

## Introduction

La biosphère est en éternel mouvement d'échange de matière entre ses différents réservoirs qui sont l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère, c'est ce qu'on appelle les cycles biogéochimiques. Dans ces cycles, les éléments sont en perpétuel déplacement, parmi ces éléments l'azote qui est le quatrième élément essentiel à la vie.

Durant son cycle, l'azote passe d'un état combiné à un état libre, d'un état minéral à un état organique... l'une de ses étapes est la fixation, c'est de loin l'étape la plus importante, elle est assurée par des procaryotes, certains assurent cette fonction à l'état libre, d'autres doivent entrer dans un état de symbiose avec des plantes.

En fait c'est l'état symbiotique qui nous intéresse le plus dans la mesure où cette symbiose est spécifique. En effet, la bactérie *Rhizobium* est capable d'établir des associations symbiotiques avec beaucoup de légumineuses et quelques espèces non légumineuses suite à l'établissement d'un langage moléculaire entre les deux partenaires. Le trait le plus important est leur capacité de former des nodules sur les racines dans lesquelles la fixation d'azote atmosphérique a lieu. Beijerinck (1888) fut le premier à découvrir cette association, c'est pour cela que certains le considèrent comme étant le père de l'écologie microbienne.

A partir de l'établissement de ce langage moléculaire, qui illustre la spécificité de l'hôte, il est indispensable d'aborder en premier les critères phénotypiques des bactéries isolées à partir des racines d'une légumineuse.

Dans nos expérimentations, la légumineuse étudiée est une espèce de trèfle, *Trifolium repens* L. Les bactéries isolées à partir des nodosités de cette légumineuse subissent une caractérisation phénotypique, particulièrement l'aspect morpho-cultural, physiologique, biochimique en appliquant les références d'auteurs souvent cités. Les isolats sont comparés avec des souches de références, issues du laboratoire, et appartenant à plusieurs genres de rhizobia. Cette comparaison apparaît notamment dans les critères suscités et particulièrement dans le profil électrophorétique des protéines cellulaires.

# **1. La fixation d'azote**

## **1.1. L'azote**

L'azote est un élément essentiel pour toutes les formes de vie qui existent sur terre. Chez les plantes, la concentration requise en azote pour une croissance optimale des plantes varie entre 2 et 5% sur une base de matière sèche (Parent, 1999). Il peut présenter jusqu'à 7% de cette matière et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif, comme en début de floraison. L'insuffisance ou la carence de cet élément se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (Tourte *et al.*, 2005).

La forme la plus répandue de l'azote est le N<sub>2</sub>, ou azote moléculaire, c'est un gaz inodore et incolore qui représente la plus grande partie de l'atmosphère, 78% en volume (Hopkins, 2003). Ce gaz est la principale source de l'azote utilisée par les plantes, mais paradoxalement, elles ne peuvent l'assimiler sous cette forme, seulement sous forme NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Bado, 2002), une transformation de l'azote atmosphérique en ammoniac est donc nécessaire, ce processus est appelé fixation d'azote (Tortora *et al.*, 2003).

## **1.2. La fixation d'azote**

Il existe deux processus naturels différents, permettent la transformation de l'azote gazeux en azote assimilable par les plantes (Hopkins, 2003) :

### **1.2.1 La fixation physique**

En temps d'orages, au voisinage des éclairs, les hautes températures et pressions engendrées permettent la formation d'oxydes d'azote qui retombent au sol avec la pluie.

### **1.2.2 La fixation biologique**

La fixation biologique de N<sub>2</sub> est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Les organismes assimilateurs de N<sub>2</sub> sont des

eubactéries et archaebactéries procaryotes réparties dans plus de 100 genres ; certains fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font au cours d'une symbiose (Pelmont, 2005).

La quantité totale d'azote fixé par les bactéries libres représente environ 50 millions de tonnes chaque année (Davet, 1996). Ces bactéries peuvent être aérobies (*Azotobacter*), anaérobies (*Clostridium*), aérobies facultatives (*Klebsiella*), des cyanobactéries (*Anabaena*) et même des méthanogènes (*Methanosarcina*). Elles peuvent habiter les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces, ainsi que le tube digestif de divers animaux (Hopkins, 2003 ; Pelmont, 2005).

La fixation d'azote par les bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996). Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte, et le partenaire bactérien le symbiote. La forme la plus connue d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte, des structures multicellulaires hypertrophiques nommées nodules (Hopkins, 2003). L'association symbiotique entre une plante et la bactérie à bénéfice réciproque donne lieu à une fixation d'azote. La plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qui intégrera les protéines végétales (Tortora *et al.*, 2003).

Dans les nodules des non-légumineuses, le symbiote est une bactérie filamenteuse (*Frankia*) qui fait partie du groupe des actinomycètes. Un petit nombre des associations symbiotiques qui ne provoque pas la formation de nodules ont été étudiés, comme l'association de la plante *Azolla* avec la cyanobactérie *Anabaena* (Hopkins, 2003).

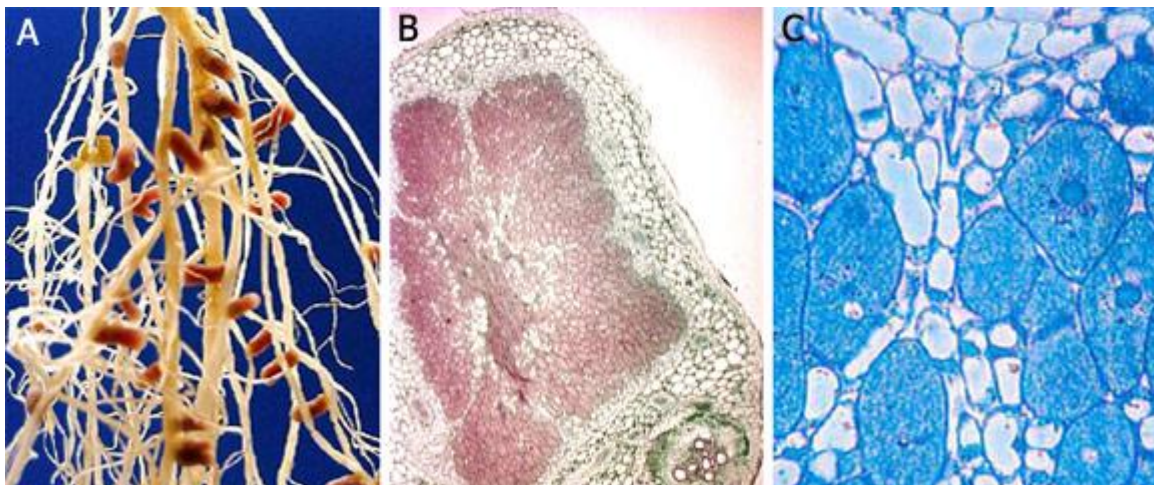
## **2. La symbiose *Rhizobium*-Légumineuse**

En 1838, l'agronome français J.B. Boussingault montra que les légumineuses peuvent assimiler l'azote de l'air. En 1887, Hellriegel et Wilfarth ont montré que la fixation de l'azote est associée avec la nodulation des racines des légumineuses. Cette fixation est liée à la présence de nodosités ou nodules sur leurs racines, qui n'apparaissent qu'après infestation par des bactéries isolées par le Hollandais Beijerinck en 1888, les rhizobia (Heller *et al.*, 1989).

*Rhizobium* est capable d'établir des associations symbiotiques avec beaucoup de légumineuses et quelques espèces non légumineuses. Le trait le plus important est leur capacité de former des nodules sur les racines dans lesquelles la fixation d'azote atmosphérique ( $N_2$ ) a lieu (Pelmont, 1995 ; Lindström *et al.*, 2002 ; Dénarié *et al.*, 2004).

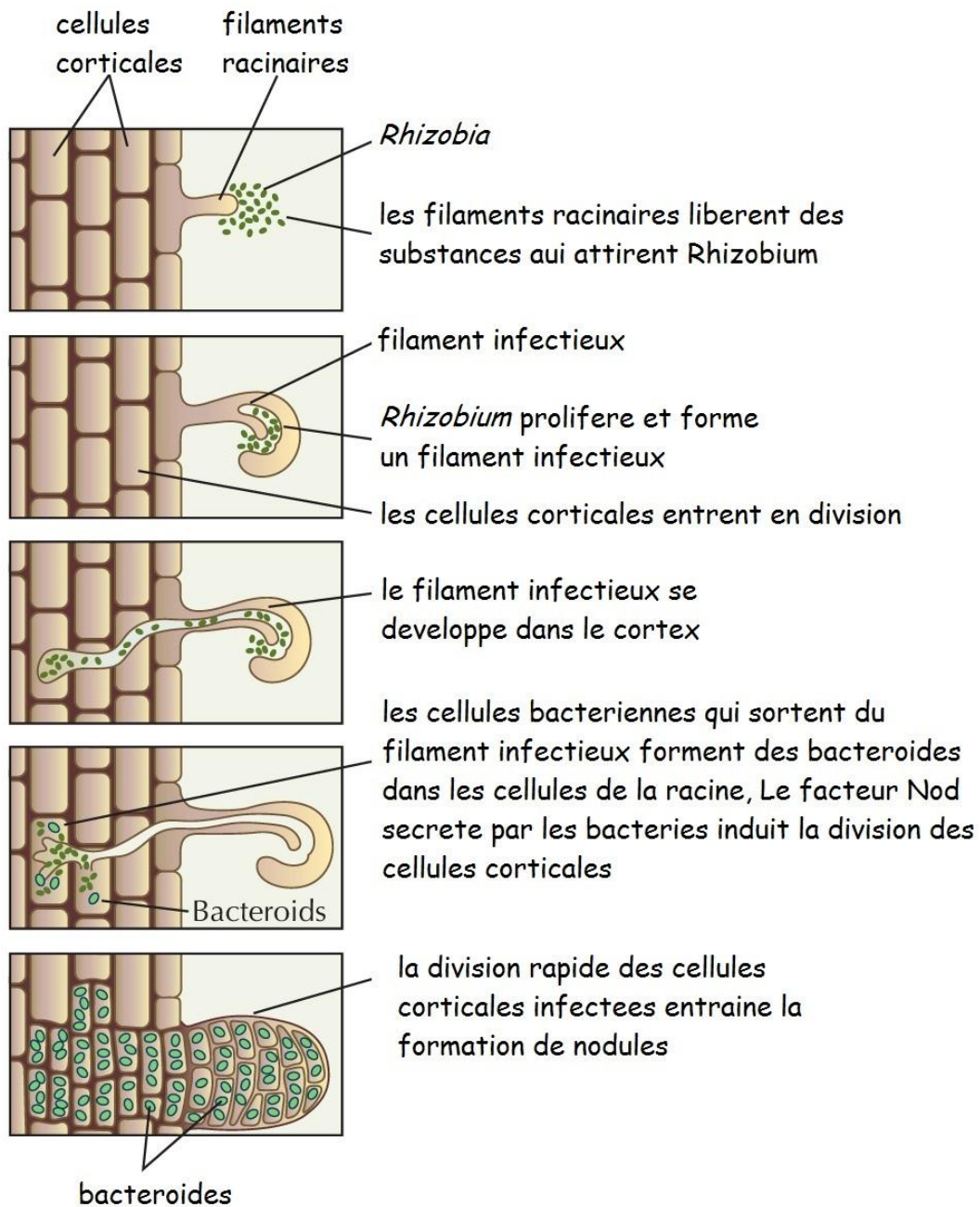
Cette symbiose est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite, mais aussi au *Rhizobium* pour obtenir les nutriments nécessaires à son développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven *et al.*, 2000).

Ces bactéries n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante ; cette assimilation du  $N_2$  est une propriété qu'elles n'acquièrent qu'à l'état de symbiote. L'association symbiotique est généralement très spécifique ; chaque souche n'infecte qu'une espèce de plante ou une gamme très limitée d'hôtes (Pelmont, 1995 ; Debellé *et al.*, 2001).



**Figure 01** - Nodosités des *Fabaceae* : **A** vue macroscopique, **B** coupe transversale partielle d'une nodosité, **C** détail d'un tissu nodulaire infecté par *Rhizobium*, les cellules touchées sont hypertrophiées (Plantes et botanique, 2014).

Le processus de nodulation commence par la pré-infection, lors de la reconnaissance entre les deux partenaires, suivie de l'infection de la racine par les bactéries et l'organogenèse du nodule, ces deux étapes sont quasiment simultanées (Patriarca *et al.*, 2004).



**Figure 02** - Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004).

## 2.1 Etape de pré-infection

La pré-infection est l'étape préliminaire de l'interaction plante-*Rhizobium*. Un système de signalisation entre les deux organismes permet à chacun d'eux non seulement de reconnaître la présence de l'autre mais aussi de déterminer si la bactérie est bien appropriée à l'espèce légumineuse (Raven *et al.*,2011).

Les racines de la légumineuse sécrètent une variété de composés, déterminant une chimiotaxie positive, tels que : les hydrates de carbone, les acides aminés, les acides organiques, les vitamines et les dérivés phénoliques, dont la plupart augmentent la croissance des microorganismes dans la rhizosphère (Pelmont ,1995 ; Terefework, 2002). Parmi ces composés, les flavonoïdes, qui sont produits surtout en condition de carence en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Patriarca *et al.*, 2004) sont importants dans la perspective symbiotique, car ils induisent les gènes *nod* contrôlant la synthèse des facteurs Nod, responsables de la spécificité et de la reconnaissance entre les symbiotes et le déclenchement de l'organogénèse nodulaire. Donc le développement nodulaire est programmé par la plante et déclenché par la bactérie (Terefework, 2002).

Les gènes *nod* codent pour les facteurs de nodulation (lipochitino-oligosaccharides) qui à leur tour induisent des événements précoces du procédé d'infection de la plante hôte, tel que des changements de l'épiderme de la racine, déformation et bordage des poils de la racine, et divisions des cellules dans le cortex de la racine et finalement le déclenchement du nodule primordial (Rasanen, 2002).

## 2.2 Le processus d'infection

Tout d'abord, les cellules bactériennes s'attachent aux poils absorbants de la plante hôte. C'est une étape hautement spécifique et irréversible. Deux substances sont essentielles pour la reconnaissance et l'adhésion (Gage, 2004) :

- des lectines, qui sont des protéines formées par la plante, se liant spécifiquement à des glucides particuliers sur le *Rhizobium* ;
- la rhicadhésine, qui est un polysaccharide de surface porté par les souches bactériennes.

Chez *R. leguminosarum*, cet attachement se déroule en deux étapes. D'abord, les bactéries se lient aux poils grâce à la rhicadhésine (Smit *et al.*, 1989). Ensuite, les fibrilles de cellulose synthétisées par les bactéries permettent de former un biofilm à l'extrémité des poils absorbants (Smit *et al.*, 1986 ; 1987). Après s'être fixées à l'extrémité des poils, les bactéries libèrent à leur tour des hormones (acides gibbéréllique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005), elles s'apprêtent alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induit une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (Bélangier, 1998). Cette interaction induit une déformation du poil absorbant à 360° appelée «crosse de berger». Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (Machrafi, 2001).

En réponse, le poil absorbant secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi, la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (Dupuy et Nougier, 2005). Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (Perry *et al.*, 2004).

Une fois que les parois des cellules de poils sont digérées, une structure tubulaire appelée le fil d'infection est formée. Elle se compose des cellules de la paroi nouvellement synthétisées qui seront un matériel entourant le Rhizobium. Le centre du tube est une glycoprotéine contenant quelques produits bactériens et quelques glycoprotéines de la plante hôte (Gage, 2004).

Les cellules bactériennes entrent dans le poil absorbant via ce fil d'infection, perdent leur membrane externe et changent de forme, tout en produisant une cytokinine (sorte d'hormone de croissance) (Pelmont, 2005).

### **2.3 L'organogenèse du nodule**

Les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme des cellules corticales, via le fil d'infection, provoquant ainsi l'apparition du méristème, qui est une zone de multiplication cellulaire dont l'activité est à l'origine de la formation du nodule, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes ou endosymbiose (Lindström *et al.*, 2002).

Une membrane péribactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004). Cette membrane protège la plante contre l'ammoniac produit et une pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote (Bélanger, 1998).

Les bactéroïdes ne sont pas épars dans le cytoplasme, mais enfermés dans des vésicules contenant un seul bactéroïde par vésicule chez le trèfle (Heller *et al.*, 1989).

Le nodule prend forme avec la multiplication des cellules du cortex. Il se charge de pigments appelés «leghémoglobine», synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Andriankaja, 2002). C'est la leghémoglobine qui donne la coloration rouge à la partie fixatrice d'azote. Cette couleur rouge est un critère de l'activité des nodules des légumineuses symbiotes (Tourte *et al.*, 2005).

Quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire, sont présentes dans le nodule ; ce sont les cellules qui survivront et se multiplieront dans le sol après la mort de la plante. Elles pourront alors infecter les racines des plantes situées dans le voisinage ou de celles qui se développent ultérieurement sur le même site (Perry *et al.*, 2004).

Après que les bactéroïdes aient cessé la division, ils produisent de la nitrogenase et développent la capacité de fixation de l' $N_2$  (Brewin *et al.*, 1992 ; Rasanen, 2002).

L'action de leghémoglobine est de maintenir l'oxygène à faible concentration dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote. (Rasanen, 2002 ; Simms et Taylor, 2002).

Les nodosités utilisent la majeure partie de l'ammonium produit par fixation symbiotique de l'azote pour synthétiser des acides aminés, qui passe ensuite dans le xylème pour se rendre dans le système caulinaire (Campbell et Reece, 2004).



### **3. Les partenaires de la symbiose**

#### **3.1. Le partenaire végétal**

##### **3.1.1. Présentation du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.)**

Le genre *Trifolium* comprend approximativement 240 espèces (Vizintin *et al.*, 2006). C'est une plante vivace de 10 à 40cm, glabre, gazonnante, aux feuilles souvent marbrées de blanc, nervées et denticulées tout autour, aux fleurs blanches de 15mm (Coste, 2011). Le nom du genre fait référence habituellement aux feuilles distinctives composées de trois folioles. La diffusion native du *Trifolium* inclut les régions tempérées et une étendue moindre dans les Hémisphères Nord et Sud ; les trèfles sont absents dans le sud-est d'Asie et en Australie. Les espèces de *Trifolium* survivent dans une large gamme d'habitats tels les prés, les prairies, les régions semi-désertiques, les montagnes et les sommets des Alpes. Une caractéristique commune de ces habitats divers est la haute radiation solaire ; peu d'espèces de trèfle tolèrent l'ombre (Ellison *et al.*, 2006).

Le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) est l'une des espèces les plus importantes sur le plan agronomique des 240 espèces du genre *Trifolium*. Ce dernier appartient à la tribu des Trifoliées de la sous-famille *Papilionoideae* de la famille des Fabacées (Williams, 1987).

Le trèfle blanc est originaire de la région méditerranéenne de l'Europe et a été étendu à travers l'Europe et l'Asie occidentale avec la migration des animaux. La domestication du trèfle blanc a eu lieu il y a 400 ans aux Pays-Bas et a migré avec les colons européens à différents continents sur lesquels il est maintenant considéré comme espèce autochtone (Lane *et al.*, 1997). Le trèfle blanc a tendance à naturaliser dans les régions tempérées du monde avec plus de 750 mm de précipitations annuelles (Jahufer *et al.*, 2001).



**Figure 03** – Feuilles et fleurs de *Trifolium repens* L. (ITIS, 2011).

Comme c'est le cas de toutes les légumineuses, l'intérêt agronomique du trèfle provient en premier lieu de son aptitude à la fixation symbiotique de l'azote grâce à la bactérie *Rhizobium trifolii* (Crush, 1987). Au total un champ de trèfle fixe entre 50 et 100Kg d'azote par hectare et par an (Frontier *et al.*, 2004). Le trèfle joue un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles. Utilisé en rotation ou en association dans les systèmes de culture, le trèfle apporte une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système (Babo, 2002).

Cette fixation permet également de produire en abondance des protéines végétales, ce qui constitue une source très importante dans l'alimentation animale (Baudoin, 2001), c'est pour cette raison que le trèfle blanc est utilisé comme fourrage. Il est très important dans l'industrie laitière, ainsi que dans l'industrie de la viande et de la laine, il améliore sensiblement le rendement de ces produits (Ayres *et al.*, 2000).

### 3.1.2. Classification du trèfle blanc (ITIS, 2011)

<b><u>Règne :</u></b>	<i>Plantae</i>
<b><u>Sous-règne :</u></b>	<i>Viridaeplantae</i>
<b><u>Infrarègne :</u></b>	<i>Streptophyta</i>
<b><u>Division :</u></b>	<i>Tracheophyta</i>
<b><u>Sous-division :</u></b>	<i>Spermatophytina</i>
<b><u>Infradivision :</u></b>	<i>Angiospermae</i>
<b><u>Classe :</u></b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b><u>Super-ordre :</u></b>	<i>Rosanae</i>
<b><u>Ordre :</u></b>	<i>Fabales</i>
<b><u>Famille :</u></b>	<i>Fabaceae</i>
<b><u>Genre :</u></b>	<i>Trifolium L.</i>
<b><u>Espèce :</u></b>	<i>Trifolium repens L.</i>

## 3.2. Le partenaire bactérien

### 3.2.1. Principaux caractères des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatives. Elles apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9µm de largeur sur 1,2 à 3,0µm de longueur (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobia à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2 à 6 flagelles péritriches, ceux à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision des Alpha-Proteobacteria (Zakhia et de Lajudie, 2001; Laranjo *et al.*, 2002).

Les rhizobia peuvent exister sous deux formes :

- une forme végétative (non bactéroïde), des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes ;
- une forme bactéroïde : à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry *et al.*, 2004). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

Sur la base de la matière sèche, les cellules des rhizobia contiennent 52 à 55% de carbone et 4 à 5% d'azote (Allen et Allen, 1950).

*Rhizobium* est un micro-organisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6,0 et 7,0 plus exactement 6,8 ; mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25 et 30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le Yeast Mannitol Agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture des rhizobia (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

Il est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

Les espèces de *Rhizobium* en culture ont besoin d'un milieu qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les rhizobia sont des bactéries chimioorganotrophes ; elles utilisent des hydrates de carbone relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés.

Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994). Elles n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammonical ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).



**Figure 04** - Morphologie de *Rhizobium trifolii* (Dazzo, 1995).



**Figure 05** - *Rhizobium leguminosarum* sous microscope électronique à balayage (Psmicrographs, 2010).

La classification du genre *Rhizobium* est la suivante : (George *et al.*, 2005)

<u>Règne</u> :	<u><i>Bacteria</i></u>
<u>Embranchement</u> :	<u><i>Proteobacteria</i></u>
<u>Classe</u> :	<u><i>Alpha Proteobacteria</i></u>
<u>Ordre</u> :	<u><i>Rhizobiales</i></u>
<u>Famille</u> :	<u><i>Rhizobiaceae</i></u>
<u>Genre</u> :	<u><i>Rhizobium</i></u>

### **3.2.2. La taxonomie bactérienne**

Depuis la découverte du monde microbien, le souci des microbiologistes a toujours été d'identifier, de classer et de nommer chaque nouveau microorganisme qu'ils découvraient, c'est ce qu'on appelle la taxonomie.

Il y a un siècle, cette discipline ne pouvait reposer que sur des critères phénotypiques restreints tels l'aspect microscopique, les caractères culturels, etc., ces critères étaient insuffisants pour différencier certaines espèces et étaient par conséquent insatisfaisants (Janssen, 2006). De nos jours, avec l'avancée des techniques génotypiques et moléculaires, une nouvelle approche est née, celle de la taxonomie polyphasique, celle-ci englobe les techniques modernes, allant chercher l'information à différents niveaux de la cellule bactérienne (protéines, ADN, etc.), sans pour autant négliger les techniques classiques (phénotypiques) qui constituent la base pour la description formelle des taxa (Young *et al.*, 2003 ; Vandamme *et al.*, 1996).

#### **3.2.2.1. Méthodes phénotypiques**

Les méthodes phénotypiques englobent les caractéristiques morphologiques (cellulaires et coloniales), physiologiques (conditions de croissance) et biochimiques (enzymes, métabolisme, etc.) des bactéries (Vandamme *et al.*, 1996), elles ne sont pas directement basées sur l'ADN ou l'ARN.

La taxonomie phénotypique aborde essentiellement :

- **La composition des parois cellulaires**

En plus de la coloration de Gram qui permet de distinguer les bactéries sur la base de la composition de la paroi cellulaire et de sa perméabilité, il existe d'autres techniques pour analyser les différents polymères de la paroi telle que les acides téichoïques qui peuvent être facilement extraits et purifiés par la chromatographie gaz-liquide (Benguedouar, 2000).

Cette approche est plutôt utilisée pour les bactéries à Gram positif, car la composition de leur paroi contient une variabilité d'éléments informatifs (Schleifer et Kandler, 1972). Toutefois, les LPS (lipopolysaccharides), composants principales de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, peuvent également être analysés par des techniques d'électrophorèse et des techniques immunologiques (Yang et Lin, 1998).

- **FAME (« fatty acid methyl ester ») ou analyse des acides gras cellulaires**

La technique FAME a été introduite pour la caractérisation des B.N.L. par Jarvis et Tighe (1994). Elle consiste à extraire les acides gras totaux de la cellule bactérienne afin d'en obtenir des profils qui sont caractéristiques de la souche étudiée. Cependant, cette méthode doit procéder à une standardisation du milieu et des conditions de culture, car la composition d'acides gras dans les cellules varie en fonction des changements de conditions environnementales (variabilité de longueur de leur squelette lipidique et de la position de la double liaison) (Jones et Krieg, 1984; Suzuki *et al.*, 1993).

Cette technique a un pouvoir résolutif qui peut aller jusqu'à la séparation des différentes espèces de B.N.L. (les espèces de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Agrobacterium*) sauf pour *R. etli* et *R. leguminosarum* (Jarvis *et al.*, 1996).

- **SDS–PAGE (« sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis ») des protéines cellulaires totales**

La méthode SDS–PAGE consiste en l'extraction des protéines cellulaires totales que l'on fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. On obtient ainsi des profils caractéristiques de chaque souche bactérienne.

Le profil électrophorétique d'une souche donnée est le reflet du bagage génétique du microorganisme, et sa comparaison avec les profils d'autres bactéries permet de mesurer le degré de parenté avec ces microorganismes.

Roberts *et al.* (1980) ont utilisé cette technique afin d'étudier la diversité des B.N.L., depuis, son application a été très importante dans leur taxonomie.

- **MLEE (multilocus enzyme electrophoresis)**

La discrimination entre les isolats se fait sur la base de variations de la mobilité électrophorétique de certaines enzymes bactériennes. Au cours de l'analyse par MLEE, les enzymes bactériennes sont extraites et chargées sur gel d'amidon (qui permet un meilleur découpage des bandes que le gel de polyacrylamide). Les bandes sont ensuite mises dans des solutions pour révéler la présence ou l'absence d'une enzyme. Dans le cas où l'enzyme est présente, sa mobilité est comparée pour les différents isolats.

Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique pour l'étude de la diversité des B.N.L. : *R. leguminosarum* a été étudié en utilisant cette technique par Pinero *et al.* (1988) et Demezas *et al.* (1995).

Outre les techniques phénotypiques qu'on a citées, il en existe d'autres, comme la sérologie, la pyrolyse, le séquençage des acides aminés, etc. Cependant, ces techniques restent jusqu'à présent peu utilisées dans la caractérisation des B.N.L.



Les données phénotypiques sont les premières à analyser au moyen de la comparaison numérique assistée par l'ordinateur. La taxonomie numérique permet la comparaison d'un grand nombre de caractères phénotypiques pour un grand nombre de souches.

Les matrices des données montrant le degré de similitude entre chaque paire de souches et l'analyse des clusters ayant pour résultat des dendrogrammes, ont indiqué une image générale de la consistance phénotypique d'un groupe particulier de souches. En effet, cette analyse d'un grand nombre de caractéristiques phénotypiques est taxonomiquement significative (Vandamme *et al.*, 1996).

### **3.2.2.2. Méthodes génotypiques**

Il s'agit de techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Elles sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne.

Actuellement les techniques génotypiques les plus couramment utilisées par les microbiologistes sont :

- **Détermination du pourcentage en guanine + cytosine (% G + C)**

Le premier élément des acides nucléiques à avoir été utilisé en taxonomie est le pourcentage (mol %) de bases guanine et cytosine (Johnson, 1984). Les valeurs de ce pourcentage d'une souche à une autre au sein d'une même espèce ne doivent pas présenter une variation supérieure à 3%. Les valeurs de ce pourcentage des espèces d'un genre donné ne doivent pas présenter une variation supérieure à 10% (Stackebrandt et Liesack, 1993).

- **L'hybridation ADN/ADN**

La valeur d'hybridation entre les ADN totaux de deux souches est un indicateur de la similarité des séquences entre génomes entiers (De Ley *et al.*, 1970 ; Grimont *et al.*, 1980).

En pratique, cette valeur est exprimée sous forme d'un pourcentage d'hybridation ADN /ADN et de la stabilité thermique de l'hybride. Couramment, des souches appartiennent à une même

espèce bactérienne lorsqu'elles présentent une valeur d'hybridation supérieure ou égale à 70% et une stabilité de l'hybride de 5°C ou moins (Stackebrandt et Goebel, 1994).

- **Le profil plasmidique**

La caractérisation plasmidique consiste à déterminer le nombre et la taille des plasmides dans une cellule bactérienne. Cette méthode a été utilisée pour caractériser des souches bactériennes entre elles. Elle a été appliquée très tôt à l'étude des rhizobia. Ainsi, Nuti *et al.* (1977) ont été les premiers à prouver la présence de plasmides de grande taille dans plusieurs espèces de *Rhizobium* tout en donnant une estimation de la masse moléculaire de ces plasmides (Dénarié *et al.*, 1981).

- **Le séquençage de l'ADNr 16S et d'autres gènes**

Les ARN ribosomiques (5S, 16S et 23S) constituent un outil de choix pour étudier les relations phylogénétiques grâce à sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que des parties à séquences variables (Woese, 1987 ; Schleifer et Ludwig, 1989; Stackebrandt et Goebel, 1994). Le développement de nouvelles techniques moléculaires a permis aux microbiologistes de faire l'étude comparative des molécules d'ARNr.

Ces marqueurs biologiques de l'identité ont servi de pilier à la classification taxonomique des microorganismes jusqu'à ce jour, et par conséquent à la description des communautés bactériennes de l'environnement. Sur cette base, le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Ludwig et Klenk, 2001) définit les groupes taxonomiques selon 7 niveaux principaux : Domaine, Phylum, Classe, Ordre, Famille, Genre, Espèce.

- **La technique PFGE ( pulsed-field gel electrophoresis )**

La technique PFGE (Corich *et al.*, 1991) est l'analyse de génomes par électrophorèse en champs pulsés après hydrolyse par des enzymes de restriction qui coupent peu (ce qui va générer de grands fragments). Elle permet la séparation de fragments de génomes bactériens en vue d'une détermination de leur taille mais aussi en vue de typage d'isolats bactériens.

La PFGE a été utilisée pour la différenciation entre les souches d'une même population de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (Corich *et al.*, 1991) et entre les souches nodulant différents arbres légumineux originaires du Soudan (Haukka et Lindström, 1994).

- **La méthode LMW (low molecular weight) RNA « staircase electrophoresis »**

La méthode LMW a été décrite par Höfle (1988) et améliorée par Velázquez *et al.* (1998). Les molécules d'ARN de faible poids sont extraites, et comprennent trois classes : l'ARNr 5S et les classes 1 et 2 d'ARNt. La séparation de ces molécules par électrophorèse à gradient de voltage croissant (augmentation de 50V chaque 10min, de 100 à 2300V) sur gel de polyacrylamide résulte en des profils caractéristiques de chaque souche étudiée (Cruz-Sanchez *et al.*, 1997). Velázquez *et al.* (1998) décrivent cette technique comme une technique de typage rapide des B.N.L.

Velázquez *et al.* (2001) ont caractérisé avec cette technique des isolats de nodules de *Phaseolus vulgaris*, ils ont trouvé qu'elle est plus discriminante que les séquences de l'ADNr 16S quand il s'agissait de biovar de *Rhizobium leguminosarum*.

### **3.2.3. Taxonomie des rhizobia**

L'histoire des rhizobia commence au XIX<sup>ème</sup> siècle, quand Beijerinck (1888) et Frank (1889) regroupent toutes les bactéries isolées de nodosités de racines de légumineuses dans un seul et unique genre : le *Rhizobium*.

Elles ont ensuite été caractérisées par leur vitesse de croissance, les souches à croissance rapide et à production acide sur le milieu YMA du genre *Rhizobium* sont différenciées des souches à croissance lente ainsi qu'à production alcaline sur le milieu YMA du genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984).

Plus tard, les rhizobia seront subdivisés en 4 genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988) récemment renommé *Ensifer* (Young, 2003) et *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988).

En 1997, le genre *Mesorhizobium* a été additionné (Jarvis *et al.*, 1997). Et en 1998 le genre *Allorhizobium* a été décrit incluant l'unique espèce *A. undicola* (de Lajudie *et al.*, 1998) Mais récemment cette espèce est renommée *R. undicola* (Young, 2003) .

Zakhia *et al.*, (2004) a proposé le terme B.N.L. (Bactéries Nodulant les Légumineuses) pour éviter toute confusion entre le terme général de *Rhizobium* et le nom du genre et pour désigner l'ensemble des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques capables d'entrer en symbiose avec les légumineuses .

Depuis, l'application des techniques de la taxonomie polyphasique, et notamment l'utilisation de l'ADNr 16S comme marqueur taxonomique, la classification des B.N.L. s'enrichit chaque année de plusieurs espèces, au fur et à mesure de l'exploitation de la diversité des bactéries symbiotiques associées aux légumineuses (Zakhia et de Lajudie, 2001) (Tableau 1).

Actuellement, le groupe des rhizobia ou bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) compte près de 13 genres et 98 espèces, respectivement décrites dans 30 espèces bactériennes du genre *Rhizobium* , 21 espèces bactériennes du genre *Mesorhizobium* , 17 espèces du genre *Ensifer* , 9 espèces du genre *Bradyrhizobium* , 7 espèces du genre *Burkholderia* , 3 espèces du genre *Phyllobacterium* , 3 espèces du genre *Microvirga* , 2 espèces du genre *Azorhizobium* , 2 espèces du genre *Ochrobactrum* , 1 espèce du genre *Cupriavidus* , 1 espèce du genre *Methylobacterium*, 1 espèce du genre *Devosia* et 1 espèce du genre *Shinella* (Weir, 2013).

Les genres appartenant à la classe des  $\alpha$ -Proteobactéries sont représentés actuellement dans les genres suivants : *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988 ; de Lajudie *et al.*, 1998), *Ensifer* (Young *et al.*, 2003), *Rhizobium* (Franck, 1889), *Methylobacterium* (Patt *et al.*, 1976), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2003), *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005 ; Mantelin *et al.*, 2006), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005 ; Zurdo-Pineiro *et al.*, 2007).

La classe des  $\beta$ -Proteobactéries renferme les genres : *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Moulin *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2003) *Cupriavidus*, *Shinella* (Lin *et al.*, 2008).

Des bactéries de la sous-classe des  $\gamma$ -Proteobactéries (*Pantoea agglomerans*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia vulneris*, *Pseudomonas* sp.) ont également été isolées de nodosités de légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004).

Sur la base de ces découvertes, il n'est pas exclu de trouver d'autres bactéries capables de noduler les légumineuses, même en dehors du phylum des Protéobactéries. Durant les dernières années, on associe au groupe des rhizobia un autre groupe de non rhizobia, symbionts capables de noduler les racines des légumineuses et répertoriés dans les sous-classes de  $\alpha$   $\beta$  et  $\gamma$  - *proteobacteria* (Balachandar *et al.*, 2007).

**Tableaux 01** - Derniers remaniements de la classification des B.N.L. selon Weir (2013) dont la dernière mise à jour date du 2 Mai 2013.

Genres	Espèces	Références
<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium alamii</i>	<u>Berge <i>et al.</i> (2009)</u>
	<i>Rhizobium alkalisoli</i>	<u>Lu <i>et al.</i> (2009)</u>
	<i>Rhizobium cellulosityticum</i>	<u>García-Fraile <i>et al.</i> (2007)</u>
	<i>Rhizobium daejeonense</i>	
	<i>Rhizobium endophyticum</i>	<u>López-López <i>et al.</i> (2011)</u>
	<i>Rhizobium etli</i>	
	<i>Rhizobium galegae</i>	
	<i>Rhizobium gallicum</i>	
	<i>Rhizobium giardinii</i>	
	<i>Rhizobium hainanense</i>	
	<i>Rhizobium herbae</i>	<u>Ren <i>et al.</i> (2011)</u>
	<i>Rhizobium huautlense</i>	
	<i>Rhizobium indigoferae</i>	
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Espèces types. Voir note <b>A</b>
<i>Rhizobium loessense</i>	anciennement <i>Rhizobium huanglingense</i>	

A - *Rhizobium trifolii* est un synonyme plus récent de *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* est une espèce valide distinctes, et certains isolats précédemment connu sous le nom de *R. leguminosarum* sont maintenant *R. pisi* (Ramirez-Bahena *et al.*, 2008).

<b>Genres</b>	<b>Espèces :</b>	<b>Références</b>
<b>Rhizobium</b>	<i>Rhizobium lusitanum</i>	
	<i>Rhizobium mesosinicum</i>	<u>Lin <i>et al.</i> (2009)</u>
	<i>Rhizobium miluonense</i>	<u>Gu <i>et al.</i> (2008)</u>
	<i>Rhizobium mongolense</i>	
	<i>Rhizobium multihospitium</i>	<u>Han <i>et al.</i> (2008)</u>
	<i>Rhizobium oryzae</i>	<u>Peng <i>et al.</i> (2008)</u>
	<i>Rhizobium phaseoli</i>	<u>Ramirez-Bahena <i>et al.</i> (2008)</u>
	<i>Rhizobium pisi</i>	<u>Ramirez-Bahena <i>et al.</i> (2008)</u>
	<i>Rhizobium tibeticum</i>	<u>Hou <i>et al.</i> (2009)</u>
	<i>Rhizobium sullae</i>	Squartini (2002)
	<i>Rhizobium tropici</i>	
	<i>Rhizobium tubonense</i>	<u>Zhang <i>et al.</i> (2011)</u>
	<i>Rhizobium undicola</i>	anciennement <i>Allorhizobium undicola</i>
	<i>Rhizobium vignae</i>	<u>Ren <i>et al.</i> (2011)</u>
<i>Rhizobium yanglingense</i>		

<i>Genres</i>	<i>Espèces</i>	<i>Références</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium albiziae</i>	<u>Wang et al. (2007)</u>
	<i>Mesorhizobium alhagi</i>	<u>Chen et al. (2010)</u>
	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
	<i>Mesorhizobium australicum</i>	<u>Nandasena et al. (2009)</u>
	<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	<u>Chen et al. (2011)</u>
	<i>Mesorhizobium caraganae</i>	<u>Wang et al. (2007)</u>
	<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Jarvis (1997)
	<i>Mesorhizobium gobiense</i>	<u>Han et al. (2008b)</u>
	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	anciennement <i>Rhizobium huakuii</i>
	<i>Mesorhizobium loti</i>	anciennement <i>Rhizobium loti</i> , Type species

<i>Genres</i>	<i>Espèces</i>	<i>Références</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	anciennement <i>Rhizobium mediterraneum</i>
	<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	<u>Vidal et al. (2009)</u>
	<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	<u>Nandasena et al. (2009)</u>
	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	
	<i>Mesorhizobium robiniae</i>	<u>Zhou et al. (2010)</u>
	<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	<u>Lu et al. (2009)</u>
	<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
	<i>Mesorhizobium tarimense</i>	<u>Han et al. (2008b)</u>
	<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	anciennement <i>Rhizobium tianshanense</i>



Genres	Espèces	Références
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	
	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	anciennement <i>Blastobacter denitrificans</i>
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	
	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	<u>Islam et al. (2008)</u>
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	anciennement <i>Rhizobium japonicum</i>
	<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	<u>Ramírez-Bahena et al. (2009)</u>
	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	
	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	<u>Ramírez-Bahena et al. (2009)</u>
	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	

Genres	Espèces	Références
<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer abri</i>	
	<i>Sinorhizobium americanum</i>	
	<i>Ensifer arboris</i>	
	<i>Ensifer fredii</i>	anciennement <i>Rhizobium fredii</i>
	<i>Ensifer garamanticus</i>	<u>Merabet et al. (2010)</u>
	<i>Ensifer indiaense</i>	
	<i>Ensifer kostiensis</i>	
	<i>Ensifer kummerowiae</i>	
	<i>Ensifer medicae</i>	
	<i>Ensifer meliloti</i>	anciennement <i>Rhizobium meliloti</i>
	<i>Ensifer mexicanus</i>	<u>Lloret et al. (2007)</u>
	' <i>Sinorhizobium morelense</i> '	
	<i>Ensifer adhaerens</i>	
	<i>Ensifer numidicus</i>	<u>Merabet et al. (2010)</u>
	<i>Ensifer saheli</i>	
	<i>Ensifer sojae</i>	<u>Li et al. (2014)</u>
<i>Ensifer terangae</i>		

Genres	Espèces	Références
Burkholderia	<i>Burkholderia caribensis</i>	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	
	<i>Burkholderia mimosarum</i>	
	<i>Burkholderia nodosa</i>	<u>Chen et al. (2007)</u>
	<i>Burkholderia phymatum</i>	
	<i>Burkholderia sabiae</i>	<u>Chen et al. (2008)</u>
	<i>Burkholderia tuberum</i>	
Phyllobacterium	<i>Phyllobacterium trifolii</i>	
	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	<u>Mantelin et al. (2006)</u>
	<i>Phyllobacterium leguminum</i>	<u>Mantelin et al. (2006)</u>
Microvirga	<i>Microvirga lupini</i>	<u>Ardley et al. (2012)</u>
	<i>Microvirga lotononidis</i>	<u>Ardley et al. (2012)</u>
	<i>Microvirga zambiensis</i>	<u>Ardley et al. (2012)</u>

Genres	Espèces	Références
Azorhizobium	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	
	<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	anciennement <i>Azorhizobium johannae</i>
Ochrobactrum	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<u>Zurdo-Piñeiro et al. 2007</u>
	<i>Ochrobactrum lupini</i>	
Methylobacterium	<i>Methylobacterium nodulans</i>	
Cupriavidus	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	
Devosia	<i>Devosia neptuniae</i>	
Shinella	<i>Shinella kummerowiae</i>	<u>Lin et al. (2008)</u>

# 1. Isolement des bactéries à partir des nodules

## 1.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir des racines de la légumineuse *Trifolium repens* L. (trèfle blanc), l'échantillonnage a eu lieu au niveau de la commune de Zighoud Youcef, au mois de Mars 2014.

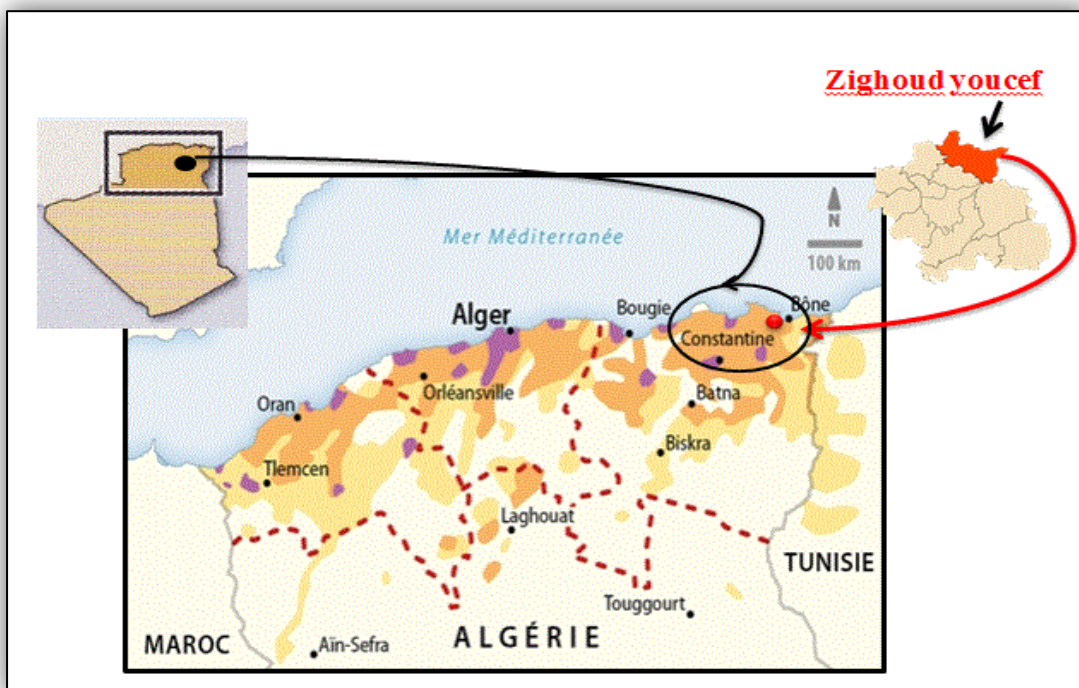


Figure 06 - Localisation géographique de la zone de prélèvement.



Figure 07 - *Trifolium repens* L.

a. Figure du site de prélèvement ; b. Champ de trèfle blanc ; c. Feuilles de trèfle blanc.

La collecte est réalisée selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), cette méthode consiste à :

- creuser à 15 cm autour de la plante et à une profondeur de 20 cm, ceci afin de prélever la plante entière avec tout son appareil racinaire sans l'endommager ;
- extraire délicatement le bloc de sol et enlever manuellement la terre liée aux racines en faisant attention à ne pas tirer dessus (surtout les racines secondaires qui portent souvent beaucoup de nodules) ;
- placer la plante, les racines en bas, dans un sac en plastique pour transporter au niveau du laboratoire ;



**Figure 08** - La plante extraite avec son appareil racinaire.

- rincer délicatement les racines sous un courant d'eau des restes de terre puis sécher au papier filtre.



**Figure 09 - a.** Rincage des racines ; **b.** Racines séchées.

Les nodules sont détachés de la racine à l'aide d'un bistouri, il est important de couper à quelques millimètres de leur site d'attache, ceci pour les maintenir intacts car dans le cas contraire, il y aurait un risque de les endommager en rompant leur cortex, ce qui réduit nos chances d'obtenir des cultures viables. Après cela, les nodules sont séchés au papier filtre, ils sont prêts pour la conservation.



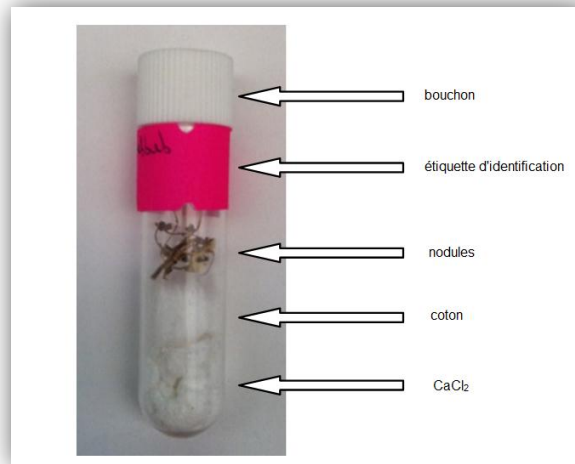
**Figure 10-** Nodules prêts à être conservés.

## **1.2. Conservation des nodules**

Pour un usage immédiat, les nodules peuvent être conservés au réfrigérateur à 4°C, à condition que le délai ne dépasse pas 48h. Pour une longue période de stockage, une dessiccation au chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est recommandée (Vincent, 1970), cela permet une conservation de 6 à 12 mois.

La conservation se fait dans un tube en verre contenant du  $\text{CaCl}_2$  couvert de coton, les nodules sont déposés sur le coton et le tube est fermé hermétiquement et identifié d'une étiquette portant les informations suivantes :

- nom de la plante hôte ;
- date de conservation ;
- date et lieu de prélèvement.



**Figure 11** - Nodules conservés sous  $\text{CaCl}_2$ .

### **1.3. Isolement des bactéries à partir des nodules**

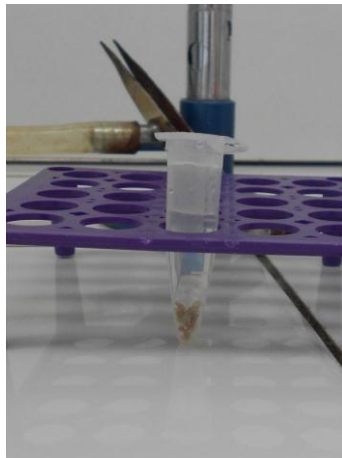
La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules frais sont utilisés directement, ceux conservés au réfrigérateur sont laissés à température ambiante pendant 1h avant utilisation, et ceux conservés au  $\text{CaCl}_2$  sont réhydratés toute une nuit dans de l'eau du robinet à 4°C puis laissés pendant 1h à température ambiante.

#### **1.3.1. Stérilisation des nodules**

Toutes les manipulations se déroulent sous une hotte à flux laminaire, javellisée et exposée aux rayons UV pendant 20 minutes avant utilisation (ceci garantit des conditions d'asepsie totale), munie d'un bec Bunsen à proximité duquel se font les manipulations.

Les nodules prélevés doivent être stérilisés de l'extérieur, le but étant d'isoler seulement les bactéries se trouvant à l'intérieur par écrasement, la surface des nodules doit donc être parfaitement stérile.

Les nodules sont mis à l'aide d'une pince (préalablement immergée dans de l'éthanol puis flambée et refroidie) dans un microtube Eppendorf, le choix de cette méthode est dû à la petite taille des nodules. Ceux-ci sont immergés dans de l'éthanol à 95% pendant 10 secondes, puis transférés directement dans une solution de chlorure de mercure acidifiée à 0,1% pendant 3 minutes, et enfin rincés à l'eau distillée stérile au moins 10 fois. Les nodules sont laissés tremper dans l'eau du 11<sup>e</sup> rinçage au moins une demi-heure pour être bien hydratés (Vincent, 1970).



**Figure 15** - Les nodules pendant le dernier rinçage.

### **1.3.2. Isolement selon la méthode du nodule écrasé**

Dans le même microtube, les nodules sont écrasés dans quelques gouttes d'eau distillée stérile à l'aide d'une pince, jusqu'à obtention d'un « jus » nodulaire de couleur brune.

Avec une anse de platine flambée et refroidie, on prélève une öse à partir du broyât contenu dans le microtube et on l'ensemence dans une boîte de Pétri contenant un des milieux spécifiques selon la technique des 3 cadrans, afin d'obtenir des colonies bien isolées.

Les milieux de culture utilisés sont le Yeast Mannitol Agar additionné de rouge Congo (YMA + RC) et le Glucose Peptone Agar additionné de bromocrésol pourpre(GPA) (Annexe I), le reste

du jus est transféré dans un tube à essai contenant du Yeast Mannitol Broth (YMB) (Annexe I). L'ensemble des boîtes et des tubes est incubé 72h à 28°C (Vincent, 1970).

Ces milieux (YMA et YMB) sont utilisés car ils sont spécifiques à la culture des rhizobia, ils contiennent de l'extrait de levure qui est une source d'acides aminés, le mannitol est la source de carbone et le calcium et magnésium fournissent les cations essentiels à la croissance de ces bactéries (Allen et Allen, 1950).

### **1.3.3. Purification des souches**

Après incubation, seules les colonies ayant peu ou pas absorbé le rouge Congo et n'ayant pas acidifié le milieu GPA + BCP seront repiquées sur le milieu YMB, ainsi, on réalise des repiquages réguliers en alternant YMA + RC et YMB jusqu'à purification complète des souches.

## **2. Caractères morphologiques**

### **2.1. Aspect macroscopique**

L'aspect des colonies est observé sur milieu YMA sans rouge Congo (Annexe I), il doit correspondre à une description selon Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) quant à la forme des colonies, leur taille, leur couleur et leur texture.

L'ensemencement se fait à partir d'une culture sur YMB selon la méthode des trois quadrans, l'incubation se fait à 28°C pendant 24 heures.

### **2.2. Aspect microscopique**

En vue d'une caractérisation morphologique, nos isolats subiront une observation microscopique après une coloration de Gram. Le protocole expérimental consiste à :

- préparer un frottis à partir de la culture YMB ;
- recouvrir la lame de violet de gentiane, laisser agir 1 minute ;



- chasser le violet de gentiane par la solution de Lugol, recouvrir la lame de solution de Lugol et laisser agir 30 secondes ;
- incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool-acétone.
- rincer à l'eau distillée ;
- recouvrir de fuchsine et laisser agir 1 minute ;
- rincer à l'eau distillée ;
- observer au microscope à immersion à l'objectif x100.

### 3. Conservation des isolats

La conservation des souches se fait sur milieu YMA additionné de 3 g/l de CaCO<sub>3</sub> comme agent neutralisant l'acidité. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle (18h), des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 28°C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

**Tableau 02** - Isolats et souches de référence utilisés.

Code	Souches	Provenance
<i>R.a1</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	S. Dekkiche- U. Cne 1
<i>M. ciceri</i>	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	S. Dekkiche- U. Cne 1
<i>R.s.</i>	<i>Rhizobium sullae</i>	A. Benguedouar – U. Cne 1
<i>R.l. v.</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	N. Riah – U.Cne 1
<i>R.a.2</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	S. Dekkiche- U. Cne 1
S1	Notre étude	
S2	Notre étude	
S3	Notre étude	

## 4. Tests préliminaires relatifs aux rhizobia

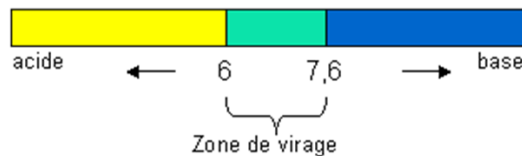
### 4.1. Aspect des colonies sur milieu YMA additionné de rouge Congo à faible concentration (0,0025%)

Chaque isolat est cultivé sur milieu YMA additionné de 0,0025% de rouge Congo et incubé 24h à 28°C dans l'obscurité afin d'apprécier leur absorption du rouge Congo, et de distinguer les colonies de *Rhizobium* qui absorbent peu ou pas le rouge Congo (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994) des éventuels contaminants ou des autres B.N.L.

### 4.2. Vitesse de croissance sur YMA + Bleu de bromothymol

Nos isolats sont ensemencées sur milieu YMA + Bleu de bromothymol (Annexe I) (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970) pour mettre en évidence leur vitesse de croissance.

Ce colorant étant un indicateur de pH mettant en évidence l'acidification du milieu par un virage de l'indicateur de pH au jaune.



**Figure 16** - Couleurs du bleu de bromothymol.

Ce virage permet de distinguer les souches à croissance rapide (notamment les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, etc.) qui poussent au bout de 24h d'incubation et virent le milieu au jaune (bactéries acidifiantes) des autres souches à croissance lente (notamment *Bradyrhizobium*) (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993 ; Pagano, 2008).

## **5. Tests nutritionnels**

Les tests nutritionnels sont effectués sur les isolats conservés au CaCO<sub>3</sub>, ils mettent en évidence la capacité d'une souche à assimiler différents hydrates de carbone, différentes sources d'acides aminés et leurs besoins en vitamines.

### **5.1. Assimilation de la source de carbone**

Nos isolats et les souches de référence sont ensemencés sur le milieu YMA modifié : l'extrait de levure est réduit à 0.05g/l et le mannitol est substitué à chaque fois par l'un des mono- et disaccharides suivants : D-Fructose, D-Galactose, D-Saccharose, D-Glucose, D-Xylose, Citrate de sodium, Lactose et Maltose, à concentration de 0.1%. On utilise comme témoin un milieu YMA contenant le Mannitol (Somasogaran et Hoben, 1994). Les boîtes ensemencées en surface par stries sont incubées à 28°C pendant 24h, 48h et 72h.

### **5.2. Assimilation de la source d'azote**

Nos isolats et les souches de référence sont cultivés sur milieu Défini 8 (Annexe I) (Lindström et Lehtomäski, 1988 ; Vincent, 1970) dont le glutamate de sodium est substitué à chaque fois par l'un des acides aminés suivants : Valine, Tyrosine, Leucine, Proline, Isoleucine, Glycine, Serine, Histidine, Arginine, Cystéine, Méthionine, Asparagine et Tryptophane, à une concentration de 1%. On utilise comme témoin le milieu Défini 8 contenant du glutamate de sodium. Les boîtes sont ensemencées en surface par stries puis incubées à 28°C pendant 24h, 48h et 72h.

### **5.3. Besoins en vitamines (Jordan, 1984)**

Le but est de déterminer si la croissance de nos isolats et des souches de référence nécessite l'adjonction d'une vitamine donnée (Thiamine-HCl et Pantothénate de calcium) dans le milieu, pour ce, ils sont cultivés sur quatre milieux :

- le milieu TYA additionné de Thiamine-HCl ;
- le milieu TYA additionné de Pantothénate de calcium ;

- le milieu TYA additionné des deux vitamines ;
- et le milieu TYA standard comme témoin.

Les solutions stock sont stérilisées à part par filtration (filtre à 0,2µm de diamètre), elles sont ensuite ajoutées au milieu maintenu à une température de 45°C à raison de 1µg de vitamine par ml de TYA (Annexe I). Les boîtes sont incubées 24h à 28°C. La croissance est ensuite comparée entre le milieu contenant les vitamines et le milieu standard, afin de déterminer l'exigence ou non de la bactérie.

## **6. Recherche des enzymes spécifiques**

Le but est de mettre en évidence certaines enzymes de dégradation synthétisées par les bactéries qui jouent un rôle lors du processus d'infection.

### **6.1. Activité cellulasique**

L'enzyme recherchée est la carboxyméthylcellulase, aussi appelée endo  $\beta$ -1,4-glucanase, ou encore CMCase, responsable du clivage de glucanes (polysaccharides composés exclusivement de monomères de glucose) à partir de l'intérieur de la chaîne carbonée.

La CMCase est l'une des principales enzymes pouvant être impliquées dans la phase initiale du processus d'infection (Bhat et Bhat, 1997 ; Hu *et al.*, 2007).

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode modifiée du rouge Congo de Teather et Wood (1982), ce composé est capable de se lier de manière stable à une molécule non dégradable de Carboxyméthylcellulose (CMC).

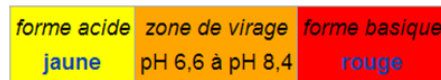
Nos isolats et les souches de référence sont mis en culture sur le milieu YMA contenant 0,25% (p/v) de carboxyméthylcellulose et incubés 5 jours à 28°C, les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 28°C. La solution colorante est remplacée par une solution de NaCl 1M, et les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes puis vidées de cette

solution. La présence de l'enzyme se traduit par un halo jaune orangé entourant les colonies (Struffi *et al.*, 1998).

## 6.2. Hydrolyse de l'urée

L'enzyme recherchée est l'uréase, qui catalyse la réaction de transformation de l'urée en carbonate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) qui est responsable de l'alcalinisation du milieu (Delarras, 2007).

Les isolats et les souches de référence sont cultivés sur milieu YMA contenant 0,2g/l d'urée et 0.012g/l de rouge de phénol comme indicateur de pH (Jarvis *et al.*, 1977).



**Figure 17** - Couleurs du rouge de phénol.

La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre à 0.2µm de diamètre) et ajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C. Les boîtes sont incubées 48h à 28°C.

Les résultats sont évalués par le changement de la coloration du milieu. Une coloration rouge (pouvant aller jusqu'au rose fuchsia) indique l'hydrolyse de l'urée (alcalinisation du milieu due à la production de carbonate d'ammonium), alors qu'une persistance d'une couleur orange indique une réaction négative.

## 6.3. Réduction des nitrates

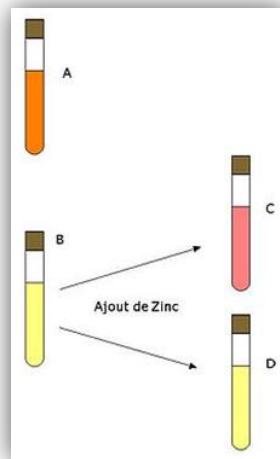
L'enzyme recherchée est la nitrate-réductase, elle catalyse la réaction de réduction des nitrates, cette réduction peut se faire à différents stades selon le type de nitrate-réductase :

- jusqu'au stade nitrites selon la réaction :  $NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$

Les nitrites pourront ensuite être réduits en ammoniac grâce à la nitrite réductase ;

- jusqu'au stade diazote selon la réaction :  $NO_3^- + 6H^+ + 5e^- \longrightarrow 1/2N_2 + 3H_2O$

Cette enzyme est mise en évidence après culture des isolats et des souches de référence sur bouillon TY (Annexe I) contenant 1g de  $KNO_3/l$  de milieu comme source d'azote. L'incubation se fait à 28°C pendant 4 jours, après quoi on ajoute 3 gouttes de chacun des deux réactifs de la nitrate réductase I et II (Guiraud, 1998) et on interprète selon le schéma suivant :



**Figure 18** - Résultats possibles du test de la réduction des nitrates.

- A. Milieu rouge orangé : la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase au stade nitrites.
- B. Milieu jaune  $\Rightarrow$  ajout de la poudre de zinc (épreuve de Zo Bell).
- C. Milieu rouge : présence de nitrate dans le milieu, la bactérie ne possède pas l'enzyme.
- D. Coloration jaune : pas de nitrate dans le milieu, la bactérie possède l'enzyme au stade diazote.

## 7. Influence des facteurs abiotiques

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter la population bactérienne dans le sol. Parmi ces facteurs le stress salin, le stress acide ou alcalin et le stress et choc thermiques.

### 7.1. Effet du chlorure de sodium

Les tests de tolérance au sel sont réalisés sur nos isolats et les souches de références à différentes concentrations de NaCl. L'évaluation de la tolérance au NaCl est effectuée par culture des souches sur le milieu TY contenant des teneurs croissantes en NaCl, 1% (171mM) ; 2% (342mM) ; 5% (855mM) et 20% (3,419M).

Trois répétitions sont réalisées pour chaque concentration. La croissance sous l'effet de la salinité est estimée par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600nm ( $DO_{\lambda_{600}}$ ) après incubation à 28°C pendant 24h, 48h et 72h. Un tube de TY non ensemencé est utilisé comme témoin.

## **7.2. Effet de la température**

La mise en culture de nos isolats et des souches de référence sur milieu YMA à différentes températures : 4°C ; 20°C et 45°C (Lupwayi et Haque, 1994) nous permet d'estimer les températures optimales et maximales de croissance. La lecture est effectuée après 24h, 48h et 72h d'incubation. Concernant la température 4°C, l'incubation peut aller jusqu'à 10 jours. Les résultats sont comparés au témoin incubé à 28°C.

## **7.3. Effet du pH**

Nos isolats et les souches de références sont cultivés sur le milieu TY ajusté à différents pH : 4,0 ; 5,0 ; 6,8 (témoin) ; 8,0 et 10. Trois répétitions sont réalisées pour chaque pH. L'évaluation de la croissance est effectuée par la mesure de la densité optique à 600nm ( $DO_{\lambda_{600}}$ ) après incubation à 28°C pendant 24h, 48h, et 72h.

# **8. Résistance intrinsèque aux antibiotiques et aux métaux lourds**

## **8.1. Résistance aux antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques est souvent utilisée dans l'identification des rhizobia dans les études écologiques (Beck *et al.*, 1993).

Afin d'étudier la résistance de nos isolats et des souches de référence vis-à-vis de certains antibiotiques et de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), on les cultive à 28°C pendant 7 jours sur le milieu Mueller Hinton (Annexe I) auquel des concentrations croissantes d'antibiotiques sont ajoutées, cette technique est préconisée par Vincent (1970), Beck *et al.* (1993) et Somasegaran et Hoben (1994).

Les solutions stock sont préparées en dissolvant une quantité de 0.1 à 0.5 g d'antibiotique dans 100 ml du solvant correspondant (Annexe I), elles sont ensuite stérilisées par filtration (0.20µm) et ajoutées au milieu maintenu en surfusion à 45°C.

**Tableau 03** - Antibiotiques, concentrations et solvants utilisés.

Antibiotiques	Concentrations en µg/ml	Solvants
Erythromycine	10-20	Ethanol 95%
Chloramphénicol	2.5-5-10	Ethanol 95%
Carbénicilline	10-30-50	Eau distillée
Kanamicine	10-20-50	Eau distillée
Specticine	5-10	Eau distillée
Rifamicine	5-10	Eau distillée
Acide nalidixique	100-200	NaOH 1N

## 8.2. Résistance intrinsèque aux métaux lourds

Certains métaux lourds peuvent influencer la croissance et la physiologie des microorganismes en affectant les processus de fixation de l'azote atmosphérique et la nodulation des légumineuses par les bactéries-hôtes.

Afin d'étudier la capacité des souches à tolérer certains métaux lourds et de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), on cultive nos isolats et les souches de référence à 28°C pendant 72h sur le milieu Mueller Hinton contenant des concentrations croissantes (de 1 à 1000µg/ml de milieu) des métaux lourds suivants :  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ;  $\text{HgCl}_2$  ;  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ;  $\text{ZnCl}_2$  ;  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 2 à 3 jours.



**Tableau 04 - Métaux lourds, concentrations et solvants utilisés.**

Métaux lourds	Concentrations en µg/ml	solvants
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (chlorure de cuivre)	200-500-1000	Eau distillée
HgCl <sub>2</sub> (chlorure de mercure)	1-5-10	Eau distillée
CdCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (chlorure de cadmium)	20-40-100	Eau distillée
ZnCl <sub>2</sub> (chlorure de zinc)	100-200-500	Eau distillée
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (acétate de plomb)	500-100-200	Eau distillée

## 9. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par Laemmli (1970). La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu dans des conditions dénaturantes en présence de l'agent anionique, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

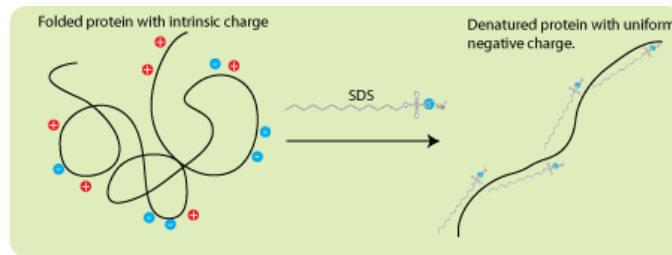
### 9.1. Principe

SDS-PAGE est le sigle anglophone de « sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis », ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium. C'est une technique de séparation de mélanges de protéines sous l'effet d'un champ électrique.

Comme toutes molécules chargées, les protéines peuvent se mouvoir dans un champ électrique. Cette charge provient des groupements ionisables des chaînes latérales de certains acides aminés composant la protéine. C'est pourquoi on peut se servir de cette technique pour les séparer (Gauthier, 2009).

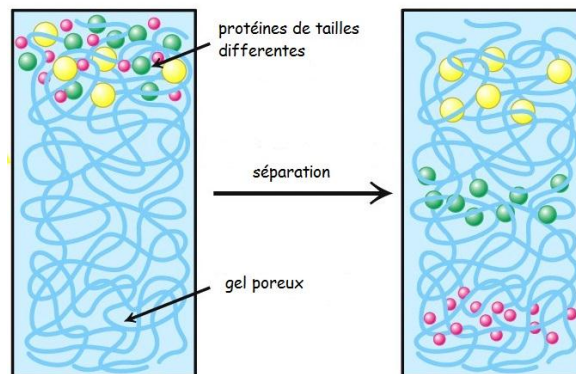
Le sodium dodécylsulfate (SDS) est un détergent anionique qui dénature les protéines auxquelles il se fixe en leur conférant une charge nette négative, ce qui détermine le sens de migration vers l'anode sous l'effet d'un champ électrique qui joue la force motrice. Donc dans ces conditions de séparation dénaturante de SDS-PAGE, la migration n'est pas déterminée par la charge électrique intrinsèque du polypeptide, mais plutôt par le poids moléculaire (Coyne *et coll.*,

2002). Ainsi, Les protéines ayant un petit poids moléculaire seront moins retenues dans les pores du gel et migreront donc plus loin que les grosses.



**Figure 19** - Rôle du SDS dans la dénaturation des protéines.

Cette migration se fait sur une matrice de polyacrylamide (Walker, 1994). Le gel de polyacrylamide est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide, en présence d'agents de polymérisation (TEMED et persulfate d'ammonium). Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et plus les molécules seront freinées dans le gel.



**Figure 20**- Migration des molécules en fonction de leurs poids moléculaire.

## 9.2. Préparation des extraits protéiques

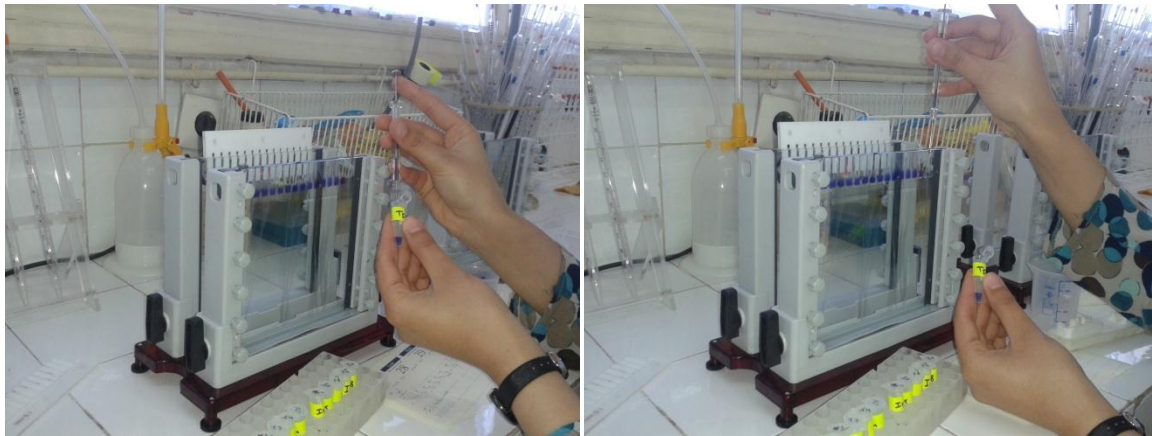
- Un bouillon YMB estensemencé la veille à partir de nos isolats et des souches de référence et est incubé à 28°C pendant 18h ;
- en phase de croissance exponentielle, une aliquote de 100µl de chaque culture bactérienne est transférée dans des tubes Eppendorf et centrifugée à une vitesse de 10 000 rotation par minute à 4°C pendant 15 minutes ;

- les culots récupérés sont traités avec 50µl de tampon de lyse (Annexe III). Le mélange est agité pendant 30min puis traité à la chaleur (65°C) pour accélérer les réactions de dénaturation des protéines.

### 9.3. Préparation du gel

Le gel est préparé en utilisant un mélange de solutions mères d'acrylamide, de tampon de gel de séparation (TGS) et de tampon de gel de tassement (TGT) (Annexe III).

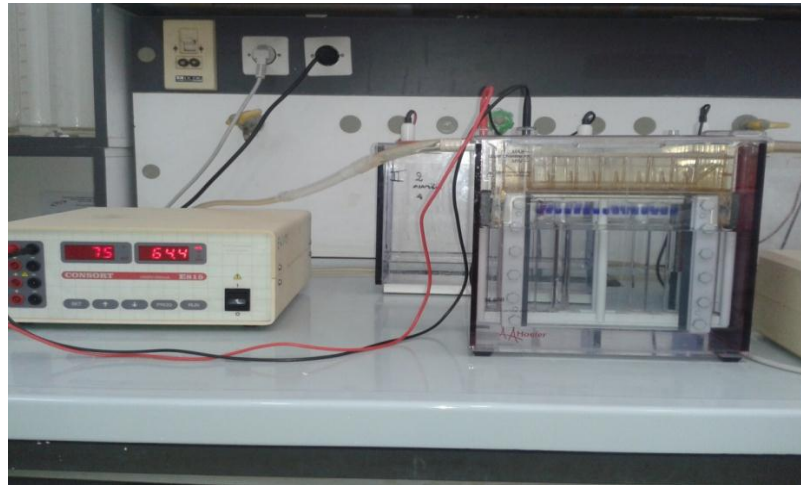
- Les plaques de gel sont montées dans le couleur ;
- le gel de migration est coulé et recouvert d'eau + butanol ;
- l'eau + butanol est retiré et le gel de concentration est coulé ;
- les peignes sont placés rapidement ;
- on laisse polymériser, on démonte et on retire les peignes ;
- 35 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits ;
- on place 1 ou 2 plaques dans l'appareil à électrophorèse et on remplit avec le tampon de migration.



**Figure 21** - Dépôt des échantillons protéiques dans les puits du gel de concentration.

Conditions de migration :

La migration électrophorétique est réalisée en appliquant un ampérage constant de 40 mA et un voltage maximum (1200 V). La migration est arrêtée généralement après la sortie du front coloré.



**Figure 22** - Lancement de la migration.

#### **9.4. Révélation des bandes protéiques**

Une fois la migration stoppée, l'appareil éteint et les électrodes débranchées, le gel est démoulé. Le gel de concentration est écarté et le gel de séparation est mis dans un récipient contenant la solution de coloration (Annexe III), cela permet de fixer les protéines grâce à l'acide trichloroacétique en même temps qu'on les colore au bleu de Coomassie, on laisse sous agitation pendant 24 h. La décoloration est effectuée en remplaçant la solution de coloration par de l'eau de robinet jusqu'à la décoloration complète du gel.

## **1. Caractéristiques morphologiques des isolats**

### **1.1. Croissance sur milieu YMA + rouge Congo**

La croissance dans le milieu YMA figure parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des rhizobia (Vincent, 1970).

La mise en culture du broyât nodulaire sur milieu YMA + rouge Congo a donné au bout de 48 à 72h, des colonies absorbant très peu ou pas le rouge Congo (Figure 08), seules les colonies ne l'absorbant pas sont prises en considération dans les manipulations ultérieures.



**Figure 23** - Colonies issues d'un isolement sur milieu YMA+ RC.

### **1.2. Croissance sur bouillon YMB**

Le bouillon YMB est utilisé comme support de repiquage d'un milieu à un autre. Une fois ensemencé et après 24h d'incubation à 28°C, il se caractérise par l'apparition d'un trouble (Figure 09), ce qui a été observé au niveau de tous nos isolats y compris les souches de référence.



**Figure 24** - Apparition d'un trouble après incubation 24h sur bouillon YMB des isolats S1 et S2.

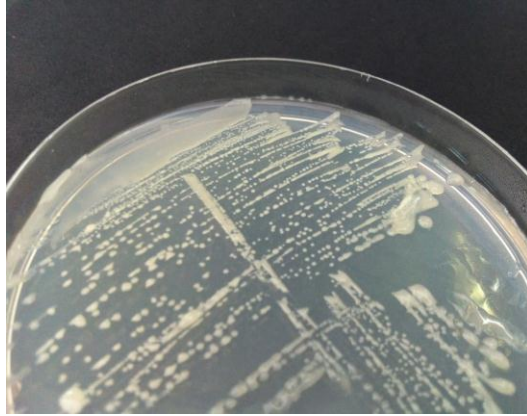
### **1.3. Le milieu Glucose-Peptide-Agar + pourpre de bromocresol (GPA+BPC)**

Ce milieu est utilisé pour le contrôle de la pureté des isolats. Tous les isolats ainsi que les souches de référence n'entraînent aucun virement de couleur du milieu après 24h d'incubation comme peuvent le faire certains contaminants notamment les bactéries à Gram positif (Beck *et al.*, 1993 ; Somasegaran et Hoben,1994) .

### **1.4. Aspect macroscopique sur milieu YMA**

Sur le milieu YMA, la croissance apparait au bout de 24 à 48h sous forme de petites colonies de 2 à 5mm de diamètre, circulaires à surfaces lisses et contours réguliers, brillantes, convexes, de texture homogène et de couleur blanchâtre à crème (Figure 10).

Cette description est valable pour la grande majorité des colonies, et ceci correspond à la description des rhizobia par Jordan (1984).



**Figure 25** - Aspect des colonies sur milieu YMA.

### 1.5. Aspect microscopique

L'observation microscopique permet d'apprécier des bacilles courts de couleur rose, à Gram négatif (Figure 11) (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993).



**Figure 26** - Observation microscopique de l'isolat S2 (objectif x100) après coloration de Gram.

## 2. Tests préliminaires relatifs aux rhizobia

### 2.1. Croissance sur milieu YMA additionné de rouge Congo à 0,0025%

Les colonies apparaissant au bout de 24h sont blanchâtres et n'absorbent pas le rouge Congo (Figure 12) (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984 ; Struffi, 1998). Ceci est observé chez la majorité des rhizobia.



**Figure 27** - Croissance de l'isolat S2 sur milieu YMA + RC à 0.0025%.

### 2.2. Vitesse de croissance sur YMA + BTB

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984 ; Beck *et al.*, 1993 ; Pagano, 2008). Nos isolats acidifient le milieu après 24h d'incubation (observation d'un virage de l'indicateur de pH) (Figure 13). Ce résultat permet de les classer parmi les bactéries à croissance rapide.

Xu *et al.* (1995) ont rapporté que 80% des souches testées de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le YEM + BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives.





**Figure 28** - Croissance de l'isolat S3 sur milieu YMA+BTB.

### **3. Tests nutritionnels**

#### **3.1. Assimilation de la source de carbone**

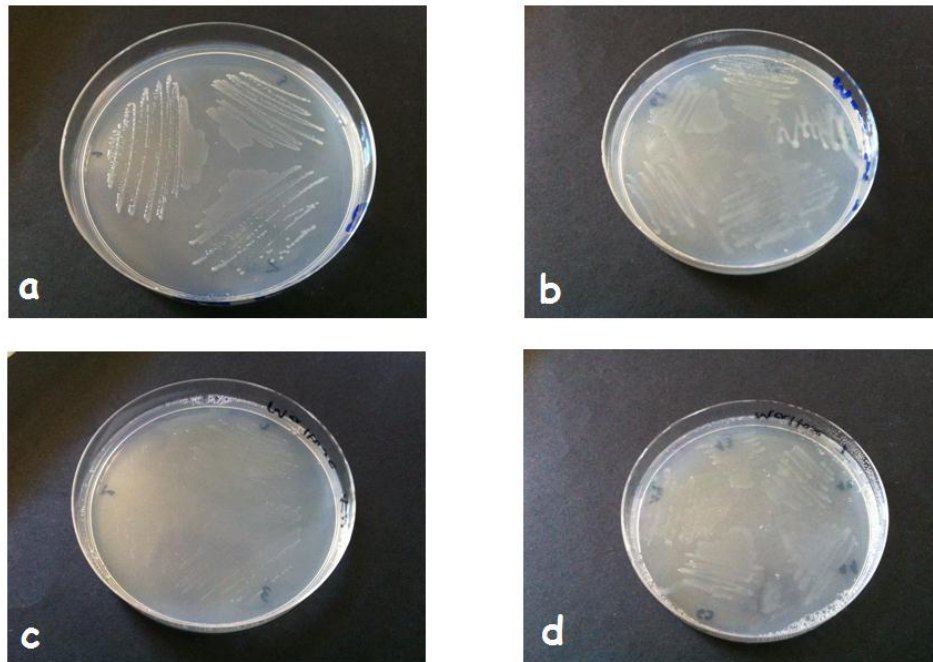
L'utilisation des sucres peut fournir les caractères différentiels pour l'identification des espèces (Allen et Allen, 1950).

Les rhizobia présentent un large spectre d'assimilation vis-à-vis des hydrates de carbone. Les rhizobia à croissance rapide ont la capacité de produire l'enzyme NADP-6 phosphogluconate déshydrogénase qui leur permet d'utiliser une large gamme de sucres (Martinez-Romero *et al.*, 1991).

L'assimilation des mono- et disaccharides testés apparaît après 24h d'incubation par nos isolats et souches de référence. La croissance est variable selon l'hydrate de carbone utilisé. Une faible croissance est observée en présence de Maltose, Lactose, Galactose, Glucose et Saccharose, par rapport au milieu de référence (témoin). On note une croissance nulle sur Xylose pour l'ensemble des souches utilisées (Tableau 05). Certains auteurs constatent également un degré de différence dans l'assimilation des hydrates de carbone (Struffi *et al.*, 1998 ; Rodriguerz *et al.*, 1987 ; Mulongoy et Elkan, 1977 ; El Essawi et Abdelghaffor, 1967).

Tan *et al.* (1999) ont trouvé que tous leurs isolats utilisent le mannitol comme seule source de carbone, également dans notre cas on remarque que le mannitol est le substrat carboné le mieux dégradé par nos isolats ainsi que les souches de référence qui affichent une très bonne croissance en présence de ce dernier (Figure 14 a et b).

Les résultats de cette étude montrent que nos isolats ainsi que les souches de référence sont capables d'utiliser une grande variété d'hydrates de carbone (tableau 05), ce qui est confirmé par Vincent (1970), Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994).



**Figure 29** - Croissance des isolats et des souches de référence en présence de mannitol et de maltose.

- a.** Isolats S1, S2, S3 en présence de mannitol ;
- b.** souches de référence *R.a. 1* ; *M. ciceri* ; *R.s.* ; *R.l.v.* et *R.a. 2* en présence de mannitol ;
- c.** isolats S1, S2, S3 en présence de maltose ;
- d.** souches de référence *R.a. 1* ; *M. ciceri* ; *R.s.* ; *R.l.v.* et *R.a. 2* en présence de maltose.

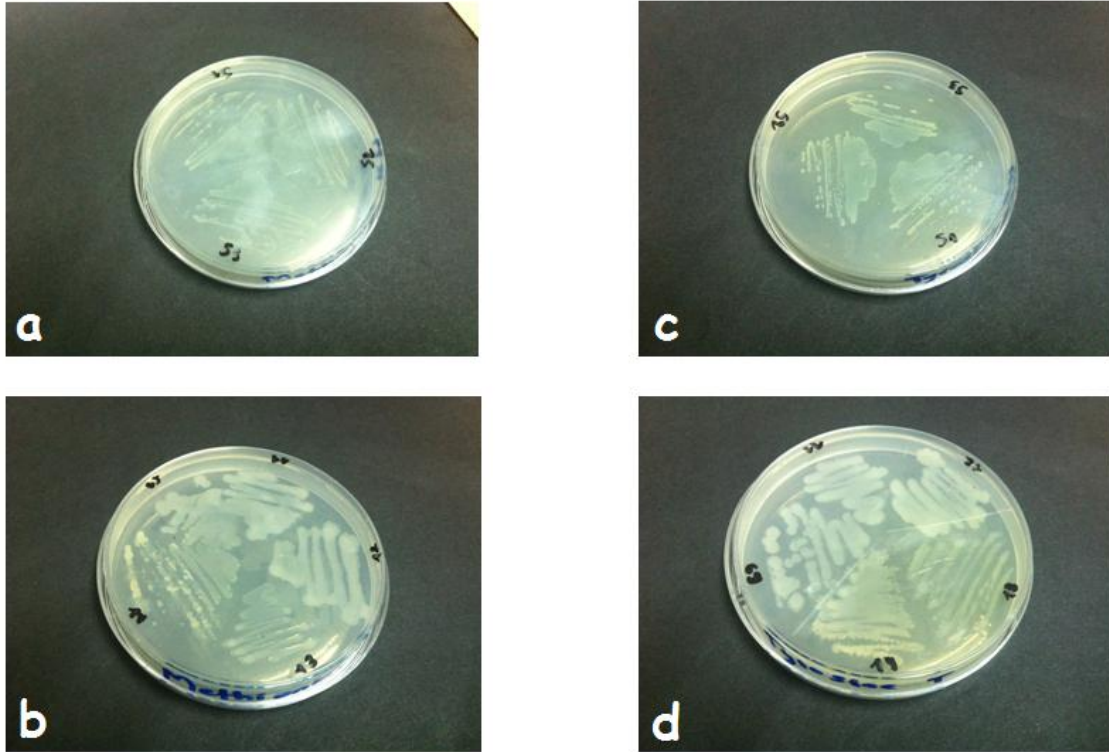
**Tableau 05** - Assimilation de la source de carbone par les souches testées.

Souches	S1	S2	S3	<i>R.a1</i>	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v</i>	<i>R.a2</i>
Fructose	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++
Maltose	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Lactose	+	+	+++	+++	+++	++	+	+++
Galactose	+	+	+	+++	+++	+	+++	+++
Glucose	+	+	+	+++	+++	+	+++	+++
Saccharose	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Mannitol	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate de Na	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++

(-) Pas de croissance ; (+) faible croissance ; (++) bonne croissance ; (+++) très bonne croissance.

### 3.2. Assimilation de la source d'azote

La croissance des isolats et souches de référence sur milieu défini 8 en présence des différents acides aminés est variable selon la source d'azote (Figure 15). Toutefois, isolats et souches de référence assimilent très bien les acides aminés utilisés (Tableau 06). Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994) ont constaté que beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les rhizobia.



**Figure 30** - Croissance des isolats et des souches de référence en présence de méthionine et de tyrosine.

- a. Isolats S1, S2, S3 en présence de méthionine ;
- b. souches de référence *R.a. 1* ; *M. ciceri* ; *R.s.* ; *R.l.v.* et *R.a. 2* en présence de méthionine ;
- c. isolats S1, S2, S3 en présence de tyrosine ;
- d. souches de référence *R.a. 1* ; *M. ciceri* ; *R.s.* ; *R.l.v.* et *R.a. 2* en présence de tyrosine.

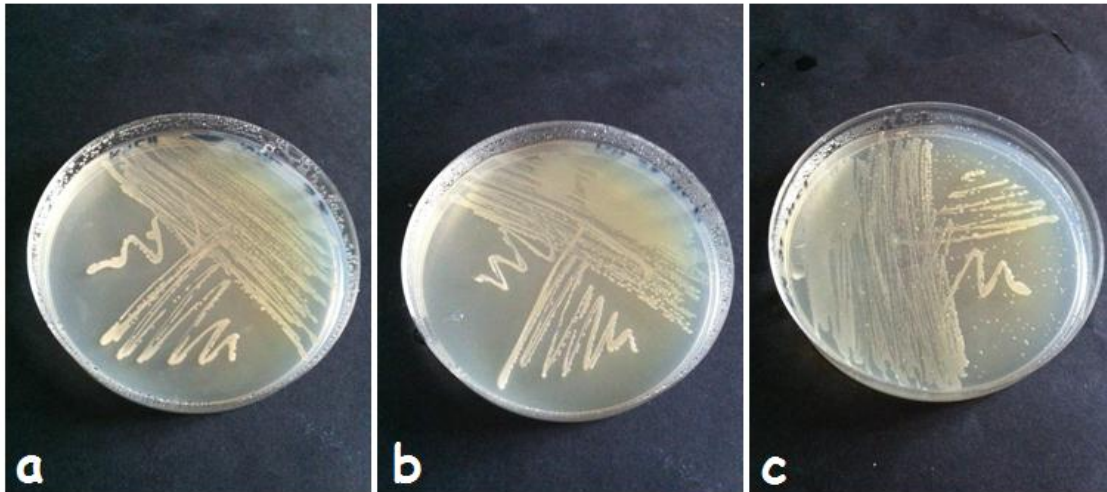
**Tableau 06** - Assimilation de la source d'azote par les souches testées.

Souches	S1	S2	S3	<i>R.a. 1</i>	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v</i>	<i>R.a. 2</i>
Glutamate de Na	+++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++++
Proline	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Méthionine	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Tyrosine	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
Serine	+++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+++
Glycine	+++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++++
Tryptophane	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Cystéine	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Asparagine	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Leucine	+++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++++
Alanine	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Valine	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Arginine	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
Histidine	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

(+++) Bonne croissance ; (++++) très bonne croissance.

### 3.3 Besoins en vitamines

Werner (1992) démontre que le besoin en vitamines chez les rhizobia est très variable et qu'en général la croissance du *Rhizobium* est stimulée par la thiamine et la pantothénate. Les autres vitamines ne sont pas exigées pour la croissance des rhizobia. Dans le cas de nos isolats et souches de référence, la croissance sur milieu TY additionné ou non de vitamines ne fait apparaître aucune différence. L'addition d'un facteur de croissance (les deux vitamines) ne change en rien la croissance des bactéries (tableau 07).



**Figure 31** - Croissance de l'isolat S2 sur milieu TY :

- a. standard ;
- b. additionné de pantothénate de calcium ;
- c. additionné de thiamine-HCl.

**Tableau 07** - Utilisation des vitamines par les souches testées.

Souches	S1	S2	S3	<i>R.al</i>	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v</i>	<i>R.a2</i>
Thiamine Hcl	+	+	+	+	+	+	+	+
pantothénate de calcium	+	+	+	+	+	+	+	+
Thiamine Hcl+ pantothénate de calcium	+	+	+	+	+	+	+	+
Standard (sans vitamine)	+	+	+	+	+	+	+	+

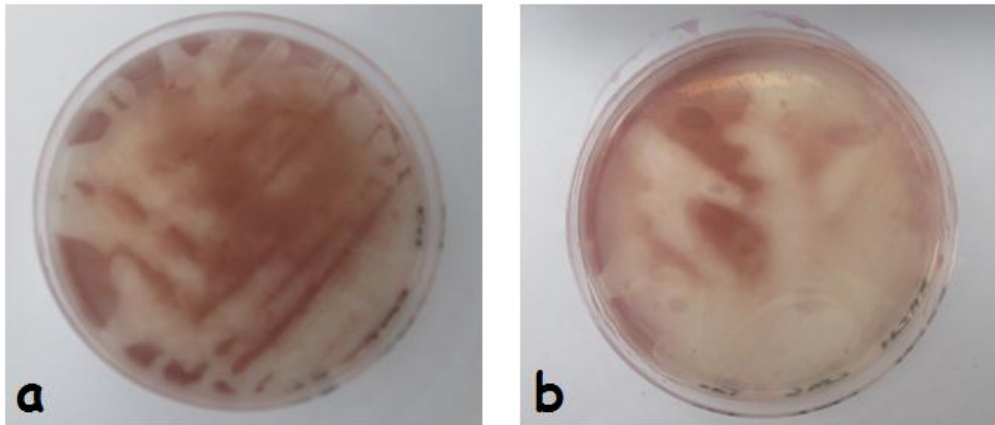
(+) Bonne croissance.

## 4. Recherche des enzymes spécifiques

### 4.1. Activité cellulasique

Les colonies des isolats et des souches de référence testées apparaissent sur un fond rouge avec un halo jaune clair autour (Figure 17), mettant en évidence l'activité endoglucanasique (Lindestrom et Lehtomak, 1988).

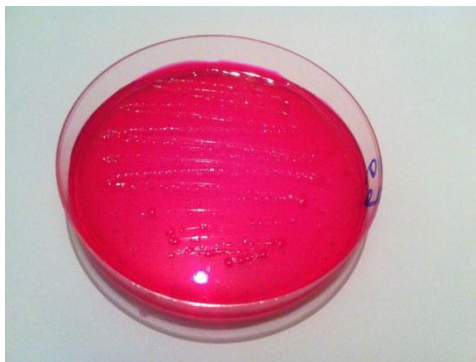
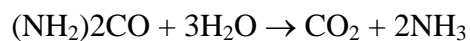
Plusieurs auteurs ont détecté CMC-ases dans différentes espèces de *Rhizobium* et ont démontrés que la cellulase produite par *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 est codée par le plasmide de symbiose (pSym) (Pedro *et al.*, 1992).



**Figure 32** - Activité cellulasique positive chez l'isolat S1 (a) et la souche *R.a.* 2 (b).

#### 4.2. Hydrolyse de l'urée

L'activité uréasique est positive pour tous les isolats et les souches suite à une alcalinisation du milieu YMA additionné d'urée et de rouge de phénol comme indicateur de pH (Mobley, 1992). Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération d'ammoniac selon l'équation (Guiraud, 1998) :



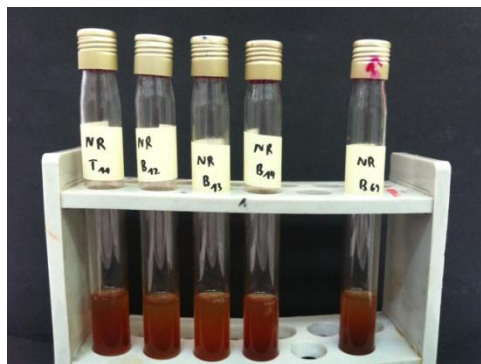
**Figure 33** - Hydrolyse de l'urée chez la souche *R.a.* 2.

### 4.3. Réduction des nitrates

La réduction des nitrates ou des nitrites constitue un caractère taxonomique important (Joffin et Leyval , 2006).

Selon Lucinski *et al.* (2002), la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses, et l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia, dans 97% des cas, cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes. Selon Munns (1968) la présence de nitrates dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des rhizobia aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective.

Isolats et souches de référence ont une activité nitrate-réductase après culture sur milieu TY additionné de  $KNO_3$  et après l'ajout de nitrate I et de nitrate II, donnant une coloration rouge qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase qui décompose les nitrates en nitrites dans le cas des souches de référence (Lindström et Lehtomaki, 1988 ; Struffi *et al.*, 1998) (Figure 19), et en l'absence de coloration après l'ajout de la poudre de zinc pour nos isolats (décomposition des nitrates jusqu'au stade diazote).



**Figure 34** - Réduction des nitrates par les souches de référence.

**Tableau 08** - résultats de réduction des nitrates par les isolats et les souches de références testées

Souche	S1	S2	S3	<i>R.a. 1</i>	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v.</i>	<i>R.a. 2</i>
Résultats	+	+	+	+	+	+	+	+



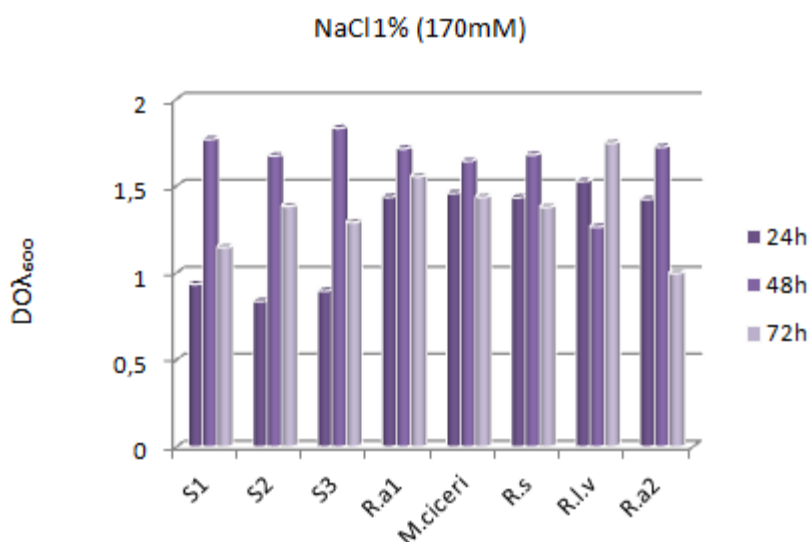
## 5. Influence des facteurs abiotiques

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

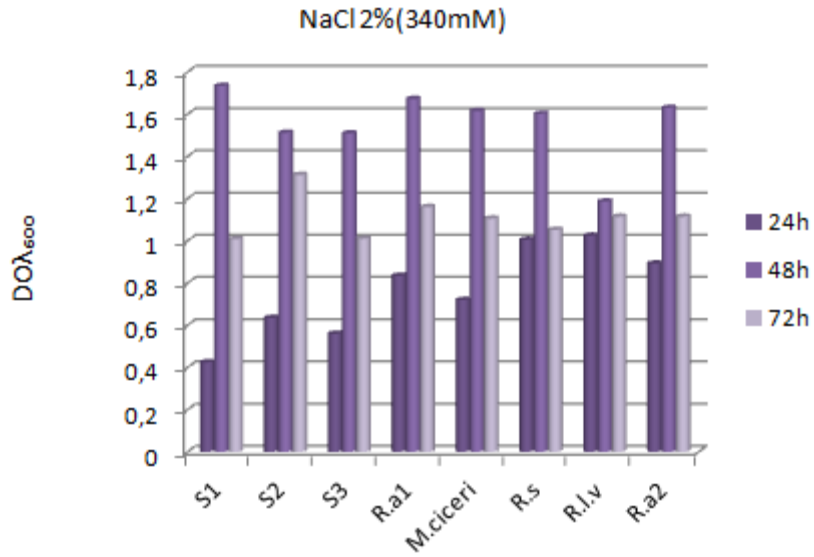
Les stress abiotiques peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des rhizobia à l'état saprophytique (en absence de l'hôte). Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice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

### 5.1. Effet du chlorure de sodium

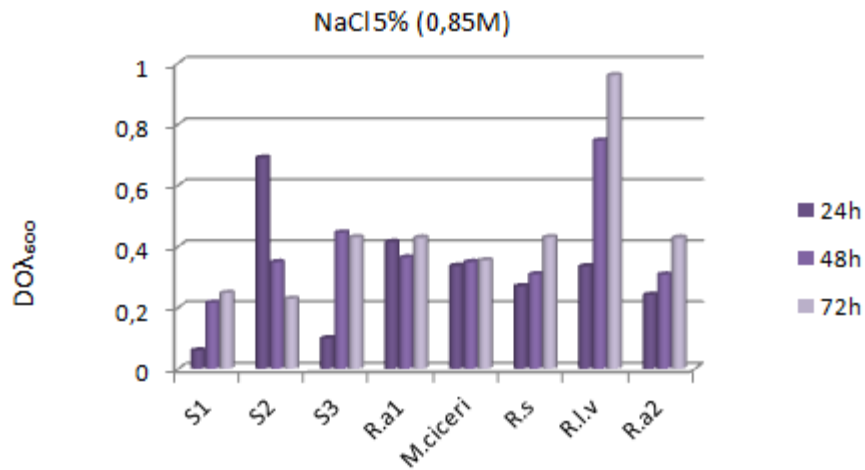
Les souches et isolats tolèrent des concentrations faibles en NaCl (1, 2%). A 5% de NaCl la croissance diminue dans le temps avec l'ensemble des souches. A une concentration de près de 3,5M de NaCl la D.O. mesurée tend à s'annuler et même l'effet d'osmoprotection n'apparaît pas (figures 10, 11,12 et 13).



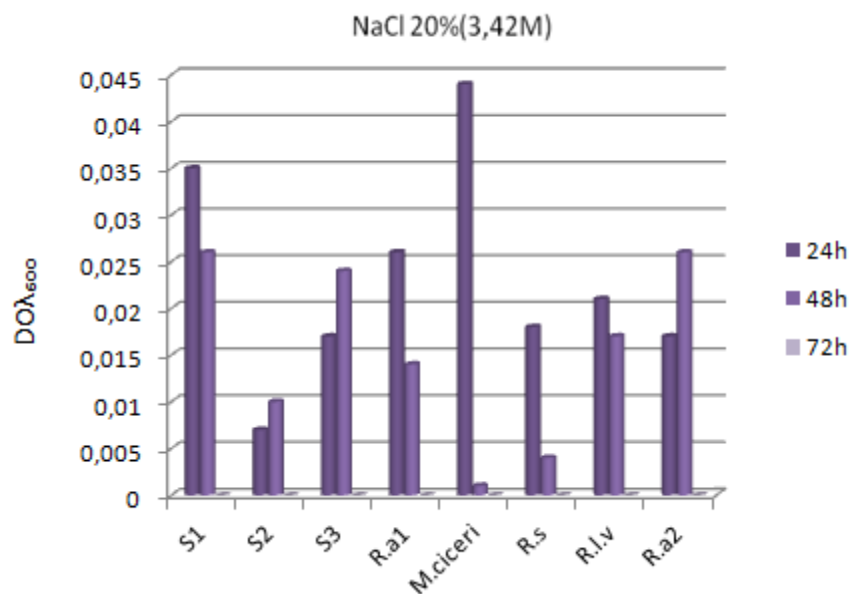
**Figure 35** - Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de référence à une concentration de 1% (170mM).



**Figure 36** - Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de référence à une concentration de 2% (340mM).



**Figure 37** - Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de référence à une concentration de 5% (0,85M).



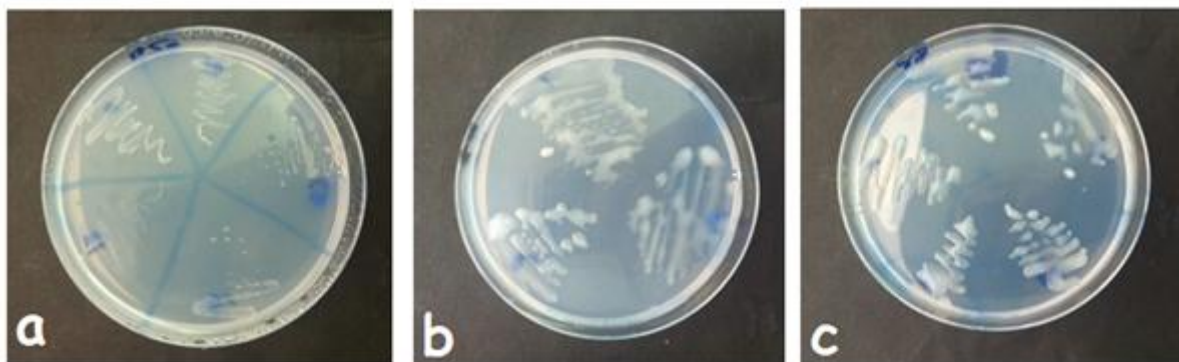
**Figure 38** - Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de référence à une concentration de 20% (3,42M).

## 5.2. Effet de la température

L'intervalle de croissance observé chez les isolats et les souches testés est de 4°C à moins de 45°C. Toutefois l'incubation à 4°C (le réfrigérateur) n'est pas une température stable du fait de sa forte utilisation. Les températures de 20 et 28°C paraissent comme optimales pour le développement des souches et isolats (Figure 20, Tableau 09). Ces résultats rejoignent ceux de Moawad et Beck, (1991), Jordan (1984) et Graham (1992) qui montrent que les rhizobia cultivent bien entre 20°C et 40°C.

Certaines espèces de *Rhizobium* peuvent supporter des températures élevées (Werner, 1992), mais l'exposition aux hautes températures peut mener à la perte du plasmide symbiotique et par conséquent la perte de la capacité infective de la bactérie. Les températures élevées peuvent mener à la réduction du nombre de cellules au-dessous du niveau demandé pour une bonne nodulation. Somasegaran *et al.* (1984) ont pu montrer un déclin graduel de la persistance d'une population de souches de *Rhizobium* incubée à 37°C pendant huit semaines.

Alors qu'il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodulent certaines légumineuses dans les régions arctiques (Lipsanen et Lindström, 1989).



**Figure 39** - croissance des isolats et des souches de référence sur différentes températures :

- a. souches de référence à 4°C ;
- b. isolats à 20°C ;
- c. souches de référence à 28°C.

**Tableau 09** - Résultats d'incubation des souches sur YMA à différentes températures.

	S1	S2	S3	<i>R.a. 1</i>	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v</i>	<i>R.a. 2</i>
4°C	+	+	+	+	+	+	+	+
20°C	++	++	++	++	++	++	++	++
28°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Pas de croissance ; (+) faible croissance ; (++) bonne croissance ; (+++) très bonne croissance.

### 5.3. Effet du pH

En général, les rhizobia sont des bactéries neutrophiles, cependant leur pH optimal de croissance peut varier (El-Hilali, 2006).

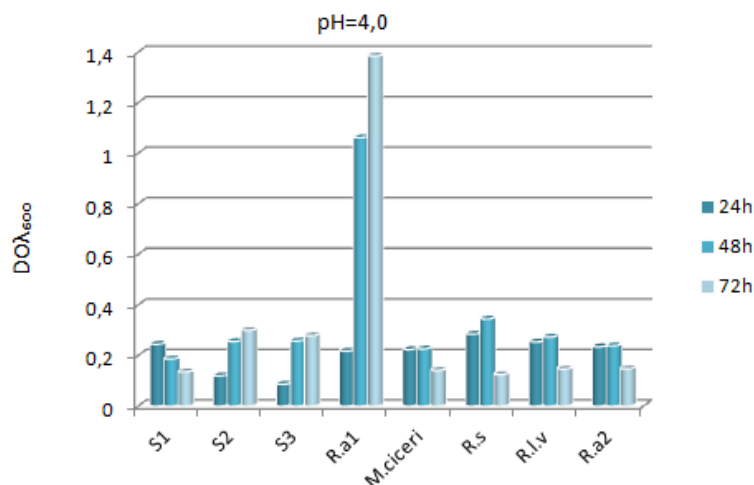
La  $DO_{\lambda 600}$  montre que dans l'ensemble, les isolats et les souches de référence tolèrent majoritairement les trois types de pH utilisés dans cette étude, le pH acide (4,0 ; 5,0), neutre (6,8) et alcalin (8,0 ; 10). Ces résultats concordent avec ceux de Raza *et al.* (2001) qui ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10), et Maatallah *et al.* (2002)

qui ont détecté une croissance de leurs isolats à des valeurs de pH comprises entre 4,0 et 7,5 et plus.

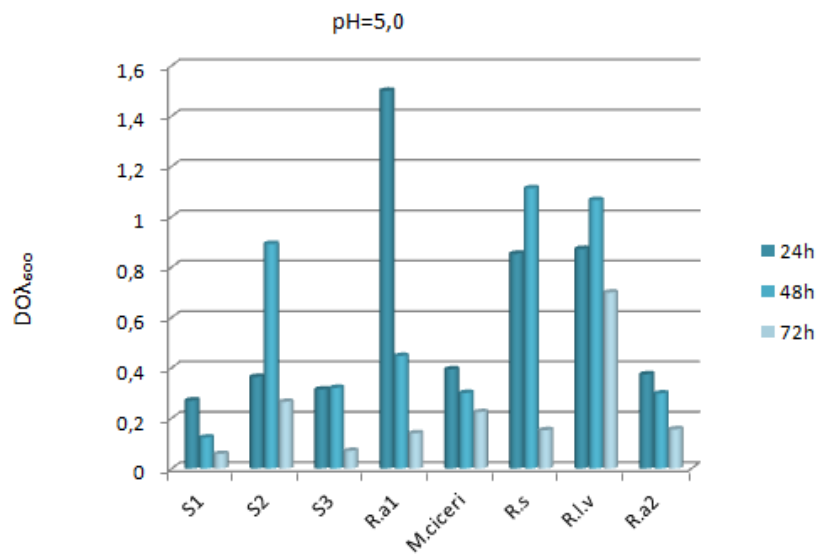
Une croissance optimale de la majorité des isolats est observée au pH neutre, ainsi qu'au pH alcalin (8,0 et 10) (Figure 19). Au pH acide, on observe une croissance moindre.

Les rhizobia adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditions acides du sol (Zahran, 1999). Les mécanismes d'adaptation physiologiques et biochimiques des rhizobiums en milieux acides sont nombreux (O'Hara et Glenn, 1994 ; Graham *et al.*, 1994). Ces mécanismes incluent entre autre l'exclusion et l'expulsion des protons  $H^+$  (Chen *et al.*, 1993), la forte teneur en potassium et en glutamate du cytoplasme des cellules stressées (Aarons et Graham, 1991), le changement de la composition du LPS (Chen *et al.*, 1993), et l'accumulation de polyamines (Fujihara et Yoneyama, 1993). Chez plusieurs bactéries comme *R. leguminosarum* biovar *Trifolii*, ces mécanismes ont été décrits comme étant une réponse adaptative au pH du milieu (Correa et Barneix, 1997). Donc, la sélection des souches de rhizobium plus tolérante au faible pH permet d'améliorer la tolérance des légumineuses à l'acidité (Correa et Barneix, 1997).

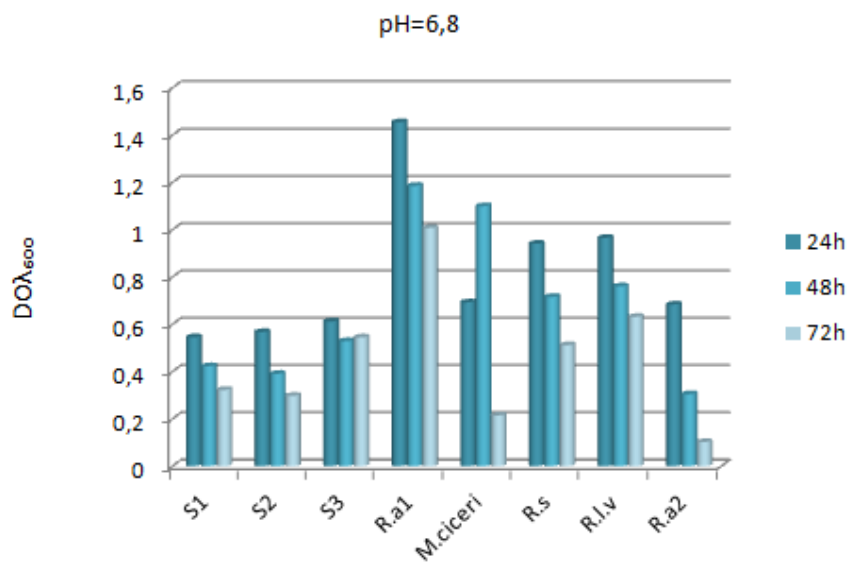
L'alcalinité est moins néfaste pour la survie des rhizobiums. Jordan (1984) a montré que la majorité de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9, ce qui est le cas de tous nos isolats.



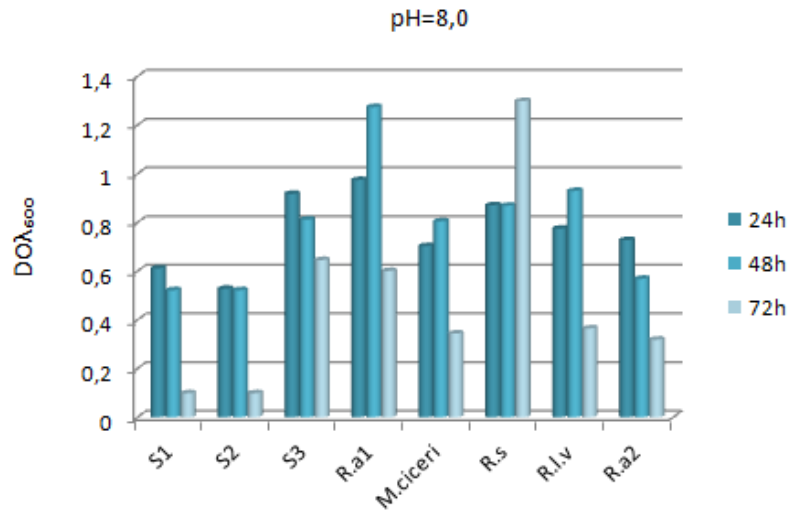
**Figure 40** - Tolérance des isolats et des souches de référence au pH 4.



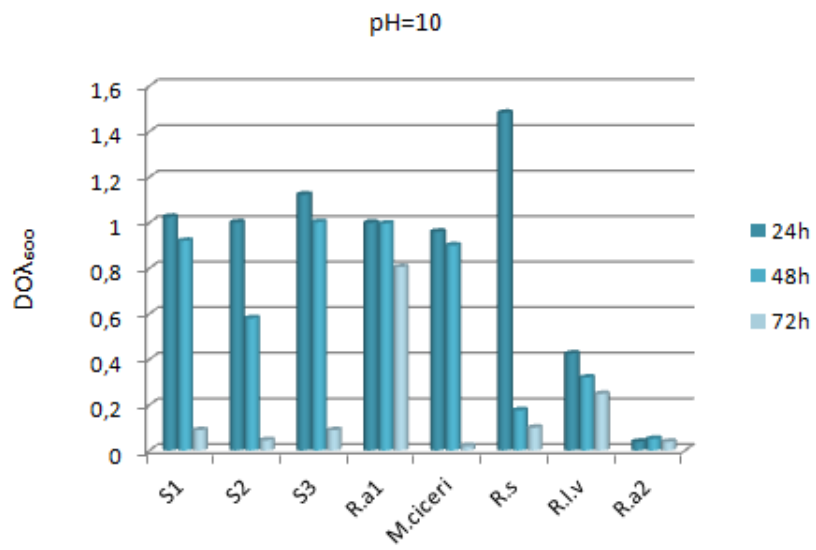
**Figure 41** - Tolérance des isolats et des souches de référence au pH 5.



**Figure 42** - Tolérance des isolats et des souches de référence au pH 6,8.



**Figure 43** - Tolérance des isolats et des souches de référence au pH 8.



**Figure 44** - Tolérance des isolats et des souches de référence au pH 10.

## 6. Résistance intrinsèque aux antibiotiques et aux métaux lourds

### 6.1. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée dans les études rhizobiales en tant que moyen d'identification des souches et est considérée comme un bon trait pour comparer les différentes souches (Beck *et al.*, 1993).

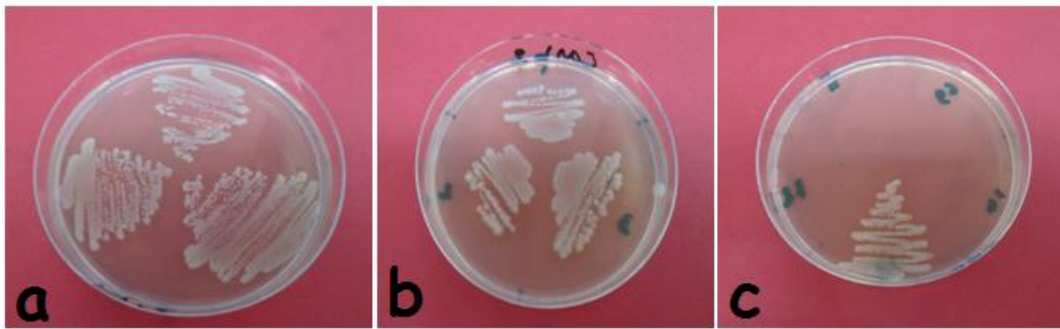
La sélection de souches présentant une résistance multiple aux différents antibiotiques est très intéressante du fait que cette résistance peut être utilisée comme un important marqueur pour l'identification des souches et l'étude de leurs diversité (Josey *et al.*, 1979 ; Shishido et Pepper, 1990 ; Sawada *et al.*, 1990).

Graham *et al.*, (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.

Toutes les souches cultivées sur milieu Mueller Hinton à différentes concentrations de Kanamicine (10 ; 20 et 50µg/ml) et de Chloramphénicol (2,5 ; 5 et 10µg/ml) montrent une sensibilité, c'est-à-dire que la croissance est inhibée en présence de ces deux antibiotiques, sauf la souche *R.a.* 2 qui est plus ou moins sensible à toutes les concentrations de Chloramphénicol (tableau 10).

Les concentrations de 10 à 20 µg/ml des antibiotiques suivant : (erythromycine, carbénicilline, rifamicine, acide nalidixique, Spectinomycine) ne peuvent pas être des concentrations minimales inhibitrices (MIC) vu que nos isolats et souches testés montrent une résistance vis-à-vis ces antibiotiques.





**Figure 45** - Croissance des isolats en présence d'antibiotiques.

- a. Croissance Isolats S1, S2 et S3 sur 10 µg/ml de rifamicine ;
- b. Croissance Isolats S1, S2 et S3 sur 30µg/ml de *carbénicilline* ;
- c. Croissance de *R.a. 2* sur 10 µg/ml de chloramphénicol.

**Tableau 10** - Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents antibiotiques.

Antibiotiques	Souches		Concentration minimale inhibitrice	S1	S2	S3	<i>R.al</i>	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v</i>	<i>R.a2</i>
	Concentrations										
Erythromycine	10 µg/ml	>20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20 µg/ml		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chloramphénicol	2.5 µg/ml	<2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	5 µg/ml		-	-	-	-	-	-	-	-	+
	10 µg/ml		-	-	-	-	-	-	-	-	+
Carbenicilline	10 µg/ml	>50	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30 µg/ml		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50 µg/ml		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kanamycine	10 µg/ml	<10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20 µg/ml		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50 µg/ml		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spectinomycine	5 µg/ml	>10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 µg/ml		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rifamicine	5 µg/ml	>10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 µg/ml		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acide nalidixique	100 µg/ml	>200	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200 µg/ml		+	+	+	+	+	+	+	+	+

## 6.2. Résistance intrinsèque aux métaux lourds

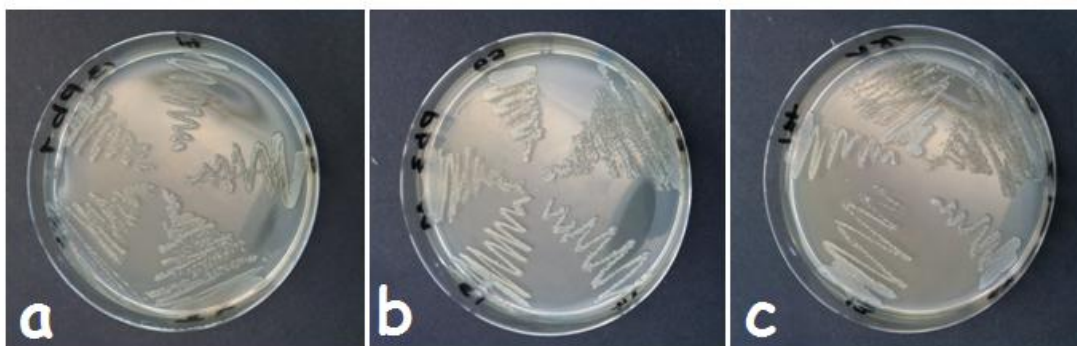
Les bactéries à Gram négatif sont tolérantes à des concentrations élevées de métaux lourds, alors que les bactéries à Gram positif ne le sont pas (Barkey *et al.*, 1985).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches tolèrent toutes les concentrations des métaux lourds testés sauf qu'en présence de Mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) avec concentrations minimales ou faibles (1 ; 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ ), ainsi que la totalité des souches montrent une sensibilité en présence de Zinc avec concentration  $>100$  cela veut dire que le zinc et le mercure peuvent être les métaux les plus toxiques à des concentrations plus élevées (tableau 11).

La nature du sol et son pH peuvent influencer la précipitation ou la solubilité des minéraux. Sous forme ionique, un métal devient plus mobile et donc plus toxique. L'effet combiné du pH et des métaux lourds sur une population de *Rhizobium leguminosarum* et sur son potentiel fixateur d'azote s'est révélé plus néfaste sous les conditions d'acidité (Ibekwe *et al.*, 1997).

Certaines associations rhizobium-légumineuse sont capables de se maintenir sur des sols à haut contenu en métaux lourds. En effet, l'inoculation des graines de trèfle cultivées sous stress métallique par des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* efficaces et résistantes aux métaux lourds a pu augmenter le taux de la fixation d'azote (Giller *et al.*, 1989).

La sélection de souches résistantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Plusieurs recherches se penchent actuellement sur l'utilisation de la symbiose entre des rhizobias et des légumineuses résistantes comme un moyen efficace de "bio-remédiation" contre la contamination des sols par les métaux lourds. En outre, l'utilisation du rhizobium comme un agent de prévention dans les sols contaminés a été récemment rapportée par Abbas et Kamel (2004).



**Figure 46** - Croissance des isolats en présence des différents étiaux lourds.

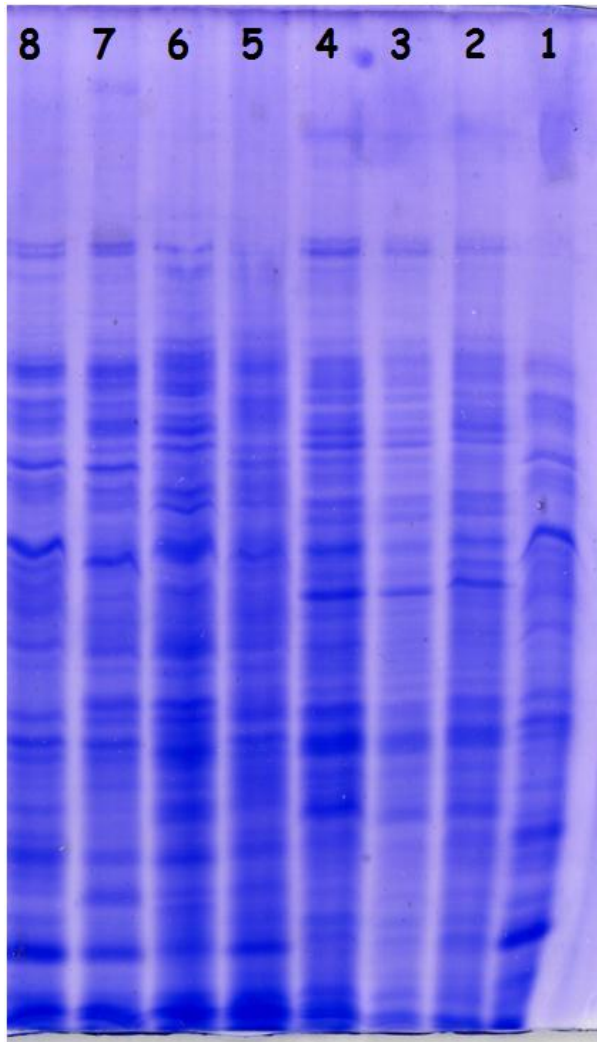
- a. Croissance des souches témoins sur 500µg/ml de plomb ;
- b. Croissance des souches témoins sur 200µg/ml de plomb ;
- c. Croissance des souches témoins sur 100µg/ml de plomb ;

**Tableau 11** - Concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents métaux lourds.

Métaux lourds	Concentrations	Concentration minimale inhibitrice	S1	S2	S3	<i>R.a1</i>	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v</i>	<i>R.a2</i>
Cuivre	200 µg/ml	>1000	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	500 µg/ml		++	++	++	+	++	++	++	++
	1000 µg/ml		+	+	+	++	+	+	+	+
Cadmium	20 µg/ml	>100	+	+	+	+	+	+	+	+
	40µg/ml		+	+	+	++	++	++	++	++
	100µg/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
Mercure	1µg/ml	<1	-	-	-	+	-	-	-	-
	5µg/ml		-	-	-	+	-	-	-	-
	10µg/ml		-	-	-	+	-	-	-	-
Zinc	100µg/ml	>100	+	+	+	+	+	+	+	+
	200µg/ml		-	-	-	-	-	-	-	-
	500µg/ml		-	-	-	-	-	-	-	-
Plomb	500µg/ml	>200	++	++	++	++	++	++	++	++
	100µg/ml		++	++	++	++	++	++	++	++
	200µg/ml		++	++	++	++	++	++	++	++

## 7. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

Dans une cellule bactérienne, il y a plus de 2000 protéines différentes, ce qui constitue une source d'information très riche pour la caractérisation et l'identification et donc la connaissance d'un organisme bactérien (Ndiaye *et coll.*, 2002).



1. *R.a.1 (Rahnella aquatilis)* ;
2. isolat S1 ;
3. isolat S2 ;
4. isolat S3 ;
5. *M.c. (Mesorhizobium ciceri)* ;
6. *R.s. (Rhizobium sullae)* ;
7. *R.l.v. (R. leguminosarum bv viceae)* ;
8. *R.a.2 (Rahnella aquatilis)*.

**Figure 47** - Profil SDS-PAGE des protéines totales (12%).

La comparaison visuelle des profils protéiques a permis en premier lieu de déterminer la présence ou l'absence des bandes protéiques pour chaque isolat (Tableau 12).

**Tableau 12** - Présence et absence des bandes protéiques pour chaque isolat.

Bandes	Puits 1 <i>R.a 1</i>	Puits 2 <i>S1</i>	Puits 3 <i>S2</i>	Puits 4 <i>S3</i>	Puits 5 <i>M.c</i>	Puits 6 <i>R.S.</i>	Puits 7 <i>R.l.v</i>	Puits 8 <i>R.a 2</i>
Bande 1	0	0	0	0	0	0	1	0
Bande 2	0	1	1	1	0	1	0	0
Bande 3	0	0	0	1	0	0	0	0
Bande 4	0	1	1	1	0	0	1	1
Bande 5	0	1	1	1	1	1	1	1
Bande 6	0	0	1	1	0	1	0	1
Bande 7	0	1	1	1	1	1	1	0
Bande 8	0	0	0	0	1	1	0	1
Bande 9	0	1	1	1	1	1	1	1
Bande 10	0	0	0	0	1	1	1	1
Bande 11	1	1	1	1	1	1	0	0
Bande 12	1	0	0	0	1	1	1	1
Bande 13	0	1	1	1	0	1	1	0
Bande 14	0	0	0	0	0	0	1	0
Bande 15	1	1	1	1	1	1	1	1
Bande 16	1	1	1	1	1	1	1	1
Bande 17	0	1	1	1	0	1	1	1
Bande 18	0	1	1	1	0	1	1	0
Bande 19	1	1	1	1	1	0	1	1
Bande 20	1	1	1	1	1	0	0	0
Bande 21	1	1	1	1	1	0	1	1
Bande 22	1	0	0	0	1	1	1	1
Bande 23	1	1	1	1	1	1	1	1
Bande 24	1	1	1	1	0	1	0	0
Bande 25	0	1	1	1	0	1	0	0
Bande 26	0	0	0	0	0	1	1	0
Bande 27	1	1	1	1	1	1	1	1
Bande 28	1	0	0	0	1	0	1	1
Bande 29	1	1	1	1	0	1	0	0
Bande 30	1	0	0	0	0	1	1	1
Bande 31	0	1	1	1	1	1	0	1
Bande 32	1	1	1	1	1	1	0	0
Bande 33	0	1	1	1	0	1	0	1
Bande 34	1	0	0	1	1	0	0	1
Bande 35	1	0	0	0	0	1	1	1
Bande 36	1	1	1	1	1	1	0	0
Bande 37	1	1	1	1	0	0	0	1
Bande 38	1	1	1	1	1	1	0	0
Bande 39	0	0	0	0	1	1	1	1
Bande 40	1	0	0	0	1	0	0	0
Bande 41	1	1	1	1	1	1	1	1

Le degré de ressemblance entre les profils protéiques de chaque paire de souches est déterminé par le calcul du coefficient de Jaccard ( $S_J$ ) (Prescott *et al.*, 2003) selon la formule suivante :

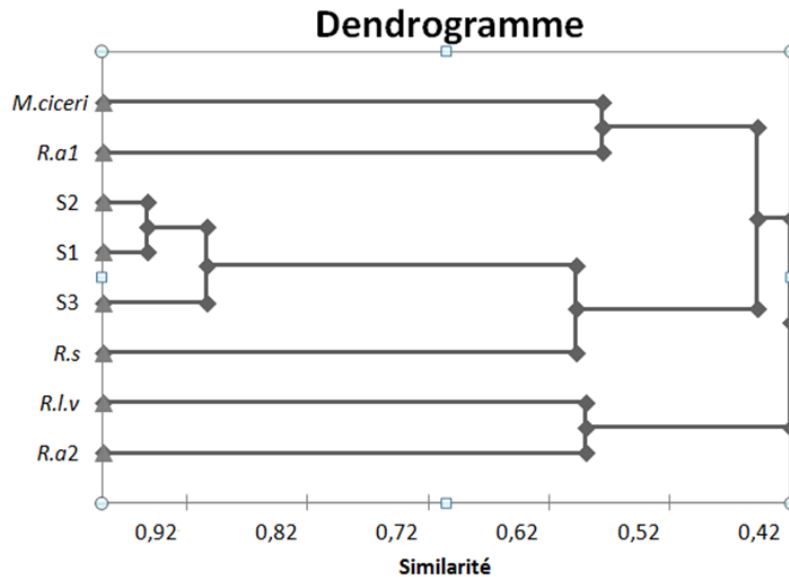
$$S_J = a / (a+b+c)$$

- (a) étant le nombre de bandes présentes pour les deux souches (1) ;
- (b) et (c) étant le nombre de bandes différentes (1,0 ou 0,1) entre les deux souches.

Le coefficient d'association est alors arrangé en une matrice de similitude qui compare chacune des huit souches bactériennes entre elles.

**Tableau 13** - Matrice de similitude des profils protéiques.

	<i>R.a1</i>	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	<i>M.cicer</i>	<i>R.s</i>	<i>R.l.v</i>	<i>R.a2</i>
<i>R.a1</i>	1	0,455	0,441	0,457	0,586	0,405	0,353	0,438
Isolat 1	0,455	1	0,963	0,897	0,471	0,600	0,389	0,389
Isolat 2	0,441	0,963	1	0,931	0,457	0,629	0,378	0,417
Isolat 3	0,457	0,897	0,931	1	0,472	0,595	0,359	0,432
<i>M.cicer</i>	0,586	0,471	0,457	0,472	1	0,500	0,455	0,548
<i>R.s</i>	0,405	0,600	0,629	0,595	0,500	1	0,500	0,500
<i>R.l.v</i>	0,353	0,389	0,378	0,359	0,455	0,500	1	0,600
<i>R.a2</i>	0,438	0,389	0,417	0,432	0,548	0,500	0,600	1



**Figure 48** - Dendrogramme du profil protéique sur SDS-PAGE des isolats et souches de référence après analyse numérique par le logiciel XL STAT.

A partir de la matrice de similarité et du dendrogramme qui en découle, on observe trois groupes ou phénons. Le premier regroupe *Mesorhizobium ciceri* et *Rahnella aquatilis*, tous deux isolés à partir des racines de *Cicer arietinum* de deux sites différents (Dekkiche, in press). Le second regroupe les isolats, S1, S2 et S3, isolés à partir des racines de *Trifolium repens*. Le profil des isolats se rapproche de *Rhizobium sullae* de presque 60%, isolé à partir des racines de *Hedysarum coronarium* (Squartini *et al.*, 2002). Enfin le troisième groupe englobe deux souches appartenant à des familles différentes (*Rhizobiaceae*, *Enterobacteriaceae*).

## Conclusion

A partir des résultats obtenus et des caractères phénotypiques recherchés, on peut donner les arguments suivants : en comparaison avec les souches de référence utilisées et appartenant aux familles des rhizobia et B.N.L., les isolats présentent les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques similaires aux précédentes. En effet les colonies sur YMA (avec ou sans rouge Congo) sont en accord avec les auteurs cités (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994, Jordan, 1984). Il en est de même de l'aspect microscopique.

Les isolats et souches ont subi certains tests relatifs aux rhizobia et B.N.L. notamment la vitesse de croissance et la faible absorption du colorant, le rouge Congo. Il apparaît que l'ensemble des bactéries répondent favorablement à ces critères. En effet elles ont une croissance rapide visible sur milieu YMA additionné de bleu de bromothymol et absorbent très peu le rouge Congo sur milieu YMA + rouge Congo à 0.25 et 0.0025%.

La totalité des souches et isolats secrètent les enzymes nécessaires au processus d'infection (cellulase) ou au métabolisme azoté (uréase et nitrate-réductase). La recherche de la pectinase, outil indispensable pour l'infectivité, n'a pas été réalisée par manque de réactifs.

Par ailleurs et conformément à la bibliographie (Jordan, 1984) toutes les souches bactériennes assimilent parfaitement tous les mono- et disaccharides utilisés (exception faite pour le Xylose) et l'ensemble des acides aminés comme source d'azote. En se référant à la même source bibliographique (Jordan, 1984) elles n'ont pas besoin de vitamines comme facteur de croissance (cf. croissance en présence et en absence de Thiamine et Panthoténate-Ca).

L'influence des facteurs abiotiques stressants, l'effet du NaCl, pH et température, s'illustre négativement à concentration élevée de sel (20%) et à température élevée (45°C). Effectivement les souches résistent aux concentrations de 5%, aux pH basiques où l'on note une croissance maximale à pH 8 et 10.

Isolées à partir des racines de plante, donc du sol, les bactéries sont souvent confrontées à la toxicité relative des métaux lourds telluriques. Nos tests montrent que l'ensemble des souches



sont inhibées par le Mercure et le Zinc (aux concentrations indiquées, et aux fortes concentrations de Zinc). Toutefois on observe une résistance aux concentrations utilisées de Mercure pour *Rahnella aquatilis*, une entérobactérie isolée partir des racines de *Cicer arietinum*.

L'usage d'antibiotiques est nécessaire pour le marquage des bactéries en vue d'une introduction dans le sol moins fertile en azote. Les bactéries sont cultivées sur Mueller-Hinton en présence d'antibiotiques à différentes concentrations. La M.I.C. est variable selon l'antibactérien. Au vu des résultats on observe une inhibition des souches par la Kanamycine et le Chloramphénicol. Pour ce dernier, seule l'entérobactérie, *Rahnella aquatilis* a pu croître à toutes les concentrations de cet antibiotique.

A ces critères phénotypiques précédemment cités, on associe le profil protéique SDS-PAGE des souches et isolats. Ce paramètre taxonomique est indispensable pour une éventuelle position de nos isolats en présence des souches de référence. Le profil obtenu et illustré dans le dendrogramme établi indique que nos isolats ont une similarité de 60% avec une espèce de *Rhizobium* isolée à partir d'une légumineuse fourragère très répandue dans le site du constantinois, *Rhizobium sullae* (Squartini, 2002). Mais toujours est-il que ce profil SDS-PAGE montre un polymorphisme entre les isolats et souches de *Rhizobium* de référence.

A partir de ces données expérimentales et des résultats qui en découlent et, en se basant sur les critères morpho-cultureux, nutritionnels et biochimiques, on peut inclure nos isolats dans la famille des *Rhizobiaceae* ou B.N.L. Seules les techniques moléculaires et phylogénétiques sont en mesure de préciser le genre, l'espèce et éventuellement le biovar.

**Aarons S.R. et Graham P.H., 1991.** Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. *Plant Soil*. 134 : 145-151.

**Abbas S.M. et Kamel E.A., 2004.** *Rhizobium* as a Biological Agent for Preventing heavy Metal Stress. *Asian J. Plant Sc.* 3, 416-424.

**Alexander M., 1985.** Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. *Adv. Microbial Ecology*. 8 : 163-183.

**Allen E.K. et Allen O.N., 1950.** Biochemical and symbiotic properties of the *Rhizobia*. Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, Madison.

**Andriankaja A.H., 2002.** Mise en évidence des opportunités de développement de la riziculture adoption du Sri, et évaluation de la fixation biologique de l'azote. Université d'Antananarivo.

**Ayres J.F., Davies H.L., Farquharson R.J. et Murison R.D., 2000.** The contribution of pasture research for animal production from legume-based pastures in temperate Australia. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 13 (suppl. 2000B) : 1-4.

**Bado D.V., 2002.** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor.

**Balachandar D., Balachandar., Raja P., Kumar K. et Sundaram S.P., 2007.** Nonrhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 2 (2) : 049-057.

**Barkey T., Tripp S.C. et Olson B.T., 1985.** Effect of metal rich sewage sludge application on bacterial communities of grass land soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 : 333-337.

- Baudoin J-P., 2001.** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 5(4) : 221-230.
- Beck D.P., Materon L.A. et Afandi F., 1993.** Pratical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. ICARDA. Syria.
- Beijerinck M.W., 1888.** Die Bacterien der papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung*. 46, 797-804.
- Bélangier E., 1998.** Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium* sp. (*Oxytropis Arctobla*) souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.
- Benguedouar A., 2000.** Etude de la symbiose : *Rhizobium*–*Hedysarum coronarium*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie.
- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. et Squartini A., 2004.** Gamma Proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*. 27, 462-468.
- Bhat M.K. et Bhat S., 1997.** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotech, advan*. 15: 583-620.
- Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C. et Talini L., 2006.** Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG*. 6 : 97-110.
- Brewin N.J., Downie J.A. and Young J.P.W., 1992.** Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology*, M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New york. 3 : 239-248.

**Campbell N.A. et Reece J.B., 2004.** Biologie. 2<sup>ème</sup> Edition de Boeck, Quebec.

**Chen H., Richardson A.E. et Rolfe B.G., 1993.** Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 1798-1804.

**Chen W.M., James E.K., Prescott A.R., Kirans M. et Sprent J.I., 2003.** Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 16, 1051-1061.

**Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., DeVos P., Mergeay M. et Vandamme P., 2001.** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 1729-1735.

**Chen W.X., Yan G.H. et J.L., 1988.** Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 : 3926-397.

**Corich V., Giacomini A., Ollero F.J., Squartini A. et Nuti M.F., 1991.** Pulsed-field electrophoresis in contour-clamped homogeneous electric fields (CHEF) for the fingerprinting of *Rhizobium* spp. *FEMS*, 1991.

**Correa O.S. et Barneix A.J., 1997.** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13 pp 153-157.

**Coyne V.E., Diane M.J., Reid S.J. et Rybicki E.P., 2002.** Molecular Biology Techniques Manual: SDS POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE). University of Cape Town. Dept Microbiology.

**Crush J.R., 1987.** Nitrogen fixation. In "White Clover", MJ Baker, WM Williams, eds. CAB International, Wallingford. pp 185-201.

**Cruz-Sanchez J.M., Velázquez E., Mateos P.F. et Martínez-Molina E., 1997.** Enhancement of resolution of low molecular weight RNA profiles by staircase electrophoresis. *Electrophoresis*. 18 : 1909-1911.

**Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris.

**Dazzo F.B., 1995.** <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrr0101.html>

**De Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willims A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B. et Gillis., 1998.** *Allorhizobium undicola* gen. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *J. Syst. Bacteriol.* 48 : 1277-1290.

**De Ley J., Cattoir H. et Reynaerts A., 1970.** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12 : 133-142.

**Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J. et Boivin C., 2001.** *nod* Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica Minireview*. 48 (2) : 359-365.

**Delarras C., 2007.** Milieux de culture et tests pour l'identification bactérienne. In *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. TEC et DOC, EM inter. Pp 126-172. ISBN : 978-2-7430-0945-8.

**Demezas D.H., Reardon T.B., Strain S.R., Watson, J.M. et Gibson A.H., 1995.** Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum*. *L. Mol. Ecol.* 4 : 209-220.

**Dénarié J., Boistard P., Casse-Delbart F., Atherly A.G., Berry J.O. et Russell P., 1981.** Indigenous plasmids of *Rhizobium*. *Int. Rev. Cytol.* 13: 225–246.

**Dénarie J., Debelle F. et Prome J.C., 1996.** *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors : signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 503-535.

**Dreyfus B., Garcia J.L. et Gillis M., 1988.** Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. Nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 : 89-98.

**Dupuy Y. et Nougier P., 2005.** Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses. Paris.

**El Essawi T.M. et Abdelghaffar A.S., 1967.** Cultural and symbiobiotic properties of rhizobia from egyptian Clover (*Trifolium alexandinum*). *J. Appl. Bact.* 30 (2) : 354-361.

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

**Ellison N.W., Liston A., Steiner J.J., Williams W.M. and Taylor N.L., 2006.** Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium-Leguminosae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 39 : 688-705.

**Franck B ., 1889.** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte Der Deutschen. *Botanischen Gesellschaft.* 7, 332-346.

**Frontier S., Piched-Viale D., Leprêtre A., Davoult D. et Luczak C., 2004.** Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution. 3<sup>ème</sup> Edition Dunod, Paris.

**Fujihara S. et Yoneyama T., 1993.** Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 1104-1109.

**Gage, D.J., 2004.** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2) : 280–300.

**Gauthier D., 2009.** Introduction aux techniques utilisées en biochimie. Groupe AFNOR, <http://www.chimiebiochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/electro.html>, dernière mise à jour : 19 juin 2009.

**George M., Garrity D., Boone R. et Richard W., 2005.** Bergy's Manual of Systematic Bacteriology .Volume II. Deuxième édition : Library of Congress.

**Giller K.E., McGrath S.P. et Hirsch P.R., 1989.** Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* 21, 841-848.

**Graham P.H., 1992.** Stress tolerance *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. microbial.* 38 : 475-484.

**Graham P.H., Draeger K., Ferrey M.L., Conroy M.J., Hammer B.E., Martinez E., Naarons S.R. et Quinto C., 1994.** Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* 40 : 198-207.

**Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnet Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., Deley D.J., Jarvis B.D.W., RoslyCcky E.B., Strijdom B.W. et Young J.P.W., 1991.** Proposed

minimal standards for the description of new genera and species of root-and stemnodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 582-587.

**Grimont P.A.D., Popoff M.Y., Grimont, F., Coynault C. et Lemelin M., 1980.**

Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* 4 : 325-330.

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

**Haukka K. et Lindstrom K., 1994.** Pulsed-field gel electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. *FEMS Microbiol. Lett.* 119,215-220.

**Heller R., Esnart R. et Lance C., 1989.** Physiologie végétale. 4<sup>ème</sup> Edition Masson, Paris.

**Hirsch P.R., 1996.** Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.* 133 : 159-171.

**Höfle M.G., 1988.** Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Methods.* 8 : 235-248.

**Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de Boeck.

**Hu C.Y., Tseng W.S., Hseih C.L., Chen Y.C., Cheng H.L. et Yang S.S., 2009.** Electron microscopy analysis of carboxymethylcellulase in rhizobia. *Soil. Boil. Biochem.* 41 ; 431-434.

**Ibekwe A.M., Angle J.S., Chaney R.L. and Vonberkum P., 1997.** Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric. Ecosyst. Environ.* 61, 103-111.



ITIS, 2011. [http://eol.org/pages/703436/hierarchy\\_entries/52871969/overview](http://eol.org/pages/703436/hierarchy_entries/52871969/overview)

ITIS, 2011.

[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=26206](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26206)

**Jahufer Z., Rogers H., Rogers M.-J. et 2001.** White clover. Department of Natural Resources and Environment, Victoria.

**Janssen P.H., 2006.** Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 : 1719-1728.

**Jarvis B.D. et Tighe S.W., 1994.** Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant and Soil*, 161 : 31–41.

**Jarvis B.D.W., Sivakumaran S., Tighe, S.W. et Gillis M., 1996.** Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant and Soil*, 184 : 143–158.

**Jarvis B.D.W., Mc lean T.S., Robertson I.G.C. et Fanning G.R., 1977.** Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20,42-52.

**Jarvis B.D.W., Van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J. C. et Gillis M., 1997.** Transfer of *rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 : 895-898.

**Joffin J.N. et Leyval G., 2006.** Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome1, 4<sup>e</sup> édition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne.

**Johnson J.L., 1984.** Bacterial classification. III. Nucleic acids in bacterial classification. Dans Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Sous la direction de : N.R. Krieg et J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. p 8–11.

**Jones D. et Krieg N.R., 1984.** Serology and chemotaxonomy. Dans Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Sous la direction de : N.R. Krieg et J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. p 15–18.

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

**Jordan D.C., 1984.** Family III. *Rhizobiaceae*. In Kreig N.R. and Holt J.H. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1 the Williams & Wilkins Co. Baltimore, p234-256.

**Josey D.P., Beynon J.A., Jonston W.B. et Beringer J.E., 1979.** Strain identification of *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 46, 343-350.

**L'Abbé Coste, 2011.** eFlore, la flore électronique de Tela Botanica.

**Laemmli U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.

**Lane L.A., Ayres J.F. and Lovett J.V., 1997.** A review of the introduction and use of white clover (*Trifolium repens* L.) in Australia - significance for breeding objectives. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 37 : 831-839.

**Laranjo M., Branco C., Soares R., Alho L., Carvalho M.D.E. et Oliveira S., 2002.** Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *J. Appl. Microbiol.* 92 : 1043-1050.

**Lin., Dong Xu., Wang., En Tao., Tang., Hui., Han., Tian Xu., He., Yu Rong., Guan., Su Hua., Chen. et Wen Xin., 2008.** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008 58 : 1409-1413.

**Lindström K. et Lehtomäki S., 1988.** Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensitivity of *rhizobium* sp. (*Galega*) compared with others fastgrowing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50, 277-287.

**Lipsanen P. et Lindström K., 1989.** Lipopolysaccharides and protein patterns of *Rhizobium* sp. (*Galega*). *FEMS Microbiol. Lett.* 58, 323-328.

**Lucinski R., Polcyn W. et Rotayczak L., 2002.** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimia Polonia.* 49 (2) : 537-546.

**Ludwig W. et Klenk H.P., 2001.** Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: R.W. BDRaC (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer-Verlag, New York, N.Y. edn. pp 49-65.

**Lupwayi N.Z. et Haque I., 1994.** *Legume-Rhizobium* Technology Manual. Environmental Science Division, International Livestock Center for Africa Addis Ababa, Ethiopia, p 97.

**Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J. et Lluch C., 2002.** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22 : 321-329.

**Machrafi Y., 2001.** Inhibition de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.

**Mantelin S., Fischer-Le Saux M., Zakhia F., Béna G, Bonneau S., Jeder H., de Lajudie P. et Cleyret-Marel J.C., 2006.** Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots : *Phyllobacterium bourgogense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov., and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(4) : 827-839.

**Martinez-Romero E., Segovia L., Meercante F.M., Franco Graham P. et Pardo M.A., 1991.** *Rhizobium tropicia* novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J. Syst. Bacteriol.* 41, 417-426.

**Mobley L.T.H., 1992.** Urease Microbial. J. Lederberg (ed). Encyclopedia of microbiology. 4 : 327-346.

**Moulin L., Munive A., Dreyfus B. et Boivin-Masson C. ,2001.** Nodulation of legumes by members of the  $\beta$  subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411, 948-950.

**Mulongoy K. et Elkan G.H.,1977.** Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen fixing efficiency. *J. Bacterial.* 131 : 179-187.

**Munns D.N., 1968.** Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil.* 29, 33-49.

**Ndiaye A.A., Sylla S.N., Gueye M., Delajudie P. et Ndoye I., 2002.** Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des Rhizobiums d'*Acacia tortilis* (Forsk) Hayne subsp. *Raddiana* (Savi). Brenan. *African Journal of Science and Technology*. Science and Engineering Series 3 (1) : 33-43.

**Nuti M.P., Ledebouer A.M., Lepidi A.A. et Schilperoot R.A., 1977.** Large plasmids in different *Rhizobium* species. *J. Gene Microbiol.* 100 : 241-248.

**O'Hara G.W. and Glenn A.R. 1994.** The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 161 : 286-292.

**Pagano M.C., 2008.** Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54, 2008 (11) pp 498–508.

**Parent L.E., 1999.** Notes de cours de Fertilisations des sols. Département des sols et de génie agroalimentaire, Université Laval, Québec In : Villeneuve S., 1999. Fertilisation azotée et utilisation de tests rapides de dosage des nitrates dans la production brocoli. Mémoire présenté à la faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de maitre des sciences (M.Sc.).

**Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S. and Iaccarino M., 2004.** Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* 234, 201-262.

**Patt T.E., Cole G.E. et Hanson R.S., 1976.** *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 26, 226-229.

**Pedro F., Mateos P.F, Jimenez-Zurdo J.I, Chen J., Squartini A.S., Haack S.K., Martinez-Molina E., Hubbell D.H. et Dazzo F.B., 1992.** Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Département of Microbiology, Michigan State University, East Lansing 48824

**Pelmont J., 1995.** Bactérie et environnement. Vol 2. Office des Publication Universitaire. Grenoble.

**Pelmont J., 1995.** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presse universitaire de Grenoble.

**Pelmont J., 2005.** Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.

**Perry J.J., Staley J.T. et Lory S., 2004.** Microbiologie. Edition Dunod, Paris.

**Pinero D., Martinez-Romero E. et Selander R.K., 1988.** Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2825-2832.

**Plantes et botanique, 2014.** [http://www.plantes-botanique.org/biologie\\_04\\_0\\_le-systeme-racinaire](http://www.plantes-botanique.org/biologie_04_0_le-systeme-racinaire)

**Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M. et Dusart J., 2003.** Microbiologie, 2ème Édition, Traduit par : Claire-Michèle Bacq-Calberg, Jean Dusart, Éditeur De Boeck Université, 2003. 1164 p.

**PSmicrographs., 2010.** <http://www.psmicrographs.co.uk/>.

**Rasanen L.A., 2002.** Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

**Raven P.H., Evert R.F. et Eichlorn S.E., 2000.** Biologie végétale. 6ème Edition de Boeck, Paris.

**Raven P.H., Johnson G.B., Mason K.A., Losos J.B. et Singer S.S., 2011.** Biologie. Edition De Boeck Supérieur. p793.

**Raza S., Jørnsgard B., Abou-Taleb H. et Christiansen J.L., 2001.** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology.* 32 (6 : 379-383).

**Rivas R., Willems A., Subba-Rao N.S., Mateos P.F., Dazzo F.B., Kroppenstedt R.M., Martinez-Molina E., Gillis M. et Velazquez E., 2003.** Description of *Devosia neptunia* sp. Nov. That nodulates and fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.* 26 : 47-53.

**Roberts G.P., Leps W.T., Silver L.E. et Brill W.J., 1980.** Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 414-422.

**Rodriguez J., Freire J.R.J. et Schrank I., 1987.** Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Mircen Journal.* 3 : 289-295.

**Sawada Y. Miyashita K. et Yokoyama T., 1990.** Diversity within serogroups of Japanese isolates of *Bradyrhizobium* as indicated by intrinsic antibiotic resistance. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30, 501-504.

**Schleifer K.H. et Ludwig W., 1989.** Phylogenetic relationships of bacteria. The hierarchy of life. Sous la direction de : B. Fernholm, K. Bremer et H. Jörnvall. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 103-117.

**Schleifer K. H. et Kandler O., 1972.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, 407-477.

**Shishido M. et Pepper I.L., 1990.** Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 22, 11-16.

**Simms E.L. et Taylor D.L., 2002.** Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and rhizobia. *INTEG. Et COMP. BIOL.*, 42 : 369-380.

**Smit G., Kijne J.W. et Lugtenberg B.J., 1986.** Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* 168, 821-827.

**Smit G., Kijne J.W. et Lugtenberg, B.J., 1987.** Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup> dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* 169, 4294-4301.

**Smit G., Logman T.J., Boerrigter M.E., Kijne J.W. et Lugtenberg B.J., 1989.** Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca<sup>2+</sup> dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. *J. Bacteriol.* 171, 4054-4062.

**Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook for *Rhizobia*. Springer verlage. New York.

**Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S. et Nuti M.P., 2002.** *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 52 : 1267-1276.

**Stackebrandt E. et Goebel B.M., 1994.** Taxonomic note: A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4) : 846-849.

**Stackebrandt E. et Liesack W., 1993.** Nucleic acids and classification. Handbook of new bacterial systematics. Sous la direction de : M. Goodfellow et A.G. O'Donnell. Academic Press Ltd., London. pp. 151–194.



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

**Suzuki K., Goodfellow M. et O'Donnell A.G., 1993.** Cell envelopes and classification. Handbook of new bacterial systematics. Sous la direction de : M. Goodfellow et A.G. O'Donnell. Academy Press, Ltd., London. pp. 195-250.

**Tan Z.Y., Wang E.T., Peng G.X., Zhu M.E., Martinez-Romero E. et Chen W.X., 1999.** Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49 : 1457-1469.

**Teather R.M. et Wood P.J., 1982.** Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.

**Terefework Z., 2002.** Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of *Rhizobium*-legume symbiosis. ACADEMIC DISSERTATION IN MICROBIOLOGY. University of Helsinki. ISSN 1239-9469.

**Tortora G.J., Funk B.R. et Case C.L., 2003.** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Nb de pages 945.

**Tourte Y., Bordonneau M., Henry M. et Tourte C., 2005.** Le monde des végétaux. Edition Dunod, Paris.

**Trujillo M.E., Willems A., Abril A., Planchuelo A.M., Rivas R., Ludeña D., Mateos P.F., Martínez-Molina E. et Velázquez E., 2005.** Nodulation of *Lupinus* by strains of the new species *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1318-1327.

**Valverde A., Velazquez E., Santos F.F., Vizcaino N., Rivas R., Mateos P.F., Molina E.M., Igual J.M. et Willems A., 2005.** *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1985-1989.

**Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Keresters K. et Swing J., 1996.** Polyphasic Taxonomy, a Concensus Approach to Bacteriol Systematic. *Microbiological. Rev.* 60(2), 407-438.

**Velázquez E., Cruz-Sanchez J.M., Mateos P.F. et Martínez-Molina E., 1998.** Analysis of stable low-molecular-weight RNA profiles of members of the family *Rhizobiaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4) : 1555-1559.

**Vincent J.M., 1970.** The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd. Oxford, United Kingdom.

**Vizintin L., Javornik B., Bohanec B., 2006.** Genetic characterization of selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and its rDNA region analysis. *Plant Science.* 170 : 859-866.

**Walker J.M., 1994.** Methods in Molecular Biology, Vol 32 : Basic Protein and Peptide protocols: humana Press. Inc, Totowa, N.J.

**Weir B.S., 2013.** The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website.  
<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated : 02 May, 2013.

**Werner D., 1992.** Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

**Williams W.M., 1987.** White clover taxonomy and biosystematics. In "White Clover", eds. CAB International, Wallingford. pp 323-342.

**Woese C.R., 1987.** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2) : 221-271.

**Xu L., M C., Ge Z., Cui J., Li., et Fan H., 1995.** *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706-711.

**Yang F.L. et Lin L.P., 1998.** Cytostructure, lipopolysaccharides and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39 : 261-267.

**Young D., Mudge J. et Ellis T., 2003.** Legume genomes : more than peas in a pod. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6, 199-204.

**Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A. et Sawada H., 2003.** Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Farrand *et al.* (2003). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 : 1689-1695.

**Zahran H.H., 1999.** *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 : 968-989.

**Zakhia F. et de Lajudie P., 2001.** Taxonomy of *Rhizobia*, mini-review. *Agronomie*, 21, 569-576.

**Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C., Gillis M., Dreyfus B. et De Lajudie P., 2004.** Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology.* 27, 380-395.

**Zurdo-Piñeiro J.L., Rivas R., Trujillo M.E., Vizcaíno N., Carrasco J.A., Chamber M., Palomares A., Mateos P.F., Martínez-Molina E. et Velázquez E., 2007.** *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 784-788.