



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :  
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

## MASTER

**Domaine :** Sciences de la nature et de la vie

**Filière :** Sciences biologiques

**Spécialité :** Biochimie appliquée

**Par :** BELHADJAISSA Meriem

**BENBITOUR Iman**

## Thème

**Caractérisation de certaines souches de *Rhizobia* associés à la culture d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) à haut potentiel de solubiliser le phosphore dans la région de Ghardaïa.**

**Soutenu publiquement le : 24/05/2017.**

**Devant le jury :**

<b>M<sup>me</sup> : HADDAD S.</b>	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	<b>Président</b>
<b>M : KRAIMAT Mohamed.</b>	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	<b>Encadreur</b>
<b>M : BAKKELI A.</b>	Maître Assistant B	Univ. Ghardaïa	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>me</sup> : HAMID OUDJANA A.</b>	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	<b>Examineur</b>

**Année universitaire 2016/2017.**

## **DÉDICACES**

**J'adresse cette dédicace :**

- **A ceux qui ont toujours été à mes côtés ;**
- **A ceux qui m'ont toujours soutenu dans les moments les plus difficiles et avec lesquels j'ai partagé les meilleurs et mauvais moments ;**
- **A ceux qui participer avec force à la construction de mon avenir ;**
- **A ma chère mère et mon cher père. Sans votre présence de ce monde je serais absente.**

**Je dédie ce travail :**

- **A mes très chers frères : *TAHA* ; *ABD ELDLALIL* ; surtout *ABD ELHAK* et ma très chère sœur : *HADJER* pour leur soutien continu pendant l'élaboration de ce mémoire ;**
- **A mes très chers neveux : *IBRAHIM* ; *DJEBER* et ma très chère nièce *KHADIDJA* ;**
- **A toutes celles et ceux qui ont toujours cru dans mes capacités ;**
- **A mes très chères amies : *NADJAT* ; *DALILA*, *HADJER*, *IMAN*, *KHADIDJA*, *FARIDA*, *HAMIDA* .....pour être les très bonnes amis. Pour tous les moments partagés ensemble. Pour leur soutien et leurs mots encourageants et pour leur amitié sincère ;**
- **Enfin. A ma très chère copine et amie *NADIA*. Pour sa gentillesse. Son écoute. Sa disponibilité et sa présence permanente à mes côtés. Merci pour ton aide morale et physique.**

*« La vie est faite de moments difficiles et d'instant de bonheur. Je sais, aujourd'hui que vous êtes là pour moi dans les moments douloureux comme dans les instants de joie et de bonheur.....merci pour votre présence à mes côtés ».*

 *Meriem.*



## DÉDICACE

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie cette thèse de master à :  
A Ma tendre Mère Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*A Mon très cher Père aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*A mon très cher mari Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études. Ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle. Énormément.*

*A mon cher frère et mes sœurs.*

*A mes très chers amis surtout meriembelhadjaissa m'aide beaucoup hafida, faffa  
A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.*



 .Iman

# Remerciements

« Mes remerciements les plus sincères, les plus continus s'adressent à ALLAH, le Tout-Puissant qui nous a aidés à surmonter les obstacles et parvenir à ce niveau d'étude et à notre prophète MOHAMED, salut et paix sur lui ».

- Il est très difficile de pouvoir énumérer tous ceux qui nous ont de près ou de loin aidé à finalisé ce travail même si l'envie nous tient à cœur. C'est avec un enthousiasme très vif et très sincère que nous voudrions adresser nos remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont d'une manière ou d'une autre rendu ce travail possible et agréable.
- Nous tiens à remercier particulièrement notre encadreur, Mr : *KRAIMAT Mohamed* pour son aide précieuse et ces conseils judicieux, nous lui assurons le témoignage de notre profonde reconnaissance.
- Nous tiens à remercier particulièrement nos professeurs : Mr *DIF G.*, Mr *BELGHIT S* et Mme *HADDAD S* à L'université de Ghardaïa pour leurs aides et leurs encouragements pendant le stage pratique au laboratoire de microbiologie.
- Nos remerciements vont s'adresser aussi Mr *LAGHOUITER A*, Technicien supérieur en agriculture au Mansoura et Mr *BENGUAIDE A* Technicien supérieur en agriculture au Sebseb, qui nous ont donné la chance de réaliser La collecte des nodules à partir ces régions.
- Nous voudrions enfin remercier toute l'équipe du laboratoire d'université de Ghardaïa, surtout Mr *MOULAY AMAR Ali*, Mr *BENHAMDOUN Hicham* et Mr *MESIETFA*, pour leurs aides et leurs disponibilités tout le long de la réalisation de ce travail.

 M<sup>elle</sup> *BELHADJ AISSA Meriem*  
Mme *BENBITOUR Iman*

# SOMMAIRE

Introduction générale	01
Etude bibliographique	04
1. Le partenaire végétal : l'arachide ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	04
1.1 Origine de la plante hôte	04
1.2 Position systématique et taxonomie	04
1.3 Diversité génétique	05
1.4 Morphologie	06
1.5 Exigences culturales	08
1.6 Production de la culture d'arachide (dans la région de Ghardaïa)	09
2. Le partenaire bactérien : <i>Rhizobia</i>	10
2.1 Classification	10
2.2 Morphologie des <i>Rhizobia</i>	10
2.3 Caractères biochimiques	11
2.4 Caractères physiologiques	11
2.5 Caractères cultureux	11
3. La symbiose légumineuse- <i>Rhizobia</i>	12
3.1 La formation des nodules	12
3.2 La fixation de l'azote	16
3.2.1 Le cycle de l'azote	16
3.2.2 La fixation industrielle de l'azote	17
3.2.3 La fixation biologique de l'azote	17
3.2.4 La nitrogénase	18
4. Nutrition phosphatée et interactions Plante-Rhizosphère	19
4.1 Formes du phosphore dans les sols agricoles et forestiers	19
4.1.1 Formes solubles inorganiques	20
4.1.2 Phosphate inorganiques faiblement retenus (labile)	21
4.2 Nutrition phosphatée chez les plantes	21
4.3 Effet de déficience en phosphore	21
4.3.1 Effet sur la croissance de la plante	21
4.3.2 Effet sur la fixation symbiotique de l'azote (FSN)	21
4.3.3 Effet sur le métabolisme oxydatif	22
4.4 biodisponibilité du phosphore	22
4.5 Cycle du phosphore dans les systèmes agricoles	23
4.6 Réaction des engrais phosphatés dans le sol	23
4.7 Les mécanismes biologiques de la mobilisation de phosphore	24

<b>Matérielles et méthodes</b>	<b>25</b>
<b>1. Isolement des bactéries à partir des nodules</b>	<b>25</b>
1.1 Collecte des nodules	25
1.2 Conservation des nodules	28
1.3 Stérilisation des nodules	28
1.4 Ecrasement des nodules	28
1.5 Isolement des souches	29
<b>2. Caractères cultureux</b>	<b>30</b>
2.1 Examens microscopique...	30
Coloration de gram	30
<b>3. Caractérisation phénotypique des bactéries</b>	<b>30</b>
3.1 Tests nutritionnels	30
3.1.1 Utilisation des sucres comme seul source de carbone	30
3.1.2 Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote	31
3.2 Tests physiologiques	31
3.2.1 Tolérance à la salinité (NaCl)	31
3.2.2 Influence du pH	31
3.3 Tests biochimiques	31
3.3.1 Test de solubilisation de phosphore en milieu solide (PVK)	31
<b>4. Conservation</b>	<b>32</b>
<b>5 Analyse statistique</b>	<b>32</b>
<b>Résulta et discussions</b>	<b>33</b>
<b>1 Caractères cultureux</b>	<b>33</b>
1.1 Croissance des isolats sur milieu YMA	33
1.2 Examens microscopique	35
Coloration de gram	35
<b>2 Caractérisation phénotypique des bactéries</b>	<b>35</b>
2.1 Tests nutritionnels	35
2.1.1 Utilisation des sucres comme seul source de carbone	35
2.1.2 Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote	37
2.2 Tests physiologiques	38
2.2.1 Tolérance à la salinité (NaCl)	38
2.2.2 Influence du pH	40
2.3 Tests biochimiques	42
2.3.1 Solubilisation de phosphore	42
<b>3. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)</b>	<b>44</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>45</b>
<b>Perspectives</b>	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>2</b>
<b>Annexe</b>	<b>2</b>

## LISTE D'ABREVIATION

<b>Abréviations</b>	<b>Signification</b>
<b>ADN</b>	<b>acide désoxyribonucléique</b>
<b>YMA</b>	<b>yeast mannitol agar</b>
<b>FNods</b>	<b>facteur de nodulation</b>
<b>N<sub>2</sub></b>	<b>Diazote</b>
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>Nitrates</b>
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>d'ions ammonium</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>dioxyde de carbone</b>
<b>Fe</b>	<b>Fer</b>
<b>ATP</b>	<b>adénosine triphosphate</b>
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	<b>ion dihydrogéo-phosphate</b>
<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	<b>Mono hydrogénophosphate</b>
<b>Al</b>	<b>Aluminium</b>
<b>Ca</b>	<b>Calcium</b>
<b>Pi</b>	<b>phosphore inorganique</b>
<b>Ca Cl<sub>2</sub></b>	<b>chlorure de Calcium</b>
<b>YMB</b>	<b>Yeast Manitol Broth</b>
<b>CAH</b>	<b>classification ascendante hiérarchique</b>
<b>BTB</b>	<b>Bleu de bromothymol.</b>
<b>ANOVA</b>	<b>Analyse de la variance</b>
<b>Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>phosphate de calcium tribasique</b>
<b>TCP</b>	<b>phosphates tricalciques</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	page
01	Plant d'arachide ( <i>Arachis hypogaea</i> L.) et leur Gousses.	04
02	Types de ramification chez l'arachide.	06
03	Représentation d'une plante d'arachide.	07
04	Dialogue moléculaire <i>Rhizobia</i> -légumineuse.	12
05	Illustration du début de l'infection des poils absorbant.	13
06	Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé.	15
07	Le cycle de l'azote.	17
08	Les étapes de réduction de N <sub>2</sub> par la nitrogénase.	19
09	Schéma du cycle du phosphore dans le sol et dans l'eau.	20
10	Cycle simplifié du phosphore dans un système agricole.	23
11	Mécanismes biologiques de la mobilisation de P.	24
12	Carte administrative de l'Algérie montrant le territoire de Ghardaïa en rose, le 3 Octobre 2012.	25
13	Les échantillons collectés à partir Djedid.	26
14	L'échantillon collecté à partir Sebseb.	26
15	Les échantillons collectés à partir Mansoura.	27
16	Collecte des nodules à partir de la racine d'arachide.	27
17	Conservation des nodules sous CaCl <sub>2</sub> .	28
18	Technique d'écrasement les nodules.	29
19	Isolement des souches selon la technique de quatre cadrons.	29
20	Aspect des isolats poussant sur milieux YMA + BTB.	32
21	Coloration de Gram.	35
22	Utilisation des sucres comme source de carbone par les isolats testés.	36
23	Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les isolats testés.	38
24	Effet du NaCl sur la croissance des isolats testés.	39
25	Effet du pH sur la croissance des isolats testés.	41
26	Test de solubilisation du P inorganique.	42
27	Halos de solubilisation du P inorganique sur un milieu solide PVK.	43
28	Dendrogramme montre le regroupement général de <i>Rhizobia</i> étudiés.	44

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	page
01	Classification botanique de l'arachide cultivée ( <i>Arachis hypogaea</i> L.) tétraploïde.	06
02	L'effet acidifiante ou alcalinisant des isolats étudiés.	34

## Résumé

Dans le but de Caractériser les microsymbiotes associés à la culture d'arachide (*Arachis hypogaea* L) dans la région de Ghardaïa. 15 échantillons de Rhizobia ont été isolés à partir des plantes d'arachide poussant dans les régions de Sebseb, Djedid et Mansoura.

Les tests morphologiques montrent que 60% des échantillons appartient au genre de *Rhizobium* qui caractérise par leur croissance rapide et l'effet acidifiant sur le milieu de culture YMA+BTB, tandis que les 40% restantes sont des *Bradyrhizobium* alcalinisant à croissance lent. Ce qui confirmé par les tests phénotypiques : nutritionnels, physiologiques et biochimiques.

Comme le teste nutritionnel quia révélé que les échantillons testées de L'arachide présentent une assimilation de sources de carbone similaire à celle des souches à croissance rapide et à celle à croissance lente. Et pour la source d'azote, on a remarqué que quelques acides aminés peuvent inhiber leur croissance.

Une large tolérance au NaCl, au pH a été notée pour l'ensemble des souches isolées.

Les quinze échantillons de *Rhizobia* ont été testées pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique TCP sur un milieu solide PVK présentent des potentiels de solubilisation très important avec des halos de solubilisation dans la gamme de 10-35 mm de diamètre. Par conséquence nos souches ont une grande capacité de solubilise le Pi, c'est le principal avantage d'utiliser le *Rhizobium* en tant que microorganisme solubilisant au phosphate sera leur effet nutritionnel bénéfique résultant à la fois de la mobilisation des phosphates et de la fixation de l'azote.

**Mots clés:** Arachide, *Arachis hypogaea* L, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, isolat, phosphate.

## ABSTRACT

To study the microsymbiotes associated with the cultivation of groundnut (*Arachis hypogaea* L) in the region of Ghardaïa. 15 samples of *Rhizobia* were isolated from groundnut plants growing in Sebseb, Jedid and Mansoura regions.

The morphological tests show that 60% of the samples belong to the genus *Rhizobium*, which is characterized by their rapid growth and the acidifying effect on the YMA + BTB culture medium, while the remaining 40% are *Bradyrhizobium* by their slow-growing and alkaling effect. This is confirmed by phenotypic tests: nutritional, physiological and biochemical.

The nutritional test revealed that the tested groundnut strains showed a similar assimilation of carbon sources as fast-growing and slow-growing strains. And for the nitrogen source, it has been observed that some amino acids can inhibit their growth.

A broad resistance to NaCl, pH was noticed for all isolated samples.

The fifteen samples of *Rhizobia* were tested for their ability to solubilize the inorganic phosphate TCP by using a PVK solid medium and it was found that all of them have very high solubilization potentials with solubilizing halos in the range of 10-35 mm in diameter. As a result, it can be said that the isolated strains have a high capacity of solubilizing Pi, which is a main advantage of using *Rhizobium* as a phosphate solubilizing microorganism this latter is useful for both the mobilization of phosphate and the Nitrogen fixation.

**Keywords:** groundnut, *Arachis hypogaea* L, *Rhizobia*, *Bradyrhizobium*, strains, phosphate.

## الملخص

من أجل دراسة التعايش البكتيري المرتبط بنبات الفول السوداني بمنطقة غرداية . خمسة عشر عينة ريزوبيا , تم عزلها من نباتات فول سوداني نامية بضواحي: سبب , جديد و منصوره.

حيث بينت الدراسات المورفولوجية أن 60% من العينات المعزولة تنتمي إلى رتبة الريزوبيا سريعة النمو و التي لها أثر حمضي في وسط تنمية صلب, بينما 40% الباقية تعتبر من رتبة البراديريزوبيا ذات النمو البطيء و الأثر القلوي . و هذا ما أكدته الاختبارات المظهرية: غذائية, فسيولوجية و البيوكيميائية.

كشفت الاختبارات الغذائية أن عزلات الفول السوداني تستهلك مصادر كربون مماثلة لاستهلاك سلالات ريزوبيا سريعة و بطيئة النمو. أما فيما يخص مصدر النيتروجين فقد لوحظ أن بعض الأحماض الآمنية لها نشاط تثبيطي على نمو الريزوبيا المعزولة.

قدرة تحمل عالية لوحظت في الوسط من طرف الريزوبيا المعزولة لتركيز NaCl و الأس الهيدروجيني pH .

تم اختبار الخمسة عشر عينة المعزولة لقدرتها على إذابة الفوسفات غير العضوي, و ذلك باستعمال وسط تنمية صلب من نوع PVK, حيث تبين أن كل العينات لها قدرة عالية لإذابة الفوسفات بهالات إذابة في المجال 10-35 ملم.

و نتيجة لذلك نخلص إلى أن العينات المعزولة لها قدرة عالية على إذابة الفوسفات غير العضوي و هي ميزة رئيسية لاستخدام الريزوبيا ككائنات حية دقيقة تفيد في التغذية الفوسفاتية للنبات و تثبيت النيتروجين في آن واحد.

الكلمات المفتاحية : الفول السوداني, الريزوبيا, البراديريزوبيا, عينة, الفوسفات.

# Introduction Générale

## Introduction générale

La production agricole, qui a fait un bond en avant au cours des dernières décennies, devra progresser encore plus à l'avenir, la population mondiale ayant elle aussi augmenté de façon spectaculaire. Le surcroît de production enregistré peut être attribué, pour plus de la moitié, à l'utilisation accrue d'engrais inorganiques.

Parmi les éléments nutritifs qu'apportent ces engrais, le plus important est l'azote, auquel on peut imputer, dans certains cas, 75% de l'augmentation observée des rendements. Pour satisfaire les besoins alimentaires futurs, il faudra, de toute évidence, continuer de faire de plus en plus appel aux engrais azotés inorganiques. Mais ceux-ci coûtent cher et risquent, à terme, de polluer l'environnement.

Les légumineuses sont mises à contribution par l'agriculture depuis des centaines d'années, mais ce n'est qu'au début du siècle que l'on s'est aperçu qu'elles pouvaient fixer indirectement l'azote atmosphérique, grâce à leur association symbiotique avec le *Rhizobium*.

*Le Rhizobium* est une bactérie qui infecte les racines des légumineuses et donne naissance à des excroissances de type tumoral appelées nodosités. Le centre de chaque nodosité mature contient des milliards de bactéries qui fixent l'azote. La légumineuse hôte fournit l'énergie nécessaire à cette fixation en capturant l'énergie du soleil par le phénomène de la photosynthèse. Le rendement global de cette symbiose complexe dépend donc du rendement de chacun des deux organismes associés. Leurs caractéristiques génétiques revêtent donc une très grande importance, de même que la façon dont s'exerce leur interaction. En outre, tout facteur nutritionnel ou environnemental influant soit sur la bactérie, soit sur la légumineuse, se répercute sur le rendement global de la symbiose. La complexité de cette dernière impose absolument que l'on effectue des recherches sur le terrain, où tous les facteurs peuvent être pris en considération. Depuis cette époque, de grands progrès ont été faits dans la compréhension des facteurs de génétique bactérienne et végétale régissant la symbiose, la biochimie des enzymes qui entrent en jeu, et les conditions nutritionnelles et environnementales qui influent sur le fonctionnement du système (**Danso et al ., 1987**).

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire algérien. De nombreuses espèces de légumineuses sont utilisées comme ressources pour l'alimentation humaine (fève, soja, haricot, pois chiche, lentille, l'arachide ...) et animale (luzernes, trèfles, ...) et en médecine (fenugrec) (**Chabbi, 2010**).

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est l'une des plus importantes légumineuses cultivées dans le monde, notamment dans les régions arides et semi-arides de l'Afrique. Classée la quatrième des cultures oléagineuses mondiales et la troisième parmi les cultures vivrières dans le monde. Est une culture commerciale importante actuellement, cultivée dans plus de quatre-vingts pays (**Chuan et al.,2012**). C'est une légumineuse qui peut utiliser l'azote atmosphérique grâce à la symbiose avec Le *Rhizobium* pouvant fournir jusqu'à 30 % de l'azote nécessaire à la plante mais la quantité d'azote fixé est très variable car l'activité symbiotique est influencée par plusieurs facteurs tels que le déficit hydrique, la salinité, les variations de température, la déficience des sols en éléments minéraux surtout en P.

En Algérie la culture de ces plantes occupe une place primordiale grâce à leurs intérêts agro-économiques et environnementaux. Cependant, dans les zones comme Ghardaïa. Les rendements restent encore modestes à cause de nombreuses de ces contraintes.

Le phosphore, par ordre d'importance est le deuxième macroélément après l'azote pour la croissance et le développement des plantes. Les sols sont souvent riches en phosphate minéral et organique, mais déficients en orthophosphates disponibles pour la nutrition des légumineuses. Sa disponibilité sous forme soluble dans les sols, est par conséquent d'une grande importance pour l'agriculture. En cas de déficience, le phosphore affecte négativement la symbiose et par conséquent la productivité et le rendement des légumineuses (**Suliman et al., 2013**).

La majorité du phosphore (P) contenu dans les sols se trouve sous des formes minérales et organiques complexes qui ne sont pas directement utilisables par les plantes (**Turner et al., 2005**). La faible mobilité du Pi dans la solution du sol résulte de sa forte réactivité avec les constituants du sol. Seule une faible proportion de phosphore est alors présente sous forme de Pi en solution et sa concentration est estimée pour la majorité des sols entre 0,1 et 10 µM (**Hinsinger, 2001**). Cette concentration est insuffisante face aux besoins nutritifs en P des légumineuses et la biodisponibilité en Pi devient alors rapidement un facteur limitant pour la production de biomasse, et la fixation symbiotique d'azote chez ces espèces.

C'est dans ce contexte que s'intègre notre travail, où nous avons entrepris pour la première fois une caractérisation des souches rhizobienne de la plantes légumineuse d'arachide poussant dans différentes zones de la région de Ghardaïa (sud algérien), et la sélection des souches locales de *Rhizobia* à haut potentiel de solubilisation du phosphore.

## ***Introduction générale***

---

Le présent travail est réalisé selon le plan suivant :

- Collecte des nodules à partir des racines de la plante d'arachide (*Arachis hypogaea L.*) poussant dans les zones : Sebseb, Djedid, Mansoura dans la région de Ghardaïa,
- Isolement des souches bactériennes à partir de ces nodules ;
- Etude morphologique des isolats ;
- Tests nutritionnels (source de carbone, source d'azote) ;
- Tests physiologiques (effet de salinité, effet du pH) ;
- Test biochimique qui se focalise sur la capacité des souches de solubiliser le phosphore inorganique ;

# Etude bibliographique

## 1. Le partenaire végétal : l'arachide (*Arachis hypogaea* L.)

### 1.1. Origine de la plante hôte

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est originaire de l'Amérique du Sud. Les portugais introduisirent la plante au début du XVIème siècle sur la côte occidentale de l'Afrique. De leur côté, les espagnols, à peu près à la même époque, l'auraient introduite aux Philippines à partir de la côte Ouest du Mexique. De là, la culture de l'arachide se serait étendue vers la Chine, le Japon, le Sud-est asiatique, l'Inde et la côte Est de l'Australie. Ainsi, l'Afrique se trouverait être un lieu de rencontre de deux voies différentes de diffusion de l'espèce (Gillier et Silvestre, 1969).



**Figure 1:Plante d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) et leur Gousses (Gillier et Silvestre, 1969).**

### 1.2. Position systématique et taxonomie

L'Arachide appartient à la famille des Légumineuses une des plus riches du globe en espèces (elle en renferme plus de 10 000 connues) ; elle est avec la famille des Graminées la plus utile à l'homme auquel elle fournit de nombreux produits alimentaires, industriels, fourragers, médicinaux.

Les Légumineuses sont des Dicotylédones dialypétales à pistil libre, à étamines souvent réunies à leur base, généralement au nombre de dix. Le pistil est formé d'un seul carpelle libre qui à maturité devient un fruit sec, indéhiscent ou plus souvent déhiscent ; dans ce cas il s'ouvre en deux valves et constitue ce qu'on appelle une «gousse» ou « légume » (du mot latin *legumen*, gousse, d'où le nom de la famille).

On sait que la grande famille des Légumineuses comprend trois sous-familles.

Les Papilionacées, dont la fleur est en forme de papillon, l'embryon est souvent courbé, la graine n'a pas d'albumen (Herbes, arbres, arbustes, ou lianes répandus dans tous les pays).

Les Caesalpiniées, à fleur irrégulière, mais non papilionacée, embryon généralement droit, graine souvent albuminée (Arbres, arbustes ou lianes, rarement herbes). Les représentants de la sous-famille vivent dans les pays chauds.

Les Mimosées, à fleur régulière, à étamines souvent nombreuses, à graines presque toujours dépourvues d'albumen.

L'Arachide, comme le Trèfle, la Luzerne, le Haricot, le Pois est une Légumineuse Papilionacée, mais comme nous le verrons (**Anonyme, 1933**).

La classification classique qui a été retenue est la suivante :

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Rosidae

**Ordre :** Fabales

**Famille :** Fabaceae

**Sous-famille :** Faboideae

**Genre :** *Arachis*

**Espèce :** *Arachis hypogaea*

Nom binominal *Arachis hypogaea* (**Fernand, 1941**).

### **1.3. Diversité génétique**

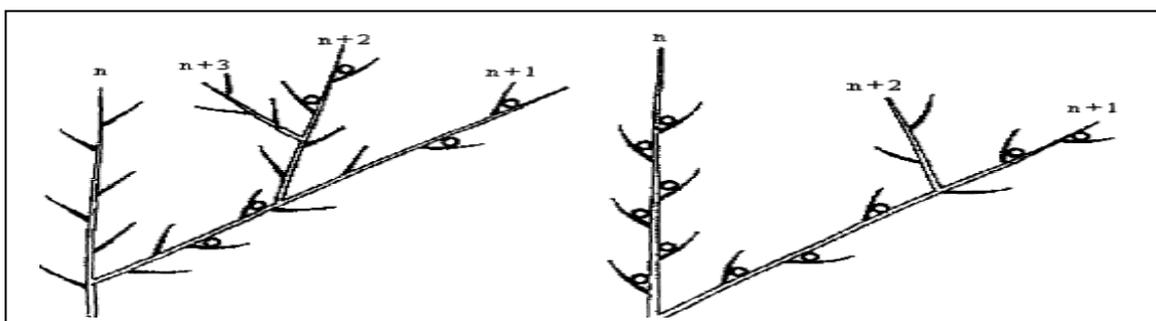
La floraison et la croissance de l'arachide sont indéterminées et sa distribution géographique importante. La plasticité et la diversité morphologique de l'arachide sont, par conséquent, très fortes. Le port de la plante peut être érigé ou rampant, avec tous les stades intermédiaires. On distingue plusieurs types variétaux, principalement sur la base de leur système de ramification, notamment de la fréquence des ramifications d'ordre élevé et de la disposition relative des rameaux végétatifs et des rameaux reproducteurs (**Gillierp, Silvestre, 1969**).

**Tableau 1 : Classification botanique de l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) tétraploïde (Singh et Simpson, 1994 et Herselman, 2003).**

Sous -espèce	Variété botanique	Type commercial	ramification	port
<i>Hypogaea</i>	hypogaea	virginia	alternée	Rampant à érigé
<i>Fastigiata</i>	Hirsuta	Peruvian Runner	Alternée	Rampant
	Fastigiata	Valencia	séquentielle	Érigé
	Vulgaris	Spanish	séquentielle	Érigé
	Aequatoriana peruviana	- -		

#### 1.4. Morphologie

- a. **Tige primaire** : toujours dressée, est le plus souvent ramifiée dès la base. Selon les variétés, les rameaux sont “rampants”, largement étalés sur le sol ou “érigés” jusqu’à une hauteur de 60 centimètres environ. Le port de la plante représente un des critères essentiels du système de classification de l’arachide en sous-espèces (**Chevalier, 1934**).



**Figure 2 : Types de ramification chez l'arachide : (Pattee et Stalker, 1995)**

- b. **Feuilles et les folioles** : présentent, surtout dans le jeune âge, une position diurne et une position nocturne par suite de l'existence d'étranglements moteurs à leurs bases. Le soir, les folioles s'abaissent en se rapprochant deux à deux, les épidermes supérieurs venant presque en contact. La transpiration et la fonction chlorophyllienne s'arrêtent alors complètement. Les feuilles qui paraissent flétries dans la journée

lorsqu'il fait chaud et qu'il n'a pas plus depuis plusieurs jours redeviennent turgescentes.

- c. **Les racines :** Au fur et à mesure que la tige primaire de l'Arachide émet des ramifications, la racine primaire s'enfonce verticalement dans le sol et elle grossit par le fonctionnement d'une zone cambiale. Elle peut ainsi pénétrer à 20 cm. ou 30 cm. de profondeur.

Deux ou trois semaines après la germination on voit fréquemment apparaître sur certaines racines de la plante de petites nodosités d'abord excessivement petites (un demi à un millimètre). Ces nodosités peuvent rester en cet état et tomber ou se dessécher plus tard avec les radicelles qui les portent. On compte parfois plusieurs centaines de ces nodosités sur un seul plant d'Arachide (Chevalier, 1934).



**Figure 3 : Représentation d'une plante d'arachide. 1 : feuille composée de 4 folioles, 2 : fleur, 3 : hypanthe, 4 : gynophore, 5 : gousse, 6 : bec de la gousse, 7 : constriction ; 8 : tégument de la graine, 9 : graine sans tégument, 10 : cotylédon portant**

### **1.5. Exigences culturelles**

Les variétés cultivées sont très nombreuses et regroupées en deux grands types :

*Virginia*, à port rampant et à cycle végétatif long (120 à 140 jours) ; les graines ne germent pas prématurément ; cette variété est plus résistante à la tavelure des feuilles ;

*Spanish* et *Valencia*, à port érigé et à cycle végétatif court (90 à 110 jours) ; le rendement est plus élevé, mais la germination rapide après maturité peut poser problème. Le cycle de culture dure de 90 à 150 jours. La floraison intervient un mois après le semis.

Les cacahuètes ne poussent que dans des sols bien drainés et pas trop argileux pour éviter les pertes au moment de la récolte (arrachage). Le pH idéal est de 5,8 (en cas de sol acide, il faut donc procéder à un chaulage). Les cacahuètes sont des légumineuses et peuvent satisfaire la totalité ou presque de leurs besoins en azote grâce à une relation de symbiose qu'elles entretiennent avec un type de bactérie (*Rhizobium*) qu'il faut inoculer sur un sol dont elle est absente (9 kg/ha pour obtenir une bonne nodulation, l'inoculant doit être épandu directement sur la semence dans la raie de semis).

Pour protéger le sol contre l'érosion par le vent et par l'eau, on y installe normalement une culture couvre-sol d'hiver qui sera ensuite enfouie vers la fin avril, afin de lui laisser le temps de bien se décomposer avant les semences de l'arachide. Les petits exploitants africains plantent souvent les cacahuètes avec une ou deux autres cultures, telles que le sorgho, le millet ou les pois sauvages. Les cultures se font en buttes (surélevées) séparées d'un mètre environ; ce qui permet d'améliorer le drainage et facilite l'arrachage. Dans les régions de savane au nord de l'Afrique occidentale, elles sont généralement plantées en juin et récoltées en septembre ou octobre. Dans les régions de savane du sud, où les précipitations sont plus élevées, il est souvent possible d'obtenir deux récoltes (la première se faisant d'avril ou mai jusqu'au mois d'août, et la deuxième d'août ou septembre jusqu'au mois de novembre). La récolte doit se faire dès la maturité (lorsque la pellicule qui recouvre la graine se détache facilement). Un point important est d'éviter le développement de moisissures qui peuvent produire des aflatoxines, dangereuses pour le bétail qui consommerait les tourteaux contaminés. À signaler, une maladie virale, la « rosette », transmise par un puceron. Cette maladie provoque le rabougrissement des pieds et fait baisser sensiblement le rendement surtout si elle apparaît tôt (moins de 40 jours après le semis).

Deux autres maladies fongiques, la cercosporiose (tavelure des feuilles) et la rouille (spores sur la face inférieure des feuilles), sont présentes sur l'arachide surtout en climat humide, où

elles provoquent une chute des feuilles entraînant une baisse des rendements en gousses (Chevalier, 1934).

### **1.6. Production de la culture d'arachide (dans la région de Ghardaïa)**

Une récolte de 8.000 quintaux d'arachide «Bio» a été obtenue au titre de la campagne de cueillette qui a été lancée au cours du mois courant dans la wilaya de Ghardaïa, a-t-on indiqué auprès de la direction des services de l'agriculture (DSA). Cette culture circonscrite principalement dans les localités de Sebseb, Mansoura et Metlili au sud du chef-lieu, à laquelle une superficie cumulée de près de 450 hectares a été consacrée, est «prometteuse», selon la même source. L'arachide est la qualité supérieure de la région de Sebseb qui retient l'attention. Bien que la production arachidière n'ait pas encore atteint sa vitesse de croisière, les cacahuètes de Sebseb ont gagné une notoriété qui a dépassé les frontières de la région de Ghardaïa, a-t-on relevé. Le produit est très apprécié par beaucoup de personnes notamment les touristes et autres vacanciers de passage dans la région du M'Zab, soulignant que pour obtenir un produit d'une telle qualité, les agriculteurs de Sebseb suivent la même recette : une culture «bio». De nombreux cultivateurs des localités de Sebseb, Mansoura et Metlili accordent un grand intérêt à l'intensification de la culture de l'arachide qui constitue une «culture lucrative» qui rapporte notamment avec l'abondance de l'eau, l'ensoleillement et un sol sablonneux, a expliqué un technicien des Services de l'agriculture. Introduite par un agriculteur à Sebseb, localité désenclavée située à 50 km au sud de Ghardaïa, la culture d'arachide a été généralisée dans les localités de Mansoura et Metlili avec l'importation des semences de deux variétés d'origine égyptienne et espagnole, indique la même source, ajoutant que cette culture reste au stade «traditionnel» dans ces régions du sud du pays. Les travaux de semis sont réalisés manuellement par une centaine d'agriculteurs qui sont confrontés à de nombreux problèmes en particulier leur ignorance de l'itinéraire technique de cette culture et aux nombreux ravageurs de ce type de culture notamment les moineaux, les rongeurs et autres prédateurs, a-t-il fait savoir. De nombreux spécialistes dans le développement rural estiment que l'intensification de cette culture «stratégique» soutenue par une formation technique des agriculteurs peut assurer un développement durable pour ces contrées enclavées en créant des unités de conditionnement de cacahuètes, de huileries ou savonneries. De la famille des légumineuses ou fabacée, «*Arachis hypogaea*», l'arachide est très nutritive. Les grains ou cacahuète renferment entre 40 et 50% d'huile, 20 à 30% de protéines et constituent aussi une source considérable en vitamine B (Salim ,2012).

## **2. Le partenaire bactérien : *Rhizobia***

Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées *Rhizobiums*. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie (Eric, 2007).

### **2.1. Classification**

Les *Rhizobia* ont été reclassés dans en deux genres :

- **Genre *Rhizobium*** : correspond aux souches à croissance rapide (Temps de génération : 2 à 4 heures), pourvues de plusieurs flagelles, acidifiant certains milieux.
- **Genre *Bradyrhizobium*** : souches à croissance lente (temps de génération supérieur à 6 heures), pourvues d'un seul flagelle, alcalinisant certains milieux. En suite d'autres modifications ont été apportées ; comme le genre *Azorhizobium* qui a été créé, et qui regroupe les souches susceptibles de former des nodosités sur la tige et les racines, en plus de l'aptitude de fixation de l'azote atmosphérique en culture pure (Neyra, 1992)

La taxonomie moderne est basée sur l'approche polyphasique, c'est à dire sur l'analyse génétique (Séquence de l'ADNr, homologie ADN / ADN) ainsi que sur l'analyse numérique afin de décrire toute nouvelle espèce de *Rhizobia* (Graham et al., 1991 ; Zakhia et de Lajudie, 2006).

La nouvelle nomenclature a permis de classer les bactéries nodulant les légumineuses en 12 genres différents: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Devosia*, *Cupriavidus* (autrefois appelé *Ralstonia*), *Herbaspirillum*, *Phyllobacterium* (Zakhia et de Lajudie, 2006).

### **2.2. Morphologie des *Rhizobia***

Les *Rhizobia* sont des bactéries du sol, gram négatifs, aérobies, hétérotrophes et non sporulant, ils présentent deux formes :

- **La forme in vitro** : Les *Rhizobia* sont des bâtonnets de 1,2 à 3 µm de longueur sur 0,5 à 0,9 µm de large, pourvus d'un flagelle polaire, ou de plusieurs flagelles péritriches. Les *Rhizobia* pourvus de 2 à 6 flagelles sont caractérisés par une croissance rapide, tandis que les *Rhizobia* à un seul flagelle polaire ou subpolaire ont une croissance lente (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

- **La forme bactéroïde** : les *Rhizobia* à l'intérieur des nodules se transforment en bactéroïdes de forme régulière ou irrégulière. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

### **2.3. Caractères biochimiques**

Les *Rhizobia* sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Les vitamines s'avèrent parfois nécessaire pour la croissance de certaines espèces (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Les *Rhizobia* à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose. Tandis que la majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

### **2.4. Caractères physiologiques**

Le *Rhizobium* est un micro-organisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible pression en oxygène. Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, précisément 6,8, mais certaines souches peuvent tolérer un milieu acide de pH 4 comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

### **2.5. Caractères culturaux**

Les *Rhizobium* sont divisés en deux groupes, la première comporte les *Rhizobia* à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h. Le deuxième est le groupe des *Rhizobia* à croissance lente, ce

sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h.

Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de *Rhizobium* (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, humides et translucides. Les colonies jaunes et pâles sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les bactéries correspondant aux formes non différenciées en bactéroïdes sont les seules capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson et al., 2006).

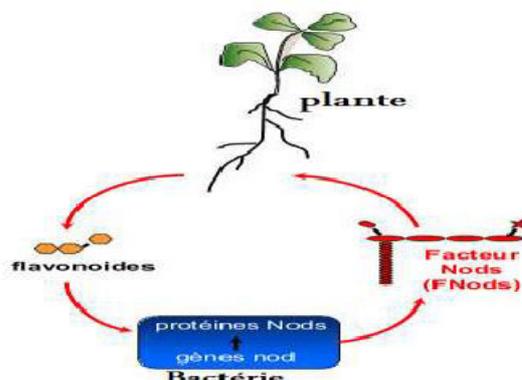
### **3. La symbiose légumineuse-*Rhizobia***

#### **3.1. La formation des nodules**

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte, mais le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. 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 *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection (Anonyme, 2004).

##### **a. Pré infection**

La symbiose légumineuse-*Rhizobium* se traduit par la formation d'un nouvel organe, le nodule racinaire, au sein duquel les *Rhizobia* fixent l'azote atmosphérique. Le processus de nodulation commence lors de la pré-infection, par une phase de reconnaissance entre les deux partenaires, et qui est suivie de deux étapes quasiment simultanées, l'infection de la racine par les bactéries et l'organogenèse du nodule (Patriarca et al., 2004).



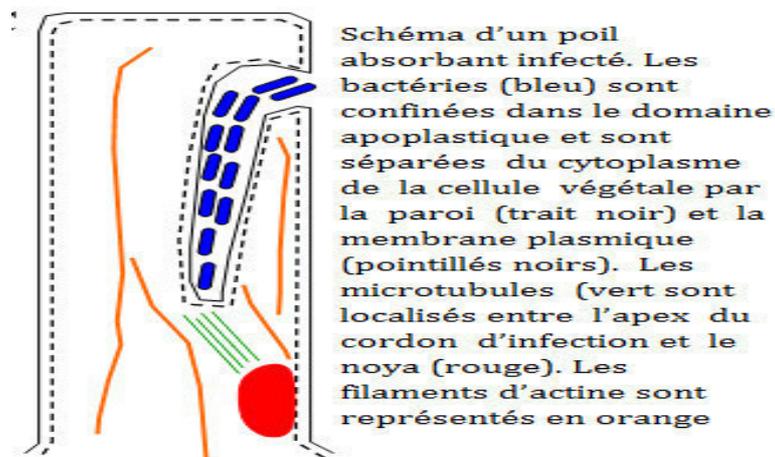
**Figure 4: Dialogue moléculaire *Rhizobia*-légumineuse (Patriarca et al., 2004).**

**b. L 'infection de la racine**

La première étape de l'infection est l'attachement des bactéries sur les jeunes poils absorbants. Une fois fixées au niveau de l'apex du poil en croissance, les bactéries vont induire par l'intermédiaire des FNods la courbure du poil absorbant autour d'une micro-colonie bactérienne. A la suite de cette déformation les bactéries pénètrent dans le poil absorbant via une structure tubulaire appelée cordon d'infection (**Timmers et al., 1999**).

La progression des bactéries vers la base du poil absorbant se fait grâce à l'élongation du cordon d'infection, qui est délimité du reste de la cellule par une paroi végétale primaire néosynthétisée et de nature pectocellulosique (**Rae et al., 1992**). A l'intérieur du cordon d'infection, les bactéries apparaissent alignées en une ou deux colonnes plus ou moins parallèles à l'axe du cordon (**Patriarca et al., 2004**).

Lorsque le cordon d'infection atteint la base de la cellule épidermique, il fusionne avec la paroi et les bactéries se propagent dans l'espace intercellulaire. Dans le même temps, la paroi de la cellule corticale sous-jacente s'invagine au niveau du ponts cytoplasmiques (figure 5), au travers duquel le cordon d'infection continue ensuite sa progression (**van Brussel et al., 1992**).



**Figure 5: Illustration du début de l'infection des poils absorbant (van Brussel et al., 1992).**

**c. L' organogenèse du nodule**

Les cellules du cortex interne se différencient et leur activité mitotique se réactive avant et pendant que le cordon d'infection se forme et progresse vers les tissus internes de la racine (**Foucher et Kondorosi, 2000**). La conséquence de cette activité mitotique est la formation d'une structure appelée primordium nodulaire (**Brewin, 1991**). Lorsque les cordons d'infection atteignent le primordium, les cellules du cortex moyen qui n'ont pas été traversées

par les bactéries se différencient en cellules méristématiques (Figure 6). Tandis que le nodule croît grâce à l'action du méristème, les cordons d'infection se ramifient d'avantage et pénètrent une partie des cellules situées en dessous du méristème.

Ainsi, le jeune nodule est formé d'un méristème apical et d'un tissu central composé de cellules infectées (**Monahan-Giovanelli et al., 2006**).

Pendant le développement du nodule, les bactéries sont libérées à certains endroits des cordons d'infection dans le cytoplasme des cellules végétales. Les cordons d'infection ne sont plus délimitées par de la paroi, permettant ainsi l'invagination de la membrane plasmique et la formation de vésicules d'endocytose enfermant une ou plusieurs bactéries (**Cermola et al., 2000**). A partir de ce stade, les bactéries libérées sont appelées bactéroïdes, la membrane qui les entourent est appelée membrane péri-bactéroïdienne et l'ensemble forme le symbiosome (**Brewin, 1991**). La présence de leghémoglobine autour des symbiosomes permet de baisser la pression partielle en oxygène, qui agit comme inhibiteur sur la nitrogénase bactérienne, tout en assurant un approvisionnement en oxygène pour la respiration des bactéroïdes (**Ott et al., 2005**).

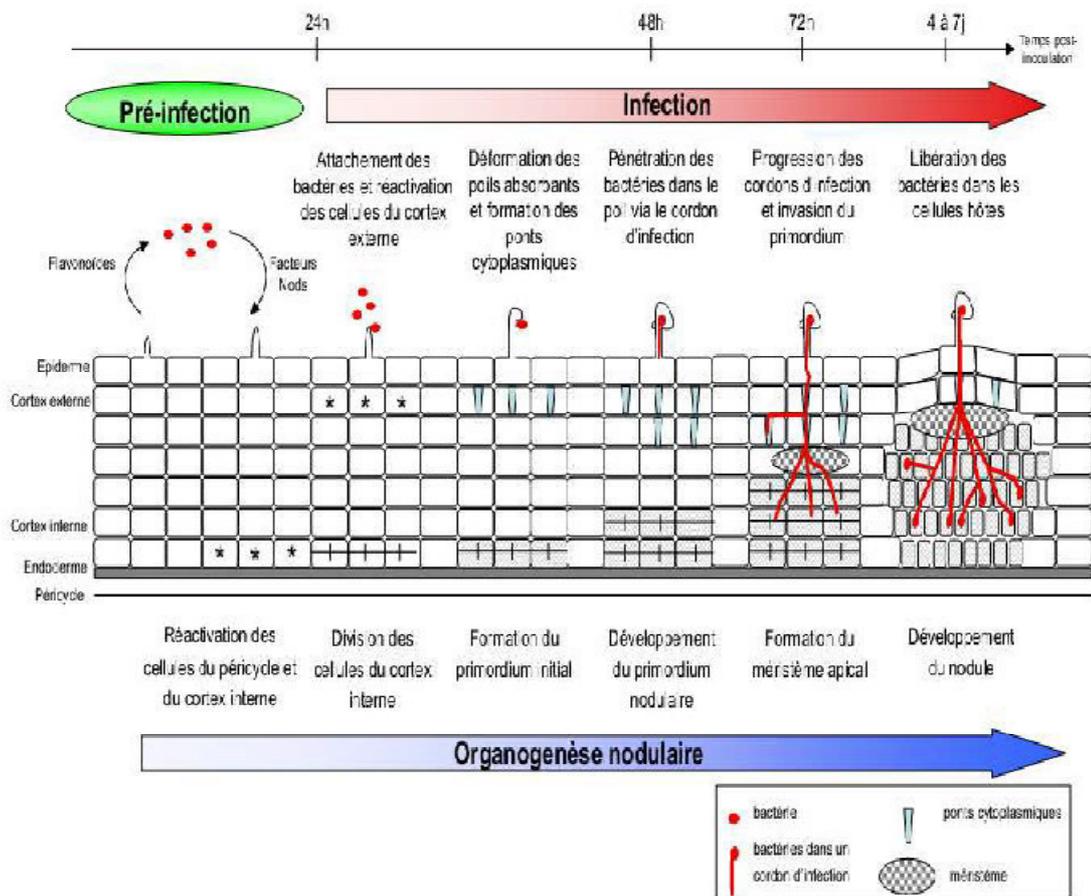


Figure 6: Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé (Monahan-Giovanelli et al. 2006).

### 3.2. La fixation de l'azote

#### 3.2.1. Le cycle de l'azote

L'atmosphère terrestre est composée à près de 80% de  $N_2$ . L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques. Par exemple : les acides aminés des protéines (chaque acide aminé contient un groupement  $NH_2$ ).

Par contre, les plantes ne peuvent pas utiliser l'azote atmosphérique. L'azote est assimilé par les racines sous forme de nitrates ( $NO_3^-$ ) ou, parfois, d'ions ammonium ( $NH_4^+$ ). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol.

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des décomposeurs (des bactéries du sol). Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée. Et le cycle recommence (**Bourbonnais, 2010**).

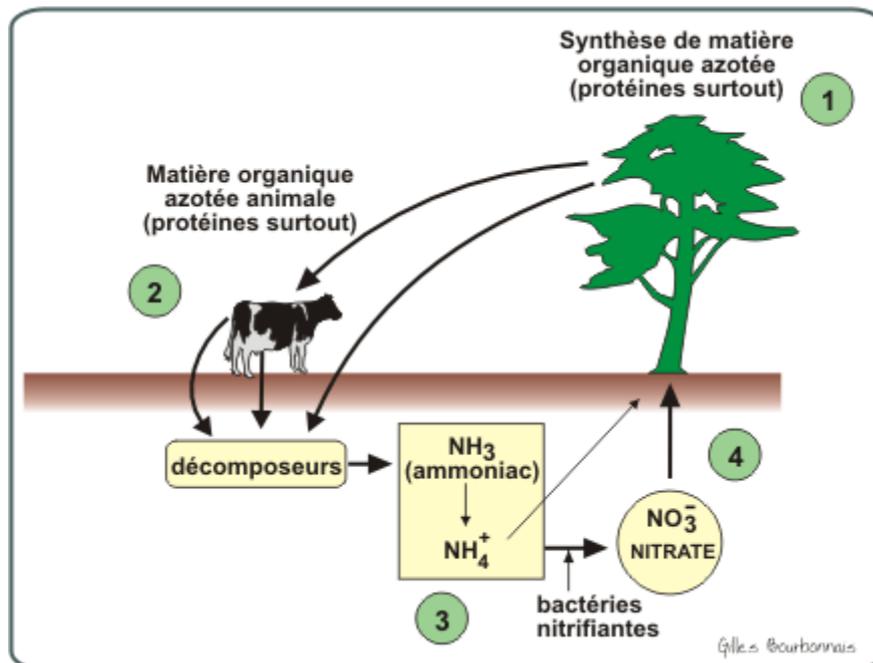


Figure 7 : Le cycle de l'azote (Bourbonnais, 2010).

Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions  $NO_3^-$  puisés dans le sol.

Les animaux utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leur propre matière organique azotée. Les protéines de la viande, par exemple, sont produites à partir des

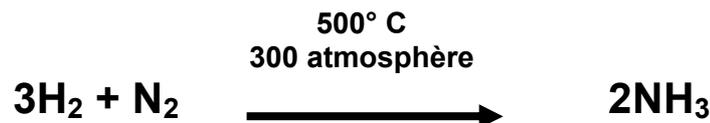
acides aminés fabriqués par les plantes et mangés, sous forme de protéines végétales, par l'animal.

Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et ammoniac (NH<sub>3</sub>). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> qui se forme directement à partir d'ammoniac (**Bourbonnais, 2010**).

### 3.2.2. La fixation industrielle de l'azote

On peut produire de l'engrais azoté à partir de l'azote de l'air par la réaction de **Haber-Bosh**.



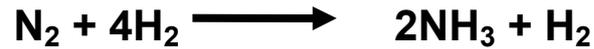
Le dihydrogène est produit à partir de gaz naturel (CH<sub>4</sub>). Le processus nécessite de l'énergie et libère du gaz carbonique.



L'ammoniac produit peut être utilisé directement ou converti en nitrates (ex. nitrate de sodium NaNO<sub>3</sub> ou nitrate d'ammonium NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) (**Bourbonnais, 2010**).

### 3.2.3. La fixation biologique de l'azote

Ainsi le processus majoritaire de fixation est la fixation biologique naturelle de N<sub>2</sub>. L'origine de ce processus se confond avec l'apparition de la vie sur terre, il y a 3,5 milliards d'années (**Clark et al., 2008**). Cette fixation est surtout connue sur les continents où elle permet à la vie de se développer dans des milieux initialement pauvres en nitrate. La fixation du diazote est limitée aux procaryotes qui possèdent, à l'inverse des plantes, un complexe enzymatique, la dinitrogénase, qui catalyse la réduction suivante:



Les organismes fixateurs comprennent à la fois des procaryotes symbiotiques ou libres, tels que des bactéries hétérotrophes, aérobies (*Azotobacter*) et principalement anaérobies (*Clostridium*), ainsi que des bactéries autotrophes (*Rhodospirillum*) très répandues dans le sol, sur la surface des feuilles et des écorces. Les systèmes symbiotiques des légumineuses sont relativement bien compris alors que des méconnaissances persistent sur la fixation par des cyanobactéries symbiotiques ou des bactéries libres hétérotrophes. Il est donc difficile d'établir avec précision leur taux de fixation N<sub>2</sub> même si leur contribution est supposée importante. Mais les plus puissants fixateurs sont les bactéries symbiotiques de végétaux supérieurs, tels que le genre *Rhizobium* symbiotiques des Fabacées, pouvant fixer jusqu'à 200 kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (Smith, 1999).

#### 3.2.4. La nitrogénase

La conversion biologique de l'azote moléculaire en ammonium est catalysée par une enzyme, la nitrogénase, système que l'on trouve chez les bactéries fixatrices d'azote (Rees et al., 1993). Ce n'est que lorsque la symbiose est mise en place que la nitrogénase apparaît dans les bactéroïdes et la leghémoglobine dans les nodosités (Anonyme, 2004). La nitrogénase est constituée de deux protéines : la Fe-protéine et la Fe- Mo-protéine, qui, ensemble, véhiculent l'ATP (Rees et al. 1993).

Le complexe nitrogénase est sensible au dioxygène qui l'inactive de manière irréversible.

La présence de grandes quantités de leghémoglobine (hémoglobine) dans les nodules est l'un de ces mécanismes qui permet d'assurer un transport efficace de l'oxygène jusqu'aux chaînes respiratoires mitochondriales tout en maintenant une concentration en O<sub>2</sub> faible compatible avec l'activité nitrogénase (Appleby, 1988).

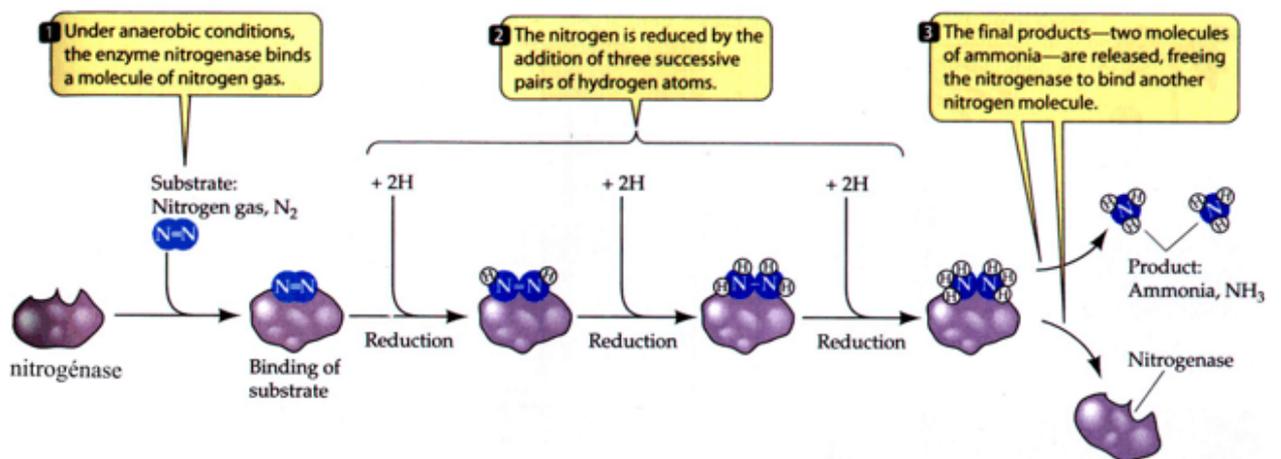


Figure 8 : Les étapes de réduction de N<sub>2</sub> par la nitrogénase (Bourbonnais , 2010).

La réaction est coûteuse en énergie. Elle nécessite 16 ATP pour chaque NH<sub>3</sub> produit (c'est la plante qui fournit, sous forme de nourriture, l'énergie à la bactérie) (Bourbonnais, 2010).

L'activité nitrogénase et le fonctionnement des nodosités symbiotiques peut être affecté par plusieurs facteurs environnementaux, parmi lesquels on trouve le déficit en phosphore. Cet élément qui reste une contrainte majeure pour la production des légumineuses.

#### 4. Nutrition phosphatée et interactions Plante-Rhizosphère

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (Ramo et al., 2008 ; Keneni et al., 2010).

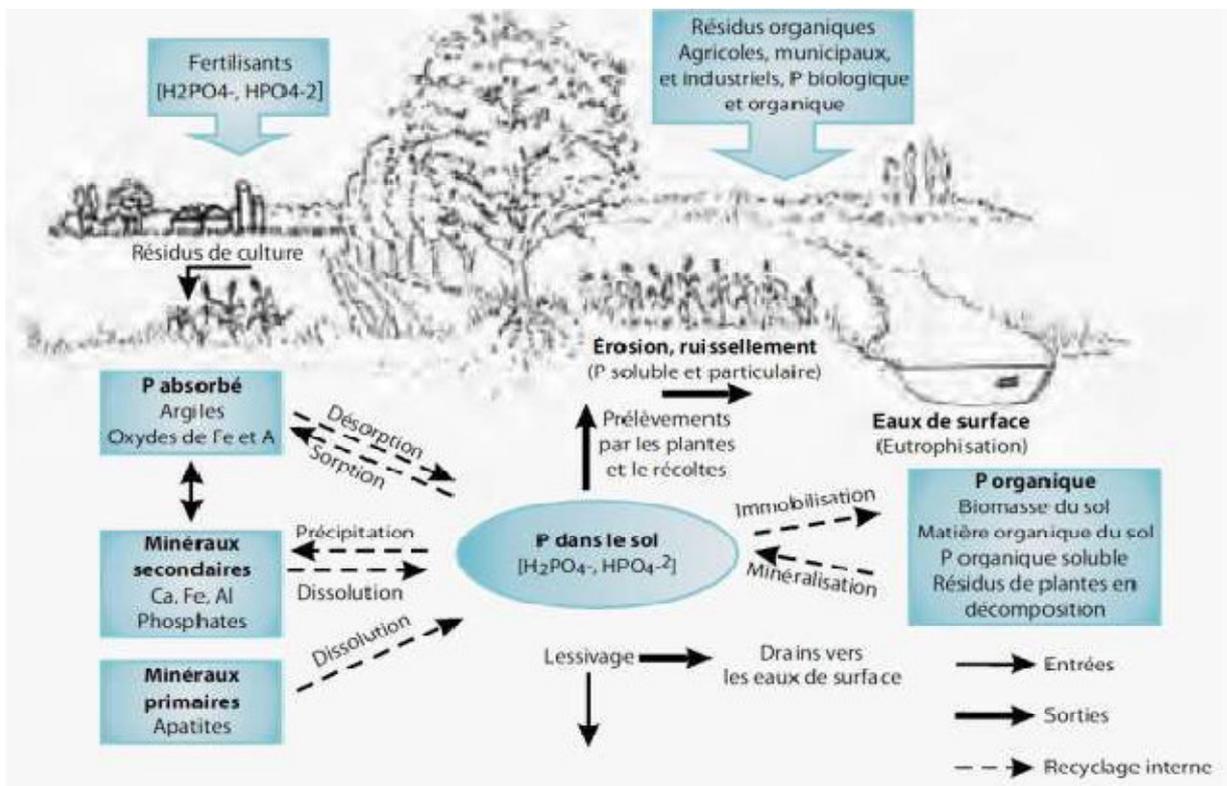
Il existe une grande réserve de phosphore dans les sols, mais très peu de quantité est disponible pour la plante. Des microorganismes dans les sols peuvent solubiliser le phosphore non disponible et le rendre disponible pour planter. Ils sont appelés microorganismes solubilisant de phosphate (PSM). Un groupe de champignons s'associe aux racines des plantes supérieures et mobilise le phosphore du sol au système végétal.

##### 4.1. Formes du phosphore dans les sols agricoles et forestiers

Dans les sols, on retrouve le P sous différentes formes. La connaissance de la dynamique de ces fractions est utile pour prédire la bio-disponibilité du P et son risque de transfert vers les

eaux de surface (Zheng et al., 2001). Ces formes peuvent être classées en différentes catégories comme suit (Stevenson, 1986).

- Formes solubles inorganiques et organiques présentes dans la solution du sol;
- Phosphates inorganiques faiblement retenus (labile);
- Phosphates de fer (Fe) et d'aluminium (Al) insolubles (dans les sols acides) et phosphates de calcium (Ca) insolubles (dans les sols calcaires et alcalins);
- Phosphates fortement retenus par les oxydes hydratés de Fe et d'Al;
- Phosphate fixé par les minéraux silicates;
- Formes organiques insolubles contenues dans la biomasse microbienne du sol, dans les résidus végétaux et animaux non décomposés et dans la matière organique du sol (humus).



**Figure 9: Schéma du cycle du phosphore dans le sol et dans l'eau (Stevenson, 1986).**

#### **4.1.1. Formes solubles inorganiques**

Dans les sols, la majorité du P inorganique existe sous forme d'orthophosphates ou de dérivés d'acides phosphorique ( $H_3PO_4$ ). Les principaux composés sont les phosphates de Ca, d'Al et de Fe en plus de certains autres cations sous formes de traces (Stevenson, 1986).

### **4.1.2. Phosphates inorganiques faiblement retenus (labile)**

Le P labile est une fraction d'importance en agriculture puisqu'elle est facilement disponible aux plantes et peut être facilement lessivée (**Hedley et al., 1982; Sharpley et Moyer, 2000**). Cette fraction représente le P présent dans la solution du sol, le P organique facilement minéralisé et les phosphates faiblement retenus sur les colloïdes argileux. D'autre part, la biomasse microbienne du sol renferme de 1 à 2 % du P du sol. La majeure partie du P du sol (> 90%) est cependant sous forme insoluble ou fixée, comme les minéraux phosphatés primaires, le P des humus, les phosphates insolubles de Ca, de Fe et de Al et les phosphates fixés par les oxydes colloïdaux et les minéraux silicates (**Stevenson, 1986**). Ce P non labile est très peu disponible pour la plante. Les formes de P labile et non labile peuvent renfermer des constituants autant organiques qu'inorganiques.

### **4.2. Nutrition phosphatée chez les plantes**

Les légumineuses, en général, requièrent de grandes quantités de phosphore et leur capacité de prélever cet élément du sol est souvent moins importante que celle des céréales. Les légumineuses disposent d'un système racinaire moins développé par rapport aux graminées ; ce qui limite l'absorption du phosphore qui se diffuse très lentement à travers la solution du sol vers la rhizosphère (**Munns et Mosse, 1980**).

### **4.3. Effets de déficience en phosphore**

#### **4.3.1. Effet sur la croissance de la plante**

En réponse au manque de P, les plantes développent plus leur enracinement, augmentent le taux de prélèvement via le sol, mobilisent plus de P à partir des feuilles âgées et mobilisent celui stocké dans les vacuoles (**Schachtman et al., 1998**).

**Snapp et Lynch, (1996)** ont trouvé que les racines conservaient le phosphore en conditions limitantes en cet élément à la différence des tiges et des feuilles qui le mobilisaient vers les graines en croissance aussi bien en conditions de suffisance qu'en condition de déficience.

#### **4.3.2. Effet sur la fixation symbiotique de l'azote (FSN)**

La disponibilité du P dans le sol a un effet remarquable sur l'aptitude des légumineuses à fixer l'azote atmosphérique (**Sulieman et al., 2013**). En effet, des études ont montré que le taux de l'azote fixé est significativement augmenté sous suffisance en P, ce qui laisse suggérer que cet

élément exerce un rôle spécifique dans le fonctionnement des nodosités (**Christiansen et al., 2002**). Un manque de Phosphore va limiter sévèrement la formation des nodules et la fixation de l'azote. Les recherches sélectionnant des *Rhizobia* effectifs aux champs doivent prendre en considération une fertilisation phosphatée adéquate (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

Les besoins en P sont plus importants pour la FSN que pour l'assimilation de l'azote minéral (**Kouas et al., 2005**). Ainsi, il a été démontré que la fixation de N<sub>2</sub> était faible chez des plantes de haricot soumises à une sévère déficience en P, en comparaison avec d'autres plantes bénéficiant d'un régime modéré ou suffisant en P (**Kouas et al., 2005**).

### **4.3.3. Effet sur le métabolisme oxydatif**

Le déficit en P peut induire un stress oxydatif en produisant des espèces réactives de l'oxygène comme les superoxydes, le radical hydroxyle et peroxyde. En effet, au niveau de la symbiose rhizobienne, (**Bargaz et al., 2013**).

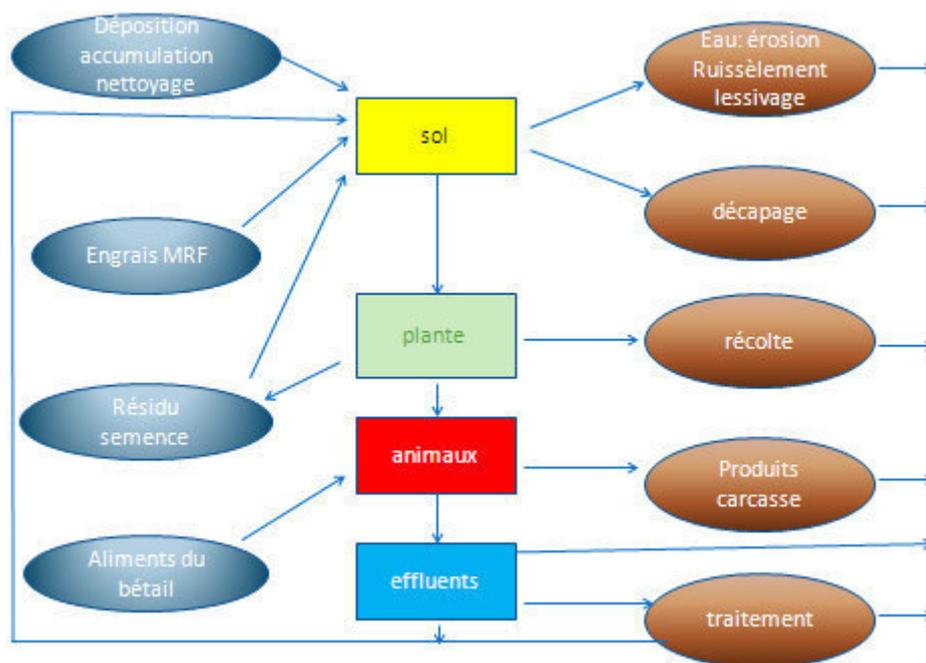
Ainsi, une déficience prolongée en P des plantes entraîne l'augmentation de la peroxydation lipidique, production accrue en peroxyde d'hydrogène et stimulation de l'activité de la catalase et de la peroxydase dans les extraits des racines déficitaire en P (**Juszczuk et al., 2001**). Quant aux nodosités, des études ont montré que les formes réactives de l'oxygène peuvent résulter surtout de l'auto-oxydation de la leghémoglobine (**Puppo et Halliwell, 1988**).

## **4.4. Biodisponibilité du phosphore**

Les ions orthophosphates (Pi) représentent les seules formes de phosphore (P) utilisable par les cultures. Dans les sols, ils sont généralement présents à de faibles concentrations dans la solution, en raison des nombreux processus géochimiques contraignant leur mobilité et disponibilité. Les plantes et les micro-organismes associés, au travers de relations rhizosphériques, symbiotiques et par la prédation des populations microbiennes, modifient considérablement la quantité de P que la plante est capable d'acquérir tout au long de sa croissance (biodisponibilité).

#### 4.5. Cycle du phosphore dans les systèmes agricoles

Le cycle du P comprend des compartiments permettant de représenter la dynamique du P par un diagramme d'écoulement. Les compartiments du P sont souvent représentés par des entités où le P s'accumule, par exemple le sol, les plantes, les animaux, les structures d'entreposage des aliments du bétail et des effluents, les engrais commerciaux et l'eau non confinée dans des structures de rétention (Figure 10).



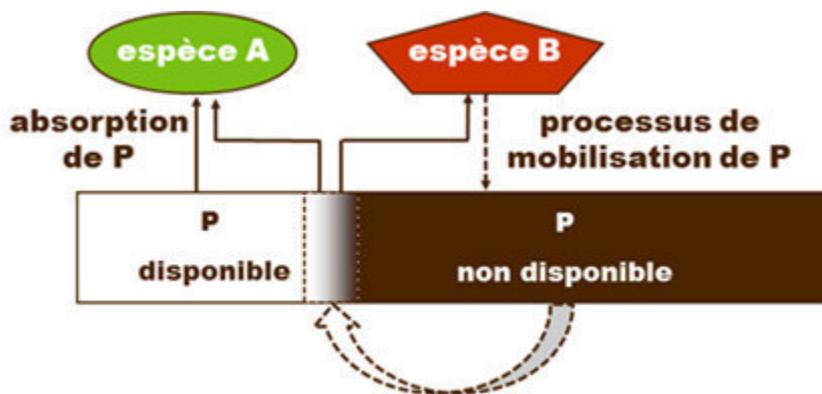
**Figure 10 : Cycle simplifié du phosphore dans un système agricole.**

#### 4.6. Réaction des engrais phosphatés dans le sol

Le phosphore apporté au sol sous forme d'engrais évolue vers des formes de moins en moins bio-disponibles. La vitesse des réactions des phosphates solubles dépend du nombre de collisions entre les particules qui diffusent dans la solution du sol et entre les particules diffusibles et la phase solide du sol (argile, limon, MO). Les réactions comme la précipitation, l'adsorption et l'immobilisation microbienne sont d'autant plus lentes que la température est basse. Du P peu retenu par le sol comporte un risque environnemental lorsqu'associé à un processus de transport (érosion, ruissellement, infiltration). La répartition du P de l'engrais dépend du type de sol et des pratiques de conservation des sols.

#### 4.7. Les mécanismes biologiques de la mobilisation de P

Le sol contient une très grande diversité d'organismes (bactéries, champignons, plantes) Capable de libérer du Pi à partir des formes de P minérales et organiques. La minéralisation des composés de P organique s'effectue grâce à la sécrétion d'enzymes qui ont la propriété de catalyser l'hydrolyse des liaisons esters phosphoriques et d'anhydrides d'acides en libérant du Pi. Ces enzymes appartiennent à un groupe très diversifié appelé phosphatases (**Burns, 1982**). Parmi les phosphatases, on peut différencier les phosphomonoestérases, les phosphodiesterases et les phytases qui vont respectivement libérer du Pi à partir des monoesters, des diesters et du phytate (**Quiquampoix et Mousain, 2005**).



**Figure 11 : Mécanismes biologiques de la mobilisation de P.**

# Matériels et méthodes

**1. Isolement des bactéries à partir des nodules**

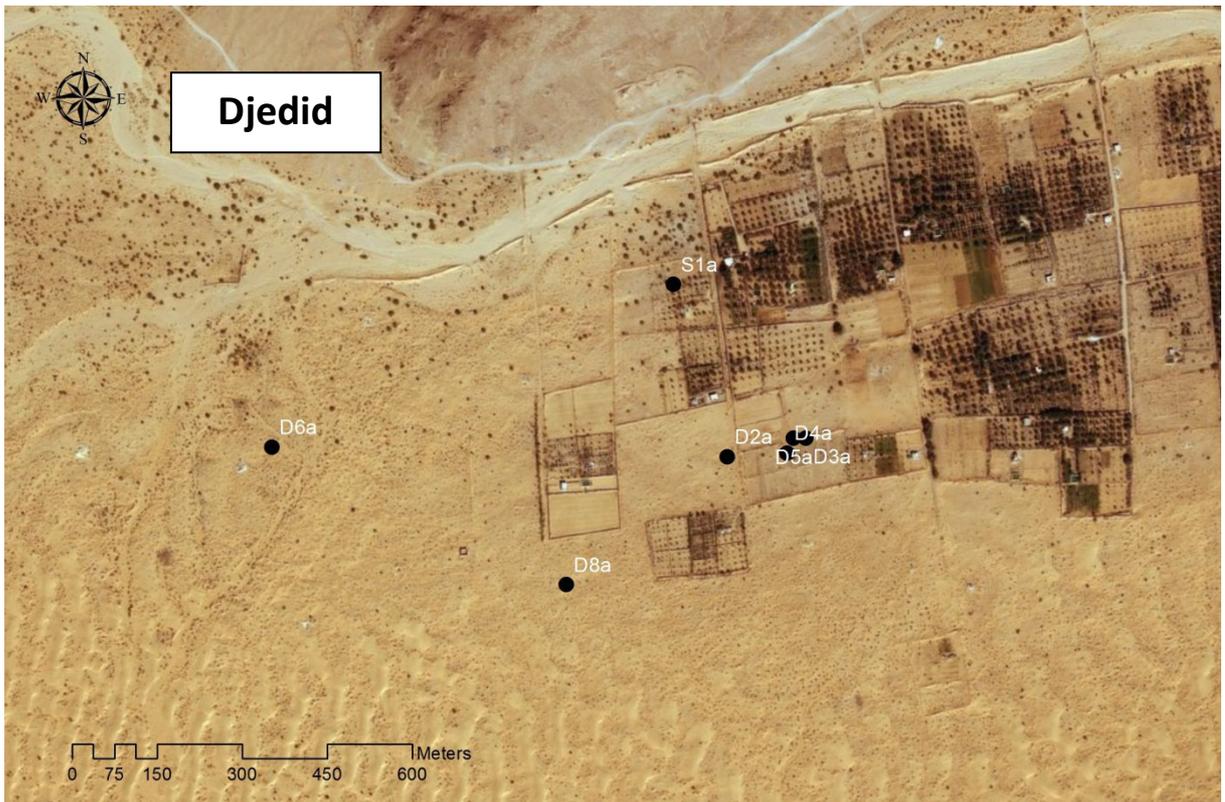
**1.1. Collecte des nodules**

Les échantillons sont des nodules à partir des racines de la plante d'arachide poussant dans trois zones de la région de Ghardaïa : Sebseb, Mansoura, Djedid.

Les nodules ont été prélevés au mois de novembre.



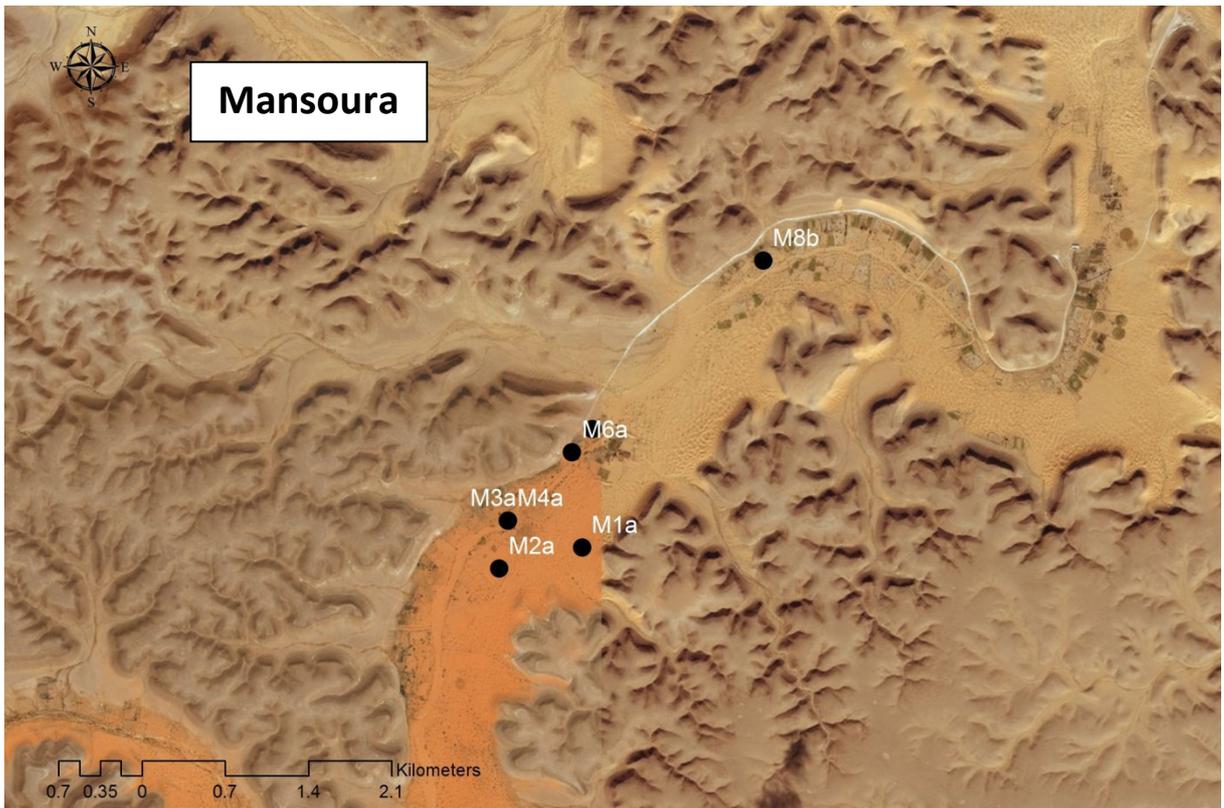
**Figure 12 : Carte administrative de l'Algérie montrant le territoire de Ghardaïa en rose le 3 Octobre 2012.**



**Figure13 : Les échantillons collectés à partir Djedid (Belhadjaissa , Benbitour 2016).**



**Figure14 : L'échantillon collecté à partir Sebseb (Belhadjaissa , Benbitour 2016).**



**Figure15 : Les échantillons collectés à partir Mansoura (Belhadjaissa , Benbitour 2016).**

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par (Vincent, 1970). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet.



**Figure16 : Collecte des nodules à partir de la racine d'arachide au mois de novembre (Belhadjaissa, Benbitour, 2016).**

### 1.2. Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4° C jusqu'à 48h pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (Vincent, 1970). Sur chaque flacon sont mentionnées le nom de la plante, date et lieu de collecte, et la date de conservation.

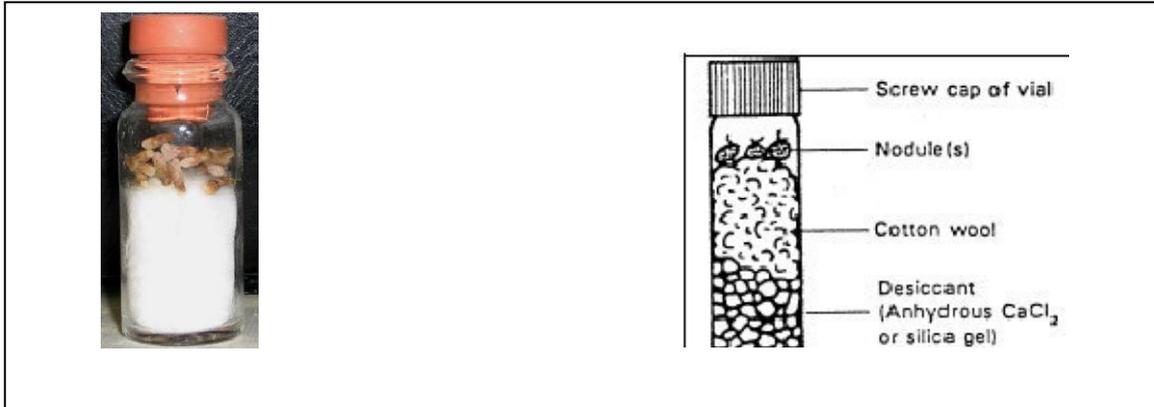


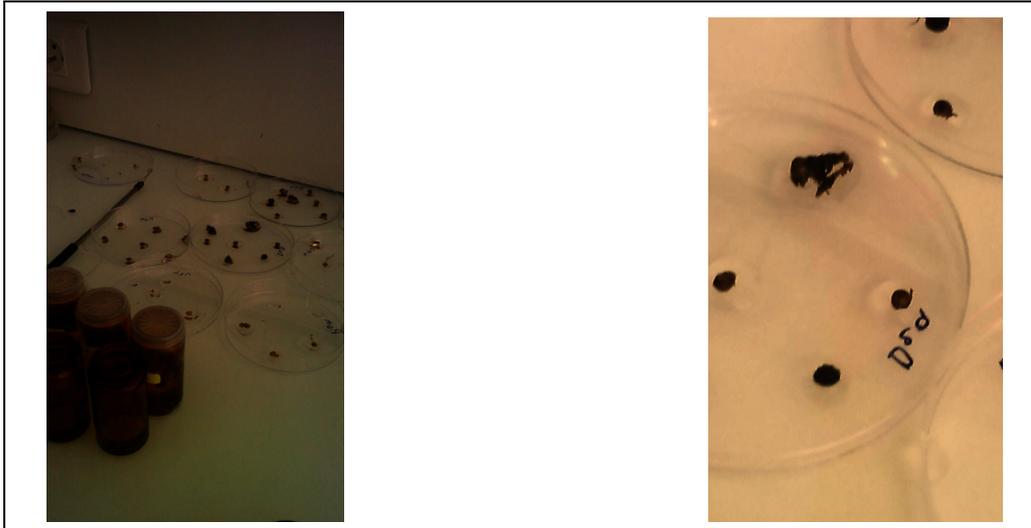
Figure 17 : Conservation des nodules sous  $\text{CaCl}_2$  (Vincent, 1970).

### 1.3. Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau au réfrigérateur toute une nuit. Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 98c° absolu puis transférés dans une solution d'eau de javel diluée 1 /2 pendant 3mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

### 1.4. Ecrasement des nodules

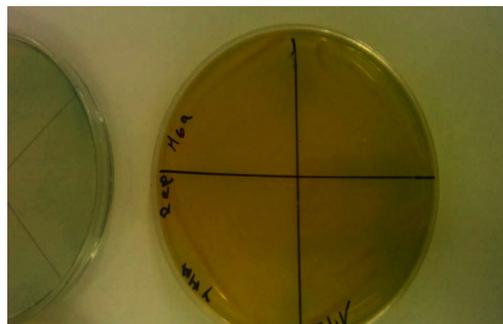
Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile, puis déposées chaque nodule stérile séparément dans une goutte d'eau. Ensuite les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flamage au bec bunsen.



**Figure 18 : Technique d'écrasement des nodules (Belhadjaissa, Benbitour, 2017).**

### **1.5. Isolement des souches**

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine, Prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrans (**Vincent, 1970**). Sur gélose coulé en boîte (YMA), puis incubé à 30°C pendant 7 jours. Toute cette manipulation doit être effectuée sous des conditions microbiologiquement contrôlé, sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen, sous une hotte à flux laminaire.



**Figure 19: Isolement des souches selon la technique de quatre cadrans (Belhadjaissa, Benbitour, 2017).**

### **2. Caractères culturels**

Un milieu spécifique est utilisé pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (Annexe1).

Le milieu de culture doit contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé le milieu spécifique suivant:

- Milieux solides : YMA (Yeast Mannitol Agar) + BTB.

L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes.

#### **2.1. Examens microscopiques**

##### **Coloration de Gram**

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de les classer les bactéries en deux grands groupes :

- Bactéries dites Gram +
- Bactéries dites Gram – (annexe 2).

### **3. Caractérisation phénotypique des bactéries**

#### **3.1. Tests nutritionnels**

##### **3.1.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone**

Ces tests ont été mis en œuvre sur milieu YMB où l'extrait de levure a été réduit à 0.05g/l et le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants, Fructose, D-Galactose, Mannitol, Glucose, Lactose, (Vincent, 1970).

On ensemence les différents milieux et on incube à 28°C dans un bain-marie avec agitation pendant 24h, puis mesurer la DO à 600nm.

### **3.1.2. Utilisation des acides aminés comme une seule source d'azote**

Les isolats sont cultivés sur le milieu Défini 8 (Vincent, 1970) où le Glutamate de sodium est remplacé par l'un des acides aminés suivants: caséine hydrolysate, L-Tryptophane, L-Cystéine, L-Leucine, L-Glutathionne.

Les tubes sont incubés à 28°C et la croissance mesurée à 600nm après 24h.

### **3.2. Tests physiologiques**

#### **3.2.1. Tolérance à la salinité (NaCl)**

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA à différentes concentrations de NaCl (1%, 5%, 8%, 10%) (p/v) en présence d'un milieu YMA à concentration normale (0.01% NaCl).

#### **3.2.2. Influence du pH**

Les isolats sont cultivés sur milieu YMA à différents pH : 2, 4.5, 9, 11, en présence d'un milieu témoin à pH 7.

### **3.3. Test biochimique**

#### **3.3.1. Test de solubilisation de phosphore en milieu solide (PVK)**

La capacité des *Rhizobia* à solubiliser le phosphore inorganique complexé a été testée selon la méthode décrite par Picosvskaya (PVK) (1948). Les colonies des souches de *Rhizobia*, ont été prélevées avec une anse et repiquées en quatre points sur milieux solides contenant le  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  comme la seule source de phosphore. Après 4 à 8 jours d'incubation à 28°C, la solubilisation du P complexé est mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie. La capacité solubilisatrice des souches a été estimée par mesure du diamètre d'halo pour chaque colonie (Annexe1).

#### **4. Conservation**

La conservation est effectuée sur milieu YMA additionné 30% (v/v) de glycérol.

Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes d'Eppendorf en un temps de 24 à 48h d'incubation à 30°C, puis mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur à -20°C.

#### **5. Analyse statistique**

Les données quantitatives obtenues dans cette présente étude ont fait l'objet d'une analyse de la variance aléatoire (ANOVA) à l'aide du programme XISTAT 2014 au seuil de signification  $\alpha = 0.05$ . De plus, une comparaison multiple des moyennes a été effectuée en utilisant le test Fisher LSD. Par ailleurs, une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été aussi établie suivant la méthode de Ward en se basant sur le type de dissimilarité à base de distance euclidienne.

# Résultats et Discussion

La caractérisation phénotypique classique est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les *Rhizobia* les mieux étudiés, la base de la description formelle de taxon, depuis les espèces et les sous-espèces jusqu'aux genres et familles (Vandamme *et al.*, 1996).

Les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches efficaces, compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux. Ainsi, ces approches d'ordre fondamental et pratique permettent la détermination d'une inoculation efficace et bénéfique pour les plantes hôtes.

### 1. Caractères cultureux

#### 1.1. Croissance des isolats sur milieu YMA

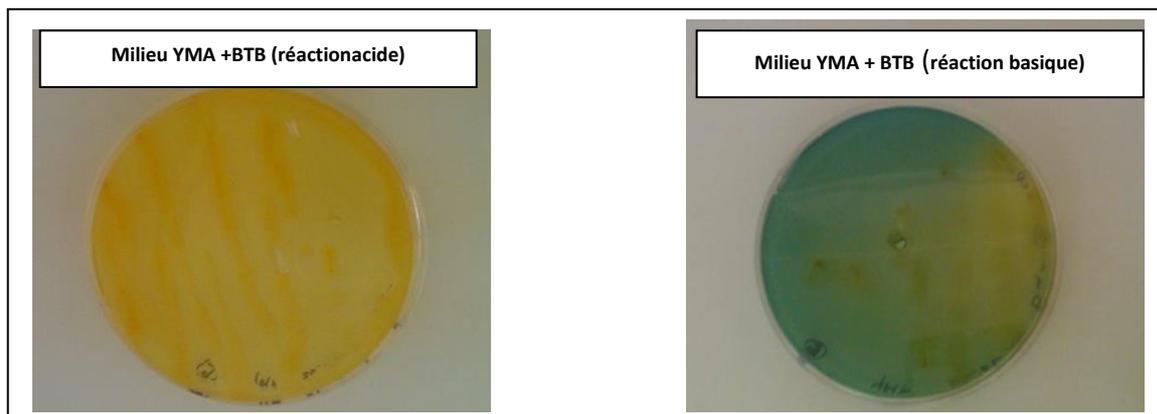
La majorité des nodules de l'arachide (*Arachis hypogaea* L) Ont donné des bactéries qui ont bien poussé sur le milieu YMA + BTB. 15 isolats ont été poussés. Après 24h d'incubation à 30°C quelques isolats ont présenté des colonies circulaires, légèrement élevées, lisses, opaques et avec une texture translucide blanchâtres. Elles sont mucilagineuses.

Le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du BTB vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu (El Hilali, 2006).

La production de l'acide et l'alcalin dans le milieu YMA a été utilisée comme un outil pour indiquer le caractère général de *Rhizobium* (Pagano, 2008). Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993 ; Pagano, 2008).

Nos isolats ont deux aspects sur le milieu YMA+BTB, 9/15 des isolats, c'est à dire 60% des échantillons ont produit des réactions acides sur le YMA + BTB alors que les 40% restantes ont produit une alcalinisation (tableau 2).

Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira *et al.*,(1993). De même, des souches à croissance rapide alcalinisant le milieu ont été mises en évidence (Hernandez et Focht, 1984).



**Figure 17 : Aspect des isolats poussant sur milieux YMA + BTB (Belhadjaissa ,Benbitour, 2017).**

**Tableau 2 : L'effet acidifiante ou alcalinisant des isolats étudiés.**

<b>Souche</b>	<b>Acidification</b>	<b>Alcalinisation</b>
<b>M2a</b>	+	-
<b>D5a</b>	+	-
<b>D3a</b>	+	-
<b>D4a</b>	-	+
<b>S1a</b>	+	-
<b>M1a</b>	-	+
<b>M7a</b>	-	+
<b>D6a</b>	-	+
<b>S3a</b>	+	-
<b>M3a</b>	+	-
<b>M4a</b>	+	-
<b>D8a</b>	-	+
<b>M6a</b>	+	-
<b>D2a</b>	+	-
<b>M8b</b>	-	+

### 1.2. Examens microscopiques

#### Coloration de Gram :

L'observation microscopique de 15 échantillons isolés révèle des bacilles roses à Gram négatif (Figure 21).



Figure 21 : Coloration de Gram.

## 2. Caractérisation phénotypique des bactéries

### 2.1. Tests nutritionnels

#### 2.1.1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone

L'Analyse de la variance aléatoire (ANOVA) a révélé des effets significatifs pour les deux facteurs étudiés (isolat et source de carbone), avec une valeur de signification  $0,046 \leq 0,05$  pour le facteur isolat. Et avec une valeur de signification  $0,019 \leq 0,05$  pour le facteur source de carbone. Ainsi que pour l'interaction une valeur de signification  $0,050 \leq 0,05$  au seuil de  $\alpha = 0,05$  (Annexe 3).

Les résultats montrent que les isolats assimilent préférentiellement les Disaccharides (Lactose) et les mono (Glucose, Fructose, Galactose) mais on peut noter également que les isolats peuvent se développer sur différentes sources de carbones avec une différenciation entre l'un et l'autre.

Le Lactose est le sucre le mieux assimiler par la majorité des isolats et en particulier les isolats : **M1a, M2a, D4a, D5a**. Aussi pour le glucose qu'il est bien assimiler par les isolats : **D6a, M3a, M6A, M8b**, le troisième sucre préférable par les *Rhizobia* c'est le Fructose et Le Galactose. Mais le Mannitol a une faible assimilation à partir tous les isolats étudiés (figure 22).

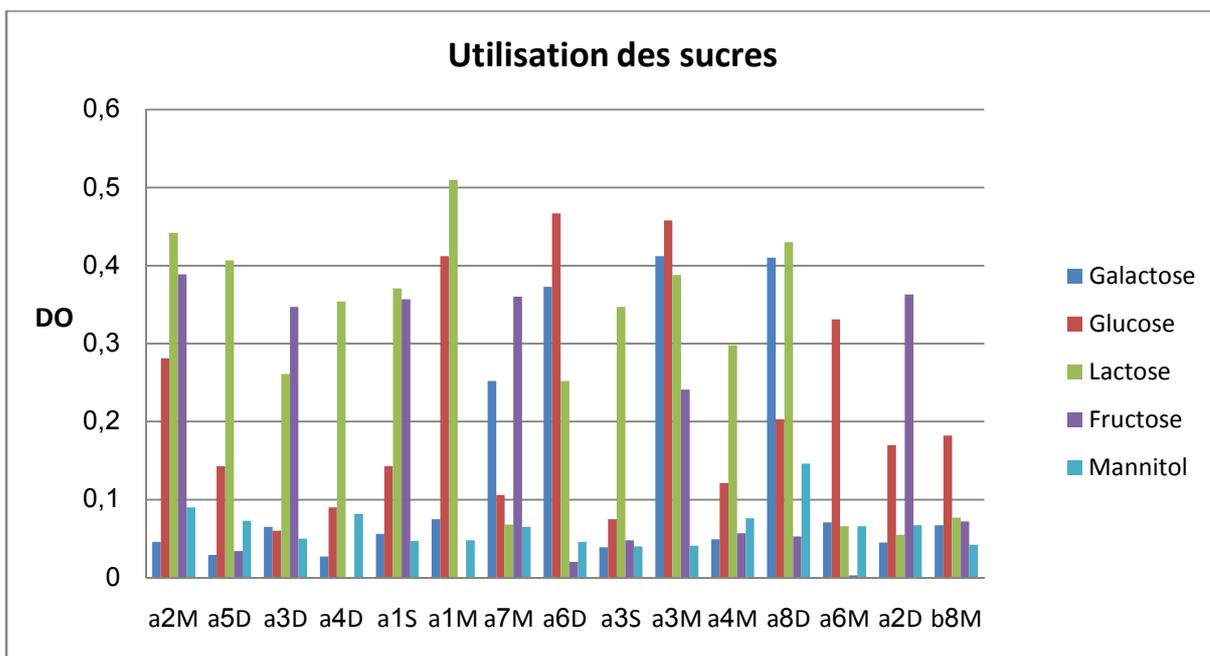


Figure 22 : Utilisation des sucres comme source de carbone par les isolats testés.

Plusieurs études ont rapporté la variabilité de la nutrition carbonée chez les *Rhizobia* (Graham, 1964 ; Zhang et al., 1991 ; Stowers et Eaglesham, 1984). Ces mêmes auteurs ont confirmé l'existence de la variabilité de l'utilisation des substrats carbonés entre les *Rhizobia* et les *bradyrhizobia*. Les souches à croissance rapide possèdent une préférence pour les hexoses, les pentoses, les disaccharides ainsi que les acides organiques (Stowers, 1985 ; van Rossum et al., 1995).

Un même résultat a été rapporté par (Lindström et Lehtomaki, 1988) pour des souches de *Rhizobium galegae*. Les souches à croissance lente présentent une utilisation rare pour les monosaccharides et une utilisation variable pour les disaccharides (Jordan, 1984). Des résultats similaires ont été rapportés par (Xu et al., 1995) pour *Bradyrhizobium liaoningense* et *Bradyrhizobium japonicum*.

L'utilisation des sucres et des acides organiques par les *Rhizobia* représente un aspect intéressant et essentiel pour la culture au laboratoire.

Selon Stowers (1985), il existe trois voies principales du catabolisme des substrats carbonés entre les *Rhizobia* à croissance rapide de type *Rhizobium* et *Sinorhizobium* et les souches à croissance lente de type *Bradyrhizobium*:

- la voie d'Entner-Doudoroff, qui est également la voie principale du métabolisme des hexoses.

- la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, qui est variable d'une souche de *Rhizobium* à une autre. Cette voie repose sur l'activité de l'enzyme phosphofructokinase.
- la voie du Pentose Phosphate, observée uniquement chez les souches à croissance rapide. Elle dépend principalement de l'enzyme 6-phosphogluconate (6-PG) déshydrogénase NADP dépendante.

Il résulte de cette étude que les isolats testés de L'arachide présentent une assimilation de sources de carbone similaire à celle des souches à croissance rapide et à celle à croissance lente.

Les données de l'utilisation des différents substrats carbonés par les différents isolats étudiés ont été également utilisées pour le test Fisher LSD qui nous a permis de regrouper.

- **Selon le facteur isolats** : trois groupes **A, AB, B** (Annexe 3).
- **Selon le facteur source de carbone** : quatre groupes **A, B, C, D** (Annexe 3).

### 2.1.2. Utilisation des acides aminés comme seule source d'azote

L'Analyse de la variance aléatoire (ANOVA) à deux facteurs montre qu'il n'y a pas des effets significatifs pour les deux facteurs étudiés (isolat et source d'azote), même pour l'interaction avec des valeurs de signification supérieures à 0,05 au seuil de  $\alpha = 0.05$  (Annexe 3).

La croissance des isolats sur le milieu **Défini 8** est variable selon la source d'azote (l'acide aminé additionné). Les isolats peuvent pousser en présence de certains des acides aminés préférables comme source d'azote. Mais avec une différenciation entre l'un et l'autre (Figure 20).

Les isolats **M8b, D4a, S3a** ne peuvent se développer avec aucun acide aminé utilisé. Par contre la caséine et L-Tryptophane sont les acides aminés les mieux assimilés par quatre isolats différents. Le Cystéine, L-Leucine et L-Glutathion sont les moins utilisés (Figure 23). Par conséquent nos isolats ne peuvent pas utiliser tous les acides aminés choisis dans notre travail comme source d'azote par contre quelques acides aminés ont inhibés la croissance des *Rhizobia* (figure 23).

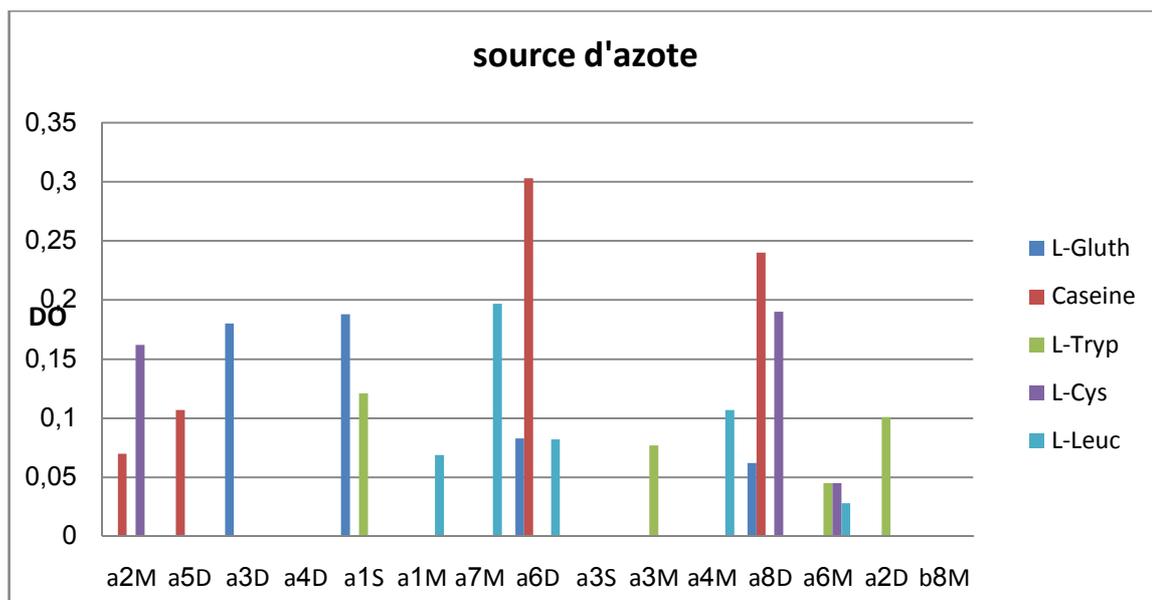


Figure 23 : Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les isolats testés.

ce qui va dans le sens des résultats de (Nour et al., 1994) qui indiquent que les acides aminés ne peuvent pas être utilisés comme source d'azote et qu'ils peuvent même jouer un rôle d'inhibiteurs pour la croissance rhizobienne (Jordan, 1984).

Les données de l'utilisation de différentes sources d'azote par les différents isolats de *Rhizobia* étudiées ont été également utilisées pour le test Fisher LSD qui nous a permis de regrouper.

- Selon le facteur isolat : un seul groupe A (Annexe 3).
- Selon le facteur source d'azote : un seul groupe A (Annexe 3).

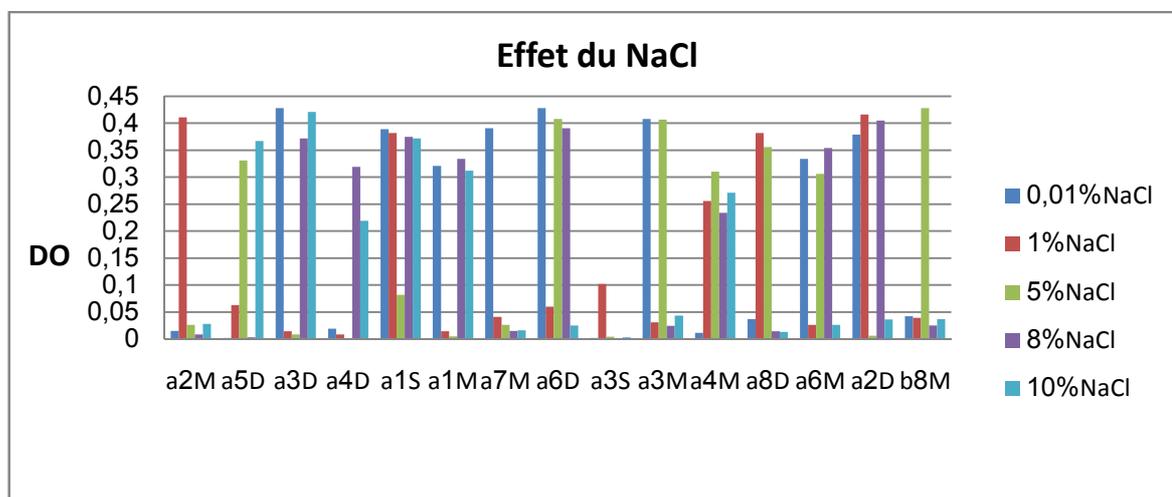
## 2.2. Tests physiologiques

### 2.2.1. Tolérance à la salinité (NaCl)

L'Analyse de la variance aléatoire (ANOVA) a révélé des effets significatifs pour les deux facteurs étudiés (isolat et salinité), avec une valeur de signification inférieure à 0,05. Ainsi que pour l'interaction, au seuil de signification  $\alpha = 0.05$  (Annexe 3).

Les résultats obtenus montrent que nos isolats poussent bien dans des concentrations de 0.01% et 0.1%, bien que leurs croissances deviennent moyennes dans une concentration de 5%. Par comparaison, on observe que la majorité des isolats sont halorésistants dans des

concentrations de 8%. Par contre à 10% de NaCl les isolats ont une faible croissance sauf pour les isolats : **D3a, D5a, M1a**, qui sont halorésistants (Figure 24).



**Figure 24 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats testés.**

D'une façon globale, ces résultats montrent une variabilité relative de tolérance vis-à-vis de la salinité chez les isolats étudiés dans ce travail (Figure 24).

En général, les effets du NaCl semblent être un bon indicateur de la réponse des *Rhizobia* aux conditions de salinité différentes (Diez et al., 2009).

Les limites de tolérance à la salinité entre les *Rhizobia* peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (El sheikh et Wood, 1989 ; Rai, 1983) et même entre les souches de la même espèce (Kassem et al., 1985).

Graham et Parker, (1964) ont montré que les souches à croissance rapide sont plus tolérantes à la salinité que les *bradyrhizobia*. Des résultats similaires ont été également rapportés par plusieurs auteurs (Jordan, 1984 ; Stowers et Elkan, 1984 ; El sheikh et Wood, 1989 ; Odee et al., 1997). Toutefois, des souches à croissance lente nodulant le genre *Vigna* pouvant tolérer des concentrations élevées en NaCl de l'ordre de 4 % à 5,5 % ont été caractérisées par (Mpeperekki et al., 1997). Des études ont montré cependant que la tolérance au sel n'est pas corrélée avec le taux de croissance (Zerhari et al., 2000) mais à d'autres mécanismes physiologiques et biochimiques (Botsford et Lewis, 1990 ; Brhada et al., 1997, Gouffi et al., 1999).

Mpeperekki et al., (1997) ont rapporté que l'existence de souches tolérantes à la salinité dans les sites salins peut être une indication d'une adaptation au stress osmotique qui est dû à

l'augmentation de la concentration d'ions et à la variation de l'humidité du sol durant les périodes sèches.

Dans cette étude, nous avons noté que la majorité des isolats présentent une bonne tolérance à la salinité à des concentrations élevées en NaCl de 8 %.

La sélection de couples symbiotiques tolérants à la salinité reste l'élément essentiel pour l'amélioration de la symbiose sous des conditions de stress salin.

Le test Fisher LSD des données d'effet du NaCl sur la croissance des différentes souches de *Rhizobia* étudiées nous a permis de regrouper.

- **Selon le facteur isolat** : sept groupes **A, B, C, CD, D, E, F** (Annexe 3).
- **Selon le facteur salinité** : quatre groupes **A, B, BC, C**, (Annexe 3).

### **2.2.2. Influence du pH**

ANOVA a révélé des effets significatifs pour les deux facteurs étudiés (isolat et pH), avec des valeurs de signification inférieure à 0.05. Ainsi que pour l'interaction, au seuil de  $\alpha = 0.05$  (Annexe 3).

Les résultats de la tolérance aux pH acides et alcalins de l'ensemble des isolats montrent que les pH alcalins sont plus tolérés que les pH acides. Les isolats, ont pu tous tolérer la grande valeur de pH testée qui est de 11. La tolérance à l'acidité s'est révélée par contre très variable selon la souche étudiée alcalinisant ou acidifiante à pH très acide de 2 (figure 25).

Toutefois, l'isolat **M4a** ne peut se développer ni avec un pH très acide 2, ni avec un pH très basique de 11(figure 25).

Tous les isolats ont bien poussé au pH 7, c'est le pH physiologique préférable chez les *Rhizobia* (figure 25).

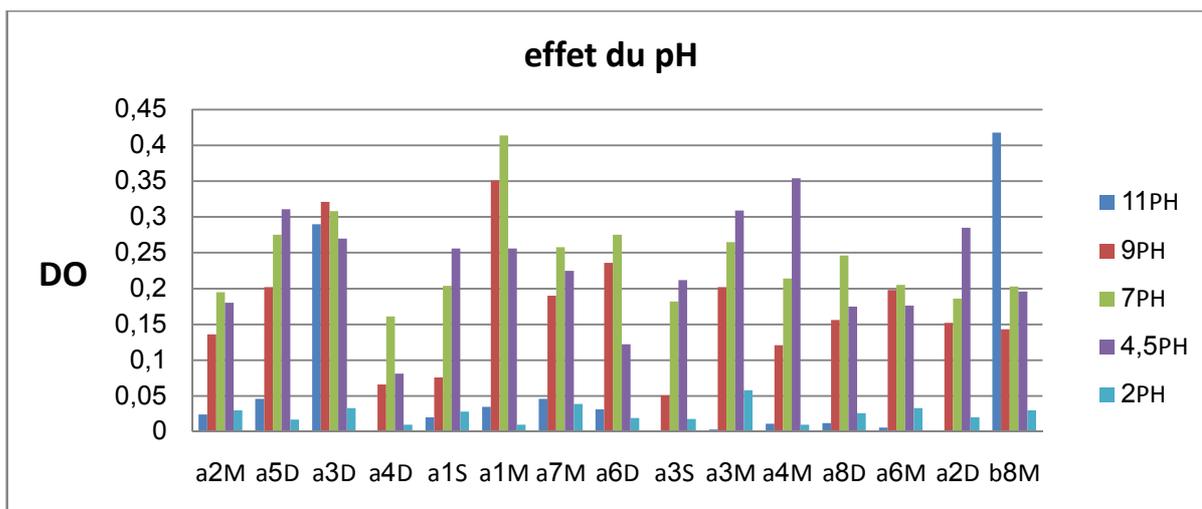


Figure 25 : Effet du pH sur la croissance des isolats testés.

Selon (Graham, 1964 et Jordan, 1984), les *Rhizobia* peuvent tolérer des pH allant de 4,5 à 9. Yadav et Vyas, (1971) ont même montré qu'une vingtaine de souches isolées de huit espèces différentes de légumineuses ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 sous des conditions non salines.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Raza et al., 2001) qui ont rapporté une tolérance allant du pH 4 au pH 10 pour quelques souches isolées des deux espèces *L. luteus* et *L. angustifolius*.

D'après nos résultats, les isolats étudiés ont généralement un taux de croissance rapide et sont globalement tolérants à l'alcalinité et moyennement tolérants à l'acidité.

Cependant, des souches de la même espèce peuvent montrer une large variation de tolérance au pH (Glenn et Dilworth, 1994). En effet, des souches tolérantes à des valeurs très basses de pH ont été retrouvées chez des espèces à croissance rapide telles que *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium tropici* (Cooper, 1982 ; Cooper et al., 1985 ; Graham, 1992 ; Graham et al., 1994 ; Gao et al., 1994). Toutefois, certains auteurs ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la tolérance d'une souche au pH acide du milieu et le taux de sa croissance (Mohamed et al., 2000).

Il a été rapporté que la tolérance des souches à l'acidité peut être due au pH acide du milieu d'isolement de ces souches (El Hilali, 2006).

La sélection de couples tolérants à l'alcalinité s'avère l'élément nécessaire pour une symbiose efficace. Dans notre étude, la majorité des souches présente une tolérance de 100% au pH variant entre 4,5 et 9 (Figure 25).

Par conséquent, la sélection de souches tolérantes à un pH acide ou alcalin est très large.

Les données de l'étude de l'effet du pH sur la croissance des isolats de *Rhizobia* étudiées ont été également utilisées pour le test Fisher LSD qui nous a permis de regrouper.

- Selon le facteur isolat : onze groupes **A, B, C, D, E, EF, F, FG, G, H, I** (Annexe 3).
- Selon le facteur pH : scinque groupes **A, B, C, D, E** (Annexe 3).

### 2.3. Test biochimique

#### 2.3.1. Solubilisation de phosphore

Les quinze isolats de *Rhizobia* ont été testés pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique sur un milieu solide PVK (Pikovaskaya) contenant le phosphate tricalcique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphore. Après 8 jours d'incubation à 30°C, tous les isolats ont produit une zone claire autour de la colonie traduit une solubilisation de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Figure 26).

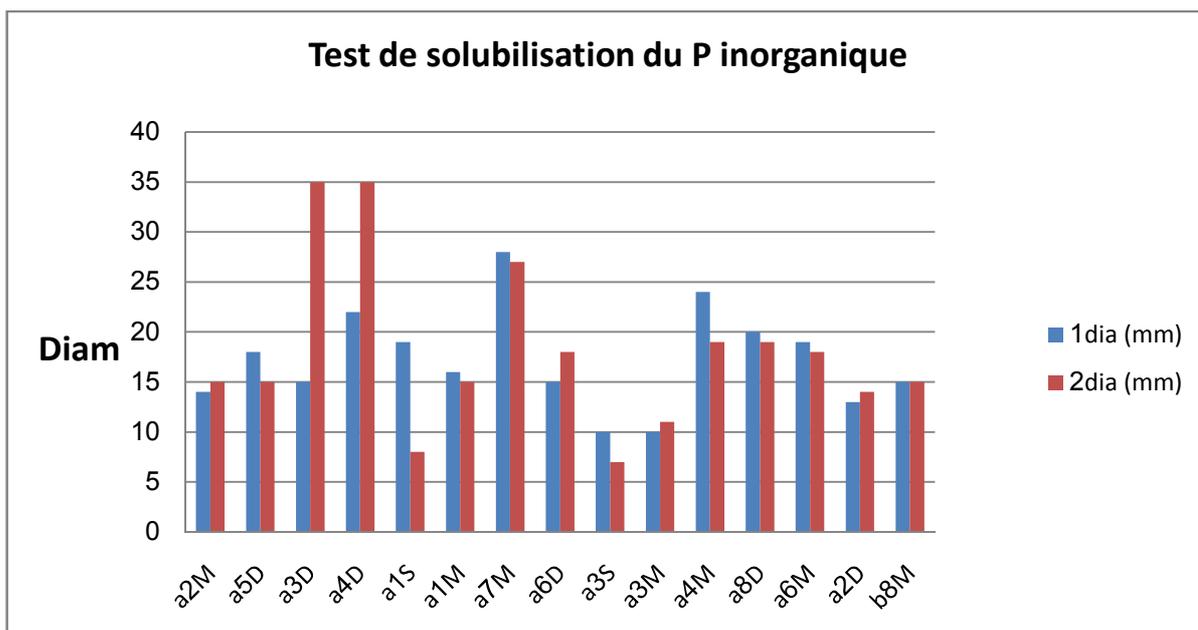
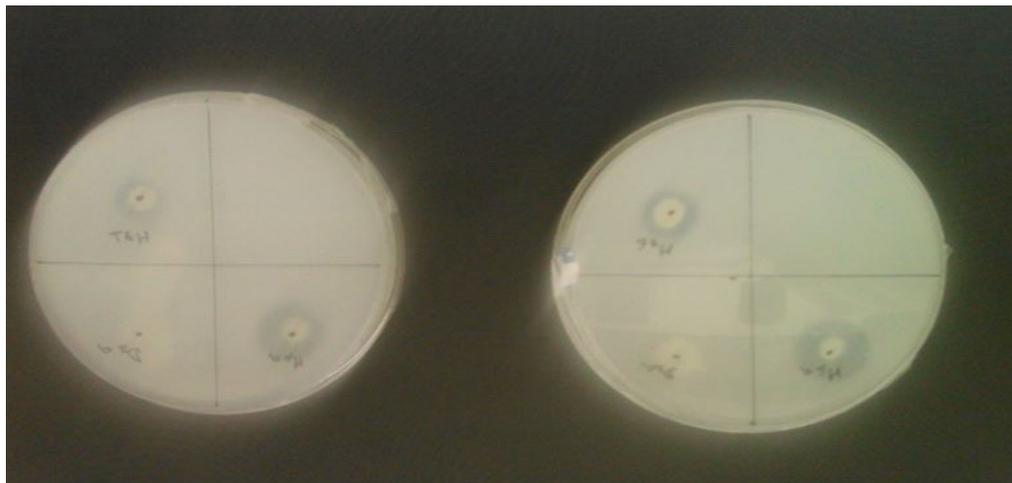


Figure 26 : Test de solubilisation du P inorganique.

Les isolats **D3a, D4a** avec un halo de solubilisation de 35 mm, et les isolats **M7a, M4a** avec un halo de 27 ,24mm respectivement, ont montré les halos de solubilisation les plus importants. Les isolats **M8b D2a, M6a, D8a, D5a, M2a, S1a, M3a, S3a**, solubilisent modérément le phosphate et le diamètre du halo varie de 20 à 10mm (figure 27).



**Figure 27 : Halos de solubilisation du P inorganique sur un milieu solide PVK (Belhadj aïssa, Benbitour, 2017).**

Le principal avantage d'utiliser le *Rhizobium* en tant que microorganisme solubilisant le phosphate sera leur effet nutritionnel bénéfique résultant à la fois de la mobilisation des phosphates et de la fixation de l'azote (Peix *et al.*, 2009).

Les souches de *Rhizobium* présentent de nombreuses variations dans la solubilisation du phosphate et sont probablement liées aux facteurs environnementaux et de l'hôte (Halder, *et al.*, 1991).

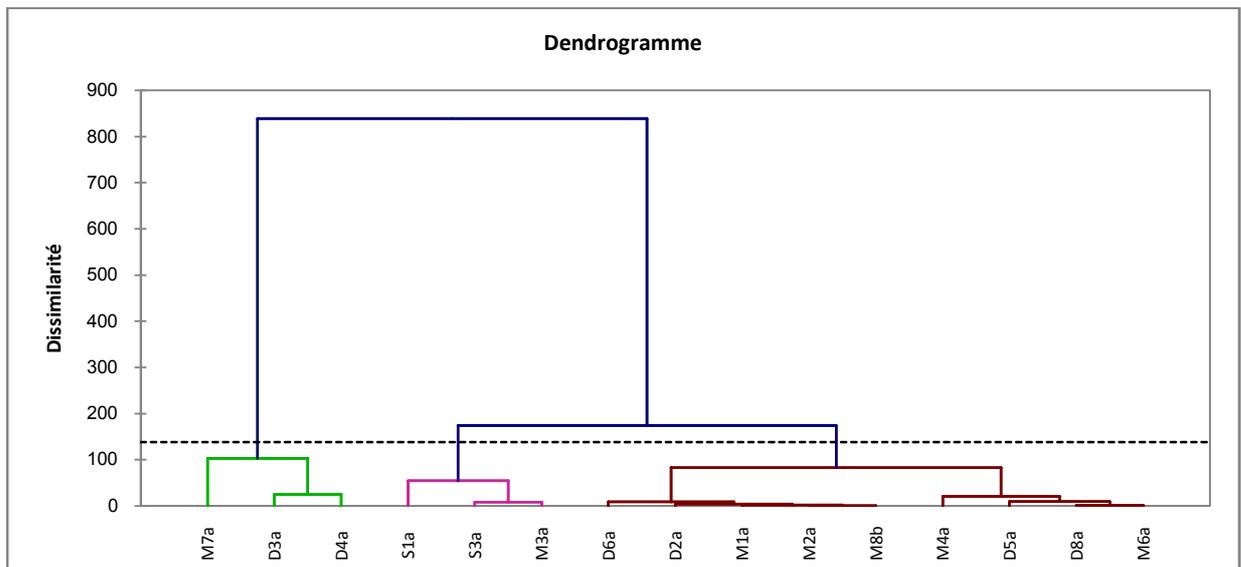
Les isolats étudiés présentent des potentiels de solubilisation très importants avec des halos de solubilisation dans la gamme de 10-35 mm de diamètre dans le milieu de Pikovskaya contenant 0,5% de TCP. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Kranthi *et Raghu*, 2014), qui ont rapporté que les souches de *Rhizobia* ont des zones de solubilisation dans la gamme de 14-18 mm de diamètre.

La solubilisation du TCP pourrait être le résultat de la libération des acides organiques qui peuvent acidifier le milieu afin de solubiliser le P inorganique. de même, (Perez *et al.*, 2007) ont montré que le pH diminue avec l'augmentation de la population de *Rhizobium* pendant la période d'incubation et que cette diminution de pH peut être liée à la production d'acides organiques au cours de la croissance bactérienne.

### **3. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)**

Le groupement général de l'ensemble des isolats rhizobienne étudiés en fonction des résultats obtenus par l'utilisation de la CAH permet de les classer en 3 classes (figure 28) :

- Classe 1 : **D6a, D2a, M1a, M2a, M8b, M4a, D5a, D8a, M6a** ;
- Classe 2 : **D3a, D4a, M7a** ;
- Classe 3 : **S1a, S3a, M3a** (Annexe 4).



**Figure 28 : Dendrogramme montre le regroupement général de *Rhizobia* étudiés.**

# Conclusion générale

## ***Conclusion générale***

---

Dans cette étude nous avons essayé de caractériser quelques souches rhizobienne associés à la culture d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) dans la région de Ghardaïa. Cette recherche a permis de déceler d'une part les différentes caractéristiques d'intérêt fonctionnel des souches et leur diversité et d'autre part de tester leurs capacités de solubiliser le Pi. Or, jusqu'à nos jours, aucune étude précise n'a été menée pour étudier la variabilité des bactéries symbiotiques associées à la culture d'arachide dans notre région.

Dans ce cadre des souches bactériennes ont été isolées à partir des nodules de l'espèce (*Arachis hypogaea* L.) provenant des zones de Sebseb, Djedid et Mansoura et caractérisées selon les techniques usuelles propres aux *Rhizobia*.

Les études morphologiques des colonies sur YMA, la vitesse de croissance, leur aspect générale sur milieux spécifiques, ....nous font croire que les isolats correspondent à une description du genre *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

A la lumière des résultats obtenus, les 15 isolats de la légumineuse *Arachis hypogaea* L. ont le même aspect morphologique que les souches appartenant au genre *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. En effet, nos isolats ont deux aspects sur le milieu YMA+BTB, des isolats ont produit des réactions acides, alors que les restantes se sont considérées comme alcalinisant.

L'observation microscopique de 15 échantillons isolés révèle des bacilles roses à Gram négatif.

Nos études phénotypiques basant sur quelques tests nutritionnels, biochimiques et physiologiques ont permis de conclure que :

- les isolats assimilent préférentiellement les Disaccharides (Lactose)et les mono (Glucose, Fructose, Galactose) mais on peut noter également que les isolats peuvent se développer sur différentes sources de carbones avec une différenciation entre l'un et l'autre.les isolats testés de L'arachide présentent une assimilation de sources de carbone similaire à celle des souches à croissance rapide et à celle à croissance lente.
- Nos souches ne peuvent pas utiliser tous les acides aminés choisies dans notre travail comme source d'azote, par contre quelques acides aminés ont inhibés leur croissance.
- Dans cette étude, nous avons noté que la majorité des isolats présentent une bonne tolérance à la salinité à des concentrations élevées en NaCl de 8%.

## Conclusion générale

---

- La sélection de couples tolérants à l'alcalinité s'avère l'élément nécessaire pour une symbiose efficace. Dans notre étude, la majorité des isolats présente une tolérance de 100% au pH variant entre 4,5 et 9. Par conséquent, la sélection de souches tolérantes à un pH acide ou alcalin est très large.
- Les quinze isolats de *Rhizobia* ont été testés pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique TCP sur un milieu solide PVK présentent des potentiels de solubilisation très importants avec des halos de solubilisation dans la gamme de 10-35 mm de diamètre dans un milieu PVK contenant 0,5% de TCP. Par conséquent nos isolats ont une grande capacité de solubiliser le Pi, c'est le principal avantage d'utiliser le *Rhizobium* en tant que microorganisme solubilisant au phosphate sera leur effet nutritionnel bénéfique résultant à la fois de la mobilisation des phosphates et de la fixation de l'azote.

Il ressort à partir de cette étude que les souches d'arachide étudiées dans la région de Ghardaïa sont classées en deux genres : *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Ces résultats confirment par ailleurs le taux de croissance rapide de quelques isolats et lente des autres, et sont des souches qui ont une grande capacité de solubiliser le phosphate inorganique.

## Perspectives

- Reprise des essais aux champs pour confirmer les résultats ;
- Test d'inoculation croisant les génotypes d'arachide et les souches à haut potentiel de solubilisation du P pour sélectionner des symbioses performantes sous déficit en P ;
- Approfondir l'étude de la symbiose arachide-*rhizobia* au déficit en P ;
- La détermination du statut taxonomique des souches rhizobienne d'arachide étudiées par des techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'ADNr 16S, L'hybridation ADN/ADN pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les *Rhizobia*.

# Références Bibliographiques

1. **Anonyme., 2004.** The science of inoculation. Becker Underwood.
2. **Anonyme.,1933.** Monographie de l'Arachide . In: *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 13<sup>e</sup> année, bulletin n°146-147. 689-789p.
3. **Anonyme., 2017.** Beneficial microorganisms in Agriculture.
4. **Appleby C. A., D. Bogusz E. S., Dennis E. S., Peacock W. J.,1988.** A role for haemoglobin in all plant roots. *Plant Cell Environ.* 1. 359-367p.
5. **Bargaz A., Lazali M., Amenc L., Abadie j., Ghoulam C., Farissi M., Faghire M., Drevon J.J., 2013.** Differential expression of trehalose 6-P phosphatase and ascorbate peroxidase transcripts in nodule cortex of *Phaseolus vulgaris* and regulation of nodule O<sub>2</sub> permeability. 238 . 107-119 p.
6. **Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A., 2004.** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol. Université de constantine. Algérie.* 27. 462- 468p
7. **Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L., 2006.** Détection et typage du gène nodC à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG 6.* 97-110p.
8. **Botsford L., Lewis T., 1990.** Osmoregulation in *Rhizobium meliloti* production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Env. Microbiol.* 56. 488-494p.
9. **Bourbonnais G., 2010.** la nutrition chez les végétaux, Le cycle de l'azote. *Biologie NYA Pasc.*
10. **Brewin N.J.,1991.** Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* 7. 191-226p.
11. **Brhada F., Poggi M.C., Le Rudulier D.,1997.** Choline and Glycine betaine uptake in various strains of *Rhizobium* isolated from nodules of *Vicia faba* var. *major* and *Cicer arietinum* L.: Modulation by salt, choline and glycine betaine. *Current Microbiol.* 34. 167-172p.
12. **Burns R.G., 1982.** Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol Biochem* 14. 423-427p.

13. **Cermola M., Fedorova E., Tate R., Riccio A., Favre R., Patriarca E.J., 2000.** Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 13.733-741p.
14. **Chabbi, R., 2010.** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de doctorat. Université Mentouri Constantine, 12 p.
15. **Chevalier August., 1934.** Monographie de l'Arachide (Suite). In: Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale, 14<sup>e</sup> année, bulletin n°156 . 565-632p.
16. **Christian M., Bernard L., Monique L., Sylvain P., 2006.** Gare à la baisse de la biodisponibilité du phosphore *Agronomie*, n°79 .21-23p.
17. **Christiansen I., Graham P.H., 2002.** Variation in di-nitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes grown at low and high of phosphorus supply. *Field Crops Research*, 73 . 133-142p.
18. **Chuan T., Yue Y., Xiu Z., Qi W., Hua Y., Tong F., Jun W., Shu T., Xian L., Wan L., Yan S, Lang Q., Dong Q., 2012.** Mutagenesis A Useful Tool for the Genetic Improvement of the Cultivated Peanut (*Arachis hypogaea* L.). INTECH World's largest Science, Technology and Medicine Open Access book publisher. Chapitre 1.
19. **Clark C.M., Tilman D., 2008.** Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, 451. 712-715p.
20. **Danso S.K.A. et Eskew D.L., 1987.** Comment renforcer la fixation biologique de l'azote. *Alimentation et agriculture. AIEA BULLETIN*, VOL.26. 29-33p .
21. **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 de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.
22. **El-sheikh E. A. E., M. Wood. 1989.** Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* 21 . 889-895p.

23. **Eric, G., 2007** . Symbiose rhizobium/légumineuse : un nouveau sésame. n° 6-7, vol. 23. 663p.
24. **Fernand B., 1941**. *L'arachide au Sénégal*, Thèse de Droit , Librairie du Recueil Sirey ,Paris, 184 p.
25. **Foucher F., Kondorosi E., 2000**. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in Medicago. *Plant Molecular Biology* 43 . 773-786p.
26. **Gao J. L., Sun J. G., Li Y., Wang E. T., Chen W. X. , 1994**. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical *Rhizobia* isolated from Hainan province, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44. 151-158p.
27. **Gillier P., Silvestre P., 1969**. *L'arachide, techniques agricoles et productions* .
28. **Glenn, A. R., and M. J. Dilworth., 1994**. The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiol. Lett.* 123 .1-10p.
29. **Gouffi K., Pica N., Pichereau V., Blanco C., 1999**. Disaccharides as a new class of non accumulating osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65. 1491-150p.
30. **Graham P.H., Sadowsky M.J., Kersters H.H., Barnett 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.W., 1991**. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41. 582-587p.
31. **Graham P. H., Parker C. A., 1964**. Diagnostic features in the characterization of root nodule bacteria of legumes. *Plant Soil.* 20. 383-396p.
32. **Halder AK., Mishra AK., Bhattacharya P., Chakrabarty PK., 1991**. Solubilization of inorganic phosphate by Bradyrhizobium. *Indian J. Exp. Biol.* 29. 28-31p.
33. **Hedley M. J., Stewart J. W. B., B. S. Chauhan., 1982**. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46. 970-976p.
34. **Hernandez B. S., Focht D. D., 1984**. Invalidity of the concept of slow growth and alkali production in cowpea *Rhizobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48.206-210p.

35. **Jordan D.C.**, 1984 . *Rhizobiaceae*. In N. R.Krieg and J.G.Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. The Williams and Wilkins, Baltimore. 234-245p.
36. **Juszczuk I., Malusà E., Rychter A.M., 2001**. Oxidative stress during phosphate deficiency in roots of bean plants (*Phaseolus vulgaris L.*) J. Plant Physiol. 158 . 1299-1305p.
37. **Kassem M., Capellano A., Gounot A.M. ,1985**. Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficience de *Rhizobium meliloti*.1 . 63-65p.
38. **Keneni, A., Assefa F., Prabu P.C., 2010**. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *fababeans* of Ethiopia and their abilities on solubilization insoluble phosphates J. Agr. Sci. Tech. 12 . 79-89p.
39. **Kouas S., Labidine N., Debez A., Abdelly C., 2005**. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. Agron. Sustain. Dev, 25 .389-393p.
40. **Léon-É., Annie P., non daté**. Colloque sur le phosphore. Une gestion éclairée Ordre des agronomes du Québec.
41. **Lindström K., Lehtomäki S., 1988**. Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galega) compared with other fast growing *Rhizobia*. FEMS Microbiol. 50 . 277-287p.
42. **Mohamed S.H., Smouni A., Neyra M., Kharchaf D., Filali-Matouf A., 2000**. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. Plant and Soil. 224.171-183p.
43. **Monahan-Giovanelli H., Pinedo C.A., Gage D.J. , 2006**. Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. Plant Physiology 14 . 661-670 p.
44. **Moreira F. M. S., Gillis B. , Pot K., Kersters A., Franco A., 1993**. Characterisation of *Rhizobia* isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. Syst. Appl. Microbiol. 16 . 135-146p.

45. **Mpeperek S., Makonese F., Wollum A. G., 1997.** Physiological characterization of indigenous *Rhizobia* nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*. 22 . 275p
46. **Munns D. N., Mosse B., 1980.** Mineral nutrition of legume crops. in *Advances in Legume Science* (Summerfield, R.J. and Bunting, A. H., ed. HMSO, London, UK. 115-125p.
47. **Neyra M., 1992.** Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote legumineuse/Rhizobium. 190 p.
48. **Nour S. M., Fernandez M. P., Normand P., Cleyet-Marel J. C., 1994.** *Rizobium ciceris* sp. consisting of strains that nodulate chickpeas (*cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. Nov. *Int. J. Syst Bacteriol* 45. 640-648p.
49. **Odee, D. W., Sutherland J. M., Makatiani E.T., Mc Inroy S. G., Sprent J. I., 1997.** Phenotypic characteristics and composition of the *rhizobia* associated with woody legumes growing in diverse Kanyen conditions. *Plant and Soil*. 188. 65-75p.
50. **Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M.K., 2005.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* 15 . 531-535p.
51. **Pagano M.C., 2008.** *Rhizobia* associated with neotropical tree *Centropogon tomentosus* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54.498–508p.
52. **Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004.** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* 234.201-262p.
53. **Peix A., Rivas-Boyer A .A., Mateos P.F, Rodriguez-Barrueco C., Martinez-Molina E., Velazquez E., 2001.** Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol Biochem* 33 .103–110p
54. **Plassard C., Robin A., Le Cadre E., Marsden C., Trap J., Herrmann L., Waithaisong K., Lesueur D., Blanchart E., Chapuis-Lardy L., Hinsinger P., 2015.**

- Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol. *Innovations Agronomiques* 43 .115-138p.
55. **Puppo A., Halliwell B., 1988.** Generation of hydroxylradicals by soybean nodule leghaemoglobin. *Planta*. 173. 405-410p.
56. **Quiquampoix H., Mousain D., 2005.** Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. *Organic phosphorus in the environment* (Turner BL, Frossard E Baldwin DS, eds). CAB International, Wallingford. 89-112p
57. **Rae A.L., Bonfante-fasolo P., Brewin N.J.,1992.** Structure and Growth of Infection Threads in the Legume Symbiosis with *Rhizobium-Leguminosarum*. *Plant Journal* 2 . 385-395p.
58. **Ramos Solano B., Barriuso Maicas J., Pereyra de la Iglesia M.T., Domenech J., Gutiérrez Mañero F. J., 2008.** Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*. **98**. 451-457p.
59. **Raza S., Jørgensen H., Abou-Taleb., Christiansen J.L.,2001.** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 32 . 379-83p.
60. **Rees D.S., Kim J., Georgiadis M., Chan M.K., Kimo H., Komiya H., Woo D., Chirino A.J., Schlessman J. HSU B.T., 1993.** Structure and functions of the nitrogenase proteins. Palacios et al (Ed), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 83-89 P.
61. **Richter G., 1993.** *Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie* .Ed .press polytechniques et universitaires Romandes. 526p.
62. **Salim Z . , 2012.** Publié dans *Le Financier* .
63. **Schachtman D.P., Reid R.J., Ayling S.M.,1998.** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116 . 447-453p.

64. **Singh A.K., Simpson C.E., 1994.** Biosystematics and genetic resources. In: The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement, Smartt, J. (Ed.), Chapman and Hall, London, 96-137p .
65. **Smith R. I., Fowler D., Sutton M. A., Flechard C., Coyle M., 2000.** Regional estimation of pollutant gas dry deposition in the UK: model description, sensitivity analyses and outputs. *Atmospheric Environment*, 34 . 3757-3777p.
66. **Snapp S., Lynch J.P., 1996.** Phosphorus distribution and remobilization in bean plants as influenced by phosphorus nutrition. *Crop Sci.* 36 . 929-935p.
67. **Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag New York. 466p.
68. **Stevenson F. J., 1986.** Cycles of soil - Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. John Wiley et Sons Inc. 380p.
69. **Stowers M. D., 1985.** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 39. 89p
70. **Stowers M. D., Eaglesham A. R. J., 1984.** Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Plant Soil.* 77 . 3-14p.
71. **Suliman S., Ha C.V., Schulze J., Tran L.S.P., 2013.** Growth and nodulation of symbiotic *Medicago*.
72. **Timmers A.C.J., Auriac M.C., Truchet G., 1999.** Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. 126 . 3617-3628p.
73. **van Brussel A.A., Bakhuizen R., van Spronsen P.C., Spink H.P., Tak T., Lugtenberg B.J., Kijne J.W., 1992.** Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257 . 70-72p.
74. **van Rossum D., Schuurmans M., Gillis A., Muyotcha H.W., van Verseveld A. H., Stotthamer., Boogerd F. C., 1995.** Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Env. Microbiol.* 61. 1599-1609p.

75. **Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Keresters K., Swing J., 1996.** Polyphasic Taxonomy, a Concensus Approach to Bacteriol Systematic. *Microbiological Rev.* 60(2) . 407-438p.
76. **Vincent, J.M., 1970.** A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook, no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, England.
77. **Xu L. M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan J. , 1995.** *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** . 706-711p.
78. **Yadav N. K., S. R. Vyas., 1973.** Salt and pH tolerance of *Rhizobia*. *Folia Microbiologica*
79. **Zakhia F., de Lajudie P., 2006.** La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Canadian Journal of Microbiology.* 52 . 169p.
80. **Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C., Gillis M., Dreyfus B., Lajudie P., 2004.** Characterisation of wild legume nodulating bacteria (BNL) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(3) .380-395p.
81. **Zerhari K., Aurag J., Khbaya B., Kharchaf A., Filali-Maltouf., 2000.** Phenotypic characteristics of rhizobial isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* 30 . 351-357p.
82. **Zhang X., Harper R., Karsisto M., Lindström K. , 1991.** Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 . 104-113p.
83. **Zheng Z., Simard R., Lafond J. , Parent L. E. , 2001.** Changes in phosphorus fractions of a humic gleysol as influenced by cropping systems and nutrient sources. *Can. J. Soil Sci.* 81. 175-183p.

# Annexes

## **Annexe 1 : Milieux de culture et solutions utilisés**

### **YMB (YeastManitolBroth) :**

Mannitol.....	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.50
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.20
NaCl.....	0.10
Extrait de levure.....	0.50
Eau.....	1000ml
pH.....	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

### **YMA (YeastManitol Agar) :**

Mannitol.....	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.50
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.20
NaCl.....	0.10
Extrait de levure.....	0.50
Agar.....	15
Eau.....	1000ml
pH.....	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

### **Composition de milieu Défini 8 en g/l (Vincent, 1970) :**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.3
MgSO <sub>4</sub> .....	0.21
CaCl <sub>2</sub> .....	0.21
Glutamate-Na.....	1
Mannitol.....	1
Solution stock vitamines.....	1ml

**Oligoéléments**.....1ml

**pH**.....6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

**Solution stock vitamines (mg/l) :**

**Acide nicotinique**.....100

**Thiamine**.....100

**Panthotenate-Ca**.....100

Dissoudre dans un tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05M ; **pH** 7.

La stérilisation de la solution stock vitamines par filtration (0.22 $\mu\text{m}$ ).

**Solution oligoéléments (mg/l) :**

**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**.....50

**FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O**.....35

**CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O**.....8

**MnSO<sub>4</sub>4H<sub>2</sub>O**.....40

**ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O**.....16

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage

**Composition de milieu PVK :**

**Ca<sub>3</sub> HPO<sub>4</sub>**.....0.7g

**Glucose**.....10g

**NaCl**.....0.2g

**KCl**.....0.295g

**FeCl<sub>3</sub>**.....0.003g

**NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>**.....0.373g

**MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O**.....0.41g

**Extraits de levures**.....3g

**Agar**.....20g

**pH**.....6.8 à 7

## **Annexe 2 : Coloration de Gram**

1. Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
2. Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
3. Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes
4. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
5. Couvrir de lugol pendant 30 secondes
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
7. Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
8. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
9. Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
10. Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
11. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

## **Annexe 3 : les tableaux d'Analyse statistique**

### **Source de carbone**

#### **➤ Analyse de la variance**

Pr > F	F	Moyenne des carrés	Somme des carrés	DDL	Source
0,046	295,710	0,021	0,299	14	Souche
0,019	1481,832	0,107	0,428	4	Carbone
0,050	247,613	0,018	0,984	55	Souche*Carbone

- **Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur souche.**

Groupes		Moyenne estimée	Modalité
	A	0,308	M3a
B	A	0,250	M2a
B	A	0,248	D8a
B	A	0,232	D6a
B	A	0,209	M1a
B	A	0,195	S1a
B	A	0,170	M7a
B	A	0,157	D3a
B	A	0,140	D2a
B	A	0,137	D5a
B	A	0,120	M4a
B	A	0,111	D4a
B	A	0,110	S3a
B	A	0,107	M6a
B		0,088	M8b

- **Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur source de carbone.**

Groupes		Moyenne estimée	Modalité
	A	0,288	Lactose
	B	0,216	Glucose
C		0,156	Fructose
C		0,134	Galactose
D		0,065	Mannitol

## Source de Azote

➤ **Analyse de la variance**

Pr > F	F	Moyenne des carrés	Somme des carrés	DDL	Source
0,602	1,315	0,005	0,067	14	Souche
0,820	0,380	0,001	0,006	4	Azote
0,630	1,226	0,004	0,247	55	Souche*Azote

➤ **Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur souche.**

Groupes	Moyenne	Modalité
A	0,098	D8a
A	0,094	D6a
A	0,062	S1a
A	0,046	M2a
A	0,039	M7a
A	0,036	D3a
A	0,024	M6a
A	0,021	D5a
A	0,021	M4a
A	0,020	D2a
A	0,015	M3a
A	0,014	M1a
A	0,000	S3a
A	0,000	M8b
A	0,000	D4a

➤ **Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur source d'azote.**

Groupes	Moyenne	Modalité
A	0,048	Caséine
A	0,034	L-Gluth
A	0,032	L-Leuc
A	0,026	L-Cys
A	0,023	L-Tryp

## Tolérance à la salinité (NaCl)

➤ **Analyse de la variance**

Pr > F	F	Moyenne des carrés	Somme des carrés	DDL	Source
0,013	3428,884	0,031	0,432	14	Souche
0,020	1366,646	0,012	0,049	4	Salinité
0,013	3491,525	0,031	1,728	55	Souche*Salinité

➤ **Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur souche.**

Groupes	Moyenne estimée	Modalité
	A	0,320 S1a
	B	0,262 D6a
	B	0,249 D3a
	B	0,248 D2a
	C	0,216 M4a
	C	0,209 M6a
	D	0,197 M1a
	D	0,183 M3a
	D	0,160 D8a
	D	0,153 D5a
E		0,114 M8b
E		0,113 D4a
E		0,098 M7a
E		0,098 M2a
F		0,022 S3a

➤ **Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur salinité.**

Groupes	Moyenne estimée	Modalité
A	0,214	0,0001
B	0,192	0,08
B	0,180	0,05
C	0,150	0,01
C	0,146	0,1

## Influence du pH

➤ Analyse de la variance

Pr > F	F	Moyenne des carrés	Somme des carrés	DDL	Source
0,011	4920,041	0,011	0,155	14	Souche
0,003	62556,187	0,141	0,563	4	pH
0,016	2356,300	0,005	0,292	55	Souche*pH

➤ Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur souche

Groupes			Moyenne	Modalité
		A	0,244	D3a
		B	0,213	M1a
		C	0,198	M8b
		D	0,170	D5a
		D	0,167	M3a
		E	0,152	M7a
	F	E	0,142	M4a
G	F	E	0,137	D6a
G	F		0,129	D2a
G	F		0,124	M6a
G	F		0,123	D8a
G	F		0,117	S1a
G			0,113	M2a
H			0,093	S3a
I			0,064	D4a

➤ Analyse de différence entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% : Facteur pH

Groupes		Moyenne	Modalité
	A	0,239	pH7
	B	0,227	pH4 ,5
	C	0,173	pH9
D		0,063	pH11
E		0,025	pH2

## **Annexe 4 : Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)**

➤ **Résultats par classe**

Classe	1	2	3
Objets	9	3	3
Somme des poids	9	3	3
Variance intra-classe	16,4416	63,9546	31,6888
Distance minimale au barycentre	1,7557	2,7262	3,4638
Distance moyenne au barycentre	3,4438	6,0700	4,4514
Distance maximale au barycentre	7,3562	8,2913	6,0567
	M2a	D3a	S1a
	D5a	D4a	S3a
	M1a	M7a	M3a
	D6a		
	M4a		
	D8a		
	M6a		
	D2a		
	M8b		