

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

Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

## Mémoire de Fin de Cycle

En vu de l'obtention du diplôme de Master II

Option : Environnement et sécurité alimentaire

### *Thème*

**Caractérisation phénotypique des bactéries  
symbiotiques isolées de *Retama  
monosperma*.**

Réalisé par :

*BOUKRARA Oualid*

*BENGANA Sabri*

Membres du jury :

*Président* : M<sup>r</sup>. HAMLAT

*Promoteur* : M<sup>me</sup>. BOULILA

*Co-promoteur* : M<sup>elle</sup> BOUCHEFFA

*Examineurs* : M<sup>r</sup>. RAMDANI

M<sup>r</sup>. AISSAT. L

*PROMOTION : 2011-2012*

## REMERCIEMENTS

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur M<sup>r</sup> Hamlat d'avoir accepté d'honorer par sa présence, la présidence du jury et l'évaluation de ce travail ; Mr. Ramdani et Mr. Aissat d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*

*Nous aimerons exprimer notre profond remerciement à notre PROMOTRICE M<sup>me</sup> BOULILA et M<sup>lle</sup> Boucheffa Karima notre copromotrice , pour le grand honneur qu'elle nous a fait en acceptant de diriger ce travail, pour ses recommandations et ses discussions perspicaces ainsi que pour ses conseils qui ont beaucoup enrichi notre travail.*

*Nos sincères remerciements à Mr ; Boulila et l'équipe de laboratoire d'écologie microbienne pour leur soutien Gentillesse et leur sympathie*

*Nous tenons à remercier l'ensemble des enseignants ayant contribué de près ou de loin à notre formation qu'ils trouvent à travers ses lignes l'expression de notre plus grande considération.*

*Nos remerciements vont également à tous nos amis et proche pour leur encouragement et leur soutien.*

# DEDICACES

*Avec l'aide du bon dieu le tout puissant est achevé ce travail, au quel je dédie à toute les personnes qui me sont chères.*

*A ceux à qui mon cœur depuis sa naissance, n'a éprouvé qu'amour et reconnaissance.*

*A ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance.*

*A ceux qui m'ont soutenu nuit et jours, et durant tout mon parcours*

*A vous très chers parents, je vous dis merci.*

*A mes frères Nabil, Yacine, et Massi*

*A mes sœurs ; sofia et Sandra*

*Et à tous mes cousins et cousines*

*A mon ami Walid et sa famille*

*A tous mes amis sans exception*



Sabri

# DEDICACES

*A vous mes chers parents : pour votre éducation, pour les sacrifices consentis, pour votre attention de tous les instants, pour votre soutien et vos encouragements... Vous avez tout fait pour moi...*

*A vous mes frères et sœurs: Mazigh, mourad , lynda, Riad, zouzou et coutcoute chanel, pour votre soutien  
A toi Sabri et ta famille*

*A toute la promotion Environnement et sécurité alimentaire  
2011/2012*

*A tous mes amis (es), particulièrement: Lila qui m'a aidé et m'a donné le courage dont j'avais besoin.*

*A vous mes copins de chambre Lhouardi, Lounis, Ferou,  
Safir et Zidane,*

*Je dédie ce travail*

*walid*



<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## **Chapitre I : synthèse bibliographique**

1- Légumineuses .....	3
1.1. Taxonomie des légumineuses.....	3
1.2. Genre Retama.....	4
1.2.1. Description du genre Retama.....	4
1.2.2. Distribution géographique des rétames .....	6
1-2-3. Intérêt des rétames.....	6
2- Rhizobiums .....	9
2-1. Evolution et diversité des rhizobiums.....	9
3. Fixation de l'azote .....	15
3.1. Principales sources d'azote.....	15
3.1.1. Sol.....	15
3.1.2. Amendements organiques.....	15
3.1.3. Engrais minéraux.....	16
3.1.4. Atmosphère.....	16
3.1.5. Fixation industrielle de l'azote.....	16
3.1.6. Fixation symbiotique.....	16
4- Symbiose rhizobia-légumineuses.....	18
5- Facteurs influençant l'association rhizobia-légumineuses .....	18
5-1. Facteurs abiotiques.....	18
5-1-1. Salinité.....	18
5-1-2. Température .....	19
5-1-3. Acidité et alcalinité.....	19
5-1-4. Métaux.....	20
5-1-5. Déficit hydrique.....	20
5-2. Facteurs biotiques.....	21

## **Chapitre II : matériels et méthodes**

# Sommaire

---

1. Matériel biologique .....	22
2. Méthodes .....	23
2.1. Analyses pédologiques .....	23
2.1.1. Préparation du sol .....	23
2.1.2. Acidité du sol .....	23
2.1.3. La texture.....	24
2.1.4. Dosage du calcaire total.....	25
2.1.5. Dosage du calcaire actif.....	25
2.1.6. Dosage du carbone organique.....	25
2.1.7. Dosage de l'azote total.....	26
2.2. Isolement et purification des rhizobia symbiotes de <i>R.monosperma</i> .....	26
2.3. Authentification des souches bactériennes purifiées .....	27
2.3.1. Mise en germination des graines .....	27
2.3.2. Préparation des cultures bactériennes .....	27
2.3.3. Obtention des plantules.....	28
2.3.4. Inoculation des plantules.....	28
3. Caractérisation phénotypique des souches purifiées .....	28
3.1 .Caractères culturaux et cellulaires .....	28
3.2. Caractérisation physiologique.....	28
3-2-1. Effet du pH .....	29
3-2-2. Effet de la température sur la croissance des souches.....	29
3-2-3. Tolérance à la salinité .....	29
3.3. Caractérisation nutritionnelle .....	29
3.3.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone .....	29
3-3-2. Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote .....	30
3-4. Caractérisation biochimique.....	30
3-4-1. Recherche des décarboxylases : LDC, ODC.....	30
3-4-2. Utilisation du citrate .....	30
3-4-3. Recherche de l'acétoïne : Réaction de Voges-Proskauer (VP).....	30
3-4-4. Production d'acide : Réaction au rouge de méthyle .....	30
3-4-5. Production d'indole.....	31
3-4-6. Réduction des nitrates .....	31

## Sommaire

---

3-4-6. Activité catalasique .....	31
4- Analyse numérique.....	32

### Chapitre III : résultats et discussions

1- Caractéristique physico-chimique du sol .....	33
2- Isolement et authentification des isolats.....	33
3- Caractérisation phénotypique des souches.....	34
3-1. Caractérisation cellulaire.....	34
3-2. Caractérisation culturale.....	34
3-3. Caractérisation physiologique .....	35
3-3-1. Effet de la température sur la croissance des souches.....	35
3-3-2. Effet du Ph.....	36
3-3-3. Effet du Na Cl sur la croissance des souches.....	38
3-4. Caractérisation nutritionnelle.....	40
3-4-1. Utilisation de sucre comme source de Carbone .....	40
3-4-2. Utilisation aminés comme source d'azote d'acides .....	40
3-5. Caractérisation biochimique.....	43
<b>4. Analyse numérique.....</b>	<b>44</b>
<b>5. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>56</b>
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	

### Introduction

L'évolution des pratiques agricoles et sylvicoles, de plus en plus intensives, pose un grand problème sur l'environnement et la durabilité des écosystèmes, notamment par les apports en engrais azoté qui sont à l'origine des différents cas de pollutions ex : contamination des nappes phréatiques et des aliments issus de ces pratiques.

L'azote est donc un facteur limitant majeur de la production agricole, Alors que l'atmosphère terrestre est constituée de 79% de diazote. Seules les bactéries diazotrophes associées à certains groupes de végétaux sont capables de l'utiliser, par un processus biochimique connu sous le nom de fixation biologique de l'azote.

Une fixation symbiotique entre une bactérie fixatrice d'azote et une plante est en principe bénéfique pour les deux partenaires. Ainsi, si le micro-organisme apporte sa capacité de réduction de l'azote gazeux pour le transformer en ammonium, essentiel pour le développement de la plante, celle-ci à son tour fournit à la bactérie un apport carboné (produits de la photosynthèse) indispensable pour sa croissance et assure sa reproduction dans un milieu clos, la nodosité ou nodule, loin de toute compétition par d'autres micro-organismes.

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont les plus connues et les mieux étudiées, sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plantes de la famille des légumineuses (de Faria et al, 1989). Elles présentent un intérêt majeur au niveau économique, agronomique et écologique. Elles permettent en effet de limiter les apports d'engrais azotés, coûteux et polluants, dans les écosystèmes cultivés et assurent le maintien de la fertilité des sols dans les milieux naturels. Elles sont de ce fait d'une grande utilité pour la restauration de milieux dégradés (Journet et al, 2001).

Le genre *Retama* appartenant à la famille des *Fabaceae* et la tribu *Genisteae* comprend trois espèces : *R. raetam*, *R. sphaerocarpa* et *R. monosperma*. Ce sont des arbustes endémiques des régions méditerranéennes de l'Afrique du nord (Algérie, Maroc, Tunisie), du sud de l'Espagne et du Portugal (Quezel et Santa, 1962).

Ce modeste travail fait l'objet d'une caractérisation phénotypique des bactéries symbiotiques isolées d'une légumineuse appartenant au genre *Retama* ; *R. monosperma* qui rentre dans le cadre de projet de recherche du laboratoire d'écologie microbienne qui étudie la



possibilité d'utilisation des espèces de Retama dans le projet de restauration des sols dégradés et pauvres.

Ce mémoire comprend trois chapitres : le premier chapitre correspond à une synthèse bibliographique ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique. Le second présente le matériel et méthodes utilisées durant cette étude et enfin, le troisième regroupe les résultats et discussion.

## 1- Légumineuses

La famille des légumineuses représente l'un des taxons végétaux les plus importants, tant du point de vue biologique et d'écologie fondamentale que du point de vue agronomique et environnemental (Journet *et al.*, 2001). Elles sont largement définies par la structure à fleur peu commune et fruit en gousse, et constituent une phytobiomasse très intéressante après celle des graminées (Räsänen, 2002). Elles se développent dans des écosystèmes extrêmement variés ; des régions tempérées (plantes à amides) aux régions tropicales (plante à uréides) (Shubert et Bolland, 1990).

Les légumineuses ont une importance potentielle en terme écologique et économique par leur capacité symbiotique avec les bactéries du sol, connues sous le nom de rhizobium. Cette association entre plante et bactérie permet d'avoir, biologiquement, une source d'azote dans le sol grâce à la fixation de l'azote atmosphérique. Elles représentent donc, par cette capacité symbiotique une source d'azote renouvelable pour l'agriculture où sont très coûteux et polluants.

Une des plus grandes particularités de cette famille, est la présence de renflement au niveau des racines appelés nodosités et contenant des bactéries symbiotiques du genre rhizobium, ces bactéries sont capable de convertir l'azote atmosphérique en azote inorganique ( $\text{NH}_4$ ), participant ainsi à la fertilisation des sols.

### 1.1. Taxonomie des légumineuses

La classification des légumineuses est en constante évolution. En effet cette famille est divisée en 3 sous familles qui correspondent véritablement à des groupes monophylétiques (Doyle *et al.* ; 2000) : **Les Mimosacées**, **Les Césalpiniciées** et **Les Papilionacées**. Chacune des sous familles est divisée en tribus et sous tribus définies selon des caractéristiques morphologiques bien précises et regroupant plusieurs genre apparentés.

#### a) *Caesalpinioideae* :

C'est le groupe le plus primitif des fabales (Van Rhijn *et al.* ; 1995), et regroupe principalement des arbres des savanes et des forêts tropicales d'Afriques, d'Amérique du sud et de l'Asie du sud-est (Leena, 2002). Cette sous famille contient environ 150 genres et 2200 espèces. 23 % seulement des espèces parmi celles examinées, sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces nodulées se retrouvent majoritairement dans les tribus des

*Caesalpinieae* et *Cassieae* ; les tribus *Cercideae* et *Amherstieae* étant très peu nodulées (Maxted et Bennett, 2001).

**b) *Mimosoideae***

Les membres de *mimosoideae* sont caractérisés par leurs nombreuses petites fleurs régulières (actinomorphes), en grappes serrées et par les nombreuses étamines saillantes en dehors des petits pétales. Ce sont en majorité des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (*Glycine*, *Acacia*,...) (Maxted et Bennett, 2001).

**c) *Papilionoideae***

C'est la sous famille des fabacées la plus abondante avec environ 500 genres et 12000 espèces. Ce sont principalement des plantes herbacées mais comprend aussi des arbres et arbustes. C'est chez les Papilionacées que l'on retrouve la majorité des légumineuses d'intérêt économique aussi bien dans l'alimentation humaine (fèves, haricots, petit pois.etc) qu'en alimentation animale (Terefework *et al* ; 2000), exemple :(trèfle, lupin...etc.) que l'on rencontre majoritairement dans les régions tempérées. La sous famille des papilionacées renferme environ 30 tribus dont la tribu des genistées et cette tribu compte un bon nombre de genre tel que *Retama* qui fait l'objet de notre travail.

**1.2. Genre *Retama***

Les rétames sont des Légumineuses arbustives, occupant les zones arides, semi-arides et côtières, qualifiées de plantes fixatrices de dunes. Leur nom dérive du nom commun est (R'tem) ou (retam) (Zohary, 1962 ; Shallaby *et al*; 1972). Ce genre fut depuis longtemps confondu avec les genres *Genista* et *Spartium* (Brongniart *et al* ; 1843), (2008). On les désigna tout d'abord par *Genistaretam* (Forkel, 1775). In Bouredja, (2005), ensuite on utilisa le *Spartium* pour désigner les deux espèces existantes: *Spartium sphaerocarpa* et *Spartium monosperma*, la nomination a ensuite été changé, et le nom de *Retama* a été considéré comme un genre regroupant ces deux espèces (Boissier, 1939). In Bouredja, (2005).

**1.2.1. Description du genre *Retama***

Les espèces du genre *Retama* sont des arbustes monoïques, pouvant atteindre jusqu'à

3 mètres de long, caractérisés par un tronc trapu et court, portant de nombreux rameaux denses, arqués, flexibles et retombants, fortement sillonnés et peu feuillés, les jeunes arbustes sont soyeux d'un vert argenté à gris argenté (Ozenda, 1982. In Bouredja, 2005).

Leurs feuilles sont caduques. Les feuilles inférieures sont trifoliolés, tandis que les supérieures sont simples et unifoliées (Quezel et Santa, 1962), elles sont minuscules, alternes et linéaires, qui ne demeurent en place que quelques jours. Les fleurs, unisexuées sont disposées en petites grappes latérales, réparties sur de courts racèmes, avec un petit calice bilabié, pétales à onglets plus ou moins soudés au tube staminal (Quezel et Santa, 1962).

La floraison est longue et précoce de la fin d'hiver à début printemps, selon le climat, elle peut s'étendre jusqu'au mois de mai. Le fruit est sous forme d'une étroite gousse indéhissante de moins de 2cm, acuminées, avec une extrémité aigue, portant une à deux graines (Quezel et Santa, 1962, Selami, 2000 ; Messirdi, 2004). Les graines contiennent de la cytosine, un alcaloïde toxique.

Le système racinaire est de type pivotant pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur (Stocker, 1974. In Bouredja, 2005), des racines adventives sont également présentes sur les rameaux et colonisent la surface des dunes. Les rétames se multiplient au printemps par semis ou par bouturage de tiges ajoutées, dans des sols pauvres, bien drainés même sablonneux à forte salinité. Le genre *Retama* compte trois espèces : *Retama sphaerocarpa*, *Retama raetam* et *Retama monosperma*.

- ***Retama monosperma***

Arbustes de 2 à 4mètres de hauteur des dunes littorales (figure 1), à fleurs blanches et fruits de type gousse portant une seule graine de couleur vert olive (Quezel et Santa, 1962).

- ***Retama sphaerocarpa***

Arbrisseaux de 1à 2mètres (figure 2), à rameaux pubescents plus ou moins dressés, caractérisés par de petites fleurs jaunes, des feuilles très petites, et des gousses globuleuses, jaunes bruns (Quezel et Santa, 1962).

- ***Retama raetam***

Arbuste saharien de 1à 3,5mètres de hauteur, à fleurs blanches et gousses non dilatée sur sa nature ventrale et contenant une petite graine (Quezel et Santa, 1962).



**Figure 1:** *Retama monosperma*



**Figure 2 :** *Retamasphaerocarpa*

### 1-2-2. Distribution géographique des rétames

Les rétames sont caractérisés par une large distribution géographique. Originaires du nord-ouest Africain et probablement des îles Canaries (Zohary, 1959), *Retama monosperma* par exemple se localise au sud de l'Europe, sur les pourtours du bassin méditerranéen, et le long de la côte de l'Espagne (Andalousie), du Portugal, de l'Italie, et dans le désert sud asiatique (Zohary, 1959 ; Beniston, 1985 ; Quezel et Santa, 1962).

En Algérie les rétames occupent une surface considérable du nord vers le sud (Thomas, 1968 et Stocker, 1974), dont *Retama monosperma* colonise de larges étendus sur le littoral oranais, le littoral algérois, l'est du littoral de Bejaia et le long du littoral de la région de Jijel. Par contre, *Retama raetam* est localisé dans le sud oranais, sud de Djelfa, Ain Safra, Touggourt, au centre de la Kabylie, à l'est de Biskra (Ighil, 1962), et à Ouargla (Allal-benfakih.l ; 2006). C'est une plante commune des écosystèmes arides qui entourent la méditerranée, elle utilise comme stratégie d'acclimatation une dormance partielle pour résister aux longues périodes de sécheresse (Mittler et al, 2002). Tandis que *Retama sphaerocarpa* se trouve principalement en petite Kabylie, Ghardaïa, Djebel Amour et les plaines de Batna (Zohary, 1962).

### 1-2-3. Intérêt des rétames

Les rétames, par leur capacité de fixation de l'azote atmosphérique présentent plusieurs intérêts écologique, pharmacologique, industriel et économique majeurs.

#### a). Intérêt écologique

Les rétames jouent un rôle très important dans le maintien de l'équilibre des milieux

naturels et des écosystèmes, reconnues comme étant des plantes des zones arides et semi arides. Elles s'adaptent aux conditions les plus extrêmes de sécheresse et de salinité grâce à leur morphologie et leur structure xéromorphique. Selon Mittler et ces collaborateurs (2000), *R. raetam* s'adapte bien aux conditions les plus extrêmes, elle développe un mécanisme moléculaire qui lui permet de résister aux changements climatiques (manque de nutriments et stress hydrique).

Certaines investigations (Dominguez-Lerena et al., 2001 ; Caravaca *et al* ; 2003 ; Rodriguez- Echeverria et Perez- Fernandez, 2005), proposent *R.sphaerocarpa* comme légumineuse efficace afin de reconstituer la biodiversité caractéristique ainsi que les propriétés physiques et biologiques des sols. Ceci permet d'une part l'installation et le développement de nouvelles espèces végétales et d'autre part empêche la désertification et l'érosion dans les régions semi arides. Grâce à leur système racinaire très développé, elles pénètrent jusqu'à 20m de profondeur dans le sol, ainsi elles constituent d'excellentes lignes de brise-vents (Ferry *et al* ; 1990).

D'après Farchichi(1997), la même espèce, *R. raetam*, grâce à son potentiel germinatif élevé, sa tolérance au stress hydrique et son mode de ramification radulaire, peut être considéré comme une espèce pionnière apte à coloniser les cordons dunaires, son utilisation dans les opérations de re-végétalisation de ces milieux fragiles est recommandable. Grâce à leur très grande capacité symbiotique, les rétames contribuent à la fertilisation, restauration et bio remédiation des sols salins, pauvres et dégradés, et comme toutes les légumineuses, les rétames participent à la réduction de l'émission de gaz à effet de serre à travers la diminution de l'utilisation des engrais azotés, qui contribuent à la fois aux émissions de CO<sub>2</sub> et le N<sub>2</sub>O (Rispaïl *et al* ; 2010).

Dans le but de la bio remédiation et revégétalisation des sols en Algérie, des efforts ont été effectués pour la valorisation des plantes du Sahara algérien comme biomatériaux pour l'absorption des métaux lourds toxiques dans l'eau. Cheriti et ces collaborateurs (2009) ont utilisé *R.retam*, plante disponible localement à El Bayadh, pour l'élimination des ions de cuivre dans une solution aqueuse. Ces auteurs ont montré que les parties végétatives des rétames peuvent être utilisées comme bio-absorbant et comme alternative appropriée à l'élimination des ions de cuivre provenant des eaux usées.

#### **b). Intérêt pharmacologique**

*Retama* est répertorié comme étant une plante médicinale des régions arides. En médecine traditionnelle, *R. raetam* est utilisé dans le traitement de plusieurs maladies comme

l'eczéma, mais également dans les soins de morsures de serpents (Hamrouni, 2001).

Le pouvoir pharmacologique des rétames est dû à la présence de certains alcaloïdes. Boiss, Battandier et Malosse avaient séparé dès 1897 chez *Retama sphérocarpa* la rétamine, ils ont aussi isolé la d-spartéine et la cytisine qui se trouve dans le fruit de cette espèce (Unesco ; 1995). La rétamine possède une activité ocytocique deux fois plus grande que la spartéine. Un certain nombre de ces mêmes alcaloïdes (rétamine, anagyriine, cytisine, lupanine et la sphérocarpine) ont été également isolé de *R. monosperma*, (Unesco.1995).

Des recherches entreprises sur le genre *Retama*, ont montré que l'extrait aqueux de *R. raetam* avait un effet diurétique, aussi bien qu'hypoglycémique (Maghrani *et al* ; 2004). En effet, l'administration orale d'une dose de 20mg/kg de l'extrait aqueux de *R. reatam*, réduisait de façon significative le taux de glucose dans le sang des rats normaux, ainsi que des rats diabétiques. Elle influe aussi sur le métabolisme lipidique, selon Maghrani *et al*, (2004), l'administration d'extraits aqueux de cette espèce induit une baisse de la concentration des triglycérides dans le plasma des rats normaux et diabétiques et conduirait à une baisse signifiante du poids. En plus *R.reatam* a une activité antioxydante (Saadaoui *et al.*, 2006), ainsi qu'antimicrobienne et cytotoxique. De ce fait, on constate la large capacité pharmacologique des rétames, et leurs éventuelle utilisation en phytothérapie.

### **c). Intérêt industriel et économique :**

Les rétames sont considérés comme d'excellents fourrages, de plus leur bois est utilisé en chauffage. Ils sont riches en fibre, dont la longueur moyenne atteint 1,93mm (Bahi, 1991), et pourraient donc être valorisés dans l'industrie papetière. Elles sont aussi des plantes ornementales en raison de leurs multiples fleurs odorantes. Les graines des rétames contiennent des lécitines, protéines allergènes, utilisées par la plante dans les mécanismes de défense contre les insectes, ce qui pourrait donc mis à profit dans l'industrie des bio-insecticides, ( Shazly *et al.*, 1996). Ceci fait partie du concept d'une agriculture durable. La plus grande partie de l'azote de la biosphère (79%) se trouve dans l'atmosphère (Haynes, 1986; Foth, 1990), l'azote du sol et les amendements organiques ne suffisent pas pour atteindre des rendements optimums, donc l'intégration de ces plantes peut remplacer les amendements des engrais minéraux. On cite aussi le rôle des engrais verts dans la rotation légumineuses – céréales qui peuvent remplacer une pratique non économique : la jachère. Cela va assurer une alimentation saine, écologiquement viable et économiquement durable.

## **2- Rhizobiums**

On appelle rhizobium toutes les bactéries capables d'induire la formation de nodosités

chez les légumineuses (O'Hara *et al.*, 2003). La fixation symbiotique est une caractéristique utilisée pour améliorer la fertilité biologique des écosystèmes agricoles (Howieson et Ballard, 2004).

Du point de vue morphologique, elles sont sous forme de bâtonnets, à Gram négatifs, aérobies, mobiles grâce à la présence d'un ou de plusieurs flagelles.

### 2-1. Evolution et diversité des rhizobiums

Sur la base des groupes d'inoculation croisée définis comme des ensembles de plantes-hôtes dont la nodulation est induite par les mêmes souches bactériennes (Fred *et al.*, 1932). Les bactéries fixatrices d'azote ont d'abord été groupées en un seul genre *Rhizobium* comprenant six espèces : *Rhizobium japonicum* (*Lathyrus*, *Lens*, *Pisum* et *Vicia*), *Rhizobium lupini* (*Lupinus*), *Rhizobium meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), *Rhizobium phaseoli* (*Phaseolus*) et *Rhizobium trifoli* (*Trifolium*).

Les rhizobiums sont des microorganismes qui vivent à l'état libre ou en association symbiotique avec les légumineuses. Ce sont des organismes chimio-organotrophes exigeant des conditions d'aérobiose. Ces bactéries élaborent différents mécanismes qui permettent leur adaptation aux changements rapides de l'environnement (Rolfé *et al.*, 2003). Ils présentent une large diversité dans les régions tempérées ainsi que dans les régions tropicales (Wei *et al.*, 2006), et leur présence dans les sols pauvres et dégradés des climats arides et semi arides témoignent de leur parfaite adaptation aux conditions défavorables de l'environnement (Zahran, 1999). Puis, sur la base de vitesse de croissance, les espèces sont reclassées dans deux genres: le genre *Rhizobium* révisé comprenant les souches à croissance rapide et le nouveau genre *Bradyrhizobium*, pour les espèces à croissance lente (Jordan, 1982). L'étude combinée des caractères phénotypiques et phylogénétiques a confirmé cette séparation en deux genres (Graham, 1964 ; de Ley et Russel, 1965 ; Jarvis *et al.*, 1980 ; Crow *et al.*, 1981).

Par ailleurs, trois espèces du genre *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. trifoli* et *R. phaseoli*) rassemblées dans un seul genre d'après des études menées par Graham (1969) sont regroupées en une seule espèce *R.leguminosarum* comprenant trois biovars : *viciae*, *trifolii* et *phaseoli* (Jordan *et al.*, 1984).

La classification des rhizobiums basée sur leur pouvoir d'infection est remise en cause (Wilson, 1944). Par exemple, l'haricot est nodulé par un grand nombre de souches de *Rhizobium* isolées de différentes légumineuses tropicales (Martinez *et al.*, 1985). Par ailleurs, la souche de *Rhizobium* NGR 234 isolée de *Dolichos lahlah* présente le spectre d'hôte le plus



large connu et infecte plus de 100 légumineuses ainsi que la non légumineuse *Parasponia* (Lewin *et al.*, 1987 ; Trinick et Galbraith, 1980). Dans le (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984). L'emploi de techniques performantes de plus en plus distinctives a contribué à l'amélioration de la classification taxonomique des bactéries. C'est ainsi que de nouveaux genres et espèces de rhizobiums sont décrites dans différentes région du monde.

Cette classification est loin d'être définitive, car on estime que seulement près d'un tiers des légumineuses ont été étudié pour leur aptitude à noduler (Weir, 2012).

**Tableau I :** Classification des *rhizobia* (Weir, 2012)

Genre <b><i>Rhizobium</i></b> . Ce genre (Frank 1889) était le premier nommé inspiré de la signification latine qui veut dire vit dans la racine. Il contient actuellement 30 espèces.	
<i>Rhizobium alamii</i>	<a href="#">Berge et al., 2009</a>
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	<a href="#">Lu et al., 2009b</a>
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	<a href="#">García-Fraile et al., 2007</a>
<i>Rhizobium daejeonense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	Nouvelle ( <a href="#">López-López et al., 2011</a> )
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium galegae</i>	
<i>Rhizobium gallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium hainanense</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Nouvelle ( <a href="#">Ren et al., 2011b</a> )
<i>Rhizobium huautlense</i>	
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>Rhizobium loessense</i>	Autrefois " <i>Rhizobium huanglingense</i> "
<i>Rhizobium lusitanum</i>	
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	<a href="#">Lin et al., 2009</a>

<i>Rhizobium miluonense</i>	<a href="#">Gu et al., 2008</a>
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitium</i>	<a href="#">Han et al., 2008</a>
<i>Rhizobium oryzae</i>	<a href="#">Peng et al., 2008</a>
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Confirmée comme espèce ( <a href="#">Ramirez-Bahena et al., 2008</a> )
<i>Rhizobium pisi</i>	<a href="#">Ramirez-Bahena et al., 2008</a>
<i>Rhizobium tibeticum</i>	<a href="#">Hou et al., 2009</a>
<i>Rhizobium sullae</i>	Autrefois " <i>Rhizobium hedysari</i> "
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	<a href="#">Zhang et al., 2011</a>
<i>Rhizobium undicola</i>	Autrefois « <i>Allorhizobium undicola</i> »
<i>Rhizobium vignae</i>	<a href="#">Ren et al., 2011</a>
<i>Rhizobium yanglingense</i>	
Genre <b>Mesorhizobium</b> . Ce genre a été décrit par Jarvis <i>et al.</i> en 1997. Plusieurs espèces ont été déplacées du genre <i>Rhizobium</i> vers ce genre qui comporte actuellement 21 espèces.	
<i>Mesorhizobium albiziae</i>	<a href="#">Wang et al., 2007</a>
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	<a href="#">Chen et al., 2010</a>
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
<i>Mesorhizobium australicum</i>	<a href="#">Nandasena et al., 2009</a>
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Nouvelle ( <a href="#">Chen et al., 2011</a> )
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	<a href="#">Wang et al., 2007</a>
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Autrefois " <i>Rhizobium ciceri</i> "
<i>Mesorhizobium gobiense</i>	<a href="#">Han et al., 2008b</a>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Autrefois « <i>Rhizobium huakuii</i> »
<i>Mesorhizobium loti</i>	Autrefois " <i>Rhizobium loti</i> «

<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Autrefois « <i>Rhizobium mediterraneum</i> »
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	<a href="#">Vidal et al., 2009</a>
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	<a href="#">Nandasena et al., 2009</a>
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	<a href="#">Zhou et al., 2010</a>
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	<a href="#">Lu et al., 2009</a>
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
<i>Mesorhizobium tarimense</i>	<a href="#">Han et al., 2008b</a>
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Autrefois " <i>Rhizobium tianshanense</i> »
<p>Genre <b><i>Ensifer</i></b> autrefois <b><i>Sinorhizobium</i></b>. Le genre <i>Sinorhizobium</i> a été décrit par Chen <i>et al.</i> en 1988. Cependant quelques études récentes ont montré que <i>Sinorhizobium</i> et le genre <i>Ensifer</i> (Casida, 1982) appartiennent au même taxon. <i>Ensifer</i> garde la priorité (Young, 2003). La taxonomie de ce genre a été vérifiée en 2007 par Martens <i>et al.</i> Il contient actuellement 17 espèces.</p>	
<i>Ensifer abri</i>	
<i>Sinorhizobium americanum</i>	
<i>Ensifer arboris</i>	
<i>Ensifer fredii</i>	Autrefois " <i>Rhizobium fredii</i> "
<i>Ensifer garamanticus</i>	<a href="#">Merabet et al., 2010</a>
<i>Ensifer indiaense</i>	
<i>Ensifer kostiense</i>	
<i>Ensifer kummerowiae</i>	
<i>Ensifer medicae</i>	
<i>Ensifer meliloti</i>	Autrefois « <i>Rhizobium meliloti</i> »
<i>Ensifer mexicanus</i>	<a href="#">Lloret et al., 2007</a>
' <i>Sinorhizobium morelense</i> '	<b>Pas encore nommée <i>Ensifer</i></b> (Martens <i>et al.</i> , 2007)

<i>Ensifer adhaerens</i>	
<i>Ensifer numidicus</i>	<a href="#">Merabet et al., 2010</a>
<i>Ensifer saheli</i>	Autrefois " <i>Sinorhizobium sahelense</i> "
<i>Ensifer sojae</i>	<a href="#">Li et al. (en attente)</a>
<i>Ensifer terangae</i>	Nommée incorrectement <i>Sinorhizobium terangae</i>
Genre <b>Bradyrhizobium</b> . Ce genre a été décrit par Jordan en 1982 et contient actuellement 9 espèces.	
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	Autrefois " <i>Blastobacter denitrificans</i> "
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	<a href="#">Islam et al., 2008</a>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Autrefois " <i>Rhizobium japonicum</i> »
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	<a href="#">Ramírez-Bahena et al., 2009</a>
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	<a href="#">Ramírez-Bahena et al., 2009</a>
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	
Genre <b>Azorhizobium</b> . Ce genre a été décrit par Dreyfus et al. en 1988. Il est représenté actuellement par 2 espèces.	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	Autrefois « <i>Azorhizobium johanna</i> »
Genre <b>Methylobacterium</b> . Ce genre est actuellement représenté par une seule espèce.	
<i>Methylobacterium nodulans</i>	
Genre <b>Burkholderia</b> . Ce genre comporte actuellement sept espèces de rhizobia.	
<i>Burkholderia caribensis</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	
<i>Burkholderia mimosarum</i>	

<i>Burkholderia nodosa</i>	<a href="#">Chen et al., 2007</a>
<i>Burkholderia phymatum</i>	
<i>Burkholderia sabiae</i>	<a href="#">Chen et al., 2008</a>
<i>Burkholderia tuberum</i>	
Genre <i>Cupriavidus</i> . D'abord appelé <i>Wautersia</i> puis <i>Ralstonia</i> , ce genre subit actuellement plusieurs révisions taxonomiques et contient une seule espèce.	
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	
Genre <i>Devosia</i> . Il est actuellement représenté par une seule espèce.	
<i>Devosia neptuniae</i>	
Genre <i>Microvirga</i> . Il est actuellement représenté par trois espèces.	
<i>Microvirga lupine</i>	Nouvelle Ardley et al. (en attente)
<i>Microvirga lotononidis</i>	Nouvelle Ardley et al. (en attente)
<i>Microvirga zambiensis</i>	Nouvelle Ardley et al. (en attente)
Genre <i>Ochrobactrum</i> . Il est actuellement représenté par deux espèces.	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<a href="#">Zurdo-Piñeiro et al., 2007</a>
<i>Ochrobactrum lupine</i>	
Genre <i>Phyllobacterium</i> . Il contient actuellement trois espèces.	
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	
<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	<a href="#">Mantelin et al., 2006</a> (isolée de nodules sans preuve de capacité de noduler).
<i>Phyllobacterium leguminum</i>	<a href="#">Mantelin et al., 2006</a> (isolée de nodules sans preuve de capacité de noduler).
Genre <i>Shinella</i> . Il est actuellement représenté par une seule espèce	
<i>Shinella kummerowiae</i>	<a href="#">Lin et al., 2008</a>

### 3. Fixation de l'azote

Le cycle d'azote (figure 3) joue un rôle essentiel dans l'agriculture ainsi que dans les différents écosystèmes. L'azote est un facteur dit limitant dans la production agricole, alors

que l'atmosphère est la principale réserve naturelle d'azote avec 78% de l'atmosphère terrestre. L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les nucléotides, les acides nucléiques et la chlorophylle (Epstein, 1972). Il favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Stenvenson, 1986). Ainsi qu'il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (Lamaze *et al.*, 1990).

### **3.1. Principales sources d'azote**

L'azote provient par six sources qui sont : le sol, les amendements organiques, les engrais minéraux, l'atmosphère, la Fixation industrielle et par la fixation symbiotique.

#### **3.1.1. Sol**

La première source d'azote utilisée par les plantes est l'azote du sol. En absence de tout apport d'engrais les plantes non fixatrices d'azote utilisent l'azote du sol durant leur cycle physiologique. Même les plantes fixatrices d'azote atmosphérique utilisent d'abord l'azote de la semence et du sol durant la première phase de la croissance. L'azote du sol est essentiellement sous forme organique. C'est par minéralisation que la matière organique du sol libère l'azote utilisable par les plantes.

L'azote inorganique ou azote minéral, principalement ( $\text{NO}_3^-$ ) et ( $\text{NH}_4^+$ ), disponible pour la plante, constitue une petite fraction de l'azote total du sol (2-5%). L'azote minéral se trouve essentiellement dans la solution du sol et une petite quantité de  $\text{NH}_4^+$  adsorbée aux sites d'échange cationique sur les colloïdes du sol. Très peu de N est libéré des minéraux du sol (Newton, 1998).

#### **3.1.2. Amendements organiques**

Les résidus organiques laissés sur le sol après les récoltes constituent une litière temporaire. Quand ils sont enfouis en début de saison, ces résidus enrichissent la matière organique du sol. Les amendements organiques incorporés aux sols sous forme de fumier ou de compost viennent également enrichir et constituent une source d'azote et d'humus.

#### **3.1. 3. Engrais minéraux**

L'azote du sol et les amendements organiques ne suffisent pas pour atteindre des

rendements optimums. Des engrais minéraux azotés sont utilisés comme complément d'azote pour augmenter les rendements et intensifier la production végétale. Dans l'agriculture conventionnelle, la plus grande partie de l'azote minéral vient des engrais dissous avec une contribution de minéralisation de l'azote organique dans sol (Newton, 1998).

#### 3.1.4. Atmosphère

Une partie de l'azote retourne à la terre quand de l'azote atmosphérique ( $\text{NO}_2$ ) ou  $\text{NH}_3$  de l'industrie, des automobiles ou des unités d'élevage confinées réagissent avec les pluies.

#### 3.1.5. Fixation industrielle de l'azote

La production agricole et la sécurité alimentaire mondiale seraient en danger sans engrais (fixation industrielle de l'azote atmosphérique). L'azote apporté comme élément nutritif pour la plante est loin de la source la plus importante.

Les réactions du processus Haber-Bosch :  $\text{H}_2 + \text{N}_2 \rightleftharpoons \text{NH}_3$  (gaz ammoniac) : le gaz ammoniac peut être utilisé soit directement (ammoniac anhydre) soit pour la fabrication des autres engrais azotés comme  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ .

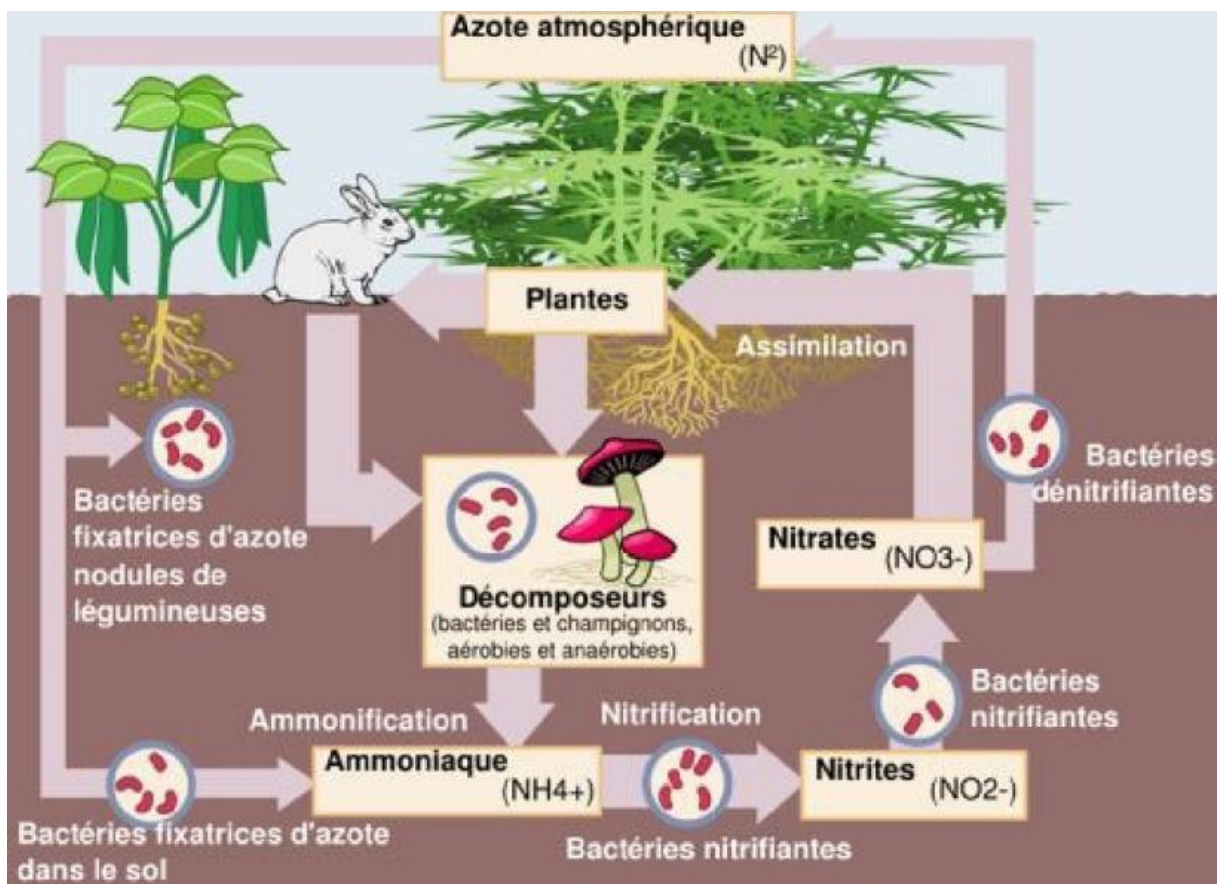
L'azote minéral dans le sol est donc sous forme de  $\text{NO}_3$  et de  $\text{NH}_3$ . Le  $\text{NH}_4^+$ , une fois absorbé par les plantes, est rapidement incorporé dans des acides aminés en raison de sa toxicité. Le  $\text{NO}_3^-$  nécessite la présence d'un transporteur membranaire au niveau des poils absorbants pour son absorption (dont il induit la fabrication). Il est alors soit stocké dans les vacuoles des cellules (et intervient alors dans le contrôle de la pression osmotique), soit transporté vers les parties aériennes par la sève brute (où l'on ne trouve pas d'ammonium). C'est la forme d'azote qui est majoritairement absorbée (Newton, 1998).

#### 3.1.6. Fixation symbiotique

La plus grande partie de l'azote de la biosphère (79%) se trouve dans l'atmosphère (Haynes, 1986; Foth, 1990). La fixation d'azote est le principal moyen naturel par lequel l'azote atmosphérique est ajouté au sol. Mais seul un nombre réduit de genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphère. Par la symbiose entre les bactéries réductrices de l'azote atmosphérique, une grande partie des légumineuses utilisent principalement l'azote provenant de l'atmosphère et un échange bénéfique se produit de manière réciproque entre les deux partenaires : plante

bactérie où la plante-hôte (la légumineuse) offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse. En retour, la bactérie fixe l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et le fournit à la plante hôte sous forme assimilable  $NH_3$  (Dommergues *et al.*, 1999).

A l'échelle mondiale, la fixation biologique annuelle de l'azote est estimée au double de l'utilisation mondiale des engrais. Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible. (Newton, 1998).



**Figure 3** : Le cycle d'azote : La grande majorité de l'azote se trouve sous forme de di azote ( $N_2$ ) non-assimilable par les plantes. La fixation biologique de l'azote par les bactéries en symbiose avec les plantes actinorhiziennes et les Légumineuses permet d'accéder à une source quasi-illimitée d'azote. ( Peret, 2007).

#### 4- Symbiose rhizobia-légumineuses

La symbiose, du grec ancien symbiôsis (sym : ensemble ; biôsis : vivre) désigne l'ensemble des associations, plus ou moins fortes, s'établissant entre deux organismes différents vivant ensemble grâce à leurs échanges.



Les *rhizobia* peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation de structures appelés nodosités ou nodules. Par ces nodules, la plante hôte (la légumineuse) offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse. Le processus de la fixation, lui-même, consiste en la réduction de l'azote atmosphérique N<sub>2</sub> sous forme ammoniacale. Cette association à profit réciproque entre la légumineuse et les bactéries est appelée symbiose fixatrice de l'azote atmosphérique.

Le complexe symbiotique rhizobia-légumineuses par sa capacité de fixer l'azote atmosphérique, est considéré comme la source idéale d'azote pour l'agriculture.

## **5- Facteurs influençant l'association rhizobia-légumineuses**

Parmi les facteurs qui peut trainer une influence sur la symbiose entre les rhizobiums et les légumineuses deux approches sont à signaler : facteurs biotiques et abiotiques.

### **5-1. Facteurs abiotiques**

Les facteurs abiotiques sont représentés par : la salinité, la température, le pH, le déficit hydrique et les métaux.

#### **5-1-1. Salinité**

La salinité constitue une contrainte majeure limitant considérablement la productivité végétale. Sur une superficie d'environ 40% de la surface terrestre, notamment en régions méditerranéennes. La tolérance des végétaux à cette contrainte est un phénomène complexe qui implique des particularités morphologiques et de multiples mécanismes d'adaptation pour la plante. Cependant, la compréhension des différences de mécanismes physiologiques est loin d'aboutir à une explication génétique. Il est nécessaire donc de découvrir les bases génétiques reliées aux différences phénotypiques liées à la tolérance au sel. La nocivité de la salinité non seulement sur la plante hôte, mais aussi sur la croissance et la survie des populations de *Rhizobium* du sol, sur le développement et le fonctionnement des nodosités et, donc, sur la capacité fixatrice d'azote de l'association symbiotique. La croissance des rhizobiums sous les conditions salines varie d'une espèce à l'autre et d'un type de sol à l'autre (El-Hilali, 2006). Alors que la survie et la croissance des légumineuses dans ces conditions sont liées à des processus adaptatifs qui impliquent le transport et la compartimentation des ions, la biosynthèse d'osmolytes organiques participant à l'ajustement osmotique et à des

remaniements protéiques nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire (Boulbada et al., 2009).

### 5-1-2. Température

Dans l'écosystème sol-plante, la température est un facteur environnemental très important, qui influe sur la croissance et la survie des rhizobiums dans le sol, son interaction avec les légumineuses et sa concurrence pour la nodosité.

La plupart des légumineuses cultivées en zones tempérées ont une température optimale de croissance allant de 15 à 25°C. Elles sont exposées à un large éventail de température au cours de leur cycle végétatif. Les températures extrêmes sont connues pour réduire l'activité de la nitrogénase dans les nodules des légumineuses (Margési et Schinner, 1999). La survie de ces dernières dans le sol est plus affectée par les températures élevées, en particulier en environnement humide, que par les basses températures.

La température optimale de croissance pour la plupart des rhizobiums est située entre 25 et 30°C, alors que 35°C est préférée par les souches *Sinorhizobium meliloti*. Toutefois, des souches de rhizobium du trèfle se développent bien à 10°C, (Margesi et Schinner, 1999). La nodulation du soja est considérablement réduite quand la température au niveau de la racine est de l'ordre de 15°C.

Les rhizobiums des régions tempérées tolèrent 4°C, une faible croissance peut survenir généralement. Toutefois, il a été rapporté que les rhizobiums *lathyrus sp* isolés de l'arctique canadien croissent très bien à 5°C (Spaink et al., 1998).

### 5-1-3. Acidité et alcalinité

L'une des principales limites au processus de fixation symbiotique de l'azote est l'acidité du sol. Environ un quart des terres agricoles dans le monde est acide. Les effets du pH acide sur la croissance et la survie des bactéries nodulantes des racines sont importants pour déterminer le succès de l'inoculation des légumineuses dans l'agriculture pratique (Angelini et al., 2003).

Pour les nodosités des légumineuses, les effets du pH comprennent la réduction de survie et la croissance des rhizobiums dans le sol ou sur les semences, aussi la réduction de l'attachement et de l'infection des poils racinaires, et la croissance des plantes. Quelques souches de rhizobia sont incapable de croître dans des milieux de cultures à pH 5 au moins, et seulement *Rhizobium tropici*, *R loti* et certains *Bradyrhizobiumsp* sont en mesure de tolérer un pH de 4,5 (Spaink et al, 1998, Liu, 2008.).

#### 5-1-4. Métaux

Plusieurs auteurs ont montré que les métaux affectent la croissance, la morphologie et l'activité des microorganismes ainsi que la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Il est bien connu que les métaux sont directement et/ou indirectement impliqués dans tous les aspects de la croissance microbienne, le métabolisme et la différenciation.

Certains métaux tels que le Zinc (Zn), le Nickel (Ni), le Cuivre(Cu) et le Chrome(Cr) sont essentiels pour les plantes, les animaux et les microorganismes, alors que d'autre comme le Cadmium (Cd), le Mercure (Hg), et le Plomb (Pb) n'ont aucune fonction biologique ou physiologique et sont considérés toxiques même à très faible concentration (Kulaze, 2007 ; Saikia, 2007 et Liu, 2008).

Les microorganismes au sein des espèces du même genre ou dans les souches de la même espèce peuvent avoir une sensibilité différente aux métaux. Gilberte et ses collaborateurs (1993) ainsi que Liu (2008) ont démontré que *Sinorhizobium meliloti* est moins sensible au cadmium que *Rhizobium leguminosarum* et *R. loti*. Il a été constaté que les bactéries font preuve de remarquables possibilités d'adaptation. Ainsi, les populations de *Sinorhizobium meliloti* isolées dans un terrain très contaminé à proximité d'une mine de zinc tolère des concentrations de Zinc, de Cuivre, de Nickel et de Cadmium 1000 fois supérieures aux concentrations effectivement présentes dans la solution du sol. La tolérance aux métaux lourds semble dans certains cas préexistée à la pression de sélection, *Alcaligenes eutrophus*, est capable de résister à des concentrations de plusieurs milli moles de divers métaux lourds (Davet, 1996).

#### 5-1-5. Déficit hydrique

La sécheresse ou la déshydratation est un facteur abiotique majeur qui conduit à la réduction de la production agricole, due au déficit de l'eau. Les légumineuses sont extrêmement sensibles à ce déficit, un certain nombre de légumineuses tempérées ou tropicales telles que *Medicago sativa*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Vigna sp.*, et autres légumineuses arbustives (*Adenocarpus decorticans*) montrent une réduction de la fixation de l'azote dans ces conditions de stress (Kirda et al., 1989 ; Parajasingham et Knievel, 1990). La sécheresse exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixée car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette dernière que celui du métabolisme général de la racine et de la tige (Ganry et Dommergues, 1998).

Le principal résultat de la sécheresse est le déséquilibre métabolique et osmotique de la plante suivit de l'expression de la croissance cellulaire et d'une photosynthèse inadéquate

due au dioxyde du carbone limité rapidement grâce à la fermeture des stomates (Sazzad, 2007).

### **5-2. Facteurs biotiques**

Les facteurs abiotiques ne sont pas la seule contrainte qui inhibe la fixation symbiotique de l'azote. Des facteurs liés à la population bactérienne peuvent être aussi la cause de cette inhibition. Les raisons principales de l'absence ou la formation de nodules inefficaces peuvent être dus à :

- La faible charge des rhizobia dans le sol.
- La présence de rhizobia indigènes qui forme des nodules non fixateurs d'azote.
- L'infection par d'autres espèces telle que *Agrobacterium sp.* chez l'*Acacia* (Räsäne, 2002).

## 1. Matériel biologique

L'espèce végétale légumineuse utilisée dans ce travail est *Retama monosperma* (figure 4) qui provient de la région d'Oran dans l'ouest Algérien. Les racines sont soigneusement déterrées du sol, afin de garder intact leur système racinaire et les nodules qui y sont associés.

Dans cette étude Un échantillon du sol est prélevé des dunes du littoral de la même région.



**Figure 4 :** Plante de *R.monosperma*

Nous avons collecté des gousses de *R.monosperma* dans le même site de prélèvement des nodules, Les graines choisies à la même classe pondérale (0,9, 0,1 et 0,11g). (figure 5 et annexe 7)

Dans ce travail, une seule souche de référence a été utilisée, il s'agit de *Bradyrhizobium* SP(RST<sub>88</sub>), appartenant au laboratoire d'écologie microbienne de l'Université Abderrahmane MIRA de Bejaia. Cette souche est intégrée dans tous les tests de caractérisation phénotypiques en parallèle avec les souches de rhizobia isolées de *Retama monosperma*.



**Figure 5 :** Graines de *R.monosperma*

## 2. Méthodes

### 2.1. Analyses pédologiques

Le sol prélevé au niveau du site des récoltes (littoral d'Oran), a subis plusieurs analyses pédologiques à savoir : l'acidité, la texture, le calcaire total, le calcaire actif, le carbone organique et le dosage de l'azote.

#### 2.1.1. Préparation du sol

L'échantillon du sol a été séché à l'air libre pendant plus d'une semaine. Un tamisage à l'aide d'un tamis de porosité de 2mm a été réalisé. Seule la terre fine est retenue pour les analyses postérieures.

#### 2.1.2. Acidité du sol

L'acidité du sol est déterminée par la méthode électro métrique. Deux mesures de pH sont réalisées ( $\text{pH}_{\text{eau}}$  et  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ ) à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné, sur une suspension aqueuse de terre fine dont le rapport sol/eau =  $\frac{1}{2.5}$ .

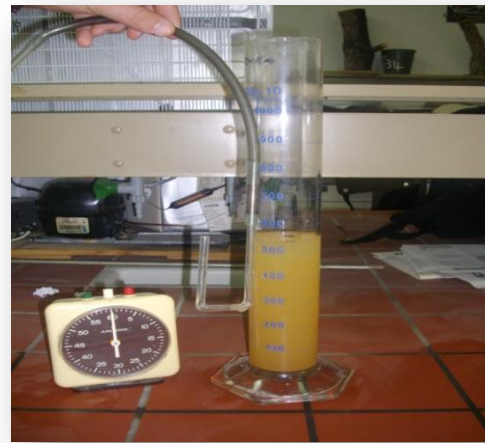
### 2.1.3. Texture

La texture ou analyse granulométrique du sol a comme but de donner la composition élémentaire de ce dernier et de déterminer ses propriétés pédologiques. Cette analyse est réalisée par la méthode internationale de sédimentation (voir annexe 6).

Après destruction de la matière organique à l'eau oxygénée à chaud et dispersion des agrégats au pyrophosphate de sodium, les prélèvements des fractions granulométriques fines (argiles et limons fins) sont effectués à l'aide de la pipette de Robinson et les fractions grossières (limons grossiers, sables fins et sables grossiers) sont récupérées après siphonages et lavages successifs. Le séchage de ces fractions se fait à 105°C et les fractions sableuses sont séparées par tamisage. Les classes texturales des sols sont déterminées suivant le triangle de texture USDA.



**Figure 6 :** Bain de sable



**Figure 7 :** siphon/allonge



**Figure 8 :** Tamiseur automatique

#### 2.1.4. Dosage du calcaire total

Le dosage du calcaire total de notre sol ( $\text{CaCO}_3$ ) est réalisé par la méthode volumétrique, en décomposant les carbonates de calcium par l'acide chlorhydrique (HCl dilué au 1/2), et en mesurant le volume de  $\text{CO}_2$  dégagé à l'aide du calcimètre de BERNARD.



**Figure 9** : Calcimètre de BERNARD.

#### 2.1.5. Dosage du calcaire actif

La détermination du calcaire actif concerne la fraction des carbonates de calcium qui sont précipitées par une solution d'oxalate d'ammonium.

L'oxalate d'ammonium résiduel est dosé par le permanganate de potassium en milieu sulfurique. Un échantillon de sol (10g) est additionné d'oxalate d'ammonium (250ml), sous agitation pendant 1heure puis filtrer. 10ml de filtrat sont ajoutés à 5ml d'acide sulfurique (9N), et chauffés à 60-70°C. La solution est alors titré avec le permanganate de potassium jusqu'à obtention d'une coloration rose persistante.

#### 2.1.5. Dosage du carbone organique

La teneur en carbone organique du sol est déterminée par la méthode ANNE modifiée. Après oxydation à chaud du carbone de la matière organique en  $\text{CO}_2$  par un mélange de bichromate de potassium  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (8%) et d'acide sulfurique concentré. Le bichromate en



excès est titré à froid par une solution réductrice de sels ferreux (Sel de MOHR à 0.2N). Le taux de la matière organique des sols est déduit en multipliant le pourcentage du carbone organique par un facteur de 1,72.  $\%MO = \%C \times 1,72$ .

#### **2.1.6. Dosage de l'azote total**

Le dosage de l'azote total du sol est effectué selon la méthode Kjeldahl, dans laquelle l'azote des composés organiques est transformé en azote ammoniacal sous l'action de l'acide sulfurique concentré à ébullition, et en présence d'un catalyseur renfermant du sélénium. Lorsque la matière organique est entièrement oxydée, la solution de sulfate d'ammonium obtenue est récupérée pour le dosage. L'ammoniaque est déplacée de la combinaison par la soude, distillé et récupéré dans une solution d'acide borique. Il est titré avec une solution d'acide sulfurique (0.02N).

#### **2.2. Isolement, identification et purification des rhizobia symbiotes de *R.monosperma***

La collecte des nodules est réalisée selon la technique de Vincent (1970) et de Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse du sol attaché aux racines sans toutefois endommager les nodules. Ces derniers sont lavés délicatement à l'eau courante puis essuyés à l'aide de papier absorbant. A l'aide d'un ciseau et d'une pince, les nodules sont coupés des racines et mis dans des tubes Eppendorf pour une stérilisation superficielle.

Les nodules sont immergés successivement dans les solutions suivantes : éthanol 95° pendant 30 secondes, solution s'hypochlorite de sodium (3%) pendant 3 à 5 minutes, puis un rinçage abondant (10 bains avec agitation) avec l'eau distillée stérile.

Enfin, dans des conditions stériles les nodules sont écrasés aseptiquement à l'aide d'une tige métallique. A partir des broyats obtenus, plusieurs boites de Pétri contenant le milieu Yeast-Mannitol- Agar (YMA, voir annexe1) sont ensemencées et incubées à 28°C pendant 48 heures.

Les colonies montrant un aspect bombé, translucides ou laiteuses bien isolées sont repiquées sur milieu YMA en gélose inclinée et conservées à 4°C.

Les Eppendorfs contenant les broyats nodulaires sont également conservés à -18° par addition de 100ul de glycérol à 12%.

### 2.3. Authentification des souches bactériennes purifiées :

La seule indication fiable pour la reconnaissance de l'appartenance de nos isolats bactériens à *Rhizobia*, est leur capacité à induire la formation de nodules chez leur plante hôte.

#### 2.3.1. Mise en germination des graines

Les graines isolées des gousses sont d'abord traitées avec l'acide sulfurique pendant 3heures afin de ramollir les téguments et accélérer la germination. Puis un rinçage abondant à l'eau distillée stérile, et on les laisse dans un flacon d'eau distillée pendant 24h.

Les graines ainsi stériles sont mises à germer dans un cristalliseur contenant de la vermiculite stérile (figure10), recouverte par le papier aluminium puis incubé à 20°C pendant une semaine d'environ.



**Figure 10 :** Transfert des graines dans la vermiculite

#### 2.3.2. Préparation des cultures bactériennes

Des precultures sont réalisées par inoculation solide liquide sur milieu Yeast-Mannitol-Broth (annexe1) en conditions stériles et incubation pendant 24heures à 28°C.

Ces precultures servent à inoculer des cultures de milieu YMB, incubation à 28°C pendant 24heures.

### 2.3.3. Obtention des plantules axéniques

Après environ 48 heures d'incubation, les graines germées, non contaminées, sont transférées dans des flacons contenant 200 ml du milieu Jensen (voir annexe 1) à raison d'une plantule par flacon. Bien couvrir les flacons pour assurer l'obscurité nécessaire au système racinaire et les déposer à la lumière, nécessaire pour que la plantule pousse normalement.

### 2.3.4. Inoculation des plantules

Afin de voir l'aptitude de nos souches à noduler *R.monosperma*, chaque plantule est inoculée avec 1 ml d'une suspension bactérienne contenant environ  $10^9$  cellules. Chaque souche a été testée avec 3 répétitions.

## 3. Caractérisation phénotypique des souches purifiées

les souches étudiées ont subi une caractérisation phénotypique à savoir : caractérisation morphologique, caractérisation physiologique ainsi que la caractérisation biochimique

### 3-1. Caractères culturels et cellulaires

Dans le but de déterminer les caractères culturels de nos souches, ces dernières ont été ensemencées sur des boîtes de pétri contenant le milieu YMA et les colonies obtenues après 24 heures d'incubation à 28°C ont été étudiées selon la forme, l'aspect, la couleur, l'opacité, l'élévation, la taille et la présence d'exopolysaccharides (EPS).

Les souches isolées ont été examinées à l'état frais à partir d'une culture de 24 heures. Les observations suivantes sont à noter : le Gram, la mobilité, la forme, la taille, les extrémités, et la présence des poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB). Ce dernier critère est mis en évidence par l'aspect réfringent des cellules.

### 3-2. Caractérisation physiologique

Les souches isolées ont subi une série de tests physiologiques impliquant plusieurs paramètres afin d'évaluer leur aptitude de croissance dans des conditions de température, de pH et de salinités.

Pour tous les tests, les milieux YMB sont inoculés par  $10^7$  cellules (rhizobia) dénombrées avec la cellule de Malassez. L'évaluation de la croissance est estimée par densité optique à une longueur d'onde  $\lambda = 630$  nm.

### **3-2-1. Effet du pH**

L'effet de différents pH sur la croissance des souches isolées a été étudié sur milieu YMB, ajusté à des pH allant de 4 à 11 par des solutions de HCl (0,1 N) et de NaOH (0,1 N). Les tubes contenant 5 ml de milieu sontensemencés par une suspension bactérienne contenant  $10^7$  cellule dénombrées avec la cellule malassez, ces cultures ont été incubés à 28°C pendant 48 heures. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda=630$  nm par rapport à un témoin non inoculé.

### **3-2-2. Effet de la température sur la croissance des souches**

La croissance des isolats à différentes températures a également fait l'objet d'une étude sur milieu YMB à raison de 3 répétitions par souche. Les cultures sont incubées à différentes températures : 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C et 36°C. Après 48h d'incubation, la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda=630$  nm.

### **3-2-3. Tolérance à la salinité**

La tolérance des souches à la salinité a été testé dans sur milieu YMB additionné de concentrations croissantes en NaCl : 100, 200, 300, 400, 500, 600,700 ,800 mM. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 48 heures. La croissance bactérienne est toujours évaluée par densité optique à une longueur d'onde  $\lambda=630$  nm par rapport à un témoin nonensemencé.

## **3-3. Caractérisation nutritionnels**

Dans cette partie, deux tests ont été réalisés dont le premier est de voir l'utilisation des différents sucres comme seule source de carbone, le deuxième est de voir l'assimilation des acides aminés comme source d'azote par les souches. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda=630$  nm.

### **3-3-1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone**

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu YMB modifié (voir annexe 1), où l'extrait de levure est remplacé par  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1%) et le mannitol est substitué par l'un des sucres suivant : Sorbose 20% , Mannose 20% , Maltose 20% , Rhamnose20%, Inositol 6% , puis, répartir dans des tubes à essai contenant 5ml du milieu YMB et ensemencer par 100  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne et incuber pendant 48heures dans une étuve à 28 °C, La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda=630$  nm.

### **3-3-1. Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote**

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu YMB modifié, où l'extrait de levure est remplacé par un volume de 500 µl d'acides aminés suivants : Alanine, Histidine, Méthionine, Arginine, Glycine et répartir ensuite, dans des tubes à essai à raison de 5ml de milieu YMB et ensemercer par 100 µl de la suspension bactérienne puis, incuber pendant 48heurs dans une étuve a 28 °C.

### **3-4. Caractéristiques biochimiques**

#### **3-4-1. Recherche des décarboxylases : LDC, ODC**

La recherche des décarboxylases est réalisée en milieu Möller,(voir annexe 1), (LDC, ODC) refermant un seul acide aminé. Ces milieux sont répartis à raison de 1 ml/tube à hémolyse stérile, puis ensemenés par une suspension bactérienne âgée de 48 heures. Les tubes ainsi inoculés sont recouverts d'une couche d'huile de vaseline stérile et incubés à 28°C pendant 48 heures. Le résultat positif se traduit par le virage du milieu au violet.

#### **3-4-2. Utilisation du citrate**

La mise en évidence de l'utilisation du citrate est menée sur milieu citrate de Simmons incliné (voir annexe 1). La pente du milieu est ensemenée par stries longitudinales à partir d'une culture de 48 heures prélevée sur milieu Y.M.B. Après incubation à 28°C pendant 48 heures, l'utilisation du citrate se manifeste par l'alcalinisation du milieu (coloration bleue du milieu).

#### **3-4-3. Recherche de l'acétoïne : Réaction de Voges-Proskauer (VP)**

L'acétoïne est recherchée sur milieu Clark et Lubs (CL), (voir annexe 1), ensemené avec une culture bactérienne prélevée sur milieu Y.M.B et incubé à 28°C pendant 48 heures

03 gouttes du réactif VP1 et du réactif VP2 sont rajoutés. Après 10 minutes on note le resultat :

- VP + : coloration rouge cerise.
- VP - : coloration jaune citrin ou rose pâle.

#### **3-4-4. Production d'acide : Réaction au rouge de méthyle**

La production d'acide est mise en évidence sur milieu Clark Lubs (CL), ensemené

avec une culture bactérienne prélevée sur milieu Y.M.B, incubé à 28°C pendant 48 heures, puis quelques gouttes de la solution rouge de méthyle sont rajoutées :

- RM + : teinte rouge (pH < 4,2) ;
- RM - : teinte jaune (pH > 6,3).

### **3-4-5. Production d'indole**

La mise en évidence de la production d'indole est réalisée dans le milieu eau peptonée exempte d'indole (voir annexe 1). Ce dernier estensemencé avec une culture bactérienne prélevée sur milieu Y.M.B. Après incubation à 28°C pendant 48 heures, 5 gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu. La formation d'un anneau rouge en surface se traduit par la production d'indole à partir du tryptophane.

### **3-4-6. Réduction des nitrates**

Pour déterminer si les souches bactériennes isolées produisent une nitrate réductase des cultures sont menées sur bouillon nitraté contenant des ions nitrate mais dépourvu de nitrite. Après incubation suffisante (48 h), on ajoute quelques gouttes de réactif de Griess.

La réduction des nitrates en nitrites se traduit par l'apparition d'une coloration rouge. Si aucune couleur n'est apparue, ceci est synonyme d'absence de nitrite dans le milieu, mais cela est peut être due à deux raisons :

- La bactérie n'a pas de nitrate réductase ;
- Elle a, en plus, une nitrite réductase qui a transformé les nitrites en azote dès leur apparition.

Pour distinguer ces deux cas, il suffit juste d'ajouter quelques parcelles de poudre de zinc. Cette poudre, très réductrice, réduit en quelques minutes les nitrates (s'il en reste dans le bouillon) en nitrites et la coloration rouge apparaît. La bactérie était donc « nitrate - ». Si aucune coloration n'apparaît, c'est qu'il ne reste plus de nitrates dans le bouillon, donc, la bactérie est nitrate + (et réductrice de nitrites en azote moléculaire).

### **3-4-7. Activité catalasique**

La catalase est recherchée sur des prélèvements de colonies âgées de 48 heures, mises en contact avec de l'eau oxygénée à 10% (v/v). Une effervescence ou un dégagement gazeux

abondant sous forme de mousse ou de bulles, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase.

#### **4- Analyse numérique**

Pour l'interprétation de nos résultats, nous avons soumis l'ensemble des caractères phénotypiques étudiés à une analyse numérique basée sur la Classification Ascendante Hiérarchique (C.A.H.). Les données ont été converties en une matrice numérique ensuite introduite dans un logiciel XL STATpro.

Les tests positifs sont codés "1" et les tests négatif sont codé "0". Cette analyse numérique est faite par un logiciel XLSTATpro version 7, 5.2.

## 1- Caractéristique physico-chimique du sol

Les résultats de l'analyse physico-chimique du sol prélevé à l'endroit où nous avons récolté les nodules de *Retama monosperma* sont présentés dans le tableau II. Ces résultats montrent que ce site de récolte situé à Oran apparaît neutre à légèrement alcalin avec un  $pH_{eau}=7.4$  de même pour  $pH_{kcl}=7.4$ , il est faible en calcaire (10.7), présente une texture sableuse avec une totalité de 93.89 %. Ce sol est pauvre en matière organique (0.14%) et complètement dépourvu de l'azote. D'après le référentiel Pédologique (Baize et Girard, 1995), le sol faible en calcaire et texture sableuse a un pouvoir de rétention de l'eau très faible. Ces résultats sont identiques à ceux trouvés par Soltner (1988) qui a étudié les sols méditerranéens lors de ses études sur les bases de la production végétale.

**Tableau II** : résultats de l'analyse du sol. %A : argile ; %Lf : limons fins ; %LG : limons grossier ; %SG : sable grossier ; %Sf : sable fin ; %C : carbone ; %MO : matière organique ; %N : azote ; %CaCO3 : carbonates de calcium.

Paramètres	Pourcentages (résultats)
%A	5.96
%Lf	0
%LG	0.14
%Sf	23.15
%SG	70.74
Texture	Sableuse
%C	0.24
%MO	0.41
%N	0
%CaCO3	10.7
$pH_{eau}$	7.4
$pH_{KCl}$	7.4



## 2- Isolement et authentification des isolats

Tous les nodules racinaires de *Retama monosperma* récoltés sont en forme de grappe et multilobé avec un aspect rugueux (Figure 11). A partir de 20 nodules, nous avons isolé et purifié 16 souches. Afin de vérifier l'appartenance de ces souches aux rhizobia, un test de nodulation a été effectué sur la plante-hôte *Retama monosperma*. Le test est en cours



Figure 11 : nodule de *R.monosperma*

## 3- Caractérisation phénotypique des souches

### 3-1. Caractérisation cellulaire

Sous microscope, l'observation à l'état frais, d'une suspension bactérienne, montre que la plupart des souches ont une forme bâtonnet à extrémité arrondie, mobile, Gram négatif et de taille variable. Ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly B-hydroxybutyrates (Pedrosa, 1988). Ces caractéristiques sont semblables à celle de la souche de référence RST88 étudié par Boulila et *al.*, (2009).

### 3-2. Caractérisation culturale

Les souches cultivées sur YMA à 28°C, présentent des colonies au bout de 48 heures, ceci suggère que ces souches sont à croissance rapide (Jordan, 1982, 1984).

Ces colonies ont une forme circulaire, à contour régulier. Leur diamètre varie entre 0,5 à

1mm. Elles sont bombées, lisse, opaques, de couleur blanche laiteuse ou beige. Ces caractéristiques semblent différentes de RST<sub>88</sub>. En effet, cette souche est à croissance lente, les colonies sont de petites tailles (0.5mm) (Boulila *et al* ; 2009).

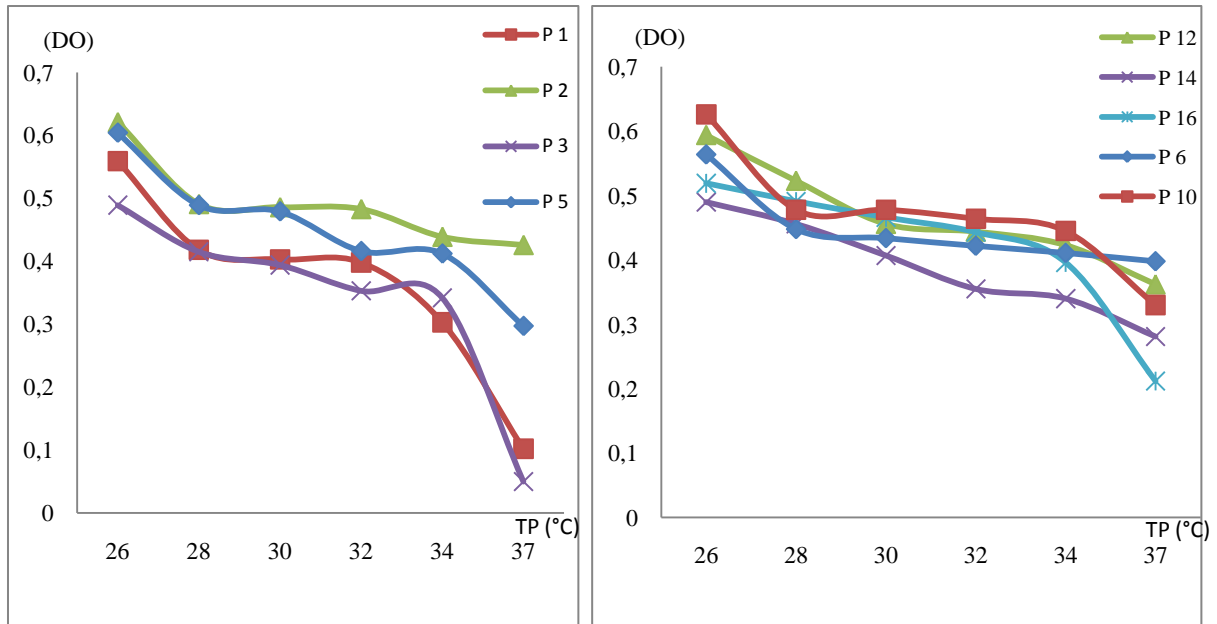
### 3-3. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la température, du pH et de la salinité sur la croissance des isolats de *R. monosperma*

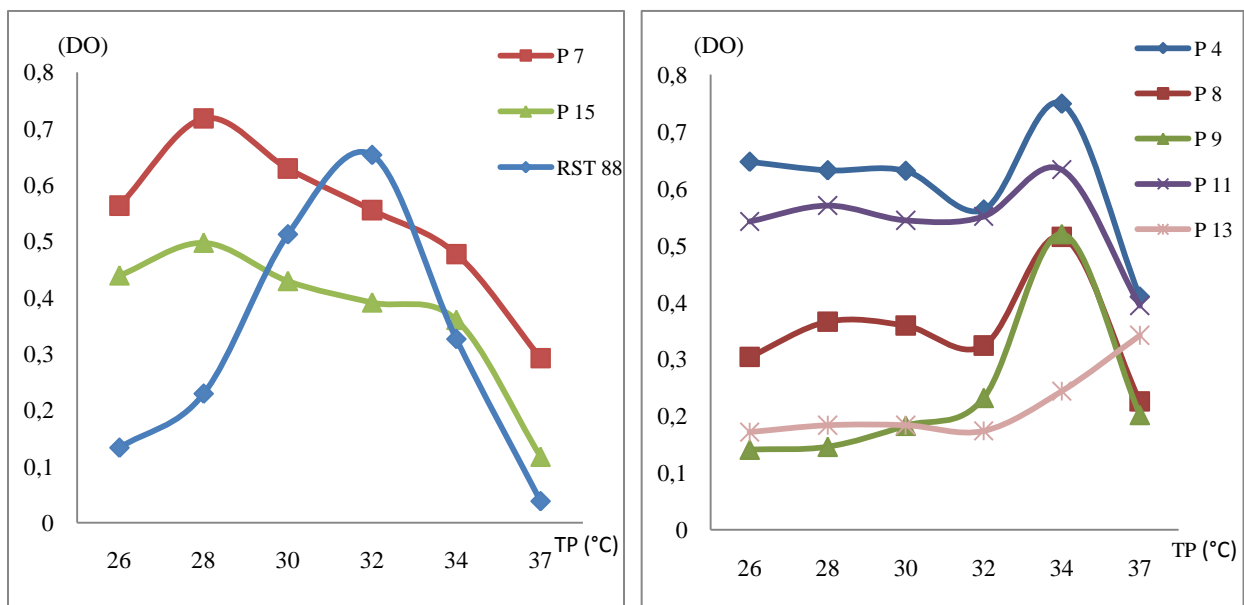
#### 3-2-1. Effet de la température sur la croissance des souches

Les résultats obtenus (Figures : 12 et 13) montrent une variabilité du comportement des isolats de *Retama monosperma* vis-à-vis de la température. En effet, dans la gamme de température étudiée, les souches P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>12</sub>, P<sub>14</sub> et P<sub>16</sub> présentent une très bonne croissance à 26°C suivie d'un déclin. Cependant, les souches P<sub>2</sub> et P<sub>6</sub> tolèrent les températures allant jusqu'à 37°C. Les souches P<sub>7</sub>, P<sub>15</sub> présentent un optimum de croissance à 28°C. Alors que P<sub>4</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>9</sub> et P<sub>11</sub> présentent un optimum de croissance à 34°C suivies d'une phase de déclin immédiate à 36°C. Cependant la souche qui mérite un intérêt particulier est la P<sub>13</sub>. En effet, sa croissance augmente progressivement pour atteindre son maximum à 37°C. Il serait intéressant d'étudier sa croissance au delà de cette température. Concernant la souche de référence RST<sub>88</sub>, l'optimum de sa croissance est situé 32°C.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Graham (1992). En effet, cet auteur a rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches tend vers 28°C.



**Figure 12 :** Effet de la température sur la croissance des souches (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>12</sub>, P<sub>14</sub> et P<sub>16</sub>).



**Figure 13 :** Effet de la température sur la croissance des souches (P<sub>4</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>9</sub>, P<sub>11</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>15</sub>, P<sub>13</sub> et RST<sub>88</sub>).

### 3-2-2. Effet du pH

Les résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches sont présentés dans les figures 14, 15 et 16. Ces résultats montrent que toutes les souches présentent une très bonne

croissance entre le pH 6 et 10 à l'exception de P<sub>9</sub> et P<sub>10</sub>. En effet, la première ne présente une bonne croissance qu'à pH 8 et la deuxième préfère un pH acide 4 qui continue de pousser dans les pH plus élevés. Pour la souche RST<sub>88</sub>, l'optimum de croissance se situe à pH 7. Cette souche semble très sensible aux pH acide qu'alcalin.

Raza *et al.* (2001) ont rapporté que les rhizobia de deux espèces *L. luteus* et *L. angustifolius* tolèrent des pH allant du 4 à 10. Alors que Kishinevsky *et al.* (2002), ont montré qu'aucune des souches de rhizobia isolées à partir d'*Hedysarum spinosissimum* n'est capable de croître à un pH 4 et que leur optimum de croissance est situé entre pH 7 et pH 8.

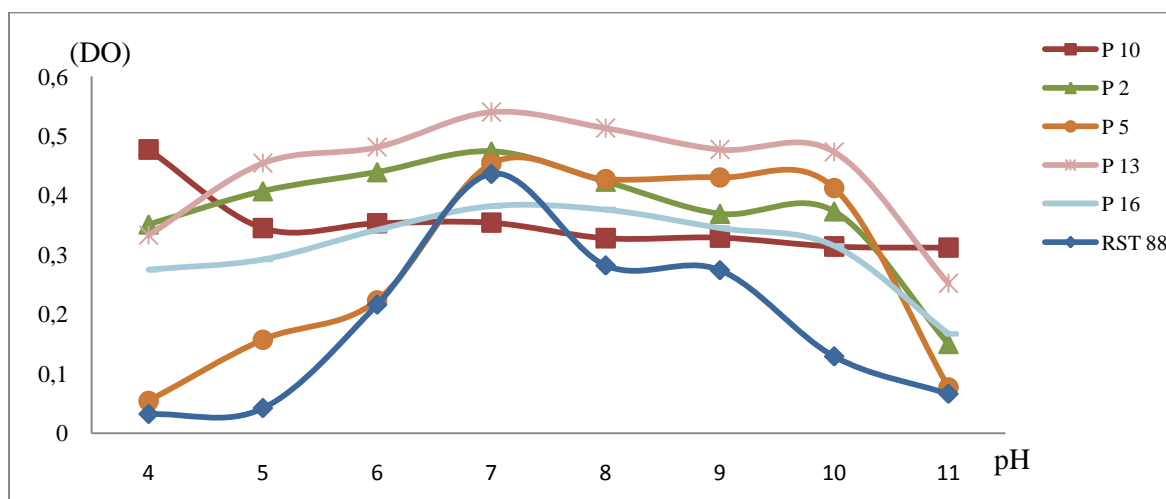


Figure 14 : Effet du pH sur la croissance des souches (P<sub>10</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>13</sub> et P<sub>16</sub> et RST<sub>88</sub>).

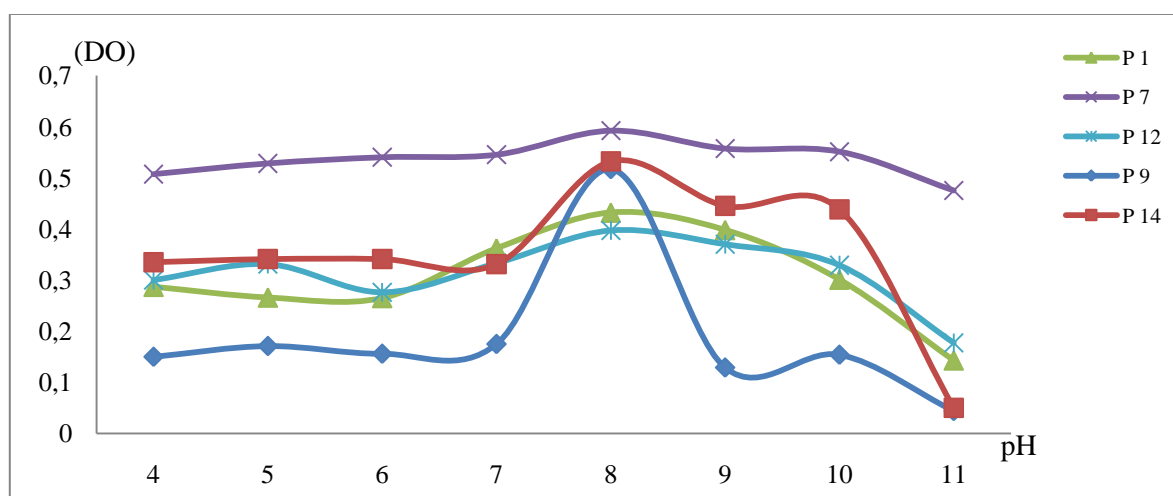
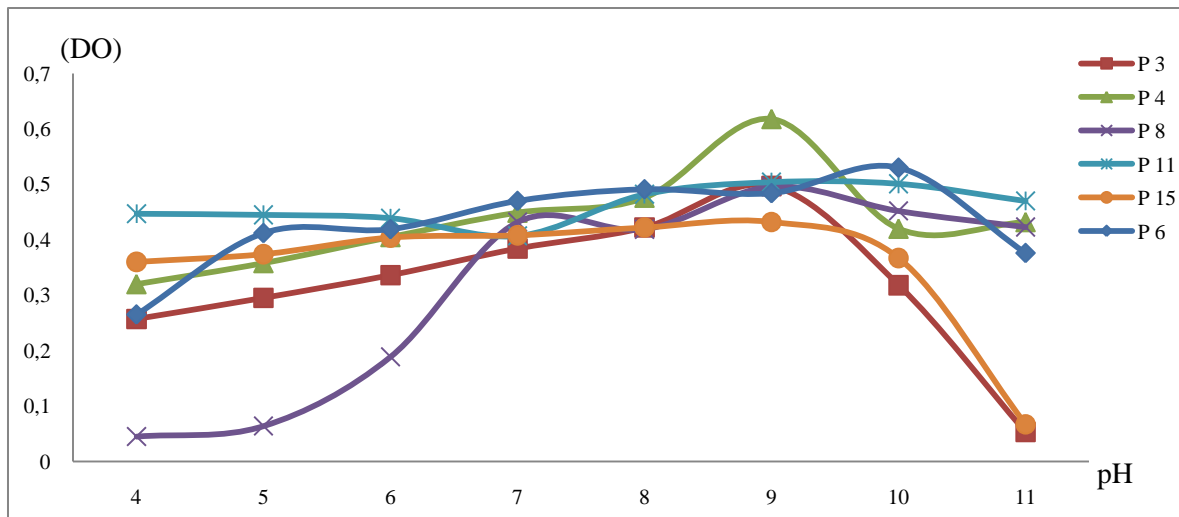


Figure 15 : Effet du pH sur la croissance des souches (P<sub>1</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>12</sub>, P<sub>9</sub> et P<sub>14</sub>).



**Figure 16:** Effet du pH sur la croissance des souches (P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>11</sub>, P<sub>15</sub> et P<sub>6</sub>).

### 3-2-3. Effet du NaCl sur la croissance des souches

Les résultats obtenus (figures 17 et 18) montrent que les souches présentent une variabilité de tolérance vis-à-vis du NaCl.

La courbe de croissance des souches P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>11</sub>, P<sub>13</sub>, P<sub>14</sub>, et P<sub>15</sub> présentent presque la même allure. En effet, à partir de la concentration 100 mM, ces souches présentent une diminution de la croissance tout en restant tolérantes.

Les souches P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>12</sub>, et P<sub>16</sub> montrent une croissance optimale à 200 mM. Alors que, la P<sub>9</sub> et RST<sub>88</sub> semble sensible à toutes les concentrations étudiées.

La tolérance de la plupart des souches à la salinité pourrait être liée à leur origine géographique. En effet ces souches proviennent des sols salins des dunes littorales d'Oran. Il a été rapporté que des souches à croissance rapide sont moins tolérantes au sel que des souches de rhizobia à croissance lente, du soja et d'arachide (Ghittoni et Bueno, 1996).

Miller et Wood (1996) ont rapporté que le rhizobium est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées. Cette tolérance est en rapport avec des mécanismes d'adaptation qui permettent de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs (Csonka et Hanson 1991). Certains auteurs ont rapporté aussi que les rhizobia sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Zahran 1999, Swaraj et Bishnoi 1999).

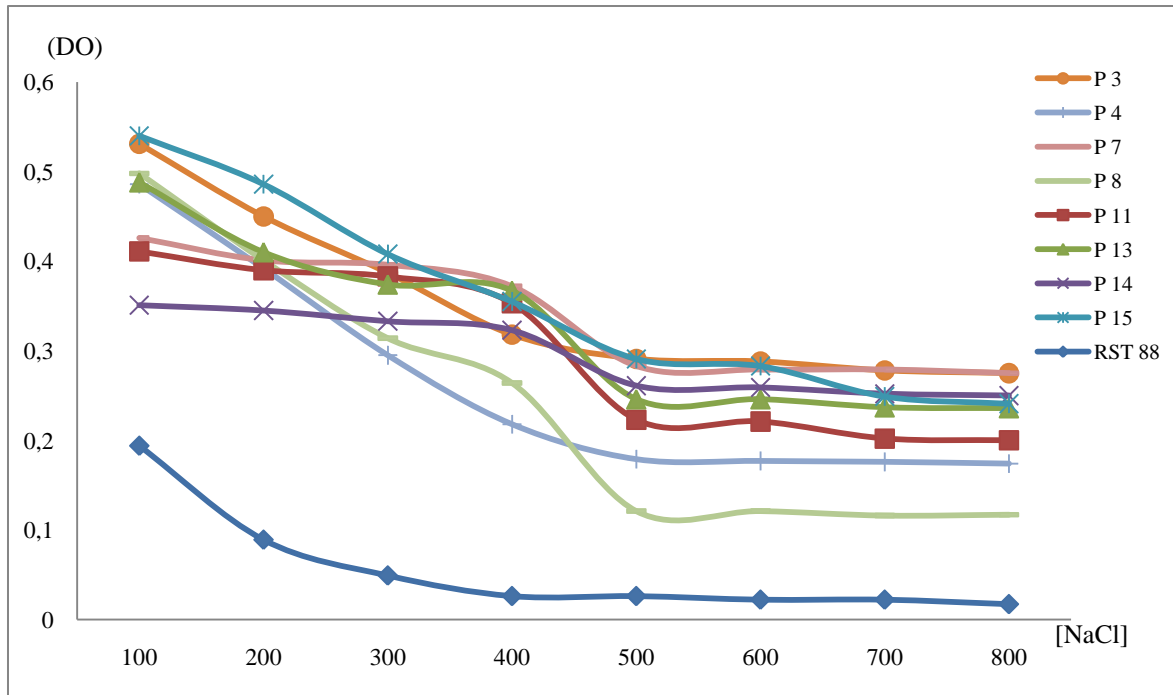


Figure 17 : Effet de la salinité sur la croissance des souches (P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>11</sub>, P<sub>13</sub>, P<sub>14</sub>, P<sub>15</sub> et RST<sub>88</sub>).

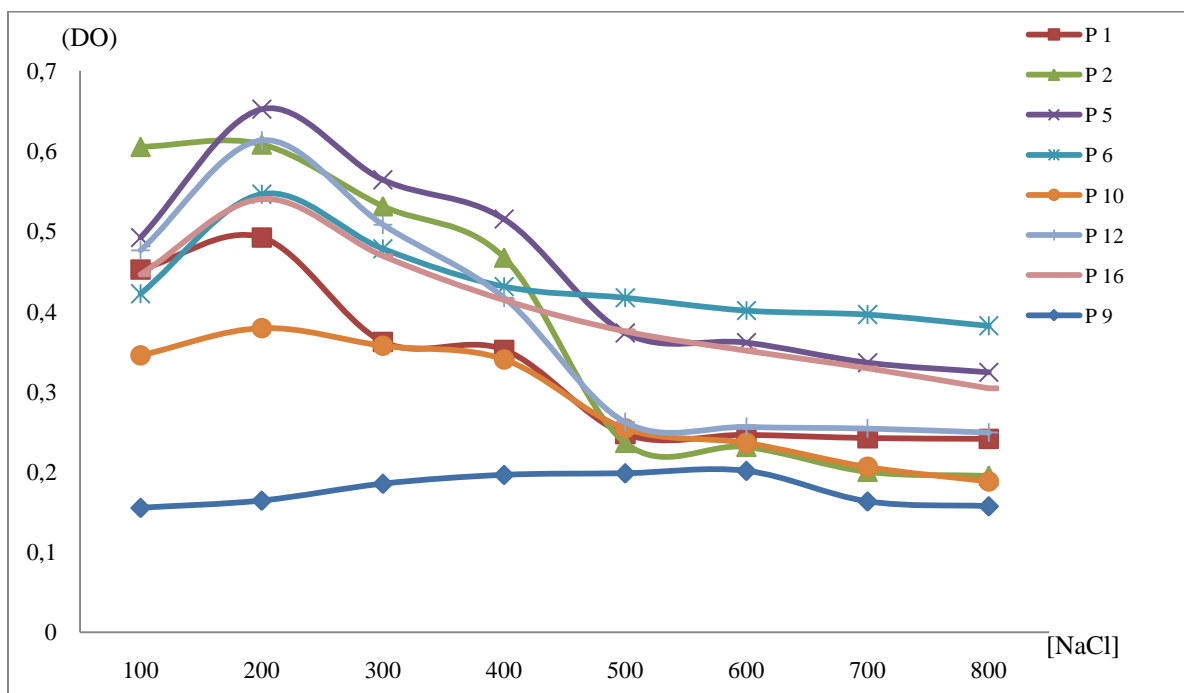


Figure 18 : Effet de la salinité sur la croissance des souches (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>12</sub>, P<sub>16</sub> et P<sub>9</sub>).

### 3-3. Caractérisation nutritionnelle

Nous nous sommes intéressés à l'assimilation de source de carbone et de source d'azote par les isolats de *R. monosperma*.

#### 3-3-1. Utilisation de sucre comme source de carbone

Les résultats présentés dans la figure 19, montrent les différents sucres assimilés comme source de carbone. Ces résultats indiquent clairement que les sucres testés sont faiblement assimilés par les isolats de *R. monosperma* ainsi que la souche de référence RST<sub>88</sub> à l'exception du mannose qui est fortement assimilé par deux souches P<sub>6</sub> et P<sub>2</sub>. Les souches P<sub>9</sub>, P<sub>12</sub> et P<sub>15</sub> n'assimilent presque aucun des sucres testés.

Certains travaux indiquent que les rhizobia peuvent utiliser différentes sources de carbone ce qui les caractérise (Cepeda Hernandez, 2005). D'autres montrent que les rhizobia à croissance rapide possèdent une préférence pour les hexoses, les pentoses et les disaccharides (El-Hilali, 2006). L'étude de l'assimilation de diverses sources de carbone par différentes souches appartenant au genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les mono- et les disaccharides. Cependant, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides et moins pour les disaccharides (Stowers, 1985).

#### 3-3-2. Utilisation d'acides aminés comme source d'azote

Les résultats obtenus (figure 20) montrent que tous les acides aminés sont assimilés, par les isolats de *R. monosperma* étudiés ainsi que la souche de référence RST<sub>88</sub>, à l'exception du Méthionine. Arginine et Alanine sont les plus assimilés par ces souches. Ce ci pourrait être dû à la structure simple d'alanine et à la double fonction amine d'arginine.

Lehtomaski (1988) a rapporté que la méthionine est un acide aminé très mal absorbé par les rhizobia.

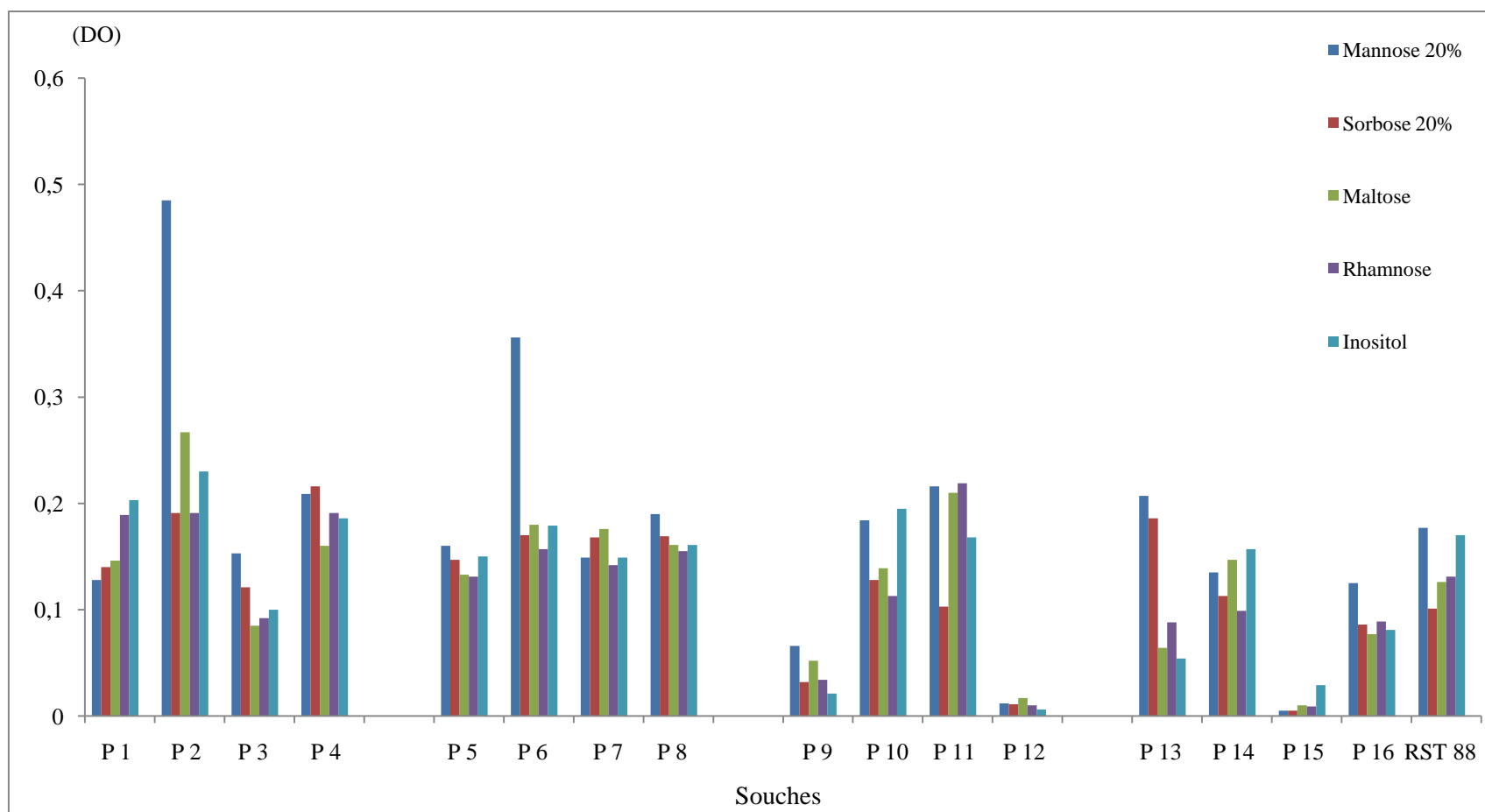
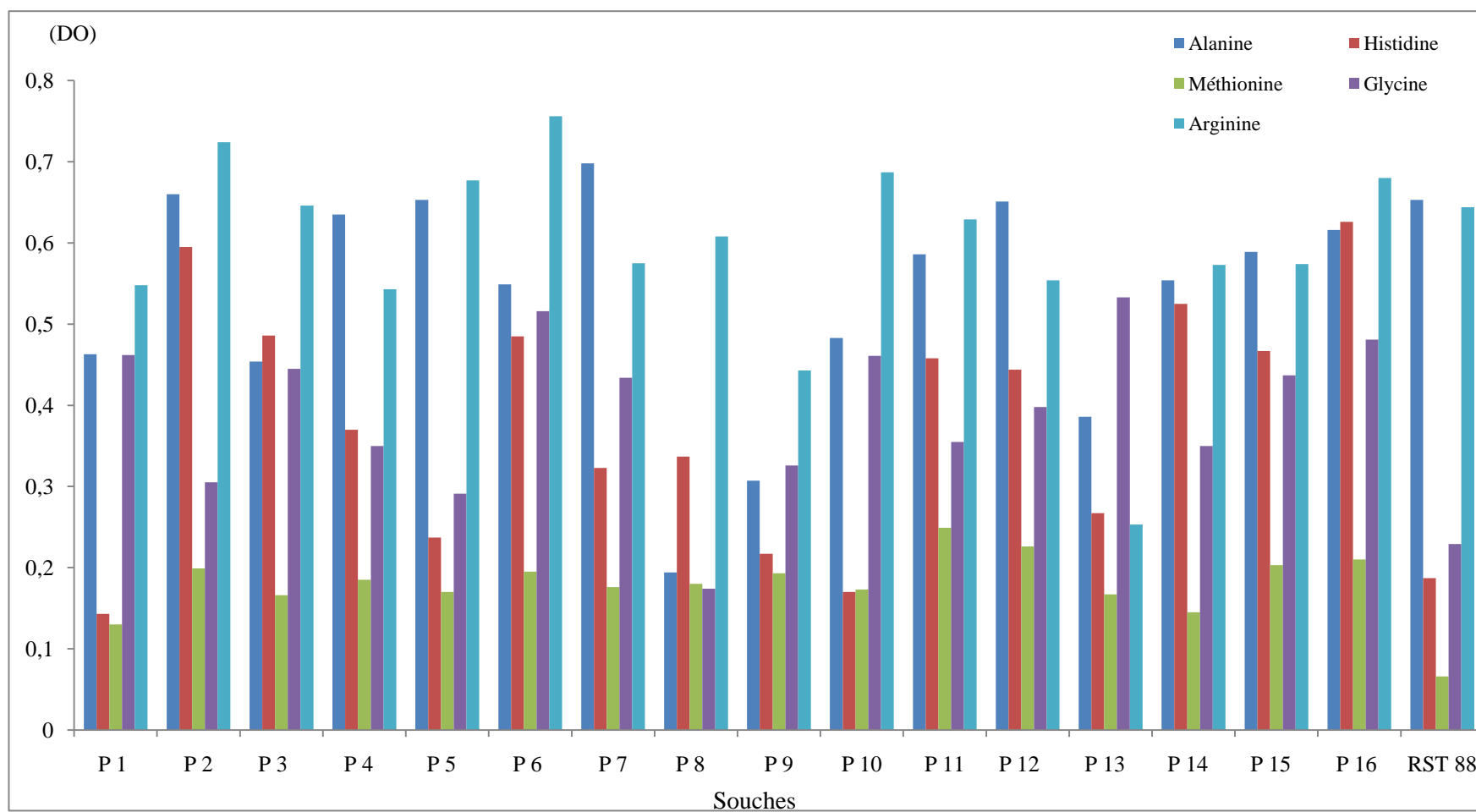


Figure 19 : Assimilation des sucres par les souches





**Figure 20 :** Assimilation des acides aminés par les souches

### 3-3-4. Caractérisation biochimique

8 tests biochimiques ont été réalisés sur des isolats de *R. monosperma*. Ces résultats montrent que toutes les souches possèdent la catalase et n'utilisent pas le citrate.

La plupart des souches sont dénitrifiantes possédant la nitrite et nitrate réductase (NR++) à l'exception de P5, P9 ainsi que RST88 qui ne présentent que la nitrate réductase (NR+). L'ODC (Ornithine décarboxylase) existe chez les souches :P1, P2, P4, P5, P6, P7, P12, P14, P15, et RST88. Alors que les souches P5, P12 et P16 possèdent plutôt la Lysine décarboxylase (LDC). A l'exception des souches P3 et P9, toutes les autres acidifient le milieu (RM+ et VP-).

**Tableau III:** Résultats de la caractérisation biochimique

Souche N°	NR	VP	RM	Témoin	LDC	ODC	Citrate	Catalase	Productio n d'indole
P <sub>1</sub>	++	-	+	-	+	+	-	+	-
P <sub>2</sub>	++	-	+	-	+	+	-	+	-
P <sub>3</sub>	++	+	-	-	+	-	-	+	-
P <sub>4</sub>	++	-	+	-	+	+	-	+	-
P <sub>5</sub>	+	-	+	-	-	+	-	+	-
P <sub>6</sub>	++	-	+	-	+	+	-	+	-
P <sub>7</sub>	++	-	+	-	+	+	-	+	-
P <sub>8</sub>	++	-	+	-	+	-	-	+	-
P <sub>9</sub>	+	+	-	-	+	-	-	+	-
P <sub>10</sub>	++	-	+	-	+	-	-	+	+
P <sub>11</sub>	++	-	+	-	+	-	-	+	-
P <sub>12</sub>	++	-	+	-	-	+	-	+	+
P <sub>13</sub>	+	-	+	-	+	-	-	+	-
P <sub>14</sub>	++	-	+	-	+	+	-	+	-
P <sub>15</sub>	++	-	+	-	+	+	-	+	+
P <sub>16</sub>	++	-	+	-	-	-	-	+	-
RST <sub>88</sub>	+	-	+	-	+	+	-	+	-

(-) teste négatif, (+) test positif,

NR (+) Nitrate réductase, NR (++) Nitrite réductase

#### 4. Analyse numérique

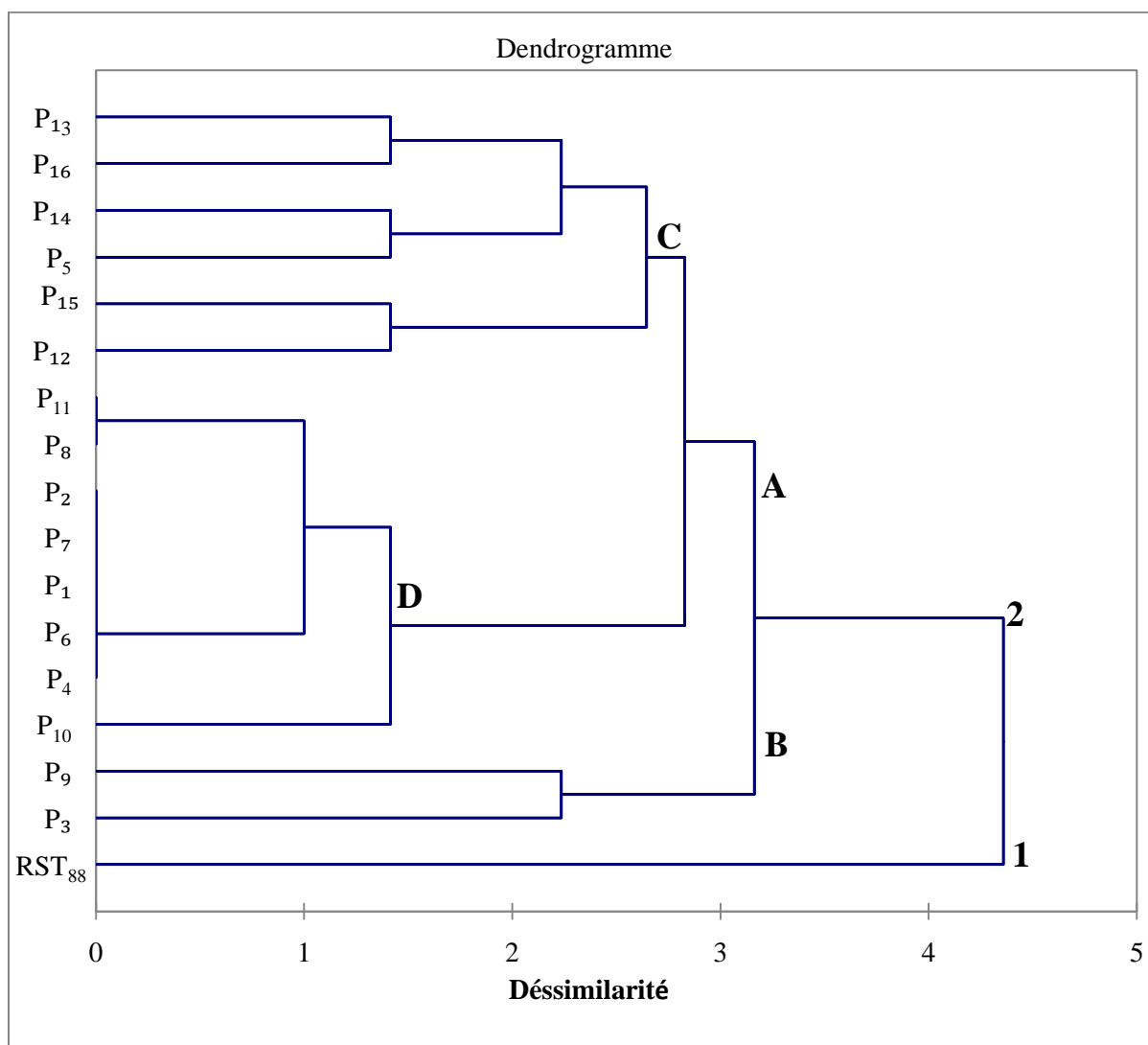
Les 49 tests phénotypiques concernant les 17 souches *R. monosperma* et de la souche référence RST88, ont été convertis en une matrice pour une analyse numérique. Le dendrogramme obtenu, représenté dans la figure 21, montre qu'à une distance d'agrégation de 4.5, les souches sont hétérogènes et présentent deux clusters différents. Le premier cluster (1) est constitué d'une seule souche RST<sub>88</sub>, isolée à partir de *R. sphaerocarpa* provenant de l'est de l'Algérie, qui est une *Bradyrhizobium* sp. (Boulila et al., 2009). Alors que le cluster 2, comporte l'ensemble des 16 souches isolées de *R. monosperma* à savoir : P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>9</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>11</sub>, P<sub>12</sub>, P<sub>13</sub>, P<sub>14</sub>, P<sub>15</sub>, et P<sub>16</sub> caractérisées par une croissance rapide.

Ce dernier cluster est subdivisé en deux sous-groupes (A et B), dont le premier comprend seulement deux souches : P<sub>3</sub> et P<sub>9</sub>. Tandis que le deuxième rassemble toutes les autres souches.

A une distance d'agrégation 1.4, les souches P<sub>5</sub>, P<sub>14</sub>, P<sub>12</sub>, P<sub>15</sub>, P<sub>16</sub> et P<sub>13</sub> sont très proches et ne présentent que quelques différences concernant spécialement la nitrate réductase où P<sub>5</sub>, P<sub>12</sub>, P<sub>13</sub> et P<sub>15</sub> possèdent des « NR++ », les autres souches ont des « NR+ ».

A la distance 1, les souches P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>6</sub> et P<sub>7</sub> ont presque les mêmes caractères que P<sub>8</sub> et P<sub>11</sub> à l'exception du test « ODC ». En effet, P<sub>8</sub> possède une ODC- contrairement aux restes des souches qui se caractérisent par une ODC+.

Quant à P<sub>3</sub> et, P<sub>9</sub>, elles se situent à part à une distance de 2.5 et se différencient par quelques caractères qui sont liés particulièrement à la température et à la salinité.



**Figure 21 :** Dendrogramme des caractères phénotypiques des rhizobia isolés du genre *R. monosperma*

### Conclusion et perspectives

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à une caractérisation phénotypique des rhizobia isolés des nodules racinaires de *R.monosperma* récoltés dans la région ouest d'Algérie et plus exactement au littoral d'Oran.

Les expériences que nous avons réalisées, nous ont permis de montrer que la plupart des isolats sont à croissance rapide et présentent un aspect morphologique identique à celui des rhizobiums.

Les résultats obtenus à partir des tests physiologiques et biochimiques montrent que la majorité des souches présentent une variabilité de comportement vis-à-vis de la température et une grande tolérance à l'effet du NaCl. En effet, elles supportent des concentrations allant de 100 à 800 mM, elles présentent une très bonne croissance entre le pH 6 et 10.

Concernant l'utilisation des sucres comme seule source de carbone, toutes les souches étudiées montrent une faible assimilation vis-à-vis des sucres utilisés, à l'exception du mannose qui est fortement assimilé par certaines de nos souches. Les souches étudiés utilisent tout les acides aminés, à l'exception de la méthionine qui n'est pas assimilé par la plupart des souches.

L'analyse numérique de l'ensemble des données phénotypiques par le logiciel XL STATpro a dévoilé l'existence de 02 clusters différents. L'un est composé par la souche de référence RST<sub>88</sub> isolé de *R. sphaerocarpa* et l'autre comporte toutes les souches isolé de *R. monosperma* et ceci témoigne de la diversité des rhizobia nodulant le genre *Retama*.

En perspective, il serait intéressant d'approfondir cette caractérisation phénotypique des bactéries associées au genre *R.monosperma* en élargissant la gamme des paramètres pris en considération. Ceci en vue de sélectionner des souches à caractères extrêmophiles qui pourraient être importante au projet de revégétation des sols dégradés et pauvres. Enfin, il apparaît indispensable de compléter cette étude par une caractérisation génotypique

## Références bibliographiques

- ❖ **Allal-benfakih I. (2006).** Recherche quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Orth.Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques .thèse de doctorat N°17-2006.UNIV de limoge. Laboratoire UMR INRA 1061, Institut National Agronomique d'El Harrach.p27.
- ❖ **Angelini, j., Castro, S.et Fabra, A. (2003).** Alterations in root colonization and nod C gene induction in the peanut –rhizobia interaction under acidic conditions . *Plant physiology and biochemistry.* 41,289-294.
- ❖ **Bahi K. (1991).** Contribution à l'étude de *Rétama monosperma* étude du système racinaire et recherche des associations de type *Rhizobium*.in In Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma*(boiss) : mémoire de magistère . UNIV.des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (U.S.T.O) Oran.
- ❖ **Baize D., et Girarad MC. (1995).** AFES, Référentiel Pédologique. INRA, Paris, p. 332.
- ❖ **Beniston. NT-WS ; (1985).** Fleurs d'Algérie. Entreprise nationale des arts graphiques. éd, Reghaia.Algérie , 112p
- ❖ **Blondeau R. (1980).** Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Vuibert 19-79
- ❖ **Boissier. (1939).** In **Bouredja N. (2005).** Etude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Retama monosperma* (boiss) : mémoire de magistère UNIV. des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.
- ❖ **Boulbada L., Bouaziz S., Mainassara ZA., Mokhtar H., et Mokhtar L. (2009).** Effets de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *rhizobium* sp.et du regime des pluies sur la production de la biomasse et la teneur en azote du pois chiche . *Biotechnology , agronomy ,Society and enveronment.*13.4,537-544
- ❖ **Boulila F., Depert G., Boulila A., Belhadi D., Benallaoua S. et Laguerre G. (2009).** *Retama* species growing in different ecological-climatic areas of northastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenic clade with in the *bradyrizobium* genus. *Systematic and Applies Microbiology.* 32, 245, 255.
- ❖ **Bowen GD. (1973).** Mineral nutrition of octomycorrhizae. *Ectomycorrhhyzae. Their Ecology and Physiology.* G.C. Marks and T.T. Kozlowski, ed., Academic Press, New Yorkand London, 151-197.

- ❖ **Brongniart AD., Decaisne J. (1843).** Annales des sciences naturelles. *In Mahnane W. (2010).* Appréciation de la diversité génétique du genre *Rétama* par les marqueurs biochimiques. Mémoire de Magistère en biotechnologie végétale, Université Mentouri de Constantine. **P. 64.**
- ❖ **Bouredja N. (2005).** étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma*(boiss) : mémoire de magistère . UNIV.des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (U.S.T.O) Oran.
- ❖ **Cepeda Hernandez ML. (2005).** Phenotypic characterization of rhizobia that nodulate ball clover. Thèse de Magister. Texas A and M University. 61p.conditions and in arid climate. *Microbiol. Molec. Rev.* **63(4)** : 968-989.
- ❖ **Chen WX., GH., Yan and JL Li. (1988).** Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:392-397.
- ❖ **Cheriti A., Talhi MF., Belboukhari N., Taleb S., et Roussel C. (2009).** Removal of copper from aqueous solution by *Rtama forsk.* growing in Algerian Sahara. *Desalination and water Treatment.* 10, 317-320.
- ❖ **Crow V., L., B., D., W., Jarvis and RM., Greenwood. (1981).** Deoxyribinucleic acid homologies among acid-producing RhizohiUln. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:152-172.
- ❖ **Csonka LN., et Hanson AD. (1991).** Prokaryotic osmo-régulation : genetics and physiology
- ❖ **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut internationale de recherche agronomique. Paris.**pp :1.**
- ❖ **Denarie j., (2009).** Les signaux des symbioses racinaires : de la biologie moléculaire à l'agronomie. académie des sciences. Institut de France .**pp :1.**
- ❖ **Domergue O. (2006).** Diversité des rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. Université de Montpellier. France. **p. 78**
- ❖ **Dominguez-Lerena et al. (2001).** Caravaca et al., 2003 ; Rodriguez- Echeverria et Perez / 38 p 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ.**39**: 51-75 .
- ❖ **Dommergues Y., Duhoux E., and Diem HG. (1999).** Les arbres fixateurs d'azote : caractérisation fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Éditions espaces 34 (CRAD, FAO ; IRD).
- ❖ **Doyle jj., Chapill jA., Bailey DC., and Kajita T. (2000).** towards a comprehensive phylogenie of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In

- advances in legume systematic ., (eds .P.S. Herendeen and A.Bruneau) Kew: Royal Botanic Gardens. **pp. 120.**
- ❖ **Dowling 1., Dénarié and WJ., Broughton. (1987).** Multiple hostspecificityloci of the broad host-range Rhizohium sp. NGR 234 selected usingthe widely compatible legume Vigna unguiculata. Plant Mol. Biol. 8:447-459.
  - ❖ **Dreyfus B., 1L., Garcia and M Gillis. (1988).** Characterization of *Azorhizobium caulino* dans gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Jnt. 1. Syst. Bacteriol. 38:89-98.
  - ❖ **El Hamrouni A. (2001).** Conservation des zones humides littorales et des écosystèmes côtiers du Cap-bon. Rapport de diagnostic des sites .partie relative à la flore et la végétation. République Tunisienne .Ministère de l'environnement et de l'aménagement du territoire .agence de protection et d'aménagement du littoral. **p6 .**
  - ❖ **El Shazly A., Ateyaa AM., Witte L. (1996).** Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama retam*, *R.sphaerocarpa* and *R.monosperma* ,*Zeitschrift für Naturforschung. C. A journal of biosciences* ISSN 0939-5075 CODEN ZNCBDA . 1996, vol. 51, no5-6, **pp. 301-308** [8 page(s) (article)]. Ed : Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen, ALLEMAGNE (1986) (Revue) INIST-CNRS.
  - ❖ **El-Hilali I. (2006).** La symbiose rhizobium-Lupin : biodiversité des microsymbiontes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V-AGDAL. **231p.**
  - ❖ **Epstein E. (1972).** Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Wiley, New York.
  - ❖ **Farchichi A. (1996).** La lutte contre l'ensablement et pour la stabilisation des dunes: Essai de la fixation biologique des dunes en Tunisie présaharienne. Recherches sur la désertification dans la Jeffara. Rev. Tunis. Geogr. **12:** 49–102.
  - ❖ **Ferry M. (1990 ).** Concurrence et complémentarité des espèces végétales dans les oasis. CIHEAM- option méditerranéenne. Institut national de la recherche agronomique ; France. 1,261-270.
  - ❖ **Foth HD. (1990).** Fundamentals of soil science. Henry, D. Foth (ed), John Wiley & sons, New York. 336p.
  - ❖ **Fungairino SG., Fernandez C., Serrano JM ., Lopez F., et Acosta FJ. (2005).** Developmental instability and plant potential fitness in a mediterranean perennial



- plant, *Retama sphaerocarpa* (L) Boiss. *Acta oecologica* 27 , 43- 48. *General Microbiology*, 24: 263-292.
- ❖ **Ghittoni NE., and Bueno MA. (1996).** Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity. *Symbiosis* **20**,117–127.
  - ❖ **Graham PH. (1992).** Review: Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation
  - ❖ **Graham PH. (1964).** Studies on the utilisation of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Ser. I.* 30:68-72.
  - ❖ **Hageman RH. (1984).** Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. In. Nitrogen in crop production. ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, 67-85.
  - ❖ **Guinard, JL. (2000).** Botanique. Systématique. Abrège. 12eme edit. Masson. 174-179.
  - ❖ **Haynes RJ. (1986).** Origin, distribution and cycling of nitrogen in terrestrial ecosystems. In: Mineral nitrogen in the plant-soil system. R. J. Haynes (Ed.) 1-15, Academic Press, Orlando.
  - ❖ **Hopkins WG. (2003).** Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. Edition de boeck. P 99-120.
  - ❖ **Hoben HJ., Aung NN., Somasegaran P., et Kang U. (1991).** Oils as adhesives for seed inoculation and their influence on the survival of *Rhizobium* spp. And *Bradyrhizobium* spp. on inoculated seeds, *World j. Microbiol. Biotech.* 7: 324-330.
  - ❖ **Ighil Hariz Z. (1990).** Etude du comportement physiologique, biochimique et structurale du *Retama retam* vis à vis du NaCl. Thèse de Magister, Université d’Oran Algérie, 120 p.
  - ❖ **Jordan DC. (1982).** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *International Journal of Systematic Bacteriology.* **32**: 136-139.
  - ❖ **Jordan DC. (1984).** Family III. *Rhizobiaceae*. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p.234-242.
  - ❖ **Journet EP., Carreau V., Gouzy J., Thoquet P., Rosenberg C., Barker D., Huguet T., Denarie J., and Gamas P. (2001).** La légumineuse modèle *Medicago truncatula*. Ecole Thématique Biologie Végétale. pp.1-9.

- ❖ **Kishinevsky BD., Nandasena KG., Yates RJ., Nemas C., and Howieson JG. (2002).** Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species: *H. spinosissimum*, *H. coronarium* and *H. flexuosum*. *Plant and Soil* . **251** : 143–153.
- ❖ **Krulaze G., V. (2007).** Environmental Microbiology Research trends. Nova science publishers.Inc.pp:239-245.
- ❖ **Lamaze T., S Khamis., C Foyer., J Farineau., MH., Valadier et JF., Morot-Gaudty. (1990).** Effet d'une limitation en N sur la photosynthèse chez le maïs. In : *Physiologie et production du maïs*. INRA, Paris, 113-121.
- ❖ **Lindström K., And S Lehtomäki. (1988).** Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50: 277-287.
- ❖ **Lindstrom K., P van Berkul11., M Gillis., E Martinez., N Novikova and B Jarvis. (1995).** Report from the roundtable on *Rhizobium* Taxonomy. In. IA. Tikhonovich, N.A. Proporov, V. I. Romonov and W.E. Newton (ed.) *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Netherlands. Kluwer Academic Publishers.
- ❖ **Liu T-X. (2008).** Soil ecology research developments. Nova science publishers, Inc.p139-145.
- ❖ **Maghrani M., et al. (2004).** Effect of *Retama raetam* on lipid metabolism in normal and recent-onset diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacologie*, Volume 90, Issue 2-3, February 2004, **pages 323-329**.
- ❖ **Manchai M. (2003).** The characterisation and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes. Thèse de Magistère. Suranaree University of Technology Academic. **70p**.
- ❖ **Margesin R., Schinner F. (1999).** Biotechnological applications of cold-adapted organisms. Springer-Verlag gmbh et Co. KG.2 **pp: 162-166**.
- ❖ **Martinez E., MA., Pardo R., Palacios and MA., Cevallos. (1985).** Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
- ❖ **Maxted et Bennett SJ. (2001).** Legume diversity in the Mediterranean region. *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: 51-75
- ❖ **Messirdi R., (2004).** étude cytogénétique de *Retama retam*. mémoire d'ingénieur d'état en biotechnologie, USTO ;**12-25p**. *Microbiol.* **32**, 379-83.

- ❖ **Miller KJ., JM Wood. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphère bacteria. Ann. Review.Microbial., 50 : 101-136.
- ❖ **Mittler R. (2000).** Living under a dormant canopy : a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama retam*. The plant journal. Blackwell Science Ltd. (2001) **25**(4), 407-416. New Zealand conifers. Soil Biol. Biochem. 5: 111-179.
- ❖ **Newton WR. (1998).** Nitrogénase : fonction et évolution. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 13 : 238241.
- ❖ **O'hara GW., Howieson JG., and Grahman PH. (2002).** Nitrogen fixation and Agricultural Practice. G. Jeffry Leigh, Editor. **pp. 391-419.**
- ❖ **Ozenda P. (1958).** flore du Sahara septentrional et centrale .CNRS., Paris. **486p.**
- ❖ **Pedrosa FO. (1988).** Physiology, biochemistry and genetics of Azospirillum and other root associated nitrogen-fixing bacteria. C.R.P sci. 6, 345-384.
- ❖ **Postgate JR. (1974 ).** Evolution within nitrogen-fixing systems. Symposia of the Society for General Microbiology, 24: 263-292.
- ❖ **Quezel et Santa. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I.**p156-162**
- ❖ **Räsänen L. (2002).** Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia and Prosopis. Thèse de doctorat. University of Helsinki, Finland. **93p.**
- ❖ **Raza S., B., Jornsgard H., Abou-Taleb ., and JL., Christiansen. (2001).** Tolerance of Bradyrhizobium sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. Lett. Appl. rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. 50: 277-287
- ❖ **Rispail N., Kalo P., Kiss., GB., NoelEllis., TH., Gallardo K., Thompson RD., Prats E., Larrainzar E., Ladrera R., Gonzalez EM., Arrese-Igor C., Ferguson BJ., Gresshoff PM., et Rubiales D. (2010).** Model legume contribute to faba bean breeding .Field Crops Research. 115, 253-269.
- ❖ **Rolfe BG., Mathesius U., Djordjevic M., Weinman J., Hocart C., Weiller G., and Bauer D. (2003).** Proteomic analysis of legume-microbe interaction. Comparative and Functional Genomics. Vol 4. **pp. 225-228.**
- ❖ **Saadaoui B. (2007).** Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. Revue des régions arides. ISSN 0330-7956.2007(1), **pp.316-321**[6 page(s) (article)]. ed. : Institut des régions arides, Médenine, Tunisie.
- ❖ **Saikia R. (2008).** Microbial biotechnology. New India publishing agency. **pp:188-195**

- ❖ **Selami N. (2000).** Contribution à l'étude de *retama monosperma*. Etude du système racinaire et recherche des associations de type Rhizobium. Mémoire d'ingénieur en biotechnologie. USTO.ORAN .38P
- ❖ **Shallaby A., MonayerI M., Etman MA., El Habibi AM., Youssef MP. (1972).** In **Bouredja. (2005).** étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma*(boiss) : mémoire de magistère . UNIV.des sciences et de latechnologie d'Oran Mohamed Boudiaf (U.S.T.O) Oran.
- ❖ **Shubert KR., and Bolland MT. (1990).** The ureides. the biochemistry of plants. Vol 16. pp.197-282.
- ❖ **Silvester WB., KJ., Bennett., (1973).** Acetylene reduction by roots and associated soil of new zealand conifers. Soil Biol. Biochem. 5: 111-179.
- ❖ **Soltner D. (1988).** Les bases de la production végétale : Le sol, le climat, la plante. Tome 1 : le sol. 16<sup>ème</sup> édition, Collection Science et Techniques Agricoles, Angers France.
- ❖ **Spaink HP., Kondorosi A., et hooykaas paul jj. (1998).** The rhizobiacea : molecular .
- ❖ **Spichiger RE., Salvlainen V., Figeat M., Jammonob D. (2004).** Botanique systématique des plantes à fleurs .éd :press polytechnique et universitaire romande,203-206p in **Bouredja N. (2005).** étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés
- ❖ **Stevenson JF. (1986).** Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. John Wiley & Sons, New York.
- ❖ **Stocker., (1974).** In **Bouredja N. (2005).** étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma*(boiss) : mémoire de magistère . UNIV.des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (U.S.T.O) Oran.
- ❖ **Stowers MD. (1985).** Carbon metabolism in Rhizobium species. Ann. Rev. Microbiol. 39 : 89-108.
- ❖ **Swaraj K., et Bishnoi NR. (1999).** Effet of salt stress on nodulation and nitrogen fixationtemperature and phage sensivity of Rhizobium sp. (*Galega*) compared with other fast-growing.
- ❖ **Terefework Z. (2002).** Diversity and phylogeny of rhizobium galagae and reflection on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Thèse de doctorat. University of Helenski, Finland. 58p.

- ❖ **Thomas. (1968), JP. (1969).** Ecologie et dynamique de la végétation de la dune littorale dans la région de Djidjelli. Bull. Soc. Hist. Nat. Afr.nord, 59: 37-98.
- ❖ **Unesco. (1960).** Recherches sur la zone aride - XIII-Les plantes médicinales des régions arides,  
Pb Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture, place de Fontenoy, Paris-7e
- ❖ **Van Rhijn PJ., S., and J Vanderleyden. (1995).** The Rhizobium-plant symbiosis. Microbiol. Rev. **59** : 124-142.
- ❖ **Velazquez E., Igual JM., Willems A., Frenandez MP., Munoz E., Mateos PF., Abril A., Toro N., Normand P., Cervantes E., Gillis M., and Martinez-Molina E. (2001).** *Mesorhizobium chacoense* sp nov a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). Int J Syst Evol Microbiol. **54** :1011-1021.
- ❖ **Wei GH., Zhong ZX., Chen C., Chen WM., and Ju WT. (2006).** Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera Astragalus, lespedeza and Hedysarum in northwestern china. Microbiological Research. pp. **112**
- ❖ **Weirs R. (2012).** The *current taxonomy of rhizobia* .international journal of systematic and evolutionary microbiology.
- ❖ **Wilson JK. (1944).** Over five hundred reasons for abandoning the crossinoculation groups of the legumes. Soil Science. 58:61-69.
- ❖ **Zahran HH. (1999).** Rhizobium-legume symbiosis and Nitrogen fixation under Severe Condition and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Reviews. Vol 63. n° 4. pp. **968-989**.
- ❖ **Zehari K. (2000).** Diversité phénotypique et génotypique des rhizobia isolés des régions arides et sahariennes du Maroc nodulant quatre espèces d'*Acacia*.
- ❖ **Zohary. (1962).** plant life of Palestine, Israel, and Jordan, Michael Zohary. Ronald, New York, 1962. Science 11 may 1962: Vol. 163 . no.3515, p. **523** . DOI: 10.1126/science.136.3515.523.
- ❖ **fr.wikipedia.org/wiki/Retama\_monosperma** : images des *retama monosperma*

### Annexe1 : Milieux de culture utilisés pour : rhizobia et plante

#### 1- Composition du milieu YMA (Vincent, 1970)

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

pH ajusté à 6.8

#### 2- Composition du milieu YMB (Vincent, 1970)

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

pH ajusté à 6.8

#### 3- Composition du milieu Jensen (référence)

Solution stocke dix fois concentrée.....	100ml
Oligo-éléments.....	1ml
Fe Cl <sub>2</sub> .....	300µl

pH ajusté à 7

### 4- Composition des milieux utilisés pour la caractérisation biochimiques

(Pour 1L d' eau distillée) (Le Minor et Richard, 1993)

#### 4-1. Milieu au citrate de Simmons

Sulfate de magnésium.....	0.2g
Phosphate mono-ammonique.....	1g
Phosphate bipotassique.....	1g
Citrate de sodium.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Agar.....	15g

pH ajusté à 6.8

#### 4-2. Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	300 g
Hydrolysate de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	17 g

pH ajusté à 7.4

#### 4-3. Bouillon nitraté

Macération de viande.....	1000ml
Peptone tryptique.....	15g
NaCl ou KCl.....	5g

Nitrite de Sodium ( $\text{Na NO}_2$ ).....1ml

### 4-4. Milieu Clark-Lubs

Peptone trypsique de viande..... 5 g

Phosphate bipotassique..... 5 g

Glucose..... 6 g

pH ajusté à 7

### 4-5. Eau peptonée

Peptone trypsique.....15g

NaCl.....5g

### 5- Milieu de culture utilisé pour l'assimilation des sucres comme seule source de carbone

$\text{NH}_4\text{Cl}$ .....1g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....0.5g

$\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....0.2g

NaCl.....0.1G

Eau distillée.....1000ml

pH ajusté à 6.8

### 6- Milieu de culture utilisé pour l'assimilation des acides aminés comme source d'azote

Mannitol.....10g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....0.5g

$\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....0.2g

NaCl.....0.1g

Eau distillée qsp.....1000ml

pH ajusté à 6.8



## Annexes

### Annexe 2 : sucres (moyenne de trois déterminations)

Sucres Souches	Mannose 20%	Sorbose 20%	Maltose	Rhamnose	Inositol
P <sub>2.2</sub>	0.458	0.191	0.267	0.191	0.230
P <sub>1.1'</sub>	0.128	0.140	0.146	0.189	0.203
P <sub>6.1'</sub>	0.356	0.170	0.180	0.157	0.179
P <sub>12.2''</sub>	0.012	0.011	0.017	0.01	0.006
P <sub>19.2''</sub>	0.160	0.147	0.133	0.131	0.150
P <sub>3.2'</sub>	0.153	0.121	0.085	0.092	0.100
P <sub>16.2''</sub>	0.125	0.086	0.077	0.089	0.081
P <sub>18.1'''</sub>	0.216	0.103	0.210	0.219	0.168
P <sub>7.1'</sub>	0.149	0.168	0.176	0.142	0.149
P <sub>14.1''</sub>	0.135	0.113	0.147	0.099	0.157
P <sub>15.2''</sub>	0.005	0.005	0.010	0.009	0.029
P <sub>9.1</sub>	0.066	0.032	0.052	0.034	0.021
P <sub>19.2'''</sub>	0.209	0.216	0.160	0.191	0.186
P <sub>8.1</sub>	0.190	0.169	0.161	0.155	0.161
P <sub>18.1''</sub>	0.184	0.128	0.139	0.113	0.195
P <sub>17</sub>	0.207	0.186	0.064	0.088	0.054
RST <sub>88</sub>	0.177	0.101	0.126	0.131	0.170

### Annexe 3 : acides aminés (moyenne de trois déterminations)

A.A. Souches	Alanine	Histidine	Méthionine	Glycine	Arginine
P <sub>17</sub>	0.386	0.267	0.167	0.533	0.253
P <sub>15.2''</sub>	0.589	0.467	0.203	0.437	0.574
P <sub>18.1'''</sub>	0.586	0.458	0.249	0.355	0.629
P <sub>2.2</sub>	0.660	0.595	0.199	0.305	0.724
P <sub>16.2''</sub>	0.616	0.626	0.210	0.481	0.680
P <sub>14.1''</sub>	0.554	0.525	0.145	0.350	0.573
P <sub>3.2'</sub>	0.454	0.486	0.166	0.445	0.646
P <sub>19.2'''</sub>	0.635	0.370	0.185	0.350	0.543
P <sub>18.1''</sub>	0.483	0.170	0.173	0.461	0.687
P <sub>6.1'</sub>	0.549	0.485	0.195	0.516	0.756
P <sub>19.2''</sub>	0.653	0.237	0.170	0.291	0.677
P <sub>9.1</sub>	0.307	0.217	0.193	0.326	0.443
P <sub>12.2''</sub>	0.651	0.444	0.226	0.398	0.554
P <sub>7.1'</sub>	0.698	0.323	0.176	0.434	0.575
P <sub>1.1'</sub>	0.463	0.143	0.130	0.462	0.548
P <sub>8.1</sub>	0.194	0.337	0.180	0.174	0.608
RST <sub>88</sub>	0.653	0.187	0.066	0.229	0.644

## Annexes

### Annexe 4 : températures (moyenne de trois déterminations)

TP° Souches	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	37°C
<b>P</b> 7.1'	0.563	0.718	0.629	0.555	0.477	0.292
<b>P</b> 18.1''	0.626	0.478	0.478	0.494	0.445	0.330
<b>P</b> 8.1	0.304	0.366	0.359	0.324	0.515	0.226
<b>P</b> 18.1'''	0.542	0.570	0.544	0.551	0.633	0.394
<b>P</b> 19.2'''	0.647	0.632	0.631	0.563	0.749	0.410
<b>P</b> 14.1''	0.490	0.456	0.407	0.355	0.340	0.281
<b>P</b> 9.1	0.141	0.146	0.183	0.232	0.520	0.202
<b>P</b> 17	0.172	0.184	0.184	0.174	0.244	0.342
<b>P</b> 2.2'	0.621	0.491	0.486	0.483	0.439	0.426
<b>P</b> 1.1'	0.559	0.418	0.403	0.398	0.303	0.102
<b>P</b> 6.1'	0.564	0.448	0.434	0.422	0.411	0.398
<b>P</b> 12.2''	0.594	0.523	0.456	0.444	0.423	0.362
<b>P</b> 19.2''	0.604	0.489	0.479	0.416	0.412	0.297
<b>P</b> 3.2'	0.489	0.415	0.394	0.353	0.342	0.050
<b>P</b> 16.2''	0.519	0.491	0.466	0.443	0.396	0.212
<b>P</b> 15.2''	0.439	0.497	0.429	0.391	0.360	0.117
<b>RST</b> 88	0.130	0.229	0.512	0.653	0.326	0.038

### Annexe 5: salinité (moyennes de trois déterminations)

G Souches	100	200	300	400	500	600	700	800
<b>P</b> 71	0.426	0.401	0.279	0.279	0.396	0.372	0.275	0.283
<b>P</b> 18.1''	0.345	0.379	0.206	0.236	0.357	0.340	0.254	0.188
<b>P</b> 8.1	0.498	0.401	0.116	0.121	0.314	0.264	0.121	0.117
<b>P</b> 18.1'''	0.411	0.390	0.202	0.221	0.383	0.353	0.223	0.200
<b>P</b> 19.2'''	0.486	0.392	0.176	0.177	0.295	0.218	0.179	0.174
<b>P</b> 14.1''	0.351	0.345	0.259	0.252	0.333	0.323	0.250	0.261
<b>P</b> 9.1	0.185	0.196	0.164	0.155	0.198	0.201	0.163	0.157
<b>P</b> 17	0.488	0.410	0.236	0.246	0.367	0.374	0.246	0.237
<b>P</b> 2.2'	0.605	0.608	0.236	0.195	0.531	0.467	0.200	0.231
<b>P</b> 1.1'	0.452	0.492	0.241	0.247	0.352	0.362	0.246	0.242
<b>P</b> 6.1'	0.422	0.546	0.396	0.417	0.478	0.401	0.431	0.382
<b>P</b> 12.2''	0.476	0.613	0.262	0.249	0.508	0.417	0.254	0.256
<b>P</b> 19.2''	0.492	0.652	0.336	0.361	0.564	0.515	0.373	0.324
<b>P</b> 3.2'	0.531	0.450	0.278	0.288	0.387	0.318	0.291	0.275
<b>P</b> 16.2''	0.446	0.540	0.329	0.351	0.469	0.414	0.375	0.304
<b>P</b> 15.2''	0.540	0.486	0.283	0.249	0.408	0.355	0.241	0.291
<b>RST</b> 88	0.194	0.267	0.022	0.026	0.049	0.017	0.022	0.026

### Liste des codes de différentes souches issues du prélèvement

Code final	Code experimental
$P_1 \Rightarrow$	$P_{1,1}'$
$P_2 \Rightarrow$	$P_{2,2}'$
$P_3 \Rightarrow$	$P_{3,2}'$
$P_4 \Rightarrow$	$P_{19,2}'''$
$P_5 \Rightarrow$	$P_{19,2}''$
$P_6 \Rightarrow$	$P_{6,1}'$
$P_7 \Rightarrow$	$P_{7,1}'$
$P_8 \Rightarrow$	$P_{8,1}$
$P_9 \Rightarrow$	$P_{9,1}$
$P_{10} \Rightarrow$	$P_{18,1}''$
$P_{11} \Rightarrow$	$P_{18,1}'''$
$P_{12} \Rightarrow$	$P_{12,2}''$
$P_{13} \Rightarrow$	$P_{17}$
$P_{14} \Rightarrow$	$P_{14,1}''$
$P_{15} \Rightarrow$	$P_{15,2}''$
$P_{16} \Rightarrow$	$P_{16,2}''$
$RST_{88} \Rightarrow$	$RST_{88}$

#### Annexe6 :

**La texture :** La texture ou analyse granulométrique du sol a comme but de donner la composition élémentaire de ce dernier et de déterminer ses propriétés en ce qui concerne : la perméabilité, la rétention de l'eau et la réserve d'éléments nutritifs. Pour cela, on a suivi la **méthode internationale de sédimentation** qui consiste :

- Tout d'abord à la destruction de la matière organique ; On a pesé 20g de notre sol, on l'a mis dans un Becher de 500ml, on lui a ajouté 50ml d'eau et commencement de l'attaque au premier des temps à froid avant de le transférer à chaud au bain de sable.
- Puis, la dispersion des agrégats au pyrophosphate de sodium ; on a transféré le contenu du Becher dans un flacon d'un litre, on l'a ajusté avec l'eau distillée jusqu'à 500ml en lui rajoutant 25ml de la solution de pyrophosphate de sodium à 40 g/l.

## Annexes

laisser agiter pendant 2 heures à l'agitateur rotatif à allure modérée. On a transvasé par suit le contenu dans une allonge de sédimentation tout en ajustant la suspension par de l'eau distillée à 1000ml, bien agiter par retournement et déposer l'allonge sur la paillasse loin de toute source de chaleur pour un temps nécessaire aux particules à prélever.

- La détermination des fractions fines (argiles et limons fins) est effectuée par prélèvement, à l'aide de la pipette Robinson, de 20ml à 10 cm de profondeur de l'allonge après 5 minutes et 10 secondes de son dépôt à sédimenter et la laisser continuer la sédimentation pendant 6heurs. Les 20ml prélevés sont transvasés dans une tarre de 50ml après avoir pris son poids à vide et la soumettre au séchage à 105°C. Ainsi pour les argiles, on a apéré de la meme façon après repos de 6 heurs à une profondeur déterminée à partir du tableau des temps de sédimentation.
- Les fractions grossières (limons grossiers, sables fins et sables grossiers) sont récupérées après siphonages et lavages successifs. Le séchage de ces fractions se fait à 105°C et les fractions sableuses sont séparées par tamisage. Les classes texturales des sols sont déterminées suivant le triangle de texture USDA.

### Annexe7 : La classe pondérale :

Afin de réussir une germination meilleur, on doit tout d'abord mettre on considération le choix de graines. À partir d'un lot de 200 graines d'environ prises d'une manière aléatoire, on effectue une classe pondérale, on pèse les graines prises et on les réparties sur différents poids en grammes allant pour celles de *R.monosperma* de 0.4g jusqu'à 0.13g.

Les pois en g	Le nombre de graines
0.4	05
0.5	04
0.6	03
0.7	24
0.8	28
<b>0.9</b>	<b>50</b>
<b>0.10</b>	<b>43</b>
<b>0.11</b>	<b>36</b>
0.12	7
0.13	0

## Annexes

---

[0.9 / 0.10 / 0.11] g : est la classe modale (l'effectif le plus répandu).