



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 الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

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 :

**Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse
fourragère *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans la région
de Djebel Boutaleb (Setif).**

Présenté et soutenu par : AOUADJ Rayane

Le : 15 /06/2015

SAIDI SIEF Oussama

Jury d'évaluation :

Président du jury : M. BENGUEDOUAR Amar

Professeur. U.F.M Constantine

Rapporteur : M. BENHIZIA Yacine

Professeur. U.F.M Constantine

Examinatrice : M^{me}. RIAH Nassira

M C. U.F.M Constantine

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude, notre plus chaleureuse amitié ainsi que notre plus grand respect au Pr. BENHIZIA Yacine qui a assuré la direction de notre mémoire. Merci de nous avoir permis de terminer nos études dans de si bonnes conditions.

Nous tenons aussi à exprimer toute notre gratitude et nos vifs remerciements à Monsieur BENGUEDOUAR Amar, Professeur à l'université Mentouri de Constantine, de nous avoir accepté dans le laboratoire d'Ecologie Microbienne aussi pour sa disponibilité et l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nos remerciements et toutes nos reconnaissances s'adressent également à Dr. RIAH Nassira, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent également à Melle BOUKAOUS Leila, doctorante à l'université Mentouri pour son aide et ses nombreuses orientations durant la préparation de ce travail.

Merci encore à toutes les doctorantes :Hanene, Asma, Maroua, Sabra, Radja, Maya,et surtout à Mme Guergouri Ibtissem et Gaci Meriem qui nous ont permis d'avoir confiance en nous. Aussi à celles qui n'ont été que de passage mais avec qui nous avons passé de réels bons moments au coin d'une paillasse ou d'une hotte.

Merci à tous nos collègues du laboratoire d'Ecologie Microbienne pour leur soutien matériel et moral.

Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes
Chers parents Kamel et Fouzia qui m'ont dirigée et suivie
Durant toutes mes années d'étude, et aussi pour leurs Sacrifices,
Leur patience sans limite et l'éducation
Qu'ils m'ont donnée, je leurs dit merci mille fois.
Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:
Mon cher fiancé : Ismail Kheireddine
Mes chers frères : Akram et Charaf
Et surtout à ma sœur: Maya
Egalement je dédie ce travail à mes adorables amies:
Maha, Nihed, Amira, et surtout Meyssa.*

*Enfinement je dédie ce travail à ma belle famille
Et surtout à mon beau père Nasreddine (que Dieu ait pitié).*

A. Rayane

Dédicace

*Merci mon dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,
La force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve
Et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire " Ya Karim "*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie,
Le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,
A ma mère ...*

*A mon père, école de mon enfance, A tous mes enseignants,
Particulièrement professeur Benhizia.Y que dieu les gardes et les protège.*

A mes sœurs et mes frères : Saleh, Djaber, Amina, Safiya et Redouane

A mes anges : Younes, Ayoub, Raouf.

A ma chère Chaima

*A mes amis : Lamine, Boubaker, Kamel, Yacine, Mouad, Chouaib, Islam, Seif, Zaki,
Hichem.*

*A tous ceux qui me sont chers, A tous ceux qui m'aiment, A tous ceux que j'aime.
Je dédie ce travail.*

S. Oussama

Résumé

Ce travail a été réalisé sur quatre souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf., répandues dans la région du Djebel Boutaleb, afin d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique existante en présence des souches de référence.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique qui nous a permis d'avoir des colonies homogènes d'une forme circulaire, un contour régulier et une surface semi bombée, des bacilles à Gram négatif, suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclue des tests nutritionnels, biochimiques et des tests physiologiques.

Cette caractérisation reste quand même insuffisante, mais elle nous informe sur la position taxonomique hypothétique des isolats traités dans cette étude.

Mots clés : *Hedysarum pallidum*, caractérisation, Gram, isolats.

Summary

This work was carried out on four bacterial strains isolated from root nodules of the legume *Hedysarum pallidum* Desf., Widespread in the gion of Djebel Boutaleb to assess and characterize the existing phenotypic diversity in the presence of the reference strains.

Strain characterization involves a morphological study that allowed us to have homogeneous colonies from a circular shape, regular contour and a semi domed surface of negative Gram bacilli, followed by phenotypic characterization that includes tests nutritional, biochemical and physiological tests.

This characterization still remains inadequate, but it informs us about the hypothetical taxonomic position treaty isolates in this study.

key words: *Hedysarum pallidum*, characterization, Gram, isolates.

ملخص:

أجريت هذه الدراسة على أربعة سلالات بكتيرية معزولة من العقد الجذرية للبقوليات *Hedysarum pallidum* Desf., المتواجدة على مستوى جبل بوطالب على نطاق واسع من أجل تقييم وتمييز التنوع الظاهري في حضور السلالات المرجعية.

التوصيف المظهري للسلالات سمح لنا بتكوين مستعمرات متجانسة ذات شكل دائري، ومحيط منتظم وسطح شبه محدب، عصيات ذات Gram سلبية، يليها توصيف ظاهري يشمل اختبارات غذائية، كيميوية واختبارات فيزيولوجية.

هذا التوصيف غير كاف معه أنه يخبرنا عن الافتراضية التصنيفية لهذه العزلات.

الكلمات المفتاحية: *Hedysarum pallidum* Desf., توصيف، Gram، العزلات.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 Etude Bibliographique	
1- La symbiose.....	3
1-1- Généralités.....	3
1-2- Spécificité de la symbiose rhizobia-légumineuse.....	3
2- Le partenaire végétal	4
2-1- Présentation de l'espèce <i>Hedysarum pallidum</i> Desf.	4
2-2- Taxonomie.....	4
2-3- Ecologie et habitat.....	5
2-4- Description.....	5
3- Le partenaire bactérien.....	6
3-1- Caractères généraux.....	6
3-2- Caractères biochimiques et physiologiques.....	7
3-3 - Caractères génétiques.....	7
3-4- Classification.....	8
4- La nodulation.....	13
4-1- Le nodule	13
4-2- Processus de nodulation.....	13
4-2-1- Pré-échange de signal d'infection.....	14
4-2-2- Infection.....	14
4-2-3- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....	15
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	
1- Isolement des bactéries à partir des nodules.....	17
1-1- Description de la zone d'étude.....	17
1-2- Collecte des nodules.....	17
1-3- Conservation des nodules.....	18

1-4- Stérilisation des nodules.....	19
1-4-1 Test de stérilisation.....	19
1-4-2- Ecrasement des nodules.....	20
1-4-2-1- Méthode préconisée par Vincent.....	20
1-4-2-2-Méthode des tubes Eppendorf.....	20
1-5- Isolement des souches à partir des nodules.....	20
2- Caractères morphologique et culturaux.....	21
2-1- Principaux milieux de culture utilisés.....	21
2-2- Purification des isolats.....	22
2-3 Examen microscopique.....	22
2-4- Observations des colonies et conservation des isolats.....	22
3- Caractéristiques métaboliques des isolats.....	23
3-1- Vitesse de croissance.....	23
3-2- Tests biochimiques (recherche de certaines enzymes).....	23
3-2-1- Réduction des nitrates.....	23
3-2-2- Hydrolyse de l'urée.....	24
3-2-3- Activité cellulosique.....	24
3-3- Tests nutritionnels.....	24
3-3-1- Utilisation des sucres comme seule source de carbone.....	24
3-4- tests physiologiques.....	25
3-4-1- Effet de la température	25

Chapitre 3: Résultats et discussion

1- Test de stérilisation	26
2- Caractères morphologiques et culturaux.....	27
2-1- Croissance sur YMA.....	27
2-2- Croissance sur YMA+ RC	27
2-3- Croissance sur GPA+BCP.....	28
2-4- Aspect microscopique.....	29
3- Caractérisation phénotypique des isolats	29

3-1- Mesure de la vitesse de croissance.....	29
3-2- Tests nutritionnels	30
3- 2-1 - Assimilation de la Source de carbone	30
3-3- Tests biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques).....	31
3-3-1- Réductions des nitrates.....	31
3-3-2- Recherche de l'urèase.....	32
3-3-3- Activité cellulosique.....	33
3- 4- Tests physiologiques.....	34
3-4-1- Effet de température.....	34
Discussion générale	36
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : Photographie d' <i>H. Pallidum</i> Desf., dans la région de Boutaleb à Setif.....	6
Figure 2: Nodules racinaires et nodules caulinaires.....	13
Figure 3: Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse (Tortora et al., 2003)	16
Figure 4 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	17
Figure 5: Collecte des nodules (Photographie D.P. Beck, 1993).....	18
Figure 6 : Conservation des nodules (Vincent, 1970).....	19
Figure 7 : Isolement par la méthode des 4 quadrants.....	21
Figure 8 : Test de stérilisation des nodules de l'espèce <i>H. pallidum</i> Desf.....	26
Figure 9 : Aspect des colonies sur YMA.....	27
Figure 10 : Croissance sur milieu YMA+ RC.....	28
Figure 11 : Acidification et alcalinisation sur milieu GPA+ BCP.....	28
Figure 12 : Observation microscopique des bactéries isolées (G ×100).....	29
Figure 13 : Croissance des isolats sur milieu YMA+BTB.....	30
Figure 14: Réduction des nitrates.....	32
Figure 15: Test d'Uréase.....	33
Figure 16: Activité cellulosique des isolats.....	33
Figure17 : Test de culture sur différentes températures.....	35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les derniers remaniements de la classification des rhizobia selon Weir, 22Février 2014 (Berrada et Benbrahim, 2014).....	9
Tableau 2: Utilisation des sucres comme source de carbone par le groupe des souches testées.....	31
Tableau 3 : Résultats des tests biochimique.....	34

Introduction

L'association symbiotique plante légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement.

Les interactions symbiotiques sont caractérisées chez les légumineuses par la formation des nodules racinaires colonisés par des rhizobium. Auparavant, le groupe des bactéries qui colonisent les racines des légumineuses n'était composé que d'Alpha-Proteobacteria, mais récemment deux souches de Beta-Proteobacteria ont été décrites comme bactéries capables d'induire une nodulation chez les légumineuses du genre *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) et du genre *Ralstonia* (Chen et al., 2001). Ainsi que des souches de Gamma-Proteobacteria ont été désignées comme des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia et al., 2004).

Le genre *Hedysarum*, fait partie de la famille des légumineuses, appelé communément «Sulla » ou Sainfoin d'Espagne, et composé d'un grand nombre d'espèces avec une répartition très étendue dans le monde. Différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Afrique du Nord et en Europe du Sud.

En Algérie, on compte neuf espèces appartenant au genre *Hedysarum* (Quezel et Santa, 1962). Celles-ci se localisent dans diverses régions caractérisées par des microclimats variables (Abdelguerfi-Berrekia, 1985). Elles sont d'un intérêt agronomique non négligeable, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique et peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi et al., 2004).

Parmi ces espèces, *Hedysarum pallidum* Desf., est une plante vivace, cespiteuse, pousse spontanément au Maroc, en Tunisie et en Algérie. Elle a une répartition bien plus large dans l'Est, l'Ouest et le centre d'Algérie sans atteindre les zones sahariennes. Cette espèce se rencontre sur les sols riches en calcaire total, à teneur variable en potassium, phosphore et calcium (Abdelguerfi-Berrekia, 1985).

Ce présent travail repose sur un isolement et une caractérisation phénotypique des bactéries isolées des nodules racinaires de la légumineuse fourragère *Hedysarum pallidum* Desf. Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules.
- Etude morphologique et microscopique.
- Caractérisation phénotypique des isolats comprenant une série de tests.

Chapitre 1 :

Etude

Bibliographique

1- La symbiose

1-1- Généralités

La symbiose rhizobium-légumineuse, décrite pour la première fois par Frank (1889), présente un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote. Elle présente un intérêt agronomique considérable. En effet, l'azote minéral du sol, principale ressource azotée des plantes est, dans le cas des plantes cultivées, fourni principalement par des engrais chimiques qui posent des problèmes de pollution, en particulier des nappes phréatiques par le lessivage des nitrates. La symbiose permet l'enrichissement naturel du sol en azote et la réduction des apports d'engrais.

L'azote fixé par la symbiose est restitué au sol après la décomposition de la matière végétale (racines, nodules, parties aériennes), ou via les déjections des animaux ayant pâturé (Ndiaye, 1996). Les légumineuses sont traditionnellement utilisées comme fourrage.

1-2- Spécificité de la symbiose rhizobia-légumineuse

La symbiose rhizobium-légumineuse est très spécifique, un *Rhizobium* donné n'est capable d'effectuer une symbiose fixatrice d'azote que si l'autre partenaire appartient à son spectre d'hôte, et le contraire est juste.

Les amplitudes des spectres des légumineuses et des rhizobia sont très variables. En effet, on retrouve des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel que *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988), alors que cette même légumineuse possède d'autres partenaires bactériens (*Sinorhizobium saheli* et *S.terangae*) (Boivin et al., 1997). D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôte modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti* qui s'associe avec les espèces des genres *Medicago*, *Meliloti* et *Trigonella* (De lajudie et al., 1994).

En outre, les études de spectre d'hôte ont révélé que rhizobium ne s'associait qu'avec une seule espèce de légumineuse (Zahran 2001, Perret et al., 2000 ; Tan et al., 1999).

2- Le partenaire végétal

2-1- Présentation de l'espèce *Hedysarum pallidum* Desf.

Le genre *Hedysarum* appartient à la sous famille des Papilionaceae qui est très répandue dans le monde, pousse sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, et présente ainsi une grande diversité. Les espèces de ce genre sont rencontrées à l'état naturel dans tout le bassin méditerranéen, en particulier en Afrique du Nord.

Ces espèces d'intérêt agronomique, constituent un patrimoine phylogénétique performant pour la production de fourrage et l'amélioration de la fertilité des sols par la 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).

Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum* comporte neuf espèces (annuelles et vivaces) dont plusieurs sont des endémiques très localisées, comme *H.naudinianum* Coss et *H.perrauderianum* Coss, qui ne se développent qu'en Algérie. *H.carnosum* Desf., et *H.pallidum* Desf., qui sont endémiques de l'Afrique du Nord.

2-2- Taxonomie

Règne: Plantae
Sous règne: Tracheobionta
Division: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Sous-classe: Rosidae
Ordre : Fabales
Famille : Fabaceae
Genre: *Hedysarum*
Espèce : *Hedysarum pallidum* Desf.

2-3- Ecologie et habitat

Très peu de données existent sur *H. pallidum* Desf., espèce décrite pour la première fois par Desfontaines., c'est une légumineuse à vocation fourragère, pousse spontanément en Algérie, au Maroc et en Tunisie. Elle a une écologie peu marquée, se rencontre dans des milieux assez divers (Benhizia H, 2001).

En Algérie, *H. pallidum* se rencontre à Sétif, Constantine et dans les Aurès. Elle se développe généralement dans l'Est Algérien, sans pour autant atteindre les zones Sahariennes (Quezel et Santa, 1962). Elle se trouve généralement dans les forêts et les broussailles. Cette espèce est également signalée dans la région de haret, Nador et Garrouban (Pomel, 1874), Tebessa (Abdelkrim, 1984), près de Ain Tedeles, Saida, à Arzew, Oran et près d'El Aouinet (Abdelguerfi – Berrechia et *al.*, 1988).

2-4- Description

Selon Quezel et Santa (1962), la clé de détermination de l'espèce *Hedysarum pallidum* est basée sur les caractères suivants :

- Une fleur formée d'un calice en cloche, à cinq dents égales ou inégales, pétales à onglet très court, carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité et étamines diadelphes (9-1) à tube fendu en dessus,
- Une gousse aplatie, divisée en articles monospermes ovales, orbiculaires ou quadrangulaires, se séparant à maturité,
- Des feuilles imparipennées à deux stipules latérales.

C'est une plante vivace, cespiteuse, à longues tiges plus au moins prostrées appartenant à la famille des *Fabaceae* (voir la classification). Elle a de grandes fleurs rosées ou blanches lavées de pourpre, parfois blanches et des calices entièrement hispides (**Figure 1**).



Figure 1 : *H. Pallidum* Desf., dans la région de Djebel Boutaleb à Setif

3- Le partenaire bactérien

Les rhizobium furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote, c'est Franck 1889 le premier a proposé le nom de *Rhizobium*.

3-1- Caractères généraux

Les rhizobium sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 μm de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur et non sporulants (Jordan, 1984). Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'*Alpha- Proteobacteria*. (Zakhia et de Lajudie., 2001; Laranjo et *al.*, 2002). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992).

Les espèces de rhizobia en culture ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (Somasegaran et Hoben, 1994). En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les rhizobium et le *Bradyrhizobium* ont une grande exigence pour le Ca^{2+} , Fe^{2+} et Co^{2+} , leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre *Bradyrhizobium* est généralement stimulé par la biotine, alors que le *Rhizobium* a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate (Werner, 1992).

3-2- Caractères biochimiques et physiologiques

Rhizobium possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobiose; alors que dans les conditions d'anaérobiose, les espèces *rhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (Werner, 1992 et Benguedouar, 2000).

La voie de Enter-Doudoroff est le mécanisme principal du métabolisme des carbohydrates (Werner, 1992).

Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0 (Somasegaran et Hoben, 1994). Les températures extrêmes sont de 4°C et 42,5°C.

Les souches de *Rhizobium* peuvent se développer à un pH compris entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984).

3-3 - Caractères génétiques

La génétique de *Rhizobium* n'est pas facile, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Pelmont, 1995). Les souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (Patrícia et al., 1998; Raposeiras et al., 2002).

Le génome du *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un mégaplasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieure à 1 Mb, selon les espèces (Laranjo et al., 2002).

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide (P_{sym}) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti*. Les gènes responsables de la nodulation (Nod) et de la fixation de l'azote (Fix, Nif) dans les souches de *Rhizobium* sont situés sur ce simple réplicon symbiotique, des gènes codent pour des bactériocines et de la production des pigments sont aussi présents (Werner, 1992., Pelmont, 1995., Patrícia et al., 1998).

La spécificité de l'hôte est codée par les gènes du plasmide sym, un échange dans ce plasmide signifie un échange dans la spécificité de l'hôte (Pelmont, 1995).

3-4- Classification

La combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques a permis de modifier considérablement la taxonomie des rhizobium ces dernières années (**tableau 1**).

Au total, 98 espèces de rhizobium réparties en 13 genres et appartenant aux sous-classes alpha (10 genres) et beta (2 genres) des Protéobactéries ont été identifiées depuis 2013 (NOEL, 2013). Ces espèces se répartissent également en huit familles (Rhizobiacées, Phyllobacteriacées, Bradyrhizobiacées, Hyphomicrobiacées, Methylobactériacées, Brucellacées, Burkholderiacées et Ralstoniacées) et deux ordres, à savoir les rhizobiales et les burkholderiales. L'ordre des rhizobiales renferme les six premières familles.

Tableau 1: Les derniers remaniements de la classification des rhizobia selon Weir, 22 Février 2014
(Berrada et Benbrahim, 2014).

	Espèces	Source d'isolation	Références
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i> Genre: <i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>		Frank B et al., 1889
	<i>symbiovar viciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>	Frank B et al., 1889; Jordan DC et al., 1982
	<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Jordan DC et al., 1982; Renan A et al., 2012
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frank B et al., 1889; Jordan DC et al., 1982
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>	Terefework Z et al., 1998; Lindström K et al., 1989
	<i>symbiovar officinalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström K et al., 1989
	<i>symbiovar orientalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>	Martinez-Romero E et al., 1991
	<i>R. leucaenae</i>		Renan A et al., 2012
	<i>R. tropici</i>		Martinez-Romero E et al., 1991
	<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	López LA et al., 2010
	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	
	<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Tian CF et al., 2008
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>	Segovia L et al., 1993
	<i>symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	Wang LX et al., 1999
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	Souza V et al., 1994
	<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie P et al., 1998
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger N et al., 1997
	<i>symbiovar phaseoli</i>		
	<i>symbiovar gallicum</i>		
	<i>R. giardinii</i>		
	<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	
	<i>symbiovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>	Chen WX et al., 1988
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang ET et al., 1998
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>	Van Berkum P et al., 1998
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>	Tan ZY et al., 2001
	<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>	Bouzar HD et al., 2001
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp</i>	Wei GH et al., 2002	
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>	Squartini A et al., 2002	
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>	Wei GH et al., 2003	
<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>	Garcia-Fraile P et al., 2007	

	<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	Gu CT et al., 2008
	<i>R. multihospitium</i>	<i>Multiple legume species</i>	Han TX et al., 2008
	<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	Peng G et al., 2008
	<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	Ramirez-Bahena MH et al., 2008
	<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>	Lin DX et al., 2008
	<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berge O et al., 2009
	<i>R. alkalisola</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu YL et al., 2009
	<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	Hou BC et al., 2009
	<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	El Akhal MR et al., 2008.
	<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>	Hou BC et al., 2009
	<i>R. radiobacter</i>	*	Young JM et al., 2001
	<i>R. rhizogenes</i>	*	
	<i>R. rubi</i>	*	
	<i>R. vitis</i>	*	
	<i>R. nepotum</i>	*	
			Pulawska J et al., 2012
Genre: <i>Ensifer</i>	<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Dangeard PA, 1926.
	<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>	Scholla MH et Elkan GH, 1984
	<i>symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>	Chen WX et al., 1988
	<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>	de Lajudie P et al., 1994
	<i>E. terangaie</i>	<i>Different host plants</i>	
	<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>	Young JM et al., 2001
	<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>	Lorquin J et al., 1997
	<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>	Rome S et al., 1996
	<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick G et al., 1999
	<i>E. kostiense</i>		
	<i>E. xingianense (anciennement: Sinorhizobium xingianense)</i>	<i>Glycine max</i>	Chen WX, Yan GH, Li J, 1988
	<i>E. adhaerens</i>	*	Casida LEJ, 1982
	<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>	Wei GH et al., 2002
	<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>	Toledo I et al., 2003
	<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret L et al., 2007
	<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>	Merabet C et al., 2010
Genre: <i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Lin DX et al., 2008
Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i> Genre: <i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>	Jarvis BDW et al., 1982
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen H et al., 1991
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour SM et al., 1994
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour SM et al., 1995

	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,</i>	de Lajudie P et al., 1998
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang ET et al., 1999
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velásquez, E et al., 2001
	<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao JL et al., 2004
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	
	<i>M. thiogangeticum</i>	*	
	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Wang FQ et al., 2007
	<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>	Guan SH et al., 2008
	<i>M. gobiense</i>	<i>Wild legumes</i>	Han TX et al., 2008
	<i>M. tarimense</i>		
	<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al., 2009
	<i>M. opportunistum</i>		
	<i>M. metallidurans</i>		
	<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal C et al., 2009
	<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>	Chen WM et al., 2011
	<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia.</i>	
	<i>M. abyssinicae</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Degefu T et al., 2013
	<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang JJ et al., 2012
	<i>M. hawassense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Degefu T et al., 2013
	<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Zheng WT et al., 2013
	<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou PF et al., 2010
	<i>M. shonense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>	Chen H et al., 1991
	<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana species</i>	Lu YL et al., 2009
	<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus species</i>	Zhao CT et al., 2012
	<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>	Ramirez-Bahena MH et al., 2012
Genre: <i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde A et al., 2005
Famille: <i>Methylobacteriaceae</i> Genre: <i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>	Jourand P et al., 2004
Genre: <i>Microvirga</i>	<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus sp.</i>	Ardley JK et al., 2012
	<i>M. lotononidis</i>	<i>Différentes légumes hôte</i>	
	<i>M. zambiensis</i>		
Famille: <i>Brucellaceae</i> Genre: <i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<i>Cytisus</i>	Zurdo-Piñeiro JL et al., 2007
	<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	Trujillo ME et al., 2005

Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i> Genre: <i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus B et al., 1988	
	<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Moreira FMS et al., 2006	
	<i>A. oxalatifilum</i>	*	Lang E et al., 2013	
Genre: <i>Devosia</i>	<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas R et al., 2003	
Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i> Genre: <i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Jordan DC 1984 ; Jordan DC et al., 1982	
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	KuyKendall LD et al., 1992	
	<i>B. liaoningense</i>	*	Xu LM et al., 1995	
	<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	Yao ZY et al., 2002	
	<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>	Rivas R et al., 2004	
	<i>B. canariense</i>	<i>Genistea et Loteae</i>	Vinuesa P et al., 2005	
	<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>	Islam MS et al., 2008	
	<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramirez-Bahana MH et al., 2009	
	<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Islam MS et al., 2008	
	<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>	Zhang YM et al., 2012	
	<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahbourne R et al., 2011	
	<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>	Wang JY et al., 2013	
	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	Van Berkum P et al., 2006	
	<i>B. oligotrophicum</i>	*	Ramirez-Bahana MH et al., 2013	
	<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>		
Classe: <i>Beta Proeobacteria</i> Ordre: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i> Genre: <i>Burkholderia</i>	<i>B. caribensis</i>	<i>Vertisol microaggregates</i>	Achouak W et al., 1999	
	<i>C. taiwanensis</i> <i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	Moulin L et al., 2001	
	<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>	Vandamme P et al., 2003	
	<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>		
	<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i>	Chen WM et al., 2007	
	<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	Chen WM et al., 2008	
	<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Chen WM et al., 2003	
	<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Partida-Martinez LP et al., 2007	
	<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Sheu SY et al., 2013	
	<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Partida-Martinez LP et al., 2007	
	<i>B. heleia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>	Aizawa T et al., 2010	
		<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa spp.</i>	SHEU (S.Y) et al., 2012
		<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa sp.</i>	VandammeP et Coeyene T, 2004
Classe: <i>Gamma-Proteobacteria</i> Ordre: <i>Pseudomonadales</i> Famille: <i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Shiraishi A et al., 2010	

4- La nodulation

4-1- Le nodule

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bacteroides, fixent l'azote atmosphérique. Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactive par l'oxygène, la plante maintient les nodules en condition de micro-oxye grâce au parenchyme nodulaire pendant que la légghémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène indispensable à la respiration (Ott *et al.*, 2005). Les nodules sont majoritairement racinaires mais peuvent parfois être caulinaires (Fernandez-Lopez *et al.*, 1998). Une illustration de ces différents types de nodules est présentée (**Figure 2**).

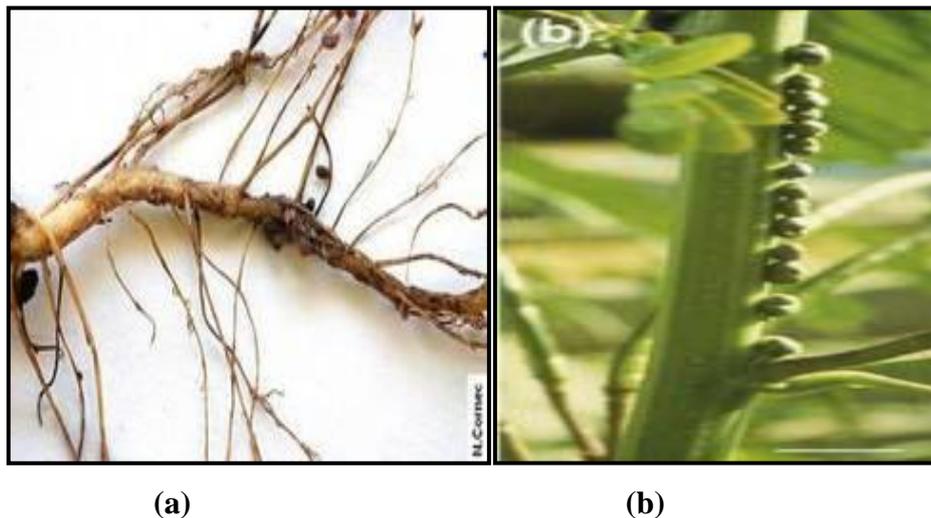


Figure 2: (a) : Nodules racinaires

(b) : Nodules caulinaires

4-2- Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan *et al.*, 2007). Les étapes sont les suivantes :

4-2-1- Pré-échange de signal d'infection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en ions d'ammonium (NH_4^+), les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca *et al.*, 2004). Ce signal, une fois perçu par le Rhizobium, induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitino-oligosaccharides ou LCO) (Dénarié, 2000). Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca *et al.*, 2004).

Les rhizobiums diffèrent dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un deuxième niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (Moschetii *et al.*, 2005).

4-2-2- Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, « la rhicadhésine ». Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Perry *et al.*, 2004). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005). Le Rhizobium s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (Bélanger, 1998).

Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (Machrafi, 2001). En réponse le poil absorbant secrète une enzyme, « la polygalacturonase », qui fragilise la paroi ; la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (Dupuy et Nougier, 2005). Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (Perry *et al.*, 2004). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme, tout en produisant une cytokinine (sorte d'hormone de croissance). (Pelmont, 2005).

4-2-3- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe contenant des mucilages limités par des fibrilles celluloses d'origine végétale; c'est le filament d'infection (Dupuy et Nougier, 2005). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. De là, l'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (Bélanger, 1998). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes ; un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (Dupuy et Nougier, 2005). Le temps de pénétration est de 5 heures chez le soja (pour un trajet de 70 ou 80 µm), de 17 heures chez le lupin et de 2 jours chez le pois (Heller *et al.*, 1989).

La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivie de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Machrafi, 2001). La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroïdienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004). Elle protège la plante contre l'ammoniac produit et une pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote (Bélanger, 1998). Les bactéroïdes ne sont pas épars dans le cytoplasme, mais enfermés dans des vésicules au nombre de 6 à 8 bactéroïdes par vésicule chez le soja et le haricot, un seul chez le trèfle (Heller *et al.*, 1989).

Le passage à l'état symbiotique s'accompagne d'une forte répression des gènes du métabolisme basal et d'une surexpression de ceux impliqués dans la fixation et l'assimilation de l'azote (Becker *et al.*, 2004). Quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire, sont présentes dans le nodule ; ce sont les cellules qui survivront et se multiplieront dans le sol après la mort de la plante. Elles pourront alors infecter les racines des plantes situées dans le voisinage ou de celles qui se développent ultérieurement sur le même site (Perry *et al.*, 2004). Le centre du nodule est entouré de faisceaux conducteurs dans lesquels le xylème est externe, le phloème est interne alors que cette disposition est inversée dans de la structure normale de la racine (Dupuy et Nougier, 2005). Les nodosités utilisent la majeure partie de l'ammonium produit par fixation symbiotique de l'azote pour synthétiser des acides aminés, qui passe ensuite dans le xylème pour se rendre dans le système caulinaire (Campbell et Reece, 2004).

Les deux composantes impliquées dans la sensibilité de la symbiose au sol sont d'une part le développement et le fonctionnement des nodosités et d'autre part la croissance et l'aptitude des organes photosynthétiques à approvisionner les nodosités en photosynthétats (Saadallah *et al.*, 2001) (Figure 3).

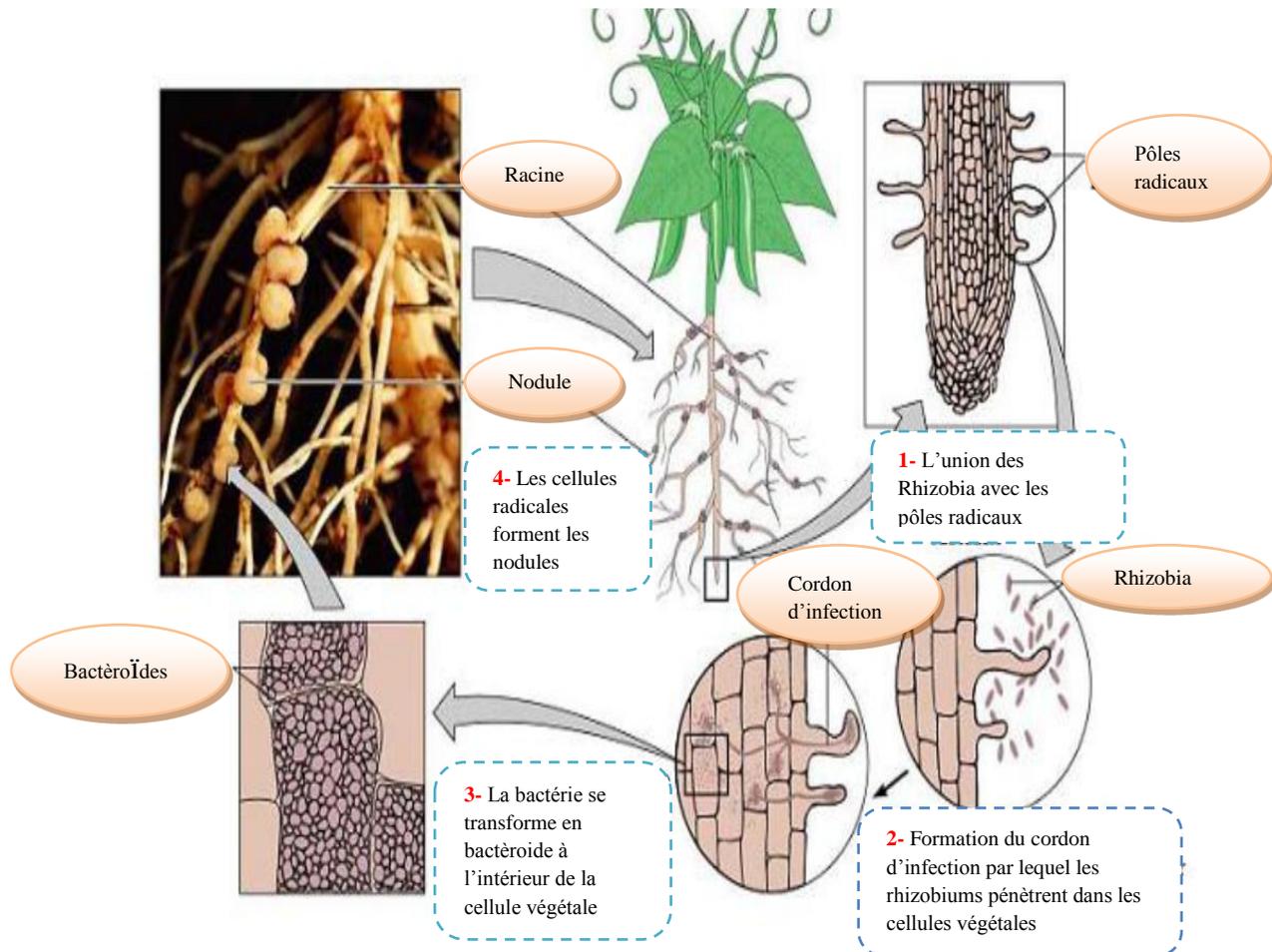


Figure 3: Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse (Tortora *et al.*, 2003).

Chapitre 2 :

*Matériel et
Méthodes*

1- Isolement des bactéries à partir des nodules

1-1- Description de la zone d'étude

Notre étude porte essentiellement sur la région de Boutaleb, Wilaya de Setif (Latitude $5^{\circ}16'53.3E$ et longitude $35^{\circ}40'13.4N$), et plus précisément dans le village de Guenifa sur Djebel Boutaleb (Sud-Ouest de Setif). Cette région semi-aride du Nord-Est Algérien est située à environ 227 Km de Constantine (**Figure 4**).

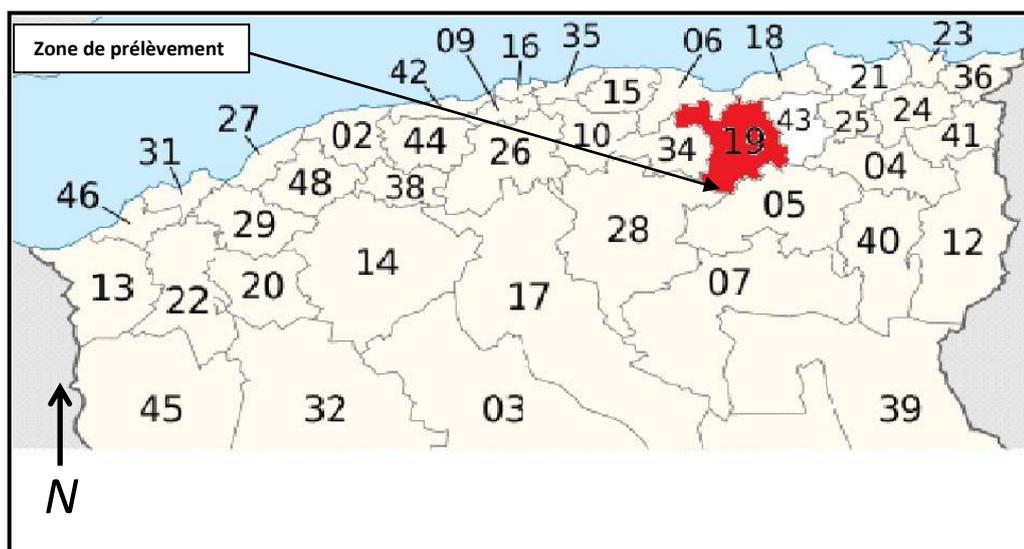


Figure 4: Localisation géographique de la zone de prélèvement

1-2- Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité ; la récolte est effectuée au printemps durant le mois d'Avril. A cette période de l'année, les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines.

La collecte est réalisée selon la technique préconisée par Vincent (1970) et Beck *et al.*, (1993).

Il s'agit de :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire sans l'abimer (**Figure 5**).
- Se débarrasser de la terre manuellement au niveau des racines sans endommager les nodules.
- Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique.
- Répéter l'opération sur plusieurs pieds pour avoir le maximum de nodules.



Figure 5 : Collecte des nodules

- Au laboratoire, enlever la partie aérienne, et laver la partie racinaire soigneusement à l'eau courante.
- Couper les nodules à 2mm du site d'attache et sécher les avec du papier absorbant.

1-3- Conservation des nodules

Pour une courte conservation et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C de 24 jusqu'à 48 heures (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace).

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994)., qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par du chlorure de calcium CaCl_2 (pour une meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel les nodules sont déposés (**Figure 6**).

Sur chaque flacon, on doit mentionner le nom de la plante, le lieu et la date de prélèvement (Vincent, 1970).

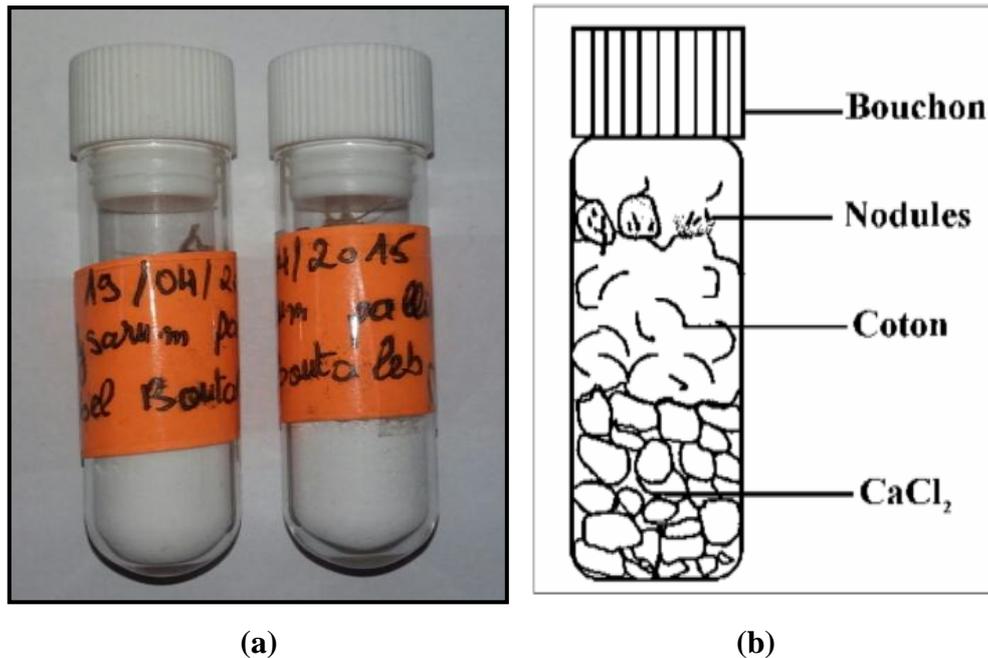


Figure 6 : (a)-Tubes utilisés pour la conservation des nodules dans notre étude.

(b)- Conservation des nodules (Vincent., 1970)

1-4- Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau distillée au réfrigérateur toute une nuit. Sous la hotte à flux laminaire les nodules préparés sont immergés dans l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes puis transférés immédiatement dans une solution de Chlorure de Mercure HgCl₂ (1 g HgCl₂ + 5 ml HCl + 1 l'eau distillée) pendant 3 minutes, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent J.M., 1970).

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

1-4-1 Test de stérilisation

Prendre le nodule stérile et l'ensemencer en le faisant passer sur le milieu YMA+Rouge Congo (**Annexe 1**), puis l'incuber à 28°C pendant 24 heures, et cela pour vérifier la technique de stérilisation utilisée et la stérilité externe des nodules.

1-4-2- Ecrasement des nodules

Deux méthodes ont été utilisées :

1-4-2-2- Méthode préconisée par Vincent

Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile, ensuite ils sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen (Vincent, 1970).

1-4-2-2- Méthode des tubes Eppendorf

Les nodules sont réhydratés avec de l'eau distillée dans des tubes Eppendorf. Après avoir éliminé l'eau, les nodules sont stérilisés par immersion dans une solution de chlorure de Mercure pendant 3 minutes. Ensuite, ils sont rincés 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace de Chlorure de Mercure. Les nodules sont enfin écrasés dans les tubes Eppendorf stériles dans 2 gouttes d'eau distillée stérile.

Les deux méthodes sont réalisées dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...).

1-5- Isolement des souches à partir des nodules

Le jus nodulaire obtenu à partir de ces 2 méthodes estensemencé à l'aide d'une anse de platine flambée au bec Bunsen, sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA, Vincent J.M., 1970) additionné de rouge Congo (**Annexe 1**). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser (**Figure 7**). Les mêmes nodules sontensemencés sur une boîte de milieu Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA au BCP. **Annexe 1**). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24 à 48 heures.

Récupérer le jus restant et l'ensemencer sur un bouillon YMB (**Annexe 1**). Incuber à 28°C pendant 24 heures et répéter l'opération pour plusieurs nodules afin d'avoir le maximum de souches.

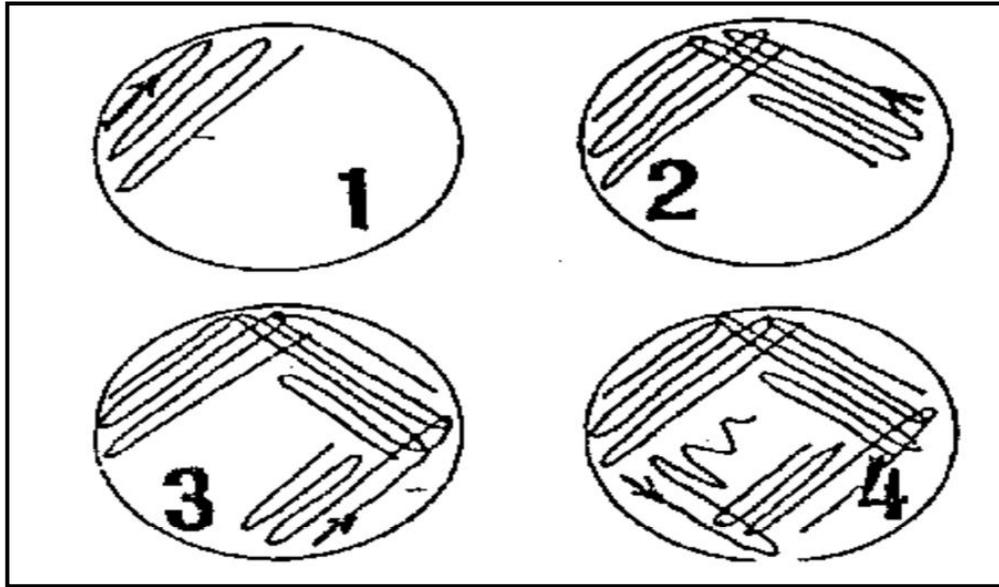


Figure 7 : Isolement par la méthode des 4 quadrants

2- Caractères morphologique et culturaux

2-1- Principaux milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée.

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants :

- Milieu liquide: YMB (yeast Mannitol Broth).

- Milieux solides: YMA (yeast Mannitol Agar).

YMA+RC (yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)

YMA+BTB (yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol).

GPA+BCP (Glucose Peptone Agar+ pourpre de Bromocrésol).

2-2- Purification des isolats

Après l'examen des isolats selon les caractères microscopiques et morphologiques sur les différents milieux (Vincent., 1970., Somasegaram et Hoben, 1994), des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification. La méthode consiste à ensemercer des tubes contenant le YMB puis les placer dans un bain Marie agitateur de 120 tours/ min à 28°C. Après 24h d'incubation, l'ensemencement se fait sur le milieu YMB+RC. Des examens microscopiques et morphologique sont enfin réalisés.

2-3- Examen microscopique

Dans notre étude, on a effectué la coloration de Gram. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de diviser les bactéries en deux groupe Gram positif et Gram négatif (Tortora., 2003).

- Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant basique le violet de Gentiane.
- Laisser agir pendant 1minute.
- Chasser le violet avec le Lugol, ensuite recouvrir le frottis pendant 30 secondes.
- Laver à l'alcool-acétone et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau courante.
- Recouvrir le frottis par la Fushine et laisser agir durant 1 minute.
- Laver à nouveau avec de l'eau, puis égoutter la lame sur du papier absorbant et enfin observer au microscope.

2-4- Observations des colonies et conservation des isolats

Les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo sur milieu YMA et n'ayant pas acidifié le milieu GPA (virage du BCP au jaune) sont prises en considération. Ces colonies, propres aux bactéries nodulant les Légumineuses, en particulier le genre *Hedysarum* (Benhizia et al., 2004 ; Torche. A, 2006). Une observation microscopique (coloration de Gram) et un examen morphologique des colonies sur milieu YMA sont réalisés sur les isolats avant d'être conservés sur YMA tamponné avec du CaCO₃ (3 g/l). Après une incubation de 24 heures, les souches sont stockées au réfrigérateur en vue de leur caractérisation.

3- Caractéristiques métaboliques des isolats

Dans le premier cas, il s'agit de vérifier la vitesse de croissance des isolats pour la distinction entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente sur le milieu YMA contenant le Bleu de Bromothymol, et de tester l'absorption du Rouge Congo sur milieu YMA par les isolats. Dans le second cas, la recherche de certaines enzymes intervenant dans la phase d'infection des racines de plantes par les souches bactériennes, notamment la nitrate-réductase, la cellulase et l'uréase.

3-1- Vitesse de croissance

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...). Pour cela on cultive nos isolats et les souches de référence sur milieu YMA+Bleu de Bromothymol. L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours).

3-2- Tests biochimiques (recherche de certaines enzymes)

Le but consiste à rechercher certaines enzymes qui jouent un rôle lors de l'infection (nodulation) des racines par les bactéries, particulièrement, la cellulase, la nitrate-réductase et à un moindre degré l'uréase.

3-2-1- Réduction des nitrates

La présence ou l'absence de la nitrate-réductase se fait par la mise en évidence de la transformation de nitrate en nitrite en milieu TY (**Annexe 1**) additionné de KNO_3 à 0.1% (p/v). Les bouillons sont ensemencés à partir d'isolats et de souches témoins et incubés pendant 4 jours à 28°C. Après incubation, on ajoute quelques gouttes des réactifs nitrate-réductase I et II (réactifs spécifiques à la recherche de nitrate-réductase). Une coloration rose ou rouge du milieu désigne une réaction négative, mais certaines bactéries réduisent les nitrates directement en azote gazeux (N_2), c'est-à-dire une coloration rose obtenue après addition de poudre de zinc. (Le zinc est un agent réducteur qui a la capacité de réduire les nitrates en nitrites).

3-2-2- Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence de l'uréase, les isolats et les souches témoins sont cultivés sur le milieu YMA (**Annexe 1**) contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012 g de Rouge de Phénol comme indicateur de pH. Le milieu solide sans l'urée est mis dans l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes puis refroidi jusqu'à environ 45°C. La solution d'urée est stérilisée par filtration et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire puis incubation à 28°C pendant 48 heures.

Une couleur rouge représente l'alcalinisation du milieu ce qui indique l'hydrolyse de l'urée.

3-2-3- Activité cellulosique

Les bactéries sont cultivées sur milieu YMB ensuite ensemencées sur TYA (**Annexe 1**) contenant 0.25 (p/v) de CMC (Carboxyle-Méthyle-Cellulose) incubées pendant 5 jours à 28°C. Les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante. Les boîtes sont remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées 30 min dans l'étuve à 28°C. La solution colorante est remplacées par une solution de NaCl 1N, et les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes puis vidées de cette solution.

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

3-3- Tests nutritionnels

3-3-1- Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Les souches sont cultivées sur milieu YMA ou le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D-Galactose, D-Glucose, D-Lactose, D-Saccharose, D-Sorbitol, D-Xylose, D-Fructose, D-Maltose. On utilise un témoin avec le Mannitol.

- Incubation a 28°C pendant 24 à 48 heures.
- L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'évaluation de la croissance (+ : il y a une pousse de colonie, - : pas de pousse de colonie).

3-4- Tests physiologiques

3-4-1- Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sontensemencées sur le milieu TYA (**Annexe 1**) par la méthode des stries simples et incubées à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 37°C, 44°C et 50°C.

Les souches sont incubées pendant 24 à 48 heures. Pour la température 4°C, La lecture peut y aller jusqu'à 10 jours.

Chapitre 3:

Résultats

Et discussion

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les rhizobiums, la base de la description formelle. Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (Baldani et Baldani, 2005).

En dehors de ces informations dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, notamment polyphasique, les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux.

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de *H. pallidum*, nous avons tenu compte de 4 isolats : Epp, A.N, N_{6a} et E_{3N3}. Ces isolats ont été identifiés par comparaison avec des souches de référence : T, F et Méso.

Notre mode opératoire a été choisi selon les méthodes préconisées par Vincent (1970) et Somasegaram et Hoben (1994).

1- Test de stérilisation

Ce test permet de vérifier l'efficacité de la technique utilisée pour la stérilisation des nodules, et ceci se manifestera par l'absence de croissance des bactéries sur le milieu YMA+RC (**Figure 8**).



Figure 8 : Test de stérilisation des nodules de l'espèce *H. pallidum* Desf.

2- Caractères morphologiques et culturels

2-1- Croissance sur YMA

Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur milieu YMA. Les colonies sont d'une couleur blanchâtre ou crème, d'un diamètre qui varie entre 2 et 4 mm, sous forme ronde avec un contour régulier, une surface semi bombée et lisse. Elles sont translucides, visqueuses et brillantes, avec une texture homogène (**Figure 9**).



Figure 9 : Aspect des colonies sur YMA

2-2- Croissance sur YMA+ RC

En général, les rhizobia produisent des colonies blanches ou absorbent faiblement le Rouge Congo. Malgré que ce dernier soit souvent rajouté au milieu de culture pour isoler les rhizobia ou pour tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être un agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries (in. Torche, 2006).

Nos isolats n'absorbent pas le rouge Congo et apparaissent avec la couleur initiale (couleur blanche) (**Figure 10**).

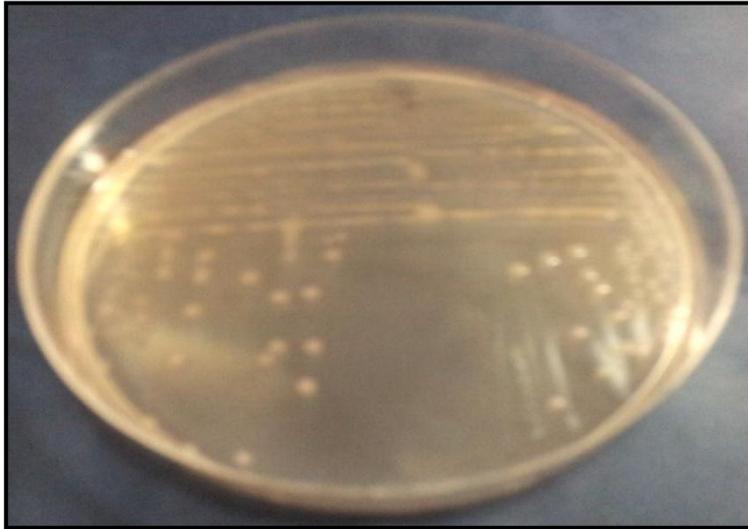


Figure 10 : Croissance sur milieu YMA+ RC

2-3- Croissance sur GPA+BCP

Sur le milieu GPA, le développement des bactéries se fait avec acidification et alcalinisation du milieu après 24 à 48 heures. Le virage de couleur vers le jaune indique une acidification (**Figure 11**).



(a)



(b)

Figure 11 : (a) Acidification sur milieu GPA+ BCP
(b) Alcalinisation sur milieu GPA+BCP

2-4- Aspect microscopique

L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets de taille différente et des coccobacilles roses à Gram négatif compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (**Figure 12**).



Figure 12 : Observation microscopique des bactéries isolées (G×100)

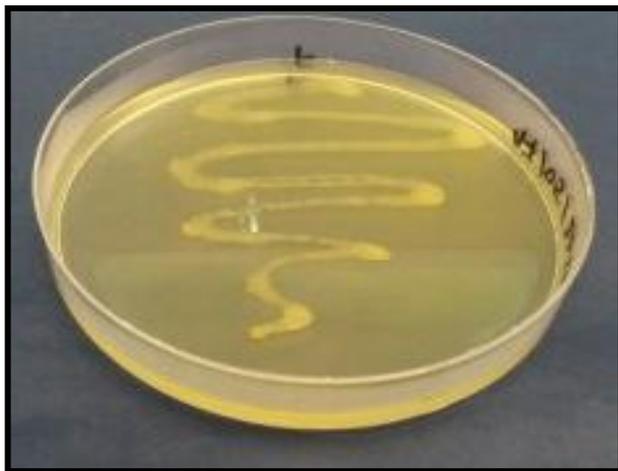
L'ensemble des résultats obtenus relatifs à l'aspect macroscopique et microscopique suggèrent que les isolats ont la même description des rhizobia.

3- Caractérisation phénotypique des isolats

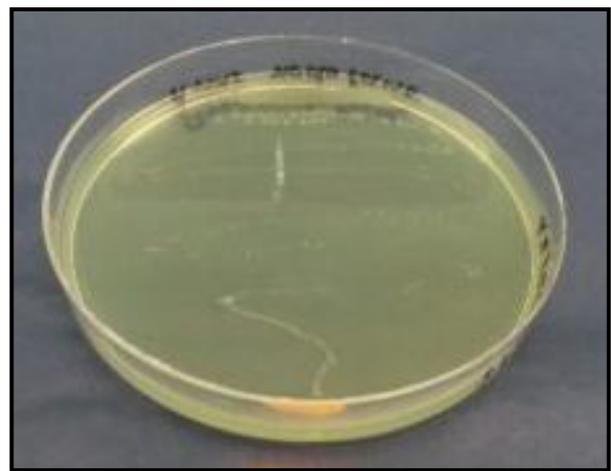
3-1- Mesure de la vitesse de croissance

En fait, le Bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7.6. Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (Jordan, 1984., Beck et *al.*, 1993., Pagano, 2008).

Pratiquement tous nos isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB après 24 à 48 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes, ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide, sauf l'isolat A.N qui a donné une réaction alcaline (**Figure 13**).



(a)



(b)

Figure 13 : (a) Isolat à croissance rapide sur milieu YMA+BTB
(b) Isolat à croissance lente sur milieu YMA+BTB

3-2- Tests nutritionnels

3- 2-1 - Assimilation de la source de carbone

L'évaluation de la croissance après 48 heures d'incubation montre que les sucres testés comme seule source de carbone sont assimilables par les souches (isolats et souches témoins) avec une fréquence de dégradation variable (**Tableau 2**).

Wei et *al* (2008) ont rapporté que certaines souches nodulant *Astragalus*, *Lespedeza* et *Hedysarum* ne peuvent utiliser le Xylose comme seule source de carbone.

Les résultats obtenus montrent une croissance importante de toutes les souches en présence du Mannitol et du Glucose, ce qui signifie leurs utilisations. Alors que les sucres les moins utilisés sont le Lactose et le Xylose pour toutes souches.

Une différence significative est observée dans l'utilisation des sucres : Maltose, Sorbitol, Galactose, Saccharose et Fructose ; Les souches témoins et l'isolat E₃N₃ ont assimilé les sucres beaucoup plus que les isolats A.N, Epp et N₆a.

Tableau 2: Utilisation des sucres comme source de carbone par le groupe des souches testées

	Lactose	Glucose	Xylose	Maltose	sorbitol	Galactose	saccharose	Fructose	Mannitol
Epp	±	++	±	±	±	±	±	+	+++
A.N	±	+++	+	+	+	±	±	+	+++
N_{6a}	±	+++	±	±	±	±	±	+	+++
E₃N₃	±	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+++
Méso	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
T	±	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
F	±	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

(+): Pousse de colonie faible,

(++) : Pousse de colonie moyenne,

(+++): Pousse de colonie forte,

(±) : pas de pousse de colonie.

3-3- Tests biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques)

3-3-1- Réduction des nitrates

La majorité des souches réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition des réactifs I et II de la nitrate réductase, sauf la souche E₃N₃ qui a donné une réaction négative, mais après l'addition de la poudre de zinc, il y a eu une apparition d'une couleur rougeâtre (**Figure 14**).

La coloration rouge ou rose traduit la décomposition de nitrate en nitrite selon la réaction suivante :



La réaction peut être rendue négative, et pour vérifier la présence de nitrate dans le milieu ou non, on ajoute une pincée de poudre de zinc, après quelques minutes : une apparition d'une teinte rouge signifiant la présence des ions nitrate dans le milieu et donc c'est un résultat négatif ou bien l'absence de la coloration rouge et donc l'absence des ions nitrates dans le milieu, ce qui indique un résultat positif.

Il est bien connu que les nitrates inhibent l'activité de la nitrogénase dans les nodules des légumineuses (Lucinsni et *al.*, 2002).

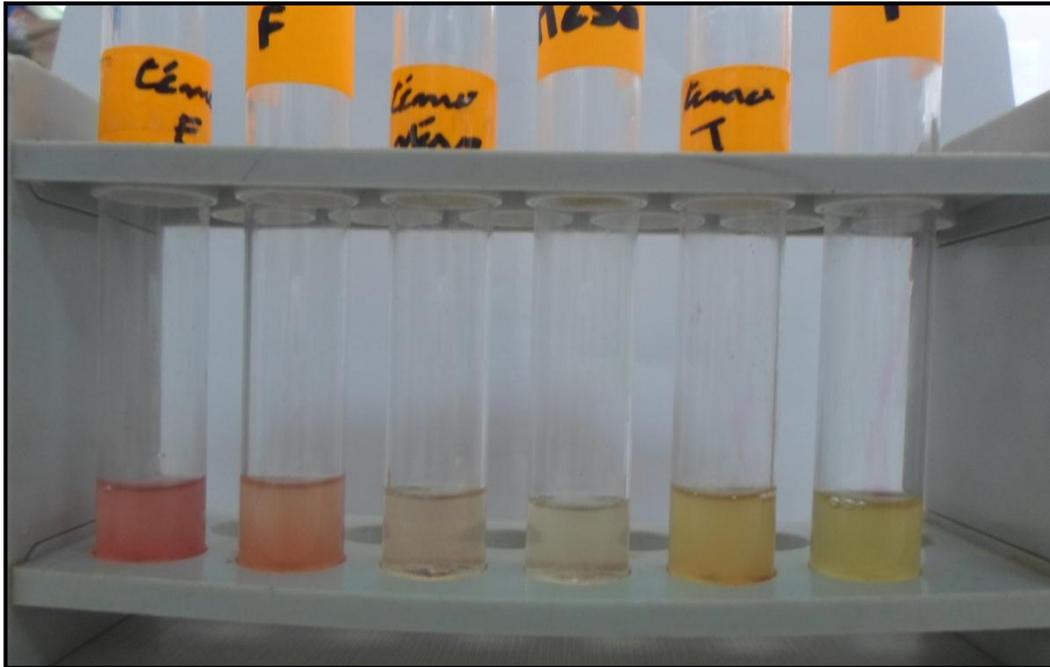
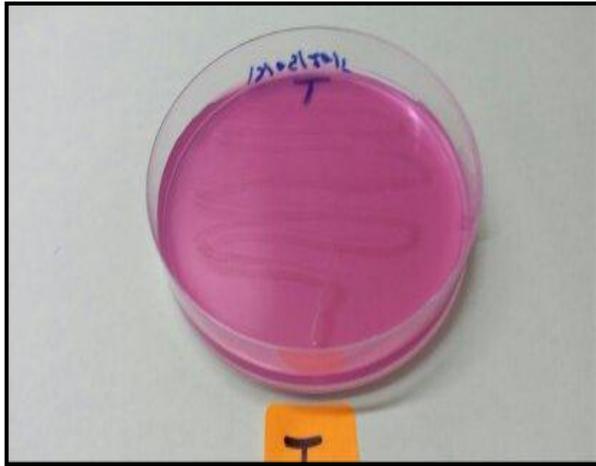


Figure 14 : Réduction des nitrates

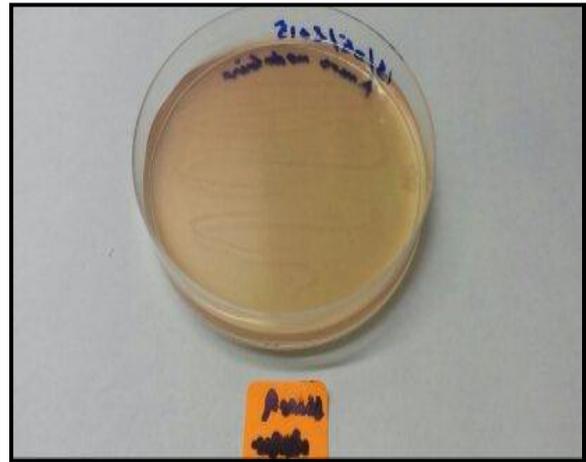
3-3-2- Recherche de l'uréase

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

Après l'incubation, les souches E₃N₃, Epp, N₆a en plus des souches témoins, donnent un autre aspect avec une couleur rose, c'est-à-dire alcalinisation du milieu (uréase+). Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium comme dans l'équation (Guiraud, 1998). Par contre l'isolat A.N n'a donné aucune alcalinisation du milieu, ce qui indique l'absence de l'activité uréolytique chez ce dernier (**Figure 15**).



(a)



(b)

Figure 15 : (a) Test d'Uréase positif, (b) Test d'Uréase négatif (-)

3-3-3- Activité cellulosique

Pour les souches de rhizobia, les colonies apparaissent sur un fond rouge, entourées d'un halo jaune orangé ce qui met en évidence l'activité cellulolytique et cela s'est produit pour toutes les souches. Par contre pour la souche Mésos (souche témoin), on remarque l'absence de halo et donc l'activité cellulolytique est négative (**Figure 16**).

Les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* laissent apparaître une activité cellulolytique négative (Benhizia, 2004).

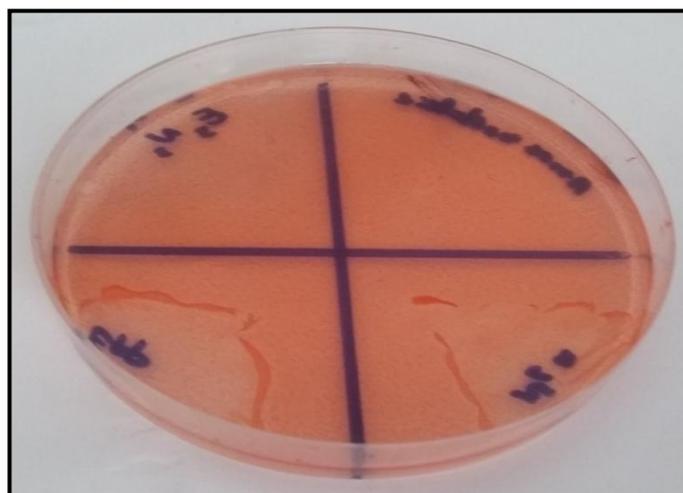


Figure 16: Activité cellulosique des isolats

Le tableau suivant exprime les résultats des tests biochimiques (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Résultats des tests biochimique

	Nitrate réductase	uréase	Cellulase
Mesorhizobium sp	+	+	-
Rhizobium bv trifolii.	+	+	+
Rhizobium sullae RHF	+	+	+
Epp	+	+	+
N_{6a}	+	+	+
E_{3N₃}	-	+	+
A.N	+	-	+

3- 4- Tests physiologiques

3-4-1- Effet de température

Nos isolats et souches témoins sont incapables de croître à une température au-dessous de 4°C et au-delà de 44°C, par contre on a une bonne croissance dans un intervalle de 20°C à 37°C. Ce qui indique que nos isolats sont thermo-tolérants. Les mêmes résultats ont été observés chez les souches de référence (**Figure 17**).

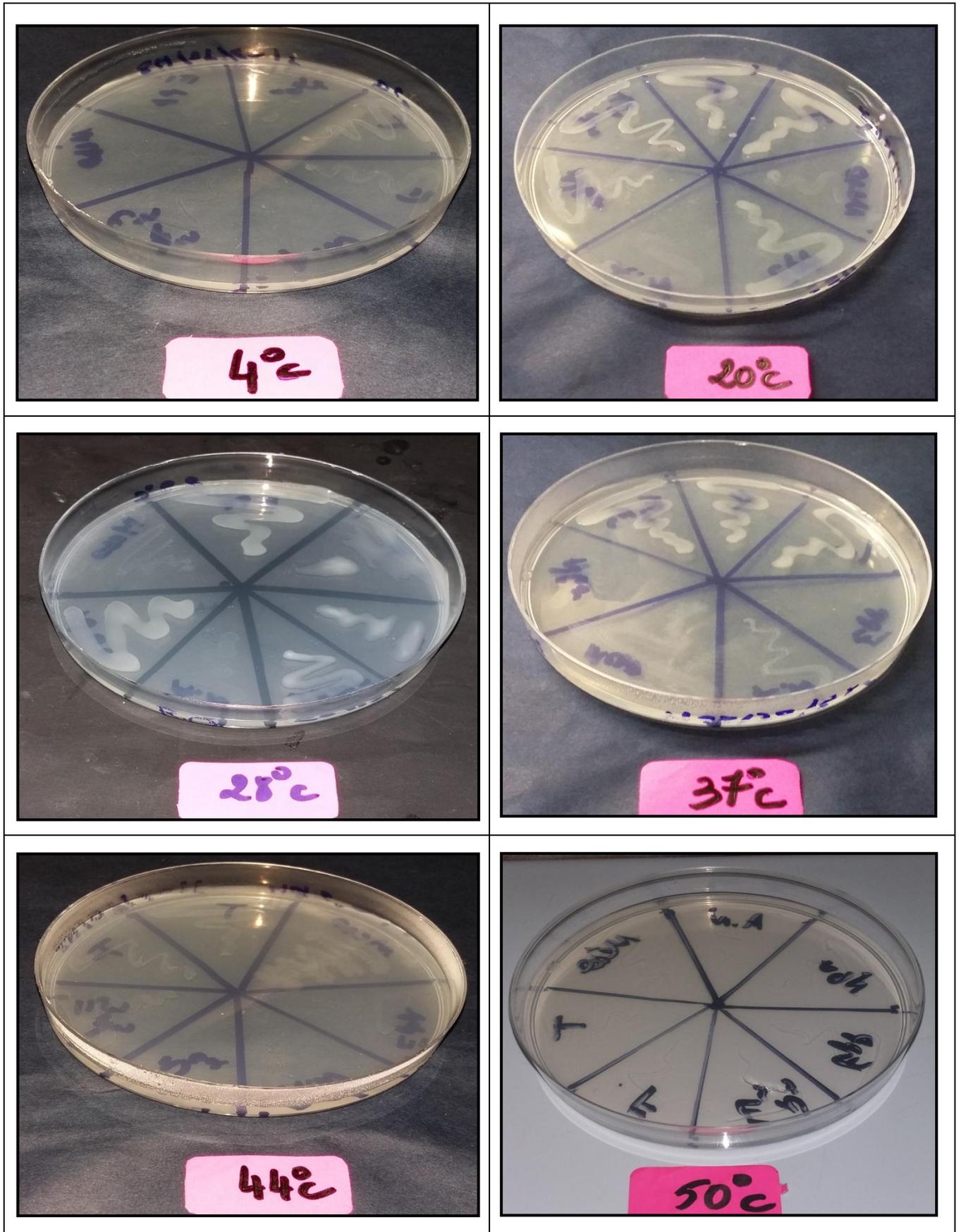


Figure 17 : Test de culture sur différentes températures

Discussion générale

Nous avons procédé dans ce travail à une caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse fourragère *Hedysarum pallidum* Desf., à partir du site de Boutaleb (Setif).

Cette recherche a pour but de déceler d'une part les caractéristiques des souches et leurs diversités, et d'une autre part la détermination de la position taxonomique des isolats.

Notre étude a porté sur quatre isolats en présence de trois souches de référence qui sont déjà caractérisées du point de vue phénotypique et phylogénétique; Méso: *Mesorhizobium* sp, F: *Rhizobium sulae* RHF et T : *Rhizobium bv trifolii*.

En effet, les aspects microscopiques et morphologiques des colonies des souches étudiées sont en accord avec la description faite par les auteurs (Vincent, 1970., Somasegaran et Hoben, 1994., Jordan, 1984). Notre étude microscopique montre des bacilles de différentes tailles ainsi que des coccobacilles à Gram négatif ; ces aspects sont observés par ailleurs avec les souches de référence utilisées dans nos expérimentations.

Ce résultat est confirmé par la vitesse de croissance des isolats qui est rapide (obtenue en 24 heures sur milieu YMA+BTB); ce qui peut nous orienter vers le genre *Rhizobium*.

L'examen biochimique révèle l'absence de la nitrate réductase chez l'isolat E₃N₃, de l'activité uréolytique chez A.N et de l'activité cellulolique chez la Mèso. Donc, la majorité des isolats possèdent les enzymes spécifiques au processus d'infection avec les souches de référence, ce qui les englobe dans le groupe des bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L). Toutefois la présence de pectinase chez nos isolats n'a pas été recherchée par manque de réactifs spécifiques, dans la mesure où sa présence confirme l'aspect infectif des isolats.

Le test nutritionnel dévoile que les isolats et les souches de référence ont tendance à utiliser une large gamme de carbohydrates comme source de carbone. Cependant, le degré diffère d'une souche à une autre.

Il apparait aussi que les souches peuvent croître à des températures élevées atteignant les 44°C qui leur confèrent la propriété des bactéries thermo-tolérantes.

A travers ces résultats, nous pouvons admettre que nos isolats possèdent un profil de bactéries nodulant les légumineuses (Zakhia et de Ladjudie, 2001., Benhizia et *al.*, 2004), ou de rhizobia (Vincent, 1970., 1982). Par conséquent, nous n'avons pas pu ressortir une distinction appréciable afin de confirmer que nos isolats appartiennent au genre *Rhizobium* ou B.N.L à cause de l'absence de l'examen génotypique basé sur les techniques moléculaires.

Références
bibliographiques

-A-

Abdelguerfi – Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N., Guittonneau G.G., 1988. Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* en Algérie. III Dénombrement chromosomique chez 29 populations de huit (8) espèces . Ann. Int. Nat. Agro. EL-Harrach. Vol.12 (1) : 233 - 247.

Abdelguerfi-Berrekia R., 1985. Contribution à l'étude du genre *Hedysarum L.*, en Algérie. Thèse de Magister, option phytotechnie. I. N. A. 131 p.

Abdelkrim H., 1984. Approche phytoécologique et phytosociologique de quelques nappes alfatières des régions de Djelfa et Tebbessa. Thèse de Magister. INA. Alger, pp. 1 - 19.

-B-

Baldani J. I. and Baldani V. L. D., 2005. History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: spezial emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Brass. Sci. 77: 549 - 579.

Beaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R., 2004. Legume seed inoculation technology. Soil Biology & Biochemistry 36:1275-1288.

Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993. Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA, Syria.

Beijerinck M., 1888. Die Bacterien der papilionaceenknollchen. *Botanische Zeitung.* 46: 797-804.

Bélangier E., 1998. Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium sp.* (*Oxytropis Arctobla*) souche N33. Mémoire pour l' obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.

Benguedouar A., 2000. Etude de la symbiose : *Rhizobium – Hedysarum coronarium*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie.

Benhizia H., 2001. Etude caryologique d'une espèce endémique Nord-africaine, *Hedysarum pallidum* Desf, provenant d'un milieu contaminé par l'antimoine. Thèse de magister en Biologie Végétale. Université de Constantine, Algérie.

Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A., 2004. Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System. Appl. Microbiol.* 27 : 462 - 468.

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

Berrada. H et Benrahim. K., 2014. Taxonomy of the rhizobia. Current perspectives. *British Microbiology research journal* 4 (6) : 616 - 639.

Bovin C., Giraud E., L.R., Malpica C.A., and Rosenberg C., 1997. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite presente in legumes. *Journal of Bacteriology.* 173(9) :2809 – 2817.

-C-

Campbell N.A., Reece J.B., 2004. *Biologie.* 2ème Edition de boeck, Quebec.

Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., DeVos 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.

-D-

De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewetting D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kesters K., and Gills M , 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. Nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 :715 - 733.

Dénarié J., Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.

Dreyfus B., Garcia, J.L., and Gils M., 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen.sp. nov., a stem nodulation fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int.J. syst. Bacterial. 38(1) : 89 – 98.

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

-F-

Frank, B., 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Dtsc. Bot. Ges. 7 pp 332 - 346.

-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.

-J-

Jarvis B.D.W, Mc lean T.S, Robertson I.G.C et Fanning G.R., 1977. Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. New Zealand J. Agric. Res. 20: 4 - 52.

Jordan D.C., 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams & Wlikins Co. Baltimore. p. 234 - 254.

-L-

Laranjo M. C. Branco., R. Soares., L. Alho., M.D.E. Carvalho., S. Oliveira., 2002. Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations

based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. Journal of Applied Microbiology. Volume 92 Issue 6 Page 1043.

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

-M-

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

Madigan M., Martink J., 2007. Brock Biologie des microorganismes 11^e édition. Edition Person Education France. pp 599 - 601, 676 - 681.

Moschetii G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., Defez R., 2005. Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nod C* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarium* biovar *viciae*. Systematic and applied Microbiology. 28: 619-631.

Moulin L., Munve A., Dreyfus B., Boivin-Masson C., 2001. Nodulation of legumes by members of β sub class of proteobacteria. Nature. 441 :948 - 950.

-N-

Ndiaye A. A., 1996. Diversité et fixation d'azote des *rhizobiums* d'Acacia. Dakar, Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Cheikh Anta Diop.: 43.

Noel., 2009. Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'angole (caganus cajan I) à Yamoussoukrou (centre de la Cote d'Ivoire).

-P-

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

Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* 234: 201 - 62.

Patrícia P. Pinto., R. Raposeiras., A.M. Macedo., L. Seldin., E. Paiv., NadM .H .Sá., 1998. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. *Revista de Microbiologie.* Print ISSN 0001.

Pelmont J., 1995. Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2: 541 -572.

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

Perret X., Staehe Lin C., and Selander, R.K., 2000. Molecular basis of symbiostic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 : 180 - 201.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004. Microliologie. Edition Dunod, Paris.

Pomel N.A., 1874. Nouveaux matériaux pour la flore atlantique. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique du Nord.* 19 : 48-128.

-Q-

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

-R-

Raposeiras R., P. P. Patrícia., V.M. P Raul., S. Lucy., E. Paiva., M. R. Scotti., N. M. H. Sá., 2002. Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. *Brazilian Journal of Microbiology.* Print ISSN 1517 - 8382.

-S-

Saadallah K., Drevon J-J., Abdelly C., 2001. Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21: 627-634.

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc .pp 450.

-T-

Tan Z.Y., K El., Peng G.X., Wang E.T., Reinhold-Hurek, B. and Chen W.X. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in china. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 909-914.

Torche A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie.

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

-V-

Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

-W-

Wei G.H., Zhang Z.X., Chen C., Chen W. M et Ju W.T., 2008. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. Microbiol.Research. 163: 651 - 662.

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

-Z-

Zahran H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. J Biotechnol. 91(2-3): 143-153.

Zakhia F., De Lajudie P., 2001. Taxonomy of rhizobia Agronomie. 21 : 569 - 576.

Annexes

Annexe1

Milieux de culture et solutions utilisés

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

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
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	1000ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	18
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	5ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage 120°C pendant 20minutes	

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 GPA (Glucose Peptone Agar) + Pourpre de Bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes	

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

Composition de milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) en g/l (Beringer, 1974)

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0.87
Eau distillée	1000ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Les solutions stocks colorants

- Solution stock de RC : 0.25g de Rouge Congo dissous dans 100ml d'eau distillée.
- Solution stock de BCP : 1g de BCP dissous dans 100ml d'éthanol.
- Solution stock de BTB : 0.5g de BTB dissous dans 100ml d'éthanol.