



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

Influence des métaux lourds sur la croissance des bactéries isolées
à partir des nodules des légumineuses *Hedysarum coronarium* et
Medicago truncatula

Présenté et soutenu par : Merakchi Djihane

Le : 16/06/2015

Tchanderli Braham Safa

Jury d'évaluation :

Président du jury : M. Hamidechi Md Abdelhafid (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : M. Benguedouar Ammar (Professeur - UFM Constantine).

Examineurs : Mme Sakhri Nedjoua (Maitre de Conférences - UFM Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à maman chérie, mon père pour leurs encouragements, leur présence et leur soutien, sans oublier mes frères.

À mes très chères tantes Fatíha et Habíba que j'aime

Bien évidemment, je n'oublierais pas ma cousine, copine et binôme avec qui j'ai passé de très belles années.

Je vous aime.

Safa, TB.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes très chers parents, qui ont toujours été à mes côtés, soutenus durant toutes ces années et sans qui je n'en serai pas là. Puisse Dieu me les garder.

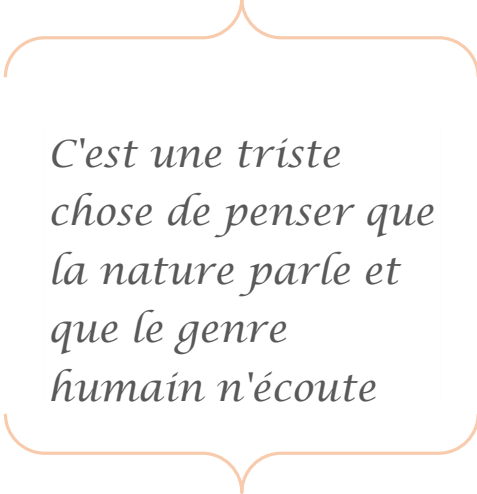
À mon unique et adorable frère et ma petite sœur chérie que j'aime

À mes grands parents

À mon très cher fiancé pour sa patience et ses encouragements

Sans oublier mes cousines, mes camarades et mes amis, plus particulièrement Safa avec qui j'ai partagé de précieux moments.

Djihane, M.



*C'est une triste
chose de penser que
la nature parle et
que le genre
humain n'écoute*

Remerciements

Avant tout nous remercions le bon Dieu de nous avoir donné patience, la force et la volonté d'accomplir ce travail.

Nos remerciements les plus sincères et nos respects les plus profonds s'adressent particulièrement à notre professeur Mr Ammar BENGUEDOUAR qui nous a encouragé, soutenu, et transmis tout son savoir pendant ces trois dernières années, et d'avoir été toujours présent durant la réalisation de notre mémoire.

Il est particulièrement émouvant de le voir partir cette année, et tout aussi honorable pour nous d'avoir été encadrées par une personne aussi brillante et passionnée par son travail.

Nous remercions également le professeur M^d Abdelhafid HAMIDECHI et Mme Nedjoudia SAKHRI Maître de conférences à l'UFM Constantine de nous avoir consacré du temps afin d'évaluer ce travail.

Et un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de biotechnologie, pour l'aide et le soutien qu'ils nous ont présenté tout au long de ses derniers mois.

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

CHAPITRE I : Etude bibliographique

1. Les métaux lourds	2
1.1. Définition.....	2
2. Origine des métaux lourds	2
3. Le problème de la toxicité des métaux	3
4. Impact de la pollution métallique sur l'environnement	4
4.1. Effet des métaux lourds sur la plante.....	4
4.2. Utilisation des plantes dans la dépollution des milieux contaminés.....	6
4.2.1. La phytostabilisation.....	6
4.3. Influence sur les microorganismes en général.....	7
4.3.1. Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds.....	8
5. Effets des métaux lourds sur la symbiose	10
5.1. La symbiose <i>Rhizobium-légumineuse</i>	10
5.2. Le langage moléculaire entre les deux partenaires.....	10
5.3. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes <i>nod</i>	11
5.4. Les gènes de nodulation.....	12
5.5. Les facteurs Nod.....	13
5.6. Le processus de nodulation.....	14
6. Influence des métaux lourds sur la symbiose <i>Rhizobium- légumineuse</i>	15
7. Le macrosymbiont: Les légumineuses	16
7.1. La diversité des légumineuses fabacées.....	16
7.2. Le 1 ^{er} macrosymbiont spécifique : Le genre <i>Hedysarum</i>	18
7.2.1. L'espèce <i>Hedysarum coronarium</i>	18
7.3. Le 2 ^{ème} macrosymbiont spécifique : le genre <i>Medicago</i>	19
7.3.1. L'espèce <i>Medicago truncatula</i>	20
8. Lemicrosymbiont : les genres <i>Rhizobium</i> et <i>Ensifer</i>	21
8.1. Etudes sur le microsymbiont spécifique.....	24
8.1.1. <i>Rhizobium sullae</i> (partenaire symbiotique de <i>H. coronarium</i>).....	24

8.1.2. <i>Ensifer medicae</i> (partenaire symbiotique de <i>Medicago truncatula</i>).....	25
9. Effet des métaux sur les bactéries du sol (<i>Rhizobium</i>).....	27

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

1. Caractères phénotypiques des isolats.....	29
1.1. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	29
1.1.1. Collecte des nodules.....	29
1.1.2. Conservation des nodules.....	30
1.1.3. Stérilisation des nodules.....	30
1.1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	30
2. Caractères cultureux.....	31
2.1. Purification des isolats.....	32
2.2. Conservation des isolats.....	32
3. Caractéristiques métaboliques des isolats.....	33
3.1. Tests biochimiques (recherches des enzymes spécifiques).....	33
3.1.1. Réduction des nitrates.....	33
3.1.2. Hydrolyse de l'urée.....	34
3.1.3. Activité cellulosique.....	34
4. Résistance intrinsèque aux métaux lourds.....	35
4.1. Détermination de la CMI sur milieu solide.....	35
5. Mesure de la Croissance des souches en milieu liquide et en présence de métaux lourds.....	35

CHAPITRE III : Résultats

1. Etude morphologique et culturelle des isolats.....	37
1.1. Croissance des isolats sur YMA.....	38
1.2. Croissance des isolats sur YMA + rouge Congo.....	38
1.3. Aspect microscopique des isolats.....	39
1.4. Croissance des isolats sur YMA + Bleu de Bromothymol.....	39
2. Recherche d'enzymes spécifiques.....	40
2.1. Réduction des nitrates.....	40

2.2. Hydrolyse de l'urée.....	41
2.3. Activité cellulolytique.....	41
3. Résistance intrinsèque aux métaux lourds.....	43
3.1. Détermination de la CMI sur milieu solide.....	43
3.2. Estimation de la Croissance en milieu liquide et en présence des métaux lourds.....	45
Discussion.....	62

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure N°01 -Les différentes stratégies de phytoremédiation utilisées pour dépolluer les environnements contaminés en métaux lourds.....	7
Figure N°02 -Dialogue moléculaire de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse hôte et le rhizobium.....	11
Figure N°03 -Squelette de base des flavonoïdes.....	12
Figure N°04 -Formation d'un nodule.....	14
Figure N°05 -Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques de légumineuses <i>Papilionoideae</i>	17
Figure N°06 - <i>Hedysarum coronarium</i>	19
Figure N°07 - <i>Medicago truncatula</i>	20
Figure N°08 -Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries.....	21
Figure N°09 - <i>Rhizobium leguminosarum</i> (cellule mobile flagellée et bacteroïdes).....	22
Figure N°10 -unique morphologie des colonies, numérisation et la transmission au microscope électronique de <i>E.medicae</i> souche WSM419.....	26
Figure N°11 - Conservation des nodules sous CaCl_2	30
Figure N°12 -Ensemencement par la technique des quatre cadrans.....	31
Figure N°13 - Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de ZnSO_4	46
Figure N°14 - Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de ZnSO_4	47
Figure N°15 - Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de ZnSO_4	47
Figure N°16 - Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de ZnSO_4	48
Figure N°17 - Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de ZnSO_4	48
Figure N°18 - Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de CuSO_4	49

Figure N°19- Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de CuSO ₄	50
Figure N°20- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de CuSO ₄	50
Figure N°21- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de CuSO ₄	51
Figure N°22- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de CuSO ₄	51
Figure N°23- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de Pb(COO) ₂	52
Figure N°24- Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de Pb(COO) ₂	53
Figure N°25- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de Pb(COO) ₂	53
Figure N°26- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de Pb(COO) ₂	54
Figure N°27- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de Pb(COO) ₂	54
Figure N°28- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de HgCl ₂	55
Figure N°29- Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de HgCl ₂	56
Figure N°30- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de HgCl ₂	56
Figure N°31- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de HgCl ₂	57
Figure N°32- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de HgCl ₂	57
Figure N°33- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de CdCl ₂	58
Figure N°34- Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de CdCl ₂	59
Figure N°35- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de CdCl ₂	59
Figure N°36- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de CdCl ₂	60
Figure N°37- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de CdCl ₂	60
Figure N°38- Croissance des isolats HC1, HC2 et HC3 et souches témoins en absence de métaux.....	61
Figure N°39- Croissance des isolats Med1, Med2 et souches témoins en absence de métaux.....	61

Liste des tableaux

Tableau N°01 : isolats et souches de référence utilisées.....	33
Tableau N°02 : Différentes concentrations de métaux lourds utilisés sur milieu solide (Mueller-Hinton).....	35
Tableau N°03 : Différentes concentrations de métaux lourds utilisés sur milieu liquide (TY).....	36
Tableau N°04 Aspect morphologique et cultural des isolats.....	37
Tableau N°05 : Résultats de la recherche d'enzymes spécifiques.....	42
Tableau N°06 : Croissance des isolats en présence de métaux lourds.....	44

Liste des photos

Photo N°01- <i>Medicago truncatula</i>	29
Photo N°02- <i>Hedysarum coronarium</i>	29
Photo N°03- Aspect des colonies sur YMA.....	38
Photo N°04- Aspect des colonies sur YMA+ rouge Congo – isolat HC3.....	39
Photo N°05- Aspect microscopique des isolats.....	39
Photo N°06- Croissance sur YMA + BTB.....	40
Photo N°07- Réduction des nitrates.....	41
Photo N°08- Hydrolyse de l'urée.....	41
Photo N°09- Activité cellulolytique – isolat Med2.....	42
Photo N°010- Croissance des isolats inhibée en présence de 20µg/ml de HgCl ₂	44
Photo N°11- Résistance des isolats à une concentration de 1000µg/ml de ZnSO ₄	45

Liste des abréviations

ADh	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Al	Aluminium
As	Arsenic
Cd	Cadmium
Co	Cobalt
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
EPS	Exepolysaccharides
ETMs	Eléments traces métalliques
Fe	Fer
G6P	Glucose-6-phosphate
Hg	Mercure
IDH	Isocitrate déshydrogénase
MDH	Malate déshydrogénase
Mn	Manganèse
Mo	Molybdène
Ni	Nickel
Pb	Plomb
Se	Sélénium
Ur	Uranium
V	Vanadium
W	Tungstène
Zn	Zinc

Résumé

Des bactéries isolées à partir des nodules racinaires des deux légumineuses fourragères *Hedysarum coronarium* et *Medicago truncatula* sont caractérisées par une étude phénotypique (tests physiologiques et biochimiques), par la détermination de la résistance intrinsèque aux métaux lourds, et par la mesure de la croissance des souches et isolats en présence des métaux lourds, toxiques (Pb, Hg et Cd) et non toxiques (Cu et Zn).

Les résultats obtenus démontrent que les isolats et les souches se comportent différemment en présence de métaux lourds.

Mots clés : Métaux lourds, Toxicité, *Hedysarum coronarium*, *Medicago truncatula*, croissance, *Rhizobium sllae*, *Ensifer medicae*.

Summary

Bacteria isolated from the root nodules of both fodder legumes *Hedysarum coronarium* and *Medicago truncatula* are characterized by a phenotypic study (physiological and biochemical tests), by determining the intrinsic resistance to heavy metals, and by measuring the growth of strains and isolates in presence of heavy metals, toxic (Pb, Cd and Hg) and non-toxic (Cu and Zn).

The results obtained demonstrate that isolates and strains behave differently in the presence of heavy metals.

Keywords: Heavy metals, toxicity, *Hedysarum coronarium*, *Medicago truncatula*, growth, *Rhizobium sllae*, *Ensifer medicae*.

المخلص

يتم تمييز البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للبقول العلفية *Hedysarum coronarium* و *Medicago truncatula*

عن طريق دراسة مظهرية (إختبارات فيزيولوجية و بيوكيماوية), بتحديد الحد الأدنى التركيز المثبط للمعادن الثقيلة و بقياس نمو السلالات و العزلات بوجود معادن ثقيلة سامة (الرصاص, الكاديوم و الزئبق) و غير سامة (النحاس و الزنك).

النتائج المحصل عليها تدل على أن العزلات و السلالات تتصرف بشكل مختلف بوجود المعادن الثقيلة.

الكلمات المفتاحية لمعادن الثقيلة، السمية، *Hedysarum coronarium*، النمو، *Medicago truncatula*

Ensifer medicae Rhizobium sullae



INTRODUCTION

Les éléments traces métalliques (ETMs) ou plus communément appelés « métaux lourds » sont des composants essentiels de la Terre car ils participent aux cycles biogéochimiques et sont pour certains d'entre eux indispensables au bon fonctionnement de la biosphère, en lui conférant une certaine stabilité dans la disponibilité des éléments minéraux essentiels à la vie, maintenant ainsi la pérennité des écosystèmes (Gadd, 2010). Tandis que d'autres constituent un des problèmes majeurs dans l'environnement par la contamination de l'atmosphère, des eaux et des sols en exerçant une influence perturbatrice sur l'environnement par leur effet toxique. Ces contaminations découlent en majorité des activités humaines, en particulier le développement considérable des activités industrielles qui a provoqué un accroissement important des pollutions et des nuisances (Aoun, 2009).

Certaines données consultées de la littérature rapportent que la présence de métaux lourds dans le sol en concentrations diverses a un effet sur les populations des bactéries telluriques (entre autre les rhizobia), leur biomasse, leur taille et leur diversité génétique, affectant par exemple la symbiose bactérie-légumineuse.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'influence des métaux lourds sur les bactéries nodulant les espèces des légumineuses fourragères *Hedysarum coronarium* et *Medicago truncatula*.

Dans un premier temps nous avons procédé à l'isolement et la caractérisation des bactéries à partir des racines des légumineuses en question. Cette étape est suivie par la mesure de la croissance des bactéries en présence de différente concentration de métaux lourds toxiques et non toxiques.



CHAPITRE I

Etude bibliographique

1. Les métaux lourds

1.1. Définition

Les métaux lourds sont des éléments ayant des propriétés métalliques (ductilité, conductivité, densité, stabilité des cations, spécifiés de ligand...) et un numéro atomique > 20 . Selon Elmsley (2001) le terme de métaux lourds désigne des éléments chimiques toxiques dont la densité excède 5g/cm^3 . Sous cette appellation figurent des éléments qui, pour certains, sont effectivement des métaux tels que Ni, Cu, Zn, Pb, Hg, Al... mais aussi des metalloïdes tels que As et Se. C'est pourquoi, une classification plus complexe, basée sur les propriétés de formation de ligands à été proposée par Nieboer et Richardson (1980), avec la dénomination d'Eléments-Traces Métalliques, préférée par certains chercheurs. Aucune définition satisfaisante n'a en définitive émergée (Aoun, 2009).

Selon les textes législatifs, la pollution par les métaux toxiques (METOX) regroupe sept métaux et un metalloïde (Chrome, Zinc, Cuivre, Nickel, Plomb, Arsenic, Cadmium et Mercure) (Aoun, 2009).

On peut classer les métaux en deux grands groupes :

Les métaux essentiels : Ce sont les micronutriments comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le fer (Fe), le cobalt (Co), le chrome (Cr) et le manganèse (Mn). Ces métaux sont tous potentiellement toxiques à forte concentration (Soussou, 2013).

Les métaux non essentiels : Ils ne sont pas impliqués dans des fonctions vitales et sont potentiellement toxiques. Le cadmium (Cd), le mercure (Hg), l'aluminium (Al) et le plomb (Pb) Leur toxicité est due à leur capacité à circuler dans les organismes et la chaîne alimentaire en mimant le comportement de métaux essentiels (Fe, Zn...) (Soussou, 2013).

2. Origine des métaux lourds

Les métaux lourds sont des constituants naturels de tous les écosystèmes, on les trouve dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère. Leur distribution dans

l'environnement procède de deux origines : l'une, naturelle qui est le résultat de processus géogéniques comme l'érosion, les précipitations géochimiques de roches et de l'eau des sources, l'activité volcanique et bactérienne ; l'autre, relève des activités anthropogéniques. En effet, ces dernières années, le développement des activités industrielles a provoqué un accroissement considérable de la teneur en métaux lourds dans l'environnement où ils peuvent parvenir de différentes manières. Sous forme gazeuse, dissoute ou de particules liées, les polluants peuvent pénétrer dans le sol par voie aérienne (déposition sèche), en utilisant l'eau comme vecteur de transport (précipitation, eau de surface, déposition humide) ou encore via des solides organiques tels les boues d'assainissement, le compost, les fertilisants et les pesticides, etc... (Aoun, 2009).

3. Le problème de la toxicité des métaux

Les métaux lourds ont tous un potentiel toxique qui dépend principalement de leur concentration dans le milieu considéré et de leur biodisponibilité, c'est-à-dire de leur fraction soluble et accessible par les organismes (Maynaud, 2012).

De trop fortes concentrations en métaux lourds même essentiels sont toxiques pour les organismes vivants. En effet les cations métalliques chargés positivement peuvent interagir avec les protéines et les enzymes chargées négativement. Par ailleurs de trop fortes concentrations en métaux lourds ont un impact sur les cellules et les différents processus biologiques (Maynaud, 2012).

La biodisponibilité en métaux lourds définit leur aptitude à être transférés d'un compartiment vers un autre, ce qui augmente le risque de toxicité sur les organismes vivants.

La biodisponibilité dépend de la spéciation du métal (différentes formes chimiques d'un élément métallique) ainsi que des conditions physico-chimiques de l'environnement où se trouve le métal considéré (pH, teneur en phosphate disponible, teneur en matière organique, activités biologiques). En effet, les métaux lourds existent soit sous forme élémentaire soit sous forme dérivée. Etant chargés positivement, ils sont alors susceptibles d'interagir avec n'importe quels éléments chargés négativement pour former des dérivés inorganiques (sel, sulfure, oxyde) ou organiques (avec liaison carbone) (Maynaud, 2012).

L'acidification du sol favorise la mobilité des métaux lourds. Inversement, l'augmentation du pH provoque l'immobilisation par la formation de composés insolubles. La plupart des plantes excrètent par leur racine des acides afin de favoriser l'absorption d'éléments nutritifs et solubilisent aussi d'autres éléments pas forcément nécessaires à la plante. Certaines activités métaboliques microbiennes influencent aussi la mobilité des métaux lourds par solubilisation, insolubilisation ou volatilisation (Maynaud, 2012).

4. Impact de la pollution métallique sur l'environnement

Contrairement aux contaminants organiques, les métaux lourds générés par les activités anthropiques ne peuvent pas être dégradés biologiquement et persistent indéfiniment dans l'environnement. De plus, les environnements pollués tels que les sites miniers sont généralement soumis à de fortes contraintes topographiques, climatiques et hydriques, érodant fortement les déchets et induisant une pollution pour les eaux et les sols environnants.

Les sols miniers sont pauvres en matière organique et en minéraux fertilisants comme l'azote empêchant alors le développement d'une couverture végétale pouvant faire office de barrière à la dispersion des métaux lourds. De ce fait, la non-gestion des sites miniers provoque de graves dégâts écologiques (Maynaud, 2012).

4.1. Effet des métaux sur la plante

La principale source de métaux pour les plantes se situe au niveau du sol, bien que leur assimilation suite à une déposition au niveau du feuillage puisse également se produire. Dans le sol, l'absorption d'un métal par les plantes est grandement influencée par certains facteurs comme le pH, le régime hydrique, la composition en argile et en matière organique, la capacité d'échange cationique et la présence d'autres éléments traces (Bélanger, 2009).

Les mécanismes d'acquisition diffèrent selon les métaux et peuvent être passifs (Ni et Pb), mais préférentiellement actifs (Cu, Mo et Zn) ce qui procure à la plante un meilleur contrôle de son homéostasie (Bélanger, 2009).

Plusieurs métaux sont essentiels chez les plantes. Parmi les plus importants se retrouvent le Co, le Cu, le Fe, le Mn, le Mo, le Ni, le Se et le Zn. Parmi ceux-ci, le Cu et le Zn sont particulièrement nécessaires puisqu'ils entrent dans la composition de plusieurs enzymes et de quelques protéines. À l'opposé, le Pb, le Cd et le Hg ne sont pas essentiels chez les plantes.

Evidemment, les métaux essentiels présents en concentrations très élevées deviendront toxiques tout comme les métaux non essentiels. Généralement, les plantes sont plus sensibles à un manque d'éléments traces qu'à l'excès de ces derniers, et elles possèdent toutes et partagent une résistance de base aux métaux alors que certaines les tolèrent en plus grandes concentrations, quelques espèces végétales peuvent même hyperaccumuler les métaux (Bélanger, 2009).

Chez les plantes sensibles aux métaux, la toxicité peut être reliée à plusieurs causes :

- Inhibition de l'activité ou la déformation structurale d'une protéine ;
- La formation de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène ;
- La substitution du métal par un analogue toxique dans la protéine cible (Bélanger, 2009).

D'après une étude révélant l'effet du plomb sur les plantes, il a été observé que des plantes cultivées dans un milieu contaminé par le Pb présentent un ralentissement de leur développement et une inhibition de la croissance des racines et des parties aériennes. Leurs feuilles ont généralement une surface inférieure à celle des témoins et des chloroses peuvent apparaître. Dans certains cas la présence de Pb peut mener à une mort des cellules (Brunet, 2008).

On a également observé le ralentissement de la croissance racinaire en présence de Pb, et les métaux lourds en général, résultant d'une inhibition de la division cellulaire, et de l'élongation des cellules. La photosynthèse est aussi inhibée (Brunet, 2008).

Les enzymes participant à la synthèse de la chlorophylle, à la fixation du CO₂, au cycle de Calvin, à l'assimilation de l'azote et au métabolisme des sucres peuvent aussi être inhibées, Alors que certaines enzymes sont au contraire activées telles que les hydrolases (comme les protéases) (Brunet, 2008).

- Mécanismes de défense chez la plante

Afin de prévenir ou de contrer les effets toxiques des métaux, la plante met en place des stratégies de défense plutôt efficaces. Ces mécanismes cellulaires menant à la détoxification ou à la tolérance des métaux chez les plantes comprennent:

- La restriction du mouvement des métaux par les mycorhizes ;
- Attachement des métaux à la membrane cellulaire ou aux exsudats racinaires ;
- La réduction de l'influx au niveau de la membrane plasmique ;
- L'efflux actif provenant de l'apoplaste ;
- La présence d'agents chélateurs dans le cytosol ;
- La réparation active de la membrane plasmique en conditions de stress ;
- Le transport de complexes métalliques (ex.: phytochélatines) vers les vacuoles ;
- Le transport et l'accumulation des métaux dans les vacuoles (Bélanger, 2009).

4.2. Utilisation des plantes dans la dépollution des milieux contaminés

Il est important d'élaborer des méthodes de gestion des environnements contaminés en métaux lourds afin de limiter la pollution engendrée car leurs accumulations et leurs transferts constituent un risque pour le milieu naturel dans son ensemble.

Il existe plusieurs stratégies de dépollution biologique, parmi celles-ci :

4.2.1. La phytostabilisation

C'est une technique qui utilise des plantes tolérantes aux métaux lourds en association avec des microorganismes pour limiter la diffusion des particules métalliques par voies aériennes ou hydriques. Les plantes utilisées accumulent très peu de métaux lourds dans les parties aériennes afin de limiter le transfert dans la chaîne alimentaire. Le principal désavantage de cette technique est que les métaux lourds restent dans le sol, ils ne sont pas enlevés. En effet, cette technique n'a pas pour but d'enlever les métaux lourds dans le sol mais seulement de les contenir. Cette technique est par contre efficace pour des sites très contaminés tels que les sites miniers où la méthode de phytoextraction est peu efficace. Les travaux de Frérot et al. (2006) sur la phytostabilisation d'anciens déblais miniers riches en Zn, Cd et Pb dans la région méditerranéenne ont montré in situ que la combinaison d'écotypes métallicoles de plantes natives de la région permettait d'améliorer et de régénérer de façon durable et significative la fertilité du sol en l'enrichissant en minéraux fertilisants et plus particulièrement en azote (Maynaud, 2012).

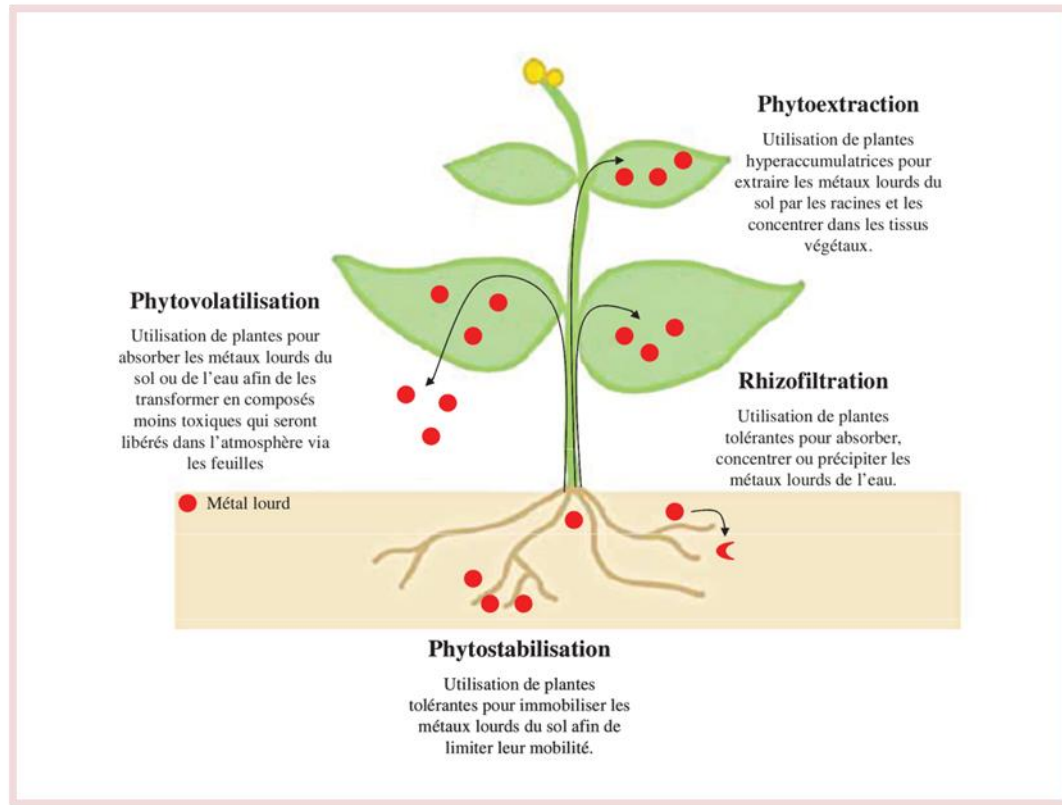


Figure N°01- Les différentes stratégies de phytoremédiation utilisées pour dépolluer les environnements contaminés en métaux lourds (Maynaud, 2012).

4.3. Influence sur Les microorganismes en général

Les concepts de tolérance, résistance et sensibilité aux métaux lourds peuvent être facilement confondus les uns avec les autres. Une publication de Gadd (1992) propose une terminologie plus précise et spécifique. Le terme «tolérance» devrait être employé lorsque les organismes supportent la présence des métaux grâce à leurs caractéristiques biologiques intrinsèques, alors que le mot «résistance» devrait être mentionné lorsque les organismes survivent à la présence de métaux à l'aide de mécanismes de détoxification spécifiques induits en présence du contaminant (Bélanger, 2009).

De manière globale, les métaux exercent une pression sélective augmentant la tolérance de base de certains microorganismes, mais diminuent la biodiversité des microorganismes retrouvés dans les sols pollués en comparaison avec des sols non pollués (Bélanger, 2009).

La sensibilité des microorganismes peut se traduire par une diminution de l'expression protéique alors qu'une augmentation de l'expression protéique signifierait une tentative

d'adaptation au nouveau contaminant (expression d'un mécanisme de résistance) (Bélanger, 2009).

Chez les bactéries, les gènes codant pour l'expression des protéines impliquées dans ces mécanismes sont principalement plasmidiques, bien que quelques-uns soient chromosomiques. L'origine plasmidique de certains gènes peut résulter en une fréquence de transfert plus élevée de ces plasmides en conditions de stress. Un tel exemple a été démontré chez *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* qui, en présence de métaux, transférait ses plasmides lui procurant sa résistance (Bélanger, 2009).

4.3.1. Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds

Les organismes vivants ont développé des mécanismes d'adaptation aux métaux lourds pour contrebalancer l'effet toxique de certains d'entre eux ou de trop fortes concentrations tout en maintenant le rôle biologique et essentiel d'autres éléments métalliques. Les organismes utilisent divers mécanismes d'adaptation pour protéger leurs composants cellulaires des effets néfastes des métaux (Maynaud, 2012).

On peut classer ces différents mécanismes d'adaptation aux métaux lourds en deux catégories:

- **Les mécanismes de tolérance** : qui sont définis comme des mécanismes passifs énergie-indépendants intervenant dans une première défense contre les métaux lourds et efficaces lors d'un faible stress :

- Modification de la perméabilité membranaire ;
- Séquestration intra- et extracellulaires des métaux lourds.

- **Les mécanismes de résistance** : qui sont définis comme des systèmes d'efflux énergie-dépendants localisés dans l'épaisseur de la membrane cytoplasmique qui préservent l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation des ions toxiques par leur reconnaissance, leur fixation et leur transport. Ces mécanismes interviennent lors d'un fort stress métallique.

Les principaux mécanismes de tolérance et de résistance retrouvés chez les bactéries comprennent:

- **Immobilisation des métaux lourds sur la paroi bactérienne par la production d'exopolysaccharides de surface (EPS)** : les EPS sont des polymères constitués de plusieurs oses, excrétés dans le milieu et capables d'absorber les métaux lourds présents dans l'environnement. La production des EPS et leur capacité à séquestrer des ions métalliques ont été rapportées chez certaines souches de *Burkholderia* isolées de champs de rizières pollués, pour la réduction de la biodisponibilité du Cd, chez des souches de *Pseudomonas* isolées d'une mine d'Ur, dans le cas de la multi-résistance aux métaux, et chez des souches d'*Azospirillum brasilense* pour la résistance au Zn (Maynaud, 2012).

- La précipitation des métaux sous forme de sels insolubles.

- Les altérations de la perméabilité de la membrane plasmique.

- **Séquestration intracellulaire des métaux lourds par la production de diverses protéines chélatantes** : les métallothionéines sont des protéines intracellulaires riches en cystéine qui ont été identifiées comme étant capables de séquestrer des cations de Zn et de Cd. Elles sont retrouvées chez certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, et *E. coli*. Chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Bradyrhizobium* sp. et *Saccharomyces cerevisiae*, la production de glutathion, un tripeptide contenant un groupement thiol qui produit en général lors d'un stress oxydatif a été mis en évidence dans la détoxification de cations métalliques tels que le Cd et le Ni (Maynaud, 2012).

- **Séquestration extracellulaire des métaux lourds par la précipitation de formes insolubles** : *Cupriavidus* sp. et *Klebsiella aerogenes* sont capables de détoxifier le Cd en excréant des sulfures pour limiter l'influx de Cd dans la cellule. Des souches de *Citrobacter* utilisent les phosphates pour précipiter le Cd à l'extérieur de la cellule pour éviter son entrée (Maynaud, 2012).

- **La production d'agents chélateurs dans le milieu extracellulaire** :

Il a été démontré chez les diazotrophes que des sidérophores sont produits afin de réguler l'acquisition de certains métaux essentiels à l'enzyme nitrogénase (Fe, Mo, V) et l'exclusion de métaux toxiques comme le W. La présence des sidérophores a également été démontrée chez les bactéries fixatrices d'azote du genre *Frankia*; ces sidérophores servaient au recrutement de Fe (Bélanger, 2009).

- La transformation biochimique des ions métalliques (Bélanger, 2009) ;

- La régulation de l'homéostasie des métaux chez les procaryotes englobe plusieurs mécanismes agissant communément afin de maintenir une concentration de métaux intracellulaire adéquate. Habituellement, ces systèmes de régulation se composent de trois sous-systèmes :

- ❖ Une pompe permettant l'entrée de métaux présents en concentrations faibles dans le milieu extérieur ;
- ❖ Une pompe à efflux pour éliminer les surplus de métaux dans le cytoplasme ;
- ❖ Une protéine relais amenant les métaux des pompes vers leurs cibles cellulaires (Bélanger, 2009).

D'autres voies d'entrée peuvent aussi être employées, quelques métaux toxiques comme le chromate ou l'arsenate pénètrent dans le cytoplasme via des systèmes de transport du phosphate ou du sulfate. Ces transporteurs non spécifiques vont donc être fréquemment sous-exprimés et/ou remplacés par des systèmes plus restrictifs afin de limiter l'apport de métal toxique (Bélanger, 2009).

5. Effets des métaux lourds sur la symbiose

5.1. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse

L'azote est un nutriment important pour la plante. Il est souvent apporté par la symbiose entre une plante et une bactérie. La symbiose intracellulaire qui s'établit entre les diverses bactéries du sol, appelées rhizobia, et les plantes de la famille des Légumineuses aboutit à la formation de structures appelées nodosités sur les racines des plantes (Figure N°02). Dans les cellules de ces nodosités, les bactéries se différencient en bactéroïdes, capables de réduire l'azote atmosphérique N_2 en une forme assimilable par la plante-hôte. En contrepartie, la plante fournit aux bactéries une niche dans laquelle elles peuvent se multiplier abondamment et des composés carbonés issus de la photosynthèse. Tout Cela nécessite d'avoir certaines molécules permettant la reconnaissance entre les deux partenaires.

5.2. Le langage moléculaire entre les deux partenaires

Des signaux moléculaires spécifiques sont échangés entre les deux partenaires tout au long de la formation de la nodosité.

Les flavonoïdes libérés par la plante constituent le premier signal moléculaire, ils sont reconnus spécifiquement par les bactéries, permettant l'activation des protéines NodD, ce qui conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *noI* collectivement appelés gènes *nod*) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices des gènes *nodA*, *B* et *C*. (*nodbox*) situées en amont des gènes *nod*. Les produits des gènes *nod* interviennent dans la biosynthèse de lipochito-oligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod (Lerouge *et al.*, 1990 ; Dénarié *et al.*, 1996), qui sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante (Kouchi *et al.*, 2010). Ces facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire. Par la suite, l'activation de nombreux gènes permet la mise en place et le contrôle de l'infection et de la différenciation du nodule (Dénarié *et al.*, 1996 ; Perret *et al.*, 2000). Formant ainsi le symbiosome dans lequel la fixation de N_2 va se réaliser.

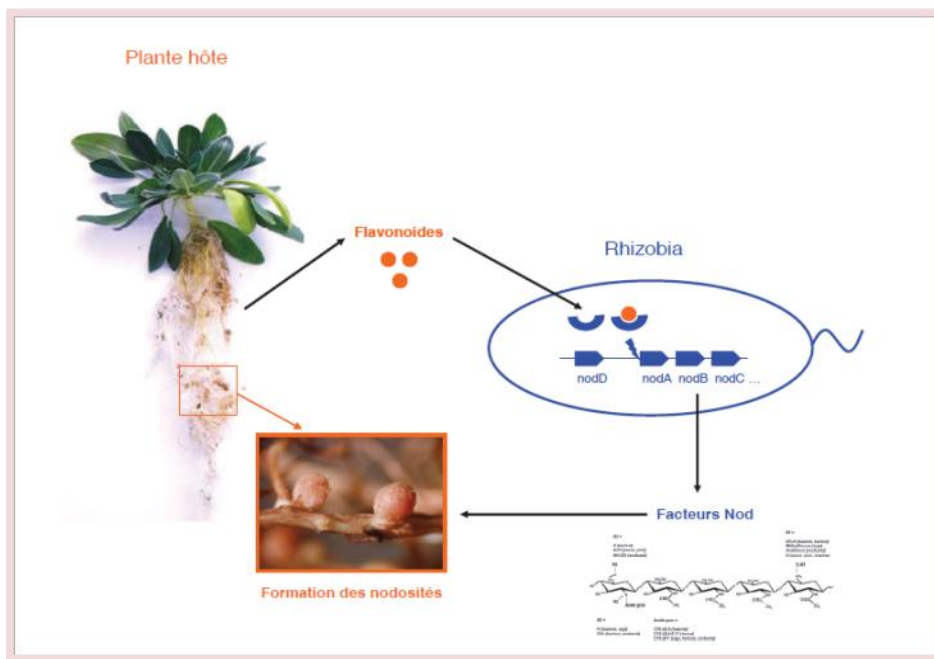


Figure N°02-Dialogue moléculaire de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse hôte et le rhizobium (Maynaud, 2012).

5.3. Les flavonoïdes signaux inducteurs des gènes *nod*

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de nature aromatique exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol (Taylor et Grotewold, 2005 ; Gibson *et al.*, 2008), induisant l'expression des gènes de nodulation chez *Rhizobium* (Cooper 2007 ; Zhang *et al.*, 2009). Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes (Cooper, 2004 ; Perret *et al.*, 2000) dont les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses (Brencic et Winans, 2005).

Les flavonoïdes possèdent une structure phenylbenzopyran tricycliques (Matkowski, 2008). Un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Figure N°03) (Bruneton, 1999).

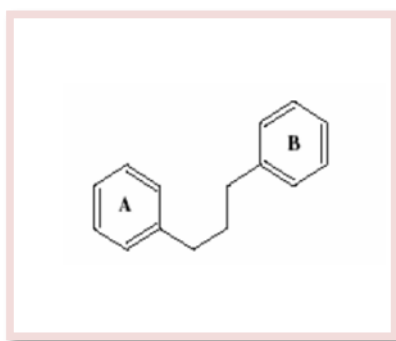


Figure N°03- Squelette de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

5.4. Les gènes de nodulation

Les gènes *nod* codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse des facteurs Nod et sont classés en trois groupes :

- Les gènes *nod* régulateurs ;
- Les gènes *nod* communs ;
- Les gènes *nod* spécifiques (Skorupska *et al.*, 2010).

- **Les gènes *nod* régulateurs** (Spaink, 2000), comprenant notamment le gène *nodD* (parfois en plusieurs copies dans le génome des rhizobiums), et codent pour des protéines qui,

en présence de signaux sécrétés par la plante (flavonoïdes), activent l'expression des autres gènes *nod* dits gènes *nod* communs.

Les gènes *nodD* codant pour des récepteurs spécifiques de signaux de la plante constituent un premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte.

Ils codent pour la synthèse des protéines constituant le facteur de transcription. Chez les diazotrophes, ce gène s'exprime de manière constitutive. Les facteurs de transcription sont donc continuellement synthétisés, que la bactérie soit en symbiose ou non (Hirsch, 1992 ; Dénarié *et al.*, 1996).

- **Les gènes *nod* communs (nod ABC)**, appelés aussi gènes structuraux, sont impliqués dans la synthèse et la sécrétion de signaux symbiotiques bactériens extracellulaires, les facteurs Nod. Ils jouent un rôle absolument essentiel dans la formation des nodosités. Ces gènes sont présents chez presque tous les rhizobiums (Dénarié *et al.*, 1996), y compris les β -protéobactéries (Moulin *et al.*, 2001). Ces gènes *nod* communs sont absents dans le génome des souches de *Bradyrhizobium* sp ce qui en fait une exception.

- **Les gènes *nod* spécifiques** (ou hsn pour « host specific nodulation »), sont responsables des substitutions qui s'opèrent sur le squelette de base du facteur Nod (Perret *et al.*, 2000). Ils confèrent des ornements variables aux facteurs Nod et jouent donc directement un rôle dans la spécificité. On peut citer: les gènes *nodZ* et *nolK* (fucosylation) ; *noeC* (arabinosylation) ; *nodH* et *noeE* (sulfatation) ; *nodL*, *nodX* et *nolL* (acétylation) ; *nodS* et *noel* (méthylation) ; *nodU* et *nolO* (carbamoxylation). (Hirsch, 1992 ; Dénarié *et al.*, 1996 ; Long 1996).

5.5. Les facteurs Nod

Les signaux Nod, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod sont des molécules lipochitoooligosaccharidiques (Terefework, 2002).

Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Debellé *et al.*, 2001).

La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nodABCD* codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs Nod, et les gènes *hsn* pour les diverses substitutions des facteurs Nod (Debellé *et al.*,

2001). La longueur et la saturation des composants de substitués d'acides gras du noyau lipooligosaccharide, le type et la position des divers substitués sur les facteurs Nod, jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

5.6. Le processus de nodulation

L'évolution de la relation symbiotique qui regroupe les rhizobia et les légumineuses est un processus hautement interactif incluant la communication moléculaire entre les organismes, une phase d'infection qui marque la pénétration des rhizobia dans les nodules et une phase symbiotique finale où les rhizobia qui occupent les nodules fixent l'azote.

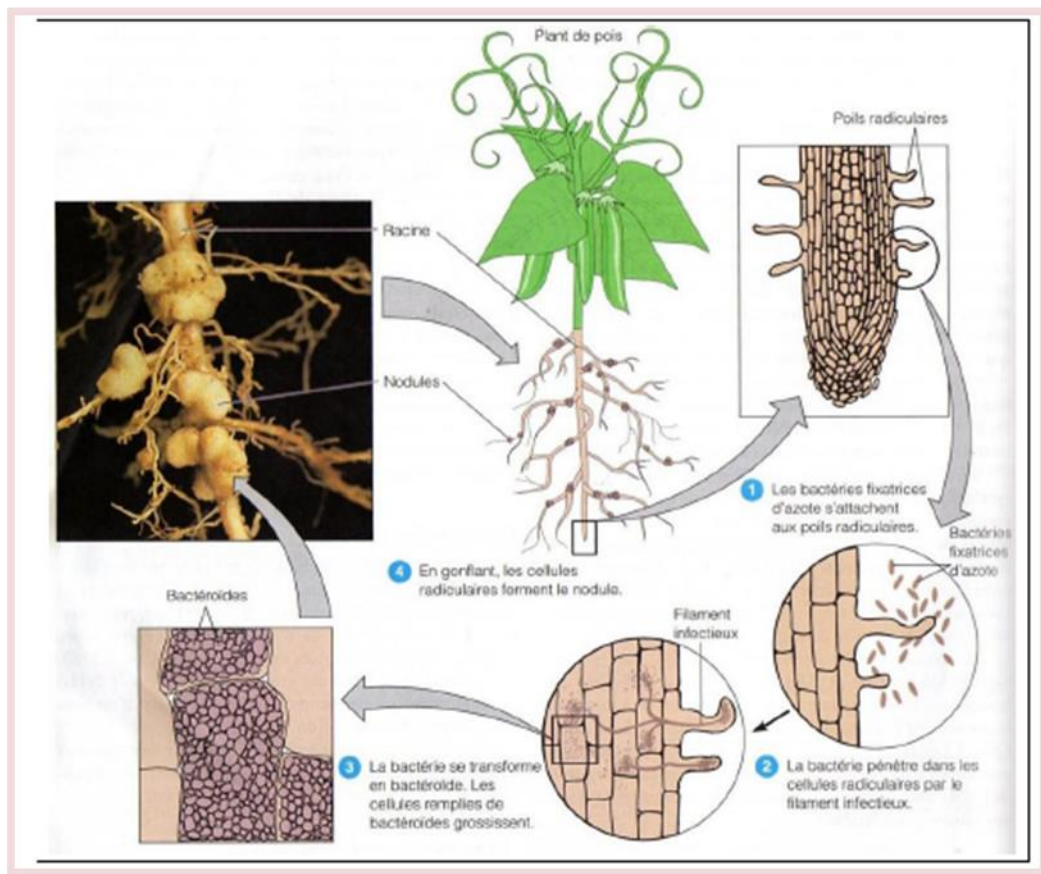


Figure N°04-Formation d'un nodule (Tortora *et al.*, 2003).

Les différentes étapes conduisant à la formation des nodosités, ou étapes symbiotiques précoces, sont maintenant bien identifiées (Nap et Bisseling, 1990). Les *Rhizobium*, qui vivent à l'état saprophytique dans le sol, sont attirés vers la rhizosphère des plantes hôtes par

diverses substances qui y sont excrétées (glucides, acides aminés, flavonoïdes...etc.), les Rhizobiums vont ensuite migrer vers l'extrémité des poils absorbants des racines, où ils vont se fixer, puis s'agréger. Ce contact direct entre les bactéries et les poils racinaires de la plante hôte induit une courbure de ces poils absorbants dite en crosse de berger.

Les bactéries emprisonnées à l'intérieur de cette dernière vont alors pénétrer à l'intérieur du poil absorbant et donner naissance à une structure tubulaire, appelée filament d'infection, résultant d'une simulation et d'une réorientation de la croissance de la paroi de la cellule végétale. Ces filaments d'infection progressent à l'intérieur des poils absorbants, puis à travers le cortex de la racine. Simultanément, des cellules du cortex interne, situées à proximité des filaments d'infection, se différencient et se divisent activement. Des cellules issues de ses divisions s'organisent en un méristème dont le fonctionnement est à l'origine des nodosités.

Les nodules matures présentent une anatomie caractéristique, comprenant notamment une zone centrale où les bactéries sont libérées hors des cordons d'infection et envahissent les cellules végétales, tandis que les traces vasculaires périphériques vont permettre les échanges métaboliques entre la nodosité et le reste de la plante.

6. Influence des métaux lourds sur la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse

Les études concernant l'effet toxique des métaux sur les symbioses étaient souvent réalisées avec des souches bactériennes différentes, des espèces végétales variées ou encore dans des conditions non similaires. Toutes ces variables rendent difficile la comparaison des résultats qui sont souvent contradictoires. L'effet toxique des métaux sur la diminution de la fixation d'azote des *Rhizobium* serait due à l'extinction graduelle de ces bactéries dans le sol puisque ce genre bactérien est plutôt sensible aux métaux (Bélanger, 2009).

Des études ont démontré que plusieurs isolats de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (85%) provenant d'un sol contaminé en métaux avaient perdu leur capacité à fixer l'azote en symbiose. D'autres travaux en sont venus à des conclusions légèrement différentes, c'est-à-dire que des *Rhizobium* isolés suite à une contamination aigüe en métaux conservaient leur pouvoir fixateur d'azote. Par contre, la capacité à établir la symbiose était affectée.

Finalement, des travaux réalisés en conditions contrôlées où les métaux étaient ajoutés sous forme de solutions ont démontré que l'inoculation de pois chiches suivie d'une exposition au Cd et au Pb provoquait une diminution du nombre de nodules chez les plants. Il a aussi été démontré que l'exposition de la symbiose entre la souche *R. leguminosarum* RP 5 et le pois au Cu diminuait le nombre de nodules par plant, alors que l'exposition au Cd et au Cr augmentait le nombre de nodules par plant. Ce dernier résultat est non seulement surprenant, mais aussi en contradiction avec celui obtenu auparavant par la même équipe pour une autre espèce végétale (Bélanger, 2009).

7. Le macrosymbiont: les Légumineuses

7.1. La diversité des légumineuses fabacées

Les légumineuses sont des plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobiums, elles appartiennent toutes à la superfamille des *Fabaceae* (appelées aussi légumineuses), à l'exception d'une seule non-légumineuse, le genre *Parasponia* de la famille des *Ulmacées* (Trinick et Hadobas, 1988 ; Lafay *et al.*, 2006).

Les légumineuses représentent la famille des *Leguminosae* (ou *Fabaceae*), de l'ordre des *Fabales*, la sous-classe des *Rosidae*, et la classe des *Dicotyledonae*. Elles forment une famille importante et variée des Angiospermes, et constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes, et l'un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifié (Allen et Allen, 1981 ; Broughton, 1984). Cette famille englobe 674 genres et plus de 18000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les *Poaceae*, en terme de diversité (Polhill *et al.*, 1981). Elle est subdivisée en trois sous-familles d'importance inégale: Les *Mimosoideae*, les *Caesalpinioideae* et les *Papilionoideae*.

La sous-famille des *Mimosoideae* comprend environ 3 300 espèces regroupées en 77 genres et sont nodulées à plus de 90%. Ce sont surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales.

Les *Caesalpinioideae* comprennent environ 2 300 espèces réparties en 171 genres et 4 tribus (Lewis *et al.*, 2005). Cette sous-famille rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Parmi les espèces de *Caesalpinioideae*, seulement 23% ont été décrites comme étant capables d'être nodulées. Elles sont essentiellement retrouvées parmi les *Caesalpinieae* et des *Cassieae* (De Faria *et al.*, 1989).

Les *Papilionoideae* constituent la plus grande sous-famille des *Fabaceae* avec 28 tribus, 478 genres et environ 13 800 espèces dont 97% parmi les espèces testées sont nodulées (De Faria *et al.*, 1989). Les membres de cette sous-famille sont principalement des herbacées.

Les *Papilionoideae* se divisent en deux groupes majeurs de plantes cultivées: les légumineuses tropicales (ou Phaseoloides) comme notamment les genres *Cajanus*, *Glycine* (soja), *Phaseolus* (haricot) et *Vigna* (vigne) regroupés dans la tribu *Phaseoleae*, et les légumineuses tempérées (ou Galegoides) comme les genres *Cicer* (pois chiche), *Lens* (lentilles), *Lotus* (lotier), *Medicago* (luzerne), *Melilotus* (mélilots), *Pisum* (pois), *Trifolium* (trèfle) et *Vicia* (vesce), *Lens* et *Pisum* étant regroupés dans la tribu des *Viciae* (Figure N°05) (Doyle et Luckow, 2003).

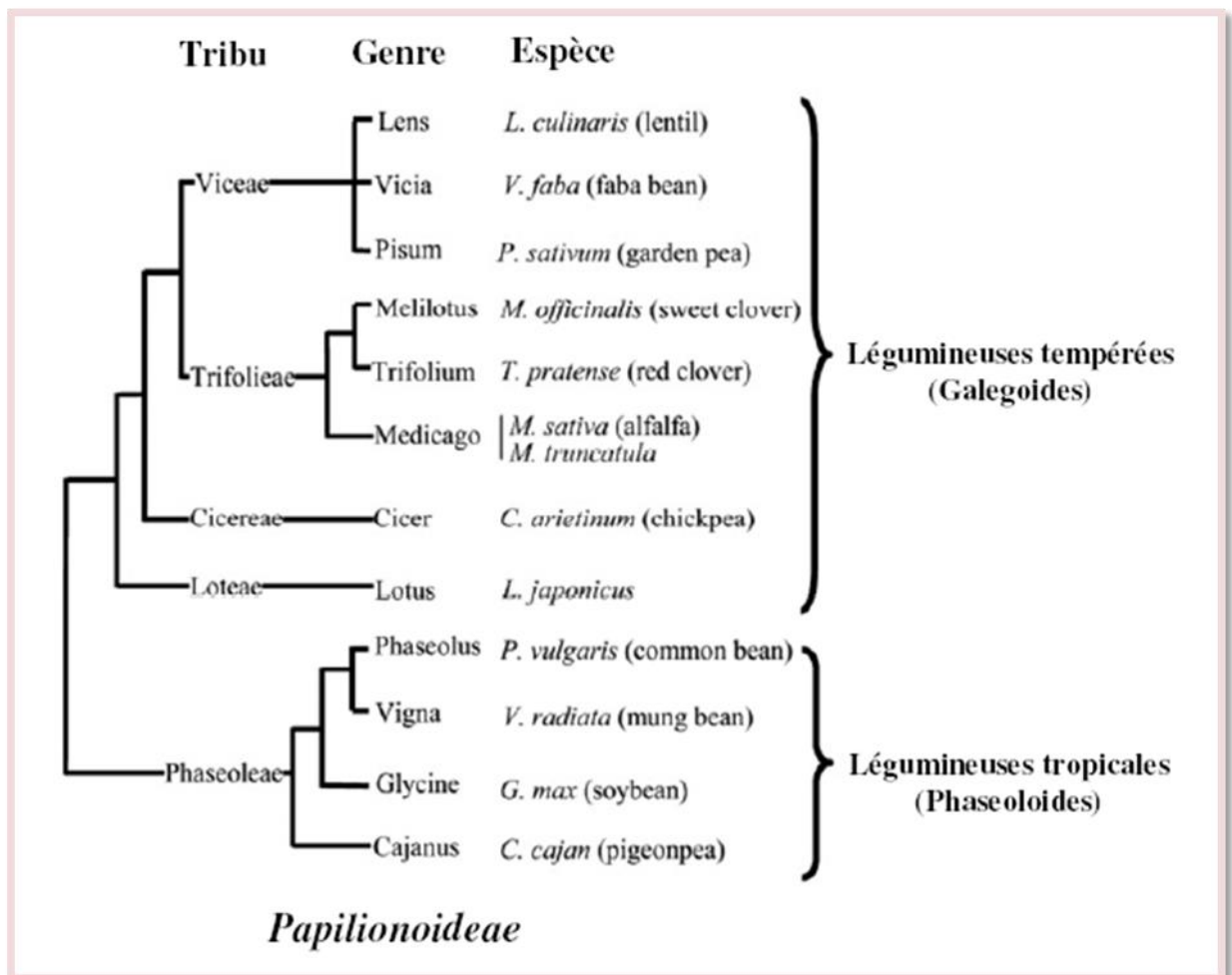


Figure N°05-Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques de légumineuses *Papilionoideae* (Zhu *et al.*, 2005).

Les deux espèces retenues pour notre étude sont :

- *Hedysarum Coronarium* ;

-*Medicago truncatula*.

7.2. Le 1^{er} macrosymbionte spécifique : Le genre *Hedysarum*

Hedysarum spp est une légumineuse fourragère spontanée assez répandue dans la région méditerranéenne. Différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Afrique du Nord et en Europe du Sud dans des étages bioclimatiques et des conditions édapho-agricoles assez variables (Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1988). Ces espèces d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi *et al.*, 2004).

Le genre *Hedysarum* renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames (Baattout, 1991 ; Boussaid *et al.*, 1995). Il est représenté en Afrique du Nord par des espèces faisant partie du groupe méditerranéen en présentant un nombre chromosomique de base $n = 8$ (Quezel et Santa, 1962 ; Pottier Alapetite, 1979).

En Algérie, le genre *Hedysarum* regroupe des espèces endémiques. Certaines espèces ont une localisation régionale : *H. coronarium* dans le Nord-Est et *H. flexuosum* dans le Centre-Nord du pays (Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1988). Les espèces du genre *Hedysarum* sont caractérisées par une diversité considérable qui concerne aussi bien la morphologie que les aires de répartition de leurs peuplements.

7.2.1. L'espèce *Hedysarum coronarium*

L'espèce *H. coronarium* L. également appelée Sulla ou sainfoin d'Espagne, occupe une large aire de répartition dans le bassin méditerranéen, du nord d'Afrique au sud d'Espagne et du centre au sud d'Italie (Squartini *et al.*, 2002). Cette légumineuse pérenne est employée pour le foin, l'ensilage et le pâturage. Parmi les espèces du genre, seule *H. coronarium* L. a

été domestiquée et a toujours été utilisée comme plante fourragère dans plusieurs pays tels que l'Espagne, le Portugal, l'Italie, la Grèce et l'Israël dus à un certain nombre de dispositifs agronomiques appropriés (Benguedouar *et al.*, 1997; Struffi *et al.*, 1998). À l'état spontané, cette espèce se localise sur des sols argilo-limoneux bien drainés des zones méridionales du bassin méditerranéen. Et montre en fait une résistance marquée aux conditions extrêmes, s'étendant de la sécheresse à la salinité au pH alcalin, permettant sa culture en terre semi-aride et argiles calcaires avec un pH aussi élevé que 9,3 (Benguedouar *et al.*, 1997; Hannachi *et al.*, 2004).

Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum* L. (sainfoin), se caractérise par : Calice en cloche, à 5 dents égales ou inégales. Pétales à onglet très court. Carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité.



Figure N°06-*Hedysarum coronarium* (www.plantae.ca).

7.3. Le 2^{ème} macrosymbiont spécifique : le genre *Medicago*

Le genre *Medicago* (les luzernes) regroupe de nombreuses espèces de plantes proches des trèfles, Appartenant comme eux à la famille des Fabacées (ou légumineuses) sous famille des *Papilionoideae*. Il présente 56 espèces, annuelles qui sont pour la majorité des diploïdes autogames ($2n=16$ ou $2n=14$ dans certains cas), et pérennes qui sont des tétraploïdes

allogames ($2n=4^*=32$) (Nègre, 1959 ; Heyn, 1963 ; Lesins et Lesins ,1979 ; Small et Jomphe, 1989) plus une seule espèce arbustive répertoriée (*Medicago arborea*).

Le nom scientifique du genre *Medicago* n'est pas lié à ses propriétés médicinales, mais au fait que la luzerne serait originaire de Médie. Quant au nom vernaculaire, il est emprunté à l'occitan *luserna*, qui désigne une petite lumière ou le ver luisant, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante.

7.3.1. L'espèce *Medicago truncatula*

C'est une espèce diploïde ($2n=16$) et autogame de taille intermédiaire (60 cm au maximum) poilue à port variable, présente sur des sols lourds, marneux ou argileux.

L'inflorescence porte de 1 à 5 fleurs de 5 à 8 mm de longueur et présente des gousses de (3 à 12 graines) cylindriques en forme de tronç.

Cette espèce est localisée principalement dans les régions chaudes et de basse altitude méditerranéennes, elle est considérée comme une espèce assez sensible au froid et aux parasites foliaires. C'est une plante modèle essentiellement lors des études sur la symbiose plante-rhizobium (Prosperi, 1995).



Figure N°07-*Medicago truncatula* (www.maltawildplants.com).

8. Le microsymbiont : les genres *Rhizobium* et *Ensifer*

« Rhizobia » est le terme qui a été donné aux bactéries du sol qui ont la capacité d'induire des nodules sur les légumineuses, et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose. La plupart d'entre eux ne forment de nodules qu'avec un petit nombre de plantes hôtes, alors que d'autres sont très spécifiques et n'infectent qu'une seule espèce (Hopkins, 2003).

Actuellement on préfère substituer au terme de « rhizobia », dérivé du nom du genre *Rhizobium*, le terme de BNL = Bactéries Nodulant les Légumineuses (Zakhia *et al.*, 2004). En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique. Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia* (classe des α -protéobactéries) et *Burkholderia* et *Ralstonia* (classe des β protéobactéries) ainsi que certaines γ -protéobactéries (Benhizia *et al.*, 2004), forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuse (Figure N°08) (Zakhia et de Lajudie 2001; Moulin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Ngom *et al.*, 2004).

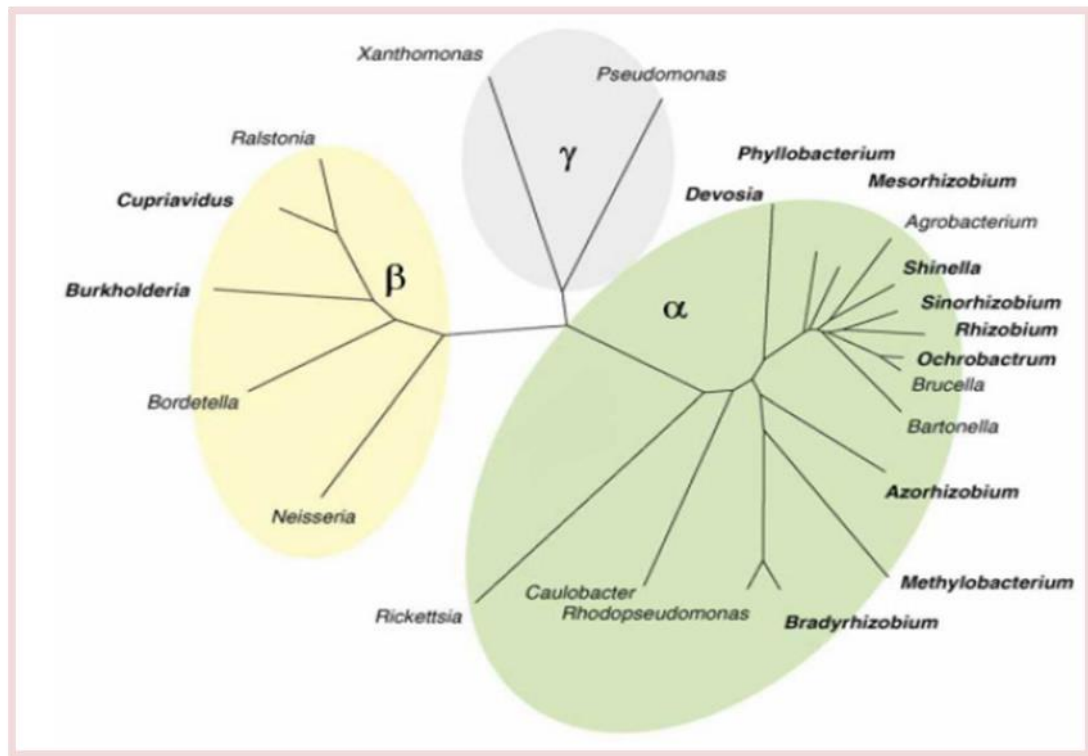


Figure N°08-Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

La première bactérie nodulant une légumineuse a été isolée en 1888 par Beijerinck, et initialement nommée *Bacillus radicicola*, puis renommée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889).

Les rhizobiums ont été décrits comme bactéries fixatrices d'azote, à Gram négatif, aérobies, ayant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 nm de largeur et de 1,9 à 3nm de longueur et non sporulants (Jordan, 1984). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Figure N°09) (Werner, 1992).

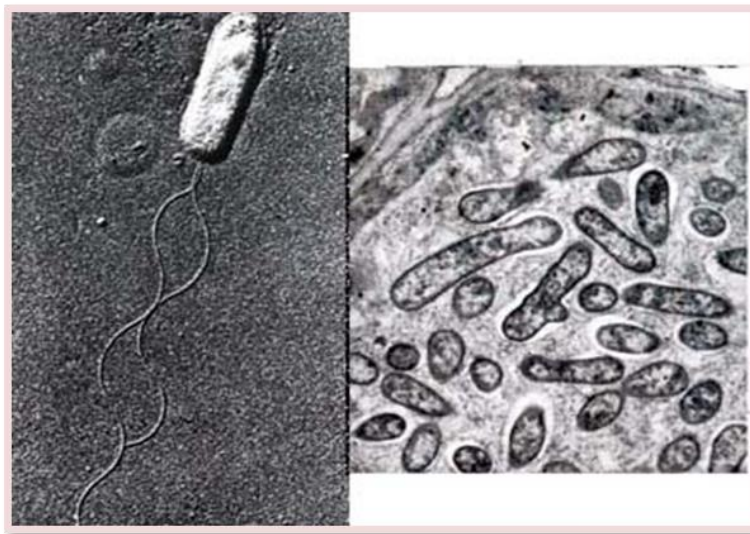


Figure N°09-*Rhizobium leguminosarum* (cellule mobile flagellée et bacteroïdes) Jordan (1984) in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1.

Les Rhizobiums sont trouvés soit à l'état libre (en général dans le sol) soit en association avec des légumineuses. Mais leur critère principal reste leur capacité de nodulation.

Suivant leur vitesse de croissance, on peut distinguer deux groupes de rhizobiums (Jordan, 1982) : le genre *Rhizobium* à croissance rapide, et le genre *Bradyrhizobium* à croissance lente.

On distingue deux formes de *Rhizobium* :

- **Une forme végétative (non bacteroïde)** : ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection ou sur les milieux de culture artificiels.

Les *Rhizobium* végétatifs sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **Une forme bactéroïde** : Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, 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).

- Caractères physiologiques et culturels des rhizobia

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

Deux groupes sont généralement assignés aux cultures des rhizobia:

- le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h.

- Le deuxième est le groupe des rhizobia à croissance lente, ce sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture des rhizobiums (Vincent, 1970). Sur ce dernier les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent aussi être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles 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).

- Caractères biochimiques :

Les rhizobiums sont qualifiés de bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose ainsi que des composés aminés. Pour certaines espèces, la présence de vitamines est cruciale pour leur croissance (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais celle-ci est meilleure en présence de glucose, mannitol ou de saccharose. Quant aux souches à croissance lente, la majorité ont une préférence pour le pentose. (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont donc besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

8.1. Etudes sur le microsymbiont spécifique

8.1.1. *Rhizobium sulae* (partenaire symbiotique de *H. coronarium*)

C'est un bacille à Gram négatif, aérobie, non sporulé, mobile par flagelles polaires multiples. Les Colonies sur le milieu YMA sont circulaires et opaques, atteignant un diamètre de 3-5 mm dans les 3 jours à 28 °C. Le taux de croissance (10 souches mesurées) se situe entre 0-28 et 0-32 h (Cabrera & Ruiz-Argueso, 1979).

La croissance sur le milieu YMA est inhibée par une concentration de 0-5 et 1% (p / v) de NaCl et un pH inférieur à 5.5.

La plupart des souches sont résistantes à la carbénicilline et l'acide nalidixique, utilisent d-(+) galactose, le mannitol, le raffinose, le rhamnose et le lactose comme source de carbone et le glutamate, la proline, la valine, l'isoleucine, l'arginine et l'asparagine comme source d'azote.

Un nombre de travaux portant sur l'aspect phénotypique de l'espèce *Rhizobium sulae* montrent que cette souche assimile tous les mono et disaccharides comme source de carbone, sauf le citrate de Na, et une bonne partie des acides aminés comme source d'azote, se cultive jusqu'à 32°C et tolère 0,5% de NaCl. Cette espèce réduit les nitrates, hydrolyse l'urée, et possède une polygalacturonase comme la majeure partie des autres espèces de *Rhizobium*. Les espèces isolées du bassin méditerranéen montrent un même profil de protéines cellulaires sur SDS-PAGE, un même profil plasmidique sur gel d'agarose (Struffi *et al.*, 1998). Une électrophorèse des isoenzymes de la même espèce isolée en Algérie, Italie et Espagne, montre

un degré de polymorphisme pour certains enzymes comme ADh, MDH, IDH et G6P, entre autres (Benguedouar, 1997).

La teneur en G + C est de 61,6% en moles (Struffi *et al.*, 1998). Les valeurs d'hybridation d'ADN entre les membres de taxons sont supérieures à 70%.

Parmi les techniques moléculaires utilisées permettant d'inclure l'espèce *Rhizobium sullae* dans le genre rhizobium sont, entre autres, le séquençage de l'ARNr 16s et l'hybridation ADN-ADN (Squartini, 2002).

Le séquençage de ARNr 16S de quatre souches de *Rhizobium* isolées de *H. coronarium* dans le bassin méditerranéen montre une totale similitude.

Trois souches parmi les symbiotes *H. coronarium* (IS123T, A6 et RHF, respectivement isolées en Espagne, en Algérie et en Italie) ont été choisies pour une série d'hybridations par paires avec des différentes espèces de *Rhizobium*. Les résultats montrent une homologie de 77,3 à 100% avec une moyenne de 92,1%.

8.1.2. *Ensifer medicae* (partenaire symbiotique de *Medicago truncatula*)

Ensifer (Sinorhizobium) medicae est un microsymbiont fixateur d'azote efficace d'un large éventail d'espèces annuelles de *Medicago*. C'est un bacille acido-tolérant, aérobic, mobile, non sporulé, Gram négatif. Cette bactérie a été isolée à partir des nodules de racine de *M. murex* recueillies en Sardaigne, en Italie en 1981 (Reeve, *et al.*, 2010).

E. medicae WSM419 forme des colonies mucoïdes qui peuvent apparaître en forme de beignets (a) sur des milieux spécifiques tels que YMA, ne forme pas de spores (b) et des flagelles péritriches. (c) (Reeve, *et al.*, 2010).

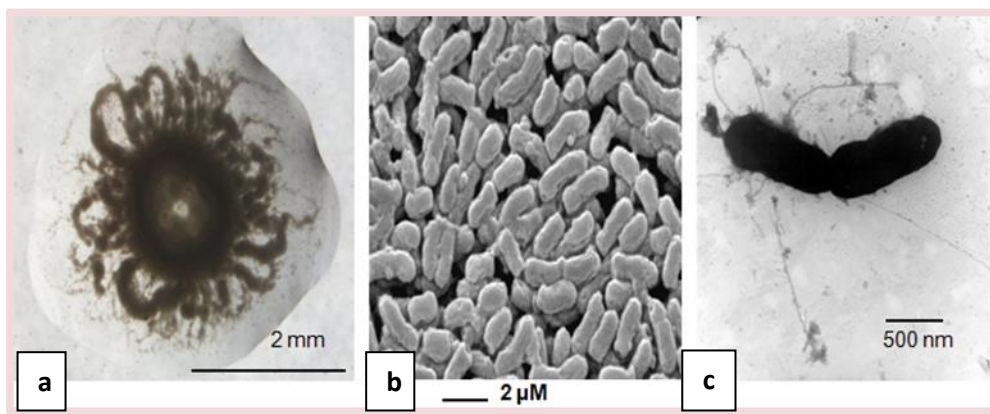


Figure N°10- unique morphologie des colonies (a) la numérisation (b) et la transmission (c) au microscope électronique de *E. medicae* souche WSM419 (Reeve, *et al.*, 2010).

Sur un milieu minimum incubé à 28°C *E. medicae* WSM419 a un temps de génération de 4.1h. D'après les analyses phylogénétiques il appartient à la famille des *Rhizobiaceae*, la classe des *Alphaproteobacteria* (Reeve, *et al.*, 2010).

Une contrainte particulière à la formation de cette symbiose est l'acidité, principalement en raison de la nature sensible aux acides. La culture en laboratoire du microsymbionte de *Medicago* montre qu'il ne parvient pas à se développer en dessous du pH 5,6 et il est considéré comme le plus sensible à l'acidité (Reeve, *et al.*, 2010).

La taille de son génome est de 6,817,576bp contenant 6518 gènes codants pour des protéines et 81 gènes seulement codant pour l'ARN. Le génome contient un chromosome de la taille de 3,781,904bp et de 3 plasmides de taille 1,570,951 pb 1,245,408 bp, et 219,313 bp. Le plasmide le plus petit est une caractéristique unique de ce microsymbionte (Reeve, *et al.*, 2010).

E. medicae et *E. meliloti* sont traditionnellement séparés sur la base de la nodulation efficace (Nod+, Fix+) par *E. medicae* sur *M. polymorpha*, caractéristiques symbiotiques spécifiques qui distinguent *E. medicae* WSM419 de *E. meliloti* incluant sa capacité à noduler et à fixer l'azote efficacement avec un large rang de *Medicago* annuelles méditerranéennes, incluant *M. polymorpha*, *M. arabica*, *M. murex* et *M. sphaerocarpos*. WSM419 est symbiotiquement compétente avec ces espèces lorsqu'elles sont cultivées dans des sols acides, en revanche WSM419 est Fix- avec les espèces de *Medicago* annuelle des sols alcalins comme *M. littoralis*, *M. tornata* et les hybrides de *M. littoralis*/*M. truncatula*. WSM419 est

aussi Nod+, Fix+ avec les légumineuses fourragère pérennes *M. sativa*, mais moins efficace avec ces espèces que ne le sont certains isolats de *M. meliloti*. Cette souche est plus efficace à fixer l'azote avec *M. truncatula* que *Meliloti* Sml021, ce qui en fait un candidat idéal pour l'inoculation de ce genre de légumineuse (Reeve, *et al.*, 2010).

M. truncatula a la capacité de former une symbiose efficace avec deux espèces bactériennes, *S.meliloti* et *Sinorhizobium medicae* (Reeve, *et al.*, 2010).

Le polymorphisme moléculaire de l'ADN a été estimé par électrophorèse capillaire simple brin polymorphisme de conformation et le fragment de restriction polymorphisme de longueur sur cinq locis. Plus de 90% des rhizobiums isolés appartenait à l'espèce *Sinorhizobium medicae* (autres appartenait à *Sinorhizobium meliloti*), avec des proportions différentes des deux espèces parmi les quatre lignes de *M. truncatula* . Les populations de *S. Meliloti* sont plus diversifiées que celles de *S. Medicae* (Reeve, *et al.*, 2010).

D'un point de vue diversité bactérienne, un total de 255 isolats de *Sinorhizobium* ont été obtenus, avec 52 à 59 individus provenant de chacune des espèces *M. truncatula*. La proportion de *S. medicae* était significativement plus élevée que celle de *S. Meliloti* (Reeve, *et al.*, 2010).

9. Effet des métaux sur les bactéries du sol (*Rhizobium*)

L'exposition à un excès de manganèse affecte la composition de la membrane externe chez les rhizobia. En fait, Appana (1988) a montré que les fortes concentrations en manganèse peuvent altérer la composition ainsi que le rôle des exopolysaccharides chez des souches de *Sinorhizobium meliloti*. Wilson et Reisenauer (1970) ont rapporté que le manganèse et le zinc affectent négativement la croissance des rhizobia. Un excès de zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des rhizobia mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques (El-Hilali, 2006).

La résistance des souches de lupin aux différentes concentrations testées en cadmium et en mercure paraît être semblable. Ces deux métaux ont été testés à de faibles concentrations et les résultats confirment qu'ils sont les plus inhibiteurs de la croissance. La taille des colonies formées a été également et visiblement très réduite par rapport à celle des témoins.

Actuellement, le cadmium est reconnu comme étant néfaste aussi bien pour les microorganismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (El-Hilali, 2006).

Les métaux lourds présents dans le sol peuvent entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire des rhizobies. Le nombre et la survie de ces bactéries dans les sols contaminés peuvent être sévèrement affectés. Angle et al. (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1994) ont rapporté que les souches de *Bradyrhizobium* sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'ils ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement. Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *bradyrhizobium japonicum*. 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. Certaines associations rhizobium – légumineuse sont capables de se maintenir sur des sols à haut contenu en métaux lourds (El-Hilali, 2006).



CHAPITRE II
Matériel et méthodes

1. Caractères phénotypiques des isolats

1.1. Isolement des bactéries à partir des nodules

1.1.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines des deux plantes spontanées *Hedysarum coronarium* et *Medicago truncatula* dans la région de Constantine, au niveau du campus universitaire de la Chaaba et au niveau de la route de Menia (Constantine). Le prélèvement des nodules est réalisé selon les techniques préconisées par Vincent, J.M. (1970) et Somasegaran, P. et J. Haben (1994).

Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Une fois la plante transportée au laboratoire, manuellement on se débarrasse de la terre au niveau des racines en prenant soin de ne pas endommager les nodules, ensuite les racines et leurs nodules sont lavés délicatement à l'eau de robinet afin d'éliminer le reste du sol.

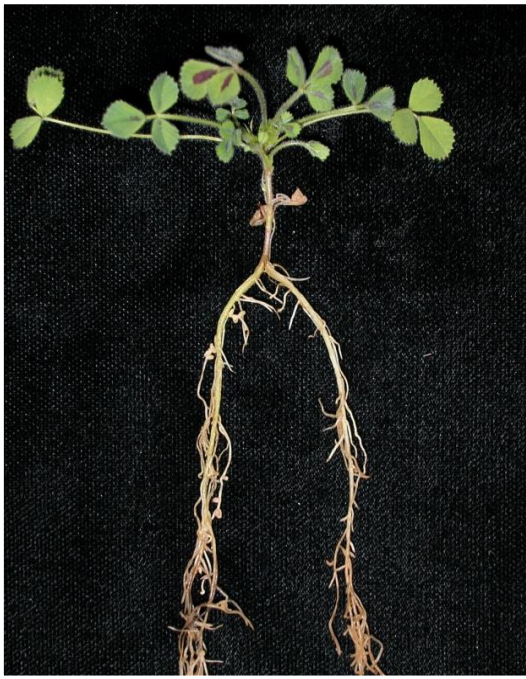


Photo N°01- *Medicago truncatula*



Photo N°02- *Hedysarum coronarium*

1.1.2. Conservation des nodules

Les nodosités sont prélevées délicatement à partir des racines de la plante à l'aide d'un bistouri, puis séchées au papier absorbant, pour être conservées dans un tube contenant un dessiccateur : le chlorure de Calcium (CaCl_2) jusqu'à leur utilisation (Vincent, J.M., 1970).

Le nom de la plante, la date et le lieu de prélèvement, ainsi que la date de conservation sont mentionnés sur chaque tube.

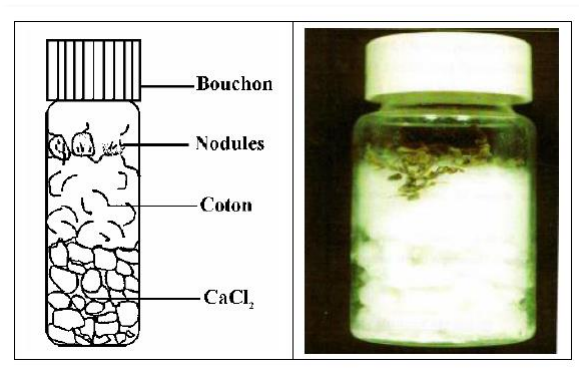


Figure N°11- Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

1.1.3. Stérilisation des nodules

Les nodules conservés sous agent dessiccateur sont transférés dans un tube contenant de l'eau et mis au réfrigérateur pendant toute une nuit.

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié à 0,1% (p/v) pendant 3 minutes, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile. Après le dernier rinçage, les nodules sont laissés dans un flacon d'eau distillée stérile pendant une heure. (Vincent, J.M., 1970).

1.1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode du nodule écrasé réalisée par Vincent, J.M., (1970).

Sous une hotte à flux laminaire de la marque KOTTERMANN, les nodules sont déposés séparément dans une boîte de Pétri stérile, chacun est immergé par 2 à 3 gouttes d'eau distillée

stérile. Avec une pince stérilisée par flambage, les nodules stériles sont écrasés individuellement. À l'aide d'une anse de platine, flambée au bec bunsen, le jus du nodule est prélevé et étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, Yeast-Mannitol-Agar (YMA, Vincent, J.M., 1970) additionné de rouge Congo (Annexe 01).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies bien isolées et donc faciles à caractériser. Le même broyat du nodule est ensemencé sur une boîte de Pétri contenant le milieu Glucose Peptone Agar additionnée de pourpre de bromocrésol (GPA au BCP. Annexe 1) et sur bouillon YMB. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 à 72 h.

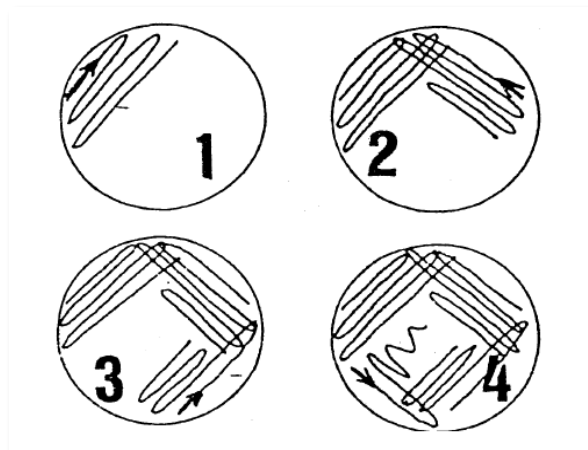


Figure N°12- Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

Le même protocole est suivi pour les nodules de *Medicago truncatula*.

2. Caractères cultureux

Les caractères recherchés sont :

- La forme, l'aspect et la couleur des colonies.
- La croissance sur les milieux suivants (Annexe 1):

YMA (Yeast Mannitol Agar).

YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + rouge Congo).

YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + bleu de Bromothymol).

2.1.Purification des isolats

La méthode consiste à mettre en culture les inoculums sur bouillon YMB 24h à 28°C et de les ensemercer sur YMA+ rouge Congo. Les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo sont prise en considération. Ces colonies ont fait l'objet de repiquages successifs sur YMA+RC et d'une coloration de Gram (annexe 2) afin d'assurer leur degrés de pureté.

La forme, la couleur, la taille, et la texture des colonies bactériennes sont vérifiées sur le milieu YMA. La vitesse de croissance des isolats est mise en évidence dans des boîtes de contenant le milieu YMA additionné de bleu de bromothymol (BTB) (annexe 3) qui a une couleur verte à pH 6,8. Les bactéries à croissance lente montre une réaction alcaline dans ce milieu et la couleur vire vers le bleu. Cependant les bactéries à croissance rapide donnent une réaction acide modifiant la couleur verte au jaune (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.2.Conservation des isolats

La conservation des souches isolées se fait sur le milieu YMA+CaCo₃. L'ensemencement est réalisé à partir d'une culture bactérienne en milieu YMB sur boite de Pétri. Après incubation pendant 72h à 28°C, les boites de Pétri sont conservées au réfrigérateur à 4°C.

Tableau N°01- isolats et souches de référence utilisées

Code des souches	Souches	Plante-hôte	Origine géographique	Source
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp	<i>Hedysarum .coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar-Constantine
CIII	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	S.Dekkiche-Constantine
T	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 843			B.J.Rolfe, Camberra
HC1	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
HC2	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
HC3	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
Med1	Notre étude	<i>Medicago truncatula</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
Med2	Notre étude	<i>Medicago truncatula</i>	Constantine, Algérie	Cette étude

3. Caractéristiques métaboliques des isolats

3.1. Tests biochimiques (recherches des enzymes spécifiques)

3.1.1. Réduction des nitrates

Les souches sont cultivées sur bouillon TY contenant 0.1% de KNO₃ (w/v).

Après 4 jours d'incubation avec agitation à 28°C, on ajoute à la culture 3 à 4 gouttes des réactifs de la nitrate réductase (Guiraud, 1998).

Réactif I : Acide sulfanilique à 3% dans l'acide dilué à 25%.

Réactif II : α naphtylamine à 0.5% dans l'acide dilué au même temps.

Après addition des réactifs I et II, s'il y a une coloration rouge, cela signifie que les souches ont une nitrate réductase + ; si non, on rajoute une pincée de poudre de zinc et on observe la couleur (une coloration rouge signifie la non réduction des nitrates, alors qu'un

milieu incolore indique que le stade nitrate est dépassé, donc la souche possède la nitrate réductase).

3.1.2. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats et souches témoins sont cultivés sur milieu YMA contenant 2% w/v d'urée et 0.012 g/l de rouge de phénol comme indicateur de pH.

Le milieu solide sans urée est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis refroidi jusqu'à environ 45°C. La solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22µm) et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire puis incubation à 28°C pendant 48 heures.

La réaction positive est indiquée par la présence de colonies alcalinisant ou acidifiant le milieu.

3.1.3. Activité cellulolytique

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode modifiée du rouge Congo de Teather et Wood (1982).

Les bactéries sont mises en culture sur milieu YMA contenant 0.25% w/v de CMC (carboxy-methyl-cellulose), puis incubées à 30°C pendant 5 jours.

Après incubation, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante, puis remplies d'une solution de rouge de Congo (1mg/ml) et incubées 30 min à 30°C. La solution du rouge Congo est remplacées par une solution de NaCl 1M, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 min puis sont vidées.

Les colonies apparaissent sur fond rouge, avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanasique.

4. Résistance intrinsèque aux métaux lourds

4.1. Détermination de la CMI sur milieu solide

La capacité des souches étudiées à tolérer cinq métaux lourds est testée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur le milieu Mueller-Hinton contenant diverses concentrations croissantes des métaux lourds suivants :

Tableau N°02- Différentes concentrations de métaux lourds utilisés

Métaux	Concentrations en µg/ml de milieu Mueller-Hinton			
ZnSO ₄	100	200	500	1000
Pb (COO) ₂	500	1000	1500	2000
CdCl ₂	20	50	100	200
CuSO ₄	200	500	1000	
HgCl ₂	5	10	20	

Les boîtes sont subdivisées en portions au nombre des souches étudiées, puis ensemencées et mises à incubation à 28°C durant 5 à 7 jours.

5. Mesure de la Croissance des souches en milieu liquide et en présence de métaux lourds

Différentes concentrations des mêmes métaux utilisés précédemment sont ajoutés à des flacons contenant chacun 150 ml de milieu TY, ces derniers sont ensuite autoclavés pendant 20 minutes à 120°C.

L'inoculum de chacune des souches est réalisé dans un tube de 7,5ml de TY et incubé 24h à 28°C et servira pour suivre la croissance de ces souches dans un flacon de 150ml TY contenant différentes concentrations en métaux lourds.

La mesure de la croissance est mesurée pendant 48 heures dans un spectrophotomètre (JENWAY 6300) où la densité optique est relevée toutes les deux heures à une longueur d'onde de 600 nm ($DO_{\lambda 600}$).

Tableau N°03- Différentes concentrations de métaux lourds utilisés

Métaux	Concentrations en µg/ml de milieu TY		
ZnSO₄	1500	2500	
Pb (COO)₂	2500	3500	
CdCl₂	5	10	20
CuSO₄	1500	2500	
HgCl₂	10	50	



CHAPITRE III

Résultats

1. Etude morphologique et culturelle des isolats

Les aspects microscopique, morphologique et cultural des colonies sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°04- Aspect morphologique et cultural des isolats

	Isolat HC1	Isolat HC2	Isolat HC3	Isolat Med1	Isolat Med2
Croissance sur milieu YMA	Croissance après 24 h. Colonies rondes à bords réguliers avec un diamètre de 2 à 4 mm, plate, lisse, de couleur blanche, brillante, translucides, ayant une consistance crémeuse.	Croissance après 24 h. Colonies de forme irrégulière avec un diamètre de 4 mm, plate, lisse, de couleur rosâtre, brillante, opaque, ayant une consistance crémeuse.	Croissance après 24 h. Colonies de forme irrégulière avec un diamètre de 5 mm, plate, rugueuse, de couleur rosâtre, brillante ayant une consistance crémeuse.	Croissance après 24 h. Colonies rondes, avec un diamètre de 2 à 3 mm, plate, de couleur blanchâtre, brillante, translucide, ayant une consistance crémeuse.	Croissance après 24 h. Colonies rondes, avec un diamètre de 1 à 2 mm, plate, de couleur blanchâtre, brillante, translucide, ayant une consistance crémeuse.
Croissance sur milieu YMA au rouge Congo	Les isolats absorbent très faiblement le rouge Congo.	Les isolats absorbent très faiblement le rouge Congo.	Les isolats absorbent très faiblement le rouge Congo.	Les isolats absorbent très faiblement le rouge Congo.	Les isolats absorbent très faiblement le rouge Congo.
Croissance sur milieu YMA au bleu de bromothymol	Apparition des colonies sans virage de la couleur du milieu.	Apparition des colonies sans virage de la couleur du milieu.	Apparition des colonies sans virage de la couleur du milieu.	Apparitions des colonies avec virage du milieu de culture du vert au jaune.	Apparitions des colonies avec virage du milieu de culture du vert au jaune.
Observation microscopique	Bacilles Gram négatif, de couleur rose, et de petite taille.	Bacilles Gram négatif, roses, à bouts ronds et de taille moyenne.	Bacilles Gram négatif, roses, à bouts ronds et de taille moyenne.	Bacilles Gram négatif, roses, de petite taille, fins et dispersés.	Coccobacilles Gram négatif, roses, de petite taille.

1.1. Croissance des isolats sur YMA

La croissance sur milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) est observée après 24 à 48h d'incubation (Photo N°03).

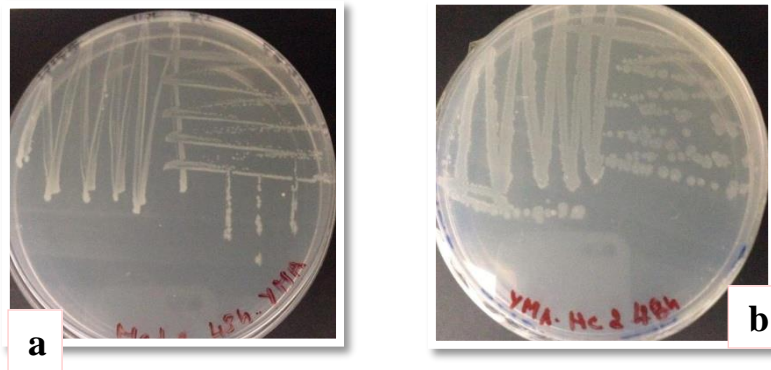


Photo N°03- Aspect des colonies sur YMA.

a) Isolat Med2

b) Isolat HC2

1.2. Croissance des isolats sur YMA + rouge Congo

Les isolats n'absorbent pas le rouge Congo contrairement aux contaminants qui l'absorbent fortement.

Généralement, les rhizobia et autres B.N.L. apparaissent sous forme de colonies blanches ou absorbent très faiblement le rouge Congo (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984). Malgré le fait que ce dernier soit souvent rajouté aux milieux de culture afin d'isoler les rhizobia ou dans le but de tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être considéré comme agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries.

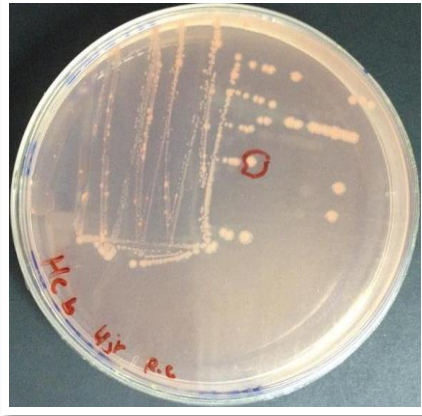


Photo N°04- Aspect des colonies sur YMA+ rouge Congo – isolat HC3.

1.3. Aspect microscopique des isolats

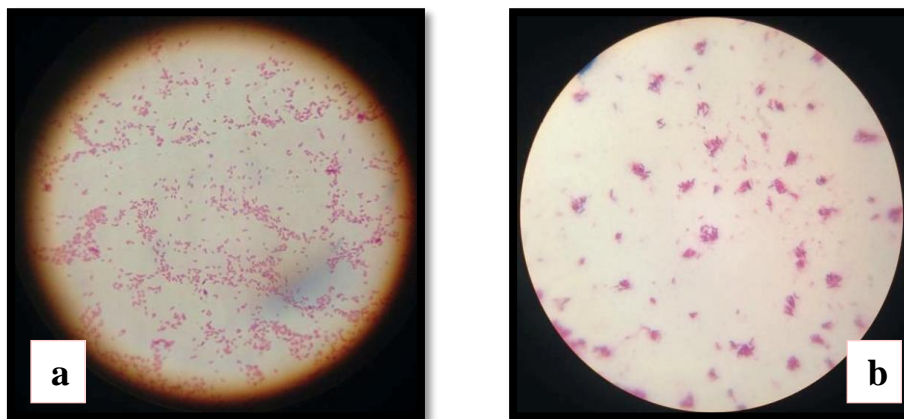


Photo N°05- Aspect microscopique des isolats (Grosissement x 100)

a) Isolat Med2

b) Isolat HC1

La coloration du Gram réalisée sur les différents isolats révèle des bâtonnets Gram négatif. Ce qui répond à l'aspect microscopique aussi des rhizobia que les bactéries nodulant les Légumineuses (B.N.L.).

1.4. Croissance des isolats sur YMA + Bleu de Bromothymol

Pour les cultures sur milieu YMA contenant le bleu de bromothymol il y a acidification du milieu après 24h d'incubation (virage de l'indicateur de pH au jaune) ; ceci confirme que les

isolats sont à croissance rapide. On note une particularité des isolats HC1 et HC2, où l'on décèle un virage tardif du milieu (après 4 jours d'incubation).

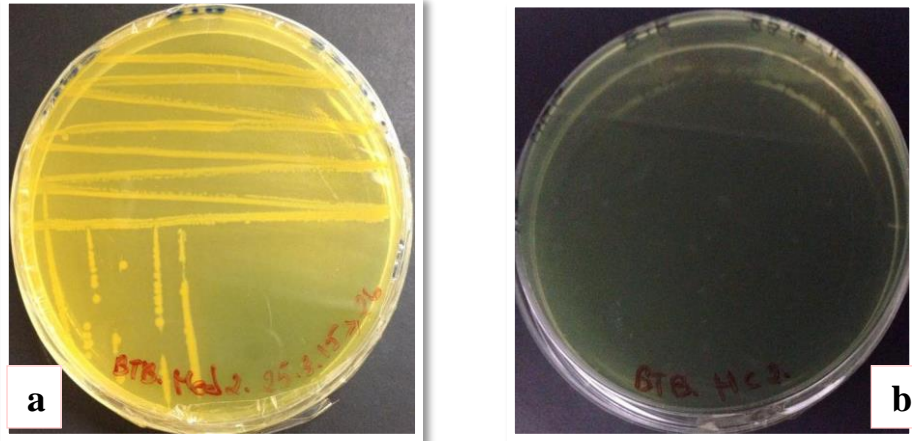


Photo N°06- Croissance sur YMA + BTB.

a) Isolat Med2

b) Isolat HC2

2. Recherche d'enzymes spécifiques

2.1. Réduction des nitrates

Après addition des réactifs I et II de la nitrate réductase, toutes les souches réduisent les nitrates en donnant une couleur rougeâtre, exceptées les souches HC1 et Med2 qui ont donné une réaction négative (Photo N°07), après addition de la poudre de zinc.

La coloration rouge ou rose traduit la décomposition des nitrates en nitrites. La réaction peut être rendue négative par la réduction des nitrites formés; il faut donc contrôler, dans le cas de l'absence de coloration, s'il reste des nitrates en ajoutant au milieu de la poudre de zinc qui les réduit et entraîne une coloration (Guiraud, 1998).

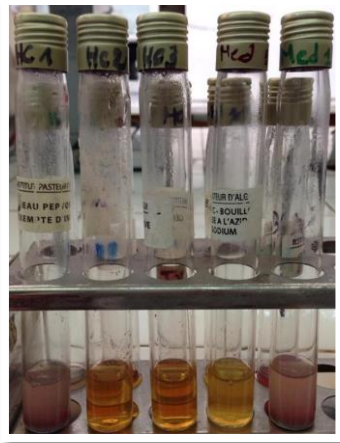


Photo N°07- Réduction des nitrates.

2.2. Hydrolyse de l'urée

L'hydrolyse de l'urée se traduit par une alcalinisation du milieu de culture en observant un virage de l'indicateur de pH, le rouge de phénol. Seule la souche HC2 a donné un résultat positif après 24h d'incubation qui s'est traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rose fushia (photo N°08-b).

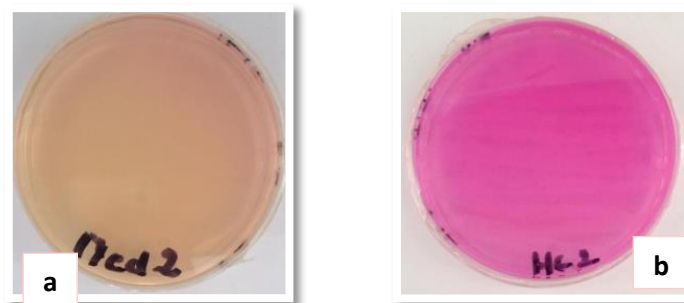


Photo N°08- Hydrolyse de l'urée.

a) Med2

b) HC2

2.3. Activité cellulolytique

Les colonies apparaissant sur un fond rouge entourées d'un halo jaune orangé ce qui met en évidence l'activité endoglucanasique. Les souches Med1 et Med2 donnent une réaction positive. Quant aux autres isolats on remarque l'absence de l'halo indiquant une activité cellulolytique négative.

Les hémicelluloses, et surtout la cellulose, constituants majeurs des cellules végétales ne sont accessibles qu'à une flore spécialisée (Davet, 1996). La démonstration de la présence de la cellulase et du hémicellulase en plus du pectinase chez les rhizobia suppose que ces bactéries infectent la plante légumineuse en hydrolysant la paroi des cellules racinaires dans le site d'infection (Martinez-Molina *et al.*, 1979).

Les constituants de la paroi cellulaire des plantes sont généralement semblables dans toutes les plantes dicotylédones et ne sont pas très divers chimiquement. Les enzymes hydrolysant ces substrats peuvent jouer un rôle dans le procédé d'infection mais n'ont pas un rôle direct dans la détermination de la spécificité de l'hôte (Hubbell *et al.*, 1978).

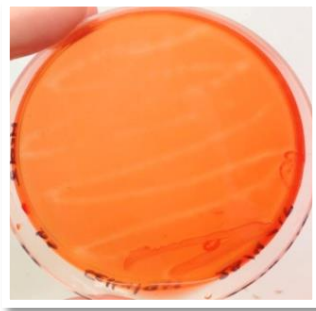


Photo N°09- Activité cellulolytique – isolat Med2

Tableau N°05- Résultats de la recherche d'enzymes spécifiques

	<i>R. sultae</i>	<i>R.l. bv trifolii</i> 843	<i>Mesorhizobium</i> sp	HC1	HC2	HC3	Med1	Med2
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'urée	+	+	+	-	+	-	-	-
Activité cellulolytique	+	+	-	-	-	-	+	+

3. Résistance intrinsèque aux métaux lourds

3.1. Détermination de la CMI sur milieu solide

Les concentrations inhibitrices sont déterminées après incubation des souches et isolats sur milieu Mueller Hinton en présence des métaux lourds pendant 5 à 7 jours à 28°C (Tableau 02).

La tolérance des souches aux métaux lourds est variable. Une croissance est observée en présence de tous les métaux lourds pour l'ensemble des souches ; exception faite pour le chlorure de Cadmium (CdCl_2) qui inhibe la croissance de la majeure partie des isolats. Toutefois certaines souches de référence présentent une résistance au Cd (*R.l. bv trifolii* et *R. sullae*).

De façon générale, l'effet de la toxicité des métaux lourds sur les microorganismes telluriques dépendent de leur disponibilité biologique. Ces derniers ont développé plusieurs mécanismes leur permettant d'immobiliser, mobiliser ou transformer les effets des métaux lourds (Gremion, 2003).

Ces mécanismes de résistance sont codés par des gènes du plasmide et des transposons et probablement par le transfert des gènes ou des mutations spontanées qui permettent aux bactéries d'acquérir une résistance aux métaux lourds (Gremion, 2003).

Tableau N°06- Croissance des isolats en présence de métaux lourds

	Concentration µg/ml de milieu	<i>Rhizobium sultae</i>	<i>R. leguminosarum bv. trifolii</i> 843	<i>Mesorhizobium sp</i>	HC1	HC2	HC3	Med1	Med2
ZnSO₄	100	++	+	+++	++	+++	++	+	++
	200	+	+	+++	++	++	++	+	++
	500	+	+	+++	++	++	++	+	+
	1000	+	+	+++	++	++	++	+	+
Pb(COO)₂	500	++	++	+++	+++	+++	++	+	++
	1000	++	++	+++	+++	+++	++	+	++
	1500	++	++	++	++	+++	++	+	++
	2000	++	++	++	++	+++	++	+	+
CuSO₄	200	+	+	++	+	++	++	++	++
	500	+	+	++	+	+	++	++	++
	1000	+	+	++	+	+	++	++	++
CdCl₂	20	+	+	+	-	++	-	-	-
	50	+	+	+	-	++	-	-	-
	100	+	+	-	-	+	-	-	-
	200	+	+	-	-	-	-	-	-
HgCl₂	5	++	++	+	+	+	++	+	+
	10	++	++	+	+	+	++	+	+
	20	++	++	+	-	+	+	+	+

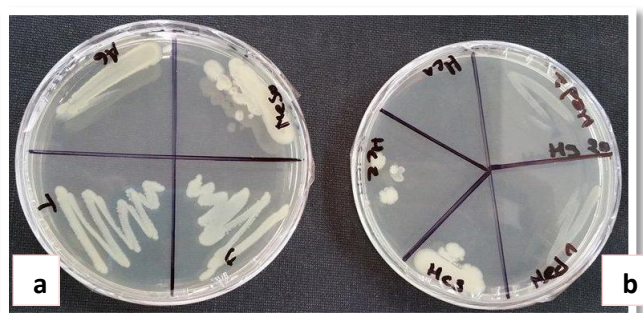


Photo N°010- Croissance des isolats inhibée en présence de 20µg/ml de HgCl₂

a) Souches de référence

b) Isolats



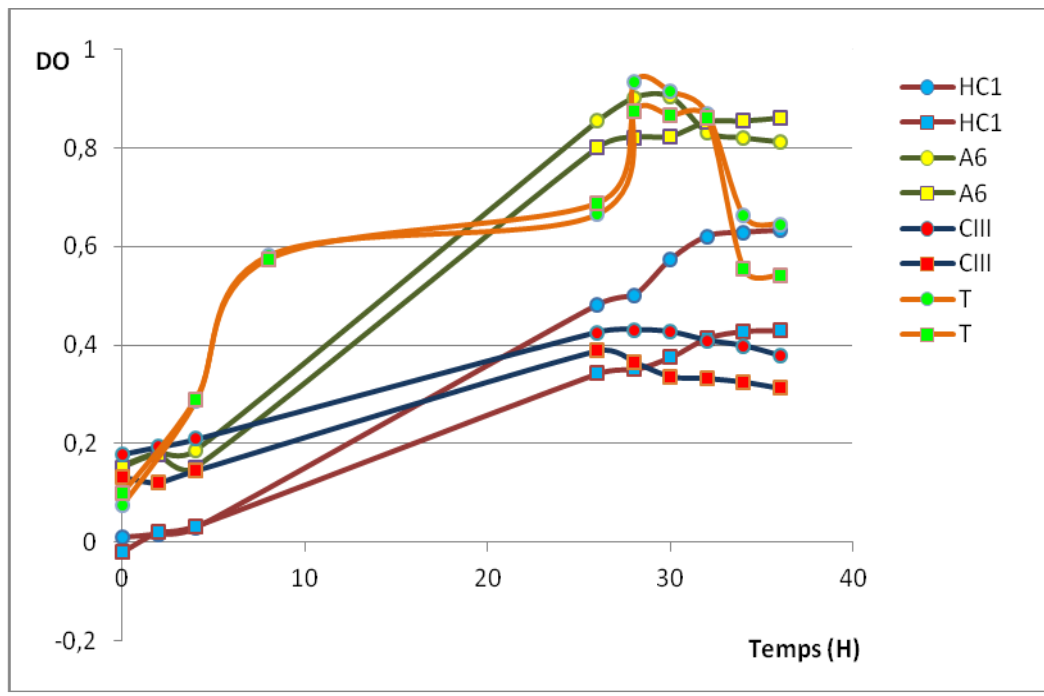
Photo N°11- Résistance des isolats à une concentration de 1000µg/ml de ZnSO₄.

a) Souches de référence

b) Isolats

3.2. Estimation de la Croissance en milieu liquide et en présence des métaux lourds

Selon les résultats obtenus en milieu solide Mueller-Hinton, la croissance des souches et isolats est réalisée sur bouillon TY en présence et en absence de métaux lourds. La mesure de l'absorbance sur spectrophotomètre est réalisée à λ_{600} . Les représentations graphiques illustrent (ci-après) le comportement des isolats et souches de référence en fonction d'un métal et du temps d'incubation ($\approx 48h$) :



A6 : *Rhizobium sultae*

CIII : *Mesorhizobium* sp

T : *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 843

● 1500 µg/ml

■ 2500 µg/ml

Figure N°013- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de ZnSO₄

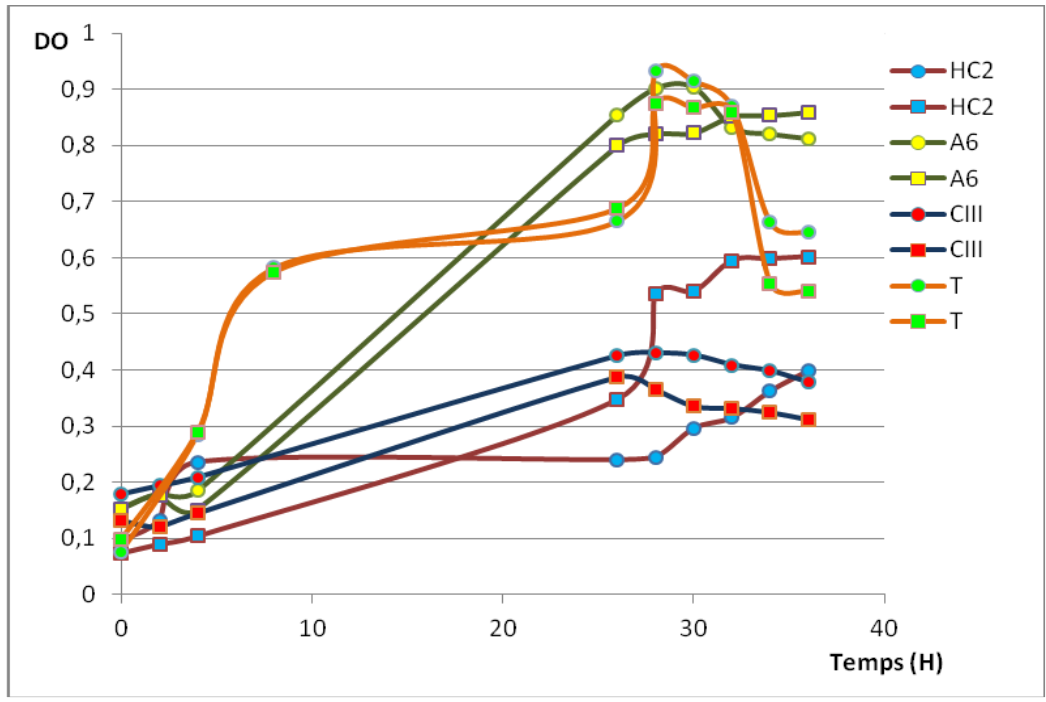


Figure N°14- Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de ZnSO₄

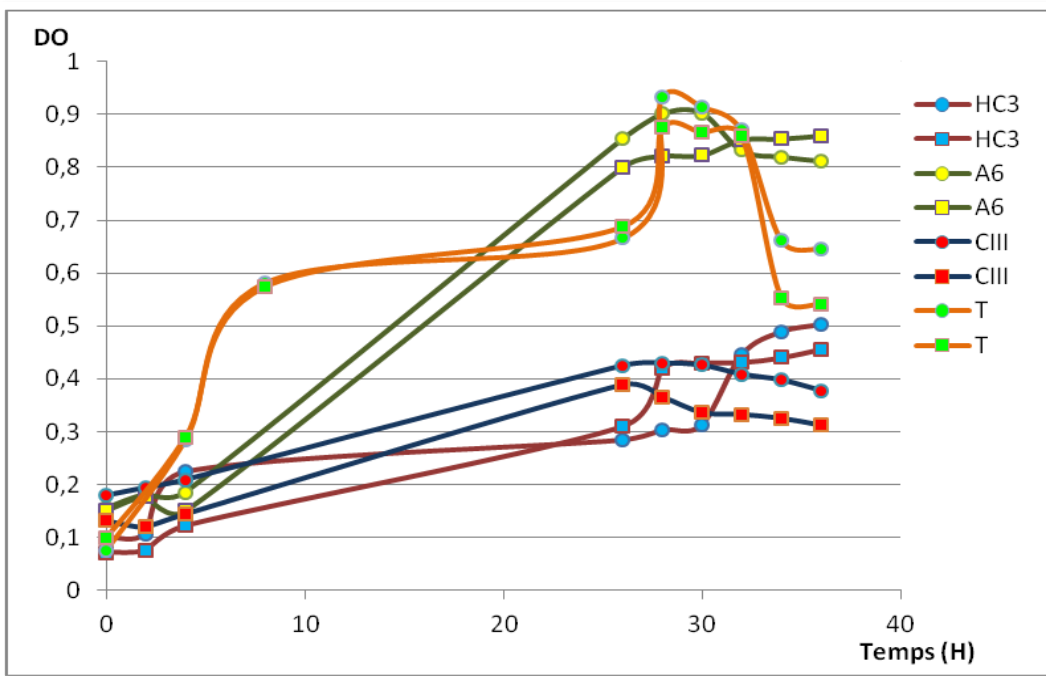


Figure N°15- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de ZnSO₄

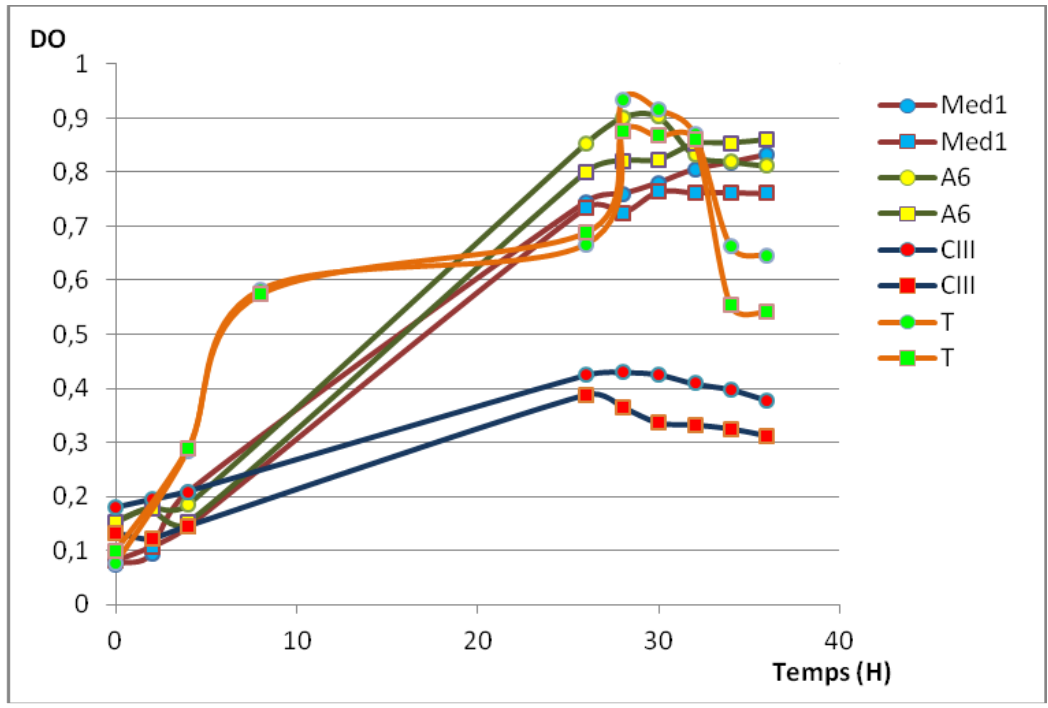


Figure N°16- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de ZnSO₄

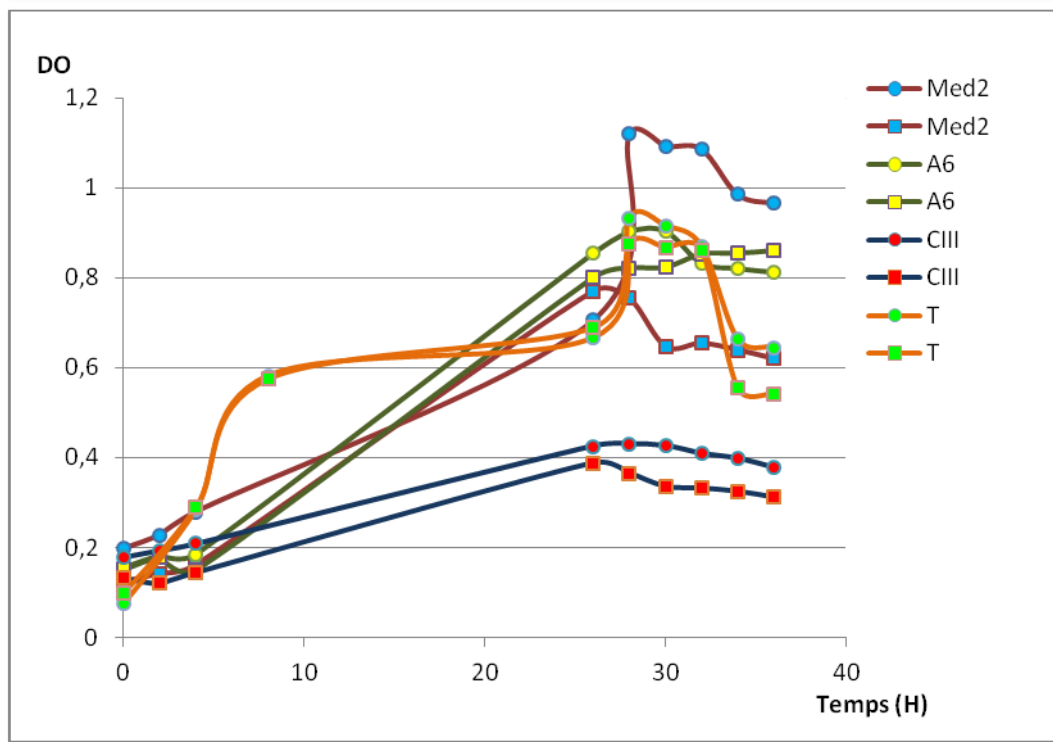
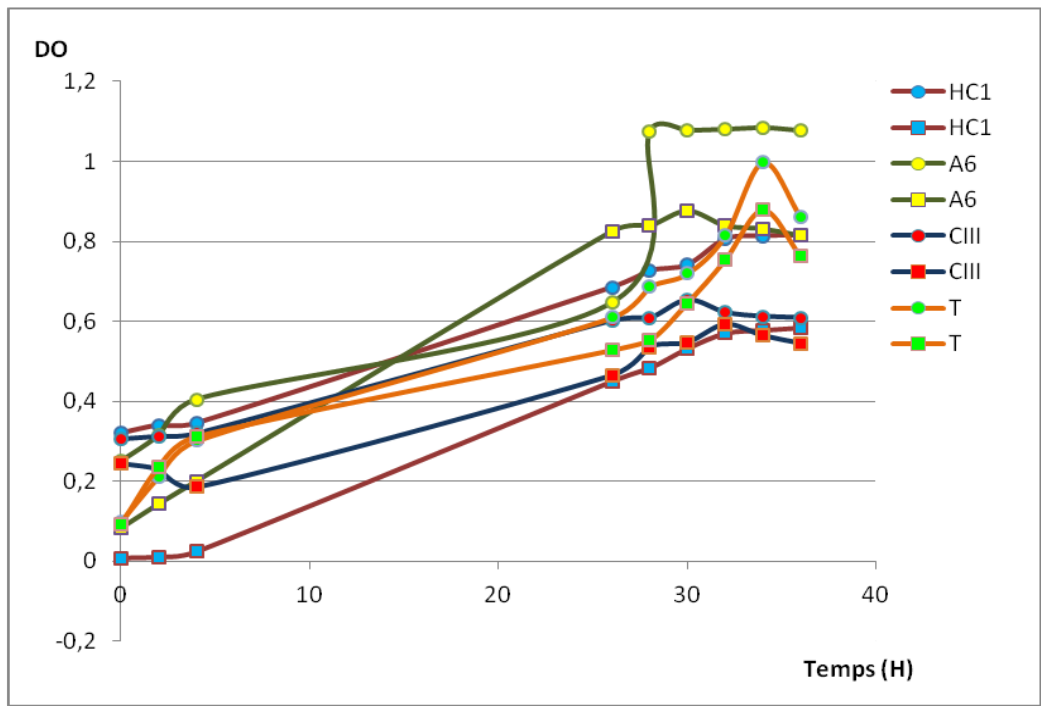


Figure N°17- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de ZnSO₄



A6 : *Rhizobium sllae*

CIII : *Mesorhizobium sp*

T : *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 843

● 1500 µg/ml

■ 2500 µg/ml

Figure N°18- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de CuSO₄

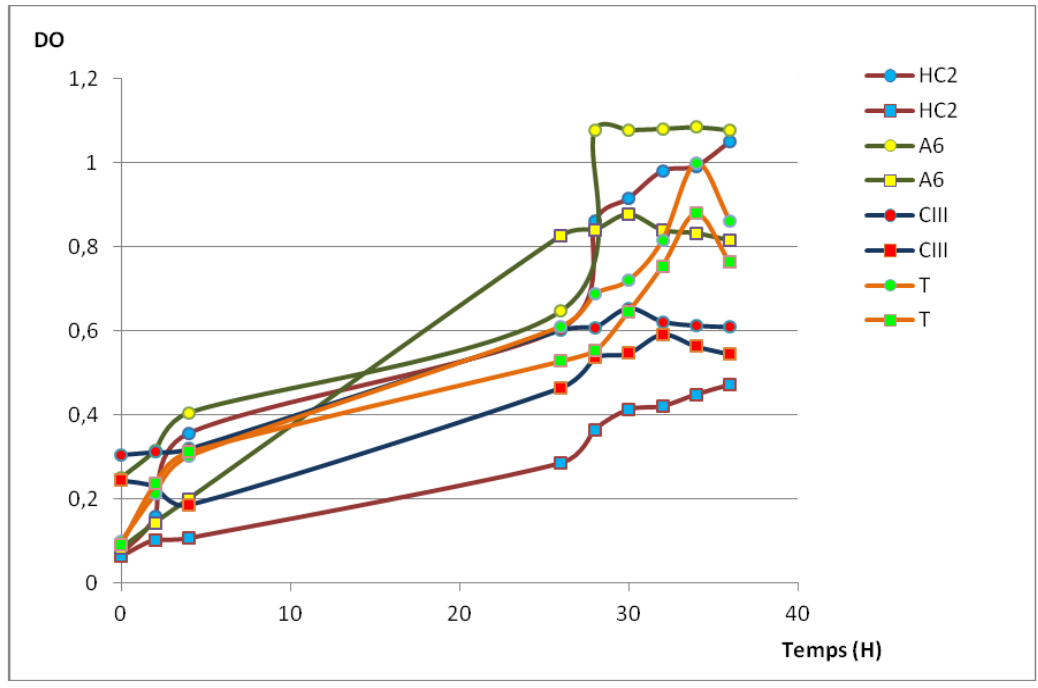


Figure N°19 Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de CuSO₄

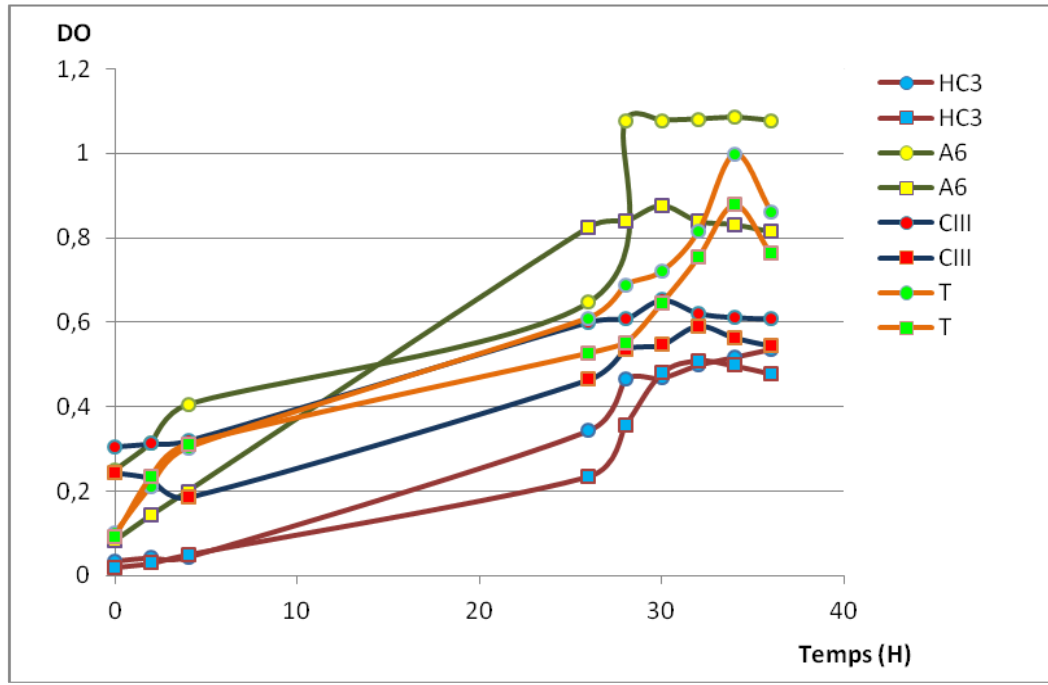


Figure N° 20- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de CuSO₄

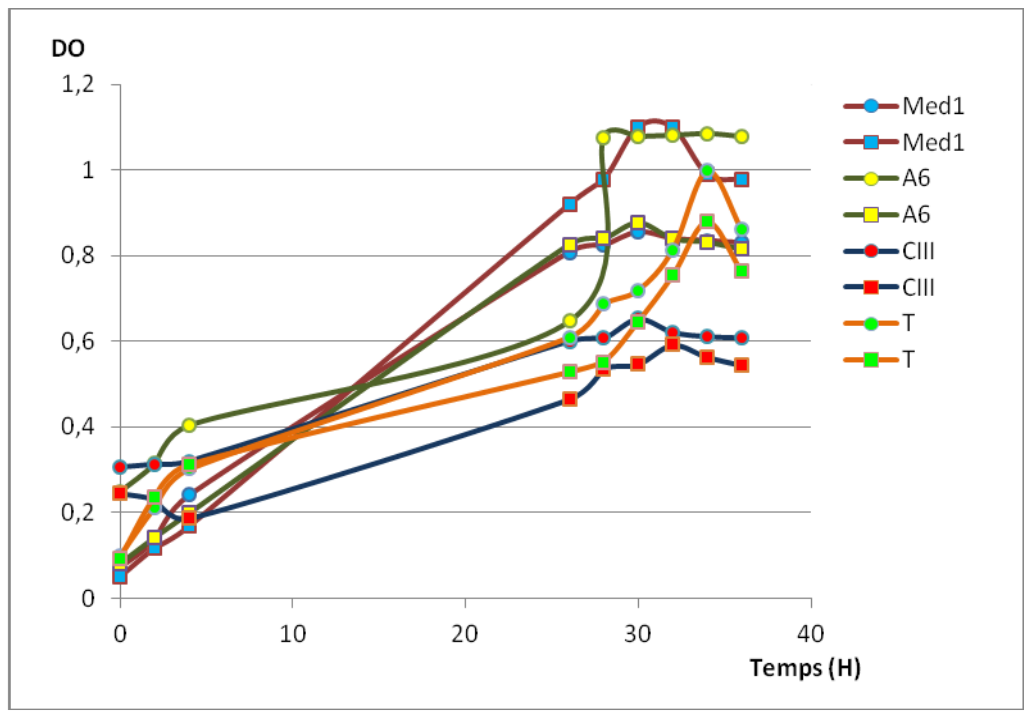


Figure N° 21- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de CuSO_4

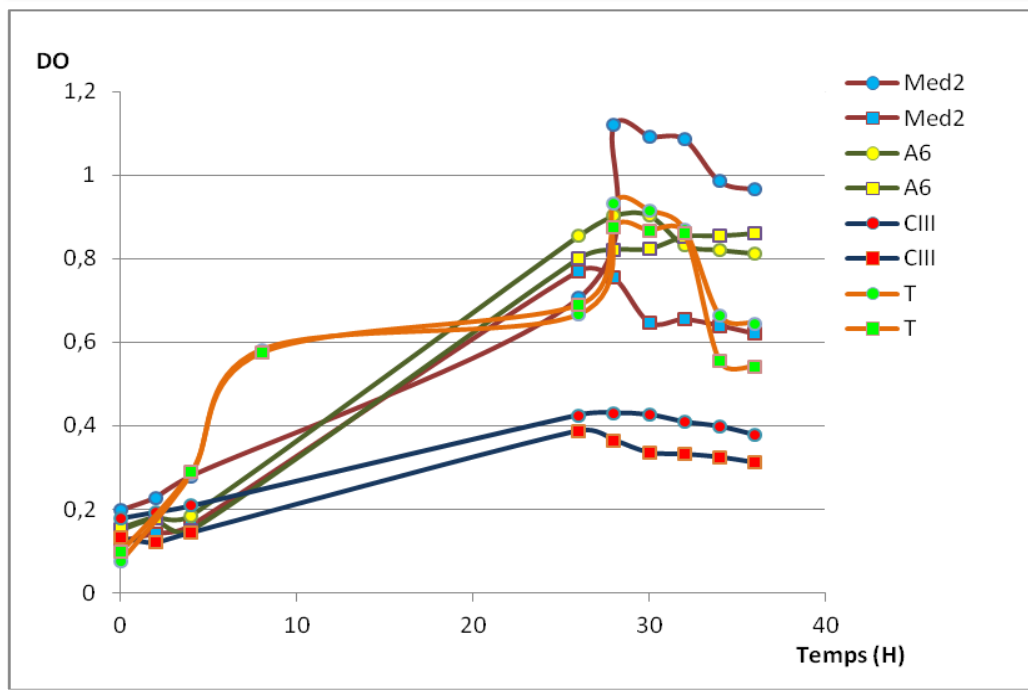
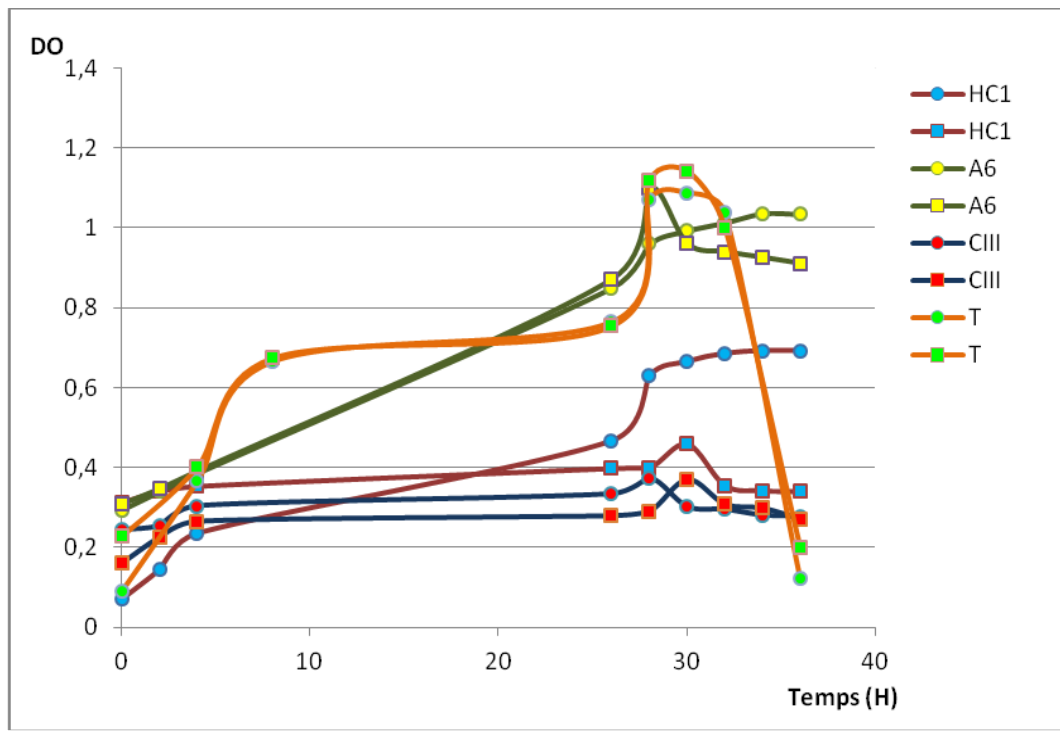


Figure N° 22- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de CuSO_4



A6 : *Rhizobium sultae*

CIII : *Mesorhizobium* sp

T : *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 843

● 2500 µg/ml

■ 3500 µg/ml

Figure N°23- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de $Pb(COO)_2$

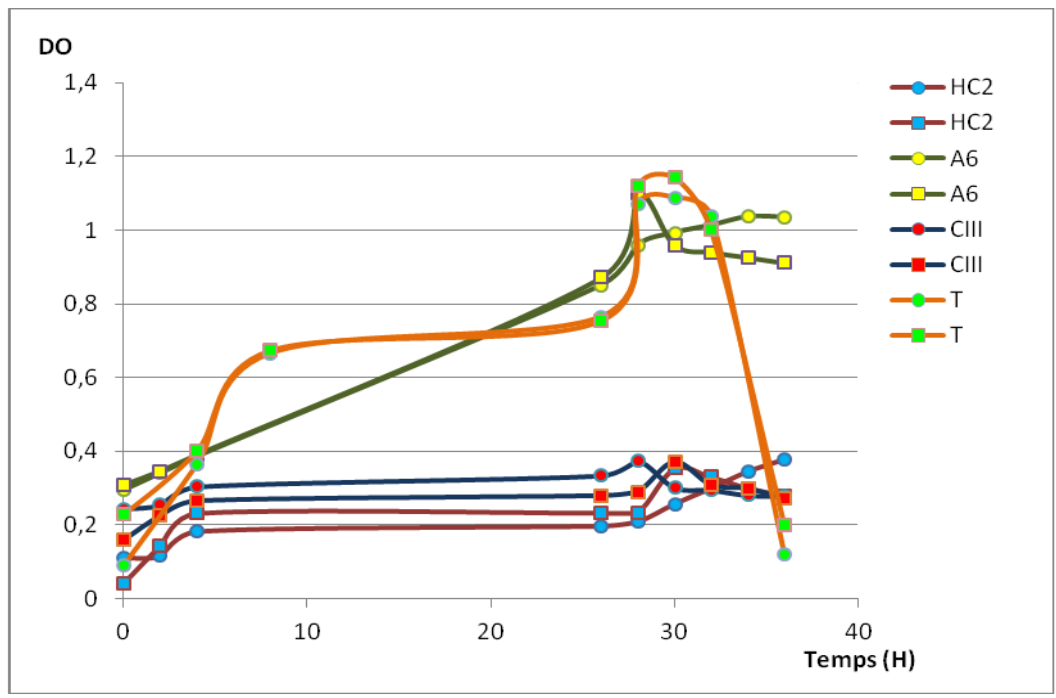


Figure N° 24- Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de $Pb(COO)_2$

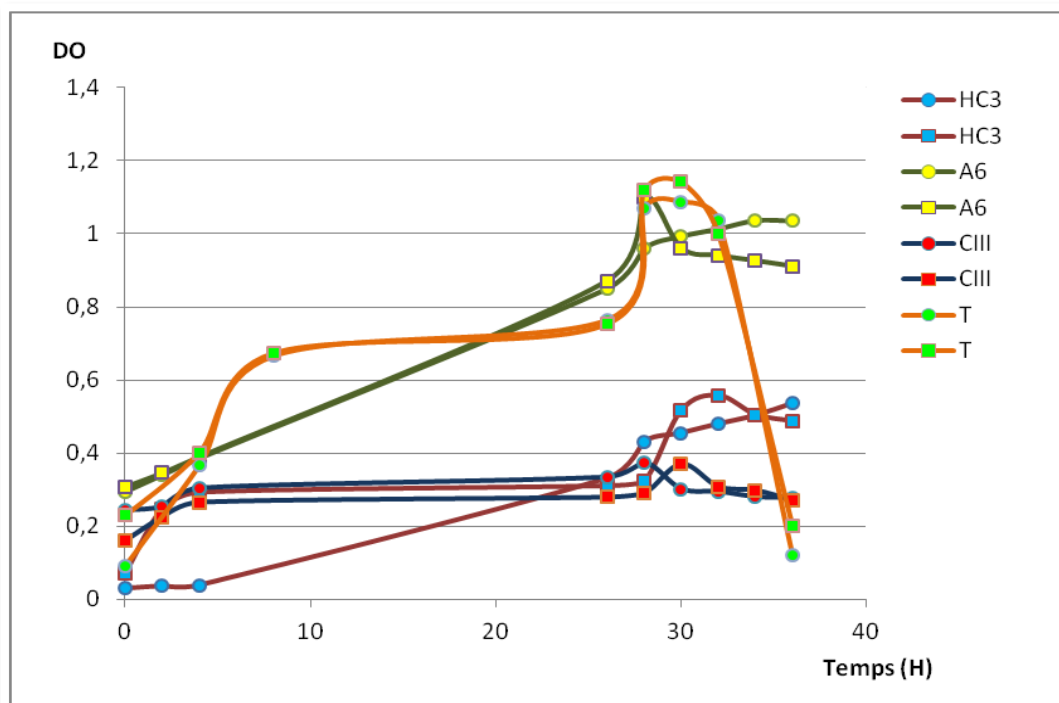


Figure N°25- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de $Pb(COO)_2$

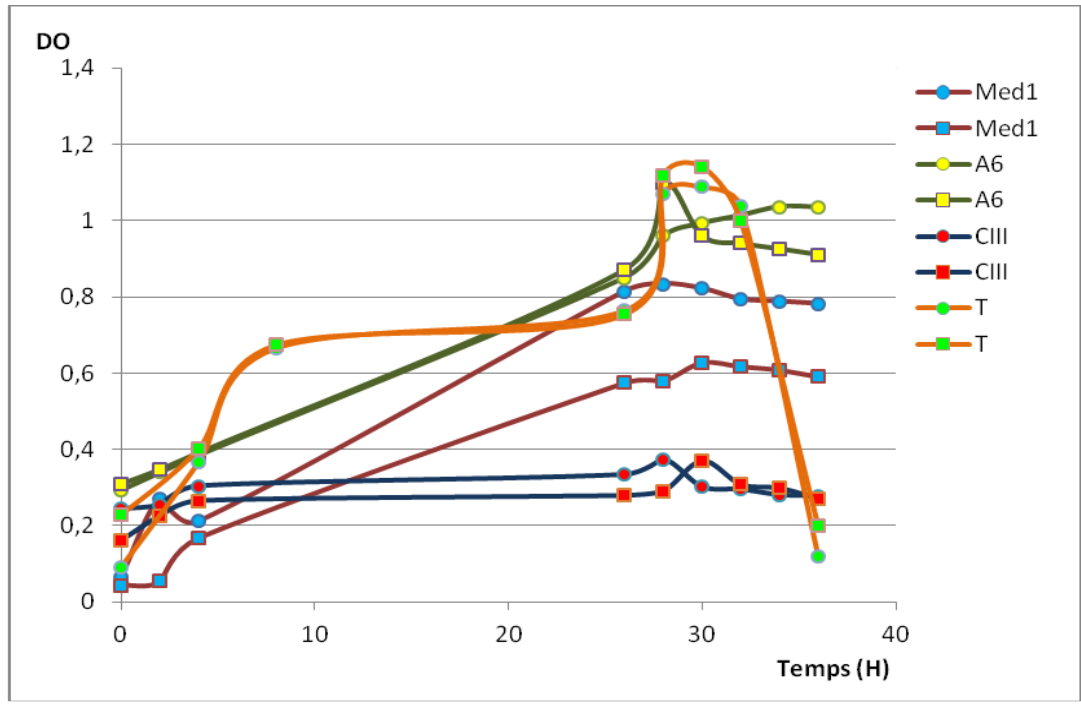


Figure N°26- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de $Pb(COO)_2$

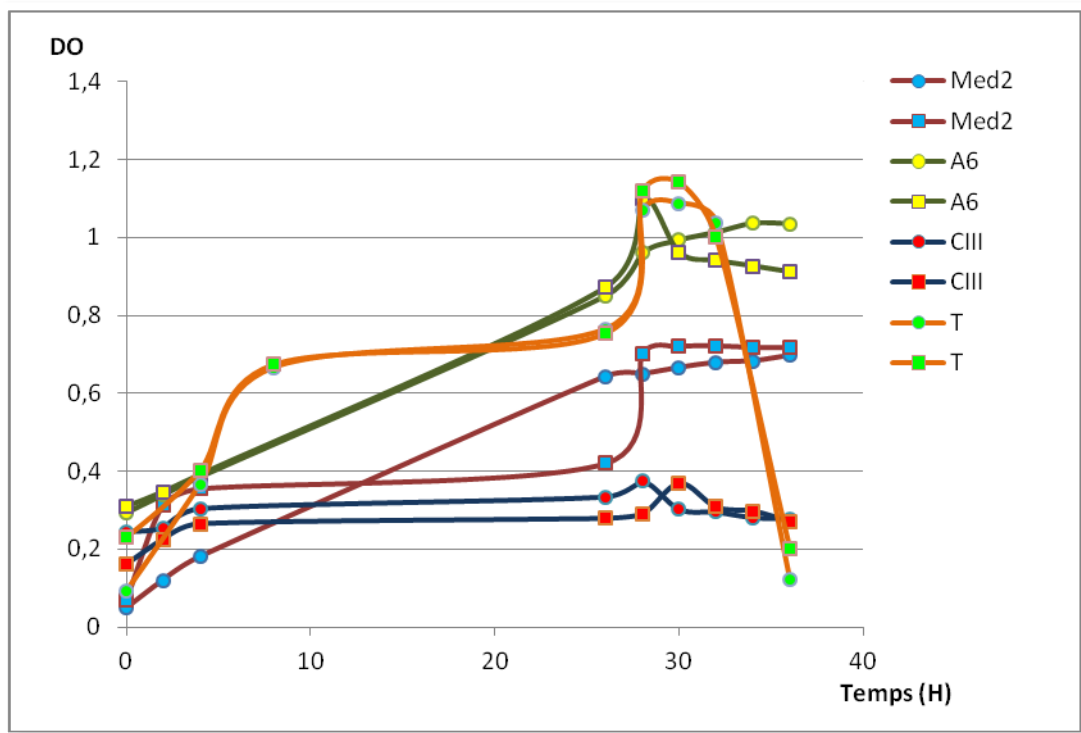
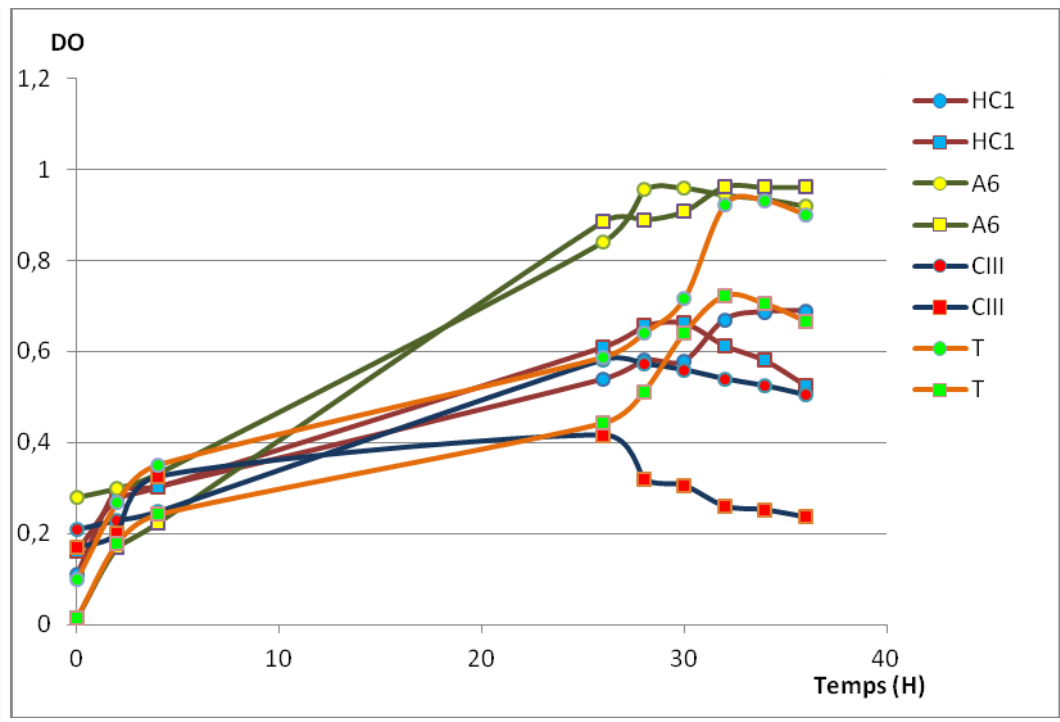


Figure N°27- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de $Pb(COO)_2$



A6 : *Rhizobium sultae*

CIII : *Mesorhizobium* sp

T : *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 843

● 10 µg/ml

■ 50 µg/ml

Figure N°28- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de HgCl₂

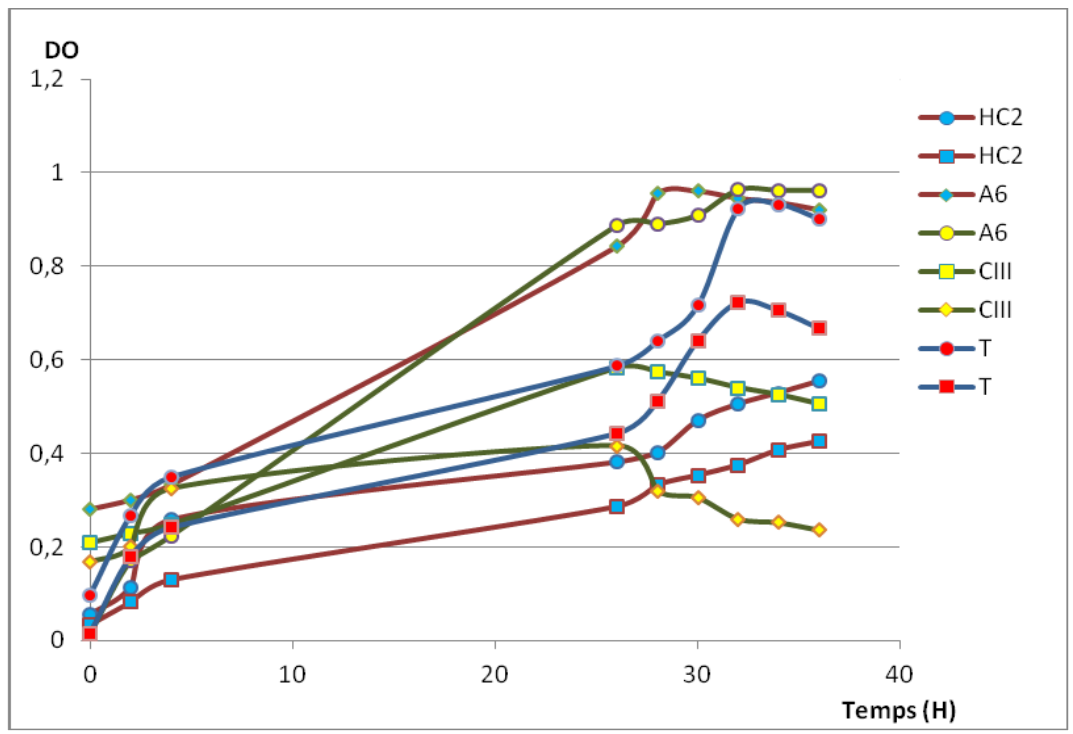


Figure N°29 Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de HgCl₂

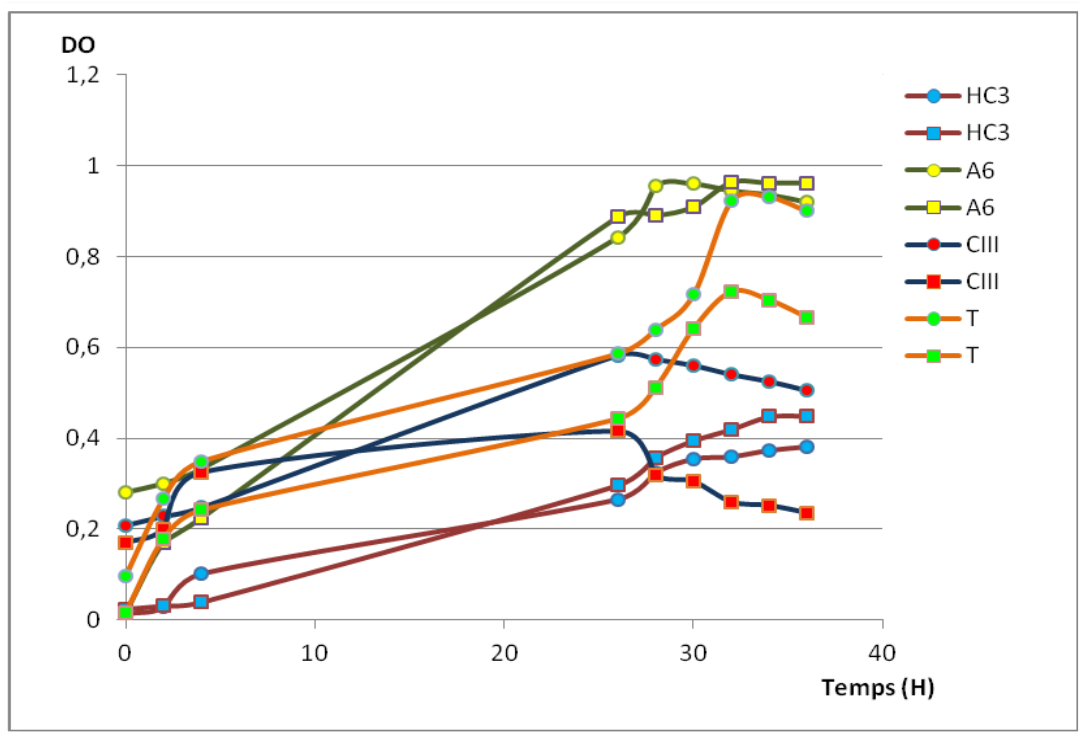


Figure N°30- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de HgCl₂

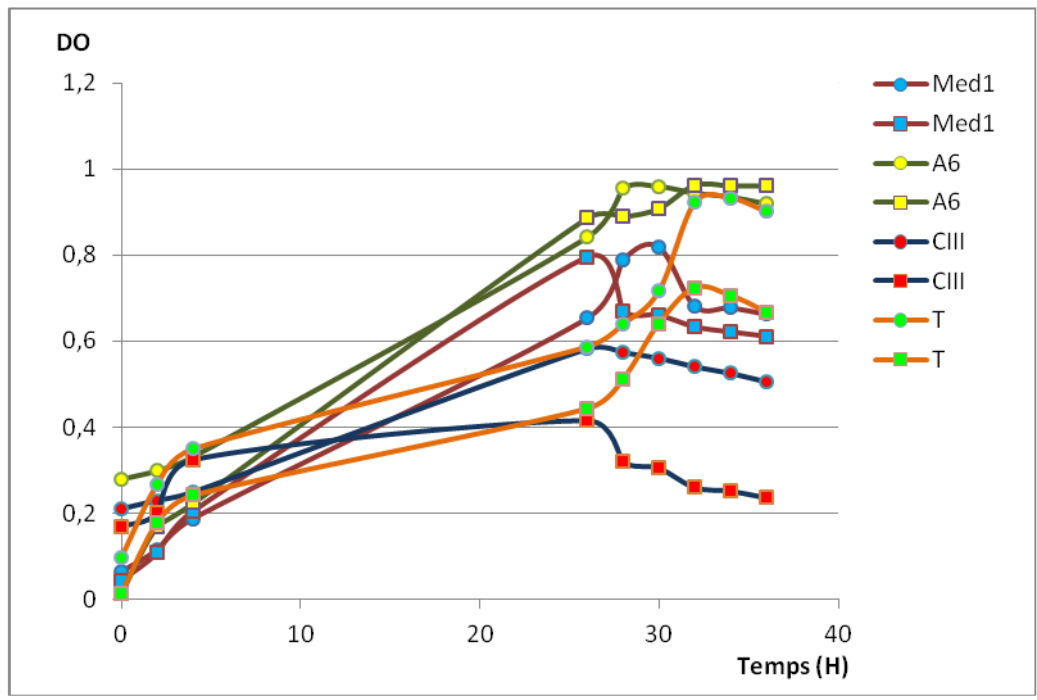


Figure N°31- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de HgCl₂

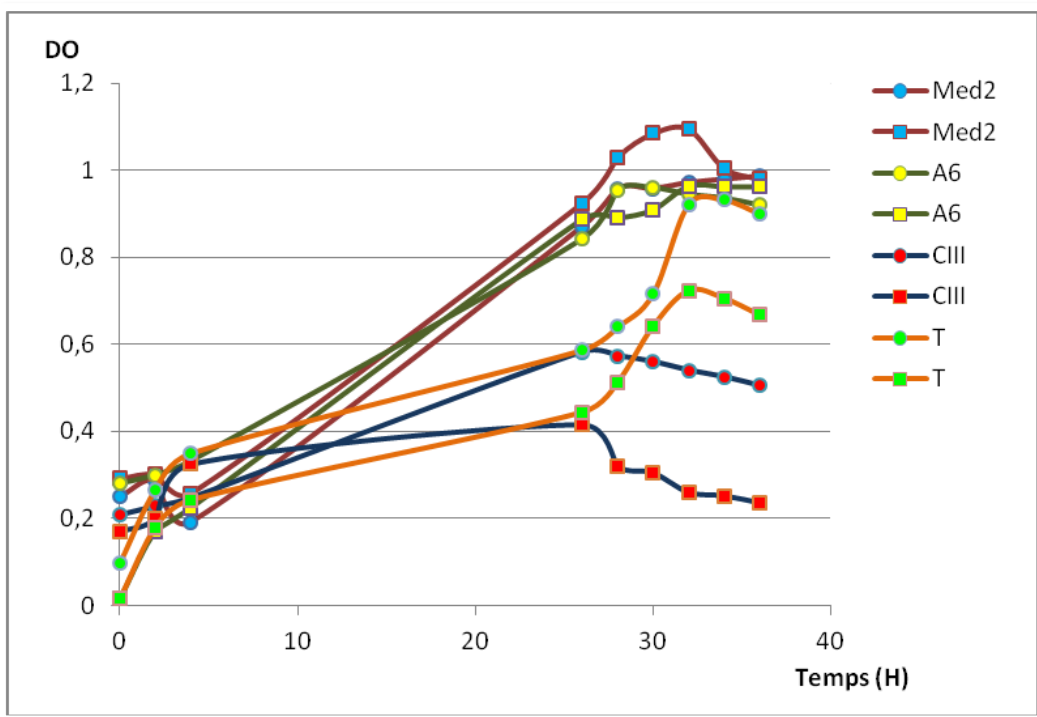
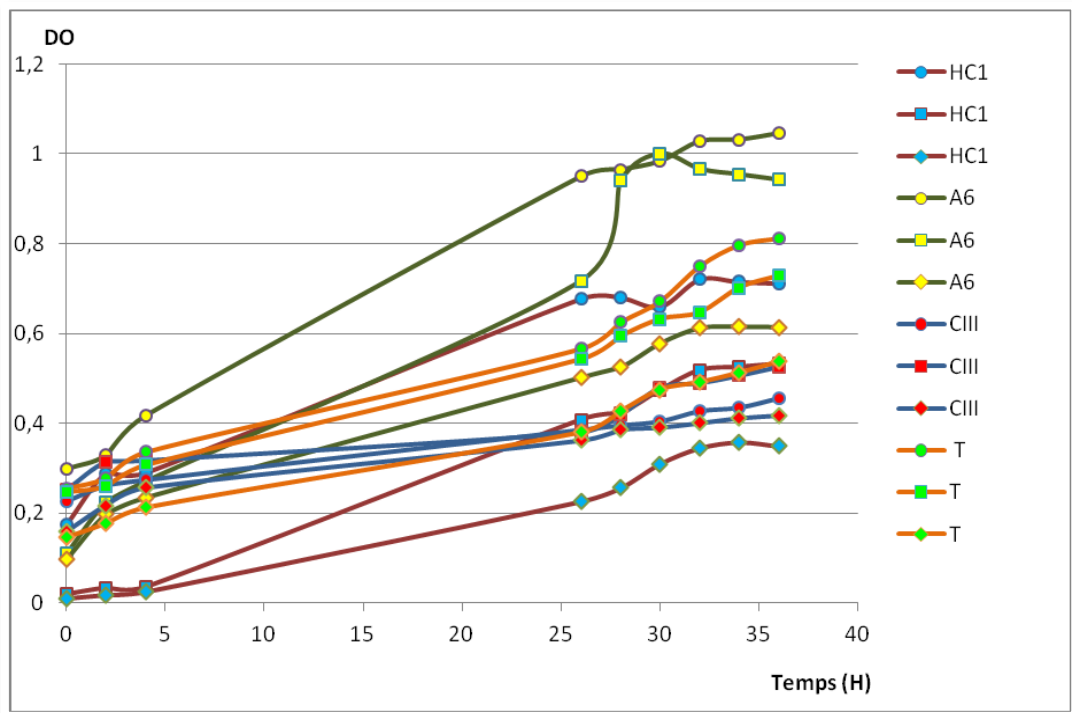


Figure N°32- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de HgCl₂



A6 : *Rhizobium sllae*

CIII : *Mesorhizobium* sp

T : *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 843

● 5 µg/ml

■ 10 µg/ml

◆ 20 µg/ml

Figure N°33- Croissance de l'isolat HC1 et souches témoins en présence de CdCl₂

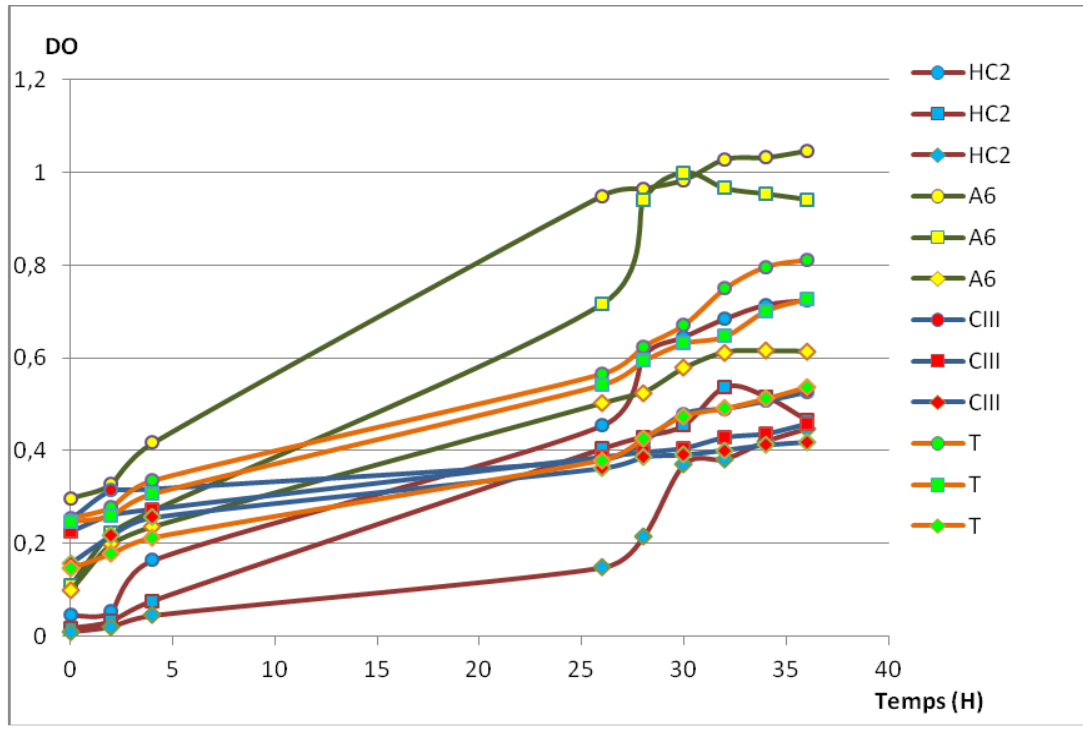


Figure N°34- Croissance de l'isolat HC2 et souches témoins en présence de CdCl₂

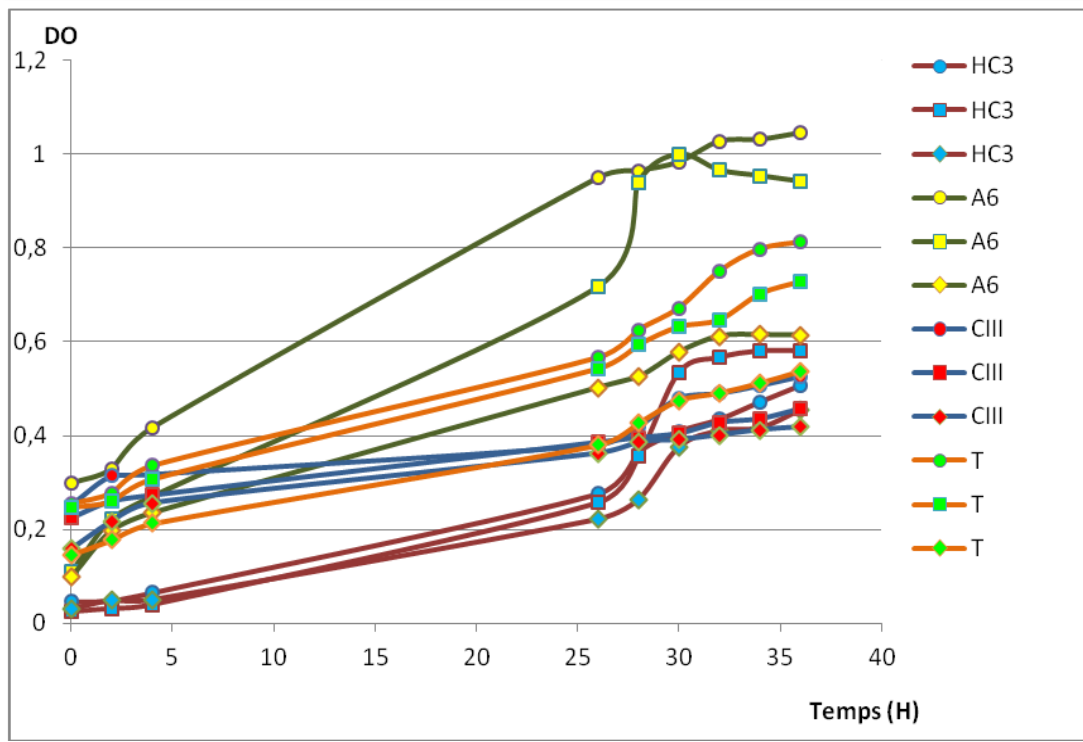


Figure N°35- Croissance de l'isolat HC3 et souches témoins en présence de CdCl₂

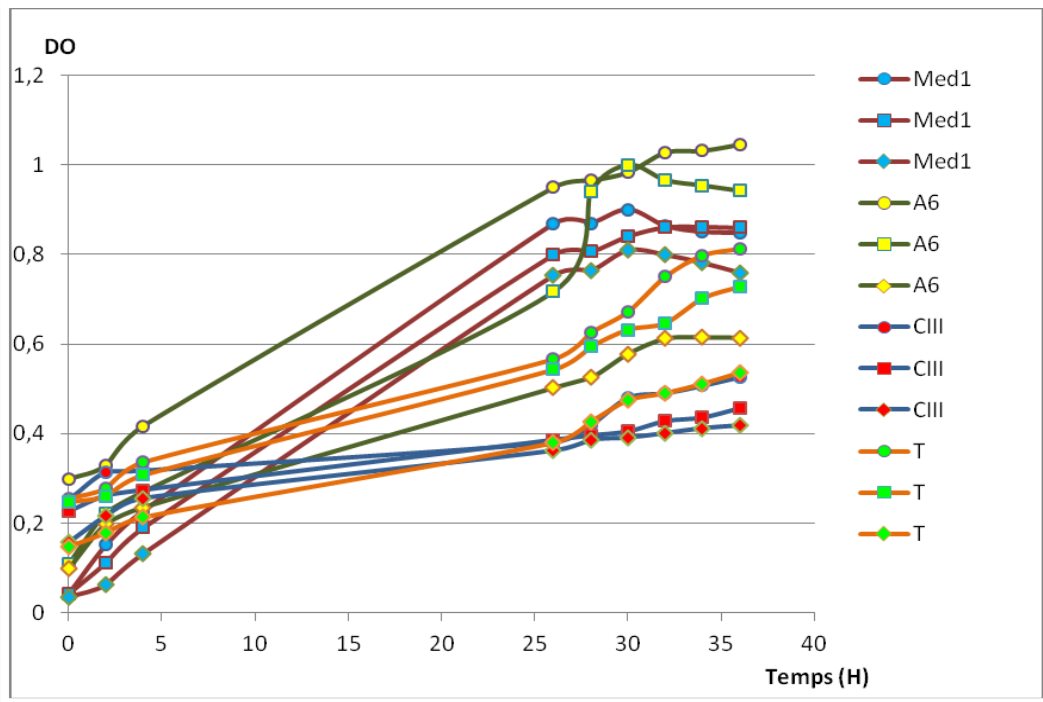


Figure N°36- Croissance de l'isolat Med1 et souches témoins en présence de CdCl₂

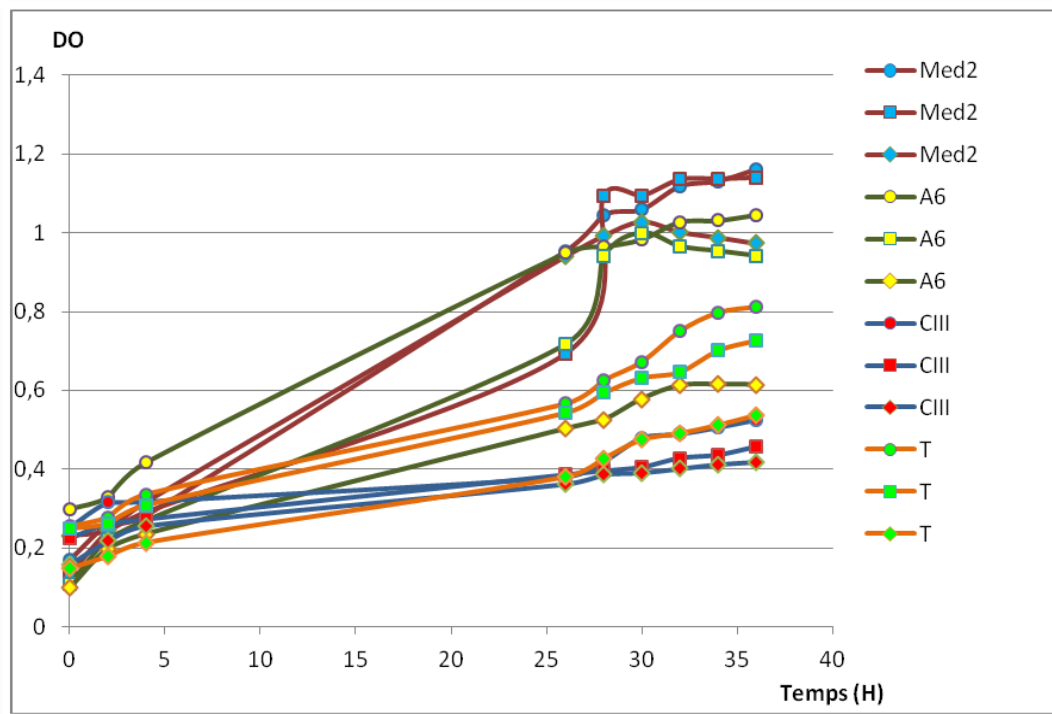
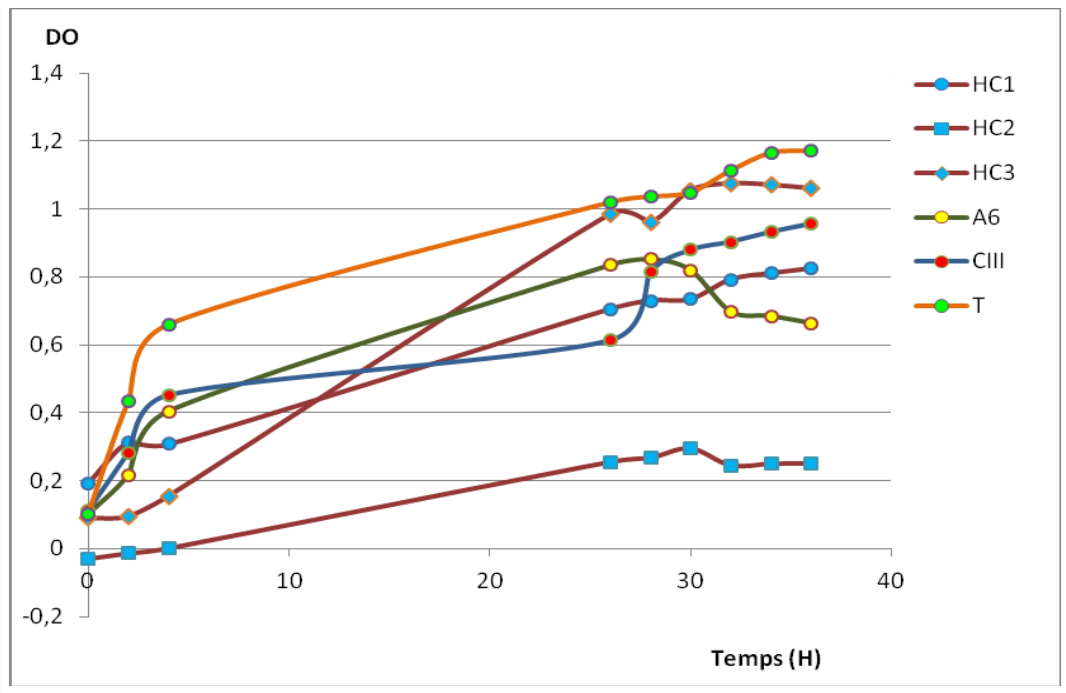


Figure N°37- Croissance de l'isolat Med2 et souches témoins en présence de CdCl₂



A6 : *Rhizobium sultae*

CIII : *Mesorhizobium* sp

T : *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 843

Figure N°38- Croissance des isolats HC1, HC2 et HC3 et souches témoins en absence de métaux

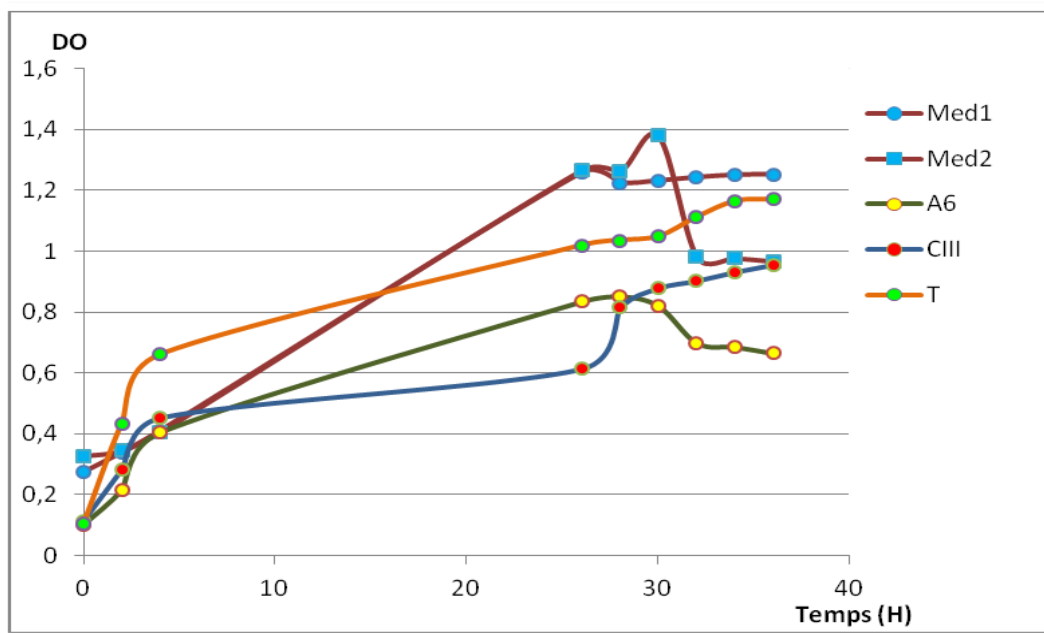


Figure N°39- Croissance des isolats Med1, Med2 et souches témoins en absence de métaux



DISCUSSION

Les bactéries isolées à partir des nodules des racines de légumineuses en question, *Hedysarum coronarium* et *Medicago truncatula*, se comportent comme la plupart des rhizobia, dans leurs aspects microscopique (bâtonnets Gram négatif) et morphologique (colonies blanchâtres, translucides et à consistance crémeuse) comme le rapporte la littérature (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970). La vitesse de croissance est mise en évidence sur milieu YMA+bleu de bromothymol et seules les souches isolées de l'espèce *Medicago truncatula* acidifient le milieu après 24h d'incubation. Par ailleurs toutes les souches absorbent très faiblement ou pas le rouge Congo.

La recherche d'enzymes spécifiques à la nodulation et la pénétration des bactéries infectantes et la dégradation des substrats ammoniacaux, n'est pas généralisée. Certains isolats (parmi HC et Med et *Mesorhizobium*) n'ont ni uréase ni cellulase. Par contre toutes les souches réduisent les nitrates. L'avantage de ce dernier résultat est que les souches bactériennes, isolées du sol, sont en mesure de dégrader les nitrates qui, à forte concentration, inhibent la fixation biologique du N₂.

L'utilisation de métaux lourds toxiques (Cd, Hg et Pb) et non toxiques (Cu, Zn) est utile dans la mesure où la concentration minimale qui inhibe la croissance des souches est due particulièrement aux métaux lourds toxiques. En effet les souches sont résistantes au Zn, Cu et Pb dans leur majorité.

Le Cadmium, élément toxique (Soussou, 2013), inhibe particulièrement la majorité des isolats, et le *Mesorhizobium* sp à fortes concentrations. On note aussi que le Mercure n'inhibe la croissance d'aucune souche sans faire apparaître la concentration minimale inhibitrice.

Si la résistance intrinsèque aux métaux lourds est réalisée sur milieu solide Mueller-Hinton, la mesure de la croissance des souches et isolats est réalisée sur milieu liquide, Tryptone-Yeast (Beringer, 1974). La croissance sur milieu liquide donne des résultats plus approfondis dans la mesure où la croissance est suivie pendant presque 48h, ce qui permet d'observer des phénomènes liés au comportement des souches vis-à-vis des métaux.

Le comportement des souches bactériennes vis-à-vis des métaux lourds toxiques et non toxiques est différent selon les concentrations utilisées. On note par exemple que les souches de référence *Rhizobium sllae* (isolée de la légumineuse fourragère *Hedysarum coronarium*) et *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (isolée du trèfle) présentent une croissance maximale

avec tous les métaux lourds utilisés, à un degré moindre le Mercure avec la seconde souche. Ce qui n'est pas le cas du *Mesorhizobium* sp (isolée de *Cicer arietinum* par Dekkiche Samia). En effet sa croissance est réduite avec tous les métaux lourds.

La croissance des isolats, en outre, est fonction de la concentration du métal, toxique ou pas. Cette observation est en relation avec leur croissance en absence totale de métaux lourds.

Une particularité apparaît dans nos résultats, notamment la croissance des souches en milieu liquide en présence de métaux lourds. La souche A6 (*R. sllae*) est isolée de la même légumineuse fourragère, *Hedysarum coronarium*, ne se comporte pas de la même manière que les isolats HC1, HC2 et HC3 (nodulant la même légumineuse).

D'un point de vue physiologique, s'il y a une croissance, faible ou moyenne, par les isolats et souches, vis-à-vis des métaux lourds toxiques, c'est qu'il apparaît des phénomènes liés à la solubilisation des métaux à l'intérieur de la cellule bactérienne, à la chélation des métaux par des protéines spécifiques, et de séquestration intra- et extracellulaire des métaux (Maynaud, 2012).

En somme ceci s'explique par une forme de résistance des souches aux métaux lourds, particulièrement toxiques. Quant aux métaux lourds non toxiques, on peut dire qu'ils sont assimilés dans la mesure où ils sont constitutifs des protéines.



**Références
bibliographiques**

A

Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N. Guittonneau G.G. (1988). Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. I- Etude auto écologique. Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach. 12: 191-219.

Ahmed, A.I., Mohamed, H.A., et Takuji, O. (2014). Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation. Nitrogen Fixing *Cyanobacteria*: Future Prospect. pp 55.

Allen, O.N. et Allen, E.K. (1981). The *Leguminosae*, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Madison.

Angle, J. S., S. P. Mc Grath, A. M. Chaudri, R. L. Chaney, and K. E. Giller. (1993). Inoculation effect on legumes grown in soil previously contaminated with sewage sludge. Soil Biol. Biochem. 25, 575-580.

Anonyme. <http://www.cours-en-ligne.tk/>

Anonyme. http://www.maltawildplants.com/FABC/Medicago_truncatula.php.

Anonyme. <http://www.plantae.ca/Fabaceae%3EFaboideae/Hedysarum/coronarium/1301.html>

Aoun, M. (2009). Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassica juncea* (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. Thèse de doctorat de l'université de Bretagne occidentale - Brest, France.

Appana, V.D. (1988). Alteration of polysaccharides composition in *Rhizobium meliloti*. JJ-1 exposed to manganese. FEMS Microbiol. Lett. 215, 79-82.

B

Baatout, H. (1991). Le complexe d'espèces *Hedysarum spinosissimum* L. dans le bassin méditerranéen occidental: analyse de la structure génétique des populations, conséquences au niveau de la systématique des deux sous-espèces *Capitatum* et *Euspinosissimum* dans le genre *Hedysarum*. Thèse d'Etat. Orsay, France, Université Paris-Sud.

Beck, D.P., L.A. Materon., F. Afandi. (1993). Paractical Rhizobium- Légume. Technology Manual. P.290.ICARDA. Syria.

Bélangier, P.-A. (2009). Etude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur *Frankia* spp. Et sa symbiose avec l'aulne noir (*alnus glutinosa* (L.) Gaertn). Mémoire de ès science (M.Sc.) de l'Université de Sherbrooke. Québec, Canada.

Benguedouar A., Corich V., Giacomini A., Squartini A., Nuti M.P. (1997). Characterization of symbiotic bacteria from the Mediterranean legume crop *Hedysarum coronarium* (Sulla) by multilocus enzyme electrophoresis. Agr. Med.127:173-177.

Benhizia Y., Goudjil H., Benguedouar A., Rosella M., Giacomini A., Squartini A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. System Appl Microbial. 27 pp 462-468.

Beringer J.E. (1974). R-Factor transfer in Rhizobium legume. J. Gen. Microbiol.84 pp 188-198.

Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L. (2006). Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Les Actes du BRG 6: 97-110.

Boussaid, M., BenFadhel, N., Trifi-Farah, N., Abdelkefi, A., Marrakchi M. (1995). Les espèces méditerranéennes du genre *Hedysarum* L. In: BRG / INRA, ed. Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. France.

Brencic, A., Winans, SC. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 69: 155-194.

Broughton, W.J. (1984). Nitrogen fixation: Legumes. *The Journal of Chartto and Windus* 2Td londress.117.

Brunet, J. (2008). Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse) : Réponse phénologique et moléculaire au plomb du *Lathyrus sativus* L. Thèse de doctorat de l'université Paris-Est. France.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed Tec & Doc Lavoisier, Paris, p. 1120.

C

Cabrera, E., Ruiz-Argueso, T. (1979). Diversidad de poblaciones nativas de rizobios de zulla (*Hedysarum coronarium* L.). VIII Congreso Nacuinal de Microbiologia, Madrid, Spain, 28-30 September 1979.

Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., De, Vos P., Mergeay, M., 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.

Cooper, J.-E. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research.* 41: 1-62.

Cooper, J.-E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology.* 103: 1355-1365.

D

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

De Faria, S., Lewis, G., Sprent, J., Sutherland, J. (1989). Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist* 111 : 607-619.

- de Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M.D., Kersters, K., Dreyfus, B., Gillis, M.** (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 48 : 1277–1290.
- de Oliveira, L.A., de Magalhães, H.P.** (1999). Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Rev Microbiol.*30(3).
- Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarié, J., Boivin, C.** (2001). Nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimia Polonia Minireview* .48 (2): 359–365.
- Denarié, J., Debelle, F., Prome, J.-C.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*. 65: 503–535.
- Dijkshoorn, L., Ursing, B.M., Ursing, J.B.** (2000). Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J. Med Microbial.* 49: 397-401.
- Dov Kishnovsky, B., Sen and Yang, G.** (1996). Diversity of Rhizobia isolated from *Hedysarum* species. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Doyle, JJ., Luckow, MA.** (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900–10.
- Duhoux E., Nicole M.** (2004). *Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes.* pp 1-20 Edition DUNOD. Paris. France
- E**
- El-Hilali, I.** (2006). La symbiose *Rhizobium-Lupin* : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.

Elmsley, J. (2001). *Nature's Building Blocks. A A-Z guide to the elements.* Oxford University Press, Oxford, UK.

F

Frank, B. (1889). *Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **7** pp 332 - 346.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Colin, C., Santos, A.D., and Escarré, J. (2006). Specific interaction between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil* **282**: 53-65.

G

Gadd, G.M. (1992). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* **46**: 834-840

Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**: 609-643.

Gibson, KE., Kobayashi, H., Walker, GC. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics.* **42**: 413–441.

Gordon, A.J., Lea, P.J., Rosenberg, C., Trinchant, J.C. (2001). Nodule formation and function. In Lea P J, Morot-Gaudry J F (Eds.), *Plant nitrogen.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp 101-146.

Gough, C. (2009). *Medicago truncatula*, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. Centre National de la Recherche Agronomique. Edition INRA. Toulouse. France.

Graham, P. et Vance, C. (2003). Legumes importance and contraintes to greater use. *Plantphysiol.* **131**:872877. Grenoble.

Gremion, F. (2003). Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods. Thèse de doctorat ès sciences. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. Lausanne, EPFL.

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. DUNOD.Paris.

H

Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Boussaid M., Marrakchi M., Trififarah N. (2004). Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, 130: 65 - 72.

Heyn. (1963). Annual Species of *Medicago* – Jerusalem: Magnes Press, The Hebrew University.

Hirsch, AM. (1992). Developmental biology of legume nodulation. New Phytologist. 122: 211-237.

Hopkins, W.G. (2003). Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck pp 99-119.

Hubbell, D.H., Morales, V.M., Umali-Garcia, M. (1978). Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. Applied and environmental microbiology.35(1): 210-213.

J

Jordan, DC. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 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). *Rhizobiaceae*. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. p: 234-245.

K

Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., Kawaguchi, M. (2010). How Many Peas in a Pod? Legume Genes Responsible for Mutualistic Symbioses Underground. *Plant Cell Physiol.* 51:1 381-1397.

L

Lafay, B., Bullier, E., Burdon, JJ. (2006). *Bradyrhizobia* isolated from root nodules of *Parasponia (Ulmaceae)* do not constitute a separate coherent lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56: 1013-1018.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.-C., Dénarié, J. (1990). Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* 344: 781–784.

Lesins & Lesins. (1979). *The Genus Medicago (Leguminosae)* – The Hague, Boston, London: Dr W. Junk.

Lewis, G.P. (2005). *Caesalpinieae*. In : Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., and Lock, M.(Eds). *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, UK. pp 127.

Lewis, G.P., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M. (2005). *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, UK. pp 577.

Long, S.R (1996). *Rhizobium* symbiosis : nod factors in perspective. *Plant cell.* 8: 1885-1898.

M

Martinez-Molina E., Morales V. M., Hubbell D. H. (1979). Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. . *Appl. Environ. Microbiol.*38(6) : 1186-1188.

Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants. *Biotechnology Advances* 26, 548–560.

Maynaud, G. (2012). Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II. France.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of *Proteobacteria*. *Nature*. 411: 948–950.

N

Nap, J.P. and Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948–954.

Nègre, R. (1959). Révision des *Medicago* d'Afrique du Nord. *Bull. soc. Hist. Nat. De l'Afrique du Nord* 50,267-3 14.

Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., kotepong, s., Suzuki, A., Higashi, S., and Abe, M. (2004). A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobacterium* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. gen. Appl. Microbiol.* 50, 1727.

Nieboer, E. et Richardson D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term « heavy metal » by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1 : 3-26.

P

Pelmont J. (1995). Bactérie et environnement. Vol 2. Office des Publications Universitaires.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.-J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64: 180–201.

Polhill, R.M., Raven, P.H. et Stirton, C.H. (1981). Evolution and systematic of Leguminous. In: Advances in legume Systematics. Eds. Polhill, R.M, andRoyal, P. P. Botanic Gardens, Kew, UK.

Pottier-Alapetite, G. (1979). Flore de la Tunisie. Angiospermes. Apétales- Dialypétales. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne.

Prosperi, JM., Guy, P., Genier, G., Angervian. (1995). Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. Ed. INRA. Paris.

Q

Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed.Paris, France.

R

Rangin, C., Brunel, B., Cleyet.-M, J.-C., Perrineau, M.-M et Béna, G. (2008). Applied and environmental microbiology. Effects of *Medicago truncatula*, Genetic Diversity, Rhizobial Competition, and Strain Effectiveness on the Diversity of a Natural *Sinorhizobium* Species Community.

Reeve, W., Chain, P., O'Hara, G., Ardley, J., Nandesena. K., Tiwari, R., Malfatti, S., Kiss, H., Lapidus, A., Copeland, A., Nolan, M., et al., (2010). Standards in genomic science. Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419.

Riah, N. (2014). Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Thèse de doctorat de l'Université Constantine1. Algérie.

S

Skorupska, A., Wielbo, J., Kidaj, D., Marek-Kozaczuk, M. (2010). Enhancing *Rhizobium* Legume Symbiosis Using Signaling Factors. In Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) *Microbes for Legume Improvement*. Springer-Verlag/Wien Printed in Germany. P 27.

Small & Jomphe. (1989). A synopsis of the genus *Medicago* (*Leguminosae*) – *Canad J. Bot.* 67:3260-3294.

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

Soussou, S. (2013). Adaptation de la symbiose *Fabacées-rhizobium* aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*. Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier. France.

Spaink, HP. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology.* 54: 257-288.

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., 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.

Struffi, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, A., Casella, S., Nuti, M.P. (1998). Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 81- 89.

T

Taylor, LP et Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology.* 8: 317–323.

Teather, R. M., and Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria 2018 NOTES APPL. ENVIRON. MICROBIOL. from the 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 .

Tong, Z., and Sadowsky, M.J. (1994). A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. Appl. Environ. Microbiol. 60, 581-586.

Torche, A. (2006). Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de magister de l'Université Mentouri. Constantine. Algérie.

Tortora G.j., Funk B.R., Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc.

Trinick, MJ., Hadobas, PA.(1988). Biology of the Parasponia-Bradyrhizobium symbiosis. Plant Soil, 110: 177–185.

V

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

W

Werner, D. (1992). Symbiosis of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

Wilson, D.O., and Reisenauer, H.M. (1970). Effect of Manganese and Zinc Ions on the Growth of Rhizobium. J Bacteriol. 102, 729–732.

Z

Zakhia, F., de Lajudie, P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21 : 569-576.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P. (2004). Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia System. *Appl. Microbiol.* 27:380-395.

Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., Yu, O. (2009). Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Journal.* 57: 171–183.

Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R., Shoemaker, R.C. (2005). Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology.* 137: 1189–1196.



Annexes

Annexe 01

Milieux de culture et solutions utilisés

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

Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0,5
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,2
Na Cl	0,1
Extrait de levure	0,5
Eau distillée	1000ml
pH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

YMB	1000 ml
Agar	15
pH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA+ rouge Congo en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml
Agar	15
pH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

Composition de milieu YMA+ bleu de bromothymol en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5 ml
Agar	15
pH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0. 5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu Mueller-Hinton en g/l

Extrait de viande	2
Peptone tryptique de caséine	17,5
Amidon	1,5
Eau distillée	1000ml
Agar	15
pH	7,3

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition du milieu Tryptone Yeast (TY) en g/l (Beringer, 1974)

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ .H ₂ O	0,87
Eau distillée	1000ml

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Pour solidifier le milieu (Milieu TY Agar) ajouter 12 g d'Agar /l de milieu avant autoclavage

Annexe 02

Coloration de Gram

Le principe de cette méthode consiste en la fixation de la solution bactérienne à la chaleur à environ 40°C pendant 10 minutes puis à la réalisation d'une série de colorations :

- Coloration par le violet de gentiane (1 min);
- Mordançage au lugol (20 sec);
- Décoloration à l'alcool (20 sec);
- Recoloration à la fuchsine (1 min).

Annexe 03

Valeurs de Densité Optique (DO) mesurées des isolats et souches de référence avec et sans métaux lourds

Tableau N°01- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de l'isolat HC1 en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,090	-0,020	0,0321	0,008	0,0720	0,312	0,110	0,160	0,175	0,020	0,010
2	0,016	0,020	0,341	0,0110	0,146	0,340	0,297	0,277	0,289	0,034	0,018
4	0,028	0,0320	0,346	0,0240	0,236	0,353	0,303	0,301	0,290	0,036	0,025
26	0,481	0,342	0,685	0,450	0,467	0,398	0,539	0,610	0,678	0,408	0,226
28	0,500	0,350	0,726	0,483	0,630	0,400	0,580	0,656	0,680	0,423	0,256
30	0,573	0,375	0,741	0,532	0,665	0,460	0,579	0,662	0,660	0,474	0,310
32	0,620	0,414	0,805	0,570	0,685	0,355	0,670	0,613	0,721	0,518	0,345
34	0,628	0,428	0,813	0,578	0,692	0,342	0,687	0,580	0,715	0,525	0,358
36	0,632	0,430	0,815	0,584	0,692	0,340	0,689	0,525	0,712	0,532	0,349

Tableau N°02- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de l'isolat HC2 en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,096	0,074	0,069	0,064	0,110	0,040	0,056	0,034	0,045	0,017	0,010
2	0,133	0,090	0,158	0,103	0,116	0,143	0,114	0,082	0,054	0,032	0,021
4	0,236	0,104	0,356	0,107	0,182	0,231	0,258	0,130	0,164	0,076	0,045
26	0,240	0,348	0,605	0,285	0,197	0,232	0,381	0,286	0,455	0,404	0,148
28	0,245	0,536	0,861	0,365	0,209	0,234	0,401	0,332	0,606	0,430	0,214
30	0,296	0,540	0,915	0,412	0,257	0,353	0,470	0,353	0,646	0,455	0,370
32	0,315	0,595	0,980	0,420	0,300	0,33	0,505	0,375	0,685	0,537	0,382
34	0,362	0,598	0,992	0,448	0,345	0,300	0,529	0,407	0,715	0,516	0,420
36	0,398	0,602	1,050	0,471	0,378	0,279	0,554	0,425	0,725	0,465	0,447

Tableau N°03- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de l'isolat HC3 en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,09 9	0,07 1	0,03 5	0,02 0	0,03 0	0,07 0	0,01 4	0,02 4	0,046	0,02 5	0,03 0
2	0,10 7	0,07 6	0,04 3	0,03 0	0,03 7	0,24 8	0,02 8	0,03 1	0,048	0,03 2	0,04 9
4	0,22 4	0,12 2	0,04 4	0,05 0	0,03 9	0,29 2	0,10 2	0,03 9	0,065 0	0,04 0	0,05 0
26	0,28 4	0,31 0	0,34 4	0,23 6	0,33 2	0,31 0	0,26 6	0,29 7	0,276	0,25 7	0,22 2
28	0,30 3	0,42 0	0,46 5	0,35 6	0,43 2	0,32 3	0,32 5	0,35 8	0,365	0,35 5	0,26 4
30	0,31 3	0,43 0	0,46 9	0,48 0	0,45 5	0,51 7	0,35 5	0,39 5	0,409	0,53 5	0,37 6
32	0,44 5	0,43 1	0,49 9	0,51 0	0,48	0,55 7	0,36 0	0,42 0	0,435	0,56 7	0,41 1
34	0,48 9	0,44	0,51 8	0,49 8	0,50 3	0,50 5	0,37 4	0,44 8	0,472	0,58 1	0,41 7
36	0,50 3	0,45 6	0,53 7	0,47 9	0,53 6	0,48 7	0,38 2	0,45 0	0,507	0,58 1	0,45 5

Tableau N°04- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de l'isolat Med1 en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,075	0,081	0,072	0,050	0,066	0,044	0,063	0,044	0,043	0,043	0,036
2	0,093	0,107	0,136	0,117	0,270	0,054	0,114	0,108	0,152	0,112	0,064
4	0,208	0,144	0,241	0,168	0,213	0,168	0,187	0,205	0,228	0,190	0,133
26	0,745	0,735	0,808	0,920	0,814	0,575	0,654	0,795	0,868	0,800	0,754
28	0,759	0,725	0,824	0,978	0,834	0,580	0,790	0,670	0,870	0,807	0,765
30	0,780	0,764	0,855	1,101	0,822	0,628	0,820	0,660	0,900	0,841	0,810
32	0,805	0,763	0,840	1,100	0,794	0,618	0,682	0,633	0,863	0,861	0,800
34	0,818	0,763	0,835	0,990	0,788	0,609	0,678	0,621	0,850	0,862	0,782
36	0,832	0,761	0,830	0,978	0,782	0,591	0,663	0,611	0,848	0,860	0,760

Tableau N°05- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de l'isolat Med2 en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,197	0,123	0,250	0,054	0,048	0,070	0,250	0,292	0,170	0,134	0,231
2	0,228	0,142	0,310	0,076	0,120	0,314	0,287	0,301	0,259	0,242	0,246
4	0,279	0,161	0,408	0,125	0,180	0,355	0,192	0,258	0,283	0,292	0,317
26	0,705	0,770	1,252	0,803	0,643	0,420	0,870	0,925	0,954	0,694	0,940
28	1,119	0,754	1,252	0,815	0,650	0,700	0,958	1,030	1,046	1,095	0,992
30	1,093	0,647	1,140	0,900	0,666	0,720	0,958	1,085	1,060	1,095	1,028
32	1,086	0,654	1,217	0,904	0,679	0,722	0,971	1,095	1,119	1,136	1,002
34	0,985	0,639	1,130	0,898	0,683	0,718	0,979	1,005	1,132	1,138	0,988
36	0,965	0,620	1,118	0,887	0,697	0,718	0,986	0,980	1,162	1,141	0,973

Tableau N°06- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de la souche A6 en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,155	0,152	0,250	0,082	0,294	0,308	0,280	0,015	0,298	0,109	0,098
2	0,181	0,177	0,315	0,143	0,340	0,346	0,300	0,170	0,329	0,223	0,198
4	0,185	0,151	0,405	0,200	0,386	0,390	0,332	0,224	0,417	0,270	0,235
26	0,854	0,800	0,647	0,826	0,850	0,871	0,842	0,887	0,950	0,717	0,502
28	0,902	0,821	1,076	0,840	0,960	1,100	0,955	0,890	0,965	0,940	0,525
30	0,903	0,823	1,078	0,877	0,993	0,960	0,960	0,909	0,984	1	0,578
32	0,832	0,852	1,081	0,840	1,013	0,940	0,945	0,963	1,028	0,966	0,612
34	0,820	0,854	1,085	0,832	1,036	0,926	0,936	0,962	1,032	0,954	0,615
36	0,812	0,860	1,078	0,815	1,035	0,911	0,920	0,962	1,046	0,942	0,614

Tableau N°07- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de la souche CIII en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,179	0,132	0,306	0,245	0,244	0,160	0,209	0,169	0,253	0,226	0,158
2	0,194	0,121	0,313	0,230	0,255	0,225	0,229	0,200	0,315	0,262	0,217
4	0,209	0,145	0,320	0,186	0,304	0,265	0,248	0,325	0,318	0,274	0,256
26	0,425	0,388	0,601	0,465	0,334	0,279	0,582	0,416	0,381	0,386	0,362
28	0,430	0,365	0,608	0,536	0,374	0,290	0,573	0,320	0,420	0,396	0,386
30	0,426	0,336	0,653	0,547	0,302	0,370	0,560	0,305	0,480	0,405	0,391
32	0,409	0,332	0,622	0,592	0,295	0,308	0,540	0,260	0,490	0,428	0,401
34	0,398	0,325	0,612	0,564	0,281	0,298	0,525	0,252	0,507	0,436	0,412
36	0,378	0,312	0,609	0,545	0,278	0,271	0,505	0,236	0,526	0,457	0,418

Tableau N°08- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ de la souche T en présence des métaux lourds

Temps (h)	ZnSO ₄		CuSO ₄		Pb(COO) ₂		HgCl ₂		CdCl ₂		
	1500 µg/ml	2500 µg/ml	1500 µg/ml	2500 µg/ml	2500 µg/ml	3500 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0	0,076	0,098	0,100	0,092	0,091	0,229	0,098	0,015	0,255	0,248	0,147
2			0,212	0,236			0,267	0,179	0,278	0,261	0,178
4	0,285	0,289	0,302	0,312	0,366	0,402	0,350	0,242	0,336	0,308	0,213
26			0,610	0,528			0,587	0,443	0,566	0,543	0,380
28	0,582	0,574	0,687	0,552	0,666	0,674	0,640	0,512	0,625	0,594	0,427
30	0,666	0,688	0,720	0,646	0,765	0,754	0,716	0,641	0,672	0,632	0,475
32	0,933	0,875	0,814	0,754	1,071	1,119	0,922	0,723	0,750	0,647	0,491
34	0,915	0,867	0,998	0,879	1,088	1,142	0,932	0,705	0,797	0,702	0,512
36	0,870	0,860	0,862	0,763	1,038	1	0,901	0,667	0,812	0,728	0,537

Tableau N°09- Mesure de la $DO_{\lambda 600}$ des isolats et souches témoins en absence des métaux lourds

Temps (h)	HC1	HC2	HC3	Med1	Med2	A6	T	CIII
0	0,193	-0,030	0,09	0,274	0,328	0,100	0,112	0,103
2	0,314	-0,014	0,095	0,339	0,345	0,216	0,282	0,434
4	0,308	0,001	0,155	0,410	0,406	0,404	0,452	0,660
26	0,705	0,255	0,984	1,258	1,267	0,835	0,613	1,019
28	0,730	0,267	0,960	1,224	1,263	0,852	0,814	1,035
30	0,734	0,295	1,054	1,231	1,379	0,820	0,879	1,048
32	0,792	0,245	1,074	1,242	0,982	0,698	0,903	1,112
34	0,810	0,250	1,070	1,250	0,978	0,685	0,932	1,164
36	0,824	0,251	1,060	1,252	0,967	0,664	0,956	1,170

Merakchi Djihane Tchanderli Braham Safa	Date de soutenance Le 16/06/2015
Titre : Influence des métaux lourds sur la croissance des bactéries isolées à partir des nodules des légumineuses <i>Hedysarum coronarium</i> et <i>Medicago truncatula</i>	
Résumé : Des bactéries isolées à partir des nodules racinaires des deux légumineuses fourragères <i>Hedysarum coronarium</i> et <i>Medicago truncatula</i> sont caractérisées par une étude phénotypique (tests physiologiques et biochimiques), par la détermination de la résistance intrinsèque aux métaux lourds, et par la mesure de la croissance des souches et isolats en présence des métaux lourds, toxiques (Pb, Hg et Cd) et non toxiques (Cu et Zn). Les résultats obtenus démontrent que les isolats et les souches se comportent différemment en présence de métaux lourds. Mots clés : Métaux lourds, Toxicité, <i>Hedysarum coronarium</i> , <i>Medicago truncatula</i> , croissance, <i>Rhizobium sullae</i> , <i>Ensifer medicae</i> .	
Devant le Jury d'Examens : Président : M. Hamidechi Md Abdelhafid(Professeur- UFM Constantine). Rapporteur : M. Benguedouar Ammar (Professeur- UFM Constantine). Examineur : Mme Sakhri Nedjoua (Maitre de Conférences- UFM Constantine).	
Lieu de réalisation : Laboratoire des Biotechnologies Année universitaire 2014-2015	