

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Faculté: Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre

Département: Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master

Identification des bactéries rhizosphériques liés à la lentille (*lens culinaris*) cultivée sous déficit en phosphore.

Présenté par :

Melle ZEMZEM Djazia

Melle BRAIRI Khouloud

Composition du Jury :

Président Mr AROUS.A

Examineur Melle BOUCHIBA.Z

Promoteur Mr BOUSSALHIH.B

Co-promotrice Melle BOUGHANEM.W

Année universitaire : 2021/2022

# Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes profondes reconnaissances et à remercier: monsieur **BOUSSALHIH B** pour avoir dirigé ce travail et accepté de l'encadrer, pour l'aide qu'il nous a apporté, et son entière disponibilité.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude à notre co- promotrice Mme **BOUGHANEM W** qui nous a orientés avec ses conseils et surtout merci pour sa patience. Merci pour votre gentillesse, vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, soyez rassuré de notre profonde gratitude et notre respectueuse considération vos qualités scientifiques et humaines resteront à jamais pour nous l'exemple.

On remercie chaleureusement Mme **BRAHIMI S** et Mme **BOUCHIBA Z** pour tout l'aide que j'ai eu pour mettre fin à ce travail.

Je remercie tous les jurys d'avoir accepté de faire partie du jury de cette mémoire.

Nous tenons également à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail :

- *Aux deux chères personnes au monde qui ont été toujours à mes côtés tous au long mon parcours, Mon père et Ma mère à qui je dois le mérite d'en arriver là.*
  - *A mes chères sœurs puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage, et surtout réussite.*
- *J'adresse un merci spécial à mes précieuses: Douma Djamila, Yousfi Rima , et Zitoun Zina, qui m'ont toujours encouragé, me donnent de l'amour et de la vivacité.*
  - *A mon aimable binôme Khouloud et sa famille.*
    - *A toute ma famille.*
  - *A toute la promotion biotechnologie microbienne 2021-2022*
    - *A tous ceux qui m'aiment et qui m'ont encouragé.*

*Djazia*

# *Dédicace*

*Avec un énorme plaisir et un cœur ouvert Je dédie ce modeste travail :*

- *A Qui n'a pas cessé de m'encourager Durant toutes mes années d'études, ma première encadrant depuis ma naissance « **ma chère maman** ». Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour elle. Ce travail est le fruit de ses sacrifices. Que dieux la protège et lui donne une longue vie.*

*A la mémoire de mon père*

- *Qui nous a quittés très tôt. Je te garde toujours au plus profond de mon cœur et je ne cesse de prier pour toi. Votre rêve est devenu réelle.*

*A mes merveilleux frères*

- *Que dire pour vous remercier... votre amour pour moi et le désir de me rendre toujours heureuse. Rassurez-vous que je suis fière d'avoir des frères comme vous.*

- *A mon fiancé **Oussama**, le soutien permanent qui n'a pas hésité à m'encourager tout au long de ce travail.*

- *A mon adorable binôme et sœur **Djazia**.*

- *A ma chère amie et sœur **Fatiha** Que dieux la protège.*

- *A toute la promotion biotechnologie microbienne 2021-2022.*

- *A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin a la réalisation de ce travail.*

***Khouloud***

## Résumé

La production des légumineuses alimentaires comme la lentille cultivée est affecté par des conditions environnementales climatiques (températures élevées, déficit hydrique, etc.). . Dans cette étude, plusieurs génotypes étaient semi-au niveau de l'ITGC dans la région Oued Smar wilaya d'Alger pour sélectionner des génotypes qui répondent et s'adaptent aux facteurs environnementaux (climatique et édaphique), afin d'isolées des bactéries à partir des nodules racinaires de la lentille (*Lens culinaris*) cultivée. Des études morphologiques et culturales ont classé ces isolats comme des bactéries à croissance rapide, Caractérisé par des bactéries du genre *Rhizobium*. La caractérisation phénotypique par les tests de tolérance aux stress abiotiques (salinité, pH) montrent Les limites de tolérance des isolats étaient pH 11, et 5 % pour le NaCl. Les testes biochimiques (solubilisation du phosphate, réduction des nitrates, hydrolyse de l'urée) Évaluer l'activité de différentes enzymes dans tous les isolats. Les résultats ont montré que ces isolats utilisent les disaccharides (lactose et saccharose) et de sucre alcool (mannitol) comme source de carbone pour favoriser la croissance.

### Mot clés :

*Rhizobium*, *Lens culinaris*, nodules racinaires, caractérisation phénotypique et biochimique, isolats bactérienne.

## **Abstract**

The production of food legumes such as cultivated lentil is affected by climatic environmental conditions (high temperatures, water deficit, etc...). In this study, several genotypes were semi at the ITGC in Oued Smar region of Algiers to select genotypes that respond and adapt to environmental factors (climatic and edaphic), in order to isolate bacteria from root nodules of cultivated lentil (*Lens culinaris*). Morphological and cultural studies classified these isolates as fast-growing bacteria, characterized by bacteria of the genus *Rhizobium*. Phenotypic characterization by abiotic stress tolerance tests (salinity, pH) show the tolerance limits of the isolates were pH 11, and 5% for NaCl. Biochemical tests (phosphate solubilization, nitrate reduction, urea hydrolysis) assess the activity of different enzymes in all isolates. The results showed that these isolates use the disaccharides (lactose and sucrose) and sugar alcohol (mannitol) as a carbon source to promote growth.

### **Keywords:**

*Rhizobium*, *Lens culinaris*, root nodules, phenotypic and Biochemical characterization, bacterial isolates.

## تلخيص

يتأثر إنتاج البقوليات الغذائية مثل العدس المزروع بالظروف البيئية المناخية (ارتفاع درجات الحرارة ، ونقص المياه ، وما إلى ذلك). في هذه الدراسة كانت العديد من الأنماط الجينية مزروعة على مستوى المعهد التقني للزراعات الواسعة بمنطقة واد السمار ولاية الجزائر لاختيار الانماط الجينية التي تستجيب وتتكيف مع العوامل البيئية (المناخية والتكوينية) ، من أجل عزل البكتيريا الموجودة في العقيدات الجذرية المزروعة لنبات العدس . صنفت الدراسات المورفولوجية و الزراعية لهذه العزلات على أنها بكتيريا سريعة النمو تتميز بها البكتيريا من جنس الريزوبيوم. التوصيف المظهري باختبارات تحمل الضغط اللاأحيائي (الملوحة ، درجة الحموضة) أظهر أن حدود التحمل للعزلات كانت 11 لدرجة الحموضة و 5٪ للملوحة. الاختبارات البيوكيميائية (إذابة الفوسفات ، اختزال النترات ، تحلل اليوريا) تقيم وجود نشاط لإنزيمات مختلفة في جميع العزلات. أظهرت النتائج أن هذه العزلات تستخدم ثنائي السكريات (اللاكتوز والسكروز) وكحول السكر (مانيتول) كمصدر للكربون لتعزيز النمو.

## الكلمات المفتاحية

البكتيريا العصوية ، العدس ، العقد الجذرية، التوصيف المظهري و البيوكيميائي ، العزلات البكتيرية

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Schéma général de la rhizosphère.....	05
<b>Figure 2:</b> La structure de la rhizosphère.....	06
<b>Figure 3 :</b> Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin et <i>al.</i> , 2009).....	15
<b>Figure 4:</b> Les principales étapes du cycle de l'azote.....	17
<b>Figure 5 :</b> Ramification du cordon d'infection (Selami, 2017).....	20
<b>Figure 6:</b> Localisation du site d'étude, Situation géographique de l'FDPS de l'ITGC de Oued Smar.....	23
<b>Figure 7:</b> Dispositif expérimentale de l'essai.....	26
<b>Figure 8:</b> techniques de conservation des nodules.....	27
<b>Figure 9:</b> Ensemencement par la technique de quatre quadrants (Vincent, 1970).....	28
<b>Figure 10:</b> Aspect microscopique des colonies.....	33



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Valeurs pluviométriques mensuelles de la campagne 2019/2020 enregistrées à Oued Smar Comparées à la moyenne de 89/2017.....	24
<b>Tableau 2:</b> analyses physicochimiques du sol.....	25
<b>Tableau 3:</b> Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl.....	34
<b>Tableau 4:</b> Croissance des isolats à différents Ph.....	35
<b>Tableau 5:</b> Croissance des souches en présence de différents sucres.....	37

## Liste des abréviations

- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique.
- ARN** : acide ribonucléique.
- ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique.
- ADNr 16S** : ADN ribosomique 16S
- atm** : atmosphère
- BNL**: bactéries nodulant légumineuses.
- Nod** : Nodulation
- R*: *Rhizobium*
- C°** : Degré Celsius.
- FBA**: fixation biologique d'azote.
- PGPR**: plant growthpromotingrhizobacteria.
- Ph** : Potentiel d'Hydrogène
- ITGC** : Institut Technique des Grands Cultures
- FAO**: Food and Agriculture organization
- RLF**: Restriction Fragment LengthPolymorphism.
- YMA**: Yeast Manitol Agar.
- YEM**: yeast extra mannitol
- YMB**: Yeast-Mannitol-Broth
- BTB**: Bleu de bromothymol
- TY**: Tryptone Yeast Agar
- PVK**: Milieu Pikovskaya

## Sommaire

Introduction.....	1
<b>Chapitre 1 : Etude bibliographique</b>	
I. Sol.....	4
I.1. Rhizosphère .....	4
I.1.1. Activité rhizosphérique .....	5
I.1.2. Microflore rhizosphérique .....	5
II. Légumineuses.....	7
II.1. Présentation générale et importance dans les systèmes de cultures .....	7
II .1.1. Intérêts scientifiques des légumineuses en général .....	7
II.1.2. Intérêt agronomique des légumineuses .....	8
II.1.3. Intérêt alimentaire des légumineuses .....	8
II.1.4. Intérêt écologiques des légumineuses.....	8
III. Lentille.....	8
III .1. Origine, Air de répartition .....	9
III .2. Classification.....	9
III .3. Caractéristiques agronomique.....	9
III .4. Importance.....	10
III .5. Production .....	11
III .6. Situation de la lentille en Algérie .....	11
III .7. Contraintes et limites de production.....	11
IV. Généralité sur rhizobium.....	12
IV.1. Caractères généraux des rhizobia.....	13
IV.2. Diversité taxonomique des rhizobiums.....	14
IV.3. Méthode d'étude de la caractérisation des rhizobiums.....	15

IV.3.1. Méthodes phénotypiques.....	16
IV.3.2. Méthodes moléculaires.....	16
V. Cycle de l'azote.....	17
a. Ammonification.....	17
b. Nitrification.....	18
c. Dénitrification.....	18
V.1. Fixation biologique de l'azote.....	18
V.2. Fixateurs d'azote.....	19
V.2.1. Fixation libre d'azote.....	19
V.2.2. Fixation symbiotique.....	19
V.3. Azote dans la plante.....	19
VI. Nodulation.....	20
VI.1. Processus de nodulation.....	20
VI.1.1. Pré échange de signal.....	20
VI.1.2. Mode d'infection.....	20
VI.1.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....	21
VI.2. Intérêt des bactéries nodulants.....	21

## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

I. Objectif de l'essai.....	23
II. Site d'échantillonnage.....	23
II.1. Localisation de l'essai.....	23
II.2. Caractéristiques climatiques.....	23
II.3. Analyses physico-chimiques du sol.....	24
II.4. Matériel végétal.....	25
II.5. Dispositif expérimental.....	25

III. Isolément des bactéries à partir des nodules .....	26
III.1. La collecte des nodules.....	26
III.2. Conservation des nodules.....	27
III.3. Isolement, purification, et conservation des souches de rhizobia .....	27
III.4. Technique d'isolement et purification.....	28
III.5. Conservation des souches.....	28
IV. Caractérisation phénotypiques des souches isolées.....	28
IV.1. Les caractères morphologiques.....	29
IV.2. Test de croissance.....	29
IV.3. Tolérance à la salinité.....	29
IV.4. Tolérance au pH.....	29
V. Caractérisation biochimique des souches isolées.....	29
V.1. Examen microscopique.....	29
V.2. Solubilisation du phosphate.....	30
V.3. Réduction des nitrates .....	30
V.4. Hydrolyse de l'urée.....	30
VI. Les tests nutritionnels: utilisation de la source de carbone.....	31

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

I. caractérisation phénotypique.....	33
I. 1. Etude morphologique et culturale.....	33
I.2. Etude microscopique.....	33
II. Tests physiologiques.....	34
II.1. Tolérance au NaCl.....	34
II.2. Effet au pH.....	34
III. Tests biochimiques.....	35

III.1. Solubilisation du phosphate.....	35
III.2. Réduction des nitrates.....	36
III.3. Hydrolyse de l'urée.....	36
IV. Les tests nutritionnels.....	36
IV.1 Utilisation de la source de carbone.....	36
<b>Conclusion</b> .....	<b>38</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>40</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>48</b>

# **Introduction générale**

### Introduction

Les légumineuses alimentaires, représentent une importante partie dans l'alimentation humaine et animale, caractérisées par leur forte teneur en protéines, la limitation de la contamination des nappes phréatiques par les nitrates des engrais, et leur contribution à fournir une quantité non négligeable d'azote fixé nécessaire à la croissance des céréales (Labdi, 1991).

En Algérie, la lentille (*Lens culinaris*) est classée comme la troisième importante culture légumineuse après l'haricot (*Phaseolus vulgaris*) et le petit pois (*Pisum sativum*) et joue un rôle important dans l'amélioration de la fertilité des sols lors des rotations de cultures. Les lentilles sont utilisées à grande échelle et constituent l'un des principaux axes du programme de développement des légumineuses lancé par le ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR). Cependant, sa culture ne représente que 1,5 % du total des terres réservées aux légumineuses comestibles. (Ait Abdellah et al. 2011)

Tout particulièrement, la lentille est cultivée comme une culture annuelle d'été dans les zones tempérées et comme une culture annuelle d'hiver dans les régions subtropicales. Sous les tropiques, elle est cultivée à des altitudes élevées (1800 ; 2500 et 2700 m) ou comme plante de saison froide (Sehirali, 1988 ; Ozdemir, 2002).

L'azote est le composant le plus important de la construction des plantes après le carbone. La fixation potentielle d'azote par les rhizobiums est limitée par des contraintes environnementales de nature physique, chimique et biologique dont les effets sont parfois considérables, de sorte que la fixation réelle d'azote peut être bien inférieure à la fixation potentielle d'azote.

Certaines légumineuses comme la lentille ont la capacité de développer des relations symbiotiques avec des bactéries appelées rhizobiums, qui à leur tour fixent l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique. Cela lui permet d'utiliser directement l'azote atmosphérique, qui est réduit dans les nodules par la nitrogénase de ces Rhizobium.

La forme la plus courante d'association symbiotique se traduit par la formation de structures multicellulaires élargies appelées nodules à la racine ou parfois à la tige de la plante hôte. (Dénarié et al, 1996). Dans les nodules, les bactéries qui se différencient en Bacteroides transforme l'azote en suspension dans l'air en une forme que les plantes peuvent absorber directement. En échange, les plantes fournissent aux bactéries des substrats carbonés issus de la photosynthèse. Survie Les rhizobiums, la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique dans le sol sont des processus très sensibles aux effets de nombreux facteurs environnementaux tels que le pH du sol, l'eau, la température et le stress salin.

Notre travail vise à identifier les bactéries rhizosphériques liés à la lentille cultivée (*Lens culinaris*) sous déficit en phosphore. L'échantillonnage a été réalisé au niveau de la région Oued Smar - alger



Et afin d'atteindre notre objectif, nous avons divisé notre travail en deux parties :

Partie bibliographique : Il s'agit d'une étude bibliographique sur les lentilles

Sol, rhizobium, légumineuses, symbiose Rhizobium-légumineuses, fixation d'azote et nodulation

Partie expérimentale : nous avons procédé à une caractérisation phénotypique et symbiotique des isolats nodulant *Lens culinaris* selon ces étapes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules racinaires de la lentille
- Etude des caractères morphologiques, culturels et microscopiques des isolats
- Caractérisation phénotypique des isolats incluant une série de tests :

-Physiologiques (Tolérance à la salinité, Tolérance au pH,).

- Biochimiques (Solubilisation du phosphate, Réduction des nitrates, Hydrolyse de l'urée)

- Nutritionnels (source de carbone).

Résultats et discussion : nous avons discuté de l'ensemble des résultats (caractérisation phénotypique, tests physiologiques, tests biochimiques, tests nutritionnelles) que nous avons obtenus à partir des tests que nous avons effectués sur les isolats.

**Chapitre 1**  
**Revue**  
**bibliographique**

## I. Sol

Le sol est un milieu solide qui est formé des minéraux et des composés organiques. Le tout forme des agrégats plus ou moins volumineux et structurent le sol. Cette partie solide est discontinue par la présence d'espaces poreux. Cette propriété explique l'existence de fluides, et des gaz, qui se déplacent et ainsi créer un écoulement de matière. Il y a la présence des organismes vivants: végétaux et animaux qui vivent et se développent (Calvet, 2003).

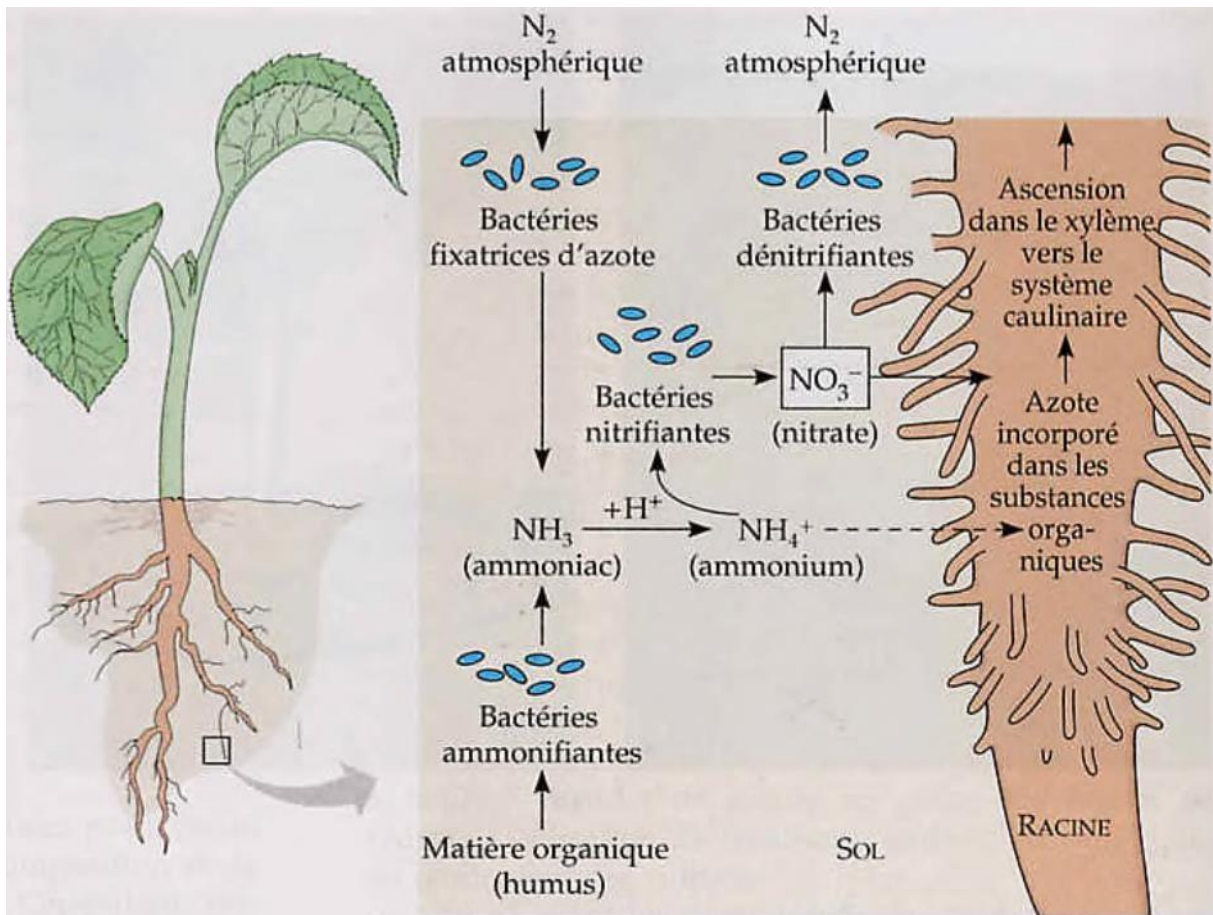
La combinaison des particules de sol en grandes unités, de tailles et de formes différentes (Lavelle et Spain 2001) définit la structure de sol. Ils sont séparés les uns des autres par des espaces poreux qui permettent le mouvement de l'eau et les échanges gazeux avec l'atmosphère. Des fissures du sol peuvent provenir suite à des changements de volume, une humidification ou un assèchement du sol (Lavelle et Spain 2001). La biologie et l'action de la flore et de la faune du sol, ainsi que d'activité racinaire entraînent ces cassures (Oades, 1993).

### I.1. Rhizosphère

La rhizosphère est la zone du sol autour des racines des plantes (Figure 1). Le terme rhizosphère a été introduit par Lorenz Hiltner en 1904, "rhizo" vient du grec "rhiza" indiquant "racine" et "sphère" est le champ. Hiltner décrit la rhizosphère comme la partie étroite du sol où l'activité microbienne autour des racines des légumineuses. Enfin, elle correspond à une zone étroite autour de la surface racinaire, où s'effectuent les échanges d'eau et les nutriments. Ainsi, la rhizosphère constitue le lieu d'échange entre les végétaux et les minéraux; c'est un milieu complexe avec des interactions multiples (Lynch, 1990).

Dans la rhizosphère, on distingue:

- Le rhizoplant (surface de la racine).
- L'endorhizosphère (surface interne de certaines bactéries, à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules).
- Sol rhizosphérique ou l'exorhizosphère (Gobat et al.2010).



**Figure 1:** Schéma général de la rhizosphère (Anonyme1, 2003).

### I.1.1. Activité rhizosphérique

Les plantes produisent des exsudats racinaires composés de matières organiques carbonées et azotées : polysaccharides, acides organiques et protéines. Qui soutiennent le développement de la microflore non pathogène ou pathogène. Les propagules fongiques se développent de manière saprophyte sur les racines, où elles peuvent infecter éventuellement ou les parasiter (Schroth et Hildenbrand, 1964). La densité de bactéries dans la rhizosphère est plus élevée que dans le sol: c'est « l'effet rhizosphère » (Foster et Rovira, 1978). L'activité bactérienne détermine la quantité et la composition des exsudats racinaires. Ces activités résultent de la synthèse de métabolites comme l'acide cyanhydrique, les sidérophores, les substances de croissance, les antibiotiques, les lipopolysaccharides (Lemanceau, 1992).

PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), une flore bactérienne diversifiée, rhizobactérie stimulatrice de la croissance des plantes est bénéfique pour la santé des plantes.

### I.1.2. Microflore rhizosphérique

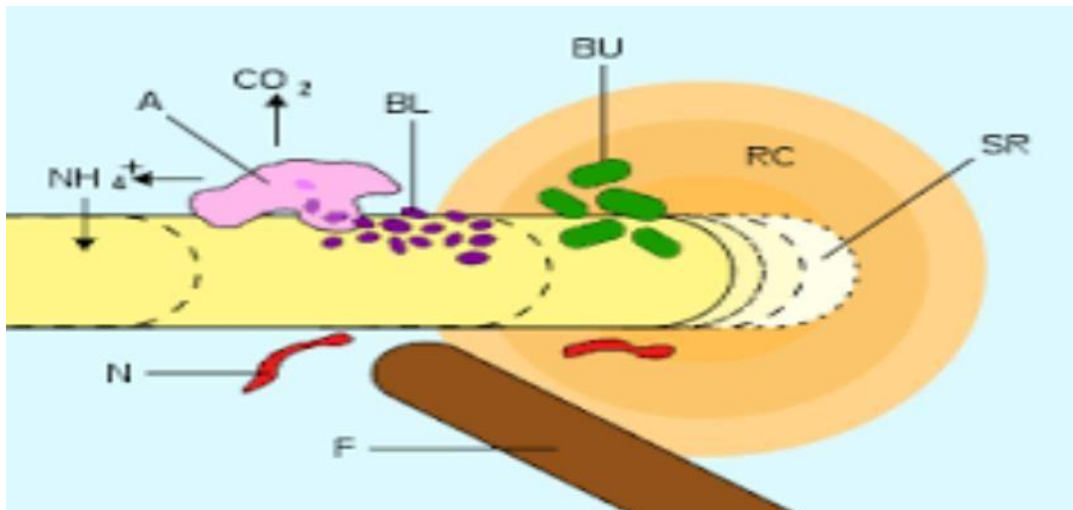
La microflore du sol, comprend des bactéries, des virus, des champignons, et des protozoaires. La distribution des microorganismes du sol est hétérogène et dépend des facteurs physico-

chimiques et nutritionnels, donc, c'est la chose la plus importante au niveau de la rhizosphère pour déterminer la densité (figure 2).

Un gramme de sol végétalisé contient environ 1 milliard de bactéries, regroupées en 5 à 25 000 espèces, dont la plupart ne sont pas connues ni même cultivées en laboratoire.

Les bactéries sont les micro-organismes les plus importants métaboliquement actifs dans le sol. L'examen microscopique direct donne une estimation de 1 gramme de sol peut contenir jusqu'à 10<sup>9</sup> espèces bactériennes (dont 1/100 peuvent être isolées par la technique de culture) (Malek, 2015). Si des techniques et des milieux appropriés sont utilisés (Dommergues et Mangenot, 1970).

Le sol contient plus de mycètes. Les racines dans le sol sont riches en microflore. La biomasse fongique varie d'un sol à un elle peut être 120 kg/ha et plus d'une tonne dans des sols normaux (Dommergues et Mangenot, 1970). L'activité métabolique importante est constitué la base de l'équilibre écologique du sol. Des travaux montrent une dominance : Trichoderma, Mucor et Aspergillus.



**Figure 2:** La structure de la rhizosphère

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/37/Rhizosphere.svg/1200pxRhizosphere.svg.png>)

## II. Légumineuses

Les légumineuses sont la plus grande famille d'angiospermes, en termes de nombre d'espèces (après Orchidaceae et Compositae), avec plus de 18 000 espèces réparties dans le monde, réparties en environ 750 genres (Benselama.2015). On les trouve dans presque tous les milieux terrestres, ils se caractérisent par une grande diversité et sont dominés par des espèces ligneuses et vivaces (Chang ,2011). D'un point de vue écologique, les légumineuses sont responsables de la conversion des flux atmosphériques globaux d'azote en formes fixes telles que l'azote ammoniacal, qui à leur tour sont convertis en composés organiques assimilables. Très important dans la lutte contre l'érosion, la désertification et la dégradation des sols (Tami et El Mansouri, 2000).

La famille des légumineuses est divisée regroupée en trois sous-familles:

- les *Mimosoideae* (62 genres et 2500 espèces) et les *Caesalpinioideae* (150 genres et 22000 espèces), se composent essentiellement d'arbres et d'arbustes des régions tropicales et subtropicales.
- les *Papilionoideae* (Faboideae) avec 467 genres et environ 14000 espèces représentent la partie la plus grande et la plus diversifiée des légumineuses.

On y trouve des arbustes et des vignes, pour la plupart des arbres exotiques, mais surtout de nombreuses herbes vivaces ou annuelles ; souvent enchevêtrées et grimpées, soit par enroulement (*Phaseolus*, *Physostigma*) soit par des vrilles de feuilles (*Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia*). Les plantes de cette sous-famille (*Faboideae*) sont particulièrement adaptées au milieu méditerranéen.

Bien que La nodulation des légumineuses par les rhizobiums soit un phénomène très courant, seulement 20 % des 18 000 espèces de légumineuses ont été étudiées à ce jour. Point de vue nodulaire. Dans cette partie, 30% de la sous-famille *Caesalpinioideae*, 90% de la sous-famille *Mimosoideae* (robinier, glycine, acacia, etc.) et 97% des espèces de la sous-famille *Faboideae* (pois, haricots, féveroles, lentilles...) avoir Nodule (Benselama 2015).

### II.1. Présentation générale et importance dans les systèmes de cultures

#### II. 1.1. Intérêts scientifiques des légumineuses en général

Les légumineuses comestibles constituent une partie importante du travail dans divers domaines tels que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin, 2001).

Les principaux objectifs de recherche pour les légumineuses à graines sont d'assurer à la fois la formation de nodules, la complémentarité entre les voies de fixation de l'azote et d'assimilation, et un meilleur transfert de l'azote des feuilles vers les tiges vers les graines. Les avantages des légumineuses sont leur faible coût énergétique et leur faible apport en gaz à effet de serre, directement lié à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet et al, 2006).

La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et des bilans énergétiques sont aujourd'hui des objectifs communs à de nombreuses industries, non seulement pour accroître la compétitivité économique ou réduire l'impact environnemental, mais surtout pour développer les biocarburants. Réduire la fertilisation azotée et améliorer les coûts et le bilan énergétiques sont désormais des objectifs communs à plusieurs secteurs, non seulement pour améliorer la compétitivité économique et réduire l'impact environnemental, mais aussi pour développer notamment les biocarburants (Pinochet et al., 2006).

### II.1.2. Intérêt agronomique des légumineuses

Leur intérêt agronomique de l'agriculture vient principalement de leur capacité à fixer l'azote symbiotique, qui leur permet de produire des protéines végétales abondantes même sans fertilisation azotée, ils s'intéressent donc aussi. Cela suscite également l'intérêt dans le cadre d'une agriculture "durable" (apports réduits, conservation et enrichissement d'intérêt dans les sols azotés) car elle peut produire des protéines végétales abondantes sans fertilisation azotée (Journet et al. 2001). De par leur symbiose fixatrice d'azote avec des souches de rhizobium, ils ont un effet très favorable sur la fertilité du sol. Par conséquent, ils jouent un rôle clé dans la rotation des cultures (Baudoin, 2001).

### II.1.3. Intérêt alimentaire des légumineuses

Des espèces cultivées appartiennent à la famille des légumineuses. Ils sont une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et des animaux (Journet et al. 2001). Elles présentent un apport peu coûteux mais important en protéines (18% à 30% des graines sèches) (Baudoin, 2001). Parmi ces légumineuses riches en protéines et en amidon figurent les lentilles (plante dicotylédone appartenant à la famille des légumineuses).

### II.1.4. Intérêt écologiques des légumineuses

Dans les pays développés, la sur-utilisation des engrais chimiques azotés entraîne une pollution des sols, des nappes phréatiques et d'eau, dans les pays développée. La contamination par les nitrates est une préoccupation majeure aujourd'hui, et la réintroduction des légumineuse s'est avérée être un excellent moyen de la limiter. En effet, la décomposition des végétaux ou de leurs résidus est progressive et plus propice à l'utilisation de l'azote par d'autres végétaux. En conséquence, les pertes d'azote par lessivage sont limitées et l'utilisation d'engrais est réduite (Sehari.2012).

## III. Lentille

L'espèce *Lens culinaris* (lentilles cultivées) appartient au genre *Lens* et classée dans la tribu *Viciae*. Dans une récente révision du genre *Lens* (Brink et Belay, 2006). Quatre espèces ont été réserve:

- *Lens culinaris* : a été divisé en quatre sous-espèces principales :
  - subsp. *culinaris* (la lentille cultivée),

- subsp. *Odemensis*.
- subsp. *Orientalis*.
- subsp. *Tomentosus*.
- *Lens ervoides*.
- *Lens nigricans*.
- *Lens lamottei*.

Les lentilles cultivées sont divisées en deux groupes en fonction de la taille des graines. Groupe *macrosperma* Principalement présent en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique (plus de 6 mm de diamètre), tandis que le groupe des *microsperma* (moins de 6 mm de diamètre) Prédominant en Asie, en Égypte et en Éthiopie (Brink et Belay, 2006).

### III.1. Origine, Air de répartition

L'origine des lentilles cultivées se situe au Proche-Orient (Zohary, 1972), De là, il s'est répandu en Méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe, étant l'un des La plus ancienne légumineuse cultivée (Brink et Belay, 2006). Les lentilles sont maintenant cultivées Global : sous-continent indien, Moyen-Orient, Afrique du Nord, Europe du Sud Amérique du Sud, du Nord et du Sud et Australie (Chahota et al. 2007).

### III.2. Classification

**Règne:** *Plantae*

**Sous règne:** *Tracheobionta*

**Division:** *Magnoliophyta*

**Classe:** *Magnoliopsida*

**Sous-classe:** *Rosidae*

**Ordre:** *Fabales*

**Famille:** *Fabaceae*

**Genre:** *Lens*

**Espèce:** *Lens culinaris* ([https://fr.wikipedia.org/wiki/Lentille\\_cultivée](https://fr.wikipedia.org/wiki/Lentille_cultivée))

### III.3. Caractéristiques agronomique

Comme de nombreuses plantes de la famille des légumineuses, les lentilles ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Ce phénomène se produit au niveau de la racine. Les rhizobiums



(bactéries) forment une relation symbiotique avec les plantes. Les racines de la plante développeront des nodules, et les bactéries bénéficieront de conditions de vie favorables. En échange, les bactéries vont capter l'azote de l'atmosphère pour le transformer en ammonium assimilable par les plantes (Carte d'identité des lentilles. 2011).

### III .4. Importance

Les lentilles sont un trésor de bienfaits.

- Des antioxydants pour prévenir certains cancers

Les lentilles contiennent des antioxydants, des composés qui protègent les cellules du corps contre les dommages des radicaux libres appelés anthocyanes, qui peuvent réduire la croissance des cellules cancéreuses humaines.

- Très grande richesse en fibres : les lentilles aident à stimuler le transit intestinal, à réduire le risque de cancer du côlon et la satiété.

La présence de fibres solubles aide également à prévenir les maladies cardiovasculaires en réduisant considérablement l'absorption des acides biliaires, ce qui aide à normaliser le taux de cholestérol sanguin. Ils peuvent également aider à gérer le diabète de type 2, par exemple en ralentissant la digestion du glucose dans les aliments.

- Source de phosphore, magnésium et potassium
  - Les lentilles contiennent du phosphore, qui joue un rôle vital dans la formation et le maintien d'os et de dents sains.
  - Les lentilles sont une source de magnésium, qui est impliqué dans le développement des os, la construction des protéines, l'action enzymatique, la contraction musculaire, la santé dentaire et le fonctionnement du système immunitaire.
  - Les lentilles sont une source de potassium, qui aide à la digestion en équilibrant le pH sanguin et en stimulant l'estomac pour produire de l'acide chlorhydrique.
- Un réservoir de fer...mais végétal

Les lentilles sont une excellente source de fer. Chaque cellule du corps contient du fer. Ce minéral est indispensable au transport de l'oxygène et à la formation des globules rouges dans le sang.

- Très bonne source de sélénium

Les lentilles sont une source de sélénium. Ce minéral travaille avec une enzyme antioxydante majeure pour empêcher la formation de radicaux libres dans le corps. Il aide également à convertir les hormones thyroïdiennes en leurs formes actives.

- Des vitamines du groupe B (B2, B3 et B9) en quantités appréciables
  - Les lentilles sont une source de vitamine B2. Cette vitamine est également connue sous le nom de riboflavine. Comme la vitamine B1, elle joue un rôle dans le métabolisme énergétique de toutes les cellules. De plus, il aide à la croissance et à la réparation des tissus, à la production d'hormones et à la formation de globules rouges.

- Les lentilles sont une source de vitamine B3. Aussi connue sous le nom de niacine, la vitamine B3 est impliquée dans de nombreuses réactions métaboliques, notamment en aidant à produire de l'énergie à partir des glucides, des lipides, des protéines et de l'alcool que nous consommons. Il agit également en synergie lors de la formation de l'ADN, permettant une croissance et un développement normaux.
- Les lentilles sont une excellente source de vitamine B9, qui participe à la production de toutes les cellules du corps, y compris les globules rouges. Cette vitamine joue un rôle vital dans la production de matériel génétique (ADN, ARN), le fonctionnement des systèmes nerveux et immunitaire, et la cicatrisation des plaies et plaies (Catherine Conan. 2021).

### III .5. Production

Les lentilles poussent à des températures moyennes de 6-27°C, mais elles ne conviennent pas aux régions tropicales chaudes et humides. Il nécessite environ 750 mm de précipitations annuelles et est récolté par temps sec. Les lentilles sont une culture de saison fraîche avec une résistance modérée à la sécheresse et à la chaleur, et prennent généralement plus de temps à fleurir. Il peut pousser sur de nombreux types de sols, des sols sableux aux sols argileux assez lourds. La plante ne tolère pas les sols gorgés d'eau, ni les inondations ni la salinité. Un pH d'environ 7 est préférable pour les lentilles (Saskatchewan Pulse Growers, 2000 ; Brink et Belay, 2006). Le cycle de croissance est de 80 à 110 jours pour les variétés à court terme et de 125 à 130 jours pour les variétés à long terme (Brink et Belay, 2006).. La couleur des graines varie selon le cultivar, du plus clair (vert clair, doré, rose) au plus foncé. Couleurs foncées (vert foncé, marron, violet...) (Vandenberg et Slinkard, 1990).

### III .6. Situation de la lentille en Algérie

En Algérie, les variétés cultivées sont soit indigènes, avec une variété de variétés mixtes, soit d'origine européenne. Plusieurs variétés ont été introduites et d'autres ont été sélectionnées en fonction de leur capacité à s'adapter aux différentes conditions agro climatiques. Parmi les cultivars comprennent: Big Blonde Metropolis, Big Blonde du Chili et Big Green d'Algérie, cette dernière étant la première variété européenne à être introduite en Algérie en tant que grande culture. Dans certaines zones de production, les lentilles dorées et vertes du puy coexistent, et une hybridation naturelle se produit, donnant des lentilles vertes d'Algérie, qui ont été sélectionnées et améliorées. (Vandenberg et Slinkard, 1990).

### III .7. Contraintes et limites de production

Les lentilles sont sensibles à l'aphanomyces : pour limiter les risques, il est important de conserver au moins 4 à 5 ans entre 2 fèves pures. Selon les agriculteurs bio experts en la matière de la Haute-Loire qui se sont entretenus avec le groupement, la période de

récupération optimale est d'environ 10 ans, mais gardez à l'esprit que cela est difficile à atteindre.

### ❖ **La gestion des adventices est « LE » point délicat de la culture**

Il est préférable de cultiver des lentilles sur des parcelles "propres" du point de vue des plantes adventices. Les solutions de désherbage sont alors limitées.

### ❖ **Carence en bore, les rendements pourraient être impactés**

D'après le retour du cultivateur expert, des expériences ont montré qu'une carence en bore peut réduire considérablement les rendements, et il est recommandé de procéder à une analyse du sol avant la plantation pour adapter la fertilisation.

### ❖ **La moisson, une affaire à ne pas prendre à la légère**

Bien que la récolte nécessite une récolte de céréales traditionnelle, elle nécessite quelques précautions. La moissonneuse doit être équipée de treuils bien ajustés et bien réglée. Il est nécessaire de prévenir votre prestataire à l'avance et d'être présent pour la saison des récoltes. Prévoyez du temps pour nettoyer la machine avant la récolte et après la récolte en aspirant ou en versant de la sciure.

### ❖ **La rapidité est de mise pour le pré-nettoyage**

Le pré-nettoyage après récolte est très important, il permet de séparer virtuellement les impuretés des lentilles afin de conserver les lentilles en bon état avant le tri complet. Cela peut être fait avec les mêmes outils que ceux utilisés pour trier/nettoyer le grain.

### ❖ **Que faire contre le bruche ?**

Le bruche est un coléoptère dont la plante est la lentille (et autres légumineuses). L'adulte émerge de la graine pendant le stockage. En AB, la principale méthode pour leur destruction est la congélation pendant 25 jours à -20°C, il existe aussi d'autres méthodes moins développées et plus coûteuses comme les systèmes à atmosphère contrôlée (article pratique.fnab.2020).

## **IV. Généralité sur rhizobium**

Les rhizobiums sont considérés comme des bactéries aérobies gram négatives fixatrices d'azote et vivent librement, se trouvent généralement dans le sol ou avec des légumineuses, et ont des formes de bâtonnets de 1,2 à 3 nanomètres de longueur et de 0,6 à 0,9 nanomètres de largeur et non sporulant (Jordan, 1984). Due à des flagelles polaires ou subpolaires ou 2 à 6 flagelles

péritriches ce sont des bactéries mobiles (Werner, 1992). Elles poussent de manière optimale à une température de 28°C et un pH compris entre 6 et 7 (Burton, 1985). Ils appartiennent à la sous-classe alpha des protéobactéries dans la grande classe des eubactéries (Maidak et al. 1994). Cependant, un grand nombre des rhizobiums non symbiotiques peuvent exister dans la rhizosphère des légumineuses ou dans le sol (Segovia et al, 1991 ; Sullivan et al, 1996).

Récemment, les rhizobiums ont également été identifiés comme endophytes de plusieurs plantes non légumineuses, notamment le maïs, le riz et le blé (Ueda et al, 1995 ; Engelhard et al. 2000).

### IV.1. Caractères généraux des rhizobia

Les rhizobiums constituent 0,1 à 8 % de la flore totale du sol, ce sont des coccobacilles ou bâtonnets réguliers, 0.6 à 0.8 µm de large sur 1 à 4 µm de long, aérobies strictes (Pelmont, 1993), Gram négatives et asporulés (Jordan, 1984 ; Bekkli, 1983), elles sont très actifs quand elles sont jeunes, grâce à la présence d'un seul flagelle polaire ou de 2 à 6 périflagellés (Bergey's, 1984).

Ces bactéries sont soit libres, soit symbiotiques, sous forme de bactéroïdes dix fois plus gros. Ils ont des formes X, Y et T (Dommergues et Mangenot, 1970).

Sur le milieu gélosé « YEM » (Vincent, 1970), ces bactéries forment des colonies de 2 à 4 mm de diamètre, blanches ou beiges, semi translucides ou opaques, circulaires, convexes, mucilagineuses et élevées, après 3 à 5 jours de culture.

Les rhizobia sont des bactéries mésophiles et leur température de croissance optimale est de 25-30°C. Certaines espèces peuvent pousser dans la plage de température de 40,5°C à 42°C, tel rhizobium *Meliloti* qui peut se développer à 42 °C (Affianha et Alexander, 1992). D'autres souches isolées de légumineuses ligneuses au Pakistan, au Kenya, et en Inde peuvent pousser à des températures comprises entre 44°C et 50°C (Zahran, 1999). Cependant, la température de croissance des rhizobiums varie selon les espèces et la zone d'isolement (Cacciari et al, 2003).

Si la majorité des rhizobia tolèrent des pH très bas (Vincent, 1977), comme le cas de *Bradyrhizobium japonicum* qui supporte des pH de l'ordre de 3.5 à 4 (Dommergues et Mangenot, 1970), d'autres favorisent la neutralité (Jordan, 1984). Ils existent des souches de *Rhizobium* qui peuvent développer à des pH alcalins allant jusqu'à 12 (Kulkarni et al, 2000). En raison de la période de génération, les rhizobiums sont divisés en deux groupes principaux:

- Rhizobium à croissance rapide; le temps de génération est de 2 à 4 heures et une turbidité évidente apparaît en milieu liquide après 2 à 3 jours. elles sont capables d'utiliser une variété de glucides (mais se développent généralement mieux avec du glucose, du mannitol et du saccharose) et produisent généralement de l'acide. (Sadowsky et al, 1983; Somasegaran et Hoben, 1985 ; Bala et al, 2004).
- Rhizobium à croissance lente, le temps de génération est de 6 à 7 heures, pour la production d'une turbidité modérée dans un milieu liquide elles nécessitent 3 à 5 jours.

Ce genre de rhizobia produit l'alcali malgré elle se croit sur une gamme moins large de sources de carbones (Sadowsky et al, 1983 ; Somasegaran et Hoben, 1985 ;Bala et al, 2004).

#### IV.2. Diversité taxonomique des rhizobiums

En 1888, Beijerinck isole la première bactérie à noduler les plantes légumineuses, initialement nommée *Bacillus radicicola*, puis renommée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Par les plantes hôtes sur lesquelles ils ont pu noduler, la taxonomie des rhizobiums a été fortement influencée (Fred et al., 1932). Dans une classification préliminaire des bactéries (Bergey et al, 1923), les rhizobiums ont été décrits comme des bactéries Gram-négatives, aérobies, non sporulées, le critère principal étant leur capacité de nodulation. Plus tard, deux groupes de rhizobiums ont été distingués en fonction des critères de leur vitesse de croissance (Jordan,1982): les *Rhizobium* à croissance rapide et les *Bradyrhizobium* à croissance lente.

Le premier variant biologique a été décrit par Jordanie en 1984 chez *R. leguminosarum*. Donc, les espèces *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. phaseoli* deviennent des biovars (ou des communautés symbiotiques comme proposé par Rogel et al. En 2011) d'une seule et même espèce *R. leguminosarum* (Ramírez-Bahena et al., 2008).

Actuellement, les rhizobiums sont divisés en 13 genres et 98 espèces symbiotiques (<http://www.rhizobiums.co.nz/taxonomy/rhizobiums.html>). Quatre genres de *Proteobacteria* constituent les principaux symbiotes de la plupart des légumineuses dans le monde : *Rhizobium* (Frank, 1889), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), (anciennement *Sinorhizobium*) (Chen et al., 1988 ; de Lajudie et al., 1994 ; Young, 2003), et *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997).

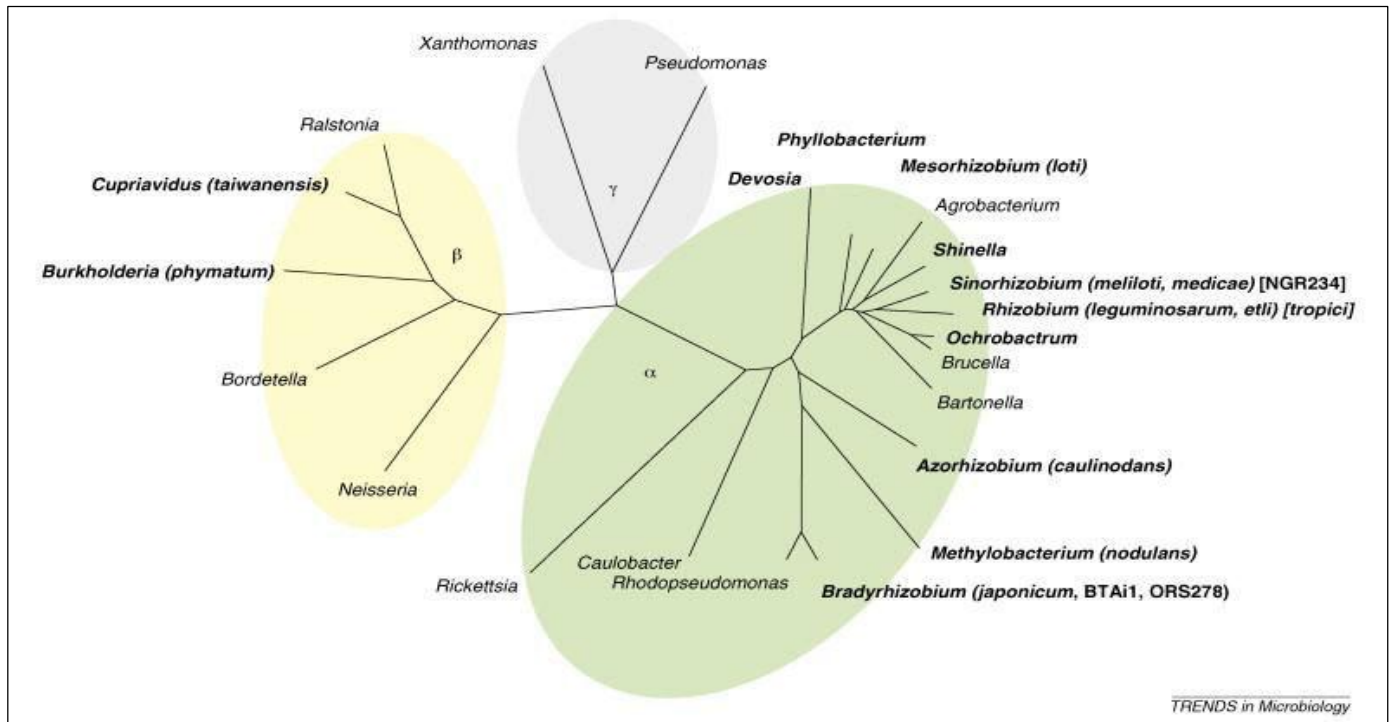
La taxonomie des rhizobiums est en constante évolution à mesure que la recherche s'étend aux légumineuses dans des régions jusqu'ici inexplorées (Afrique, Amérique du Sud, Chine... etc), et la taxonomie des rhizobiums peut subir d'autres révisions majeures en fonction de nouvelles découvertes. Des espèces de BNL courants jusqu'à aujourd'hui et répertoriés, sur les bases de données de séquences de l'ADN ribosomique 16S est regroupée en trois classe d'eubactéries ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  *Proteobacteria*), 4 ordres (*Rhizobiales*, *Burkholderiales*, *Rhodocyclales* et *Pseudomonadales*), 10 familles et 14 genres. (Figure 03)

- Chez les  $\alpha$  *Proteobacteria*, ordre des *Rhizobiales* *Rhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Methylobacteriaceae*, *Brucellaceae* et *Hyphomicrobiaceae*.
- Chez les  $\beta$  *Proteobacteria*, ordre des *Burkholderiales* – *Burkholderiaceae*, et ordre des *Rhodocyclales* – *Rhodocyclaceae*.
- Chez les  $\gamma$  *Proteobacteria*, ordre des *Pseudomonadales* – *Pseudomonadaceae*.

Ces BNL sont associés sur toutes les branches à des bactéries non fixatrices d'azote ou non symbiotiques telles que des bactéries pathogènes de végétaux, comme les *ex-Ralstonia* (= *Cupriavidus*), et les *ex-Agrobacterium* (= *Rhizobium*); des bactéries pathogènes des

mammifères comme *Burkholderia*, *Afipia*, ou *Brucella*; des bactéries photosynthétiques du genre *Rhodopseudomonas* ; et même des bactéries chimioautotrophes telles que *Xanthobacter* (OULED AMRAN.2012).

Cette taxonomie des rhizobiums est continuellement affinée et enrichie de nouvelles espèces et genres de bactéries chaque année grâce à l'exploration de la diversité des symbiotes associés aux légumineuses dans différentes parties du monde (Pascal Drouin. 1996).



**Figure 3 :** Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d'α, β et γ-protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin et *al.*, 2009).

### IV.3. Méthode d'étude de la caractérisation des rhizobiums

La diversité des rhizobiums peut être évaluée par différentes méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques.

#### IV.3.1. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques regroupent toutes les techniques qui n'utilisent pas des acides nucléiques et reposent sur l'utilisation de techniques standardisées pour déterminer les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries. Les critères morphologiques renseignent sur les caractéristiques des cellules bactériennes (forme, présence de flagelles, coloration de Gram, présence d'endospores) et l'aspect des colonies (taille, forme, couleur, état de surface) observés sur boîte de Pétri. Les principales méthodes biochimiques reposent sur la détermination des activités de différentes enzymes de certains groupes bactériens. L'étude des caractéristiques physiologiques impliquées dans l'identification bactérienne est basée sur la détermination du taux de croissance, de la capacité à utiliser différentes sources de carbone, de la croissance sous différents changements de température, de pH, de sel, d'antibiotiques et de métaux lourds. Ces analyses physiologiques sont influencées par des facteurs environnementaux. La caractérisation phénotypique classique est considérée comme une étape nécessaire dans la description et l'identification des souches d'une même espèce. Notamment, les taxonomistes bactériens stipulent que ces critères phénotypiques sont pris en compte lorsque les auteurs veulent nommer une nouvelle espèce (Riah.2014).

#### IV.3.2. Méthodes moléculaires

Ces méthodes reposent sur l'analyse de molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau du génome entier, soit en ciblant certains segments de chromosomes ou de plasmides bactériens. Les progrès de la connaissance de l'ADN bactérien ont permis des comparaisons sur des classifications plus strictes entre les bactéries. Si la classification des rhizobiums s'est longtemps basée sur leur capacité de nodulation et leurs caractéristiques morphologiques, alors le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, puis d'autres gènes dans le cadre des études MLSA, s'imposant progressivement comme critères de base pour la classification taxonomique et phylogénétique des rhizobiums, indépendamment de leurs traits phénotypiques ou symbiotiques, proposent des critères minimaux pour la validation de nouvelles espèces bactériennes basées sur des traits génotypiques (séquençage du gène ARNr16S, hybridation ADN-ADN, analyse RFLP... etc.) et description des caractéristiques morphologiques et symbiotiques ( Riah. 2014).

## V. Cycle de l'azote

Les différentes transformations que subit l'azote dans la biosphère sont appelées le cycle de l'azote (Figure 1). La plupart d'entre eux sont d'origine microbienne, et ils ont une importance agronomique considérable car ils contrôlent l'équilibre de l'azote dans le sol et fournissent aux plantes une forme minérale (Henin, 1981). Pour recycler efficacement les nutriments dans le cycle de l'azote, chaque composant du cycle doit agir à la fois comme un récepteur et comme une source (Van Diest, 1994).

Les principales étapes du cycle de l'azote sont la fixation, l'assimilation, l'ammonification, la nitrification et la dénitrification (figure 1).

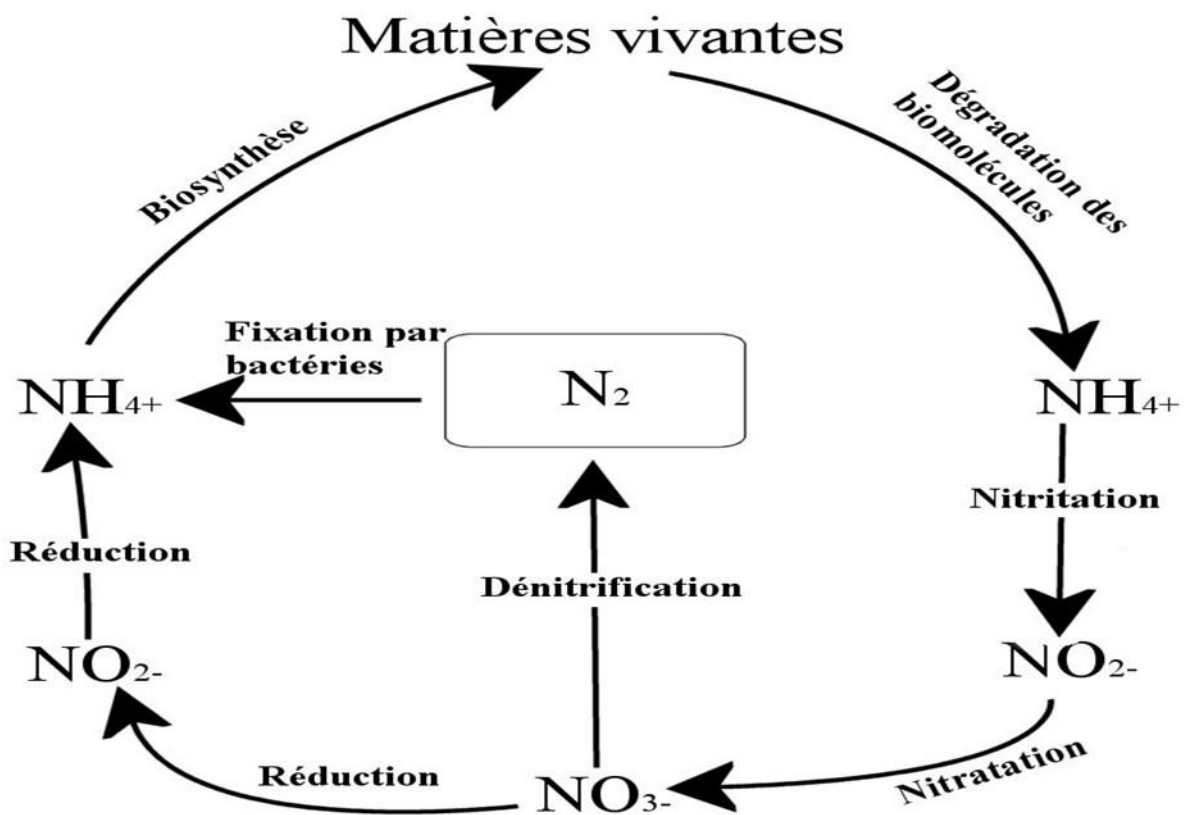


Figure 4: Les principales étapes du cycle de l'azote

([http://lionsfamily.chez-alice.fr/images/cycle\\_azote.jpg](http://lionsfamily.chez-alice.fr/images/cycle_azote.jpg))

### a. Ammonification

L'ammonium est la production d'ammoniac à travers une substance azotée organique par une réaction enzymatique. Même à faible concentration, c'est une substance toxique pour les plantes et il ne peut pas s'accumuler au niveau intracellulaire. L'ammonium absorbé est directement assimilé au niveau des racines. Lorsque  $\text{NH}_4^+$  est absorbé, des protons sont générés et doivent être libérés vers un milieu externe pour égaliser la charge. Les voies d'absorption de l'ammonium par les plantes comprennent une combinaison de glutamate synthase et de glutamine synthétase (Andrianarisoa Kasaina Sitraka2009).



### **b. Nitrification**

La nitrification est le processus d'oxydation des ions ammonium  $\text{NH}_4^+$  en nitrite  $\text{NO}_2^-$ , puis en nitrates,  $\text{NO}_3^-$ . La deuxième étape est très rapide. Le nitrite est faible dans le sol et la nitrification est considérée comme une voie directe de l'ammonium au nitrate. Ce processus est effectué par des bactéries aérobies du genre *Nitrosomonas* ou *Nitrobacter* (Paul et Clark, 1988). Ces micro-organismes fonctionnent mieux lorsque la température est comprise entre 30 et 36°C (Gouin, 1974), que le pH se situe entre 6,8 et 8, et que la teneur en eau permet une aération adéquate (Paul et Clark, 1988). Les ions nitrates sont très mobiles et faciles à dissoudre, ils sont donc facilement transférés vers la nappe phréatique. Ils peuvent aussi être captés par les plantes, dénitrifiés et moins immobilisés.

### **c. Dénitrification**

La dénitrification comprend toutes les réductions qui convertissent le nitrate  $\text{NO}_3^-$ , la forme d'azote la plus oxydative et thermodynamiquement stable que la forme gazeuse interne, elle passe par des formes intermédiaires telles que le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et les oxydes d'azote gazeux,  $\text{NO}$  et  $\text{N}_2\text{O}$  (Firestone et Davidson 1989). Ce processus est la base du cycle de l'azote car c'est le seul qui capable de restituer l'azote diatomique dans l'environnement. La dénitrification peut se produire par des processus biologiques ou chimiques. Lors de cette conversion, seule une petite quantité d'oxyde nitrique et de  $\text{NO}$  est libéré. Des conditions d'humidité élevée supportent sa réduction ultérieure (Firestone et Davidson 1989). La capacité potentielle de dénitrification du sol est généralement beaucoup plus élevée. L'activité in situ suggère que le potentiel des enzymes est rarement un facteur limitant pour ce processus microbien.

## **V.1. Fixation biologique de l'azote**

Du fait du réservoir atmosphérique ( $\text{N}_2$ ), les ressources en azote de la planète sont pratiquement illimitées. Cependant, en plus de l'eau, l'azote est le principal facteur limitant la croissance des plantes. Pour être utilisable par les plantes, l'azote doit être sous forme minérale ( $\text{NH}_4$  et  $\text{NO}_3$ ). Et cela peut passer par deux voies : la voie de biofixation et la voie industrielle de synthèse d'engrais azotés. Jusqu'au début du XXe siècle, la biofixation de  $\text{N}_2$  était la seule source d'azote lié sur notre planète, et aujourd'hui, à l'échelle mondiale, elle contribue environ 1,5 fois à celle des engrais. On estime qu'environ 195 millions de tonnes d'azote sont produites chaque année (Smil, V. 2002).

Dans le processus de la fixation biologique de l'azote (FBA), certaines bactéries transfèrent l'azote atmosphérique en gaz ammoniac. Dans la symbiose rhizobium-légumineuse, les bactéries rhizobium donnent à la plante l'azote fixe (N) qui est nécessaire pour sa croissance. Le FBA est une option à faible coût, ressource renouvelable pour les petits exploitants, et un investissement agricole très limité (Nairobi, Kenya, 2010).

### V.2. Fixateurs d'azote

#### V.2.1. Fixation libre d'azote

Représenté principalement par *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium* et *Rhodospirillum* (Mouafek, 2010). Ils se caractérisent par la formation de nouveaux organes racinaires, le nodule ou nodosité, envahis par des cellules spécifiques d'organismes microsymbiotiques fixateurs d'azote et piégés dans des structures membranaires d'origine végétale, formant des organes cellulaires propres aux symbioses rhizobia-légumineuses et Frankia-plant actinorhiziennes : le nodule (Djouadi, 2018).

#### V.2.2. Fixation symbiotique

Sont représentés par :

1. *Rhizobia*: l'un des groupes majeurs, le plus ancien connu, est associé aux légumineuses.
2. *Frankia*: bactéries filamenteuses sporulées (actinomycètes) associés aux arbres et arbustes tels que Frankia, l'aulne, Casuarina, et Milica (Rabah, 2009).

Le processus symbiotique entraîne le développement de nodules microbiens sur le système racinaire, appelé actinorhiziens ou actinorhizes. Dans ces structures, la plante hôte fournit à Frankia un substrat carboné, qui à son tour convertit l'azote atmosphérique en ammoniac, nécessaire à la croissance de la plante partenaire. Par rapport à la symbiose rhizobium-légumineuse, la symbiose des actinorhiziennes est moins étudiée, qui peut atteindre une fixation d'azote équivalente et jouer un rôle important au niveau écologique (Benabdoun et al, 2012).

### V.3. Azote dans la plante

Dans le sol, il est généralement établi que les bactéries fixatrices libres ne jouent qu'un rôle mineur. D'autre part, dans le contexte des plantes, la fixation de l'azote bénéficie directement de la photosynthèse des plantes, résultant en un système très efficace. Cette association forme des nodules, un nouvel organe normalement présent dans le système racinaire, où les bactéries se multiplient et décomposent l'azote de l'air. La plante hôte fournit aux bactéries une niche protectrice et de l'énergie, qui libère l'azote lié à la plante. Nous avons donc une symbiose, un lien d'intérêt mutuel (Cécile Revellin 2001)

## VI. Nodulation

### VI.1. Processus de nodulation

La formation des nodules et la fixation d'azote, L'établissement d'associations symbiotiques sont le résultat d'une série d'interactions entre les plantes et leurs hôtes bactériens contrôlés par des signaux moléculaires (Grama, 2008).

Un nodule racinaire est un organe produit par une plante hôte dans lequel les bactéries se différencient en bactéroïdes qui fixent l'azote atmosphérique. La nitrogénase est une enzyme qui est irréversiblement inactivée par l'oxygène. Pour une activité parfaite de la nitrogénase, Les nodules sont principalement basés sur les racines, mais peuvent parfois ressembler à des tiges (Selami, 2017)

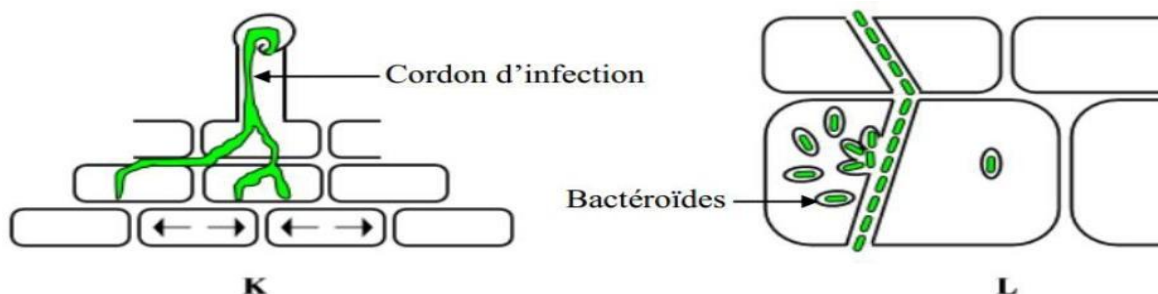
#### VI.1.1. Pré échange de signal

L'échange de signaux entre la plante hôte et les bactéries est la première étape du processus de nodulation. La reproduction bactérienne et la colonisation de la rhizosphère sont augmentées, en existence des racines de l'hôte. Dans un premier temps, il est apparu que l'attraction des bactéries vers les racines des plantes hôtes impliquait une chimiotaxie positive. Dans des conditions réductrices d'azote, les exsudats des racines des plantes contiennent une variété de substances, essentiellement des flavonoïdes, qui activent la transcription du gène Nod chez Rhizobia (Iskounen, 2012).

#### VI.1.2. Mode d'infection

L'infection implique la pénétration de rhizobiums dans différentes parties du système racinaire.

Une fois à l'intérieur des poils absorbants, les bactéries sont entourées de filaments d'infection. En conséquence, des méristèmes nodulaires se forment à la racine et les rhizobiums pénètrent à travers les filaments formés pour faciliter l'entrée des rhizobiums dans les couches plus profondes (Figure 4). Le filament (cordon) infecté continue son amélioration en se ramifiant et en déversant des bactéries dans les cellules du méristème nodulaire (Baba arbi, 2016)



**Figure 5 :** Ramification du cordon d'infection (Selami, 2017).

### VI.1.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Au niveau cortical, la division cellulaire conduit à la formation de primordium nodulaire en plus de la déformation du cordon infectieux chez certaines plantes (Cullimore et al, 2001). La ligne d'infection traverse la couche cellulaire jusqu'à le primordium nodulaire, où les bactéries sont libérées (Gage et Margolin, 2000). Le primordium se développe alors en nodule, tandis que les rhizobiums se différencient en Bactéroïdes, qui sont séparés du cytoplasme de la cellule végétale par la périmembrane bactérienne. Les unités fixatrices d'azote formées par la cellule, l'espace autour de la cellule et la membrane sont appelées symbiosome (Cermola et al., 2000). Les nodules allongés ou ronds sont deux types de nodules définis selon la localisation du système vasculaire (racine ou tige) et le degré de persistance du méristème ; en l'absence de méristème apical, la forme allongée (nodules non définis) est associée avec le maintien du méristème apical et de la rondeur (nodules bien définis) (Domergue, 2006). En fonction des conditions environnementales et de leur état physiologique, les plantes contrôlent le nombre et la qualité des nodules (Duhoux, 2004).

À l'intérieur du nodule, une protéine typique appelée légghémoglobine est formée par la globine synthétique de la plante et l'hème synthétique du rhizobium. La fonction de la légghémoglobine est de maintenir la pression d'oxygène à des niveaux suffisamment bas dans un environnement nitrogénase compatible avec la fixation de l'azote (Domergue, 2006).

### VI.2. Intérêt des bactéries nodulants

Les bactéries nodulants légumineuses existent dans la rhizosphère à l'état saprophyte et produisent une réponse chimiotactique positive aux exsudats des racines des plantes. En conséquence, la rhizosphère comprend des substances qui attirent les BNL, comme les acides aminés, les sucres, les acides dicarboxyliques..., les flavonoïdes sont aussi des composés plus spécifiques présents en faible concentration dans les exsudats racinaires des légumineuses. Le catabolisme de ces substrats permet aux BNL de multiplier tout autour des racines des plantes (Frédéric Zakida 2004).

En suivant le mécanisme complexe de reconnaissance entre les deux organismes, principalement par le dialogue moléculaire, les bactéries stimulent la formation d'un organe spécifique, le nodule, dans les racines des légumineuses, Il privilégie de l'intérieur la différenciation des bactéries intracellulaires en bactéroïdes capables de fixer l'azote de l'atmosphère en l'absorbant, via le complexe ammonium azote, et certaines légumineuses peuvent encore former des nodules sur les tiges, appelés nodules caulinaires. L'action et la progression de la symbiose sont soumises au contrôle génétique des deux partenaires. (Riah, 2014).

# **Matériels et méthodes**

### I. Objectif de l'essai

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de la faculté SNV/STU de l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana. Il porte sur l'identification des bactéries rhizosphériques chez la lentille dans la région Oued Smar wilaya d'Alger.

### II. Site d'échantillonnage

Les plantes de la lentille qui ont utilisées dans ces études sont récoltées de la station expérimentale de l'ITGC (Institut technique des grandes cultures) dans la région Oued Smar.

#### II.1. Localisation de l'essai

L'essai a été réalisé en plein champ au niveau de la Ferme de El-Harrach Alger, c'est une région algérienne, situé à environ 19 km à l'est d'Alger dans la daïra d'El Harrach, les coordonnées géographiques sont comme suit :

L'attitude: 36° 43' nord.

Longitude: 3° 8' est.



**Figure 6:** Localisation du site d'étude, Situation géographique de l'FDPS de l'ITGC de Oued Smar (Google Earth).

#### II.2. Caractéristiques climatiques

El Harrach possède un climat méditerranéen chaud avec été sec. Sur l'année, la température moyenne à El Harrach est de 19.7°C et les précipitations sont en moyenne de 672.3 mm.

Mois	Pluviométrie (mm)			Total mensuel 2019/2020 (mm)	Moyennes mensuelles 1989/2017 (mm)
	Décade 1	Décade 2	Décade 3		
<b>Septembre</b>	00	63.8	00	63.8	27.55
<b>Octobre</b>	04	00	13.2	17.2	54.39
<b>Novembre</b>	55	51	17	123	100.48
<b>Décembre</b>	00	4.9	00	4.9	92.08
<b>Janvier</b>	00	19.6	0.3	19.9	90.65
<b>Février</b>	00	00	00	00	76.68
<b>Mars</b>	19.2	9.2	55	83.4	52.74
<b>Avril</b>	20	55	28.4	103.4	53.83
<b>Mai</b>	34	00	00	34	42.74
<b>Juin</b>	4.1	00	00	4.1	5.82
<b>Total</b>				453.7	596.96

**Tableau 1:** Valeurs pluviométriques mensuelles de la campagne 2019/2020 enregistrées à Oued Smar Comparées à la moyenne de 89/2017.

### II.3. Analyses physico-chimiques du sol

sur des sols agricoles: on s'intéresse au pH, à la structure du sol, à sa granulométrie, ses capacités de rétention de l'eau et éventuellement aux ETM (éléments traces métalliques)...etc.

- **Analyse granulométrique**

L'analyse granulométrique du sol ou encore appelée analyse mécanique ou analyse physique consiste à classer les éléments du sol selon la taille du sol et à déterminer le pourcentage de chaque partie (sable, limon, argile) dont le but est de définir la texture d'un terrain.

- **Mesure de l'humidité**

L'humidité est une des données de base pour étudier et caractériser les régimes hydriques du sol. Ces données sont utilisées pour bien comprendre le phénomène des sols hydrologiques, mécaniques et chimiques et leur impact sur l'exploitation et le développement la croissance des plantes (ITA ,1975).

- **Mesure du pH**

Ajouter 20 g de terreau fin (séché à l'air) et 50 ml d'eau distillée (pour mesurer le pH de l'eau), agiter quelques minutes et laisser reposer 2 heures. Utilisez ensuite un pH-mètre pour mesurer le pH après une brève agitation (Afnor, N. 2005).

<b>Analyses</b>	<b>Eléments</b>	<b>Matériel et méthodes</b>
<b>Granulométrie</b>	Argile %	Pipette de Robinson
	Limons %	
	Sable %	
<b>Chimiques</b>	PH eau	PH mètre
	PH KCL	
	Conductivité électrique	Conductimètre
	Matière organique	La méthode d'Anne
	Carbone	
	Calcaire totale	Calcimètre de Bernard
	Calcaire réactif	Méthode de Drovinean
	Azote total	Méthode de Kjeldahl
	Phosphore assimilable	Méthode d'Olsen

**Tableau 2:** analyses physicochimiques du sol.

#### **II.4. Matériel végétal**

Dans notre étude nous avons utilisé deux pépinières ; chaque pépinière contient 6 génotypes de lentille.

#### **II.5. Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental utilisé est un bloc complètement aléatoire. Chaque bloc est structuré en 11 lignes (micro-parcelles élémentaires chaque génotype est représenté par une ligne de 1 m). Les micro-parcelles représentent les 6 génotypes. Chaque génotype a été répliqué une fois dans un bloc. La taille de la ligne est de 1.5 m de long et un écartement de 1m.



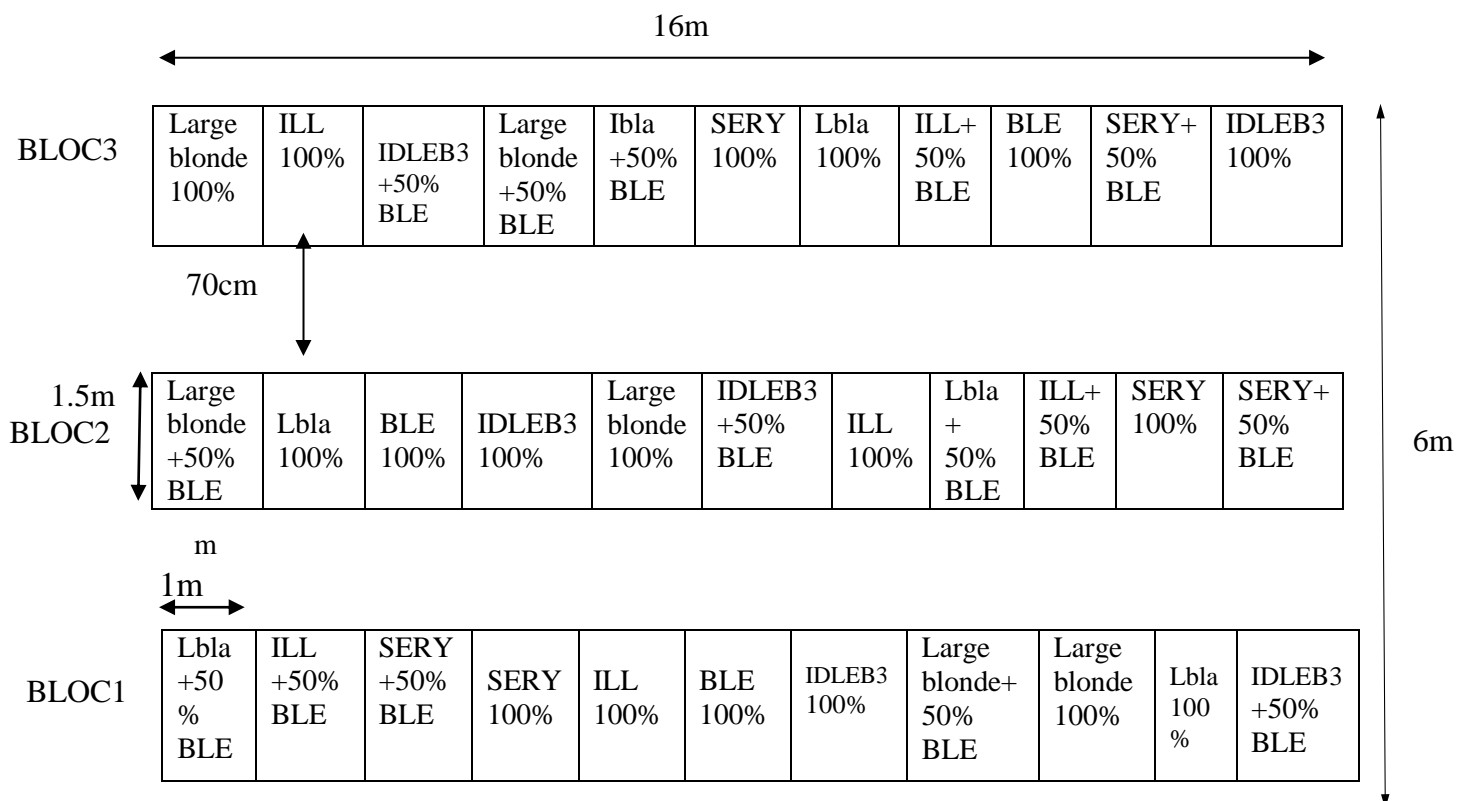


Figure 7: Dispositif expérimentale de l'essai.

### III. Isolément des bactéries à partir des nodules

#### III.1. Collecte des nodules

L'échantillonnage des plantes de lentille est réalisé le mois de mai 2022 la période des floraisons dont les nodules sont bien développées, visibles au niveau des racines et d'unecouleur rose à l'intérieure.

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent, (1970) et Somasegaran, et Hoben (1994).

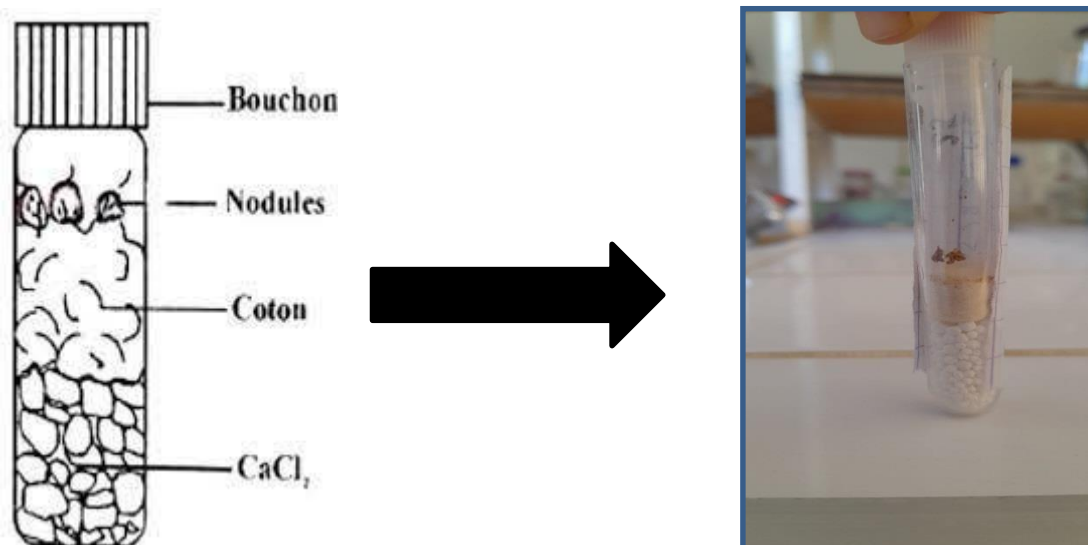
Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules et Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique.

### III.2. Conservation des nodules

Les racines avec des nodules sont rincées à l'eau courante pour éliminer les débris du sol. Les nodules sont tombés de la racine.

Pour un usage immédiat, les nodules frais peuvent être stockés dans le réfrigérateur à 4C° jusqu'à 48 heures.

Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (Vincent, 1970). Les nodules seront déposés sur une couche de coton dans un flacon contenant du  $\text{CaCl}_2$  (Figure 7).



**Figure 8:** techniques de conservation des nodules.

La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre, chacun est rempli au  $\frac{3}{4}$  de son volume, par du  $\text{CaCl}_2$  anhydre recouvert d'une couche de coton et identifié par une étiquette (fig. 7) de façon à mettre en évidence :

- Le nom de la légumineuse (genre et espèce).
- Le lieu du prélèvement.
- La date du prélèvement.

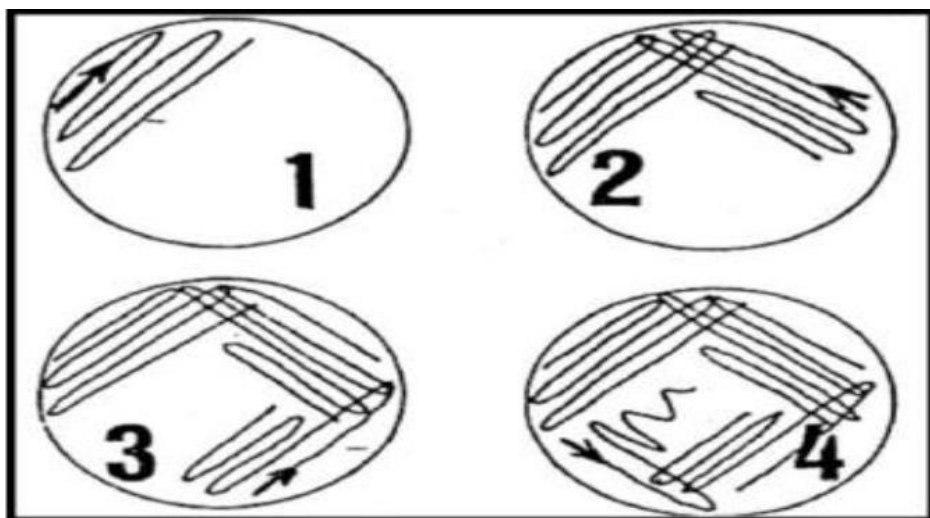
### III.3. Isolement, purification, et conservation des souches de rhizobia

Au laboratoire, les plantes sont récupérées et les parties aériennes retirées, les racines sont soigneusement lavées sous l'eau courante, des nodules de 2 mm sont coupés du site d'attache, puis séchés avec du papier absorbant (Benselama, 2015).

### III.4. Technique d'isolement et purification

La technique d'isolement est réalisée selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1985, 1994). Sous la hotte à flux laminaire, les nodules sont transférés dans un tube stérile et immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférés rapidement dans l'eau de Javel 3% pendant 3 minutes, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile pour limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes (Chabbi, 2010).

- A l'aide d'une pince stérilisée par flamage au bec Bunsen et immersion dans l'éthanol, on écrase les nodules dans une goutte d'eau distillée stérile dans des tubes Eppendorf, (Vincent, 1970).
- A l'aide d'une anse de platine, on prend une goutte de la suspension, et on l'étale sur une boîte de Pétri contenant le milieu YEM (Annexe1) (Somasegaran et Hoben ,1994).
- L'ensemencement est réalisé selon la technique des cadrans pour avoir des colonies bien isolées.
- Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C pendant 48 à 72 heures.



**Figure 9:** Ensemencement par la technique de quatre quadrants (Vincent, 1970).

### III.5. Conservation des isolats

Pour une conservation à courte durée les souches pures sont ensemencées sur milieux YEM incliné puis incubées à 28°C pendant 72 heures. Elles sont ensuite conservées à 4°C pour une période de 6 mois.

### IV. Caractérisation phénotypiques des souches isolées

### IV.1. Les caractères morphologiques

Les caractères morphologiques des souches sont mis en évidence à partir des colonies développées d'une culture de 24 à 72 heures à 28°C sur le milieu YMA. On s'intéresse à l'observation de la taille, la couleur, la forme et l'élévation des colonies.

Le milieu de culture doit contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries, pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants (Annexe 2) :

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

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

### IV.2. Test au bleu de bromothymol (BTB)

Chaque une des souches testées est mise en culture dans des boîtes de pétri contenant du milieu YEM gélosé additionné de bleu de bromothymol qui est un indicateur coloré de pH. Après cinq jours d'incubation à 28 °C.

- **Couleur jaune** : croissance rapide avec production des acides.
- **Couleur bleu** : croissance lente avec production d'alcalins.

### IV.3. Tolérance à la salinité

Pour tester la salinité de nos isolats, elles sont cultivées à 28°C pendant 72 heures sur le milieu YEM additionné à différentes concentrations de NaCl (100mM, 200mM, 300mM, 400mM, 600mM).

### IV.4. Tolérance au pH

La tolérance des souches bactériennes aux pH acides et alcalins est réalisée sur milieu YMA ajusté aux valeurs de pH variables 4.5, 6, jusqu'à pH 10. Les plaques inoculées ont été incubées à 28 °C pendant 72 heures.

## V. Caractérisation biochimique des souches isolées

Pour rechercher des enzymes qui jouent un rôle dans l'infection bactérienne des veines, nous avons effectué des tests chimiques.

### V.1. Examen microscopique

Dans notre étude, on a effectué la coloration de Gram. Cette technique est utilisée pour vérifier la pureté des bactéries et les classe en deux groupes principaux : les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives (Tortora., 2003).

Le protocole expérimental consiste à :

1. Préparer Un frottis sous la hotte à flux laminaire.
2. Recouvrir le frottis par un colorant basique le violet de Gentiane et laisser agir pendant 1 minute puis rincer avec l'eau.
3. Verser le lugol sur le frottis et laisser agir pendant 30 secondes puis rincer avec l'eau.
4. Laver à l'alcool-acétone pendant 15 secondes et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau courante.
5. Recouvrir le frottis par la Fushine et laisser agir durant 1 minute.
6. Laver à nouveau avec de l'eau, puis égoutter la lame sur du papier absorbant et enfin observer au microscope.

### V.2. Solubilisation du phosphate

Sur la surface des boîtes contiennent du milieu Pikovskaya (Annexe 4) en dépose en spot un volume 10  $\mu$ L de solution bactérienne.

Après incubation à 30°C pendant 7 jours, un halo de transparence apparaît autour des colonies ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates.

### V.3. Réduction des nitrates

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Annexe 3) (Beringer, 1974) contenant 0,1% de KNO<sub>3</sub> (p/v) pendant 2 jours avec agitation à 28°C.

Après incubation, on ajoute dans chaque tube le réactif nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique à 3% préparé dans l'acide acétique 5XM) et le réactif nitrate réductase 2 (anaphtylamine à 0,5% préparé dans l'acide acétique 5XM). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition de la poudre de zinc pour vérifier la présence de nitrate dans le milieu ou non, après quelques minutes, l'apparition d'une tinte rouge signifie la présence des ions nitrate dans le milieu donc le résultat est négatif. Si l'on n'observe pas une coloration rouge l'absence des ions nitrate dans le milieu indique un résultat positif. (Guiraud, 1998).

### V.4. Hydrolyse de l'urée (Somasegaran et Hoben, 1994)

Les souches isolées sont cultivées sur milieu YMA (annexe 1) contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol (indicateur de pH). Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min puis refroidi, à laquelle une solution d'urée stérile est ajoutée par filtration. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48 heures. Les résultats sont évalués par un changement de la coloration du milieu. La couleur rouge ou rose du fuchsia représente l'hydrolyse de l'urée et donc l'alcalinisation du milieu.

**VI. Les tests nutritionnels: utilisation de la source de carbone**

Les souches isolées ont été mis en culture sur le milieu YMA ou le mannitol est remplacé par 0.1% (w/v) des sucres (galactose, fructose, sorbitol, saccharose, lactose, maltose)

- Une boîte témoin est effectuée avec le mannitol.
- Incubation des boîtes à 28°C pendant 48 à 72 heures.

L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'évaluation de la croissance

(+ : il y a une pousse de colonie, - : pas de pousse de colonie).

# **Résultats et discussion**

## I. caractérisation phénotypique

### I. 1. Etude morphologique et culturelle

Nous avons étudié les caractéristiques morphologiques et culturelles des colonies poussant sur différents milieux sélectifs de croissance de Rhizobium pour l'identification des isolats de Lentille cultivée (*Lens culinaris*)

#### •Croissance sur milieu YMA

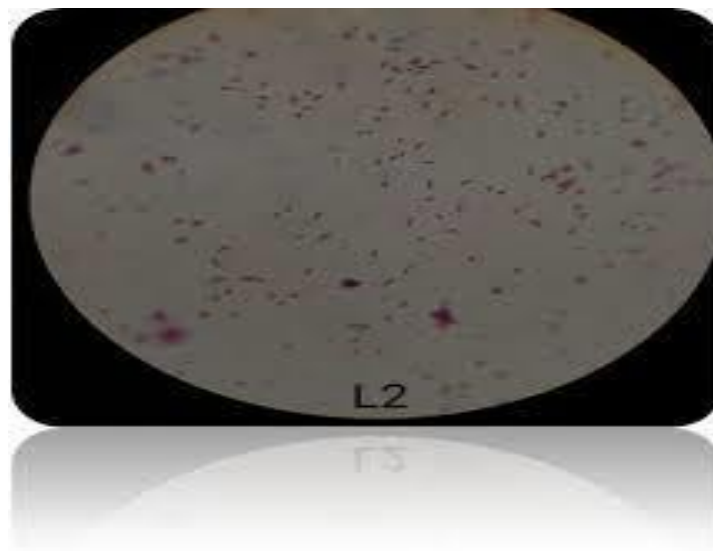
Sur le milieu YMA, les colonies sont visibles après 48h à 72h d'incubation, montrent que les nodules de cette dernière se présentent sous forme circulaire bombée à bords réguliers, de taille variable, ayant une couleur crème ou blanche, une texture semi-transparente, et une surface lisse et brillante.

#### •Croissance sur milieu YMA + bleu de bromothymol (YMA+BTB)

Après 48h d'incubation, on observe l'apparition des colonies vers la couleur jaune, qui indique la production d'acide par le bleu de bromothymol, c'est une caractéristique des bactéries à croissance rapide.

### I. 2. Etude microscopique

L'observation microscopique des isolats a permis d'observer des bâtonnets Gram négatif, Compatible avec la coloration de Gram des rhizobia (figure 8) (Vincent (1970).



**Figure 10:** Aspect microscopique des colonies

[https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdocplayer.fr%2F118952774-Isolement-et-caracterisation-des-bacteries-nodulant-la-lentille-lens-culinaris-cultivee-dans-la-region-d-ain-smara-a-constantine.html&psig=AOvVaw2-yDGPPswpDrTYpDUIM8VA&ust=1654424646337000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCMiGjJ\\_Kk\\_gCFQAAAAAdAAAAABAD](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdocplayer.fr%2F118952774-Isolement-et-caracterisation-des-bacteries-nodulant-la-lentille-lens-culinaris-cultivee-dans-la-region-d-ain-smara-a-constantine.html&psig=AOvVaw2-yDGPPswpDrTYpDUIM8VA&ust=1654424646337000&source=images&cd=vfe&ved=0CAwQjRxqFwoTCMiGjJ_Kk_gCFQAAAAAdAAAAABAD)



## II. Tests physiologiques

### II.1. Tolérance au NaCl

Ces résultats sont liés à ceux d'El essaoui et AbdelGhaffer (1967) qui ont sélectionné des souches de rhizobium Légumineuses cultivées dans un milieu contenant 5 % de NaCl. Les isolats tolèrent dans des concentrations de 1 % et 2 %, sauf pour l'isolat L11 qui n'est 1 % de NaCl est présent. Lindström et Lehtomäki (1988) ont rapporté que seulement 3 sur 13 souches de Rhizobium leguminosarum ont poussé à 2% de NaCl. Une Croissance faible à 3% et 5% a été observé et aucune croissance à 10%. Les résultats de l'étude du test de NaCl sont présentés dans le tableau 3.

[NaCl]	1%	2%	3%	5%	10%
<b>L1</b>	+++	+++	++	++	-
<b>L2</b>	+++	+++	++	++	-
<b>L4</b>	+++	+++	++	++	-
<b>L9</b>	+++	+++	++	++	-
<b>L11</b>	++	+	-	-	-

**Tableau 3:** Croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl

+++ : Très bonne croissance

++ : Bonne croissance

+ : Faible croissance

- : Absence de croissance

### II.2. Effet au pH

Tous les isolats peuvent pousser dans l'intervalle de pH de 5,5 à 11 avec une croissance optimale à pH = 6,8. Ceci confirme les résultats de Vincent (1970) et Jordan (1984). Pour une croissance optimale du pH des rhizobiums. On note un manque de croissance à pH = 4. Selon Graham et al. (1994) Il y a peu de rhizobiums qui poussent à pH 5. Dans Milieux alcalins avec des valeurs pH = 9 et pH = 11, on observe une tolérance chez tous les isolats. Il est remarqué que nos isolats ont des résistances différentes tolérance au pH, ce qui confirme l'observation donnée par Graham et al. (1994). Les résultats de l'étude de l'effet de pH sont présentés dans le tableau 4.

<b>pH</b>	<b>4</b>	<b>5.5</b>	<b>6.8</b>	<b>9</b>	<b>11</b>
<b>souches</b>					
<b>L1</b>	-	+++	+++	+++	+++
<b>L2</b>	-	+++	+++	+++	++
<b>L4</b>	-	++	+++	++	++
<b>L9</b>	-	++	+++	++	++
<b>L11</b>	-	++	+++	++	++

**Tableau 4:** Croissance des isolats à différents Ph

+++ : Très bonne croissance

++ : Bonne croissance

+ : Faible croissance

- : Absence de croissance

### **III. Tests biochimiques**

#### **III.1. Solubilisation du phosphate**

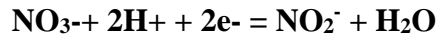
Une étude de la solubilisation du phosphate dans des isolats sélectionnés comme promoteurs de croissance des lentilles (B4 et B15), a montré la formation de halos clairs autour des colonies lors de l'inoculation sur milieu PVK et de l'incubation à 30°C pendant, 7 jours avec un indice de solubilisation de 2,8 et 3,6 respectivement (Bouras.2018).

Les résultats obtenus sont cohérents avec les travaux rapportés par Babana (2003) expliquant la libération des acides organiques du milieu solide utilisé. (Nautiyal ,1999 ; Babana, 2003 ; Komy, 2005).

La faible quantité de phosphate soluble produite par les isolats sélectionnés comme promoteurs de croissance pour les lentilles était principalement due à une déficience enzymatique. En effet, la disponibilité des formes solubles des phosphates dans le milieu favorise leur association avec les acides organiques libérés pour former des complexes organophosphorés difficilement dégradables par les bactéries (Ilmer et Schinner, 1995).

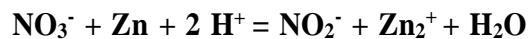
### III.2. Réduction des nitrates

La réduction des nitrates par la nitrate réductase conduit à la production de nitrites (La réaction suivante), qui montre une réaction rouge en présence d'acide sulfanilique "Nitrate I" et  $\alpha$ -naphthylamine "Nitrate II" en solution d'acide acétique concentré.



Une coloration rouge signale la présence de nitrites dans le milieu.

- Un réactif de transformation des nitrates en nitrites : le zinc en poudre (réducteur minéral)



### III.3. Hydrolyse de l'urée

Seules les souches L1 et L9 ont été transformées par La couleur du milieu urée indole vers le rose violet, c'est-à-dire elles présentent une activité uréase, ce qui indique une alcalinisation du milieu, en utilisant du rouge de phénol comme indicateur de pH. l'augmentation du pH de milieux suite à l'hydrolyse de l'urée par l'isolat, la couleur passe du rouge orangé au violet rosé. Ceci indique la dégradation de l'urée et Libération d'ions ammonium (Guirand, 1998). L'urée est catalysée par l'uréase, avec la production du dioxyde de carbone et de l'ammoniac. Par contre, L2, L4, L11 ne donnent aucun Le milieu est alcalinisé, ce qui indique que ces isolats n'ont pas d'activité uréolytique.

## IV. Les tests nutritionnels

### IV.1. Utilisation de la source de carbone

Tous les isolats ont montré une utilisation de disaccharides (lactose et saccharose) et de sucre alcool (mannitol) comme source de carbone pour favoriser la croissance. En revanche, les isolats ont montré de bons Croissance ou affaiblissement en présence de disaccharides (maltose) et de sorbitol. La plupart des bactéries ne peuvent pas se développer en présence de fructose (cétohexose). De nombreuses études ont été menées sur les modifications de la nutrition carbonée chez rhizobium (Graham, 1964 ; Zhang et al, 1991 ; Stowers et Eaglesham, 1984). Prouvé Les souches à croissance rapide favorisent les disaccharides (Stowers, 1985; van Rossum et al, 1995). Les résultats indiqués dans le tableau 1 montrent que les isolats différents dans leur aptitude à assimiler les différents sucres.

<b>sucre isolats</b>	<b>Saccharose</b>	<b>Sorbitol</b>	<b>Mannitol</b>	<b>Maltose</b>	<b>Lactose</b>	<b>Fructose</b>
<b>L1</b>	+++	++	+++	++	+++	-
<b>L2</b>	+++	++	+++	+	+++	-
<b>L4</b>	+++	++	+++	+	+++	-
<b>L9</b>	+++	++	+++	++	+++	-
<b>L11</b>	+++	++	+++	+	+++	-

**Tableau 5:** Croissance des souches en présence de différents sucres

+++ : Très bonne croissance

++ : Bonne croissance

+ : Faible croissance

- : Absence de croissance

# Conclusion

L'axe de notre recherche effectué l'isolement et la caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries nodulantes la lentille (*Lens culinaris*) cultivé dans la région de Oued Smar Alger, suit la méthode classique de Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994), relative à l'identification des bactéries appartenant au genre *Rhizobium*.

L'évaluation de la tolérance de ces souches aux différents facteurs abiotiques a été réalisée sur les deux milieux YMA, et bleu de Bromothymol.

Au terme de cette étude, on retiendra que :

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, à l'aspect des colonies apparues après environ 72 h d'incubation à 28°C et à l'examen microscopique nous ont permis de sélectionner des isolats, qui montrent les mêmes caractères du genre *Rhizobium*, à croissance rapide en fonction de la vitesse de croissance sur le milieu YMA.

Certains isolats tolèrent l'acidité, l'alcalinité, la salinité et les températures extrêmes. Plusieurs études ont démontré l'importance d'étudier la capacité des isolats à tolérer les contraintes environnementales.

L'évaluation de la tolérance de nos isolats aux facteurs de stress a présenté que ces isolats ont pu se développer dans une large gamme de pH allant de 5,5 à 11. La tolérance au sel a été prouvée Significatif à 1% et 2%.

La plupart de ces isolats sont pourvus aussi de lanitrate réductase et de l'uréase.

Les tests nutritionnels montrent que les isolats à utiliser plusieurs sucres comme source de carbone. Cependant, le degré varie selon la souche.

Les différentes études montrent que la population rhizobienne des isolats de lentille présente une diversité physiologique et symbiotique importante.

Certains des isolats ont présenté des pourcentages élevés d'efficacité de la fixation symbiotique de l'azote.

# **Références**

# **Bibliographiques**

**Anonyme1:**<https://www.google.dz/maps/place/Feraoun/@36.5653345,4.5987293,80553>  
consulté mai 2017.

**Articles pratiques.** Produire bio . fnab.2020/diversifier la rotation la lentille une legumineuse qui ne manque pas dinterets.

**Affianha T., Alexander D. 1992.** Difference among cowpea, Rhizobia intolerance to high temperature and dissication in soil. Appl. Environ. Microbiol., 43 : 435- 439 pp.

**Afnor N. (2005).** 10390. Qualité du sol Détermination du pH. AFNOR, Paris.

**Ait Abdallah. (2011).** Culture et cout de production des grandes cultures. 84.ISBN: 978-9961-881-18-7.

**Andrianarisoa Kasaina Sitraka 2009.** Thèse de doctorat : minéralisation de l'azote et nitrification dans les écosystèmes forestiers : effet du type de sol et de l'essence forestière, l'université Henri Poincare, Nancy I.

**Baba Arbi S. 2016.** Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse de Doctorat, Microbiologie Appliquée. Université Badji Mokhtar Annaba, p. 13, 33.

**Baudoin, T. 2001.** Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward a polyphasic approach using Nod factors and nod genes, in: Martinez-Romero E., Hernandez G. (Eds.), Highlights of Nitrogen fixation Research, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 295- 299

**Bekkli A. 1983.** Contribution à l'étude de quelques espèces de Luzerne et leurs symbiotes dans un environnement salé. DES biologie végétale. Oran Université d'Oran, 48 p.

**Bergey S.1984.** Manuel of systematic bacteriology. Vol. 1 (Ed) Noel, R., Krieg. Paris. 122 p.

**Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW, Huntoon FM. 1923.** Bergey's manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins, Baltimore.

**Benabdoun M., H. Gherbi A.djekoun1, D. Bogusz, C. Franche, N. Ykhlef .2012.** Fixation biologique de l'azote : la symbiose actinorhizienne casuarina-frankia 16 pp.15-19.

**Benselama Amel 2015.**Thèse doctorat Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureus* L. ex Sweet et études de son partenaire symbiotique Université D'Oran ES-SENIA.

**Brink M, Belay G. 2006.** Céréales et légumes secs, ressources végétales de l'Afrique tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P:102

**Burton, M., Elkan, G. (1985).** Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 37: 867- 870.



- Cacciari, I., Dimattia, E., Quatarni, P. 2003.** Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In, Grouzis M ; le Floc'h. Un arbre au désert, *Acacia raddiana*. IRD. Paris.183-200 pp.
- Carte d'identité** de lentille.2011.
- Calvet, 2003.** Le sol: propriétés et fonctions (Vol. 2). France Agricole Editions.
- Catherine Conan Diététicienne 2021.** La lentille : verte, brune, corail.passeportsanté.net/fr
- Cécile Revellin 2001.** Les symbioses fixatrices d'azote, UMR Agroécologie, Inra/Université de Bourgogne.
- Cermola M, Fedorova E, Tate R, Riccio A, Favre R et Patriarca EJ (2000).** Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium*metli-*Phaseolusvulgaris* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interaction*,13.pp. 733-41.
- Chabbi R. 2010.** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister, Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine, p. 7.
- Chahota RK, Kishore N, Dhiman KC, Sharma TR, Sharma SK. 2007.** Predicting
- Chang, Y., Wang, J.Y., Wang, E.T., Liu, H.C., Sui, X.H., Chen, W.X. (2011).** *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea* grown in Southern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Epub. Nov. 26, in press, doi:10.1099/ijs.0.027110-0.
- Chen WX, Yan GH, Li JL. 1988.** Numerical taxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 38: 392–397.
- Cullimore, J V, Ranjeva R et Bono J J. (2001).** Perception of lipochitoooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci*. 6.pp.24- 30.
- Denarié J, Debelle F, Prome JC. 1996.** *Rhizobium* lipo-chitoooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*. 65: 503–535.
- Djouadi, 2018.** Prévalence de la symbiose des rhizobia associés aux légumineuses d'Algérie. Thèse présenté pour l'obtention du grade de docteur en sciences biologique, écobiologie et amélioration végétal, université de la science et de la technologie houari boumedien , P 18.
- Dommergues, Y. Mangenot, F,1970.** Ecologie microbienne du sol .Masson et Cie, 2013.Microbacterium avec l'uranium. Th doctorat : Microbiologie : Université d'AixMarseille,. paris, pp9- 72(796).
- Domergue O. (2006).** Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'école pratique des hautes études. p78.

## Références bibliographiques

- Duhoux E et Nicole M. (2004).** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France. pp .1-20.
- Engelhard, S. K., van Berkum, P. B., et Oger, P. (2000).** Agrobacterium is a definable903.
- Firestone et Davidson 1989.** Microbial basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soils In : Exchange of trace gases between terrestrial Ecosystems and the atmosphere, MO.Andreae and D.S. Schimel Eds., J Wileys and Sons Ltd,Chichester, 7-21.
- Frédéric Zakida 2004.** These Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'université MONTPELLIER il diverste des bactéries hotes de légumineuses méditerranéennes en Tunisie et au Liban.
- Foster RC, Rovira AD ,1978.** The ultrastructure of the rhizosphere of Trifolium subterraneum L. In: Microbial ecology (MW Loutit, JAR Miles, eds) Springer-Verlag, Berlin, 278-290.
- Frank B. 1889.** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Bet Dtsch Bot Ges. 7: 332–346.
- Fred EB, Baldani JI, McCoy E. 1932.** Root nodule bacteria and legume plants. University of Wisconsin, USA.
- Gage D J and Margolin W. (2000).** Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia.Current Opinion in Microbiology3. 6. pp. 613-7.
- Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2010).** Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols (Vol. 14). PPUR Presses polytechniques.p 656.
- Gouin, 1974.** Influence de l'inondation d'un sol sur les bactéries telluriques actives dans le cycle de l'azote. Mémoire de maîtrise université du Québec, INRS-Eau S. te-Foy C, anada.1 63P.
- Gramma B S. (2008).** Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Constantine. , faculté des sciences de la nature et de la vie.93p.
- Guiraud JP. 1998.** Microbiologie alimentaire. Eds. Dunod. Paris. Renouveau Pédagogique Inc. Nb de pages 945.
- Hénin, S. (1981).** Le cycle d'azote, les problèmes de fertilisation et de pollution. C.R. des séances de l'Acad. D'Agr. de France.
- Iskounen T. 2012.** Isolement et caractérisation de bactéries nodulant les légumineuses Calycotome spinosa. Mémoire d'Ingénieur, Génie Biologique. Université de Bejaia, p. 3, 17.
- ITA. (1975).** Laboratoire Du sol : Méthodes D'analyses Physiques Et Chimiques Du Sol. Institut Technologique Agricole. Mostaganem : 78p.

**Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M. 1997.** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International journal of systematic bacteriology* . 47: 895–898.

**Jordan, D. C. 1982.** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov, a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 136-139.

**Jordan, D. 1984.** Family III. Rhizobiaceae, p. 234-242. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md.

**Jourmet, P., Graham, H., Allan, D. 2001.** Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. In *Nitrogen Fixation : From Molecules to Crop Productivity*. Pedrosa F.O., Hungria M. & Yates M.G. eds., Newton WE (Kluwer Academic Publishers), Dordrecht (The Netherlands), pp. 506-514.

**Kulkarni S., Surange S., Nautiyal C. S. 2000.** Crossing the limits of *Rhizobium* existence in extreme conditions. *Curr. Microbiol.* 41: 402-409 pp.

**Labdi M. (1991).** Perspectives de développement des légumineuses annuelles dans les systèmes céréaliers des zones semi-arides. *Céréaliculture*, 25: 12-20.

**Lavelle, P., & Spain, A. V. (2001).** *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, the Netherlands): 654 p.

**Lavelle et Spain 2001; Callot,G, Chamayou, H, Maertens, C. & Salsac, L. (1982).** Mieux comprendre les interactions sol-racine. Incidence sur la nutrition minerale. INRA, Paris: 325 p.

**Lemanceau, 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, EDP Sciences, 12 (6), pp.413-437.

**Lynch, J. M., & Leij, F. (1990).** *Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Ltd.

**Maidak, E., Wood, D. 1994.** Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* 21, 889-895.

**Malek, 2015.** Interaction microbienne cours assure aux Master II microbiologie et Magistère Maitrise de la qualaté et du développement microbien. Université de Tlemcen. P:17.

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

**Mouafek, 2010.** La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra .Mémoire de magister, Sciences Agronomiques , Université de Mohamed khider Biskra ,p 6 et 37.

## Références bibliographiques

**Nairobi, Kenya, 2010.** Fixation biologique de l'azote et entreprise de légumineuses à grains guide du Paysan Pilote pour N2AFRICA.

**Nassira Riah 2014.** Thèse doctorat. Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien le : 23/09/2014

**Oades, 1993.** The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil

**Ouled Amran S 2012.** USTHB thème magister Inventaire des légumineuses herbacées spontanées de la région d'El Goléa – Caractérisation symbiotique, phénotypique et génotypique des rhizobia associés.

**Ozdemir, S. (2002).** Grain legume crops (p.142). Hasad Publishing, Istanbul, Turkey.

**Pascal Drouin 1996.** Thèse doctorat à l'université Laval Québec .Caractérisation phénotypique et génotypique et étude des mécanismes d'adaptation aux basses températures de souches de *Rhizobium* isolées de *Lathyrus japonicus* et *Lathyrus pratensis*.

**Paul et Clark, 1988.** Soil microbiology and biochemistry. Academic Press and iego, C A. 273P .

**Pelmont.J. 1993.** Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques, Presses Universitaire de Grenoble, 899 p.

**Pinochet, J., Freire, I., Schrank, K. (2006).** Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Mircen Journal*.3 : 289-295.

**Rabah ,2009.** Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est Algérie. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister (École Doctorale), Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie, p 6.

**Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2008.** Revision of the taxonomic status of the Species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 58: 2484–2490.

**Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez Romero E. 2011.** Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*. 34: 96–104.

- Sadowsky M. J., Keyser H. H., Ben Bohlool B. 1983.** Biochemical Characterization of fast- and Slow- Growing Rhizobia That Nodulate Soybeans. *Int J Syst Bacteriol*: 716-722.
- Saskatchewan Pulse Growers. 2000.** Pulse production manual. Saskatchewan Pulse Growers, Saskatoon SK.
- Segovia, M., Wood, J. (1991).** Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.
- Sehari.N.2012.** Etude de l'effet du stress salin(NaCl) sur le comportement écophysologique d'une légumineuse cultivée « lens culinaris l » en sol bentonite. Mémoire de magister, physiologie végétale université d'Oran Es Senia.
- Sehirali, S. (1988).** Grain legume crops. Ankara University, Faculty of Agricultural Engineering, Ankara, Turkey 1089 (314), p. 435
- Selami N. 2017.** Associations Symbiotiques. Polycopie Du Cours, Biotechnologies. Université d'Oran Mohamed Boudiaf, pp. 11, 14, 20.
- Smil, V. (2002).** Biofixation and nitrogen in the biosphere and in global food production. In : Nitrogen fixation: global perspectives. T.M. Brogan et al. ed. CAB International, New York, 7-9.
- Somasegran P., Hoben H. G. 1985.** Methods in Legume Rhizobium Technology. United States Agency for International Development (USAID).
- Tami K., Mansouri, H. 2000.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.transgressive segregants in early generation using single seed descent method-derived.
- Tortora G.J; B.R Funk; C.L Case. 2003.** Introduction à la microbiologie.
- Ueda, P., Eardly, D . (1995).** Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae .The Rhizobiaceae .eds .Spaink H.P ., Kondorosi A., and Hooykaas P.J.J. Dorrcht Kluwer academics.
- Vandenberg,A.et Slinkard,A.E.1990.** Genetics of seed coats color and pattern in lentil. *Journal of Heredity*, (81): 484-488.
- Van Diest, A 1994.** Agricultural Sustainability and Soil Nutrient Cycling, With emphasis on Tropical Soils. International Society of Soil Science, 4b: 48-61.
- Vincent J.M. 1970.** A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook n°15. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Werner, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z., et Chen, W. X. 1992.** Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera Astragalus.

## Références bibliographiques

**Young JC, Hoogenraad N.J., Hartl F. U. 2003.** Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112(1):41-50.

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

**Zohary D. 1972.** The wild progenitor and the place of origin of the cultivated lentil *Lens*.

# **Annexes**

**Annexe 1**

Composition de milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l

<b>produit</b>	<b>Quantité pour un litre de milieu</b>
Agar	18g
Mannitol	10g
Extrait de levure	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
Glutamate de Na	0,5g
NaCl	1ml
CaCl <sub>2</sub>	1ml
FeCl <sub>3</sub>	1ml
MgSO <sub>4</sub>	10ml

Le pH ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20 min.

**Annexe 2**

Composition de milieu YMB (Yeast-Mannitol-Broth) en g/l (Vincent, 1970), Milieu de culture pour rhizobium

<b>Produit</b>	<b>Quantité pour un litre de milieu</b>
Mannitol	10g/l
Extrait de levure	0,5g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,2g/l
NaCl	0,1g/l
l'eau distillée	1l

Le pH ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20 min.

**Annexe 3**

Tryptone Yeast Agar (TY) (Beringer, 1974) en (g/l)

<b>produit</b>	<b>Quantité pour un litre de milieu</b>
Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,87g
Eau distillé	1000ml
pH	6,8 g

Autoclavage à 120c° pendant 20 min.



**Annexe 4**

Milieu Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya.1948) en (g/l)

<b>Produit</b>	<b>Quantité pour un litre de milieu</b>
Dglucose	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
NaCl	0.2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1
KCL	0.2
Extrait de levure	0.5
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.002
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.002
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5
Eau distillée	1000ml