



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

**Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à
partir des nodules racinaires de la légumineuse
*Lupinus angustifolius***

Présenté et soutenu par : *Khalfi Chahinez*

Le : 20/06/2017

Smara Romaiassa

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr *Chabbi Rabah* (maitre-assistant « A » - UFM Constantine).

Rapporteur : Mr *Benhizia Yacine* (Professeur - UFM Constantine).

Examineur : Mme *Riah Nassira* (maitre de conférences « B »- UFM Constantine).

*Année universitaire
2016 - 2017*

Remerciements

Tout d'abord, nous rendons grâce à **Dieu** le tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la santé et la patience d'accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre encadreur de mémoire **Mr Benhizia Yacine**. On le remercie de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Nous remercions sincèrement **Mr Chabbi Rabah** Maitre-assistant « A » à l'Université des Frères Mentouri-Constantine, pour avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions également **Mme Riah Nassira** Maitre de conférences « B » à l'Université des Frères Mentouri- Constantine, d'avoir accepté d'examiner et juger notre travail.

A toutes personnes intervenant par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques qui ont guidé nos réflexions et ont accepté à tout rencontrer et répondre à nos questions durant notre recherche et spécialement Mlle **Mellal Hanane** .

Nous tenons à remercier **Mr Haddi** et aussi **Mr Kadem** pour leurs aides tout au cours de notre travail.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Avec un énorme plaisir , un cœur ouvert et
une immense joie , que je dédie le fruit de ce
modeste travail à :*

*Mes chers parents Djahida et Hocine , pour
leurs amours, leurs soutiens et encouragements*

*Ma belle sœur Kaouter et sa petite famille :
Habib et Syrine .*

Mes frères Adem et Louay.

Toute la famille Khalfi et Hallel.

*Mes grands parents ,cousines , cousins , oncles
et tantes .*

Mon binôme Smara Romaissa.

Tous mes amis et collègues .

Chahinez

Dédicace

*Avec un énorme plaisir , un cœur ouvert et
une immense joie , que je dédie le fruit de ce
modeste travail à :*

*Mes chers parents Zohra et Mourad , pour
leurs amours, leurs soutiens et
encouragements*

Mon frère Sohaib

Toute la famille Smara

*Ma grande mère, mes tantes , mon oncle ,
cousins et cousines.*

Mon binôme Khalfi Chahinez.

Tous mes amis et collègues .

Romaissa

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
ADP : Adénosine Diphosphate
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN : Acide Ribo Nucléique
ARNr 16S : Acide Ribo Nucléique ribosomique 16S
ATP : Adénosine Triphosphate
BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses
BTB : Bleu de Bromothymol
bv : biovar
CaCl₂ : Chlorure de Calcium
CMC : Carboxy Methyl Cellulose
DO : Densité Optique
EPSs : Exopolysaccharides solubles
FAME : Fatty Acid Methyl Ester
Gène *fix* : fixation
FN : Facteur Nod
H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène
HgCl₂ : Chlorure Mercurique
KCl : Chlorure de Potassium
KDa : KiloDalton
KNO₃ : Nitrate de potassium
LPS : Lipopolysaccharides
MLEE : Multilocus enzyme electrophoresis
µm : micromètre
Mo : Molybdène
NaCl : Chlorure de Sodium
NH₄Cl : Chlorure d'Ammonium
Gène *nif* : Gènes de la nitrogénase
nm : nanomètre
Gène *nod* : Gène de nodulation
pH : Potentiel d'Hydrogène
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
P/V : Poids par volume
RC : Rouge Congo
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TY : Tryptone Yeast
V/V : Volume par Volume
YMA : Yeast Mannitol Agar
YMB : Yeast Mannitol Broth

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Classification actuelle des <i>Rhizobia</i> (Weir,2016).	10
Tableau 02 :	Résultats obtenus pour les paramètres d'analyse du sol de la station d'étude.....	35
Tableau 03 :	Des données relatifs aux isolats et les souches de référence.....	37
Tableau 04 :	Résultat de réaction de la catalase et de l'oxydase sur les souches étudiées.....	47
Tableau 05 :	Assimilation des différents sucres par les isolats et les souches de référence après 48 heures d'incubation.....	49
Tableau 06 :	Assimilation des différents acides aminés par les isolats et les souches de référence après 48 heures d'incubation.....	50
Tableau 07 :	Effet de la température sur la croissance de nos isolats et les souches de référence.....	55

Liste des figures

Figure 01 :	Phylogénie de quelques légumineuses (Udvardi et <i>al.</i> ,2005).....	04
Figure 02 :	<i>Lupinus angustifolius</i> (Jargeat,2011).....	07
Figure 03 :	Photo de <i>Lupinus angustifolius</i> (Janvier,2017).....	07
Figure 04 :	Représentation schématique d'un coupe longitudinal dans un nodule (Oldaton, 1992).....	18
Figure 05 :	Etapas de la formation d'un nodule racinaire chez légumineuse infectée par Rhizobia (Madigan et Martinko,2007).....	19
Figure 06 :	Representation du complexe nitrogénase.....	20
Figure 07 :	Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	25
Figure 08 :	Zone de prélèvement de <i>Lupinus angustifolius</i> (El Taraf – Malleh).....	25
Figure 09 :	Méthode de stérilisation et l'isolement selon la méthode des nodules écrasés.....	28
Figure 10 :	Méthodes de la conservation des isolats.....	30
Figure 11 :	Les nodules de <i>Lupinus angustifolius</i>	34
Figure 12 :	Test de stérilisation.....	37
Figure 13 :	Croissance bactérienne de différents isolats sur le milieu YMA.....	40
Figure 14 :	La croissance des différents isolats sur le milieu YMA+BTB en comparant avec le témoin.....	40
Figure 15 :	Observation microscopique de l'isolat (LPR ₂) et la souche de référence (LPRN) (objectif x 100) après coloration de Gram.....	40
Figure 16 :	La mobilité des différentes souches sur le milieu mannitol-mobilité.....	41
Figure 17 :	Réduction des nitrates par l'isolat LPR ₁	43
Figure 18 :	Résultat de l'hydrolyse de l'urée.....	46
Figure 19 :	Activité Cellulosique des isolats LPR ₂ et LPB ₂	46
Figure 20 :	Activité pectinolytique de l'isolat LPB ₁	46
Figure 21 :	Utilisation des différentes sources de carbone par les différents isolats et les souches témoins.....	51
Figure 22 :	Utilisation des différentes sources d'azote par les différents isolats et les souches témoins.....	51
Figure 23 :	Effet du pH sur la croissance des isolats et les souches de référence.....	56
Figure 24 :	Effet du NaCl sur la croissance des isolats et les souches de référence...	56
Figure 25 :	Effet de la température sur des différents isolats.....	56

Résumé

Dans cette étude quatre bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires de le lupin (*Lupinus angustifolius*) cultivée dans la Wilaya El Tarf -Mallah. La caractérisation est initiée par une étude morphologique et culturale, cette étude classe deux isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium* et les autres comme étant des bactéries à croissance lente ont les même caractéristiques des *Bradyrhizobium*.

Les tests biochimiques ont évalué la présence d'une activité enzymatique chez les isolats. Les tests nutritionnels et physiologiques montrent une diversité entre les isolats.

Sur la base des caractères étudiés, les isolats portent les mêmes caractères phénotypiques des (BNL).

Mots clés : *Lupinus angustifolius*, nodules racinaires, caractérisation, phénotypiques, BNL.

Abstract

In this study four bacteria were isolated from the root nodules of lupine (*Lupinus angustifolius*) grown in Wilaya El Tarf -Mallah. The characterization is initiated by a morphological and cultural study, this study classifies two isolates as fast-growing bacteria with characteristics of bacteria of the genus *Rhizobium* and others as slow-growing bacteria with the same characteristics of *Bradyrhizobium*. Biochemical tests evaluated the presence of enzymatic activity in isolates. The nutritional and physiological tests show a diversity between isolates.

On the basis of the traits studied, the isolates carry the same phenotypic characters (BNL).

Key words: *Lupinus angustifolius*, root nodules, characterization, phenotypic, BNL.

ملخص

في هذه الدراسة تم عزل أربع ة بكتيريا من العقد الجذرية من الترمس (*Lupinus angustifolius*) الذي ينمو في ولاية الطارف – ملاح . تبدأ الدراسة الوصفية بدراسة مورفولوجية و زراعية ، هذه الدراسة صنفت عزلتين الى بكتيريا سريعة النمو و هذه سمة مميزة للجنس *Rhizobium* والبعض الآخر البكتيريا بطيئة النمو لديها نفس مميزات *Bradyrhizobium* الاختبارات البيوكيميائية تظهر وجود النشاط الأنزيمي بين العزلات. اختبارات الغذائية والف زيولوجية تظهر التنوع بين السلالات .

على أساس الصفات المدروسة ،السلالات المنعزلة حملت نفس الصفات المظهرية ل (BNL) الكلمات المفتاحية : *Lupinus angustifolius*، العقد الجذرية، وصف، المظهرية، BNL.

Table des matières

Introduction	01
Chapitre 01 : Revue bibliographique	
1. L'importance de l'azote dans la nutrition des plantes.....	03
2. Les légumineuses.....	03
2.1. Le genre <i>Lupinus</i>	04
2.1.1. Généralités.....	04
2.1.2. Origine et distribution géographique.....	04
2.1.3. Ecologie de lupin.....	05
2.1.4. Intérêt et utilisation de lupin.....	05
2.1.5. l'espèce <i>Lupinus angustifolius</i>	06
2.1.5.1. Description de la plante.....	06
2.1.5.2. Taxonomie.....	08
3. Rhizobia.....	08
3.1. <i>Rhizobium</i>	08
3.2. <i>Bradyrhizobium</i>	09
3.3. Morphologie de Rhizobia.....	09
3.4. Taxonomie et biodiversité des Rhizobia.....	10
3.4.1. Systématique des Rhizobia.....	10
4. Notion de la biodiversité des Rhizobia.....	13
5. Méthodes d'étude de la biodiversité des Rhizobia.....	13
6.1. les méthodes phénotypiques.....	14
6.1.1. La composition des parois cellulaires.....	14
6.1.2. FAME «fatty acid methyl ester» ou analyse des acides gras cellulaires.....	14
6.1.3. SDS-PAGE «sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis» analyse des protéines cellulaires totales.....	15
6.1.4. MLEE (multilocus enzyme electrophoresis).....	15
6.2. Les méthodes génotypiques.....	15
6.2.1. Le pourcentage en nucléotides G+C.....	15
6.2.2. Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	16
6.2.3. Les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	16
6.2.4. Le séquençage de l'ARN16S.....	16
6. Siège de fixation : les nodosités.....	17
6.1. Organisation structurale des nodules.....	17
6.2. Ontogenèse du nodule.....	18
7. Mécanisme enzymatique de la fixation.....	20
7.1. Structure de la nitrogénase.....	20
8. Génétique de nodulation et de fixation symbiotique d'azote chez les légumineuses..	21

8.1. Gènes <i>nod</i>	21
8.2. Gènes <i>nif</i>	21
8.3. Gènes <i>fix</i>	21
8.4. Gènes de la plante hôte.....	21
9. Les critères symbiotiques.....	22
10. Les facteurs influençant la nodulation et la fixation symbiotique d'azote.....	22
10.1. Effet de la température, l'eau et la lumière.....	22
10.2. Effet de l'acidité et de la toxicité.....	23
10.3. Effet des carences en nutriment.....	23
10.4. Effet de la salinité.....	24
10.5. Effet de l'azote disponible.....	24
10.6. Effet des facteurs biologiques.....	24

Chapitre 02 : Marétiens et méthodes

1. Echantillonnage et site de collecte.....	25
1.1. Analyse pédologique de l'échantillon de sol.....	26
1.1.1. pH.....	26
1.1.2. Mesure de l'humidité	26
1.1.3. Granulométrie.....	27
1.2. Isolement des souches à partir des nodules.....	27
1.2.1. Stérilisation des nodules.....	27
1.2.2. Test de stérilisation.....	27
1.3. Isolement selon la méthode des nodules écrasés.....	27
1.4. Purification des isolats.....	29
2. Caractérisation phénotypique des isolats.....	29
2.1. Caractères cultureux des isolats et examen microscopique.....	29
2.1.1. Croissance sur le milieu YMA.....	29
2.1.2. Test du BTB.....	29
2.1.3. Coloration de Gram.....	29
2.1.4. L'état frais.....	29
2.1.5. Test de la mobilité.....	30
2.1.6. Conservation des isolats.....	30
2.2. Tests biochimiques.....	30
2.2.1. Réduction des nitrates.....	31
2.2.2. Hydrolyse de l'urée.....	31
2.2.3. Activité cellulolytique.....	31
2.2.4. Activité pectinolytique.....	32
2.2.5. La catalase.....	32
2.2.6. L'oxydase.....	32
2.3. Tests nutritionnels.....	32
2.3.1. Assimilation de la source de carbone.....	32
2.3.2. Utilisation de la source de l'azote.....	32
2.4. Tests physiologiques.....	33

2.4.1. Effet de pH.....	33
2.4.2. Tolérance au chlorure de sodium.....	33
2.4.3. Effet de la température.....	33

Chapitre 03 : Résultats et discussion

1. Echantillonnage.....	34
1.1. Analyse pédologique d'échantillon de sol.....	34
1.1.1. Paramètres physiques.....	35
1.1.1.1. Humidité (H).....	35
1.1.1.2. Texture.....	35
1.1.2. Paramètres chimiques.....	36
1.1.2.1. pH.....	36
1.2. Constitution d'une collection des Rhizobia.....	36
1.3. Test de stérilisation.....	37
2. Caractérisation phénotypique des isolats de <i>Lupinus angustifolius</i>	38
2.1. Caractérisation culturale et cellulaire.....	38
2.1.1. La croissance sur le milieu YMA + RC.....	38
2.1.2. La croissance sur le milieu YMA.....	38
2.1.3. Test du BTB.....	39
2.1.4. Coloration de Gram.....	39
2.1.5. Etat frais.....	41
2.1.6. Test de la mobilité.....	41
2.2. Tests biochimiques	42
2.2.1. Réduction des nitrates.....	42
2.2.2. Hydrolyse de l'urée.....	43
2.2.3. Activité cellulolytique.....	44
2.2.4. Activité pectinolytique.....	45
2.2.5. Catalase.....	47
2.2.6. Oxydase.....	47
2.3. Tests nutritionnels.....	48
2.3.1. Assimilation de la source de Carbone.....	48
2.3.2. Utilisation de la source d'azote.....	49
2.4. Tests physiologiques.....	52
2.4.1. Effet de pH.....	52
2.4.2. Tolérance au chlorure de sodium.....	53
2.4.3. Effet de la température.....	54
Conclusion et perspectives.....	57
Références bibliographiques.....	60

Annexes

Introduction

Toutes les plantes ont besoin d'azote pour leur croissance; Cependant, ils ne peuvent l'obtenir directement de l'atmosphère. Ils ne peuvent utiliser que de l'azote sous la forme liée d'ions nitrate ou ammonium qu'ils obtiennent soit du sol, soit par l'ajout d'engrais azoté aux sols agricoles (Zgadzaj et *al.*,2016).

Les légumineuses Établissent habituellement une symbiose avec Rhizobia et bénéficie de sa capacité à fixer L'azote de l'atmosphère, ce qui leur permet de cultiver plus efficacement sur les sols limités en éléments nutritifs (Wedhastri,2013)

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol-racine. En effet, le rhizoplan et la rhizosphère sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (Rawat et Mushtaq, 2015).

La symbiose *Rhizobia* avec des légumineuses produit 50% de 175 millions de tonnes de fixation biologique totale de N₂ Annuel dans le monde (Yadav,2014).

L'azote fourni grâce à cette symbiose rend les légumineuses riches en protéines et cultures importantes dans les régimes humains (Graham et Vance,2003)

Les études dans le milieu méditerranéen ont été jusqu'à présent principalement focalisées sur les légumineuses cultivées et leurs symbiotes. Alors que Jusqu'à présent l'avancée de recherche dans la connaissance des BNL associées aux légumineuses spontanées est lente. Pourtant, par leur vaste répartition géographique dans le bassin Méditerranéen, ces plantes jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols (Perry,2016)

Lupinus, cette plante que les anciens appelaient « la rose d'or des sables » (Dahi, 2008), cette plante est adaptée au climat semi-aride.Les lupins sont des légumineuses fourragères utilisées communément comme engrais vert naturel. Ils sont également utilisés pour l'alimentation humaine et animale. En fait, les lupins possèdent un taux élevé en protéines de l'ordre de 40% contre 36% pour le soja (Guillemand,1999).

Le symbionte de légumineuses saprophyte *Rhizobium leguminosarum* a une valeur économique importante en raison de sa capacité à fournir de l'azote fixé à des cultures alimentaires légumineuses d'importance mondiale, comme les pois et les lentilles. La recherche découverte sur la génétique et la physiologie de *R. leguminosarum* fournit les connaissances fondamentales nécessaires pour comprendre le mode de vie complexe de la

bactérie, nécessaire pour augmenter son utilisation dans un environnement agricole (Perry,2016)

1^{er} chapitre

Revue bibliographique

1. L'importance de l'azote dans la nutrition des plantes

L'azote est un élément essentiel pour toutes formes de vie (Cleland et Harpole, 2010). Il joue un rôle déterminant à la fois sur le rendement et sur la qualité des productions. Les plantes s'alimentent dans le sol en azote minéral et le transforment en protéines.

Il faut environ 1 kg d'azote minéral pour produire 6 kg de protéines végétales. Dans 100 kg de blé tendre, il y a en moyenne 11.5 kg de protéines soit 1.9 kg d'azote (Anonyme, 2010).

L'azote 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. Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (Duhoux et Nicole, 2004).

2. Les légumineuses

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont classées parmi les Angiospermes (Sprent, 1995), qui représentent la troisième famille de plante par le nombre d'espèces (Schneider et al, 2015).

Les *Fabaceae* constituent une famille de plantes comprenant 12 000 espèces différentes classées selon 400 genres distincts (Hordés, 2015).

Cette famille produit des fruits en forme de gousses que l'on récolte desséchées. Ce sont : les lentilles, les fèves et haricots secs, les pois séchés ou encore le soja. Il y a d'autres fruits en forme de gousses qui sont eux récoltés avant leur maturité finale et qui ne sont pas classés dans les légumineuses. Cette différence dans leurs caractéristiques nutritionnelles fait que les légumineuses sont regroupées avec les « viandes et substituts » en raison de leurs fortes teneurs en protéines (Besançon, 2017), soit deux fois plus que le blé et trois fois plus que le riz (Brillant, 2016).

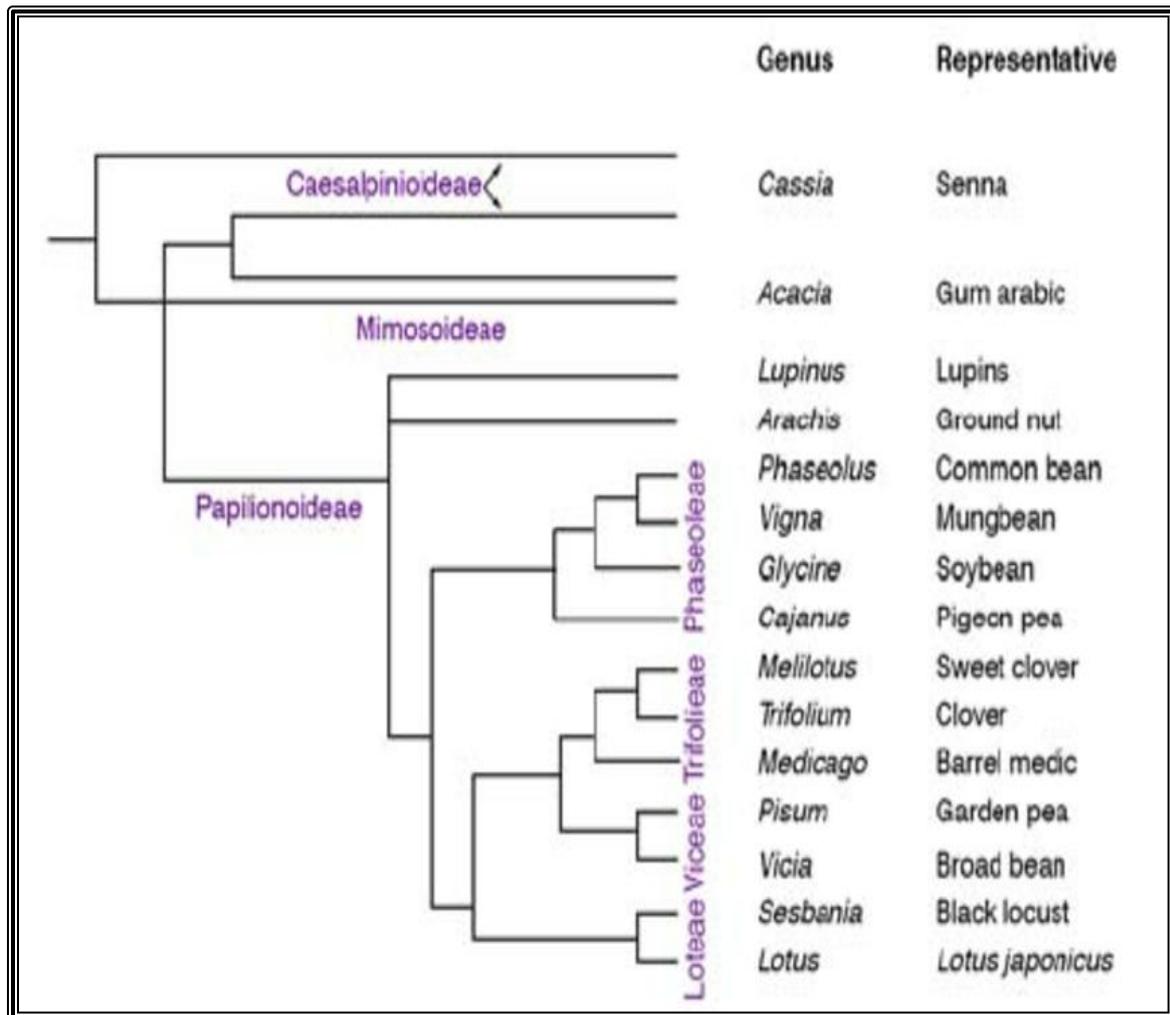


Figure 01 : phylogénie de quelques Légumineuses (Udvardi et al.,2005).

2.1. Le genre *Lupinus*

2.1.1. Généralités

Lupinus est un genre diversifié dans la famille des légumineuses. Il comprend des espèces annuelles ou vivaces, principalement herbacées ou ligneuses. La hauteur des différentes espèces varie de 0.2 – 1.5 mètres avec quelques arbustes atteignant jusqu'à 2.5 mètres (Ainouch et Bayer, 1999).

2.1.2. Origine et distribution géographique

Le lupin est d'origine du sud-est de l'Europe et de l'Asie occidentale où des types sauvages sont encore présents. Sa culture est connue depuis l'antiquité en Grèce, en Italie, en Angleterre et à Chypre. Au cours de l'histoire de sa culture, son importance a souvent fluctué, actuellement, il a quasiment disparu d'Europe centrale, alors qu'il est de plus en plus répandu

aux Amériques. De nos jours, c'est un légumes sec traditionnel secondaire, cultivé autour de la Méditerranée et de mer noire, dans la vallée du Nil, jusqu'au Soudan et en Ethiopie (Brink et Belay ,2006)

Medjahdi et *al* (2009) montrent que ce genre n'est pas très répandu en Algérie , il serait considéré comme faisant partie des plantes rares. En 1962, Quezel et Santa ont recensé 04 espèces de lupins en Algérie : *L.angustifolius* , *L.micranthus* , *L.luteus* et *L.tassilicus*. Ces derniers sont rencontrés à l'état spontané principalement sur les terrains accidentés, les falaises ou sur les zones côtières ainsi que dans le Sahara centrale (cas de *L.tassilicus*).

2.1.3. Ecologie de lupin

Par conséquent, ils sont des pionniers écologiques efficaces et capables de coloniser des sols extrêmement appauvris tels que les dunes de sable côtières et les nouveaux sols de lave déposés par des volcans récemment érupés (Lambers *et al* ., 2013).

On estime que 267 espèces de lupin sont distribuées autour de la région méditerranéenne et de l'Amérique du Nord et du Sud (Drummond *et al*, 2012)

Ce genre est adapté aux différentes conditions écologiques et présentes sur des sols acides pour la plupart des espèces mais également sur des sols alcalins. les lupins exigent des sols aérés et se développent mieux sur les sols grossiers ou moyennement grossiers de texture sableuse ou de type terreux et peu fertiles. Ils sont ainsi dénommés « les plantes d'or des sables» (Sanchez-Cañizares et *al.*,2011).

Les espèces annuelles et vivaces ont trouvé leurs niches dans une vaste gamme d'habitats écologiques à travers 100 degrés de latitude (Drummond *et al.*,2012)

2.1.4. Intérêt et utilisation de lupin

Les lupins sont des plantes dont les graines ont une forte teneur en protéines (43-50%) et contiennent aussi des fibres (25,5%), des sucres (13,5%), des matières grasses (12,5%) et des minéraux (5,5%). Plusieurs espèces sont riches en différents types d'alcaloïdes toxiques (lupanine, hydroxylupanine, spartéine,...) donnant un goût amer aux graines (Wink, 1992). Cependant, on dispose de variétés sélectionnées dépourvues ou à faible teneur en alcaloïdes qu'on nomme les lupins doux (Gladdstones, 1998).

Le lupin est un aliment de choix pour les sportifs car la graine est extrêmement riche en protéines, il y a autant de protéines dans la graine de lupin que dans la viande rouge et il y a plus de protéines que dans des œufs.

Les lupins ont une excellente digestibilité et ne font pas monter le taux de cholestérol. D'après plusieurs études, une consommation habituelle de lupin prévient l'hypertension et réduit le niveau de cholestérol dans les corps. De plus, grâce aux propriétés d'une substance appelée «tocophérol» le lupin serait utile pour la prévention du diabète de type 2 et également pour la prévention du cancer du colo (Poiret,2014).

Il améliore de plus la qualité des sols où elle pousse en synthétisant l'azote de l'air et le laissant dans la terre (Carlier, 2013).

2.1.5. l'espèce *Lupinus angustifolius*

2.1.5.1. Description de la plante

Le lupin à feuilles étroites (*Lupinus angustifolius*) gagne en popularité en tant qu'aliments naturels, qui sont riches en protéines et fibres alimentaires, mais sont pauvres en amidon et sans gluten (James et al .,2016).

Plante de 20-50 cm, munie de poils appliqués :

- folioles linéaires-oblongues, planes, glabres en dessus, pubescentes en dessous
- fleurs d'un bleu foncé, longues de 12-14 mm, alternes, assez rapprochées, en grappes peu interrompues
- pédicelles plus courts que le tube du calice
- calice bractéole, à lèvre supérieure bipartite, bien plus courte que l'inférieure entière ou à 2-3 denticules.
- carène brusquement courbée et à bec long.
- gousse large de 10-12 mm, à structure supérieure ondulée, à 4-5 graines grosses, remplissant toute la cavité de la gousse, lisses, marbrées de taches blanches et de lignes noires (Hérault,2011).

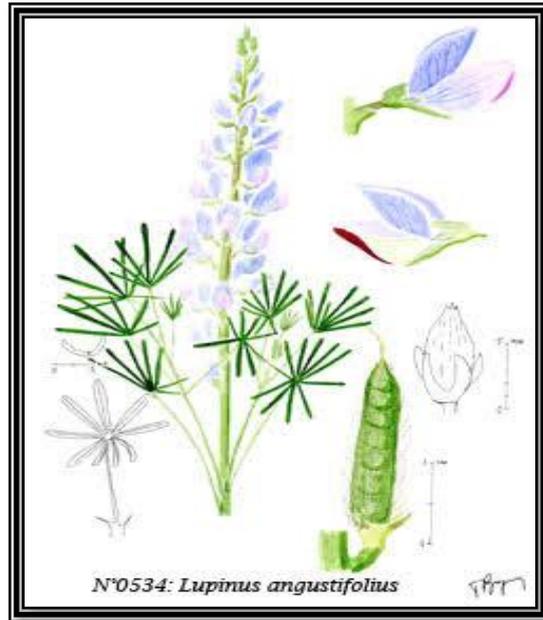


Figure 02 : *Lupinus angustifolius* (Jargeat ,2011).



Figure 03 : Photo de *Lupins angustifolius* (Janvier, 2017)

2.1.5.2. Taxonomie

Domaine : *Biota*

Règne : *Plantae*

Sous-Règne : *Viridaeplantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Equisetopsida*

Sous-Classe : *Magnoliidae*

Super-Ordre : *Rosanae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Genre : *Lupinus*

Espèce : *Lupinus angustifolius* (Gargominy et al.,2016).

3. Rhizobia

3.1. *Rhizobium*

Rhizobium est un genre bactérien qui possède la capacité de fixer l'azote atmosphérique lorsqu'il se retrouve en symbiose intracellulaire avec une plante compatible de la famille des légumineuses (Drouin, 1996).

- Les bactéries appartenant aux genres *Rhizobium* , *Mesorhizobium* , *Sinorhizobium* , *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (collectivement appelées Rhizobia) poussent dans le sol comme des organismes vivants libres, mais peuvent également vivre sous forme de symbiotes à fixation de l'azote dans les cellules de nodules racines des légumineuses (Daniel ,2004). Ils sont responsables de la plus grande partie

mondiale de l'azote atmosphérique. La fixation de l'azote par les organismes fournit environ 65% de l'azote disponible de la biosphère (Lodwig et Poole, 2003).

- Pour les *Rhizobium* à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2 à 6 flagelles péritriches. Les *Rhizobium* à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (cas de *Mesorhizobium*) (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

3.2. *Bradyrhizobium*

Bradyrhizobium (*Brady* signifie lent) est proposé après caractérisation de souches de *Rhizobium* à croissance lente isolées du soya (*Glycine max*). (Jordan 1982 ; Young et Johnson 1989).

L'identification de souches à croissance lente remonte à 1932 (Fred *et al.*) mais leur classification en un seul genre *Bradyrhizobium* a été établie par Jordan en 1982.

Le genre *Bradyrhizobium*, a été créé pour les souches à croissance lente (temps de Génération supérieur à 6 heures), pourvues d'un seul flagelle, alcalinisant certains milieux et présentant un pourcentage en guanine + cytosine de 61,6 à 65,5% (Neyra, 1992).

3.3. Morphologie de *Rhizobia*

D'un point de vue morphologique et microscopique les *Rhizobia* possèdent une forme de bâtonnets de 0,5 à 0,9 µm de large sur 1,2 à 3,0 µm de longueur ce sont des bactéries à Gram négatifs, elles sont non sporulantes (Neyra, 1992).

Somasegaran et Hoben (1994) ont indiqué que les *Rhizobium* se trouvent sous deux formes :

- Une forme végétative (non bactéroïde): ce sont des micro-organismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes.
- Une forme bactéroïde: chez les groupes *Rhizobium leguminosarum* *bv trifoli*, *Ensifer meliloti* (anciennement *Rhizobium meliloti*), les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près 10 fois plus grande que ceux de la forme végétative. Par

contre il n'existe pas de différence de taille entre les deux formes régulières chez le *Rhizobium* des groupes *Vigna* et *Lotus*.

3.4. Taxonomie et biodiversité des Rhizobia

3.4.1. Systématique des Rhizobia

Les Rhizobia sont définis classiquement comme des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités, au sein desquels ils réduisent l'azote de l'air (Duhoux et Nicole, 2004).

Tableau 01 : Classification actuelle des *Rhizobium* (Weir, 2016).

Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i>		
Genres	Espèces	Source d'isolement
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>Symbiovarviciae</i> <i>Symbiovartrifolii</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>R. galegae</i> <i>Symbiovarofficinalis</i> <i>Symbiovarorientalis</i> <i>R. tropici</i> <i>R. leucaenae</i> <i>R. tropici</i> <i>R. endophyticum</i> <i>R. phaseoli</i> <i>R. fabae</i> <i>R. etli</i> <i>Symbiovarmimosae</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>R. undicola</i> <i>R. gallicum</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>Symbiovargallicum</i> <i>R. giardinii</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>Symbiovargiardinii</i> <i>R. hainanensis</i> <i>R. huautlense</i> <i>R. mongolense</i> <i>R. yanglingense</i> <i>R. larrymoorei</i> <i>R. indigoferae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Galega, Leucaena</i> <i>Galegaorientalis</i> <i>Galegaofficinalis</i> <i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus</i> <i>Vicia faba</i> <i>Phaseolus</i> <i>Mimosa affinis</i> <i>Phaseolus</i> <i>Neptunianatans</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Desmodiumsinuatum, Centrosema.</i> <i>Sesbania herbacea</i> <i>Medicagoruthenica, Phaseolus</i> <i>Amphicarpaea</i> <i>Ficus benjamina</i> <i>Indigoferaspp.</i>

	<i>R. sullae</i> <i>R. loessense</i> <i>R. cellulosityticum</i> <i>R. miluonense</i> <i>R. multihospitium</i> <i>R. oryzae</i> <i>R. pisi</i> <i>R. mesosinicum</i> <i>R. alamii</i> <i>R. alkalisoli</i> <i>R. tibeticum</i> <i>R. tubonense</i> <i>R. halophytocola</i> <i>R. radiobacter</i> <i>R. rhizogenes</i> <i>R. rubi</i> <i>R. vitis</i> <i>R. nepotum</i>	<i>Hedysarum</i> <i>Astragalus, Lespedeza</i> <i>Populus alba</i> <i>Lespedeza</i> Plusieurs espèces de légumineuses <i>Oryza</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Caraganaintermedia</i> <i>Trigonella archiducis-nicolai</i> <i>Oxytropis glabra</i> usine de dunes côtières
<i>Ensifer</i>	<i>E. meliloti</i> <i>E. fredii</i> <i>Symbiovar fredii</i> <i>Symbiovarsienensis</i> <i>E. sahelense</i> <i>E. terangaie</i> <i>Symbiovar acaciae</i> <i>Symbiovar sesbania</i> <i>E. medicae</i> <i>E. arboris</i> <i>E. kostiense</i> <i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i>) <i>E. adhaerens</i> <i>E. kummerowiae</i> <i>E. americanum</i> <i>E. mexicanus</i> <i>E. numidicus</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i> <i>Glycine, Vigna, Cajanus</i> <i>Glycine</i> <i>Acacia, Prosopis, Neptunia,</i> <i>Leucaena</i> les plantes hôtes différentes <i>Acacia</i> <i>Sesbania</i> <i>Medicago truncatula, Melilotus</i> <i>Acacia, Prosopis</i> <i>Acacia, Prosopis</i> <i>Glycine max</i> <i>Kummerowia stipulacea</i> <i>Acacia</i> <i>Acacia angustissima</i> <i>Medicago sativa</i>
<i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i>		
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. tianshanense</i> <i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarum</i> <i>M. amorphae</i> <i>M. chacoense</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus.</i> <i>Astragalus sinicus</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i> <i>Prosopis.</i> <i>Amorpha fruticosa</i> <i>Prosopis alba</i>

	<i>M. septentrionale</i> <i>M. temperatum</i> <i>M. thiogangeticum</i> <i>M. albiziae</i> <i>M. caraganae</i> <i>M. gobiense</i> <i>M. tarimense</i> <i>M. australicum</i> <i>M. opportunistum</i> <i>M. metallidurans</i> <i>M. alhagi</i> <i>M. camelthorni</i> . <i>M. abyssinicae</i> <i>M. muleiense</i> <i>M. hawassense</i> <i>M. qingshengii</i> <i>M. robiniae</i> <i>M. shonense</i> <i>M. shangrilense</i> <i>M. silamurunense</i> <i>M. tamadayense</i>	<i>Astragalus adsurgens</i> <i>Astragalus adsurgens</i> <i>Albzia kalkora</i> <i>Caragana</i> spp. <i>Wild legumes</i> <i>Wild legumes</i> <i>Biserrula pelecinus</i> <i>Biserrula pelecinus</i> <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Alhagi</i> <i>Alhagi sparsifolia</i> Différents arbres agroforestiers de légumineuses <i>Cicer arietinum</i> Différents arbres agroforestiers de légumineuses <i>Astragalus sinicus</i> <i>Robinia pseudoacacia</i> Différents arbres agroforestiers de légumineuses <i>Caragana</i> espèce <i>Astragalus</i> espèce <i>Anagyris latifolia</i> , <i>Lotus berthelotii</i>
<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
Family: <i>Methylobacteriaceae</i>		
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i> spp.
<i>Microvirga</i>	<i>M. lupini</i> <i>M. lotononidis</i> <i>M. zambiensis</i>	<i>Lupinus</i> sp hôte légumineuse Different. hôte légumineuse Different
Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i>		
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i> <i>A. dobereinereae</i> <i>A. oxalatophilum</i>	<i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania virgata</i>
<i>Devosia</i>	<i>Devosianeptuniae</i>	<i>Neptunianatans</i>
Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i>		
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningensese</i> <i>B. yuanmingense</i> <i>B. betae</i> <i>B. canariense</i> <i>B. iriomotense</i> <i>B. jicamae</i> <i>B. lablabi</i> <i>B. huanghuaihaiense</i> <i>B. cytisi</i> <i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Lespedeza</i> <i>Betaevulgaris</i> <i>Genistee et Loteae</i> <i>Entada koshunensis</i> <i>Pachyrhizus erosus</i> <i>Lablab purpureus</i> <i>Glycine max</i> <i>Cytisus villosus</i> <i>Glycine max</i>

	<i>B. denitrificans</i> <i>B. oligotrophicum</i> <i>B. pachyrhizi</i>	<i>Aeschynomene</i> <i>Pachyrhizus erosus</i>
Classe: <i>Beta Proeobacteria</i> Ordre: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i>		
<i>Burkholderia</i>	<i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i> <i>B. phymatum</i> <i>B. nodosa</i> <i>B. sabiae</i> <i>B. mimosarum</i> <i>B. rhizoxinica</i> <i>B. diazotrophica</i> <i>B. endofungorum microsporus</i> <i>B. heleia</i> <i>B. symbiotica</i>	<i>Vertisol microaggregates</i> <i>Alysicarpus glumaceus</i> <i>Aspalatus carnosus</i> <i>Machaerium lunatum</i> <i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i> <i>Mimosa caesalpiniifolia</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus microsporus</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus</i> <i>Eleocharis dulcis</i> <i>Mimosa spp.</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Aspalatus carnosus</i> , <i>Mimosa sp.</i>

4. Notion de la biodiversité des Rhizobia

Les Rhizobia sont connus comme des bactéries fixatrices d'azote ayant la faculté d'établir des relations symbiotiques avec plusieurs espèces de la famille des *Fabacées*. Les Rhizobia ne forment pas un groupe taxonomique homogène. Certains d'entre eux sont phylogénétiquement plus proches de bactéries non symbiotiques comme *Agrobacterium* ou *Rhodopseudomonas* que d'autres *Rhizobium* (Sullivan et al, 1996).

D'une manière générale, la biodiversité des Rhizobia ou de tout autre organisme peut être définie comme suit " La diversité biologique, ou biodiversité, est la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Ceci inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et de leurs populations, la variabilité des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et de leurs interactions, et celle des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs " d'après la XVIIIème Assemblée Générale de l'Union Internationale pour la Nature (UICN) tenue à Costa Rica (1988).

5. Méthodes d'étude de la biodiversité des Rhizobia

Plusieurs techniques ont été utilisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des Rhizobia. Ces techniques ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce.

5.1. les méthodes phénotypiques

les méthodes phénotypiques constituent la base pour la description formelle des taxa (Young et *al.*, 2003 ; Vandamme et *al.*,1996).

Les méthodes phénotypiques sont celles qui ne sont pas directement basées sur l'ADN ou ARN. Elles font appel principalement aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (Graham et *al.*, 1991).

Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme). Les caractérisations physiologiques et biochimiques incluent des données sur la croissance aux différents températures et valeurs de pH, aux différents concentrations de sels, aux conditions atmosphériques, à la croissance en présence de différents agents antimicrobiens et aux données sur la présence ou l'activité de divers enzymes et de composés de métabolisme (Vandamme et *al.*, 1996).

5.1.1. La composition des parois cellulaires

Cette approche peut servir pour caractériser les bactéries mais elle est utilisée plutôt pour les bactéries à Gram positive, car la composition de leur paroi contient une variabilité d'élément informatif (Schleifer et Klander, 1992). En plus de la coloration de Gram qui permet de distinguer les bactéries sur la base de la composition de la paroi cellulaire et de sa perméabilité, il existe d'autres techniques pour analyser les différents polymères de la paroi tel que les acides teichoïques qui peuvent être facilement extraits et purifiés par la chromatographie gaz-liquide (Benguedouar,2000).

Les LPS (lipopolysaccharides) composants principales de la membrane externe des bactéries Gram négatif peuvent être analysés par des techniques d'électrophorèse et des techniques immunologiques (Yang et Lin, 1998).

5.1.2. FAME «fatty acid methyl ester» ou analyse des acides gras cellulaires

La méthode est basée sur une séquence de rupture mécanique des cellules, l'extraction par solvant à base de lipide, la transestérification des acides gras en esters gras méthyliques d'acide (FAME), et la quantification et l'identification de FAME à l'aide de Chromatographie en phase gazeuse (Breuer et *al.* ,2013) .

Cependant, cette méthode doit procéder à une standardisation du milieu et des conditions de culture, car la composition d'acides gras dans les cellules peut varier selon les conditions environnementales (variabilité de longueur de leur squelette lipidique, de la position de la double liaison) (Jones et Krieg, 1984 ; Suzuki et al., 1993).

5.1.3. SDS-PAGE «sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis» analyse des protéines cellulaires totales

Cette méthode a été utilisée dans l'étude taxonomique de plusieurs souches de *Rhizobia* très rapprochées (Vandamme et al, 1996). C'est une technique de criblage, connu pour son important pouvoir de discrimination, permet de distinguer les espèces bactériennes et même des souches au sein d'une espèce (Ndiaye et al, 2002).

Est relativement rapide, peu coûteuse et reproductible (Benguedouar, 2000).

5.1.4. MLEE (multilocus enzyme electrophoresis)

Par la MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis), plusieurs enzymes solubles peuvent être analysées (Selander et al, 1986).

Les profils isoenzymatiques ont été analysés chez différents *rhizobia* pour estimer la diversité génétique qui existe entre les souches à croissance rapide et celles à croissance lente (Young, 1985) et entre les *Rhizobia* appartenant à la même espèce telle que *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* (Pinero et al., 1988) et *Rhizobium meliloti* (Eardly et al., 1990).

5.2. Les méthodes génotypiques

Une large gamme de marqueurs moléculaires a été mise au point durant les dernières décennies. Ces marqueurs regroupent différentes techniques utilisant les acides nucléiques ADN ou ARN pour étudier la localisation ou la variabilité en séquence des gènes ou de fragments de gènes.

Les techniques les plus utilisées chez les *Rhizobium* sont les suivantes :

5.2.1. Le pourcentage en nucléotides G+C

Le taux de GC correspond au pourcentage de guanine (G) et de cytosine (C) que contient une molécule d'ADN. La guanine et la cytosine sont des bases azotées qui font partie des constituants de l'ARN et de l'ADN (Hordé, 2015).

Les valeurs de ce pourcentage d'une souche à une autre au sein d'une même espèce ne doivent pas présenter une variation supérieure à 3%. Les valeurs de ce pourcentage des espèces d'un genre donné ne doivent pas présenter une variation supérieure à 10% (Stackebrandt et Liesack, 1993).

5.2.2. Les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) consiste en la coupure de fragments d'ADN amplifiés ou non par des enzymes de restriction à des sites spécifiques composés par 4, 6 ou 8 bases nucléotidiques.

Dans la PCR-RFLP, les fragments amplifiés par PCR sont digérés par des enzymes de restriction puis révélés par électrophorèse (Gürtler *et al*, 1991 ; Vaneechoutte *et al*, 1992).

5.2.3. Les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est l'amplification sélective de fragments de restriction à partir de l'ADN génomique totalement digéré (Vos *et al*, 1995). La technique de l'AFLP permet une grande résolution génétique et elle est plus reproductible que les autres méthodes (Terefework *et al.*, 2001).

5.2.4. Le séquençage de l'ARN16S

La PCR 16S a été utilisée comme un outil de détection moléculaire directement à partir de prélèvements cliniques. Il s'agit donc d'une méthode alternative, indépendante de la culture pour la détection bactérienne (Petti, 2007).

La technique la plus couramment utilisée repose sur l'amplification puis le séquençage partiel du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16 S, gène chromosomique d'une taille d'environ 1500 paires de bases, présent chez toutes les espèces bactériennes (gène universel), dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes. La séquence obtenue est ensuite comparée à une base de données (Tristan *et al.*, 2004)

6. Siège de fixation : les nodosités

6.1. Organisation structurale des nodules

La structure du nodule comporte, en allant du méristème et en se dirigeant vers l'attache du nodule sur la racine on distingue :

- Un méristème, formé de petites cellules non contaminées par les Rhizobia et qui assurent la croissance de la nodosité
- La zone de rupture des cordons, dans cette zone, les cellules se multiplient activement et sont contaminées par les Rhizobia, mais la fixation n'a pas lieu.
- La zone de fixation, cette zone est le siège de la fixation de N₂ dont les cellules contiennent un très grand nombre de bactéries.
- La zone de dégénérescence, les cellules de la plante hôte dégénèrent
- Les faisceaux libéro- ligneux, irriguent le nodule, apportent les glucides nécessaires pour la réaction de fixation, et exportent vers les feuilles les composés azotés formés (Odaton, 1992; Elmerich, 1997; Trinchant et al, 1998).

Il existe quelques différences dans la morphologie des nodosités qui peuvent, par exemple, entourer complètement le collet comme chez le lupin, ou bien être individualisées sur la racine et prendre des formes arrondies (soja, haricot) ou allongées (luzerne, féverole). L'activité méristématique continue amène à distinguer des nodosités de type indéterminé, qui sont digitées (*Medicago*) ou coralloïdes (*Vicia*), de nodosités de type déterminé chez les quelles le méristème a une durée d'activité limitée comme chez *Glycine* ou *Phaseolus* (Trinchant et al., 1998).

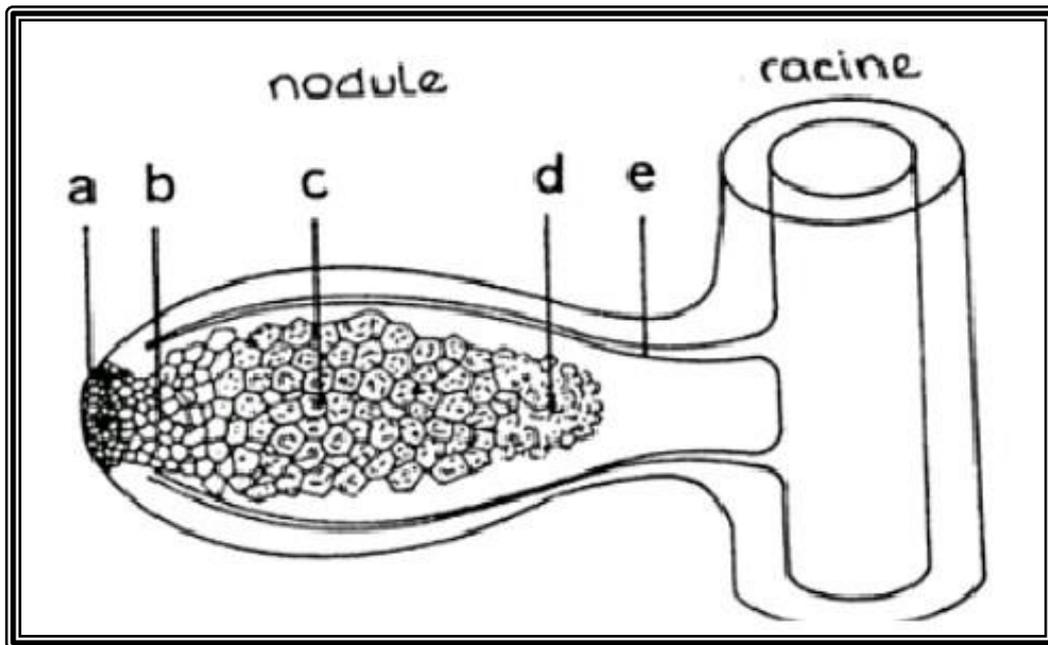


Figure 04: Représentation schématique d'un coupe longitudinal dans un nodule(a: un méristème, b: la zone de rupture des cordons, c: la zone de fixation, d: la zone de dégénérescence, e: Les faisceaux libéro- ligneux) (Odaton, 1992).

6.2. Ontogenèse du nodule

Une nodosité est une petite excroissance comme une tumeur (grosseur) présente sur les racines des légumineuses, dans laquelle se trouve la bactérie *Rhizobium* fixatrice d'azote (Kalifire, 2009)

En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les Rhizobia est connu sous le nom de l'infection (Patriarca *et al.*, 2004)

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Figueiredo *et al.*, 2008 ; Lohar *et al.*, 2009).

Il s'agit d'un véritable dialogue moléculaire permettant la reconnaissance entre les deux partenaires. La plante sécrète dans le sol des flavonoïdes qui sont perçus par le Rhizobia via une protéine régulatrice (NodD). Celle-ci déclenche l'expression des gènes *nod* (*nod* pour nodulation) aboutissant à la synthèse d'une molécule signal : le facteur Nod (FN). Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont requis pour la synthèse du squelette de base du FN, consistant en un dérivé lipochito-oligosaccharidique. Selon la bactérie, des décorations variées sont greffées

sur ce squelette (sulfate, acétate, méthyle...). La perception du FN par la plante va déclencher un enchaînement d'événements aboutissant à la formation du nodule :

(1) déformation des poils absorbants de la racine permettant d'englober la bactérie située à proximité.

(2) formation d'un cordon d'infection conduisant la bactérie jusqu'à un primordium nodulaire.

(3) libération des bactéries par endotose dans les cellules du primordium nodulaire. Au sein de ce primordium nodulaire, les bactéries se différencient en bactéroïdes, alors capables de convertir le N_2 en NH_3 . Le facteur Nod agit ainsi comme un véritable sésame. Sans celui-ci, la plante maintient un système de défense lui permettant de se protéger de l'intrusion des mille et une bactéries pathogènes qui rôdent autour de ses racines (Giraud, 2007).

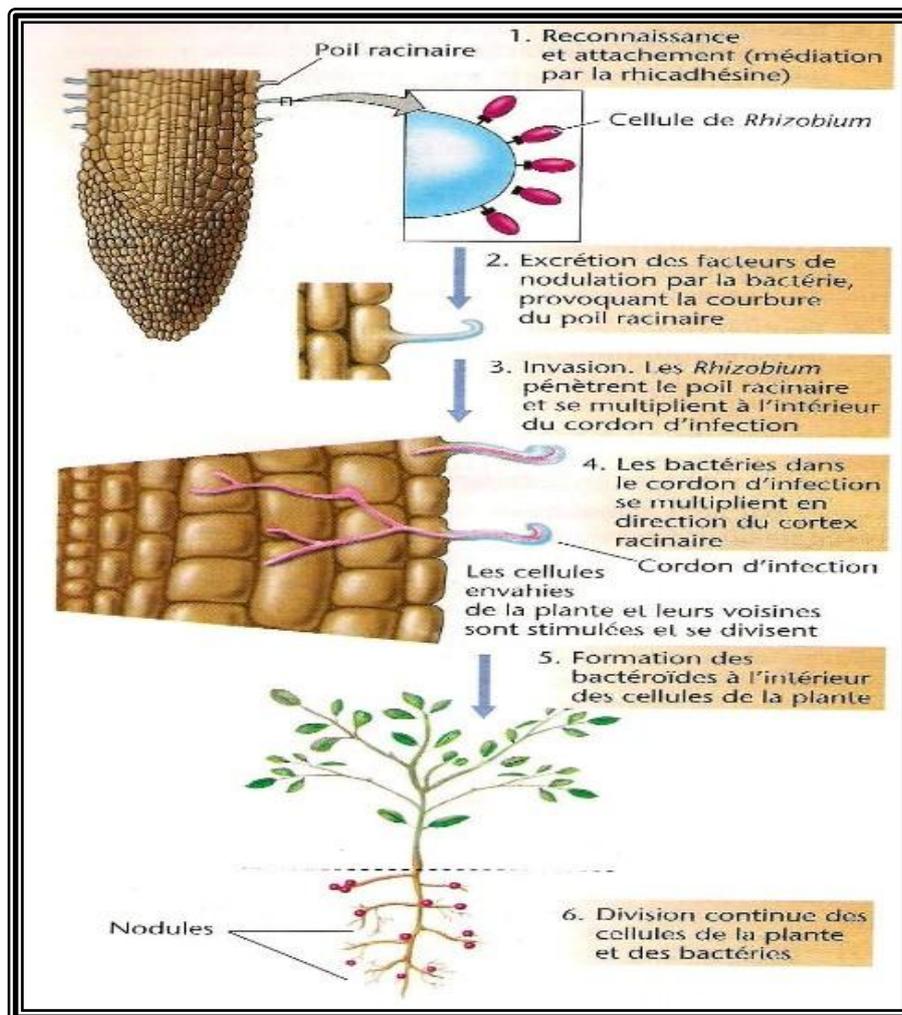


Figure 05: Etapes de la formation d'un nodule racinaire chez une légumineuse infectée par *Rhizobia* (Madigan et Martinko, 2007).

7. Mécanisme enzymatique de la fixation

7.1. Structure de la nitrogénase

le processus biologique de fixation de l'azote nécessite un enzyme complexe: c'est le complexe nitrogénase. Dans la nature, la nitrogénase corrige l'azote sous forme biologiquement utilisable dans des conditions ambiantes, Aujourd'hui, la moitié de la fixation mondiale de l'azote est réalisée grâce au procédé industriel Haber-Bosch, qui fonctionne à haute température et pression (Jian et *al.* ,2016).

Le complexe nitrogénase, qui réalise cette transformation fondamentale, est constitué de deux protéines :

1)- Une dinitrogénase réductase : (la nitrogénase I) qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du Fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa (Leclerc,1995 et Hopkins, 2003)

2)- Une nitrogénase : appelée aussi molybdoprotéine c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramérique) $\alpha_2 \beta_2$ de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4 Fe - 4 S) reliés entre eux deux par deux, ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire N_2 en NH_3 (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003)

Le transfert des électrons de la réductase à la nitrogénase est couplé à l'hydrolyse de l'ATP par réduction.

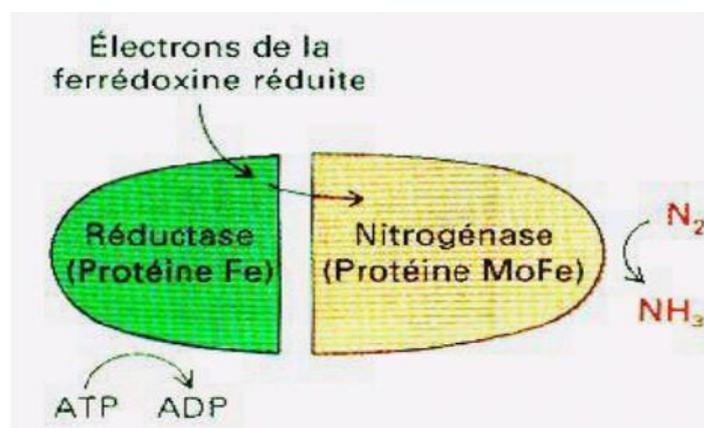


Figure 06: Représentation du complexe nitrogénase.

8. Génétique de nodulation et de fixation symbiotique d'azote chez les légumineuses

Les gènes qui participent aux interactions symbiotiques sont généralement localisés dans un grand plasmide chez les espèces de *Rhizobium* et dans le chromosome des souches de *Bradyrhizobium* (Raven et al., 2000). De nombreux gènes bactériens interviennent dans la nodulation de la plante (gènes *nod*) et dans le fonctionnement du nodule avec tous les gènes impliqués dans la fixation de l'azote (gènes *nif* et *fix*) (Werner, 1992). Les gènes *nod* sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes *nif* et les gènes *fix* sont regroupés dans 5 régions distinctes (Crossman, 2004).

8.1. Gènes *nod*

Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier, 2005).

8.2. Gènes *nif*

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le *Rhizobium* libre, ils sont au nombre de 20 (Dupuy et Nougier, 2005).

8.3. Gènes *fix*

Les gènes *fix* N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, *fix* G, H, I, S codent pour la pompe cationique, alors que les gènes *fix* A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Crossman, 2004).

Certains de ces gènes (*fix* L, *fix* J) sont des régulateurs de la synthèse du gène *nif* A, intervenant dans la régulation de la synthèse de la nitrogénase (Noel, 2009).

8.4. Gènes de la plante hôte

Ce sont des gènes spécifiques qui codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005).

Ces nodulines sont codées par des gènes *nod* localisés dans le génome de la plante hôte (Hopkins, 2003).

9. Les critères symbiotiques

Certaines plantes ont tiré bénéfice de la fixation biologique de l'azote bactérienne en mettant en place des interactions symbiotiques avec ces bactéries. Les familles de plantes concernées sont relativement rares et comprennent en particulier la majorité des plantes appartenant à la famille des Légumineuses, qui forment une symbiose avec un groupe de bactéries diazotrophes du sol, appelées Rhizobia (Mergaert, 2016).

Lorsque cette symbiose a lieu, elle présentent de nombreux avantages pour les deux partenaires car elle permet à la plante d'acquérir l'azote sous forme réduit, et au même temps au Rhizobia pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement (Raven et *al.*, 2000).

L'interaction entre les partenaires végétaux et bactériens mène à la formation d'un nouvel organe végétal : la nodosité. Cet organe héberge des millions de Rhizobia, qui vont y fixer l'azote atmosphérique et transférer l'ammonium à la plante qui l'utilisera pour sa croissance (Mergaert, 2016)

10. Les facteurs influençant la nodulation et la fixation symbiotique d'azote

10.1. Effet de la température, l'eau et la lumière

Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes (Cloutier et *al.*, 1992). L'effet des basses températures sur les Rhizobia est moins rapporté par rapport aux températures élevées (Lynch et Smith, 1993 ; Roughley, 1970).

La sécheresse inhibe la nodulation et la fixation azotée même chez les plantes inoculées (Zablotowicz et *al.*, 1981)

En condition de déficit hydrique, la croissance et la survie des Rhizobia sont affectées, la nodulation est réduite et le fonctionnement de nodules (fixation de N₂) est diminué . Les deux partenaires et toutes les étapes de l'établissement et de fonctionnement de la symbiose Rhizobia sont sensibles au stress hydrique (Dommergues et *al.*, 1999).

Une intensité lumineuse optimale est nécessaire pour obtenir la nodulation et la fixation de l'azote maximal. Par le biais de la photosynthèse qu'elle régit directement, la lumière intervient indirectement sur la fixation d'azote (Dommergues et Mangenot, 1970).

10.2. Effet de l'acidité et de la toxicité

La sensibilité des Rhizobia est variable, la tolérance des bactéries symbiotiques serait liée à leur aptitude à réguler leur pH cytoplasmique (Raddell, 1993).

Les premières étapes de l'infection racinaire sont très sensibles à l'acidité. La réduction de nodulation se manifeste très nettement lorsque le pH du sol est < 5.0 . L'acidité du sol provoque des troubles de la nutrition minérale, à la fois chez le rhizobium et chez la plante hôte (Skerman, 1982).

La toxicité du milieu (métal lourd, polluant,...) affecte moins gravement le microorganisme lui-même que la plante hôte ou le processus de fixation de N_2 , c'est le niveau de tolérance de la plante hôte à la substance toxique et non celui du microorganisme fixateur de N_2 qui détermine le seuil de fixation de N_2 (Dommergues et *al.*, 1999).

10.3. Effet des carences en nutriment

Les contraintes nutritionnelles peuvent également limiter la fixation symbiotique de l'azote en affectant la survie et la multiplication des Rhizobia, l'initiation, le développement et le fonctionnement nodulaire ainsi que la croissance de la plante hôte (Delgado et *al.*, 1994).

Le potassium ne favorise apparemment la nodulation qu'en présence de quantités suffisantes de phosphore. Une carence en soufre se traduit par une réduction de la fixation de l'azote ainsi que de l'intensité photosynthétique (Tibaoui et Zouaghi, 2003). Le magnésium est indispensable à la survie des Rhizobia dans le sol et à la fixation symbiotique (Dommergues et Mangenot, 1970). La carence en fer affecte la survie des Rhizobia (Elli et *al.*, 2000; Posey et Gherardini, 2000), la nodulation et la fixation de N_2 (Tang et Robson, 1992).

La symbiose légumineuse-Rhizobia est sensible aux carences en molybdène, en zinc, en cobalt et en bore (Dommergues et *al.*, 1999).

10.4. Effet de la salinité

En symbiose, le Rhizobia est plus résistant à la salinité que son partenaire végétal (Zahran, 2001). La tolérance de la plante hôte constitue donc un facteur déterminant (Soussi *et al*, 1998).

La salinité affecte l'initiation, ce développement et le fonctionnement des nodules ainsi que la capacité photosynthétique des feuilles (Rao *et al*, 2002). Généralement l'activité des nodules est plus touchée par le sel que la nodulation, mais l'étape la plus sensible à la présence du sel est le processus infectieux (Payakapong *et al*, 2006).

Cependant les travaux de Serraj *et al.* (1994, 1995) montrent que NaCl inhibe l'activité de la nitrogénase et la respiration des nodules en diminuant la disponibilité de l'oxygène (Serraj *et al.*, 1998)

10.5. Effet de l'azote disponible

La formation des nodules ainsi que la fixation de N₂ sont inhibés par l'azote disponible (azote nitrique et azote ammoniacal). Cette inhibition s'explique par le fait que la fixation de N₂ exige plus d'énergie que l'assimilation du nitrate ou de l'ammonium. L'azote disponible agit à différents niveaux, correspondant aux différentes étapes de l'infection, il peut y avoir: (i) réduction ou suppression de la production des substances inductrices (flavonoïdes, bétaines). (ii) impossibilité pour la bactérie de se fixer sur les poils absorbants, la quantité de lectines responsables de cette fixation étant réduite. (iii) réduction de l'excrétion des différents facteurs Nod. (iv) non perception par la plante du signal Nod (Mckay et Djordjevic, 1993; Schultze *et al*, 1994).

10.6. Effet des facteurs biologiques

Deux facteurs biologiques majeurs peuvent être impliqués. Le premier facteur consiste dans l'inadéquation des populations natives de Rhizobia compatibles avec le génotype de légumineuse que l'on souhaite planter. L'établissement de la symbiose est très sensible à de petites variations de la densité des populations natives compatibles. Le deuxième facteur concerne la présence d'ennemis et maladies. Parmi les ennemis, les nématodes affectent la symbiose fixatrice de N₂ en inhibant la nodulation et en limitant de façon drastique la fixation de N₂. La compétition des mauvaises herbes ou des rejets de souche peut affecter la légumineuse et, par conséquent leur aptitude de fixer N₂ (Dommergues *et al.*, 1999).

2^{ème} chapitre

Materiels et méthodes

1. Echantillonnage et site de collecte

La collecte des nodules est réalisée pendant la période de 01 janvier 2017 à partir des racines de la plante *Lupinus angustifolius* située dans la Wilaya d'El Taraf (Malleh) (Figure 07).

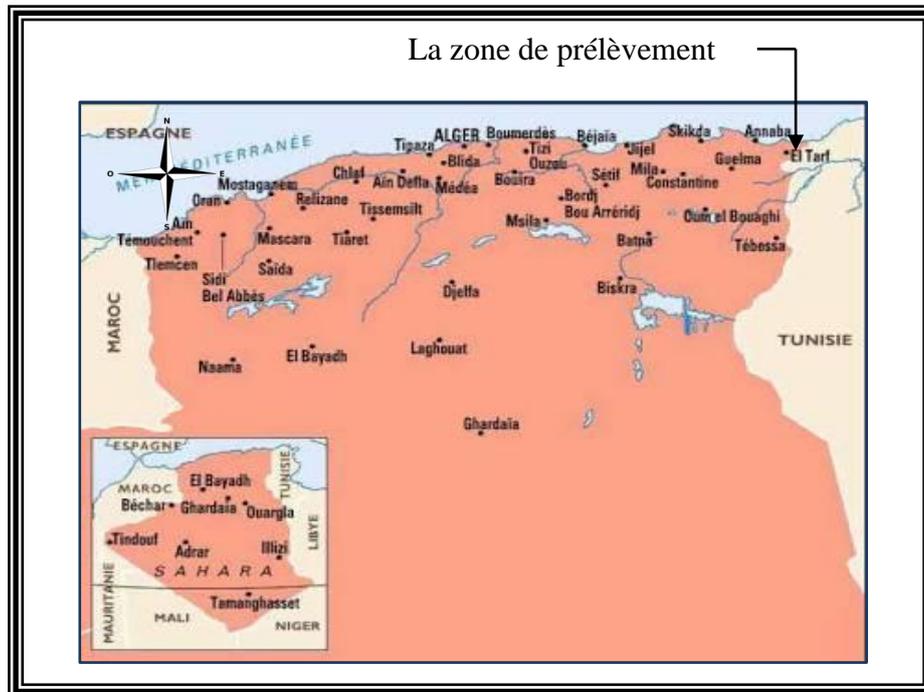


Figure 07: Localisation géographique de la zone de prélèvement



Figure 08 : Zone de prélèvement de *Lupinus angustifolius* (El Taraf – Malleh)

La collecte est réalisée selon la technique préconisées par Vincent (1970) : il s'agit de creuser environ 15 cm au tour de la plante et à 20 cm de profondeur dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement , on se débarrasse de la terre au niveau des racines avec précaution pour ne pas abimer les nodules . les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet.

Au laboratoire, les nodules séchés sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures pour un usage immédiat. Pour une longue conservation , il est recommandé d'utiliser un dessicateur spétial : le chlorure de calcium (CaCl₂) (Vincent,1970).

Sur chaque flacon sont mentionnées les informations suivantes :

- ❖ Nom de la plante hôte.
- ❖ Date de conservation.
- ❖ Date et lieu de prélèvement.

1.1. Analyse pédologique de l'échantillon de sol

L' échantillon de sol a été prélevé en surface du sol dans le site de collecte. Ces analyses nous permettons de déterminer la texture et le niveau de fertilité du sol elles représentent une importance dans la détermination des caractéristiques édaphiques relatives au site de collecte.

Le sol a subi des analyses : (granulométrie , mesure du pH , mesure de l' humidité).

1.1.1. pH

Le pH du sol est mesuré dans un rapport sol/solution = 1/2.5 . une première mesure est faite avec de l'eau, la seconde est effectuée avec une solution molaire de chlorure de potassium.

- pH eau : Il est déterminé par la méthode électrométrique (pH mètre), selon un rapport sol/eau = 1/2.5
- pH KCl : la mesure du pH eau ayant été effectuée , en ajoutant 1 g de KCl (Petard,1993)

1.1.2. Mesure de l'humidité

Nous avons pesé la boîte à tare contenant l'échantillon puis la mettre à l'étuve à 105°C. Après 48 heures, en pesant la boîte de nouveau (Petard,1993)

1.1.3. Granulométrie

Cet analyse est effectuée par la technique du boudin. Cette dernière consiste à prendre dans les mains une bonne poignée de sol humide et essayer de former un boudin (Delaunoy, 2006)

1.2. Isolement des souches à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés et placés dans l'eau distillée pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C, puis sont utilisés directement après une heure à température ambiante.

1.2.1. Stérilisation des nodules

Sous la hotte à flux laminaire, les nodosités sont immergées dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans le chlorure de mercure (HgCl₂) acidifié 0.1% pendant 3 minutes.

La stérilisation est suivie par un abondant rinçage à l'eau distillée stérile de 7 à 10 fois.

Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

1.2.2. Test de stérilisation

L'un des nodules stérilisés est l'ensemencer en le faisant passer sur le milieu YMA+Rouge Congo (Annexe 01), puis l'incuber à 28°C pendant 24 heures afin de confirmer la stérilisation.

1.3. Isolement selon la méthode des nodules écrasés

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile. On écrase le nodule à l'aide d'une pince stérile par immersion dans l'éthanol et flamage au bec Bunsen.

A l'aide d'une anse de platine, la suspension de nodule est étalée selon la technique des trois cadrants sur le milieu YMA+RC de manière à isoler des simples colonies. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 15 jours avec une vérification périodique.

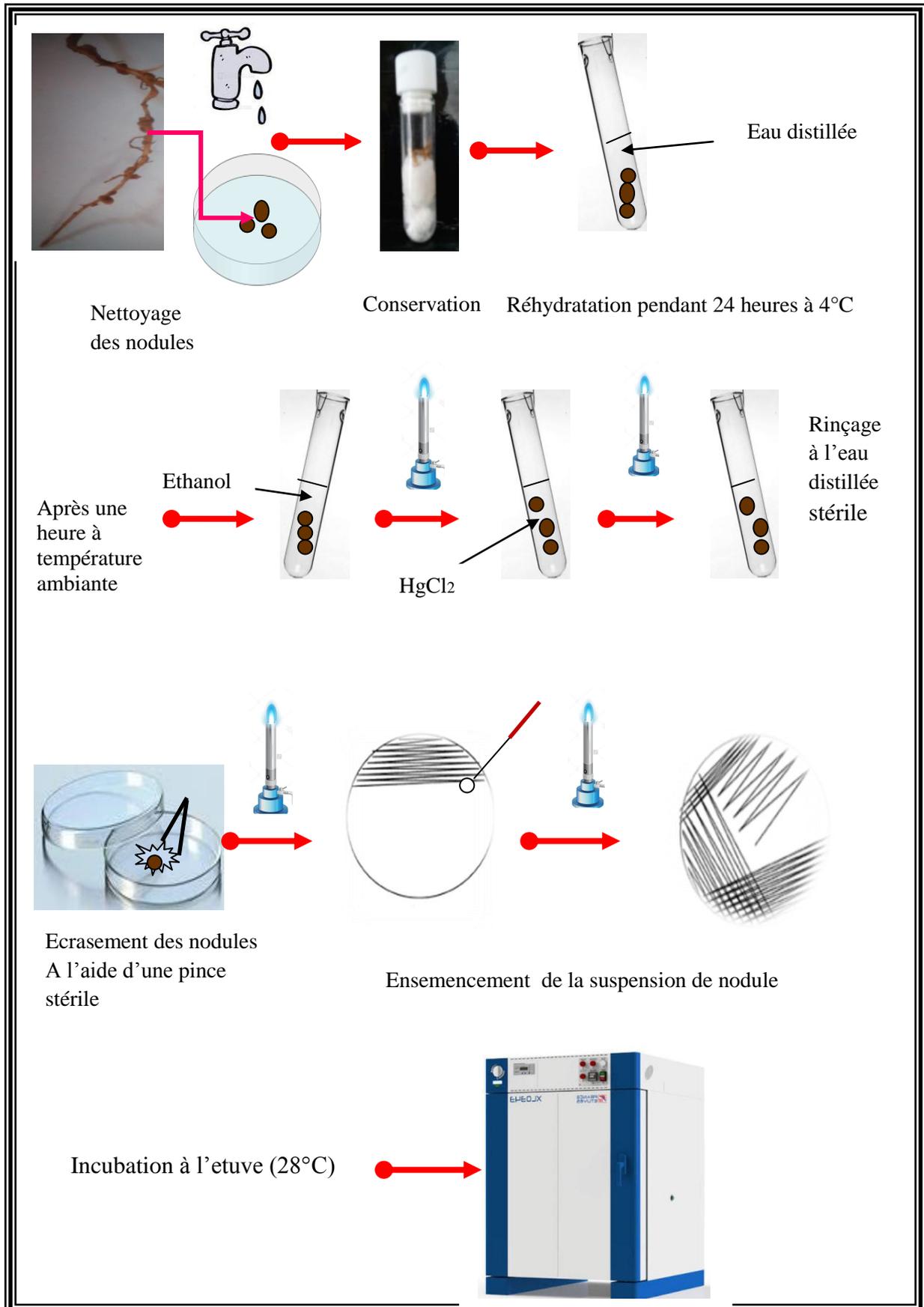


Figure 09 : Méthode de stérilisation et l'isolement selon la méthode des nodules écrasés.

1.4. Purification des isolats

La purification est réalisée par des repiquages répétés plusieurs fois, par des ensemencements sur milieu solide YMA (Annexe 01) et accompagnée par une coloration de Gram.

2. Caractérisation phénotypique des isolats

2.1. Caractères cultureux des isolats et examen microscopique

2.1.1. Croissance sur le milieu YMA

Un inoculum est ensemencé sur le milieu YMA et les caractéristiques morphologiques sont examinées au bout de 24 heures à 7 jours. Les principaux critères retenus sont : la taille des colonies, la forme, la couleur et l'opacité.

2.1.2. Test du BTB

Les *Rhizobia*, présentent deux types de croissance: les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...) (Jordan, 1984 ; Pagano,2008). Pour cela nos isolats et souches de référence sont cultivés sur le milieu YMA + bleu de bromothymol (BTB) (Annexe 01). Les bactéries à croissance lente montrent une réaction alcaline dans ce milieu qui fait virer sa couleur vers le bleu, alors que les bactéries à croissance rapide effectuent une réaction acide qui change la couleur verte du milieu en jaune(Somasegaran et Hoben, 1994).

2.1.3. Coloration de Gram

Des observations microscopiques sont réalisées sur des lames dont une préparation de culture en YMA est étalée en couche mince, séchée et fixée. Puis les lames subissent une coloration de Gram (Annexe 02).

2.1.4. L'état frais

Ce test permet de déterminer la forme et la mobilité des bactéries. L'observation se fait à l'aide de microscope optique (Annexe 02).

2.1.5. Test de la mobilité

Le caractère recherché est la mobilité des bactéries, elle évaluée en piquant le milieu mannitol- mobilité et incubation à 28°C.

2.1.6. Conservation des isolats

Les méthodes utilisées pour la conservation des souches bactériennes :

- ✓ La première méthode est la conservation sur YMA additionné de CaCO_3 (3g/l). Le milieu est réparti dans des tubes à essai et dans des tubes d'Eppendorf en formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 28°C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent,1970).
- ✓ La deuxième méthode est la conservation sur YMB (Annexe 01) additionnée de 50% (v/v) de glycérol. Les souches sont ensemencées dans des tubes d'Eppendorf et mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur de -20°C.

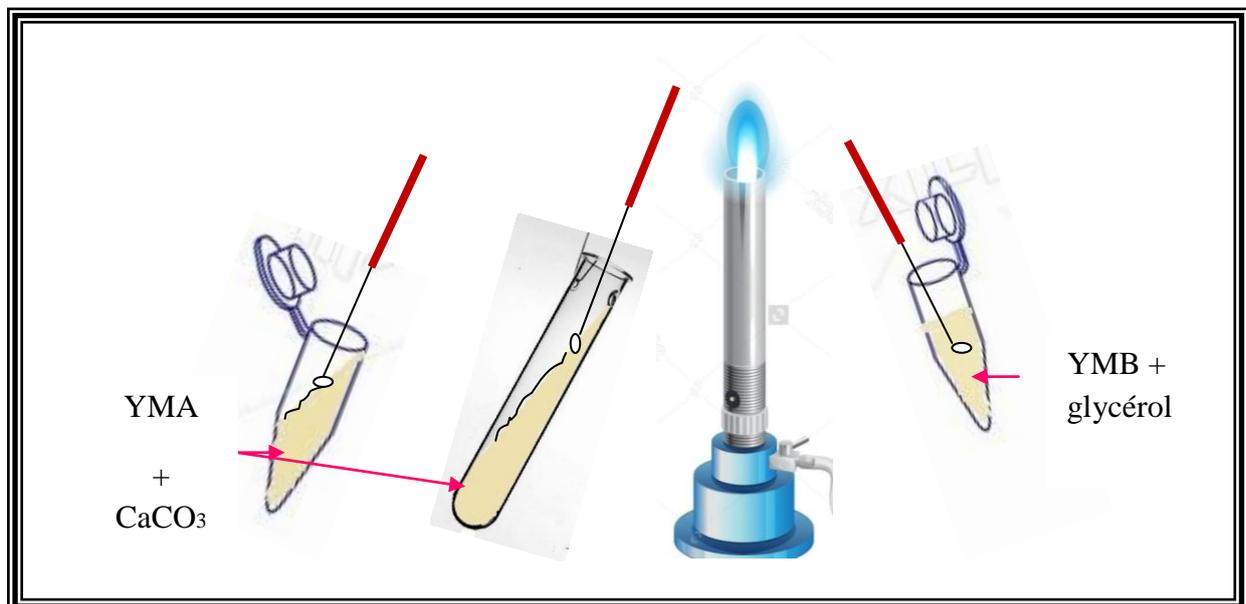


Figure 10: Méthodes de la conservation des isolats

2.2. Tests biochimiques

Le but est de rechercher la présence de diverses enzymes synthétisées par nos bactéries isolées et souches témoins qui jouant un rôle dans la symbiose tels que la cellulase,

et d'autres enzymes spécifiques nécessaires pour la croissance des *Rhizobia* dans le sol comme la nitrate réductase et l'uréase.

2.2.1. Réduction des nitrates

Les isolats et les souches témoins sont cultivées sur le bouillon TY (Annexe 01) contenant 0.1% de KNO_3 (p/v), et incubés pendant 4 jours à 28°C. Après la période d'incubation, 3 à 4 gouttes des réactifs I et II du nitrate réductase ont été ajoutés au milieu.

L'apparition d'une coloration rouge ou rose dans le milieu indique que les souches ont un nitrate réductase+ (les nitrates sont réduits en nitrites).

En absence de coloration, une pincée de la poudre de zinc est ajoutée au milieu. Si les nitrates sont toujours présents dans le milieu, ils vont être réduits sous l'effet du zinc et la coloration rouge apparaîtra, la réaction est donc réellement négative. Et si les nitrates ont été réduits par les souches en azote gazeux (N_2), le milieu ne contient plus les nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la couleur n'est pas modifiée (Euzéby, 2007; Delarras, 2007).

2.2.2. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats et souches témoins sont cultivées sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH (Jarvis et al., 1977).

La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,22 μm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C puis incubation à 28°C pendant 48 heures pour les souches qui ont une croissance rapide et 6 jours pour les isolats qui ont une croissance lente. La réaction positive se manifeste par un virage de couleur au rose violée (rose fuchsia).

2.2.3. Activité cellulolytique

Les souches sont mises en culture sur milieu YMA contenant 0.25% de CMC (Carboxy Methyl Cellulose) pendant 5 jours pour les isolats ayant une croissance rapide et 10 jours d'incubation pour les souches qui ont une croissance lente. Après incubation à 28°C, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 minutes à 28°C. La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1M ; les boîtes sont laissées 30 minutes à température ambiante puis vidées.

Un halo jaune-orangé entoure les colonies qui montrent une présence de l'enzyme (Struffi et *al.*,1997)

2.2.4. Activité pectinolytique

Le milieu de culture utilisé est semblable à l'YMA où le mannitol est remplacé par 0.1% d'inositol et 0.2% p/v de pectine (Na-polygalacturonate). L'incubation sera de 7 jours à 28°C. Après incubation, les boîtes sont rincées délicatement avec l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge de ruthénium 0.05% et laisser agir pendant 30 minutes.

Un halo décoloré autour des colonies indique une activité polygalacturonasique (Struffi et *al.*,1997).

2.2.5. La catalase

En déposant une colonie de chaque souches à analyser sur une lame en contact d'une goutte de H₂O₂. La réaction positive se traduit par la formation de bulles d'air.

2.2.6. L'oxydase

Ce test se réalise à l'aide de disques sur lequel en déposant une colonie. Le résultat positif se manifeste par l'apparition de la couleur violette.

2.3. Tests nutritionnels

2.3.1. Assimilation de la source de carbone

Les souches sont cultivées sur le milieu YMA où l'extrait de levure est remplacé par 0.1% de NH₄Cl et le mannitol est remplacé par 1% de l'un des sucres suivants : Maltose, Sorbitol, Galactose, Fructose, D-Xylose , D-Arabinose,D-Saccharose, D-Glucose, Lactose et un témoin avec le Mannitol.

Les boîtes sontensemencées et incubées à 28°C pendant 48 heures pour les souches qui ont une croissance rapide et 7 jours pour celles qui ont une croissance lente.

2.3.2. Utilisation de la source de l'azote

Pour ce test les souches sont cultivées sur le milieu YMA où l'extrait de levure est remplacé par l'un des acides aminés suivants : Glutamate , Glycine , L-Proline , L-Phénylalanine , L-Thréonine , L-Tryptophane , L-Lysine , L-Asparagine , Leucine , Histidine.

L'incubation des boîtes ensemencées à 28°C pendant 48 heures pour les souches qui ont une croissance rapide et 7 jours pour celles qui ont une croissance lente.

2.4. Tests physiologiques

La population bactérienne peut être influencée par plusieurs facteurs environnementaux comme le stress osmotique, stress acide et choc thermique.

La tolérance de nos isolats à ces différents facteurs a été évaluée par trois tests différents en présence des souches de référence.

2.4.1. Effet de pH

Les isolats et les souches témoins sont cultivés sur le milieu YMB ajusté à différents pH: 3.5, 5, 6.8, 7, 9, 10. La croissance des souches est estimée par la mesure de la DO à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6300) après 24 et 48 heures d'incubation à 28°C pour les souches qui ont une croissance rapide et pour les souches qui ont une croissance lente leurs temps d'incubation dure 7 et 8 jours. Les résultats sont comparés au témoin ajusté à pH 6,8.

2.4.2. Tolérance au chlorure de sodium

Les isolats et les souches témoins sont cultivés sur le milieu YMB à différentes concentrations de NaCl: 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%. La croissance bactérienne est estimée par la mesure de la densité optique à 600nm après 24 et 48 heures d'incubation à 28°C pour les souches qui ont une croissance rapide, 7 et 8 jours pour les souches qui ont une croissance lente.

2.4.3. Effet de la température

Les isolats et les souches témoins sont cultivés sur le milieu YMA et incubés à différentes températures: 4, 20, 28, 30, 37, 45 et 50°C.

Les lectures sont effectuées après 24 à 72 heures d'incubation pour les souches qui ont une croissance rapide et la lecture pour les souches qui ont une croissance lente dure à 6 jours. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

3^{ème} chapitre

Résultats et discussion

1. Echantillonnage

Dans ce travail nous avons étudié des isolats bactériens nodulant *Lupinus angustifolius* située dans la région Malleh- Wilaya d'El Taraf-.

En général, il existe deux types de nodules provoqués par les *Rhizobia* : les nodules déterminés caractéristiques des espèces tropicales (soja, haricot...) et les nodules indéterminés, retrouvés parmi les espèces des climats tempérés (pois, luzerne, trèfle...) (Ferguson et *al.*, 2010).

Dans notre cas les nodules pélevés été brunâtres , individuelles et des fois en amas , de forme sphériques, aux contours irrégulières de 0.2 à 0.6 cm de diamètre (Figure 11).

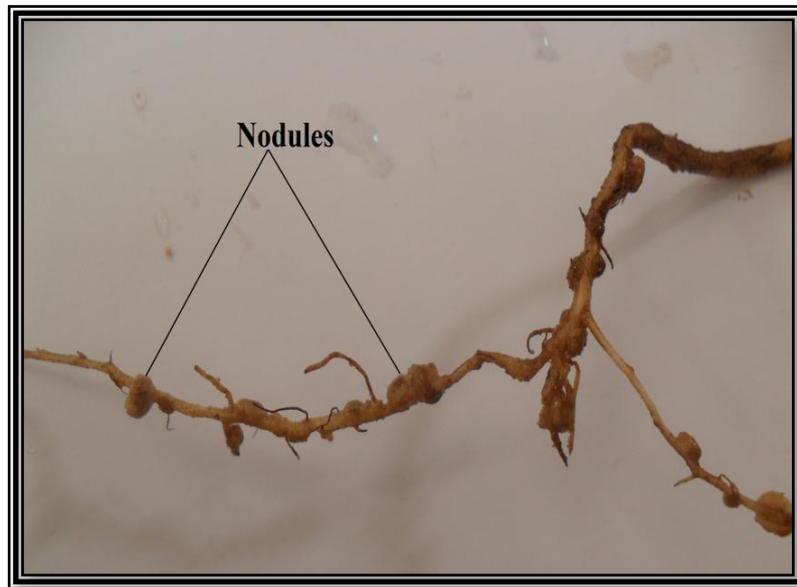


Figure 11: les nodules de *Lupinus angustifolius*

1.1. Analyse pédologique d'échantillon de sol

Les analyses pédologiques (physico-chimiques) d'un sol donné permettent d'apprécier la fertilité naturelle d'un sol, d'expliquer les différences de rendements et d'orienter les choix de cultures adaptées (Soltner,2005).

La disponibilité de BNL (bactérie nodulante legumineuse) dans le sol peut Changement en raison de l'histoire de l'utilisation des terres (Wedhastri,2013).

Le lupin ne tolère pas les sols ayant du calcaire actif. Du fait de sa forte sensibilité à l'excès d'eau, le lupin doit être cultivé dans des sols bien drainés. De plus, il faut éviter les

sols limoneux froids et battants l'acidité du sol : neutre ou légèrement acide (Bouttet et al., 2010).

Les résultats obtenus aux paramètres d'analyse du sol sont résumés dans le tableau 02.

Tableau 02: Résultats obtenus pour les paramètres d'analyse du sol de la station d'étude.

Paramètre	Paramètres physiques		Paramètres chimiques	
	Humidité (%)	Texture	pH eau	pH KCl
Echantillon				
Sol	0.11	Sableuse	6.58	6.23

1.1.1. Paramètres physiques

1.1.1.1. Humidité (H)

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le sol. Il est mesuré par rapport à la quantité de terre contenue dans un sol et exprimée en % (g H₂O/100 g de terre sèche). Le tableau 02 montre un pourcentage d'humidité égale à 0.11 pour le site étudié.

D'après certains auteurs le paramètre humidité nous permet de déterminer la capacité de rétention d'eau d'un sol donné, il est très intéressant à déterminer afin de pouvoir établir la meilleure stratégie d'irrigation des cultures (un sol à forte rétention d'eau nécessite une fréquence d'arrosage faible, une ou deux fois par semaine, par contre un sol à faible taux d'humidité en considérant que sa texture est légère voir sablonneuse nécessite de petites quantités d'eau pour l'arrosage tout en augmentant la fréquence de ces arrosages soit un jour sur deux) (ITAM, 1975).

1.1.1.2. Texture

Cette étude permet de déterminer les différents types de particule qui constituent le sol (sable, argile, limon,...). On détermine ces groupes selon les diamètres des particules. Notre résultat montre que *L. angustifolius* d'El Taraf pousse dans des sols sablonneux.

Le sol sableux , est un sol léger contient peu de nutriments, très drainant (l'eau et les nutriments s'évacuent très vite en profondeur). Il se réchauffe vite au printemps, a une structure instable (Hilliard et Reedyk ,2015).

En effet, des recherches ont montré que dans la culture en sols sablonneux, la productivité des plantes et l'efficacité symbiotique étaient de 5 à 8 fois inférieures que dans la culture hydroaéroponique (culture hors-sol utilisant des solutions nutritives et des substrats inertes) (Jebara et *al.*, 2001).

1.1.2. Paramètres chimiques

1.1.2.1. pH

L'activité du sol, tout comme la disponibilité de la majeure partie des éléments nutritifs dépend du pH (Bertschinger et *al.*,2003).

Le pH du sol a été déterminé selon deux manières :le pH à eau et le pH au KCl, le pH à eau déterminé à partir de la suspension du sol indique une valeur de 6.58 c'est-à-dire neutre. Le pH au KCl indique une valeur inférieure à celle du pH à eau. En Effet , le KCl ajouté à la suspension de sol permet la libération des protons adsorbés sur les argiles ce qui conduit à la diminution des valeurs du pH (Zahran,1999).

Selon Bordelon et Prévost (1994), la majorité des légumineuses nécessite des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficiente dans ce sol, ce qui est le cas de notre sol examiné.

Cependant, Tang et Robson (1996) ont rapporté que des valeurs de pH audessus de 6 ont un effet inhibiteur sur la nodulation chez le lupin.

1.2. Constitution d'une collection des Rhizobia

Nous avons adoptées dans notre travail sur des nodules où tenir compte de 4 isolats : LPR₁ , LPR₂ , LPB₁ , LPB₂ .

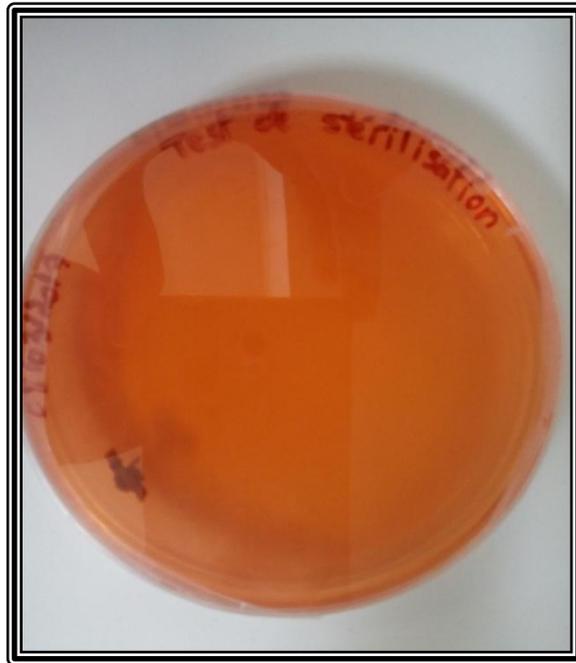
Les isolats ont été identifiés par comparaison avec des souches de référence *Rhizobium nepotum* et *Bradyrhizobium japonicum* (Tableau 03).

Tableau 03: Des données relatifs aux isolats et les souches de référence.

	Souches	Plante-hôte	Origine géographique	Source
LPRN	<i>Rhizobium nepotum</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>	El Tarf–Mallah Algérie	Mlle Mellal H
LPBJ	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine soja</i>	Granada- Espagne	Labotatoire de recherche Granada
LPB ₁	Notre étude	<i>Lupinus angustifolius</i>	El Tarf–Mallah Algérie	Cette étude
LPB ₂	Notre étude	<i>Lupinus angustifolius</i>	El Tarf–Mallah Algérie	Cette étude
LPR ₁	Notre étude	<i>Lupinus angustifolius</i>	El Tarf–Mallah Algérie	Cette étude
LPR ₂	Notre étude	<i>Lupinus angustifolius</i>	El Tarf–Mallah Algérie	Cette étude

1.3. Test de stérilisation

Ce test nous permet de vérifier que la technique utilisée pour la stérilisation des nodules a été efficace, et ceci se manifestera par l'absence de croissance de bactéries sur le milieu YMA+RC, ce qui a été le cas pour nos nodules (figure 12) .

**Figure 12:** Test de stérilisation

2. Caractérisation phénotypique des isolats de *Lupinus angustifolius*

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les *Rhizobia*, la base de la description formelle (Baldani et Baldani, 2005).

2.1. Caractérisation culturelle et cellulaire

2.1.1. La croissance sur le milieu YMA + RC

La mise en culture du broyat nodulaire sur milieu YMA + rouge Congo a donné des colonies absorbant très peu ou n'absorbant pas le rouge Congo, seules les colonies absorbant très peu ou ne l'absorbant pas sont prises en considération dans les manipulations ultérieures.

Le Rouge Congo est un indicateur qui peut être très utile pour différencier les *Rhizobia* des contaminants, en particulier des bactéries Gram-positives, car les bactéries nodulaires n'ont pas tendance à absorber le colorant (Howieson et al., 2016).

2.1.2. La croissance sur le milieu YMA

La croissance sur le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) est décelable au bout de 24 à 48 heures d'incubation à 28°C pour les isolats LPR₁ et LPR₂ alors que les isolats LPB₁ et LPB₂ l'incubation peut atteindre 7 jours, donnant ainsi des colonies circulaires de taille variable, lisses, convexes, de couleur blanchâtre ou crème avec un aspect brillant et une texture translucide pour les deux souches (LPR₁ et LPR₂) et pour les deux autres souches (LPB₁ et LPB₂) apparaissent des petites colonies circulaires, lisses, convexes, de couleur blanchâtre avec une texture opaque (Figure 13).

On remarque que les colonies de les isolats LPR₁ et LPR₂ ont les mêmes critères des colonies de la souche de référence LPRN. Les colonies de deux autres souches isolées LPB₁, LPB₂ et la souche de référence LPBJ elles ont le même aspect.

Le genre *Rhizobium* est caractérisé par des colonies qui sont généralement visibles en 48 heures elles ont une croissance rapide. Les colonies sont blanches ou beiges, circulaires, convexes, semi-translucides ou opaques, élevées et mucilagineuses. Les brins gommeux ne respectent généralement pas la boucle, mais la variation est évidente selon le genre hôte de 2 à 4 mm de diamètre dans les trois à cinq jours sur YMA.

Pour le genre *Bradyrhizobium* les colonies ont une croissance lente et translucides à première apparition avec moins de 1 mm de diamètre (environ six à dix jours), mais fortement opaques et tendant à un gris foncé avec une maturité supplémentaire. Récemment gommeux. *Bradyrhizobium japonicum* peut atteindre 1-3 mm après cinq à huit jours, immédiatement opaque et élevé (Howieson et al., 2016).

2.1.3. Test du BTB

Le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH s'étend de 6 à 7,6 .

Pratiquement 50% de nos isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB et virent le milieu vers le jaune après 24 heures d'incubation, ils s'agit des souche a croissance rapides (LPR₁et LPR₂) y compris la souche de référence LPRN .

Les autres souches qui restent (LPB₁et LPB₂) et la souche de référence LPBJ virent le milieu vers le bleu après une durée de 5 jours (Figure 14).

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (Jordan, 1984., Beck et al., 1993., Pagano, 2008).

La croissance bactérienne sur un milieu liquide ou solide peut entraîner des changements importants et rapides du pH en raison du métabolisme.

Le changement de pH sur le milieu (avec indicateur bleu de bromthymol) causé par le métabolisme rhizobial. Les souches ont acidifié le milieu, en le tournant du jaune , ou ont provoqué une réaction alcaline ,en tournant l'indicateur bleu (Howieson et al., 2016).

Donc, on peut dire que les deux isolats LPR₁ et LPR₂ appartiennent au genre *Rhizobium* et les isolats LPB₁ et LPB₂ au genre *Bradyrhizobium*.

2.1.4. Coloration de Gram

Pour vérifier que nos culture bactériennes sont pures et voir meme le mode de regroupement ,une coloration de Gram a été réalisée, pour avoir visualiser les bactéries au microscope optique .

La coloration de Gram révèle des cocobacilles avec une exrimité bien arrondie , Gram négatif (rose) pout tous nos isolats y compris les souches de référence (Figure 15).

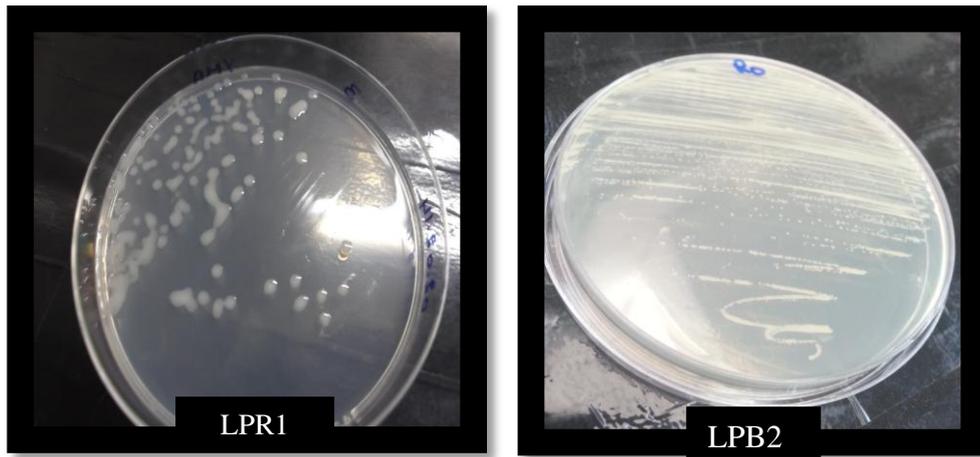


Figure 13: Croissance bactérienne de différents isolats sur le milieu YMA

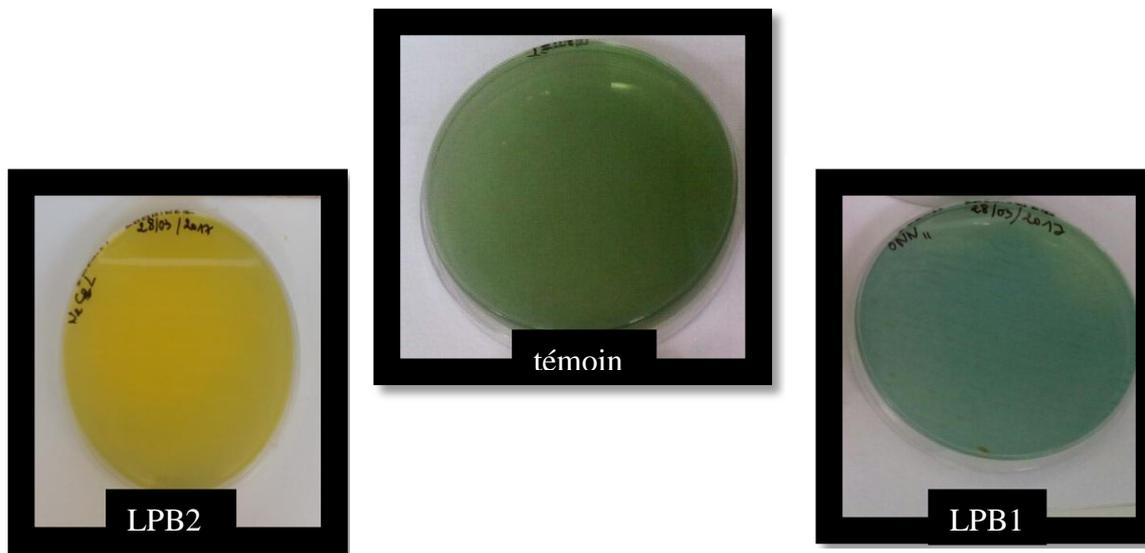


Figure 14 : La croissance des différents isolats sur le milieu YMA+BTB en comparant avec le témoin.

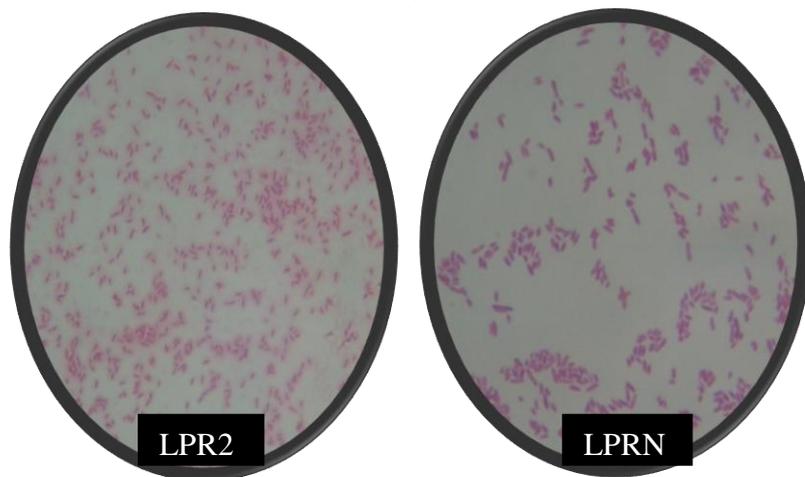


Figure 15: Observation microscopique de l'isolat (LPR2) et la souche de référence (LPRN) (objectif x 100) après coloration de Gram.

3.1.5. Etat frais

L'examen à l'état frais montre que nos isolats et les souches témoins sont des cocobacilles mobiles.

les cellules de *Rhizobium* sont généralement mobiles dans les cultures de bouillon frais qui peuvent être examinées au microscope. Bien que les flagelles bactériens ne soient pas visibles avec le microscope optique (Noel, 2009).

2.1.6. Test de la mobilité

Sur le milieu mannitol mobilité, tous les isolats ainsi que les souches de référence ont montré une réaction positive (migration d'un trouble dans le milieu) c'est une caractéristique des *Rhizobia* (Vincent, 1970).

La croissance sur des composés comme les sucres (par exemple le glucose ou le saccharose) ou des alcools de sucre (par exemple le mannitol) entraîne une acidification (pour les cultivateurs rapides) (Howieson et al., 2016).



Figure 16 : La mobilité des différentes souches sur le milieu mannitol-mobilité.

2.2. Tests biochimiques

Le but est de rechercher la présence de certains enzymes qui jouent un rôle lors du processus d'infection (nodulation) des racines par les bactéries, particulièrement, la cellulase, pectinase, la nitrate-réductase et à un degré moindre l'uréase.

L'inoculation de Rhizobia peut affecter sélectivement et différemment l'activité enzymatique en fonction du type d'enzyme et la phase de croissance des plantes (Siczek et Lipiec, 2016)

2.2.1. Réduction des nitrates

Ce test est pour la réduction du nitrate dans les milieux nitrés, pour déterminer si les bactéries contiennent du nitrate et / ou de la nitrite réductase (Tankeshwar, 2015).

Dans le sol, l'azote est présent principalement sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) et sous formes d'oxydes d'azote, les ions nitrates (NO_3^-) ou nitrites (NO_2^-).

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites, qui donnent une réaction colorée rouge en présence des deux réactifs.

Après 4 jours d'incubation l'addition de 3 à 4 gouttes des réactifs 1 et 2 du nitrate réductase a montré un virage de la couleur du milieu au rouge chez les deux isolats LPR₁, LPB₁ et la souche de référence LPRN, indiquant que le nitrate a été réduit en nitrite, à l'exception des isolats LPR₂, LPB₂ et aussi la deuxième souche de référence LPBJ dont le milieu est toujours inchangé (Figure 17). Après quelques minutes de cette addition de la poudre de zinc, qui joue le même rôle que le nitrate réductase, n'a montré aucun virage de la couleur, donc le milieu ne contient plus les ions nitrates indiquant ainsi un résultat positif.

Si aucune couleur rouge ne se forme il n'y avait pas de nitrate à réduire. Comme il n'y avait pas de nitrite présent dans le milieu, cela signifie que la dénitrification a eu lieu et de l'ammoniac ou de l'azote moléculaire ont été formés (Tankeshwar, 2015).

Ce résultat est similaire à celui d'El Hilali (2006) qui a révélé la capacité de 52% des souches isolées du lupin à réduire le nitrate.

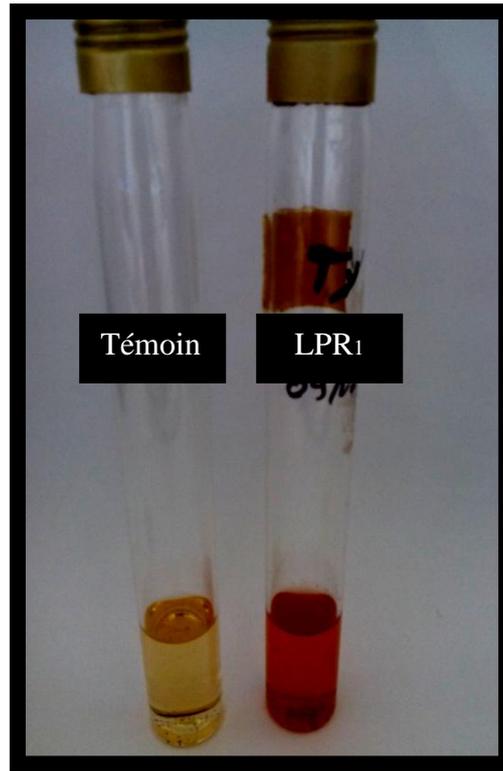


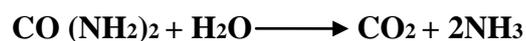
Figure 17 : Réduction des nitrate par l'isolat LPR1.

2.2.2. Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des *Rhizobia* à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis et *al* (1977), en utilisant le Rouge de Phénol comme indicateur de pH. Lorsque les souches augmentent le pH suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par changement de la couleur.

Le milieu contient de l'urée, et si la bactérie produit de l'uréase ceci va provoquer une alcalinisation du milieu. L'alcalinisation va faire virer l'indicateur coloré du jaune-orange vers le rose (Bibirou,2016).

Ce qui indique l'alcalinisation du milieu par conséquent la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998), selon la réaction suit :



Urée

ammoniac

Toutes les souches isolées et les souches de référence ont une activité uréasique positive et alcalinisent le milieu en observant un virage de la couleur de l'indicateur de pH du

rouge vers le rose, après une durée d'incubation différente , 4 jours pour les souches a croissance rapide et 7 jours pour celles qui sont lentes (Figure 18) .

Des niveaux modérés de l'activité de l'uréase ont été détectés chez *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* UPM791 . les niveaux inférieurs de l'activité de l'uréase ont été détectés également au niveau des bactéroïdes du pois (Toffanin et *al.*, 2002).

2.2.3. Activité cellulolytique

Les boites contenant nos isolats et les deux souches de référence sont mise sur un fond blanc qui nos a permis de constater l'halo jaune orangé qui traduit l'activité cellulolytique.

Tous nos isolats et les souches témoins sont capables d'hydrolyser le cellulose qui représente le constituant fibreux de la paroi végétale, c'est ainsi que les bactéries ont la capacité de pénétrer et infecter les racines (Figure 19).

Les résultats obtenus dans cette étude ont été concordants avec ceux obtenus par d'autres études précédentes, qui ont montré la capacité des rhizobactéries à produire la cellulase (Oliveira et *al.*, 2007, Sudto et *al.*, 2008).

On peut dire que, l'activité des enzymes cellulolytiques dépend de l'origine de lasouche et de la composition des milieux de culture (Howieson et *al.*,2016).

D'autres auteurs ont montré que le *Rhizobium* produit l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilite aux *Rhizobium* de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos et *al.*,1992).

Actuellement l'activité de la cellulase est trouvé chez plusieurs espèces Rhizobiales : *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* , *B japonicum* , et les différentes souches de *R leguminosarium* (Baumberger et *al.* ,2002).

En effet, cette enzyme peut aider certaines rhizobactéries notamment les *Rhizobium* à pénétrer plus facilement dans l'espace intercellulaire de la cellule racinaire et induire l'infection symbiotique des racines de légumineuses (Robledo et *al.*,2012).

2.2.4. Activité pectinolytique

Après 7 jours d'incubation et après addition du rouge de ruthénium (0.05%) et le rinçage avec de l'eau , un halo clair est observé autour des colonies indiquant une réaction positive. Nos isolats et les deux souches de référence ont une activité polygalacturonasique (Figure 20).

Ljunggren et Fahraeus (1961) ont proposé que les *Rhizobium* stimulent les plantes à produire des polygalacturonases , qui vont dégrader la paroi au site d'infection facilitant la pénétration du Rhizobia entre les microfibrilles de la membrane cellulaire (Molina et al.,1979 et Mateos et al.,1992).

Krehenbrink et al (2008) ont confirmé que *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* secrète des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques qui peuvent contribuer à éroder les parois des cellules végétales favorisant l'infection.

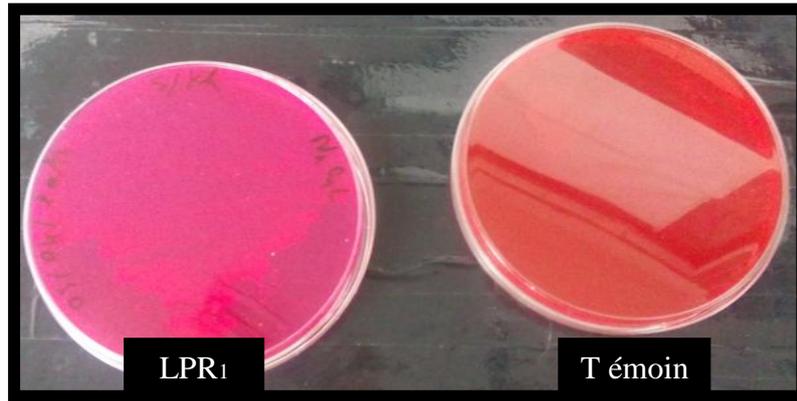


Figure 18: Résultat de l'hydrolyse de l'urée de l'isloat LPR₁

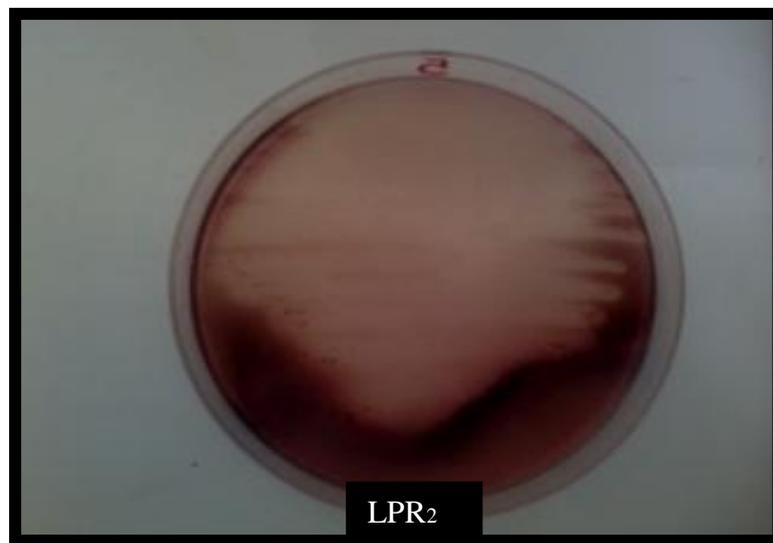


Figure 19: Activité Cellulosique des isolats LPR₂ .

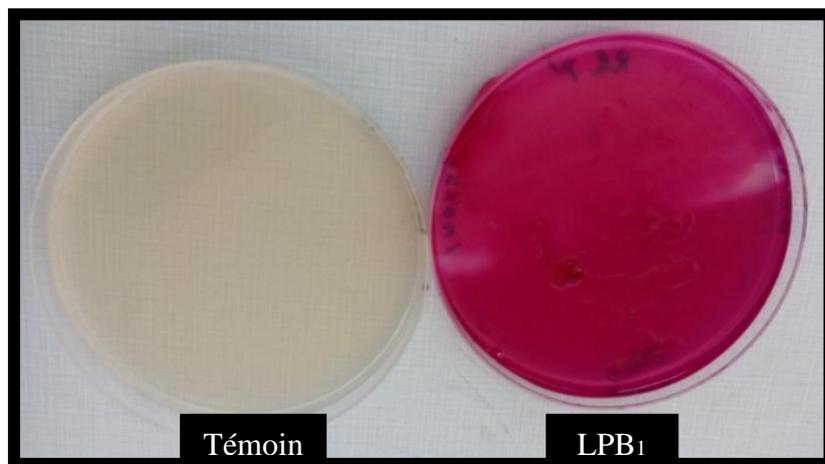
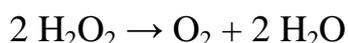


Figure 20 :Activité pectinolytique de l'isolat LPB₁

2.2.5. Catalase

Ce test démontre la présence de la catalase, une enzyme qui catalyse la libération d'oxygène du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La présence de l'enzyme dans un isolat bactérien est évidente lorsqu'un inoculum est introduit dans le peroxyde d'hydrogène et l'élaboration rapide de bulles d'oxygène se produit. L'absence de catalase est évidente par un manque ou une faible production de bulles. La culture ne devrait pas dépasser 24 heures (Aryal, 2015).



Les deux souches LPR₁ et LPR₂ donnent un résultat positif (par une apparition de bulle d'air sur la lame après l'ajout de H_2O_2) qui signifie qu'elles possèdent cet enzyme de catalase. L'absence de catalase est évidente par un manque ou une faible production de bulles (résultat négatif), le cas des autres souches ainsi les souches de références.

2.2.6. Oxydase

Ce test permet de mettre en évidence l'enzyme cytochrome oxydase des bactéries. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, l'enzyme de la bactérie oxyde le réactif phénylènediamine pour former un composé violet, l'indophénol (Bibirou, 2016).

Le transport d'électrons terminaux est généralement à O_2 via une variété de systèmes à base de cytochrome. Certaines souches peuvent utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons terminal et obtenir une croissance anaérobie limitée (Howieson et al., 2016).

Tous les souches développent une couleur bleu violette sur les disques dans 5-10 secondes, qui indique la production d'oxydase (Tableau 04).

Tableau 04 : Résultat de réaction de la catalase et de l'oxydase sur les souches étudiées.

Test souche	Résultat du test de la catalase	Résultat du test de l'oxydase
LPR ₁	+	+
LPR ₂	+	+
LPRN	-	+
LPB ₁	-	+
LPB ₂	-	+
LPBJ	-	+

2.3. Tests nutritionnels

la plupart des *Rhizobia* ne sont pas particulièrement exigeants dans leurs besoins nutritionnels (Westhoek et al.,2017).

2.3.1. Assimilation de la source de Carbone

Les résultats montrent que la croissance de nos différents isolats y compris les souches de référence est variable selon le sucre rajouté (Tableau 05 , Figure 21).

Lui et al (2005), ont constaté qu'il existe des différences entre les souches de rhizobia dans leur aptitude à assimiler les différents hydrates de carbone ce qui est en parfait accord avec nos résultats qui montrent que l'ensemble de nos isolats utilisent la majorité des sucres testés comme seule source de carbone mais avec une fréquence de dégradation variable.

Tan et al (1999) ont trouvé que toutes leurs isolats utilisent le mannitol comme seule source de carbone, également dans notre cas on remarque que le Mannitol est le substrat carboné le mieux dégradé par nos isolats et les deux souches de référence qui affichent une très bonne croissance en présence de ce dernier, suivi par le Glucose, Xylose et le Sorbitol.

Pour ce qu'est du reste des sucres le Lactose , Arabinose et le Galactose l'ensemble de nos isolats leurs présentent une affinité plus au moins variable qui s'affichent par une dégradation de ces derniers allant de moyenne a faible mais qui reste présente.

Nos isolats et les deux souches de référence n'ont pas la capacité à croitre en présence du Maltose .

Les deux isolats LPR₁ et LPR₂ affichent une incapacité à pousser en présence du Saccharose contrairement à les autres isolats et les souches témoins.

Le fructose est dégradé que par l'isolat LPR₁ et par une soule souche de référence LPRN.

L'utilisation des sucres peut fournir les caractères différentiels pour l'identification des espèces (Allen et Allen,1950). Selon Graham (1964), les bactéries à croissance rapide présentent une bonne assimilation vis-à-vis des substrats carbonés par rapport aux bactéries à croissance lente.

Seuls les groupes à croissance rapide métabolisent les sucres C12 comme le saccharose .Cependant, il existe des exceptions et certaines espèces ne poussent pas sur des classes particulières de composés carbonés. De nombreuses espèces de *Bradyrhizobium* ne se développent pas sur les disaccharides. Il est également important de reconnaître que certaines souches ont des activités métaboliques assez particulières (Howieson et al.,2016).

Tableau 05: Assimilation des différents sucres par les isolats et les souches de référence après 48 heures d'incubation.

souche \ sucre	LPR ₁	LPR ₂	LPRN	LPB ₁	LPB ₂	LPBJ
Mannitol	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Maltose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+++	+/-	+/-	+
Galactose	+/-	+/-	+	+	+/-	+
Fructose	+/-	-	+	-	-	-
Xylose	+	++	+++	++	++	++
Arabinose	+/-	+/-	+	-	-	-
Saccharose	-	-	+	+/-	+/-	+/-
Glucose	+++	+++	+++	++	++	++
Lactose	+/-	+/-	++	+/-	+/-	+/-

(+++): très bonne croissance, (++) : bonne croissance, (+) : moyenne croissance, (+/-) : faible croissance, (-) : pas de croissance.

Remarque

Pour les deux isolats LPB₁ et LPB₂ et la souche de référence LPBJ après 7 jours d'incubation avoir une croissance pour les sucres Sorbitol, Galactose et Xylose. Et 3 jours d'incubation pour les sucres Saccharose, Glucose et Lactose.

2.3.2. Utilisation de la source d'azote

La croissance des souches sur le milieu diffère selon la source d'azote est variée, on remarque que presque toutes les isolats y compris les souches de références ont la capacité à croître en présence de la majorité des acides aminés testés (Tableau 06, Figure 22). Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994) ont constaté que beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les *Rhizobia*.

Majoritairement tous nos isolats ou encore les souches témoins ont une bonne croissance avec le L-Proline, L-Thréonine, Histidine, L-Asparagine et le Glutamate (à propos du Glutamate seules les deux souches LPB₁ et LPB₂ n'utilisent pas cet acide aminé comme une seule source d'azote) suivie par une croissance un peu plus moindre pour le L-

Lysine , Leucine et le L-Phényalanine (à propos du L-Phényalanine seule la souche LPB₂ n'utilise pas cet acide aminé comme une seule source d'azote).

Pour la Glycine est utilisée que pour une seule isolat LPR₁ et une souche de référence LPRN contrairement pour le L-Tryptophane qu'il n'existe aucune croissance pour nos trois isolats LPR₁ , LPB₁ et LPB₂.

Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Jordan,1984).

La croissance de certains acides aminés comme seule source d'azote peut provoquer des changements marqués dans la morphologie cellulaire. Par exemple, la croissance de *Rhizobium leguminosarum* sur l'histidine produit des cellules presque coccoïdes (Howieson et al., 2016).

Tableau 06: Assimilation des différents acides aminés par les isolats et les souches de référence après 48 heures d'incubation.

souche acide aminé	LPR ₁	LPR ₂	LPRN	LPB ₁	LPB ₂	LPBJ
L-Proline	+++	+++	+++	+/-	+/-	+/-
Glutamate	+++	+++	+++	-	-	+/-
L-Thréonine	+++	+++	+++	+/-	+/-	+/-
Histidine	+	+++	+++	++	++	++
L-Asparagine	++	+++	++	++	+/-	++
L-Lysine	++	++	+	+/-	+/-	+/-
Glycine	+/-	-	+/-	-	-	-
Leucine	+	++	++	-	-	+
L-Phényalanine	+	+++	++	+	-	+
L-Tryptophane	-	+/-	+++	-	-	+/-

(+++): très bonne croissance , (++) : bonne croissance , (+) : moyenne croissance , (+/-) : faible croissance , (-) : pas de croissance.

Remarque

Pour les deux isolats LPB₁ et LPB₂ et la souche de référence LPBJ après 4 jours d'incubation l'apparition de croissance pour les acides aminés Histidine ,L-Asparagine et L-Lysine.

Et seulement pour la souche LPBJ, la croissance a observé après 3 jours d'incubation pour les 3 acides aminés : Leucine, L-Phényalanine et L-Tryptophane, et après 6 jours d'incubation pour l'isolat LPB₁ pour L-Phényalanine.



Figure 21 : utilisation des différentes sources de carbone par les différents isolats et les souches témoins.

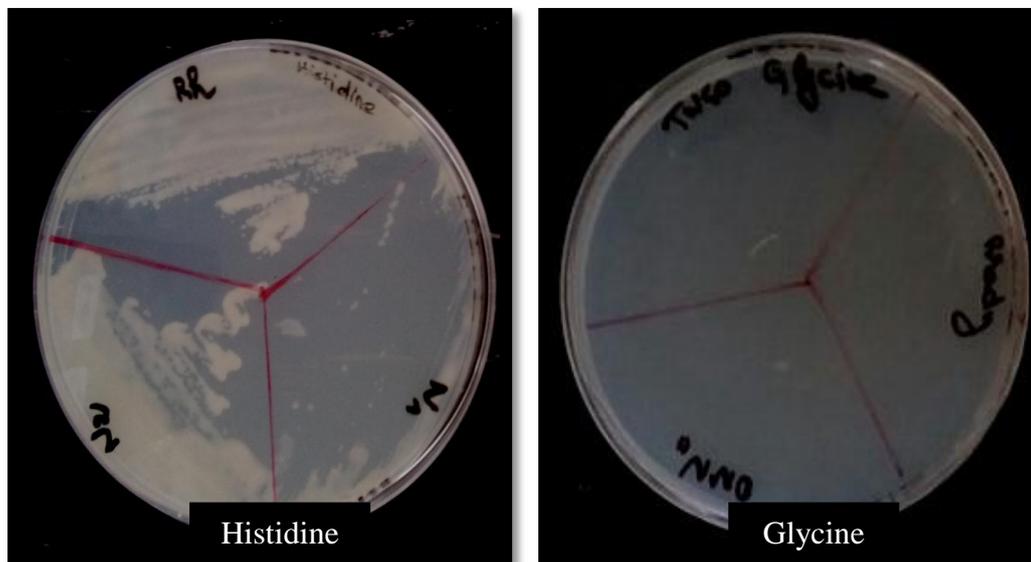


Figure 22 : utilisation des différentes sources d'azote par les différents isolats et les souches témoins.

2.4. Tests physiologiques

Ces tests , nous relatons des résultats d'expériences visant à étudier la réponse des isolats collectées dans des sols d'El Taraf (Malleh) aux stress de l'environnement naturel.

En ce qui concerne la symbiose légumineuses-bactéries, le facteur susceptible d'entraver la fixation d'azote n'est généralement pas l'absence de souches bactériennes efficaces, mais un ou plusieurs facteurs écologiques qui en limitant les potentialités (Alexander,1985).

Les divers stress biotiques et abiotiques peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des *Rhizobia* à l'état saprophytique (en absence de la plante hôte). Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation , ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose (Hirsh, 1996)

Le rôle de microorganismes dans l'adaptation des cultures à divers stress abiotiques est examiné par Grover et *al.* (2010).

2.4.1. Effet de pH

L'effet de pH montre que les souches testées varient dans leurs tolérances aux différents pH. En effet, les souches témoins sont capables de pousser dans une gamme de pH allant de 3.5 à 10 avec un optimum de croissance est observé à pH 6.8, alors que les souches isolées peuvent survivre dans l'intervalle allant de 5 à 10 avec un optimum de croissance est remarqué à pH 6.8 (Figure 23).

Les souches témoins peuvent survivre dans les pH acides (pH 3.5) donc, sont considérées comme des souches tolérantes à l'acidité. Ce résultat concorde avec ceux enregistrés par Maatallah et *al.*(2002) qui ont détecté la croissance de leur isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0 et pH supérieur à 7.5. Ainsi Raza et *al.*(2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10).

Graham et Parker (2009) ont montré que le pH bas critique pour la croissance de *Bradyrhizobium japonicum* et de *Rhizobium lupini* est compris entre 4 et 6.

Pour de nombreux *Rhizobia*, le taux de croissance diminue lorsque le pH diminue au-dessous de 6.5 (Howieson et *al.*,2016).

Le *Rhizobium* montre une croissance maximale à pH 7 (Rajeswari ,2017)

2.4.2. Tolérance au chlorure de sodium

Nous avons testé la résistance au sel de toutes les isolats ainsi que les souches de référence en évaluant leur croissance en présence de concentrations croissantes de NaCl.

Il a été démontré que le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-Rhizobia en inhibant le processus d'infection ainsi que le développement des nodules (Farissi et *al.*, 2014) En général, les premières étapes de la nodulation sont les plus sensibles au stress salin.

Au bout des premières 24 heures d'incubation jusqu'à 48 heures pour les isolats qui ont une croissance rapide et 7 à 8 jours pour celles qui ont une croissance lente, la majorité de nos isolats ainsi que les souches témoins poussent en présence des différentes concentrations de NaCl varient de 0.5 %, 1%, 2%, 3%, 5%, 10% (Figure 24).

Une excellente croissance pour toute les souches étudiées ainsi que les souches de références à 0.5%, nos isolat poussent en présence de 1% et 2% ils sont viables aussi au 3%, 5% de NaCl avec des taux variables.

les souches des sols sénégalais tolèrent des concentrations en sel supérieures à 2%, alors que celles des sols de Tunisie sont inhibées à des concentrations de 1% (Cacciari et *al.*, 2013).

Toute fois, un développement a une concentration saline plus élevée (10%) a été remarqué pour les isolats LPR₁, LPB₁, LPB₂ et la souche témoin LPBJ par contre l'isolat LPR₂ et la souche de référence LPRN sont inhibées par cette concentration.

Ce qui est remarqué par les travaux de (Zahran *et al.*, 1994; Raza *et al.*, 2001) que des niveaux de tolérance à la salinité beaucoup plus élevés ont été notés avec souches rhizobiales nodulant le Lupin (Zahran *et al.*, 1994; Raza *et al.*, 2001).

Presque 40% des terres dans le monde sont considérées comme ayant des problèmes de salinité et la plupart de ces terres sont situées dans les régions sahariennes, les régions tropiques et méditerranéennes (Koull et *al.*, 2013).

Il a été démontré que le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-Rhizobia en inhibant le processus d'infection ainsi que le développement des nodules (Farissi et *al.*, 2014).

Il faut aussi noter que les *Rhizobium* qui sont en symbiose avec les légumineuses sont plus sensibles au stress salin que ceux vivant à l'état libre. Par conséquent, les souches

rhizobiennes se révélant halotolérantes *in vitro* peuvent s'avérer ineffectives sur terrain (Hernandez, 2005).

2.4.3. Effet de la température

Une tolérance à 42,5 °C a été fréquemment signalée pour *R. meliloti*. Une résistance à des températures variant entre 44 °C à 47 °C chez certaines souches isolées au Kenya et au Soudan a même été observée. La température optimale pour la croissance des *Rhizobia* varie selon la zone climatique où ils sont isolés. L'adaptation à des températures au-dessus de 40 °C peut permettre à certaines souches isolées au Sahel nigérien de maintenir et parfois d'augmenter l'activité de fixation symbiotique de l'azote .

De nombreuses souches de *Rhizobia* isolées de sols sahéliens sénégalais et tunisiens ont été étudiées. Nos résultats montrent que les souches sont capables de se multiplier à 40 °C et même à 45 °C pour cinq d'entre elles; selon l'étude de Cacciari en 2013 (Cacciari et al.,2013).

les résultats montrent que la plupart des isolats sont capables de croître variablement à des températures différentes allant de 4°C jusqu'à 45°C .

Un optimum de croissance entre 20 et 30°C et un développement moins important pour toute les souches à 37°C et s'annule pour l'isolat LPB₂ (Tableau 07) (Figure 25).

Pour la plupart des *Rhizobia*, la température optimale de croissance est comprise entre 28 et 31°C et de nombreuses rhizobia sont incapables de croître à 38°C (Zahran 2001; Al Sherif et al., 2004 ;Thami et al., 2010)

À 4°C, les isolats LPR₁, LPR₂ ont montré une croissance en 4 jours, Le comportement de nos souches à cette temperature est en accord avec ce qui a noté par Hillali (2006), les souches isolées dans les régions (Marrakech) tolèrent la température de 4°C.

Toutefois certains isolats tels que LPR₁et la souches de référence LPRN(après 5 jours d'incubation) sont capables de pousser à 45°C.

On remarque que nos isolats ainsi que les deux souches de référence n'ont pas la capacité de croître à 50°C.

Les souches qui résistent aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique, cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räzänen, 2002).

Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes (Hume *et al.*,2000)

L'étude de Lynch et Smith (1993) ont montré que Les plantes soumises à une température de 15 °C dans la zone racinaire n'ont fixé que 9 % de l'azote fixé par les plantes qui étaient à une température de 25 °C.

Tableau 07 : Effet de la température sur la croissance de nos isolats et les souches de référence.

température \ souche	4°C	20°C	28°C	30°C	37°C	45°C	50°C
LPR ₁	+	+	+++	+++	++	-	-
LPR ₂	+	+++	+++	+++	++	+	-
LPRN	-	++	+++	+++	+	+	-
LPB ₁	+/-	+/-	+	+	+/-	-	-
LPB ₂	-	+/-	+	+	-	-	-
LPBJ	-	+/-	+	+	+/-	-	-

(+++): très bonne croissance , (++) : bonne croissance , (+) : moyenne croissance , (+/-) : faible croissance , (-) : pas de croissance.

Remarque

Pour les isolat LPR₁ et LPR₂ , la croissance a observé après 4 jours d'incubation à 4°C. Et concernant la souche de référence LPRN l'apparition des premières colonies après incubation 5 jours à 45°C.

Pour l'isolat LPB₁ ,l'observation de la croissance après 4 jours d'incubation à 20, 28 et 37° C. Et 6 jours d'incubation à 4°C.

Et pour les températures 20 et 28 °C concernat LPB₂ et LPBJ , la croissance est remarquée après 4 jours d'incubation. Alors que pour la souche LPBJ l'incubation à 37°C , la croissance est vue après 4 jours.

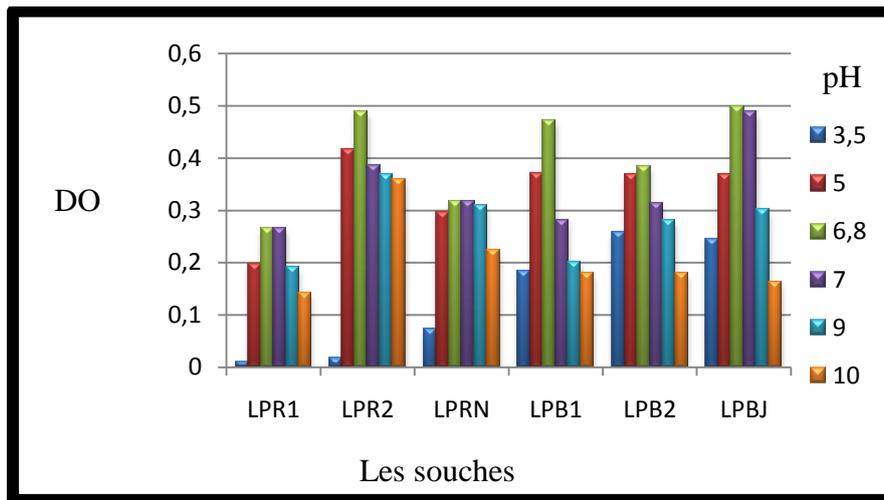


Figure 23: Effet du pH sur la croissance des isolats et les souches de référence.

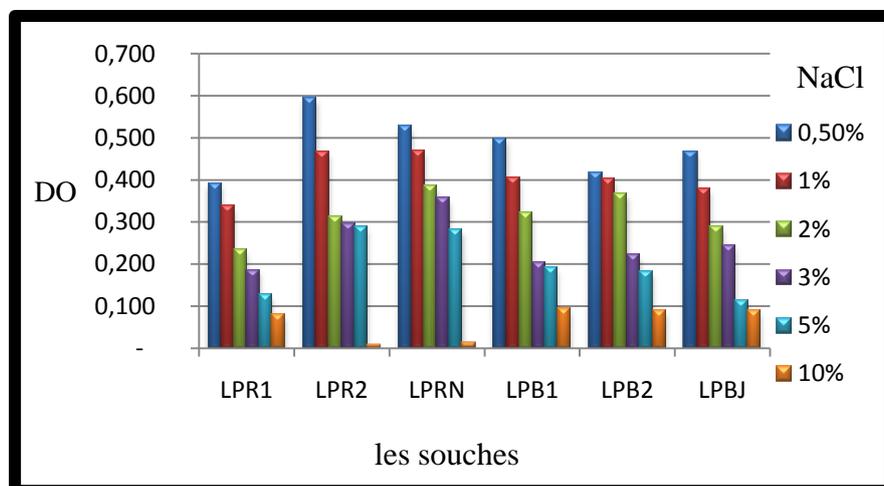


Figure 24 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats et les souches de référence.

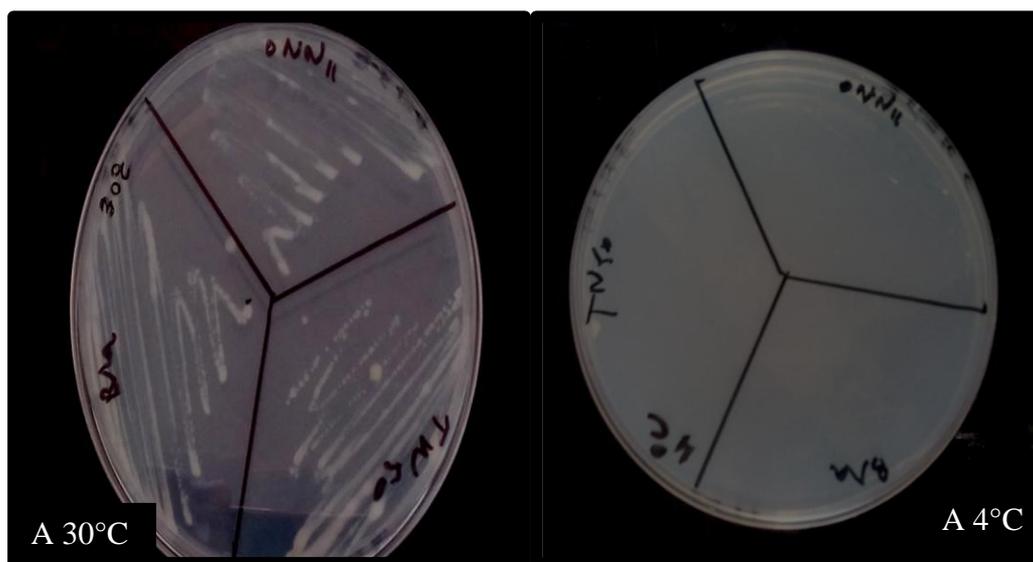


Figure 25 : Effet de la température sur la croissance des différentes isolats et la souche de référence.

Conclusion et perspectives

Dans ce travail nous avons procédé à un isolement et une caractérisation des bactéries nodulant la Légumineuse *Lupinus angustifolius*, tout en suivant une démarche classique, celle appliquée par Vincent (1970, 1982), Somasegaran et Hoben (1994), relative à l'identification des bactéries appartenant aux genres *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*.

A travers les résultats obtenus, notamment les caractères phénotypiques, ont montré que l'ensemble des isolats présentent des caractères proche des bactéries des familles de *Rhizobiaceae* et *Bradyrhizobiaceae* (morphologie des colonies sur YMA, vitesse de croissance, présence des enzymes spécifiques au processus de la nodulation).

En effet l'aspect, la couleur, la forme des colonies sur le milieu YMA, la morphologie des cellules, la croissance rapide YMA+BTB peuvent nous orienter vers les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984).

les aspects morphologiques et culturels des isolats sur les différents milieux de culture attribuent nos isolats à des souches qui ont une croissance rapide (48 heures) ,et d'autre qui possèdent une croissance lente (plus de 7 jours).

Une ressemblance apparait dans la culture de ces souches sur milieu YMA +RC (n'absorbent pas les colorants de rouge Congo) , aussi sur milieu YMA+BTB une modification de couleur initiale du milieu vers le jaune (acidification) pour les isolats à croissance rapide , et vers le bleu-vert (alcalinisation) pour qui sont lentes ils s'agit des *Bradyrhizobium* .

Ces mêmes souches possèdent les enzymes nécessaires pour infecter la plante et induire le processus de nodulation tel que la pectinase et l'enzyme nécessaire pour la relation symbiotique (cellulase).

C'est ainsi que, de très nombreuses activités enzymatiques peuvent être décelées dans le sol : cellulase, amylase, lipase, uréase..... .Les rhizobactéries sont parmi les microorganismes qui ont montré un véritable potentiel de ces activités enzymatiques (Woeng *et al.*, 2003).

Les résultats des tests nutritionnels montrent une assimilation préférentielle des sucres selon nos isolats et souche de référence. Le Mannitol, Glucose, Xylose et le Sorbitole , sont bien assimilés par les souches. La majorité des bactéries peuvent pousser en présence de la

plupart des acides aminés utilisés. On constate que beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les *Rhizobia*.

Nos isolats répondent à la majorité des caractères du genre *Rhizobium* et du genre *Bradyrhizobium*, dans l'influence des facteurs abiotiques (effet du pH, NaCl et la température). Les isolats ont été capables de tolérer une gamme assez large de pH allant de 3.5 à 10 avec des taux variables et d'autres qui sont inhibés par certains pH. Pour le stress salin on a constaté que nos isolats sont résistants aux concentrations élevées tel que les *Bradyrhizobim* qui sont atteind 10% de sel , ce qui montre que ces isolats sont des osmotolerants .

La tolérance à la temperature est très importante pouvant aller jusqu'à 45°C pour les souches à croissance rapide , ces dernieres poussent aussi à des valeurs très basses de température .

Généralement, les souches tropicales de *Rhizobia* possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans les milieux arides et semi-aride.

le *Rhizobium* a été criblé sur la base de la résistance au pH, à la résistance à la température, résistance à la salinité et résistance aux antibiotiques. (Rajeswari ,2017)

Contraintes abiotiques, telles que la sécheresse, les extrêmes de température, salinité du sol, l'acidité, alcalinité et métaux lourds provoque de graves pertes de rendement. La réponse des légumineuses à différents contraintes dépend de la réaction de la plante hôte, mais la réaction peut être influencée par le *Rhizobia* et le processus de symbiose (Yang et al., 2009).

Rhizobium et *Bradyrhizobium* sont décrits comme des bactéries du sol qui ont la capacité d'infecter la racine cheveux de légumineuses et pour induire la formation de nodules avec fixation ultérieure de l'azote (Rajeswari ,2017).

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué et pourraient également servir de base génétique pour les travaux ultérieurs.

On peut noter les prespectives suivantes :

- ✓ L'exploitation de la grande tolérance des souches aux différents stress environnementaux.

- ✓ La détermination du statut taxonomique des souches de lupin étudiées par des techniques moléculaires incluant la PCR/RFLP et le séquençage du gène de l'ADNr 16S . l'hybridation ADN/ADN pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les Rhizobia ou parmi tout autre genre des protéobactéries.
- ✓ L'établissement de stratégies d'amélioration efficace de la symbiose par la production d'inoculum de bonne qualité, c'est-à-dire l'étude de l'aptitude des souches sélectionnées à survivre et à maintenir leur potentiel symbiotique durant le stockage de l'inoculum, pendant l'inoculum au champ et durant les années suivantes (besoin de réinoculation).

Références bibliographiques

- Acharya T., 2015** : Test de réduction des nitrates: Principe, procédure et résultats, diagnostic en laboratoire de la maladie bactérienne, Bactériologie.
- Ainouch A.K., Bayer R.J.,1999** : Phylogenetic relationships in *Lupinus* based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA .Am .J. Bot.86 :590-607.
- Alexander M., 1985** : Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. Adv. Microbial Ecology, 8 :163-183.
- Allen E.K., et Allen O.N.,1950** : Biochemical and Physiological Properties of the Rhizobia Bacteriol. Rev. 14 : pp273-330.
- Al Sherif E. A., Zahran H.H., Atteya A. M., 2004** :Nitrogen fixation and chemical composition of wild annual legumes at Beni-Suef governorate, Egypt. Egyptian Journal of Biology. 6: 32-38.
- Anonyme , 2010** : l'azote et la vie . UNIFA [en ligne]. Édition Copyright UNIFA [Consulté le 20 Mars 2017]. Disponible à l'adresse : <http://fertilisation-edu.fr/nutrition-des-plantes/le-role-des-elements-nutritifs/azote.html>
- Aryal S .,2015** : Catalase Test- Principe, usages, procédure, interprétation de résultat avec précautions. Microbiology info.
- Baldani J.I.,et Baldani V.L.D., 2005** : History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: spezial emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Brass. Sci. 77: 549- 579.
- Baumberger I.C., Fraefel N., Gottfert M., Hennecke H., 2002** : New Nodw- or Nifaregulated Bradyrhizobium japonicum Genes. The American Phytopathological Society. MPMI Vol.16, No.4,2003,pp.342-351.
- Beck D.P., Materon L.A., AfandiF., 1993** : Practical *Rhizobium*–legume technology manual,.ICARDA (Ed), Syria, P.389.
- Benguedouar A., 2000** : Contribution à l'étude de la symbiose légumineuse : caractérisation de l'espèce *Rhizobium* « *hedysari* » nodulant la légumineuse *Hedysarum Coronarium*.Thèse de doctorat d'état en biologie appliquée. Université de Constantine.
- Bertschinger L., Christian G., Ryser J.P., Häseli A., Neuweiler R., Pfammatter W., Schmid A., et Weibel F., 2003** : Données de base pour la fumure en arboriculture fruitière, Fruits à pépins, fruits noyau, kiwis, baies d'arbustes., Edition: Eidgenössische Forschungsanstalt, Postfach 185, CH-8820 Wädenswil, 48 P.
- Besançon S , 2017** : les légumineuse , France.
- Bibirou .,2016** : tests utilises en bacteriologie, biologie techniques de laboratoires pour laboratoire de brousse.

Bordeleau L.M., et Prevost D., 1994 : Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments : Plant soil: 161: 115-124.

Bouttet D., Gaillard B., Liessi A., 2010 : Lupin de printemps et d'hiver - Guide de culture , l'Unip, Arvalis - Institut du Végétal , paris .

Breuer G., Evers W. A., de Vree J. H., Kleinegriss D. M., Martens D. E., Wijffels R. H., , 2013 : Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *J. Vis. Exp.* (80), e50628, doi:10.3791/50628 .

Brillant R., 2016 : Les légumineuses, ces petits grains qui partent du Canada pour nourrir la planète , canada.

Brink M., et Belay G., 2006 : Céréales et légumes secs, Fondation PROTA /Backhuys Publishers/CTA. Wageningen, Pays-Bas.

Cacciari I., Di Mattia E., Quatrini P., Moscatelli M.C., Grego S., Lippi D., et De paolis M.R., 2003 : Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In, Grouzis M ; le Floc'h .Un arbre au désert, Acaciaraaddiana.IRD.Paris ,183-200.

Carlier C., 2013 : Graine de Lupin: la nouvelle ruée vers l'or vert des agriculteurs français.

Cepeda Hernandez M.L., 2005 : Phenotypic characterization of *Rhizobia* that nodulate ball clover. Master of Science Thesis. Soil Science. Texas A&M University. 53 pages.

Cleland E.E., Harpole W.S., 2010 : Nitrogen enrichment and plant communities. *Ann NY Acad Sci* .1195:46-61.

Cloutier J., Prévost D., Nadeau P., et Antoun H., 1992 : Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2846-2853.

Crossman L.C., 2005 : Plasmid replicons of *Rhizobium* .*Biochemical Society Transactions*, 33 (1) : 157-158.

Dahi S, 2008 : Article paru au journal Le Temps (Tunisie) *Economia* , sous le titre "la rose d'or des sables" le lupin contre la faim.

Daniel J.G., 2004 : Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2):280-300.

Delaunois A., 2006 : Guide simplifié pour la description des sols, Chambre d'Agriculture Tarn, Albi. pour pratique granulométrie

Delgado M.J., Ligerio F., Lluch C., 1994 : Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea. Faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. Biochem.* 26: 371-376.

Dommergues Y., et Manganot F., 1970 : Ecologie microbienne du sol. Eds. Masson et C^{ie}. Paris. 796p.

Drouin P., 1996 : Caractérisation phénotypique et génotypique et étude des mécanismes d'adaptation aux basses températures de souches de *Rhizobium* isolées de *Lathyrus japonicus* et *Lathyrus pratensis*. Faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.) ; Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation Université Laval, Québec.

Drummond C.S., Eatswood R.J., Miotto S.T.S., Hughes C.E., 2012 : Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): testing for key innovation with incomplete taxon sampling. *Syst. Biol.* 61 : 443-460.

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

Dupuy Y., et Nougier P., 2005 : Les micro-organismes du gène à la biosphère. Ed. Ellipses. Paris. 256p.

El Essawi T.M., et Abdelghaffar A.S., 1967 : Cultural and symbiotic properties of *Rhizobia* from Egyptian Clover (*Trifolium alexandrinum*). *J. Appl. Bact.* 30 (2) : 354-361.

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

El Hilali I., 2006 : La Symbiose *Rhizobium*-Lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi infection nodulaire chez *Lupinus*- luteus. Thèse de Doctorat : Microbiologie et Biologie moléculaire. Université Mohamed V-AGDAL. Rabat. 189p.

Elli M., Zink R., Rytz A., 2000 : Iron requirement of lactobacillus spp. in completely chemically defined growth media. *J. Appl. Microbiol.* 88: 665-703.

Elmerich C., 1997 : Nitrogénase: aspect biochimiques, moléculaires et génétiques. In: MorotGaudry J.F. Assimilation de l'azote chez les plantes. Ed. INRA. Paris. pp 163-177.

Farissi M., Aziz F., Bouizgaren A., Ghoulam C., 2014 : La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *Int J ,Innovation Scientific Res* 11(1): 96-104.

Ferguson B.J . , Indrasumunar A. , Hayashi S . , Lin M.H. , Lin Y.H. , Reid D.E. , Gresshoff P.M., 2010 : Analyse moléculaire du développement du nodule des légumineuses et de l'autorégulation., ARC Centre d'excellence pour la recherche intégrée de légumineuses, l'Université du Queensland ;52 (1): 61-76.

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

Fred E. B., Baldwin I. L., et McCoy E., 1932 : Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis. (in: Elkan, 1902).

Gargominy O., Terceirie S., Régnier C., Ramage T., Schoelinck C., Dupont P., Vandel E., Daszkiewicz P., et Poncet, L., 2016 : référentiel taxonomique pour la France : méthodologie, mise en œuvre et diffusion. *Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris. Rapport SPN 2016 – 101. 144 pp.

Garrity G.M., James R. C., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D. M., Tiedje J.M., 2005 : The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. Oxford University Press. 294-296.

Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C., Jaubert M., Simon D., Cartieaux F., Prin Y., Bena G., Hannibal L., Fardoux J., Kojadinovic M., Vuillet L., Lajus A., Cruveiller S., Rouy Z., Mangenot S., Segurens B., Dossat C., Franck W.L., Chang W.S., Saunders E., Bruce D., Richardson P., Normand P., Dreyfus B., Pignol D., Stacey G., Emerich D., Vermeglio A., Medigue C., Sadowsky M., 2007 : Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic *Bradyrhizobia*. *Science* 316 : 1307-1312.

Gladstones, J. S., 1998 : Distribution, origin, taxonomy, history, importance. In *Lupins as Crop Plant: Biology, Production and Utilization* (J. S. Gladstones, C. A. Alkins and J. Hamblin, eds.). CAB International, Oxon.

Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., 2015 : Laxmipathi Gowda, CL; Krishnamurthy, L. *Rizobia favorisant la croissance des plantes: défis et opportunités*. 3 *Biotech*, 5 : 355-377.

Grover M., Ali S.Z., Sandhya V., Rasul A., Venkateswarlu B., 2010 : Le rôle des micro-organismes dans l'adaptation des cultures agricoles à abiotiques. *Monde J Microbiol Biotechnol* 27: 1231-1240.

Graham P. H., and Parker, C. A., 1964 : Diagnostic features in the characterization of the rootnodule bacteria of legumes. *Plant Soil*, 3:383-395.

Graham P.H., Sadowsky M.J., Kersters H.H., Barnet Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W., Young J.P., 1991 : Proposed 40 minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 : 582-587.

Graham P.H., et Vance C.P., 2003 : Legumes: importance et contraintes pour une utilisation accrue. *Plant Physiol* . 131 : 872-877.

Guiraud J.P., 1998 : *Microbiologie alimentaire*. DUNOD. Paris.

Gürtler V., Wilson V. A., et Mayall B. C., 1991 : Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 2673-2679.

Hérault G., 2011 : Corse Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste. Pyrénées-Orientales , Basses-Pyrénées ; Tela botanica .

- Hernandez C.M.L.,2005** : Phenotypic characterization of *Rhizobia* that nodulate ball clover. Master of Science Thesis. Soil Science. Texas A&M University.53 pages.
- Hilliard C., et Reedyk S.,2015** : terre et sol : Texture du sol et qualité de l'eau ; Conseil national de la conservation du sol et de l'eau (CNCSE) ; Agriculture et Agroalimentaire Canada.
- Hirsh P.R., 1996** : Population dynamics of indigenous and genetically modified *Rhizobia* in the field . *New Phytol.*, 133 : 159-171.
- Hopkins W.G., 2003** : Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck , pp 99-119.
- Hordé P.,2015** : Fabaceae-Définition , *Journal des Femmes Santé*,France.
- Howieson J.G., et Dilworth M.J ., 2016** :Working with *Rhizobia* ; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale. p :312.
- I.T.A.M., 1975** : (Institut de Technologie Agricole Mostaganem). Laboratoire du sol. Méthodes d'analyses physiques et chimiques du sol 3^o et 4^o année. 106p.
- James K., Hane., Yao Ming., 2016** : Une séquence généreuse complète de génome pour le lupin (*Lupinus angustifolius*), un aliment sain pour la santé: idées sur les interactions plantes-microbes et l'évolution des légumineuses, *plant biotechnology journal*.
- Jargeat P ., Ruiz-González M.X., Malé P.J, Leroy C., Dejean A., Gryta H., , Quilichini A., Orivel J., 2011** : Specific, non-nutritional association between an ascomycete fungus and *Allomerus* plant-ants. *7(3):475-9*.
- Jarvis B. D. W., Mc lean T. S., Robertson I. G. C.,et Fanning G. R., 1977** : Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20 : 42-52.
- Jebara M., Drevon J. J., Aouani M. E ., 2001** : Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native *rhizobia* from Tunisian soils. *Agron .21: 601-605*.
- James K., Hane., Yao Ming.,2016** : Une séquence généreuse complète de génome pour le lupin (*Lupinus angustifolius*), un aliment sain pour la santé: idées sur les interactions plantes-microbes et l'évolution des légumineuses. *plant biotechnology journal*.
- Jared A .W., Johannes G. R .,2014** : Nitrogénase complex ,Université de Californie, Irvine, Californie, États-Unis.
- Jones D., et Krieg N.R ., 1984** : Serology and chemotaxonomy .Dans *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. L. Sous la direction de N.R. Krieg et J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. p 15-18.

- Jordan D.C., 1982 :** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen .nov. a genus of slow-growing , root nodule bacteria from leguminous plants, Int.J.Syst. Bacteriol. 32:136-139.
- Jordan D.C., 1984 :** Family III: Rhizobiaceae. In: Krieg N.R. et Holt J.C (Eds): Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams et Wilkins. Baltimore. USA. pp 234-244.
- Julve Ph ., 2016 :** ff. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France.
- Kalifire S ., 2009 :** Glossaire de la vie : dictionnaire biologie, botanique, zoologie, aquariophilie. aquariologie et aquaculture .
- Koch R., 1884 :** Die Aetiologie der Tuberculose. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt . 2 :1-88.
- Koull K., Kherraze M .H., Lakhdari K., Benzaoui T., Helimi S., Laouissat M .S., Kherfi Y., Bougafla A., Mimouni F., Lakhdari K., Mezrag M., Benazzouz M .T ., 2013 :**Eaux D'irrigation et salinisation des sols des perimetres irrigués dans la vallee de l'oued Righ. J Alg Rég Arid . 12: 97-102
- Krehenbrink M., et Downie J.A., 2008 :** Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* . BMC Genomics . 9 -55 .
- Lambers H., Clements J.C., Nelson M.N., 2013 :** How a phosphorus-acquisition strategy based on carboxylate exudation powers the success and agronomic potential of Lupines (*Lupinus*, Fabaceae). American Journal of Botany. 100 : 263-288.
- Leclerc H., Gaillard J. L., Simonet M., 1995 :** Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien . Doin editeurs. P 412-415.
- Ljunggren H., et Fahraeus G ., 1961 :** The role of polygalacturonase in root-hair invasion by nodule bacteria.j.gen. Microbiol. 26: 521.-528.
- Liu J., Ji Y., Zhou J., et Xing D ., 2016 :** Phosphatidylinositol 3-Kinase Promotes V-ATPase Activation and Vacuolar Acidification and Delays Methyl Jasmonate-Induced Leaf Senescence. American Society of Plant Biologists. P 1714-1731.
- Lodwig E., et Poole P.,2003 :** Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. Critical Reviews in Plant Sciences. 22 : 37-78.
- Lodwig E.M., Hosie A.F., Bourdes A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J.A., et Poole P.S., 2003 :** Le cyclisme des acides aminés entraîne la fixation de l'azote dans l symbiose des légumineuses et *Rhizobium*. Nature Publishing Group. 422-426 .
- Lohar D., Stiller J., Kam J., Stacey G. et Gresshoff P.M., 2009 :** Ethylene insensitivity conferred by a mutated Arabidopsis ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. Ann .Bot.104 :277-285.

- Lynch D.H., et Smith D. L., (1993)** : Soybean nodulation and N₂ fixation as affected by period of exposure to a low root zone temperature, dans *Physiol. Plant.* 88, p. 212-220.
- Maâtallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002** : Phenotypic characterization of *Rhizobia* isolated from chickpea(*Cicer arietinum L.*) growing in moroccan soils. *J.Agro.* 22:321-329.
- Madigan M., et Martinko., 2007** :Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris. 1047p.
- Mateos P.F., Jiménez-Zurdo J.L., Chen J.A.S., Squartini S.K., Haack E.M., Molina D.H., Hubbell F., et Dazzo B., 1992** : Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* . *Appl Environ Microbiol.* 58 (6) : 1816-1822.
- Mckay I.A., et Djordjevic M.A., 1993** : Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium Leguminosarum bv. Trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *App Environ Microbiol.* 59: 385-392.
- Mergaert P., Gully D., Gargani D., Bonaldi K., Grangeteau C., Chaintreuil C., Fardoux J., Nguyen P., Marchetti R., Nouwen N., Molinaro A., Giraud E., 2016** : A Peptidoglycan-Remodeling Enzyme Is Critical for Bacteroid Differentiation in Bradyrhizobium spp. During Legume Symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact.* (6):447-57.
- Molina E.M., Morales V.M., Hubbell D.H.,1979** : Hydrolytic Enzyme Production by *Rhizobium* . *Applied and environmental microbiology.*
- Mulongoy k.,et Elkang H., 1977**:Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen-fixing efficiency. *Journal of Bacteriology* 131 : 179-187.
- Ndiaye A.A., Sylla S.N., Gueye M., Delajudie P., Et Ndoiyel I., 2002** : Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-page) pour l'étude de la diversité des rhizobiums d'*Acacia tortilis* (forsk.) Hayne subsp. Raddiana (Savi) brenan. *African Journal of Science and Technology.*61(1):33-43.
- Neyra M.,1992** : Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote : légumineuse *Rhizobium*. Ed Laboratoire de microbiologie des sols Dakar (Sénégal).
- Noel K.D. , 2009** : Bacteria *Rhizobia*. *Encyclopedia of microbiology*, Schaechter M. San Diego. Marquette University, Milwaukee, WI, USA. 3 : 877-893 .
- Odaton M., 1992** : Généralités sur la symbiose fixatrice de l'azote rhizobium-légumineuses. In: Neyra M (Ed): Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote légumineuse/ rhizobium. Ed. FAO-Rome. pp 7-12.
- Pagano M.C., 2008** : *Rhizobia* associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration *Plant Soil Environ* , 54 (11) :498-508.

- Pascual H., 2004 :** *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), new and surprising species discovered in Spain. *An Jard Bot Madr* .61:69–72.
- Patriarca E J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004 :** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* pp 62- 201.
- Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W., et Borthakur D., 2006 :** Identification of Two Clusters of Genes Involved in Salt Tolerance in *Sinorhizobium sp.* Strain BL3. *Symbiosis.* 41: 47-51.
- Perry B.J., Akter M.S., Yost C.K., 2016 :** *Rhizobium* Research ;Interactions végétales-microbes centrées sur *Rhizobium* .*Front Microbiol.* 7: 1873.
- Petard J.,1993 :** Les méthodes d'analyse Tome 1 Analyses de sols ORSTOM.
- Petti C. A., 2007 :** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases.* 44 : 1108-1114.
- Pinero D., Martinez-Romero E., et Selander R. K.,1988 :** Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobia leguminosarum bv phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2825 2832.
- Poiret D., 2014 :** le lupin a son pourcentage élevé en protéines. édition : Mr plante. Disponible à l'adresse : <http://www.mr-plantes.com/2014/04/le-lupin-a-son-pourcentage-eleve-en-proteines/>.
- Posey J.E., et Gherardini F.C., 2000 :** lack of a role for iron in the lyme disease pathogen. *Science.* 288: 1651-1653.
- Quezel P., Santa S., 1962 :** Nouvelle flore de l'Algérie et des région désertiques méridionales, tome 1. ED. Centre national de la recherche scientifique . Paris , France pp 514.
- Reddell P., 1993 :** Soil constraints to the growth of nitrogen-fixing trees in tropical environment. In: Subba Rao N.S., Rodriguez-Barrueco C. (Eds): *Symbioses in nitrogen-fixing trees*. Oxford & IBH. New Delhi. pp 65-83.
- Rajeswari P., Aishwaryalakshmi B., et Jeyagowri C., 2017 :** Isolation, identification et dépistage de *Rhizobium* Pour la promotion de la croissance des plantes . *International Journal of Applied Research; Inde.* 3 (1): 732-733 .
- Rao DLN., Giller K.E., Yeo A.R., et Flowers T.J., 2002 :** The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* 89: 563- 570.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S.E., 2000 :** Biologie végétale. 6^{ème} Edition de boeck , Paris.
- Rawat S., et Mushtaq A., 2015 :** Plant growth promoting rhizobacteria, a formula for sustainable agriculture: A review ; *Asian Journal of Plant Science and Research.* 5(4):43-46.

- Raza S., Jørnsgard B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L., 2001 :** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. Letters in Applied Microbiology. 32 (6): 379-383.
- Räzänen L.A., 2002 :** Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between *Rhizobia* and the woody legumes Acacia and Prosopis. thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.
- Robledo M., Jiménez-Zurdo J.I., Velázquez E., Trujillo M.E., Zurdo-Pineiro J.L., Ramirez- Bahena M.H., Ramos B., Diaz-Minguez J.M., Dazzo F., Martinez-Molina E., et Mateos P.F., 2008.** *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 7064-7069.
- Robledo M., Rivera L. J., Jiménez-Zurdo I., Rivas R., Dazzo F., Velázquez E., Martínez-Molina E., Hirsch A. M., et Mateos P. F., 2012 :** Rôle de *Rhizobium* endoglucanase CelC2 dans la biosynthèse de la cellulose et la formation de biofilm sur les racines des plantes et les surfaces abiotiques. Usines de cellules microbiennes . 1475-2859-11-125.
- Rodriguez J., Freire J.R.J., et Schrank I., 1987 :** Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli. Mircen Journal. 3 : 289-298.
- Roughley R. J., 1970 :** The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. Ann. Bot. 34: 631-646.
- Sánchez-Cañizares C., Rey L., Duran D., Temprano F., Sánchez-Jiménez P., Navarro A., Polajna M., Imperial J., Ruiz-Argüeso T., 2011 :** Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within *Bradyrhizobium* genus. Syst. Appl. Microbiol. 34 : 207-215.
- Schleifer K.H., et Klander O., 1992 :** Peptidoglycane types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. 36 : 407-477.
- Schneider A., 2015 :** Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaire durables ; édition Quae, France.
- Schultze M., Kondorosi E., Rater P., Buiré M., Kondorosi A., 1994 :** Cell and molecular biology of rhizobium-plant interactions.. 156: 1-75.
- Selander R. K., Caugent D. A., Ochman H., Musser J. M., Gilmour M. N., et Whittam T. S., 1986 :** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51 : 873-884.
- Serraj R., Fleurat L.P., Jaillard B., Drevon J.J., 1995 :** Structural changes in the inner cortex of soybean root-nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen content. Plant Cell Environ. 18: 455-462.

- Serraj R., Roy G., Drevon J.J., 1994 :** Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and their permeability to oxygen diffusion. *Physiol. Plant.* 91: 161-168.
- Serraj R., Vasquez D.H., Drevon J.J., 1998 :** Effects of Salt Stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion and ion distribution in soybean. *Common bean and alfalfa. J. Plant Nutr.* 21: 475-488.
- Siczek A., et Lipiec J., 2016 :** Impact de l'inoculation de rhizobium Faba Bean-Seed sur l'activité microbienne dans la Rhizosphère Sol au cours de Saison de croissance ; Académie polonaise des sciences, Département des sols et des plantes, Lublin, Pologne . 201 :20-290.
- Skerman P.J., 1982 :** Les Légumineuses fourragées tropicales. Ed. FAO. Rome. 666p.
- Soltner D., 2005 :** Les bases de la production végétale. Ed. Collection sciences et technique agricoles. 304p
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994 :** Handbook for *Rhizobia*: Methods in legume *Rhizobia* technology. Springer-Verlag. New York. P450.
- Soussi M., Ocana A., Liuch C ., 1998 :** Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). 49 : 1329-1337.
- Sprent J.I ., 1995 :** Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem.* 27: 401-407.
- Stackebrandt E., & Liesack W., 1993 :** Nucleic acids and classification. In Handbook of New Bacterial Systematics Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. London: Academic Press. pp. 152–189.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella et Nuti M.P., 1998 :** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J Appl. Microbio. supporting bacteria Current Science.* 84:81-89.
- Sullivan J.T., Eardly B.D., Van Berkum P., et Roson C.W., 1996 :** Four unnamed species of nonsymbiotic Rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus* .*Appl. Environ. Microbiol.* 62 :2818-2625.
- Suzuki K., Goodfellow M., et O'Donnell A.G., 1993 :** Cell envelopes and classification. Handbook of new bacterial systematics. Sous la direction de : M. Goodfellow et A.G. O'Donnell. Academic Press, Ltd., London. pp .195-250.
- Tan Z.Y., Wang E.T., Peng G.X., Zhu M.E., Martinez-Romero E., Chen W.X., 1999 :** Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 49 : 1457-1469.
- Tang C., Robson A. D., et Dilworth M. J., 1992:** The role of iron in the (brady)rhizobium legume symbiosis. *Journal of Plant Nutrition.* 15 : 2235–2252

- Tang C., et Robson A.D., 1993** : pH above 6.0 reduces nodulation in *Lupinus species*. Plant Soil. 152 : 269-276.
- Terefework Z., Kaijalainen S, et Lindströ., 2001** : AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae*. J. Biotech. 91 : 169-180.
- Thami-Alami I., Elboutahiri N., Udupa SM., 2010** : Variability in natural population of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. Options Méditerranéennes. Séries A. Mediterr. Semin. 92: 265-269.
- Tibaoui G., et Zouaghi M., 2003** : Influence des fertilisations phosphatées et soufrées sur la production de légumineuses fourragères : *Hedysarum coronarium* et *Trifolium alexandrinum*. In: Drevon J.J. et Sifi B. (Eds): fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le bassin méditerranéen. ANRA. Paris. pp 101-109.
- Trinchant J.C., Drevon J.J., Rigaud J., 1998** : Fixation symbiotique de l'azote. In: MorotGaudry (Ed): assimilation de l'azote chez les plantes; aspect physiologique, biochimique et moléculaire. Eds. Quae, INRA. pp 133-145.
- Tristan A., Meyronet D., Benito Y., Celard M., Vandenesch F., 2004** : Apport de la PCR universelle dans les errances diagnostiques. *Antibiotiques*, 6 : 257-261.
- Udvardi M.K., Tabata S., Parniske M., et Stougaard J., 2005** : Lotus japonicus: legume research in the fast lane. Trends Plant Sci. 10: 222-228.
- Vandamme P.B., Grillis P.D.V., Kersters K., Swing J., 1996** : Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. Microbiol.. 60 : 407-438.
- Vanechoutte M., Rossau R., De Vos P., Gillis M., Janssens D., Paepe N., De Rouck A, Fiers T., Claeys G, et Kersters K., 1992** : Rapid identification of bacteria of the *comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiol. 93 : 227-233.
- Vincent J.M., 1970** : A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP handbook n°15. Blackwell Sci. Publ. Oxford. 164p.
- Vos P., Hogers R., Beeker M., Reijans M., van de Lee T. , Hornes M. , Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. , et Zabeau M., 1995** : AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23 : 4407-4414.
- Wedhastri S., Fardhani D.M., Kabirun S., Widada J., Widiyanto D., Evizal R., et Prijambada I.D., 2013** : Legume Nodulating Bacterium, *Achromobacter xylosoxidans* Found in Tropical Shrub Agroecosystem, Sumatera, Indonesia ; Indonesian Journal of Biotechnology 2 : 161-167.
- Weir B.S., 2016** : The current taxonomy of *Rhizobia*. NZ *Rhizobia* website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: X Jan.

- Werner D., 1992 :** Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.
- Wink M., 1993 :** Allelochemical properties and the raison d'être of alkaloids. In The Alkaloids, G. Cordell (ed.), Academic press. 43: 1-117.
- Yadav J., et Verma J.P., 2014 :** Effet de l'inoculation des graines avec le *Rhizobium* indigène et la promotion de la croissance des plantes Les rhizobactéries sur l'absorption des nutriments et les rendements du pois chiche (*Cicer arietinum L.*). EUR. J. Soil Biol , 63:70-77.
- Yang F.L., et Lin L.P., 1998 :** Cytostructure, lipopolysaccharides, and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii* . Bot. Bull. Acad. Sin., 39, pp. 261–267.
- Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.M., 2009 :** bactéries rhizosphère aider plantes tolèrent le stress abiotique. Trends Plant Sei .14 (1): 1-4
- Young D., Mudge J., et Ellis T., 2003 :** Legume genomes : more than peas in a pod. Curr Opin Plant Biol. 6 : 199-204.
- Young J.P.W., et Johnston A.W.B., 1989 :** The evolution of specificity in the legumerhizobium symbiosis. TrendsEcol.Evol. 4 : 341-349.
- Zahran H. H . , 2001 :** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. J biotechnol. 91: 143-153
- Young J.P.W.,1985 :** *Rhizobium* population genetics : enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans, and lucerne grown at the same site.J.Gen. Microbiol. 131 :2399-2408.
- Young J. P. W., et Baukka K. E., 1996 :** Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytol.
- Zablutowicz R. M., et Focht D. D., 1981 :** Physiological characteristics of cowpea rhizobia evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 679-685.
- Zgadzaj R. , Garrido-Oter R. , Jensen D.B ., Koprivova A ., et Radutoiu S.,2016 :** La symbiose du nodule racinaire chez *Lotus japonicus* conduit à l'établissement de communautés bactériennes distinctes de la rhizosphère, des racines et des nodules..Allemagne. 7996 – 8005.
- Zahran H.H., 1999 :** *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate". Microbiology and Molecular Biology Reviewsp. 63(4) : 968-989.
- Zakhia F., et de Lajudie P., 2006 :** la taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bacteries nodulant les l'gumineuses(BNL). Canadian Journal of Microbiology. 52 : p 169.

Annexes

Annexe 01

Milieux de culture utilisés

➤ **Composition de milieu YMB (Yeast Manitol Broth) en g/l (Vincent., 1970)**

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
NaCl	0.10
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	0.20
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1.00 L
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

➤ **Composition de milieu YMA (Yeast Manitol Agar) en g/l (Vincent., 1970)**

YMB	1.00 L
Agar	18.00
pH	6.80

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

➤ **Composition de milieu YMA+ RC(Rouge Congo) en g/l**

YMB	1.00 L
Solution stock de RC	10.00 ml
Agar	18.00
pH	6.80

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Après l'ajustement de pH on ajoute 10 ml de Rouge Congo (0.25 g Rouge Congo dans 100 ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

➤ **Composition de milieu YMA+ BTB(bleu de Bromothymol) en g/l**

YMB	1.00 L
Solution stock de bleu de BTB	5.00 ml
Agar	18.00
pH	6.80

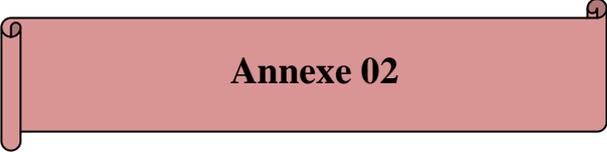
Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de Bromothymol (0.50 g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

➤ **Composition de milieu TY(Tryptone Yeast) en g/l**

Tryptone	5.00
Extrait de levure	3.00
CaCl ₂ H ₂ O	0.87
Eau distillée	1.00 L
pH	6.80

Stériliser à 120°C pendant 20 minutes.



Annexe 02

➤ Coloration de Gram

La préparation est étalée en couche mince sous la hotte, le protocole expérimental consiste à:

- 1) Déposer une goutte d'eau distillée stérile au centre d'une lame propre.
- 2) Prélever une petite quantité d'une colonie à l'aide d'une anse de platine.
- 3) Mélanger avec la goutte d'eau, sécher par passage sur la flamme d'un bec bunsen.
- 4) Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute.
- 5) Éliminer l'excès du violet de Gentiane avec du Lugol et ensuite couvrir la lame avec le Lugol pendant une minute.
- 6) Décolorer au mélange Alcool-Acétone jusqu'à la décoloration totale du frottis en maintenant la lame en position inclinée.
- 7) Couvrir la lame d'une solution de Fuchsine pendant 1 minute.
- 8) Laver à l'eau, sécher la lame avec du papier absorbant.
- 9) Déposer une goutte d'huile de Paraffine ou de vaseline stérile sur le frottis, et observer au microscope (objectif à immersion X100).

➤ L'état frais

- 1) A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, prendre un échantillon de la culture du bouillon.
- 2) Transférer une goutte de la culture au centre d'une lame, recouvrir d'une lamelle.
- 3) Examinez au microscope avec l'objectif X40.

Annexe 03

Les résultats de la mesure de la densité optique des pour :

Tableau 09: le test de la tolérance des isolats et des souches de références au pH après 48heures d'incubation pour les souches qui ont une croissance rapide et 8 jours pour les souches qui ont une croissance lente.

pH \ Souches	LPR ₁	LPR ₂	LPRN	LPB ₁	LPB ₂	LPBJ
3.5	0.011	0.018	0.073	0.182	0.258	0.245
5	0.198	0.415	0.297	0.372	0.368	0.367
6.8	0.266	0.489	0.316	0.281	0.384	0.498
7	0.265	0.387	0.316	0.281	0.313	0.488
9	0.192	0.368	0.309	0.201	0.281	0.302
10	0.143	0.359	0.223	0.180	0.179	0.163

Tableau 10: le test de latolérance des des isolats et des souches de références au NaCl après 24heures d'incubation pour les souches qui ont une croissance rapide et 8 jours pour les souches qui ont une croissance lente.

NaCl \ Souches	LPR ₁	LPR ₂	LPRN	LPB ₁	LPB ₂	LPBJ
0.50%	0.391	0.595	0.526	0.498	0.417	0.466
1%	0.337	0.465	0.468	0.405	0.402	0.378
2%	0.234	0.312	0.385	0.322	0.367	0.289
3%	0.186	0.295	0.356	0.203	0.221	0.245
5%	0.127	0.287	0.281	0.192	0.181	0.112
10%	0.080	0.007	0.013	0.094	0.089	0.090

Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Lupinus angustifolius*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne

Résumé :

Dans cette étude quatre bactéries ont été isolées à partir des nodules racinaires de le lupin (*Lupinus angustifolius*) cultivée dans la Wilaya El Taraf -Malleh. La caractérisation est initiée par une étude morphologique et culturale, cette étude classe deux isolats comme étant des bactéries à croissance rapide, présentant les caractéristiques des bactéries du genre *Rhizobium* et les autres comme étant des bactéries à croissance lente ont les même caractéristiques des *Bradyrhizobium* .

Les tests biochimiques ont évalué la présence d'une activité enzymatique chez les isolats . Les tests nutritionnels et physiologiques montrent une diversité entre les isolats .

Sur la base des caractères étudiés, les isolats portes les mêmes caractères phénotypiques des (BNL).

Mots clés : *Lupinus angustifolius* , nodules racinaires ,caractérisation , phénotypiques , BNL.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC), Faculté des Sciences de la Nature, Université des frères Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : M *Chabbi Rabah* (maitre-assistant« A » - UFM Constantine).

Rapporteur : M *Benhizia Yacine* (Professeur - UFM Constantine).

Examineur : Mme *Riah Nassira* (maitre de conférences « B »- UFM Constantine).

Date de soutenance : 20/06/2017