysine nous constatons qu'ils sont utilisés par la majorité des souches. Par contre, la glycine et cystéine aucune n'a utilisé ces acides aminés à l'exception de *Bradyrhizobium cytisi*.

L'utilisation de l'histidine comme source d'azote a été également constaté par Bourebaba (2016). Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Struffi et al. 1998)

Tableau VII : Résultats des tests nutritionnels (assimilation des sucres et les acides aminés)

Souches	Sorbitol	Maltose	Lactose	Arabinose	Galactose	Saccharose	Fructose	Glucose	Histidine	Glycine	Proline	Lysine	Cystéine
P1.3	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
P1.12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
P1.15.1	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
P1.8.3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
P1.7.1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
P1.1.1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
P1.17	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
P2.11.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.13.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.7	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
P2.10.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.15.3.2	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
P2.6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
P2.8.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.15.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.15.3.1	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
P2.1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
P2.23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.20	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.22	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-

P2.13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P2.21	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
P3.5.1'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
P3.2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
P3.6.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
P3.5.4	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
P3.4.1	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
P3.5.3	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Lut6 ^T	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
3841 ^T	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
USDA3051 ^T	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
USDA76 ^T	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
CTAW11 ^T	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
USDA110 ^T	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
BTA-1 ^T	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
USDA6 ^T	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-

IV.5. Caractéristiques physiologiques

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de certains facteurs abiotiques en l'occurrence la température, le pH et la salinité (NaCl) sur la croissance des trois groupes (Tableau VIII), de souches *S. junceum*, déterminés par le temps de croissance à savoir le groupe 1 comportant des souches à croissance rapide, le groupe 2 composé de souches à croissance lente et le groupe 3 comporte des souches à croissance très lente.

Tableau VIII : Différents groupes étudiés dans ces tests

<i>Temps de croissance par groupe</i>	<i>L'ensemble des souches étudiées ainsi les souches de référence utilisées</i>
Groupe N° 01 Entre 2 j et 3 j	<i>P1.15.1, P2.2.1, P2.13.2, P2.7, P 2.10.2, P2.6, P2.8.1, P2.15.2, P2.1, P2.17, P2.20, P2.22, P2.21, P3.5.1'</i> 3841^T, Lut6^T
Groupe N° 02 Entre 5j et 6j	<i>P1.3, P1.12, P1.8.3, P1.7.1, P1.1.1, P1.17, P2.11.2</i> <i>P2.13, P3.2, P2.23, USDA3051^T, BTA-1^T, USDA6^T</i>
Groupe N° 03 Entre 7 à 8 j	<i>P2.15.3.2, P2.15.3.1, P3.6.1, P3.5.4, P3.4.1, P3.5.3,</i> USDA76^T, USDA110^T,CTAW11^T.

Les résultats traités dans cette partie représentent la moyenne de trois répétitions pour chaque souche (voir Annexe III, Tableau A₂III).

IV.5.1. Effet de la température

L'effet de la température sur la croissance des souches rhizobia a été étudié sur une gamme de température allant de 20°C à 37°C. La figure 18 présente les résultats de la croissance des souches du groupe 1 (2j et 3j) sous l'effet de la température. En effet, ces résultats montrent que la plupart des souches étudiées ont une bonne croissance entre 28°C et 32°C.

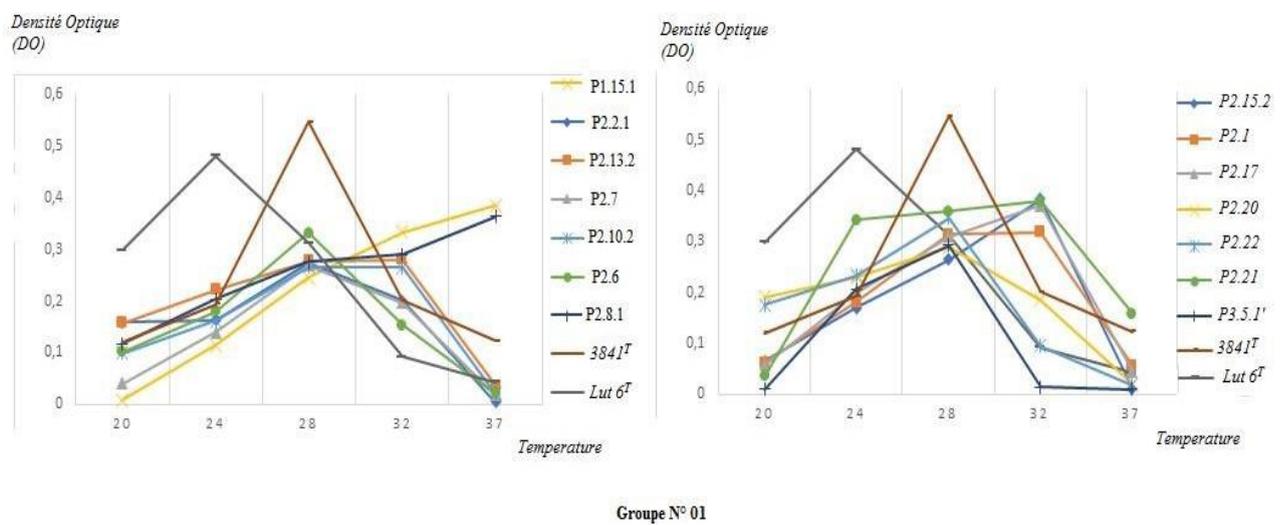


Figure 18 : Effet des températures sur la croissance des souches testées du groupe 01.

La figure 19 illustre les résultats de la croissance des souches, à croissance lente (5 et 6 jours), sous l'effet de la température. Elle indique que la plupart des souches y compris les souches de référence ont une bonne croissance entre 24°C et 32°C avec un optimum 28°C.

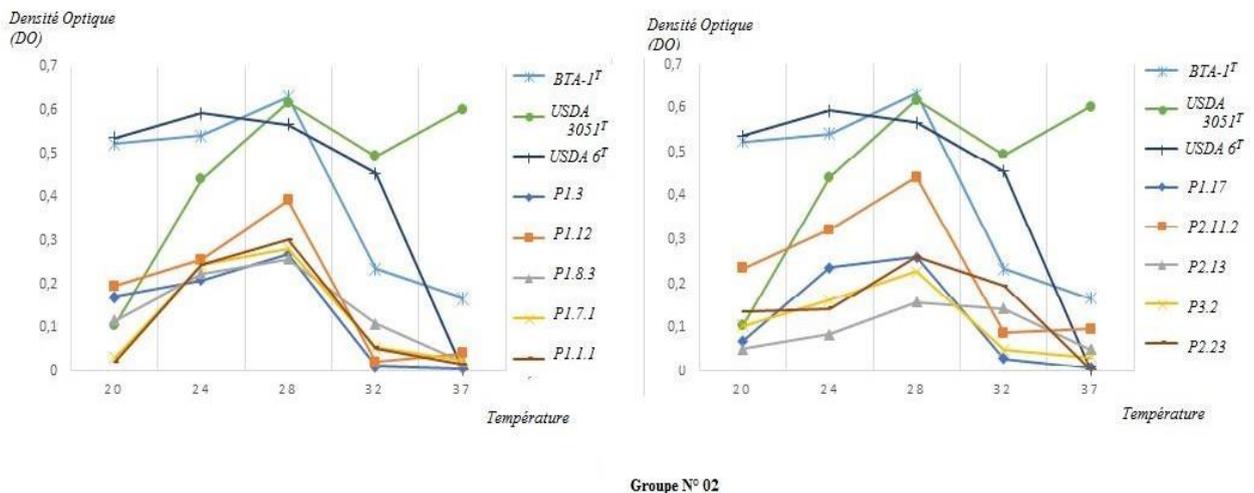
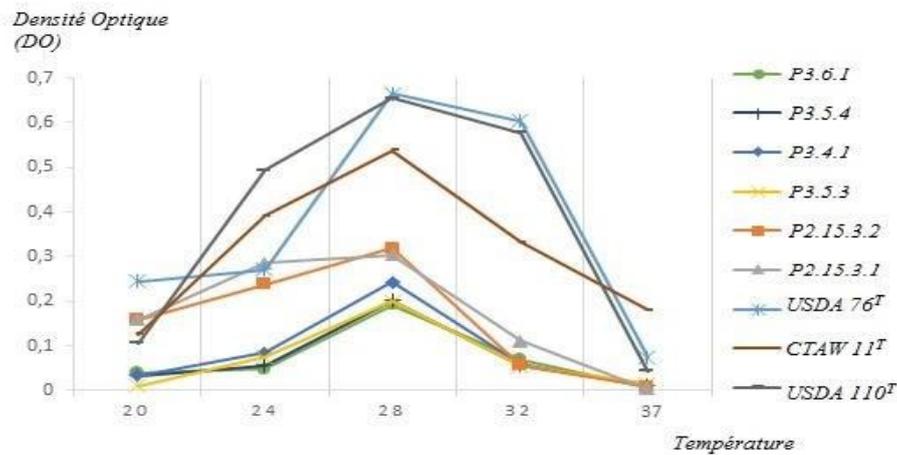


Figure 19 : Effet des températures sur la croissance des souches testées du groupe 02.

La figure 20 montre les résultats de l'effet de la température sur la croissance des souches du groupe 3 (très lentes). Ces résultats indiquent également que la plupart des souches ont une bonne croissance à 28°C et 32°C avec un optimum à 28°C.



Groupe N° 03

Figure 20 : Effet des températures sur la croissance des souches testées du groupe 03.

Les résultats obtenus concordent avec ceux rapporté par **Graham (1992)** et **Zahran (1999)** qui indiquent que la gamme optimale pour la croissance des rhizobia se situe entre 28°C et 32°C. Beaucoup de rhizobia ne se développent pas à des températures plus élevées (37°C), **Cloutier et al. (1992)** a expliqué que cela est dû à la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Concernant les températures basses, une gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation des enzymes des bactéries peut se produire. Et dans le cas d'adaptation de ces bactéries au choc thermique pourrait s'expliquer par l'expression des protéines de stress thermique HSP (Heat Shock Proteins) HSP **Cloutier et al. (1992)**.

En outre, la température idéale pour la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est corrélée le plus souvent avec la température de l'habitat naturel de ces espèces (**El Hilali 2006**).

IV.5.2. Effet du pH

La capacité des bactéries nodulant *S. junceum* à croître dans différents pH, a été évaluée dans une gamme de pH allant de 4 à 10. En effet, les figures 21, 22 et 23 présentent l'effet du pH sur la croissance des souches des trois groupes cités plus haut. Ces résultats montrent que la plupart des souches y compris les souches de référence ont une bonne croissance entre le pH 6 et 8. Pour certaines d'entre elles les pH extrêmes leurs sont néfaste comme : P1.15.1, P2.10.2 ou encore P3.5

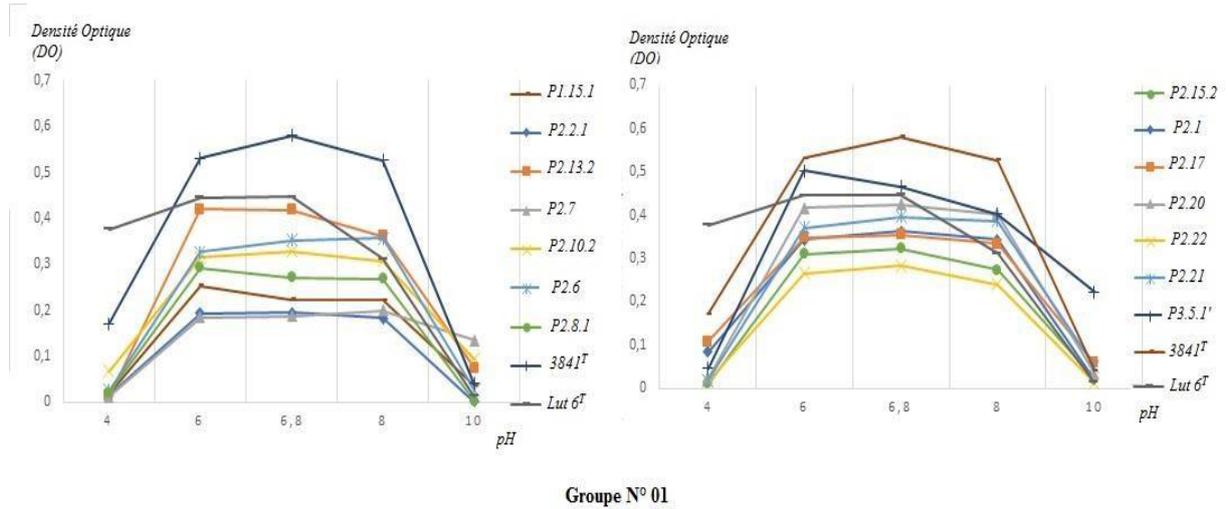


Figure 21: Effet des pH sur la croissance des souches testées du groupe 01.

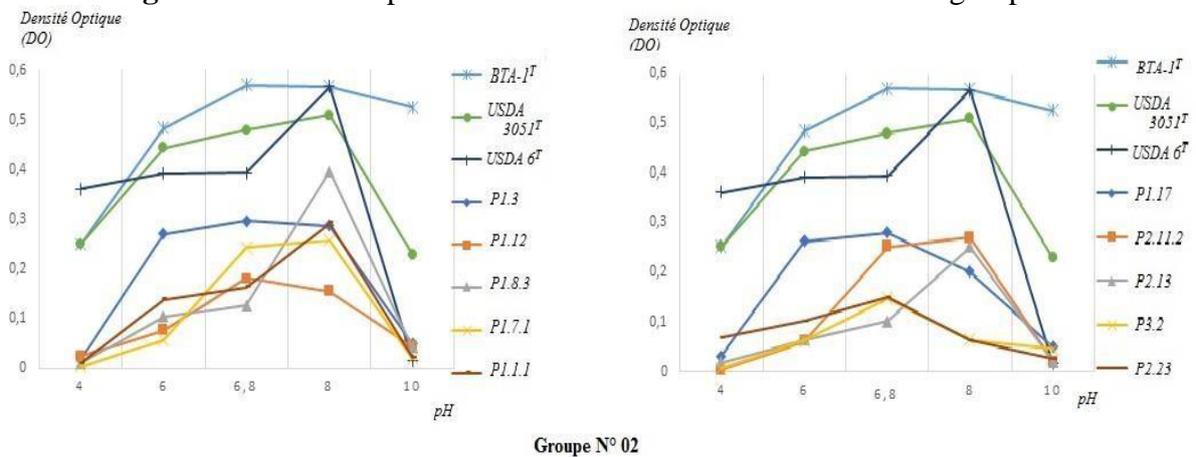


Figure 22 : Effet des pH sur la croissance des souches testées du groupe 02

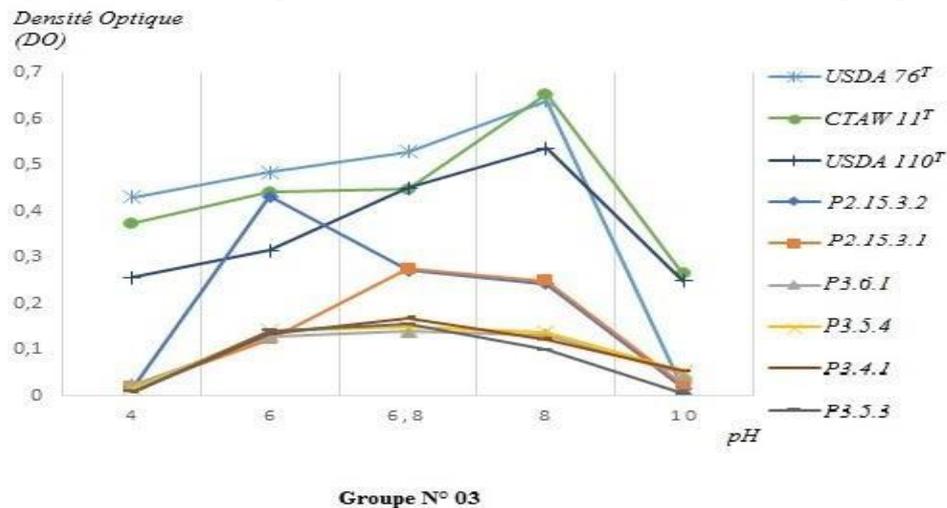


Figure 23 : Effet des pH sur la croissance des souches testées du groupe 03.

Il est à signaler que les souches P3.6.1, P3.5.4., P3.4.1 et P3.5.3. Ont le même comportement vis-à-vis du pH avec un optimum à 6,8 (Figure 21). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Salmi (2019)**. En effet, cette auteure a indiqué que les souches de rhizobia isolées de *Calicotome spinosa* poussent à des pH neutres. À l'exception de *Microvirga lupini*

qui montre une stabilité pour les pH 4, 6 et 6.8, alors qu'on observe une décroissance à pH 8 et une inhibition de la croissance bactérienne à pH 10, d'une façon générale la plupart des souches donne une bonne croissance entre les pH 6 et 8.

IV.5.3. Effet du NaCl

La croissance des souches rhizobiales des trois groupes, isolées de *S. junceum*, est évaluée sous l'effet de plusieurs concentrations en NaCl. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 24,25 et 26. Ces résultats montrent que la tolérance à la salinité diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration en sel. En effet, la croissance de la majorité des isolats de *S. junceum* ainsi que des souches de référence utilisées dans cette étude est nettement affectée par des concentrations élevées en NaCl.

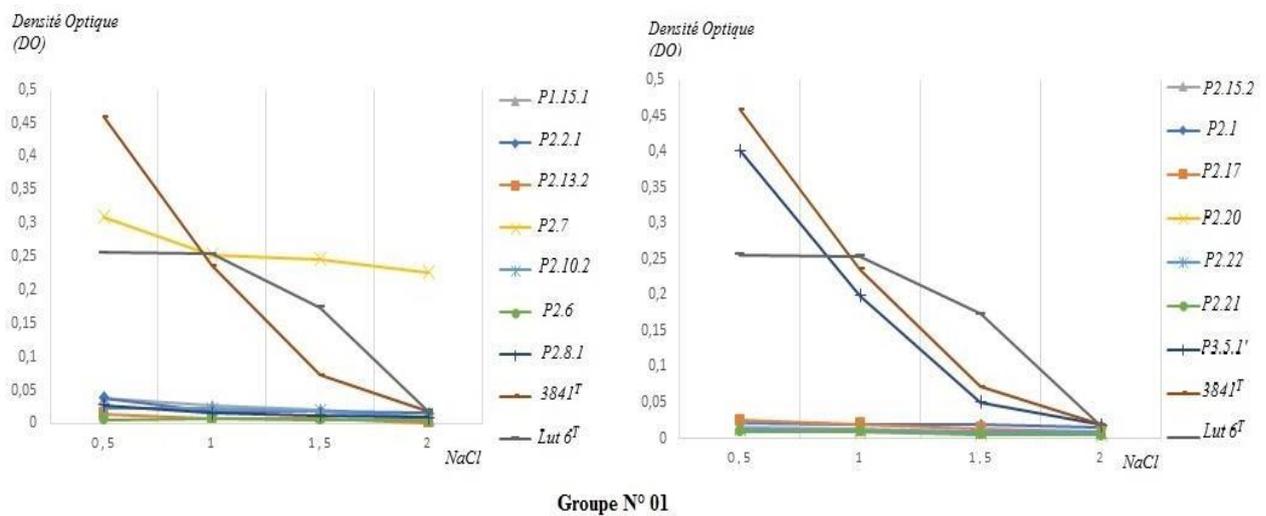


Figure 24 : Effet de NaCl a des concentrations déférentes sur la croissance des souches testées du groupe 01.

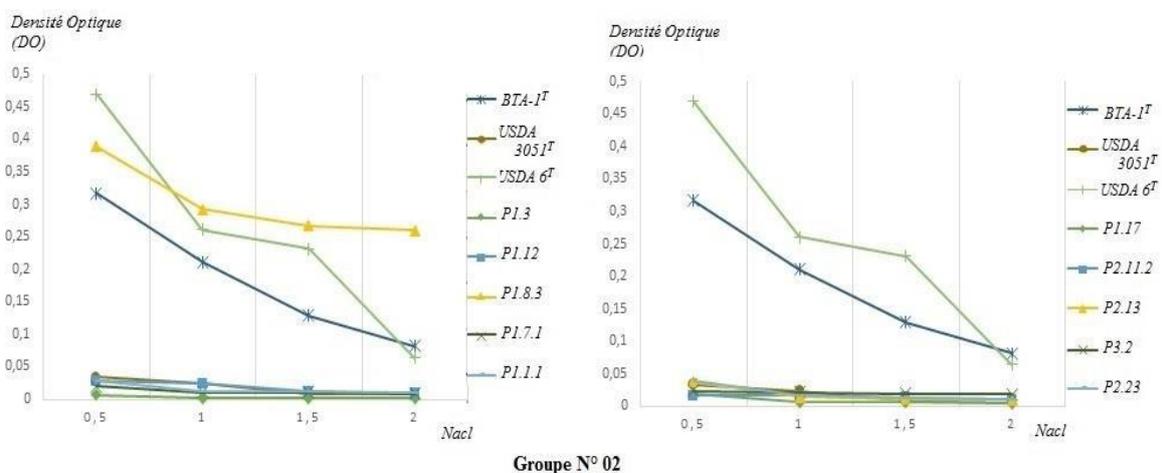


Figure 25 : Effet de NaCL a des concentrations déférentes sur la croissance des souches testées du groupe 02.

Il est à signaler que certaines souches comme P2.10.2, P2.6. et P2.20 ont une croissance inhibée à toutes les concentrations du NaCl testé. Alors que les souches P2.7 et P1.8.3. Ont une légère diminution de croissance à une concentration de 0.5% de NaCl ensuite leur croissance est stabilisée à partir de 1% de concentration (Figure 25). Ceci pourrait être dû à une adaptation de ces souches à la salinité. Ainsi, ce comportement pourrait être un atout pour l'utilisation de cette souche dans les projets de restauration des sols salins.

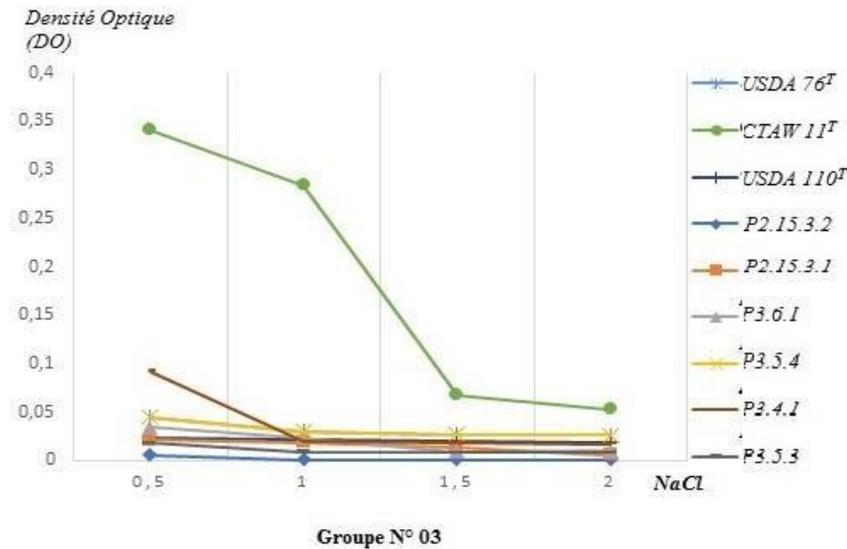


Figure 26: Effet de NaCl a des concentrations différentes sur la croissance des souches testées du groupe 03.

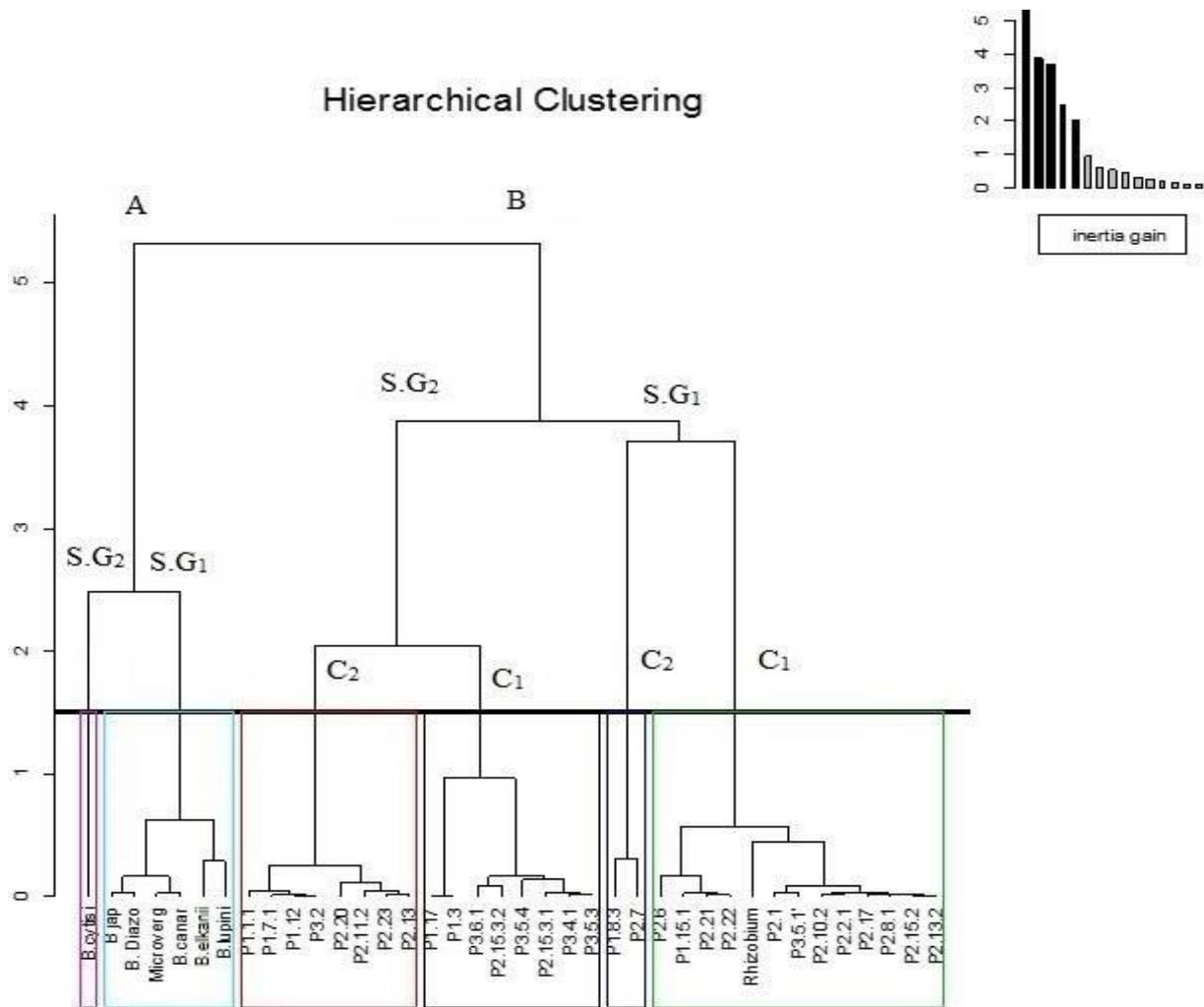
De nombreux travaux ont rapporté que les rhizobia sont très sensibles à la salinité (Jordan, 1982 ; Bourebaba, 2016 ; Salmi 2019).

V. Analyse numérique de la caractérisation phénotypique

L'analyse numérique a été établie à partir de 39 caractères. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été groupés et représentés par une matrice dont les variables sont codé par 1 et 0 (1 : présence, 0 : absence). Les résultats ont été traités par le package FactoMineR du logiciel R. Le dendrogramme qui dérive de cette analyse est représenté par la (Figure 27) par rapport et en fonction de la ressemblance entre les souches.

En effets, le dendrogramme établi par une classification ascendante hiérarchique (C.A.H) montre que nos souches sont réparties en deux principaux groupes A et B. Le groupe A est constitué essentiellement de deux sous-groupes constitue uniquement par nous souches de références du genre *Bradyrhizobium*. Le deuxième sous-groupe représente *Bradyrhizobium*

cytisi qui partage 23 caractères phénotypiques avec le premier sous-groupe constitué de 6 souches de référence du genre *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium canariense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium lupini*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Microvirga lupini*).



A : Groupe A, S.G₁: Sous-groupe 1 ; S.G₂:Sous-groupe 2 B : Groupe B, S.G₁: Sous-groupe 1 ; S.G₂: Sous-groupe 2 C₁: Classe 1, C₂: Classe 2

Figure 27 : Dendrogramme indiquant les similarités phénotypiques entre les souches nodulant *Spartium junceum* L. et les souches de références étudiées.

Le groupe B subdivisé en deux sous-groupes (S.G₁ et S.G₂) qui sont divisé encore une fois aux classes (C₁ et C₂).le sous-groupe 1 de groupe B et composée de 15 souches incluant la souche de références *Rhizobium*. La classe 2 (C₂) regroupe deux souches ce sont : P1.8.3 et P2.7 qui partage 81% des caractères en commun avec la classe 1 (C₁). Cependant, les souches de cette dernière partage 47% de ressemblance avec la souche de référence *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T.

Le sous-groupe 2 (S.G₂) de groupe B divisée en deux classes (C₁ et C₂), dont le premier est constitué de 8 souches qui partagent 20 caractères entre eux, ce qui représente 46% de ressemblance entre les souches. La classe 2 (C₂) ainsi constitué de 8 souches qui partagent 56% de ressemblances entre eux.

Les résultats du dendrogramme montrent une diversité entre les souches isolées du même site et également par rapport aux souches de références. En effets, la classe 1 (C₁) de sous-groupe 1 du groupe B qui est constituée de 13 souche y'a compris la souche de références rhizobium montre le plus rapprochement des souches au genre rhizobium ainsi le sous-groupe 2 du groupe B qui partage des caractères de ressemblance a des faibles concentrations.

Notre présente étude est une contribution à l'identification de la biodiversité des bactéries symbiotiques de *Spartium junceum* L. dans le cadre de la réhabilitation des sites dégradés (revégétalisation) et de la prévention de l'érosion des sols.

Au cours de ce travail, nous avons pu isoler, à partir de nodules racinaires de la légumineuse *Spartium junceum* L., des rhizobia au niveau du site de Tala Hiba Toudja de la région de Bejaïa.

D'après les analyses physico-chimiques effectuées au laboratoire de pédologie sur le sol prélevé du site, ont révélé une faible concentration de la salinité et une faible concentration en azote mais qu'il était riche en calcaire et en matière organique avec une conductivité électrique moyenne.

Sur les 30 isolats bactériens, isolés des nodules *Spartium junceum* L. 4 souches ont confirmé leur appartenance aux rhizobia. Parmi elles, 03 souches ont nodulées leurs plantes hôte et la souche P2.10.2 a nodulé une légumineuse de type herbacé, *Vigna unguiculata*.

A partir des tests physiologiques, nous constatons que l'ensemble des souches présentent une bonne croissance située entre 28°et 32°C. Cependant, il est à signaler que certaines souches comme P1.15.1 et P2.8.1 tolèrent même une température de 37°C. Le pH optimal de croissance des isolats est aux environs de 6,8. Nous avons constaté que les souches isolées ne tolèrent pas des concentrations élevées en NaCl.

Les résultats de l'assimilation des sucres et des acides aminés des souches étudiées montrent une diversité de leur utilisation comme source de carbone et d'azote respectivement.

Le comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques est variable. Cependant, toutes les souches isolées de *Spartium junceum* présentent une sensibilité à la kanamycine (50µg/ml) et à la spectinomycine (50 µg/ml).

Concernant la caractérisation biochimique, les souches présentent également une variabilité de réponse vis-à-vis des tests effectués.

L'analyse numérique des caractères phénotypiques semble distinguer deux groupes. Le premier est constitué des souches de références du genre *Bradyrhizobium* et de *Microvirga lupini*. Le deuxième renferme les souches isolées de *Spartium junceum* y compris la souche

de référence *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T.

Ce travail ouvre la voie à de nouvelles perspectives :

- L'enrichissement de cette collection par d'autres bactéries nodulants *S. junceum* provenant d'autres régions d'Algérie ;
- Réaliser le test de nodulation sur la plante hôte dans un habitat naturel (le sol) afin de se rapprocher des conditions réelles du processus de nodulation ;
- Effectuer un test de nodulation croisé sur plusieurs légumineuses à intérêt écologique et agronomique ;
- Effectuer les tests physiologiques, biochimiques et d'assimilation de différents substrats carbonés sur une plus large gamme afin de mieux estimer la similitude à partir des caractères phénotypiques par la technique de CAH ;
- Afin d'effectuer une parfaite identification des souches nodulant *Spartium junceum* une caractérisation génotypique et phylogénétique doit être entreprise en analysant certains gènes comme : ADNr16s, les gènes *Nod*, les gènes de ménages (*recA*, *glnII*, ...).

A

Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J.M, Rey, L, Ruiz- Argüeso, T, Boulila, A., Imperial, J. (2018) *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. *Syst Appl Microbiol.* 41(4), 333-339.

Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., Rey, L. (2014) *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(6), 1121-1129.

Allen, O.N., Allen, E.K. (1950) Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. *Bacterial. Rev.* 14, 273-330

Aoki, T., Hatanaka, Y., Look, D. C. (2000) ZnO diode fabricated by excimer-laser doping. *Applied Physics Letters*, 76(22), 3257-3258.

B

Belhadi, D., Philippe, D-L., Ramdani, N., Christine, L-R., Boulila, F., Pierre, T., Boulila, A., Benguedouard, A., Kacie, Y., Gisèle, L. (2018) *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and Applied Microbiology.* 41, 122–130.

Benouaret, R., Goujon, E., Goupil, P. (2014) Grape marc extract causes early perception events, defence reactions and hypersensitive response in cultured tobacco cells. *Plant physiology and biochemistry*, 77, 84-89.

Benouaret, S., Kheloufi, F., Ramdani, N.E. (2014) Caractérisation phénotypique des bactéries isolées des nodules racinaires de la légumineuse *Spartium junceum* L.

Bernaerts, JE., De Ley, J. (1963) A biochemical test for crown gall bacteria. Vol 197. 406-407.

Bischof, S., Kovačević, Z. (2013) Parts of the plant. From Weed to Fabric, Faculty of Textile Technology. University of Zagreb, Zagreb, 25-38.

Boukecha, O., Hammadi, L. (2017) Caractérisation des souches isolées de *Hedysarum*

coronarium. Mémoire fin de cycle Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa.

Boulila, A. (2009) Diversité génétique et variabilité de la composition terpénique des populations naturelles de *Teucrium polium* L. (Lamiacées) en Tunisie. Science Faculty of Tunis.

Bourebaba, Y., Duránb, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., José M. Palacios., Juan, I., c,Tomás R-A., Rey, L. (2016) Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 39, 266–274.

Bourebaba, Y. (2016) Etude de la diversité et de la promiscuité des bactéries nodulant *Lupinus micranthus*, Thèse de doctorat, Université Abderrahmane Mira Bejaïa, 123p.

C

Cerchiara, T., Chidichimo, G., Ragusa, M. I., Belsito, E. L., Liguori, A., Arioli, A. (2010) Characterization and utilization of Spanish Broom (*Spartium junceum* L.) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 423-426.

Chahboune, R., Barrijal, S., Moreno, S., Bedmar, E.J. (2012). *Bradyrhizobium* rifense sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif, *Syst. Appl. Microbiol*, 35, 302-305.

Cleland, E.E., Harpole, W.S. (2010) Nitrogen enrichment and plant communities, *Ann N Y Acad Sci*. 1195, 46-61.

Cloutier, E., Guay, J. H., Latouche, D. (1992) Le virage : l'évolution de l'opinion publique au Québec depuis 1960 ou comment le Québec est devenu souverainiste. Montréal : Québec/Amérique.

D

Dajoz, R. (2012) L'évolution biologique au XXIe siècle, les faits, les théories. Ed Lavoisier.

Denarie, J., Debelle F., Prome J. C. (1996) *Rhizobium* Lipochitoooligosaccharide nodulation and morphogenesis. 503-535.

Djehiche, W., Kadir, H., Ramdani, N. E. (2017) Isolement et caractérisation phénotypique des bactéries nodulantes *Spartium junceum* L.

E

El-Hilali, I. (2006) La symbiose rhizobium-lupin: biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V–Agdal. Faculté des sciences Maroc. 205 p.

Emberger, L., Godron, M. (1983) Centre d'études phytosociologiques et écologiques (Montpellier). Vade-Mecum pour le relevé méthodique de la végétation et du milieu: Extrait du "Code pour le relevé méthodique de la végétation et du milieu". Éditions du Centre national de la recherche scientifique.

Es-Skalli, Aziz. (2015) Analyse physico-chimique des sols Agricoles. Mémoire du master. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Maroc.

Eaglesham, D. J., Humphreys, C. J. (1987) McN. Alford, N., Clegg, WJ, Harmer, MA, Birchall, JD. *Appl. Phys. Lett*, 51, 457p.

F

Faune, (2009) Normes d'inventaire forestier. Analyse des tiges. Sélection, récolte et mesure en laboratoire.

G

Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Ann Rev of Genet*. 42. 413-441.

Gomes, C. M., Gottlieb, O. R., Bettolo, G. B. M., Delle Monache, F., Polhill, R. M. (1981) Systematic significance of flavonoids in *Derris* and *Lonchocarpus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 9(2-3), 129-147p.

Graham, A. Heath, P. Morten J. E. Markham A. F. (1991). The human aldose reductase gene maps to chromosome region 7q35. *Human genetics*, 86(5). 509-514p.

Graham, H. N. (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol

chemistry. Preventive medicine, 21(3). 334-350.

Graham, P. H. (1963) Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 29(1). 281-291.

Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., Young, J. P. W. (1991) Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4), 582-587.

Gram, H. E. (1984) Durability of natural fibres in concrete. Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries.

H

Hopkins W.G. (2003). Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Ed. de boeck.

I

Iskounen, T. (2012) Isolement et caractérisation de bactéries nodulant les légumineuses *Calycotome spinosa*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa

J

Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M. (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 895-898.

Jordan, D. C. (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(1), 136-139.

Julia, L. N., Gilles, B., Luis L., Marie S., Josette G. (2016) La place du transport de denrées agricoles dans le cycle biogéochimique de l'azote en France : un aspect de la spécialisation des territoires. *Cah. Agric.* 25, 15004.

K

Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J., Devine, T. E. (1988) Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 38(4). 358-361.

L

Labat-Moleur, F., Steffan, A. M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P. A., Behr, J. P. (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene therapy*, 3(11), 1010-1017.

Larpent, J. P., Larpent-Gourgaud, M. (1990) Mémento technique de Microbiologie. Technique et documentation-Lavoisier.

Lazrek Benfriha, F. (2008) Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de Doctorat –Université Toulouse III-Paul Sabatier, France. 254p

Lindström, K., Lehtomäki, S. (1988) Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium sp.* (Galega) compared with other fast-growing *rhizobia*. FEMS Microbiology Letters, 50(2-3), 277-287.

Lorenzo Segovia. J., Peter W, Young., Esperanza, M.N-R. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Biovar Phaseoli Type I Strains as *Rhizobium etli sp. nov.* INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATBICA CTERIOLOGApYr, pp, 374-377

Luciana, G., Angelini, Silvia T., Lara, F. (2013) Spanish Broom (*Spartium junceum* L.) as New Fiber for Biocomposites: The Effect of Crop Age and Microbial Retting on Fiber Quality. Conference Papers in Materials Science. Article ID 274359, 1-5.

M

Mahboub, A. (2018) Contribution à l'étude de l'interaction microbienne avec les plantes légumineuses, Mémoire de Master, universite 8 mai 1945 Guelma

Maire. R., (1987) ENCYCLOPEDIE BIOLOGIQUE, flore de l'afrique du nord, edition

chevaliers paris. Vol XVI, 301p.

Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries.

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends Microbiol 17. 458-466.

Maxted, N., Bennett, S.J. (2001) Conservation, diversity and use of Mediterranean Legumes. Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. Maxted N, and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht , Netherlands, Kluwer Academic Publ. 39 p:1-32.

Moreira, A. L., Sampaio, E. P., Zmuidzinas, A., Frindt, P., Smith, K. A., Kaplan, G. (1993) Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. Journal of Experimental Medicine, 177(6), 1675-1680.

Mazoyer, M., Roudart, L. (2017) Histoire des agricultures du monde. Du néolithique à la crise contemporaine. Le Seuil.

N

Norris, K. R. (1965) The bionomics of blow flies. Annual review of Entomology, 10(1). 47-68.

Nouar, M., Riabi, K., (2014) Isolement et caracterisation des bacteries nodulant la legumineuse *hedysarum pallidum* desf, poussant dans deux sites differents. Mémoire de Master. Universite de Constantine 1.

O

Odee, D.W., Sutherland, J.M., Makatiani, E.T., Mc Inroy, S.G., Sprent, J.I. (1997) Phenotypic characteristics and composition of the rhizobia associate with woody legumes growing in diverse Kanyen conditions, Plant Soil, 188, 65-75.

P

Parte, A. (2012) Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The actinobacteria. Springer Science & Business Media.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64. 180-201.

Polhill, R. M. (1981) *Dalbergieae* Bronn ex DC. (1825). *Advances in legume systematics*.

Pousset, J. (2002) *Engrais verts et fertilité des sols*. France Agricole Editions.

Q

Quatrini, P., Scaglione, G., Cardinale, M., Caradonna, F., Puglia, A.M. (2002) *Bradyrhizobium sp.* nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 92, 13-21.

Quezel, P., Santa, S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome I, pp. 462-541.

R

Ramdane, I., Boukarana, K. (2016) Sélection des souches rhizobiennes efficaces, autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la luzerne (*Medicago sativa* L.). Mémoire Master Académique. Université KasdiMerbah. Ouargla.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., (2000) *Biologie végétale*. 2e édition. Edition. De boeck. Paris Francen, pp. 653-660.

Roy, R.N. (2005) Evaluation du bilan en éléments nutritifs du sol. Approches et méthodologies.

S

Salmi, A. (2019) Caractérisation phénotypique, géotypique et phylogénétique des rhizobia nodulant *Calycotome spinosa*. Thèse de Doctorat en Sciences. Université A. MIRA de Béjaïa, 105 p.

Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, 111(5), 743-767p

Sebihi, F.Z. (2008) Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse pour l'obtention de Magister en Génétique et amélioration des plantes. Université

Mentouri de Constantine.

Sofiane, H., Natalizia, M., Giovanna, G., Zineb, M., Carlo, B., Francesc, C., Margita, U., Luigi, M., Sirajudheen, A., Samir, B., Damila, A., Fadila, B., Maria, F T., (2016) Antioxidant and antibacterial activity of extract and phases from stems of *Spartium junceum* L. growing in Algeria. *International Journal of Phytomedicine* 8. 37-46.

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

Soussou, S. (2013) Adaptation de la symbiose Fabacées-Rhizobium aux sites miniers: Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium* (Doctoral dissertation, Montpellier, SupAgro). 135p

Stougaard, J. (2000) Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant physiology*, 124(2), 531-540.

Struffi, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, A., Casella, S., Nuti, M.P. (1998) Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology*. 84 (1), 81-89.

V

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

Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Martínez-Romero, E. (2005) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium genospecies* alpha and *Bradyrhizobium genospecies* beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 569-575.

Z

Zahran, H.H., (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4),

page 968-989.

Zaidi, F., Kared, Y. (2017) Isolement et caractérisation des endosymbiotes de *Medicago polymorpha*. Mémoire fin de cycle Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa

Site web

Anonyme 02, cycle de l'azote <https://www.suezwaterhandbook.fr/eau-et-generalites/quelles-eaux-a-traiter-pourquoi/les-eaux-naturelles/cycle-de-l-azote>

Consulter le 27/03/2019.

Lindström et al., (2010) (Mise a jour Dec 2017) Dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuses, Consultez le 11/05/2019.

https://www.researchgate.net/figure/Dialogue-moleculaire-Rhizobium-Legumineuses-Le-zoom-montre-un-cordon-dinfection-passant_fig16_332630189.

Annexe I

Matériel, méthodes et réactifs utilisée pour le dosage

de carbonate La méthode utilisée : Méthode gazométrie.

La mesure de CaCO_3 total est réalisée sur une terre de *spartium junceum L* à une profondeur de 30cm fine et tamisé au laboratoire.

- Premièrement on fait un test d'effervescence utilisons l'acide Hcl sur la terre.
- Pour l'étalonnage de l'appareil on réalise une attaque des quantités croissantes de CaCO_3 pur par un acide Hcl dilué à $\frac{1}{2}$ et on mesure à chaque fois le volume de CO_2 dégagé.
- Ensuite, on prend la terre et l'humidifie avec de l'eau distillé et l'introduite dans un erlenmeyer dont ce dernier et relie par un calcimètre. Et on vérifie le niveau du liquide du tube gradué arrive à zéro avant de fermé le robinet de calcimetre et noté le volume initiale.
- La terre contient de carbonate dégagé le CO_2 , ce dernier et mesuré dans une pression atmosphérique et à la température de l'expérience.

Appareillage utilisée : Calcimètre de BERNARD. Et autre matériel, il s'agit d'une spatule, pissette, balance, Becher, eau distillée et eau de robinet.

Réactifs utilisée : acide Hcl diluée a $\frac{1}{2}$, CaCO_3 a des quantités croissantes.

Matériel, méthodes et réactifs utilisée pour mesuré le pH du sol

Le but et principe c'est la mesure électrométrique du pH au moyen d'une électrode combinée.

Matériel

- Balance.
- pH mètre.
- Pissette et flacons ou Erlens de 100ml.
- Agitateur magnétique.
- Le sol séché.

Réactifs

- Eau distillée, chlorure de potassium Kcl
- les étalons.
- pH 4, pH7et pH9

Annexe II

Composition de milieux de culture

Milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), (Vincent, 1970).

Mannitol	10g
Extrait de levure	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ ,7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Milieu Yeast Mannitol brouth (YMB), (Vincent, 1970).

Mannitol	10g
Extrait de levure	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ ,7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Milieu utilisés pour la culture des légumineuses (la plante)

- **Solution minérale Stock (10 X)**

CaHPO ₄	10 g
K ₂ HPO ₄	02 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	02 g
NaCl	02 g

• **Solution FeCl₂ (10 X):**

FeCl ₂	0.1 g
Eau distillée	100 ml

• **Solution d'Oligo-elements (10 X):**

CuSO ₄	0.16 g
ZnSO ₄	0.4 g
MnSO ₄	3.6 g
(NH ₄) ₂ Mo, 7H ₂ O	0.5 g
H ₃ BO ₃	0.004g
Eau distillée	200 ml

pH Ajusté a 7.0

• **Dilution (1 X)**

Solution minérale Stock (10 X)	100 ml
Solution FeCl ₂ (10 X)	0.3 ml
Solution d'Oligo-elements (10 X)	01 ml
Eau distillée	900 ml

*Diluer encore dans 2500
ml d' H₂O*

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) additionée de bleu de bromothymol (BTB)

Mannitol	10g
Extrait de levure	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ ,7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Agar	15g
Bleu de bromothymole	0.05g
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Milieu citrate de simmons

Sulfate de Mg	0.2g
Phosphate mono	1g
Phosphate di potassique	1g
Citrate de sodium	2g
Nacl	5g
Bleu de bromothymol	0.08g
Agar	12g
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Milieu Urée-Indole

L-tryptophane	03g/L
Phosphate monopotassique	01g/L
Phosphate bipotassique	01g/L
Chlorure de sodium	05g/L
Urée	20g/L
Alcool a 90°	10ml
Rouge de phénol	0.025g/L
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Milieu bouillon nitraté

K ₂ HPO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1g
KNO ₃	0.7g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
CaSO ₄ , 2H ₂ O	0.1g
FeCl ₃	4mg
L-arabinose	1g
Glycerol	4 ml
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Milieu 3-cetolactose

Premier Milieu de 3-cetolactose

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Deuxième milieu de 3-cetolactose

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Réactif de Benedict (RB)

Citrate de sodium	17.3g
Carbonate de sodium anhydre	10g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	17.3g
Eau distillée	1000ml

pH ajusté à 6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Annexe III

Tableau A₁ III : Résultats de résistance et sensibilité aux antibiotiques.

<i>Souches</i>	<i>Kana 10</i>	<i>Kana 25</i>	<i>Spectino 10</i>	<i>Spectino 50</i>	<i>Strepto 10</i>	<i>Strept 50</i>
P1.3	-	-	-	-	-	-
P1.12	-	-	-	-	-	-
P1.15.1	-	-	-	+	+	-
P1.8.3	-	-	+	+	-	-
P1.7.1	-	-	-	-	-	-
P1.1.1	-	-	-	-	-	-
P1.17	-	-	-	-	-	-
P2.11.2	-	-	-	-	-	-
P2.2.1	-	-	-	-	-	-
P2.13.2	+	-	-	-	-	-
P2.7	-	-	-	-	-	-
P2.10.2	-	-	-	-	-	-
P2.15.3.2	+	-	-	-	-	-
P2.6	-	-	-	-	+	-
P2.8.1	-	-	-	-	-	-
P2.15.2	-	-	+	-	-	-
P2.15.3.1	+	-	+	-	-	-
P2.1	+	-	+	-	-	-
P2.23	-	-	-	-	-	-
P2.17	-	-	-	-	-	-
P2.20	-	-	+	-	-	-
P2.22	-	-	+	-	-	-
P2.13	-	-	+	-	-	-
P2.21	-	-	+	-	-	-
P3.5.1'	-	-	-	-	-	-
P3.2	-	-	-	-	-	-
P3.6.1	-	-	-	-	-	-
P3.5.4	-	-	-	-	-	-
P3.4.1	-	-	-	-	-	-
P3.5.3	-	-	-	+	-	-
USDA 3051 ^T	+	+	+	+	-	-
CTAW 11 ^T	+	+	+	+	+	+
USDA 76 ^T	+	-	+	-	+	-
3841 ^T	-	-	-	-	+	+
Lut 6 ^T	+	-	+	+	+	-
USDA 110 ^T	+	-	+	-	+	-
BTA-1 ^T	-	-	+	-	+	+
USDA 6 ^T	+	-	+	-	+	-

Tableau A2III : Représente la moyenne de la DO des trois répétitions pour chaque souche.

Souches	Température (C°)					pH					NaCl (%)			
	20	24	28	32	37	4	6	6,8	8	10	0,5	1	1,5	2
P1.3	0.170	0.208	0.270	0.010	0.006	0.019	0.271	0.296	0.287	0.050	0.007	0.002	0.002	0.002
P1.12	0.195	0.256	0.391	0.020	0.040	0.024	0.077	0.181	0.155	0.044	0.028	0.024	0.012	0.009
P1.15.1	0.009	0.115	0.245	0.333	0.385	0.019	0.253	0.224	0.222	0.036	0.037	0.026	0.020	0.009
P1.8.3	0.116	0.223	0.257	0.108	0.021	0.011	0.104	0.126	0.396	0.041	0.389	0.292	0.267	0.260
P1.7.1	0.030	0.243	0.282	0.054	0.023	0.004	0.058	0.243	0.258	0.020	0.019	0.011	0.011	0.008
P1.1.1	0.020	0.243	0.302	0.052	0.014	0.010	0.139	0.163	0.292	0.022	0.028	0.012	0.012	0.010
P1.17	0.070	0.236	0.260	0.029	0.009	0.032	0.263	0.280	0.201	0.050	0.020	0.006	0.006	0.004
P2.11.2	0.235	0.322	0.442	0.087	0.096	0.004	0.061	0.252	0.270	0.020	0.017	0.017	0.013	0.010
P2.2.1	0.159	0.163	0.275	0.280	0.037	0.015	0.193	0.195	0.183	0.002	0.039	0.019	0.018	0.016
P2.13.2	0.157	0.221	0.277	0.280	0.037	0.013	0.419	0.418	0.362	0.075	0.014	0.008	0.007	0.001
P2.7	0.041	0.139	0.269	0.197	0.018	0.012	0.184	0.188	0.200	0.135	0.310	0.253	0.246	0.226
P2.10.2	0.099	0.162	0.266	0.264	0.021	0.067	0.315	0.328	0.308	0.094	0.022	0.022	0.019	0.007
P2.15.3.2	0.158	0.238	0.319	0.056	0.009	0.018	0.433	0.273	0.243	0.017	0.006	0.001	0.001	0.001
P2.6	0.102	0.180	0.332	0.153	0.021	0.025	0.327	0.353	0.357	0.027	0.006	0.008	0.006	0.005
P2.8.1	0.115	0.204	0.276	0.290	0.364	0.021	0.292	0.272	0.269	0.003	0.028	0.016	0.012	0.009
P2.15.2	0.065	0.170	0.265	0.383	0.012	0.010	0.310	0.323	0.273	0.022	0.015	0.013	0.010	0.009
P2.15.3.1	0.158	0.285	0.303	0.110	0.003	0.019	0.124	0.276	0.249	0.025	0.021	0.019	0.013	0.006
P2.1	0.062	0.181	0.314	0.319	0.057	0.083	0.343	0.362	0.343	0.020	0.022	0.019	0.013	0.006
P2.23	0.135	0.142	0.260	0.194	0.005	0.068	0.102	0.149	0.062	0.026	0.040	0.016	0.013	0.010
P2.17	0.058	0.199	0.310	0.370	0.045	0.107	0.348	0.354	0.334	0.058	0.025	0.020	0.014	0.009
P2.20	0.191	0.229	0.289	0.186	0.020	0.023	0.417	0.425	0.402	0.035	0.012	0.009	0.007	0.005
P2.22	0.175	0.233	0.347	0.095	0.018	0.017	0.266	0.283	0.240	0.012	0.014	0.012	0.010	0.009
P2.13	0.052	0.085	0.157	0.142	0.051	0.006	0.062	0.148	0.064	0.046	0.038	0.014	0.011	0.010
P2.21	0.035	0.342	0.359	0.379	0.159	0.019	0.371	0.396	0.387	0.050	0.010	0.010	0.005	0.005
P3.5.1'	0.010	0.207	0.293	0.015	0.010	0.045	0.503	0.466	0.402	0.223	0.402	0.199	0.050	0.019
P3.2	0.104	0.162	0.227	0.049	0.032	0.019	0.063	0.102	0.252	0.020	0.024	0.022	0.020	0.019
P3.6.1	0.040	0.048	0.192	0.069	0.007	0.025	0.129	0.140	0.133	0.048	0.034	0.024	0.009	0.010
P3.5.4	0.033	0.057	0.201	0.056	0.012	0.016	0.142	0.150	0.139	0.054	0.045	0.030	0.027	0.026
P3.4.1	0.033	0.084	0.243	0.060	0.011	0.007	0.134	0.170	0.123	0.054	0.092	0.020	0.018	0.017
P3.5.3	0.010	0.075	0.199	0.054	0.015	0.010	0.141	0.156	0.100	0.005	0.018	0.009	0.008	0.008
USDA 3051 ^T	0.105	0.441	0.617	0.493	0.602	0,251	0,443	0,48	0,509	0,229	0.034	0.024	0.009	0.010
CTAW 11 ^T	0.125	0.391	0.537	0.331	0.180	0,257	0,316	0,45	0,537	0,25	0.024	0.022	0.020	0.019
USDA 76 ^T	0.245	0.271	0.664	0.603	0.075	0,43	0,484	0,529	0,64	0,016	0.045	0.030	0.027	0.026
3841 ^T	0.120	0.193	0.546	0.201	0.123	0,171	0,531	0,58	0,526	0,04	0.459	0.236	0.072	0.019
Lut 6 ^T	0.298	0.481	0.312	0.092	0.043	0,377	0,445	0,447	0,312	0,014	0.256	0.254	0.174	0.018
USDA 110 ^T	0.105	0.493	0.654	0.578	0.043	0,374	0,441	0,447	0,654	0,264	0.341	0.284	0.068	0.053
BTA-1 ^T	0.523	0.541	0.632	0.234	0.167	0,251	0,484	0,57	0,568	0,526	0.317	0.211	0.129	0.082
USDA 6 ^T	0.537	0.593	0.567	0.455	0.005	0,361	0,392	0,394	0,567	0,016	0.469	0.261	0.231	0.064

Tableau A3III : Matrice utilisée pour la construction du dendrogramme

Souches	BBT	Cit	Ur	In	Nr	Rb	Kana	Kana	Spect	Spect	Strep	Strep	Sor	Mal	Lac	Ara	Gal	Sac	Fru	Glu	Hls	Cly	Pro	Lyc	Cyc	20	24	28	32	37	4	6	6,8	8	10	0,50	1%	1,50	2%		
P1.3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
P1.12	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P1.15.1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
P1.8.3	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
P1.7.1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P1.1.1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P1.17	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.11.2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.2.1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
P2.13.2	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.7	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P2.10.2	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.15.3.2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P2.6	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.8.1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.15.2	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.15.3.1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
P2.17	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.20	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
P2.22	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
P2.13	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
P2.21	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P3.5.1'	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
P3.2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P3.6.1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P3.5.4	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P3.4.1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P3.5.3	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
USDA3051 ^T	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
CTAW11 ^T	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
USDA76 ^T	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
3841 ^T	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
Lut6 ^T	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
USDA110 ^T	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
BTA-1 ^T	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
USDA6 ^T	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1



Résumé

Parmi les 30 souches bactériennes isolées des nodules racinaires de la légumineuse *Spartium junceum* L., récoltés de la région de Toudja (Bejaïa). Un test de nodulation simple et croisé a été effectué afin d'authentifier ces dernières. 03 souches ont pu former des nodules sur leur plante hôte à l'exception de la souche P2.10.2 qui a aussi nodulé *Vigna unguiculata*, confirmant leurs appartenances aux rhizobia. La caractérisation phénotypique des souches porte sur une série des tests biochimiques, physiologiques et nutritionnelles, ainsi qu'une détermination de la sensibilité ou de la résistance à certains antibiotiques qui a montré que la majorité des souches sont sensibles. En outre, un test de température a révélé qu'elles poussent entre 28° et 32°C. Pour conclure, la répartition des souches s'est basée sur une analyse numérique fondé par une CAH et le résultat a montré que la plupart des souches sont liées à la souche de référence *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T.

Mots-clés : *Spartium jenceum* L., rhizobia, nodulation, symbiose.

Abstract

Among the 30 bacterial strains isolated from the root nodules of the legume *Spartium junceum* L., harvested in the area of Toudja (Bejaia). A simple and crossed nodulation test was performed to authenticate them. 03 strains were able to form nodules on their host plant with the exception of the strain P2.10.2 which also nodulated *Vigna unguiculata*, confirming their affiliation to rhizobia. Phenotypic characterization of strains involves a series of biochemical, physiological and nutritional tests as well as a determination of the sensitivity or resistance to certain antibiotics which have shown that the majority of the strains are sensitive; in addition, a temperature test revealed that they were growing between 28 and 32 ° C. In conclusion, the distribution of the strains was based on CAH-based numerical analysis and the result showed that most strains are related to the reference strain *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T.

Key word: *Spartium junceum* L., rhizobia, nodulation, symbiosis.