



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

قسنطينة منتوري الاخوة جامعة
الحياة و الطبيعة علوم كلية

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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 :

**Mise en évidence des BNL de la légumineuse fourragère
Hedysarum spinosissimum L. poussant dans la région de
Constantine (Ain El Bey)**

Présenté et soutenu par : *LABII Ikram*

Le : 18/06/2018

MECHATI Wissem

Jury d'évaluation

Président du jury : *RIAH Nassira* (Maitre de conférence- UFM Constantine).

Rapporteur : *BENHIZIA Yacine Prénom* (Professeur- UFM Constantine).

Examineurs : *CHABI Rbeh* (Maitre-assistant - UFM Constantine).

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciement

La construction de ce mémoire n'aurait été possible sans l'intervention de certaines personnes. Qu'elles trouvent ici l'expression de notre plus sincère remerciement pour leurs précieux conseils.

Nous tenons d'abords 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 et qui nous a beaucoup aidé.

On remercie également madame RIAH Nassira pour ses conseils sans les quels ce mémoire n'aurait pu voir le jour ainsi que madame GUERGOURI Ibtissem qui nous a était d'une grande aide.

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

On tient également à remercier Mr CHABI Rabeh pour avoir toujours répondu présent lorsqu'on était dans le besoin et pour avoir pris le temps de juger notre modeste travail.

Merci à tous nos collègues du laboratoire d'Ecologie Microbienne promo 2017/2018 pour leur soutien matériel et moral.

Dédicace

A ma famille,

A mes frères et sœur

Merci à mes parents Sakina et Ahmed , pour m'avoir donné le gout des études, pour m'avoir encouragé, et donné cette exigence de moi-même indispensable dans le milieu scientifique.

Merci à mon grand frère Salah et ma grande sœur Sara d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir toujours soutenue.

Je tiens aussi à remercier ma cousine Yousra d'avoir toujours su comment me remonter le morale.

Merci à mes copines Maroua,Imen ,Sarah,Rania,Hania et Nour

Et à tous mes amis et camarades mes cousins et cousines qui m'ont apporté beaucoup de soutiens et d'encouragement.

Je dédier ce travail a tous les miens qui ont franchi le cap de l'éternité.

Que la terre leur soit légère.

A mon frère décédé le 15 octobre tu resteras toujours gravé dans mon cœur, je demande à tous ceux qui feront connaissance avec cette lecture de bien vouloir prier pour le repos de son âme.

L.Ikram

Dédicace

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents Karim et Wassila, Qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.

A ma mère qui m'a encourager durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu. Qu'elle trouve ici mon amour et mon affection.

A mon père, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

A mes très chères sœurs Maria et Hadil.

A mon frère Aymen Zakaria.

M. Wissem

Résumé :

Ce travail a été réalisé sur quatre isolats bactériens isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Hedysarum spinosissimum* L. récoltée du haut plateau d'Ain El Bey à la périphérie de la ville de Constantine, dans le but d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique existante des endophytes.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique qui nous a permis d'obtenir des colonies homogènes d'une forme circulaire, un contour régulier et 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 spinosissimum* L, caractérisation, Gram, isolats.

Summary:

This work was carried out on four bacterial strains isolated from root nodules of the legume *Hedysarum spinosissimum* L. Widespread in Ain El Bey on the outskirts of Constantine, there for to assess and characterize the existing phenotypic diversity for endophytic.

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 spinosissimum* L, characterization, Gram, isolates.

ملخص:

أجريت هذه الدراسة على بكتريا معزولة من العقد الجذرية للبقوليات *Hedysarum spinosissimum* L. المتواجدة على مستوى عين الباي ضواحي مدينة قسنطينة من أجل تقييم و تمييز التنوع الظاهري لدى الكائنات الدقيقة المتواجدة داخل النباتات.

التوصيف الظاهري للسلاطات سمح لنا بتكوين مستعمرات متجانسة ذات شكل دائر، عصابات ذات Gram سلبى يليها توصيف ظاهري يشمل اختبارات غذائية، بيوكيميائية و اختبارات فيزيولوجية.

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

الكلمات المفتاحية: *Hedysarum spinosissimum* L. ,توصيف ,Gram, العزلات.

Table des matières

Introduction.....	1
--------------------------	----------

CHAPITRE 1 : Étude Bibliographique

Table des matières

1. LES LEGUMINEUSES	3
1.1. GENERALITE	3
1.2. CLASSIFICATION	3
1.2.1. <i>Les caesalpinoideae</i>	3
1.2.2. <i>Les Mimosoideae</i>	3
1.2.3. <i>Les Papilionoideae</i>	4
1.3. LE GENRE <i>HEDYSARUM</i>	5
1.4. PRESENTATION DE L'ESPECE <i>HEDYSARUM SPINOSISSIMUM</i> L	5
1.4.1. <i>Description botanique de l'espèce</i>	5
1.4.2. <i>Ecologie</i>	6
1.4.3. <i>Classification</i>	6
2. RHIZOBIUM : LES BACTERIES NODULANT LES LEGUMINEUSES (B.N.L).....	7
2.1. DIVERSITE ET TAXONOMIE	7
2.2. CARACTERISATION DES BNL	12
2.2.1. <i>Les caractères morphologiques</i>	12
2.2.2. <i>Les caractères biochimiques</i>	12
2.2.3. <i>Les caractères physiologiques</i>	13
2.2.4. <i>Les caractères cultureux</i>	13
2.2.5. <i>Les caractères génétiques</i>	13
2.3. COEXISTENCE DES BACTERIES AVEC DES RHIZOBIA DANS LES NODULES DES LEGUMINEUSES	14
3. METHODES D'ETUDES DE LA BIODIVERSITE DES RHIZOBIA	15
3.1. LES METHODES PHENOTYPIQUES	15
3.1.1. <i>La composition des parois cellulaires</i>	15
3.1.2. <i>FAME « faty acid methyl ester ou analyse des acides gras cellulaires »</i>	15
3.1.3. <i>SDS-PAGE « sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel électrophorèses analyse des protéines cellulaires totales »</i>	16
3.1.4. <i>MLEE (Multilocus Enzyme Electrophorèses)</i>	16
3.2. METHODES GENOTYPIQUES	16
3.2.1. <i>Le pourcentage en nucléotides G+C</i>	16
3.2.2. <i>Les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)</i>	16
3.2.3. <i>Le séquençage de l'ARN 16s</i>	17
4. INTERACTION ET SPECIFICITE ENTRE LEGUMINEUSES / BACTERIES	17

5. LA NODULATION :	17
5.1. LE NODULE	17
5.2. LES ETAPES DE LA NODULATION	17
5.2.1. Pré- échange de signal d'infection	18
5.2.2. L'infection	19
5.2.3. Développement du nodule et la maturation des bacteroides	19

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DES NODULES	20
1.1. COLLECTE DES NODULES	20
1.2. CONSERVATION DES NODULES	21
1.3. ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DES NODULES	22
1.3.1. Stérilisation des nodules	22
1.3.2. Test de stérilisation	22
1.3.3. Isolement selon la méthode des nodules écrasés	22
2. CARACTERES MORPHOLOGIQUE ET CULTURAUX	23
2.1. LES MILIEUX UTILISES	23
2.2. PURIFICATION DES ISOLATS	23
2.3. EXAMEN MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE DES ISOLATS	24
3. CARACTERISTIQUES METABOLIQUES DES ISOLATS	24
3.1. VITESSE DE CROISSANCE	24
3.2. TESTS NUTRITIONNELS	24
3.2.1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone	24
3.2.2. Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote	24
3.3. TESTS BIOCHIMIQUES (RECHERCHE DE CERTAINS ENZYMES)	25
3.3.1. Réduction des nitrates	25
3.3.2. Hydrolyse de l'urée	25
3.3.3. Activité cellulolytique	25
3.4. TESTS PHYSIOLOGIQUES : (FACTEUR INTRINSEQUES)	26
3.4.1. Tolérance au NaCl	26
3.4.2. Effet de la température	26
3.4.3. Effet de pH	26

Chapitre 3: Résultats et discussion

1. TEST DE STERILISATION	27
2. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET CULTURAUX	27
2.1. CROISSANCE SUR YMA	27
2.2. CROISSANCE SUR YMA+ RC	28
2.3. ASPECT MICROSCOPIQUE	28
3. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS	30

3.1.	LA VITESSE DE CROISSANCE.....	30
3.2.	TESTS NUTRITIONNELS	31
3.2.1.	<i>Assimilation de la source de carbone</i>	31
3.2.2.	<i>Assimilation de la source d'azote</i>	32
3.3.	TESTS BIOCHIMIQUES (RECHERCHE DES ENZYMES SPECIFIQUES)	33
3.3.1.	<i>Réduction des nitrates</i>	33
3.3.2.	<i>Recherche de l'urèase</i>	34
3.3.3.	<i>Activité cellulosique</i>	35
3.4.	TESTS PHYSIOLOGIQUES	36
3.4.1.	<i>Effet de température</i>	36
3.4.2.	<i>Effet de NaCl</i>	38
3.4.3.	<i>Effet de PH</i>	39
	Conclusion	40
	Références bibliographiques	41
	Annexes	

Liste des Figures

Figure 1 la représentation des légumineuses d'après l'analyse des séquences du gène chloroplastique <i>rbcl</i> (Dyole et <i>al.</i> ,1998).....	4
Figure 2 (a) <i>Hedysarum spinosissimum</i> L; (b) Graines (Torche,2006).....	6
Figure 3 Classification d' <i>Hedysarum spinosissimum</i>	6
Figure 4 Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).....	18
Figure 5 Collecte des nodules au niveau du laboratoire.....	20
Figure 6 Conservation des nodules sous CaCl_2	21
Figure 7 Ensemencement par la technique des quatre cadrans	23
Figure 8 Test de stérilisation des nodules de l'espèce <i>H.spinosissimum</i>	27
Figure 9 Caractères cultureux et microscopiques des isolats b. Croissance sur YMA+RC ; c. Coloration de Gram; a. Croissance sur YMA.....	29
Figure 10 Croissance sur milieu YMA+BTB.....	30
Figure 11 Utilisation de saccharose par nos 4 isolats.....	32
Figure 12 Utilisation de Phénylalanine par nos 4 isolats.....	33
Figure 13 Réduction des nitrates.....	34
Figure 14 Test de l'uréase.....	35
Figure 15 Activité cellulosique des isolats.....	36
Figure 16 Test de culture sur différentes températures.....	37
Figure 17 Effet du NaCl sur la croissance des isolats.....	38
Figure 18 Effet du pH sur la croissance des isolats.....	39

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification actuelle des <i>Rhizobium</i> (Weir, 2016).....	9
Tableau 2	Utilisation des sucres comme source de carbone par les 4 isolats testés.....	31
Tableau 3	Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les 4 isolats testés.....	32

Introduction

Chez les végétaux supérieurs, l'acquisition des minéraux à partir du sol est d'une importance majeure et la carence en ces éléments constitue une limite à leur développement. Certains végétaux ont acquis au cours de l'évolution la capacité d'établir des associations symbiotiques avec des micro-organismes du sol dans le but d'améliorer l'acquisition des nutriments. Certaines de ses associations se forment à l'intérieur des cellules de la racine de l'hôte végétal et sont appelées endosymbioses racinaires.

La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, renferme trois sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* ; la majorité des espèces nodulées se rencontrent dans la sous famille des *Papilionoideae*. Le genre *Hedysarum* est un parmi les plus répandu dans le monde ; plusieurs espèces sont rencontrées en Algérie dont certaines sont endémiques (*Hedysarum naudinianum*, *Hedysarum perrauderianum*).

Les rhizobia, deuxième élément de l'association, sont des bactéries du sol capable d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités, au sein des quels ils réduisent l'azote de l'air. Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte.

Auparavant le groupe des bactéries qui colonisent les racines des légumineuses n'était composé que d'Alphaproteobacteria, mais récemment deux souches de Betaproteobacteria 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 Gammaproteobacteria ont été désignées comme des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia et al., 2004).

La majorité des études ont été portées sur des espèces cultivées de légumineuses en revanches y'avait peu d'attention consacré aux symbiotes des nodosités des racines des légumineuses sauvages, c'est à dire ceux qui ne nécessitent pas l'intervention de l'action humaine (Muresu et al., 2008)

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

- Isolement des bactéries à partir des nodules.
- Etude morphologique et microscopique.
- Caractérisation phénotypique des isolats.

Chapitre 1 :
Etude
Bibliographique

1. Les légumineuses

1.1. Généralité

Une des plus importantes familles parmi les dicotylédones c'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soit alimentaires, industrielles, ou médicinales comprenant des plantes herbacées, des arbres ou des arbustes, ou des lianes, à feuilles habituellement composées, souvent trifoliolées rarement simples, généralement avec des stipules. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles. Les fleurs, pentamères avec 10 étamines, ou parfois plus caractéristiques, ressemblent à des papillons. Fruits en gousse uniloculaire s'ouvrant en deux valves séparées et contenant de nombreuses graines (Fernand et Wathman, 1967)

1.2. Classification

Les plantes de la superfamille des légumineuses ou leguminosae sont très nombreuses (entre 16000 et 19000) très diversifiées au plan taxonomique avec 3 familles (Caesalpinioideae, Mimosoideae et Papilionoideae) (**Figure 1**), Elles comprennent des espèces annuelles et ligneuses qui colonisent des écosystèmes variés ayant des régions circumboréales jusqu'à l'équateur. Toutes les espèces appartenant aux légumineuses ne sont pas nodulées. Environ 20% des papilionoideae (soit 3400 espèces) ont été testées pour leur aptitude à noduler. Le pourcentage des familles examinées capable de noduler se répartit de la façon suivante :

Papilionoideae (97%), Mimosoideae (90%) et Caesalpinioideae (23%) (Michel et Emile, 2004)

1.2.1. Les caesalpinioideae

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles de l'extérieur (Judd et *al.*, 2001).

1.2.2. Les Mimosoideae

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd et *al.*, 2001).

1.2.3. Les Papilionoideae

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « Papillon » (Guignard et Dupont, 2005). La sous famille monophyletique des papilionoideae renferme plus des deux tiers des espèces et inclus presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995). Elle est cosmopolite et comporte 12000 espèces réparties en 429 genres (Young et al., 2003). Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd et al., 2001).

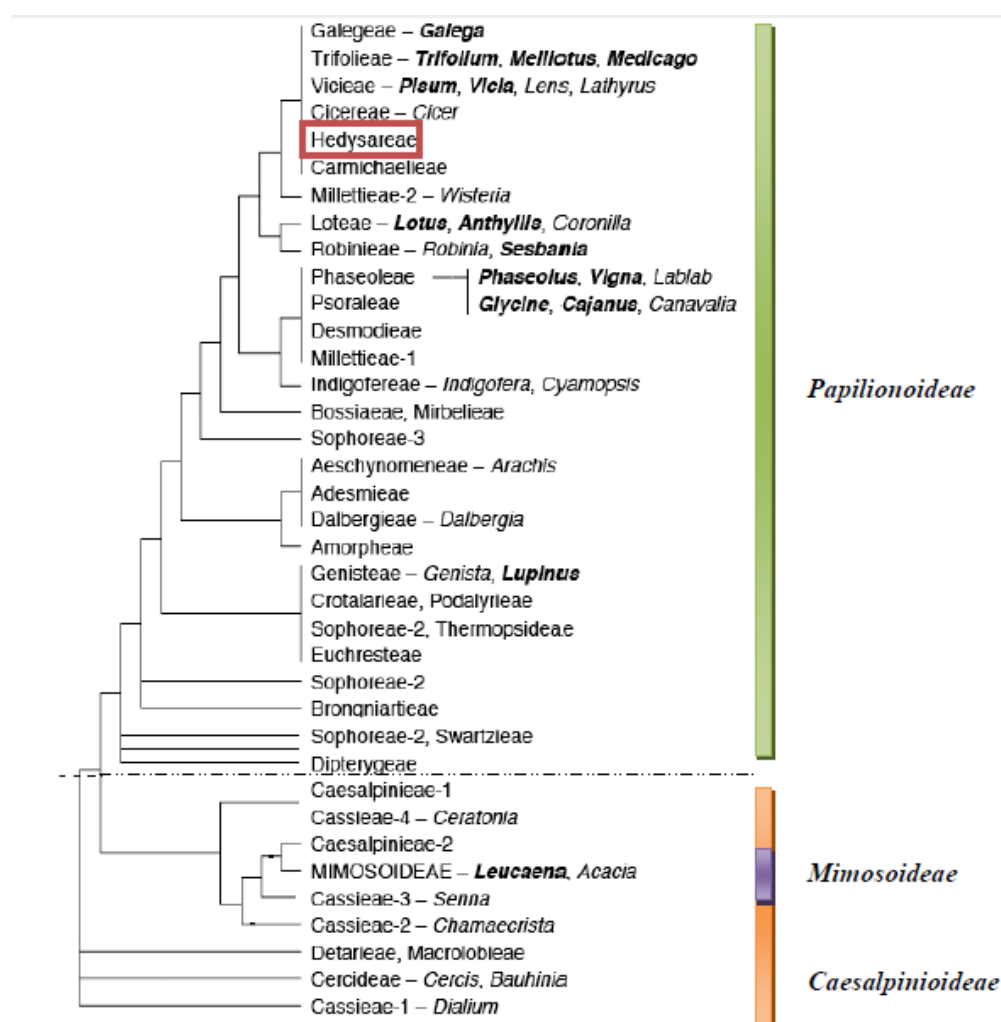


Figure 1 : la représentation des légumineuses d'après l'analyse des séquences du gène chloroplastique *rbcl* (Dyole et al., 1998).

1.3. Le Genre *Hedysarum*

Hedysarum vient du mot grec Hedys, qui signifie fourrage doux a brouter (Bonnier, 1934). Le genre *Hedysarum* appartient à la sous famille des Papilionaceae qui sont très répandue dans le monde, pousse sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, et présente ainsi une grande diversité.

Les plantes du genre *Hedysarum* ont un appareil souterrain robuste avec des nodules fixatrices d'azote, ses espèces sont au nombre de neuf, Dont plusieurs sont endémiques comme *H.naudinianum* Coss. et *H. perrauderianum* Coss. qui ne se développent qu'en Algérie. *H.carnosum* Desf., et *H.pallidum* Desf ., sont endémique de l'Afrique du nord.

1.4. Présentation de l'espèce *Hedysarum spinosissimum* L.

C'est une espèce méditerranéenne annuelle polymorphe. Présente des inflorescences en tête dense (même à la fructification) et atteignant au plus 2 cm de long.

Elle se caractérise par des folioles glabrescentes, souvent plus ou moins alternes dans la portion inférieure de la feuille. Elle pousse sur des sols salés a très salés et caillouteux. La sous espèce *H.spinossissimum* subsp *capitatum*. à allogamie prépondérante, présente des fleurs de 15-20mm et de couleur purpurine ou blanchâtre (Quezel et Santa, 1962).

1.4.1. Description botanique de l'espèce

Plante annuelle de 5-40 cm, velue blanchâtre, couchée ou ascendante et a racine grêle. Les feuilles sont petites 5 à 8 paires de folioles ovales ou linéaires, tronquée ou échancrées, mucronées, pubescentes en dessous. Les stipules libres et lancéolées-acuminées.

Elle présente des fleurs roses, assez grandes (8-12 mm) et rapprochées en grappes très courtes. Umbelliformes, sur des pédoncules plus longs que la feuille. Les pédicelles plus courts que le tube du calice. Le calice a gorge coupée transversalement, a dent plus longues que le tube. L'étendard plus long que les ailes et dépassant un peu la carène :

Les gousses sont formées de 2 à 4 articles arrondis, hérissées d'aiguillons crochus, velus et a bords non ailés. Les graines sont luisantes (Tela Botanica, 2001). (**Figure 2**).



(a)



(b)

Figure 2 : (a) *Hedysarum spinosissimum* L; (b) Graines (Torche,2006).

1.4.2. Ecologie

H. spinosissimum Semble préférer les altitudes élevées et les pluviométries faibles à moyennes. En Algérie, cette espèce rare se rencontre sur la steppe, sur les Hauts Plateaux, dans le Sahara septentrional (Quezel et Santa, 1962), et d'une façon générale, dans les régions pré désertiques (Ozenda, 1977). Pouget (1980) La mentionne dans les milieux steppiques Sud-Algérois.

1.4.3. Classification

Domaine : Biota

Règne : Plantae Haeckel, 1866

Sous-Règne : Viridaeplantae

Infra-Règne : Streptophyta John, Williamson & Guiry, 2011

Classe : Equisetopsida C.Agardh, 1825

Cladus : Tracheophyta Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998

Cladus : Spermatophyta

Sous-Classe : Magnoliidae Novák ex Takht., 1967

Super-Ordre : Rosanae Takht., 1967

Ordre : Fabales Bromhead, 1838

Famille : Fabaceae Lindl., 1836

Sous-Famille : Papilionoideae DC., 1825

Super-Tribu : Robinioids

Genre : *Hedysarum* L., 1753

Espèce : *Hedysarum spinosissimum* L., 1753

Figure 3 : Classification d'*Hesysarum spinosissimum* L.

2. Rhizobium : les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L)

2.1. Diversité et taxonomie

Le premier isolement de bactéries à partir des nodules de sulla remonte au 19^{ème} siècle (Mottareale, 1898).

« Rhizobia » est un terme qui désigne toutes les bactéries du sol aptes à former des nodules sur des légumineuses, au niveau des nodules se fait la fixation d'azote, qui est considérée comme une des conséquences de la symbiose, Il est devenu préférentielle d'utiliser le terme « BNL » au lieu de « Rhizobia » car ce dernier est dérivé du genre *Rhizobium*, Tant dis que l'existence d'autres bactéries connues pour leur capacité symbiotique et appartenant à différents genres et classe taxonomique a était démontrer (Zakhia et *al.*, 2004). 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 (Zakhia et de Lajudie 2001; Moulin et *al.*, 2001; Chen et *al.*, 2001; Ngom et *al.*, 2004).

Les BNL peuvent être présentes dans les plantes non légumineuses en tant qu'endophytes (Ueda et *al.*, 1995 ; Engelhard et *al.*, 2000) . Elles peuvent aussi avoir un rôle dans le développement des plantes (PGPR) (Reinhold-Hurek et *al.*, 1993 ; Riggs et *al.*, 2001; Coenye et *al.*, 2003).

L'identification des bactéries est une opération délicate mais importante. Ceci revient au peu de critères phénotypiques existants. Différents schémas de classification ont existé mais le plus important était le Manuel de Bergey's qui était basé sur l'observation microscopique et les tests biochimiques (Krieg et Holt, 1984).

La taxonomie bactérienne a ensuite connue un développement immense par le biais des méthodes de typages moléculaires qui a permis d'évaluer les relations phylogénétique entre les microorganismes.

Balwin et Fred (1929) ont montré que la classification des différents *Rhizobium* devrait être basée sur la spécificité de l'espèce bactérienne envers la plante hôte. Et c'est qu'en 1932 que 6 groupes de nodulation croisée ont étaient identifier par Fred et *al.*,

Rhizobium leguminosarum pour *Pisum*, *Vicia*, *Lens*, *Lathyrus*, *Rhizobium phaseoli* pour Espèces tempérées de *Phaseolus*, *Rhizobium trifolii* pour *Trifolium*, *Rhizobium meliloti* pour *Medicago*, *Melilotus*, *Trigonella*, *Rhizobium japonicum* pour *Glycine max*, *Rhizobium lupine* pour *Lupinus*, *Ornithopus* (Wilson, 1944).

Dans le « *manual of determinative bacteriology* » de Bergey les Rhizobia ont été reclassés en deux genres :

- Le genre *Rhizobium* qui comporte les souches à croissance rapide (temps de génération : 2 à 4 heures), mobile par plusieurs flagelles, acidifiant certains milieux.
- Le genre *Bradyrhizobium* qui comporte les souches à croissance lente (temps de génération supérieur à 6 heures), mobile par un seul flagelle, alcalinisant certains milieux.

Après y avait eu l'addition d'un nouveau genre *Azorhizobium* qui regroupe les souches susceptibles de former des nodules sur les tiges et racines et de fixer l'azote en culture pure (Neyra, 1992).

La classification des BNL est constamment remise en question (Vandamme et *al.*, 1996 ; Stackebrandt et *al.*, 2002).

Pour décrire une nouvelle espèce de Rhizobia il faut passer par l'analyse génétique et l'analyse numérique (Graham et *al.*, 1991 ; Zakhia et de Lajudie 2006).

Selon le Bergey's Manuel (Jordan, 1984) les rhizobia appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Gracilicutes, au domaine des Bacteria, à l'embranchement des Proteobacteria, à la classe Alpha, à l'ordre Rhizobiales et à la famille Rhizobiaceae.

Tableau 1 : Classification actuelle des *Rhizobium* (Weir, 2016).

Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i>		
Genres	Espèces	Source d'isolement
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>Symbiovarviciae</i> <i>Symbiovartrifolii</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>R. galegae</i> <i>Symbiovarofficinalis</i> <i>Symbiovarorientalis</i> <i>R. tropici</i> <i>R. leucaenae</i> <i>R. tropici</i> <i>R. endophyticum</i> <i>R. phaseoli</i> <i>R. fabae</i> <i>R. etli</i> <i>Symbiovarmimosae</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>R. undicola</i> <i>R. gallicum</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>Symbiovargallicum</i> <i>R. giardinii</i> <i>Symbiovarphaseoli</i> <i>Symbiovargiardinii</i> <i>R. hainanensis</i> <i>R. huautlense</i> <i>R. mongolense</i> <i>R. yanglingense</i> <i>R. larrymoorei</i> <i>R. indigoferae</i> <i>R. sullae</i> <i>R. loessense</i> <i>R. cellulosityticum</i> <i>R. miluonense</i> <i>R. multihospitium</i> <i>R. oryzae</i> <i>R. pisi</i> <i>R. mesosinicum</i> <i>R. alamii</i> <i>R. alkalisoli</i> <i>R. tibeticum</i> <i>R. tubonense</i> <i>R. halophytocola</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Galega, Leucaena</i> <i>Galegaorientalis</i> <i>Galegaofficinalis</i> <i>Phaseolus, Medicago,</i> <i>Macroptilium</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus</i> <i>Vicia faba</i> <i>Phaseolus</i> <i>Mimosa affinis</i> <i>Phaseolus</i> <i>Neptunianatans</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Desmodiumsinuatum, Centrosema.</i> <i>Sesbania herbacea</i> <i>Medicagoruthenica, Phaseolus</i> <i>Amphicarpaea</i> <i>Ficus benjamina</i> <i>Indigoferasp.</i> <i>Hedysarum</i> <i>Astragalus, Lespedeza</i> <i>Populus alba</i> <i>Lespedeza</i> <i>Plusieurs espèces de légumineuses</i> <i>Oryzaalta</i> <i>Pisumsativum</i> <i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i> <i>Arabidopsisthaliana</i> <i>Caraganaintermedia</i> <i>Trigonella archiducis-nicolai</i> <i>Oxytropisglabra</i> <i>usine de dunes côtières</i>

	<i>R. radiobacter</i> <i>R. rhizogenes</i> <i>R. rubi</i> <i>R. vitis</i> <i>R. nepotum</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>E. meliloti</i> <i>E. fredii</i> <i>Symbiovarfredii</i> <i>Symbiovarsiensis</i> <i>E. sahelense</i> <i>E. terangaie</i> <i>Symbiovaracaciae</i> <i>Symbiovar sesbania</i> <i>E. medicae</i> <i>E. arboris</i> <i>E. kostiense</i> <i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobiumxingianense</i>) <i>E. adhaerens</i> <i>E. kummerowiae</i> <i>E. americanum</i> <i>E. mexicanus</i> <i>E. numidicus</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i> <i>Glycine, Vigna, Cajanus</i> <i>Glycine</i> <i>Acacia, Prosopis, Neptunia,</i> <i>Leucaena</i> <i>les plantes hôtes différentes</i> <i>Acacia</i> <i>Sesbania</i> <i>Medicago truncatula, Melilotus</i> <i>Acacia, Prosopis</i> <i>Acacia, Prosopis</i> <i>Glycine max</i> <i>Kummerowia stipulaceae</i> <i>Acacia</i> <i>Acacia angustissima</i> <i>Medicago sativa</i>
<i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
<i>Famille: Phyllobacteriaceae</i>		
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. tianshanense</i> <i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarum</i> <i>M. amorphae</i> <i>M. chacoense</i> <i>M. septentrionale</i> <i>M. temperatum</i> <i>M. thiogangeticum</i> <i>M. albiziae</i> <i>M. caraganae</i> <i>M. gobiense</i> <i>M. tarimense</i> <i>M. australicum</i> <i>M. opportunistum</i> <i>M. metallidurans</i> <i>M. alhagi</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus.</i> <i>Astragalus sinicus</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i> <i>Prosopis.</i> <i>Amorpha fruticosa</i> <i>Prosopis alba</i> <i>Astragalus adsurgens</i> <i>Astragalus adsurgens</i> <i>Albizia kalkora</i> <i>Caraganaspp.</i> <i>Wild legumes</i> <i>Wild legumes</i> <i>Biserrula pelecinus</i> <i>Biserrula pelecinus</i> <i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Alhagi</i>

	<i>M. camelthorni</i> . <i>M. abyssinicae</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i> Différents arbres légumineuses
	<i>M. muleiense</i> <i>M. hawassense</i>	<i>Cicer arietinum</i> Différents arbres légumineuses
	<i>M. qingshengii</i> <i>M. robiniae</i> <i>M. shonense</i>	<i>Astragalus sinicus</i> <i>Robinia pseudoacacia</i> Différents arbres agroforestiers de légumineuses
	<i>M. shangrilense</i> <i>M. silamurunense</i> <i>M. tamadayense</i>	<i>Caragana</i> espèce <i>Astragalus</i> espèce <i>Anagyris latifolia</i> , <i>Lotus berthelotii</i>
<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
Family: <i>Methylobacteriaceae</i>		
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>
<i>Microvirga</i>	<i>M. lupini</i> <i>M. lotononidis</i> <i>M. zambiensis</i>	<i>Lupinus sp</i> hôte légumineuse Different. hôte légumineuse Different
Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i>		
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i> <i>A. dobereinereae</i> <i>A. oxalatophilum</i>	<i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania virgata</i>
<i>Devosia</i>	<i>Devosianeptuniae</i>	<i>Neptunianatans</i>
Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i>		
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningensese</i> <i>B. yuanmingense</i> <i>B. betae</i> <i>B. canariense</i> <i>B. iriomotense</i> <i>B. jicamae</i> <i>B. lablabi</i> <i>B. huanghuaihaiense</i> <i>B. cytisi</i> <i>B. daqingense</i> <i>B. denitrificans</i> <i>B. oligotrophicum</i> <i>B. pachyrhizi</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Lespedeza</i> <i>Betaevulgaris</i> <i>Genistee et Loteae</i> <i>Entada kosshunensis</i> <i>Pachyrhizus erosus</i> <i>Lablab purpureus</i> <i>Glycine max</i> <i>Cytisus villosus</i> <i>Glycine max</i> <i>Aeschynomene</i> <i>Pachyrhizus erosus</i>

Classe: <i>Beta Proeobacteria</i> Ordre: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i>		
<i>Burkholderia</i>	<i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. tuberum</i> <i>B. phymatum</i> <i>B. nodosa</i> <i>B. sabiae</i> <i>B. mimosarum</i> <i>B. rhizoxinica</i> <i>B. diazotrophica</i> <i>B. endofungorum microspores</i> <i>B. heleia</i> <i>B. symbiotica</i>	<i>Vertisol microaggregates</i> <i>Alysicarpus glumaceus</i> <i>Aspalatus carnosus</i> <i>Machaerium lunatum</i> <i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i> <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus microsporus</i> <i>Mimosa spp.</i> <i>Rhizopus</i> <i>Eleocharis dulcis</i> <i>Mimosa spp.</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Aspalatus carnosus</i> , <i>Mimosa sp.</i>

2.2. Caractérisation des BNL

2.1.1. Les caractères morphologiques

Les rhizobia sont des bactéries du sol, Gram négatif aérobies stricte ou bien aérobies anaérobies facultatifs , hétérotrophes et non sporulantes, elles présentent deux formes :

- La forme végétative :

Les Rhizobia sont des bâtonnets de 1,2 à 3 μm de longueur sur 0,5 à 0,9 μm de large, pourvus d'un flagelle polaire, ou de plusieurs flagelles pérित्रiches :

- Les rhizobia pourvus de 2 à 6 flagelles sont caractérisés par une croissance rapide.
- Les rhizobia à un seul flagelle polaire ou subpolaire ont une croissance lente.

- La forme bactéroïde :

Acquise à l'intérieure des nodules avec une forme irrégulière ou régulière et une taille a peu pré dix fois plus grande que celle de la forme végétative.

2.1.2. Les caractères biochimiques

Les rhizobia sont des bactéries chimioorganotrophes, elles utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Les vitamines s'avèrent parfois nécessaire pour la croissance de certaines espèces (Somasegarant et Hoben, 1994).

Les rhizobia à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose. Tandis que la majorité des souches à croissance lente préfèrent le pentose (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.1.3. Les caractères physiologiques

Rhizobia est un micro-organisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible pression en oxygène. Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, précisément 6.8, mais certaines souches peuvent tolérer un milieu acide de pH 4 comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30 °C (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.1.4. Les caractères culturels

Les rhizobia se divisent en deux groupes :

1. Rhizobia à croissance rapide : dans le milieu liquide le trouble apparaît en 2 à 3 jours.
2. Rhizobia à croissance lente : dans le milieu liquide le trouble apparaît en 3 à 5 jours (Somasegaran et Hoben, 1994).

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

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

2.1.5. Les caractères génétiques

L'association symbiotique *Rhizobium*-légumineuse ne peut être comprise que par l'étude des relations entre les propriétés symbiotiques de la bactérie et son matériel génétique.

Il peut y avoir 3 types de réplicons : Un chromosome de taille supérieure à 4 Mb, un mégaplasmide (1 – 2 Mb), un plasmide de taille inférieure à 1 Mb, selon l'espèce (Laranjo et al., 2002).

La souche de *Rhizobium meliloti* possède un mégaplasmide (P_{sym}) qui porte les gènes de nodulation (Nod) et les gènes de fixation d'azote (Fix, Nif), en plus des gènes qui codent

pour des bactériocines et d'autre qui codent pour la production des pigments, la présence de cet mégaplasmide est comptée parmi une des plus importantes caractéristique (Werner,1992 ;Pelmont,1995.,Patricia 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).

2.2. Coexistence des bactéries avec des Rhizobia dans les nodules des Légumineuses

L'accouplement de l'approche visuelle avec la caractérisation moléculaire a permis de reconnaître les bactéries nodulant les légumineuses (Muresu et *al.*, 2008).

Le fait qu'on a pu observer les rhizobia dans les nodules sur le milieu Yeast Manitol Agar, Implique deux probabilités : la première c'est la non transformation de quelques bactéries de forme végétative en bacteroides, et la 2eme c'est la capacité des bacteroides a êtres réanimer (Paau et *al.*, 1980 ;Timmers et *al.*,2000).

Des études ont démontré l'existence de quelques bactéries non rhizobials et qui peuvent noduler certaines légumineuses : des α , β , et γ -*Proteobacteria* , leurs apparition a permis de mettre en évidence l'aspect « non cultivable » des Rhizobia.

En effet il s'avère que chez certaines légumineuses, notamment du genre *Hedysarum*, Les souches de Rhizobia sont associées aux nodules avec d'autres bactéries endophytes (Balachandar et *al.*, 2007, Muresu et *al.*, 2008, et Zakhia et de Lajudie, 2006 Benhizia et *al.*, 2004).

Des examens menés sur 15 espèces sauvages de *Medicago* en Sardaigne ont démontrer l'existence des saprophytes dans les nodules (Brundu et *al.*, 2004)

D'autres analyses en Algérie sur 4 espèces d'*Hedysarum* ont prouver par le biais de la PCR directe du jus des nodules la présence des non Rhizobials, et des « résidents » cultivables des nodules, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* et d'autres, qui produisent une pseudoculture de croissance au lieu des colonies d'isolement, En plus de l'absence du *Rhizobium* (Benhizia et *al.*,2004).

On s'appuyant sur les travaux suivants : L'analyse des oligonucléotides des gènes *nodC* et *nifH* faite par Bontemps et *al.*, (2005) et aussi les travaux de Benhizia et *al.*,(2004) qui consistent à isoler deux bactéries γ -*proteobacteria* à partir de *H. Pallidum* et

H. spinosissimum, conclut aucune détermination génétique (gènes *nod* et *nif*) de nodulation ou de la fixation d'azote, cependant, l'abondance de ces endophytes bactériens au sein des plantes suggère d'autres types d'interaction.

3. Méthodes d'études de la biodiversité des rhizobia

Afin d'évaluer la diversité des rhizobia, les microbiologistes utilisent des techniques phénotypiques et génotypiques.

3.1. Les méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques sont basées sur les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques, sans cibler l'ADN ou l'ARN (Graham *et al.*, 1991).

3.1.1. La composition des parois cellulaires

Cette approche peut servir pour caractériser les bactéries, elle est partout utilisée pour les bactéries à Gram + (Schleifer et Kandler, 1992).

La coloration de Gram nous permet de différencier les bactéries selon la composition de leurs parois cellulaires et sa perméabilité.

Pour analyser les différents polymères de la paroi, il existe d'autres techniques :

- ✓ Chromatographie gaz-liquide : utilisée pour extraire et purifier les acides échoïques (Benguedouar, 2000).
- ✓ Electrophorèses et techniques immunologiques : qui permettent d'analyser les LPS (lipopolysaccharides) qui sont les composants majeurs des bactéries Gram – (Yong et Lin, 1998).

3.1.2. FAME « fatty acid methyl ester ou analyse des acides gras cellulaires »

Une séquence de rupture mécanique des cellules, extraction par solvant à base de liquide, transestérification des acides gras en ester gras méthyliques d'acide (FAME), la quantification et l'identification qui se fait par la chromatographie en phase gazeuse (Breuer *et al.*, 2013).

3.1.3. SDS-PAGE « sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel électrophorèses analyse des protéines cellulaires totales »

C'est une technique de criblage qui permet de distinguer les espèces bactériennes et même des souches au sein d'une espèce ce qui fait son haut pouvoir de discrimination (Ndiaye et *al.*, 2002).

Méthode : rapide, peu couteuse et reproductible (Benguedouar, 2000).

3.1.4. MLEE (Multilocus Enzyme Electrophorèses)

Les profils isoenzymatique issues de l'électrophorèse analysés chez différent rhizobia afin d'estimer la diversité génétique entre les souches a croissances rapide et celle a croissances lente (Young, 1985) et aussi entre les rhizobia de la même espèce (Eardly et *al.*, 1990).

3.2. Méthodes génotypiques

Ces méthodes sont basées sur les acides nucléiques ADN ou ARN, parmi les techniques les plus utilisées chez les rhizobiums :

3.2.1. Le pourcentage en nucléotides G+C

Le taux de GC représente le pourcentage des bases azotées guanine (G) et cytosine(c) chez une espèce (Hordé, 2015).

La variation du taux GC chez les souches d'une même espèce ne doit pas dépasser les 3 %.

La variation du taux GC chez les espèces du même genre ne doit pas être supérieure à 10% (Stackebrandtet Liesack, 1993).

3.2.2. Les AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism)

L'AFLP est l'amplification sélective de fragment de restriction à partir de l'ADN génomique totalement digéré (VOS et *al.*, 1995).

Technique qui permet :

- ✓ Une grande résolution génétique.
- ✓ Plus reproductible (Terefework et *al.*, 2001).

3.2.3. Le séquençage de l'ARN 16s

Technique la plus couramment utilisée qui consiste à faire une amplification puis un séquençage partiel du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16s, qui est très conservé, spécifique, et permet chez toutes les espèces bactériennes, la séquence obtenue par la suite est comparée à une base de donnée (Tristan et *al.*, 2004).

4. Interaction et spécificité entre légumineuses / bactéries

La symbiose- rhizobium 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.

La fixation symbiotique nécessite la présence de leghémoglobine dont la synthèse nécessite la coopération des deux partenaires : La plante procure la protéine tandis que la bactérie produit l'hème (Prellet et Poole, 2006).

5. La nodulation

5.1. Le nodule

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte, au niveau duquel les bactéries se transforment en bactéroïdes fixent l'azote atmosphérique pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactivé par l'oxygène, grâce à des parenchyme nodulaire la plante parvient à maintenir le milieu interne des nodules en condition micro-oxie pendant que la leghémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène indispensable à la respiration (Ott et *al.*, 2005).

5.2. Les étapes de la nodulation

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbionte et la plante hôte (Limpens et Bisseling, 2003). (**Figure 4**)

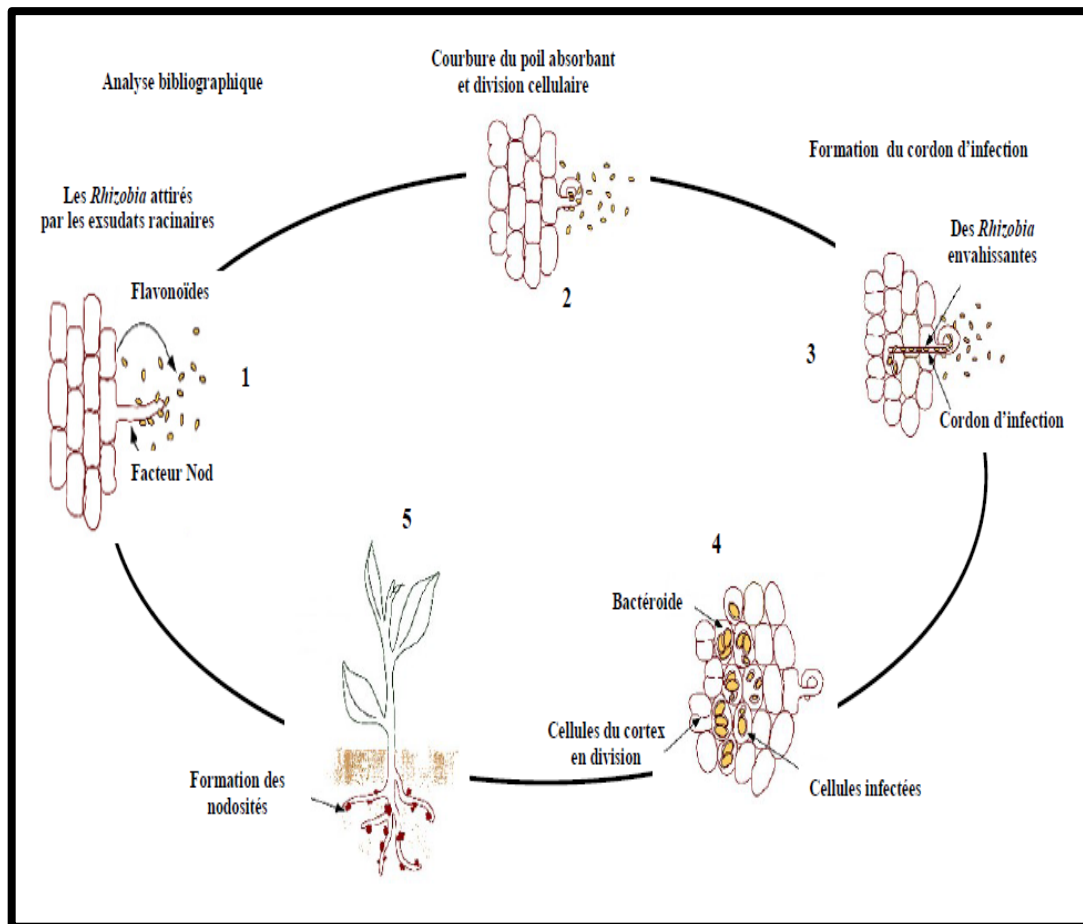


Figure 4 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).

Le processus de nodulation depuis l'infection jusqu'au développement est aujourd'hui bien connu (Madigan *et al.*, 2007) et il se déroule comme suit :

5.2.1. Pré- échange de signal d'infection

Au niveau des racines, la plante produit des flavonoïdes, action déclenchée par une carence en ammonium (NH_4^+).

Ce signal perçu par les rhizobiums provoquera l'expression des gènes Nod qui codent pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (Lipochitooligosaccharide LCO) (Denarié, 2000).

Cet échange moléculaire entre les deux partenaires est à l'origine du commencement de l'organogénèse des nodosités (Patriarca *et al.*, 2004).

5.2.2. L'infection

Par l'intermédiaire de « la rhicadhesine » une molécule spécifique d'adhésion des bactéries aux racines localisée sur les cellules. N'étant pas la seule impliquée dans l'adhésion, les lectines aussi y participent avec un degré moindre (Perry et *al.*, 2004). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants ou elles vont se fixées et libèrent des hormones responsables de l'assouplissement de la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005).

Les facteurs Nod agissent sur deux types de cellules racinaires : Les cellules corticales et épidermiques. Sur les cellules épidermiques ils induisent une dépolarisation de la membrane plasmidique, une oscillation de flux de calcium Ca_2^+ et une induction de l'expression des gènes spécifiques aussi une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger » qui renferme les BNL (Essling et *al.*, 2003).

A partir de cette niche les BNL pénètrent par un poil absorbant (mécanisme d'invagination) perdent alors leurs membranes externes, change de forme et produisent des cytokines (Perry et *al.*, 2004 ; Pelmont, 2005).

5.2.3. Développement du nodule et la maturation des bacteroides

Dans le poil absorbant des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact forme un cordon amorphe contenant des mucilages limitées par des fibrilles cellulosiques d'origine végétale, c'est le filament d'infection (Dupuy et Nougier, 2005). Par lequel les bactéries y pénètrent. Il traverse le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures (Gage, 2004), simultanément à l'infection des poils, certaines cellules du cortex interne se différencient et donne naissance à un primordium nodulaire. Lorsque le cordon d'infection atteint le primordium, les bactéries s'y libèrent par endocytose et se différencient en bactéroïdes aptes à convertir le N_2 en NH_3 (Giraud, 2007). Sauf les cellules distales du primordium qui ne seront pas envahi par les BNL et qui gardent un état non différencié, elles continuent la division cellulaire et forme les méristèmes nodulaires, ces différentes activités conduisent directement au développement d'une structure complexe : Le nodule (Prell et Pool, 2006).

Chapitre 2 :
Matériel et
Méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

1.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules a été réalisée à partir des racines de la plante *H. spinosissimum* L. (**Figure 5**) qui est située dans le plateau d'Ain El Bey à la Périphérie de la ville de Constantine.



Figure 5 : Collecte des nodules.

La collecte doit être réalisée durant une période bien précise où la plante est en pleine activité, la récolte est effectuée pendant le printemps durant le mois d'avril quand le sol est sec et les nodules sont visibles, selon la méthode de Vincent (1970) et Beck *et al.*, (1993) il s'agit de :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm de profondeur afin d'extraire la plante et l'appareil racinaire. Puis soulever lentement le bloc de sol et des racines et enlever avec délicatesse le sol pour ne pas endommager les racines et surtout les racines secondaires qui portent beaucoup de nodules.
- Placer délicatement toute la plante dans un sachet en plastique.

Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante et laver délicatement les racines sous l'eau courante. Pour des raisons de stockage et d'isolement, les racines doivent être coupées 1 à 2 mm de site d'attache de nodules, ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables et propres de bactéries. A la fin, sécher les nodules avec du papier filtre avant le stockage.

1.2. Conservation des nodules

Pour un usage immédiat, 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 la dessiccation des nodules est recommandée, ce qui permet une longue conservation, cette méthode 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 ensuite déposés. **(Figure 6)**

Chaque flacon doit être identifié par les informations suivantes :

- Nom de la plante hôte,
- Date de conservation,
- Date et lieu de prélèvement.

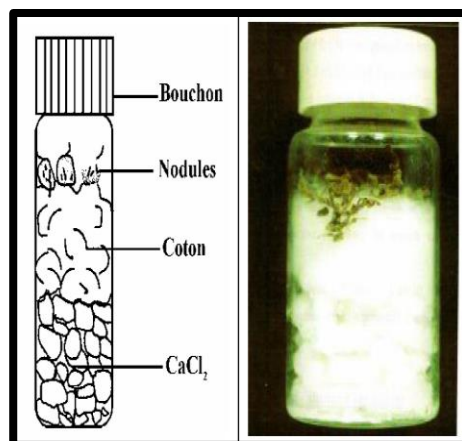


Figure 6 : Conservation des nodules sous CaCl_2 .

1.3. Isolement des bactéries à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Les nodosités conservées par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans l'eau distillée pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C, puis une heure à la température ambiante.

1.3.1. Stérilisation des nodules

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol 95 % puis transférés immédiatement dans une solution de Chlorure de Mercure HgCl_2 (1 g HgCl_2 + 5 ml HCl + 1 l'eau distillée) pendant 3 minutes ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent J.M., 1970).

1.3.2. 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 30°C pendant 24 heures, et cela pour vérifier la technique de stérilisation utilisée et la stérilité externe des nodules.

1.3.3. Isolement selon la méthode des nodules écrasés

Dans une boîte de pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile. Dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile.

Les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen.

A l'aide d'une anse de platine, une suspension de nodules est étalée selon la technique des quatre cadrans sur les milieux YMA+rouge Congo. (**Figure 7**). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

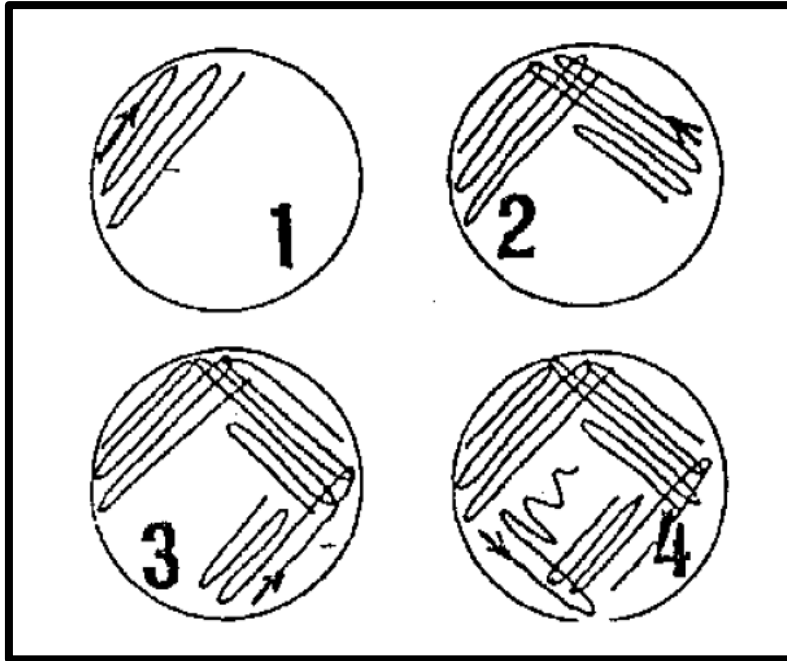


Figure 7 : Ensemencement par la technique des quatres cadrans.

Toutes les manipulations doivent être dans des conditions microbiologiques contrôlées.

2. Caractères morphologique et culturaux

2.1. Les milieux utilisés :

Les milieux qu'on a utilisés au cours de cette caractérisation morphologique et culturale sont :
(Annexe 1)

- Milieu liquides : YMB (yeast mannitol broth).
- Milieux solides: YMA (yeast mannitol agar).
- YMA+RC (yeast mannitol agar+ rouge Congo)
- YMA+BTB (yeast mannitol agar+ bromothymol blue)

2.2. Purification des isolats

La purification est réalisée par des repiquages répétés plusieurs fois, par des ensemencements sur milieu solide YMA+RC (**Annexe 1**) jusqu'à l'obtention de cultures homogènes et pures.

2.3. Examen macroscopique et microscopique des isolats

Un inoculum est ensemencé sur le milieu YMA et les caractéristiques morphologiques sont examinées au bout de 48 heures, les principaux critères retenus sont : la taille des colonies, la forme, la couleur et l'opacité.

Des observations microscopiques sont réalisées sur des lames dont une préparation de culture en YMA est étalée en couche mince, séchée et fixée. Puis les lames subissent une coloration de Gram (**Annexe 2**).

3. Caractéristiques métaboliques des isolats

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 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 nutritionnels

3.2.1. Utilisation des sucres comme seul source de carbone

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

- Incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures.
- L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'évaluation de la croissance

3.2.2. Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote

Les souches sont cultivées sur milieu YMA ou l'extrait de levure est remplacé par l'un des acides aminés suivant : Leucine, Histidine, Phénylalanine. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

3.3. Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)

Le but est de rechercher la présence de certains enzymes qui jouent un rôle lors du processus d'infection (nodulation) des racines par les bactéries.

3.3.1. 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 sontensemencés à partir d'isolats et incubés pendant 4 jours à 30 °C. Après incubation, on ajoute quelques gouttes des réactifs nitrate-réductase I et II (réactifs spécifiques à la recherche de nitrate-réductase) L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue.

3.3.2. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats sont cultivés sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH à 30 °C pendant 48 heures. La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,20 μm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C. La réaction positive est indiquée par la présence de colonies alcalinisant ou acidifiant le milieu. (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.3.3. Activité cellulolytique

Les souches sont mises en culture sur milieu YMA contenant 0.25% de CMC (Carboxy Methyl Cellulose) pendant 5jours. Après incubation les boites sont rincées avec l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge congo (1mg/ml) et incubées 30 minutes dans l'étuve à 30°C. La solution colorante est remplacée par une solution de NaCl 1M, les boites sont laissées à température ambiante pendant 30minutes.

Si le fond de la boite présente un halo jaune orangé autour des colonies, on note la présence d'une endoglucanase chez les souches.

3.4. Tests physiologiques : (facteur intrinsèques)

3.4.1. Tolérance au NaCl

Les souches sont cultivées sur le milieu TYB (**Annexe1**) avec diverses concentration d'NaCl : (0.25%,0.5%,1%,3%)

- Incubation à 30°C avec agitation pendant 24h.
- Mesurer la DO à 600nm.

3.4.2. Effet de la température

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimale de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu YMA et incubés à différentes températures : 4°C, 30°C, 38°C, 45°C.

3.4.3. Effet de pH

On prépare des bouillons YMB ajustés à des différents pH (4, 5, 6, 6.8, 9)

La DO est mesurée après 24h d'incubation sous agitation à 30°C

Chapitre 3 :
Résultats
et
Discussion

Dans cette étude, 4 isolats (HS1, HS2, HS3, HS4) ont été sélectionnés parmi les souches isolées à partir des nodules de la légumineuse *Hedysarum spinosissimum* L, Afin d'établir leurs profils phénotypiques et mettre en évidence leurs performance symbiotiques différents test ont été réalisés.

1. Test de stérilisation

Ce test nous a permis d'être sûr que la stérilisation des nodules a bien été efficace, et cela nous a été confirmé par l'absence de croissance des bactéries sur le milieu YMA+RC.



Figure 8 : Test de stérilisation des nodules.

2. Caractères morphologiques et cultureux

2.1. Croissance sur YMA

Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur milieu YMA, les 4 isolats choisis 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, visqueuse et brillantes, avec une texture homogène (**Figure 9, a**).

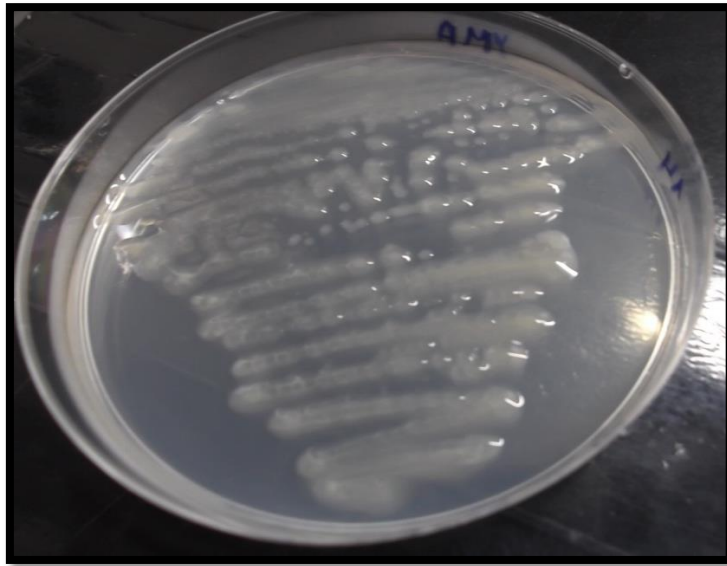
2.2. Croissance sur YMA+ RC

L'ensemencement du jus nodulaire sur les milieux YMA+RC, a donné des colonies qui absorbent faiblement et celle qui n'absorbent pas le colorant et gardent leurs couleurs blanchâtres (**Figure 9, b**)

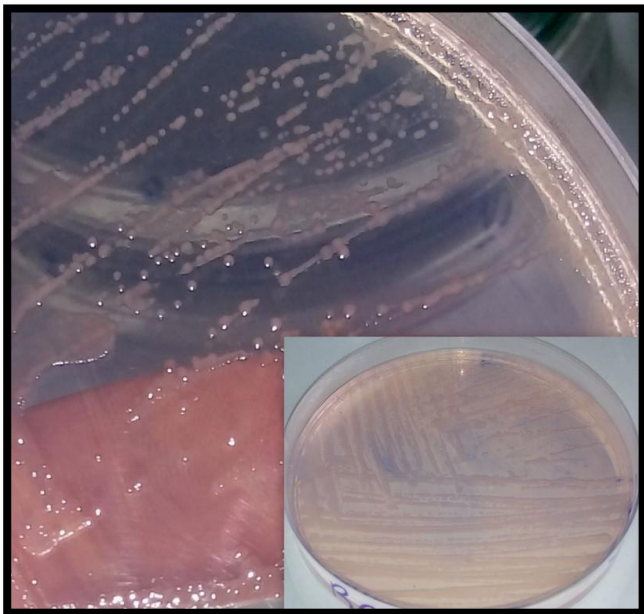
En général, les rhizobia donnent des colonies blanches ou absorbent faiblement le rouge Congo. Malgré que ce dernier soit souvent rajouté aux milieux de culture pour isoler ou pour tester la purification des cultures de rhizobia des autres bactéries (Torch, 2006).

2.3.Aspect microscopique :

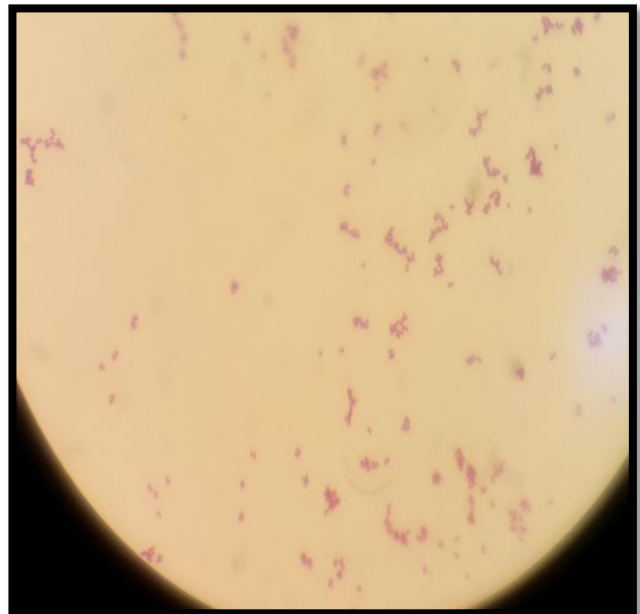
L'observation microscopique de tous nos isolats donne des bâtonnets de taille différente et des coccobacilles roses à Gram négatif, compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia. (**Figure 9, c**).



a. Croissance sur YMA



b. Croissance sur YMA+RC



c. Coloration de Gram

Figure 9 : Caractères cultureux et microscopiques des isolats.

3. Caractérisation phénotypique des isolats

3.1. La vitesse de croissance

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 (**Figure 10**), ce qui indique que nos isolats présentent une croissance rapide (Beck et *al.*, 1993).

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB du vert au jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984 ; Beck et *al.*, 1993 ; Pagano, 2008).



Figure 10 : Croissance 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 tous nos isolats, 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.

Nos isolats dans cette catégorie affichant une bonne croissance pour le Glucose et le Saccharose (**Figure 11**) Tant dis que le Xylose se présente comme le sucre le moins utilisé.

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

Tableau 2 :Utilisation des sucres comme source de carbone par les 4 isolats testés.

	Xylose	Glucose	Saccharose
HS1	+	+++	++
HS2	-	+++	+++
HS3	-	+++	++
HS4	+	+++	+++

(+): Pousse de colonie faible, (++) : Pousse de colonie moyenne,

(+++): Pousse de colonie forte, (-) : pas de pousse de colonie.

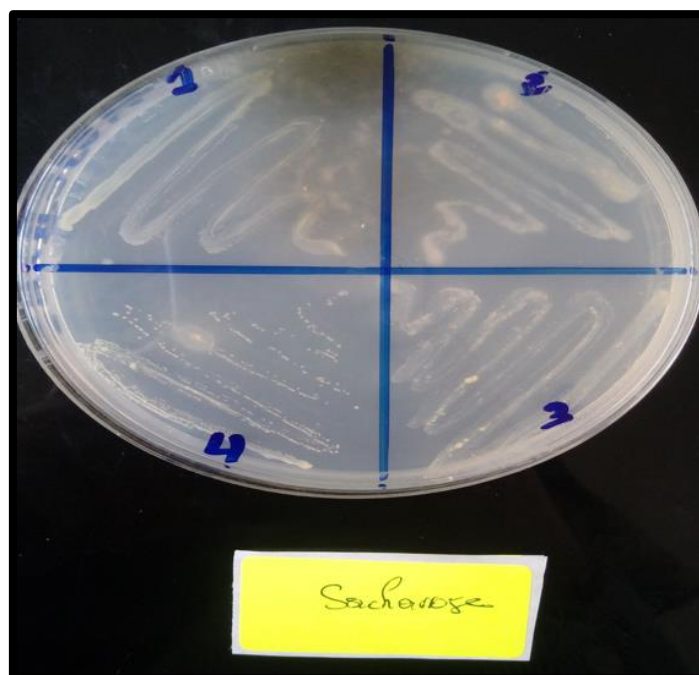


Figure 11 : Utilisation de saccharose par nos 4 isolats.

3.2.2. Assimilation de la source d'azote

On a pu constater après 48H d'incubation que la croissance des isolats sur les milieux YMA est possible en présence des 3 acides aminés (Histidine, Leucine, Phénylalanine), seulement avec des degrés qui se diffère d'un acide à un autre. (**Tableau 3**).

La majorité des isolats utilisent moyennement la Leucine et la Phénylalanine (**Figure 12**), tant dis que l'Histidine est l'acide aminée le plus utilisé.

Tableau 3 : Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les 4 isolats testés.

	Histidine	Leucine	Phénylalanine
HS1	+++	++	++
HS2	+++	++	++
HS3	++	++	+
HS4	+++	++	++

(+): Pousse de colonie faible, (++) : Pousse de colonie moyenne,

(+++): Pousse de colonie forte, (-) : pas de pousse de colonie.

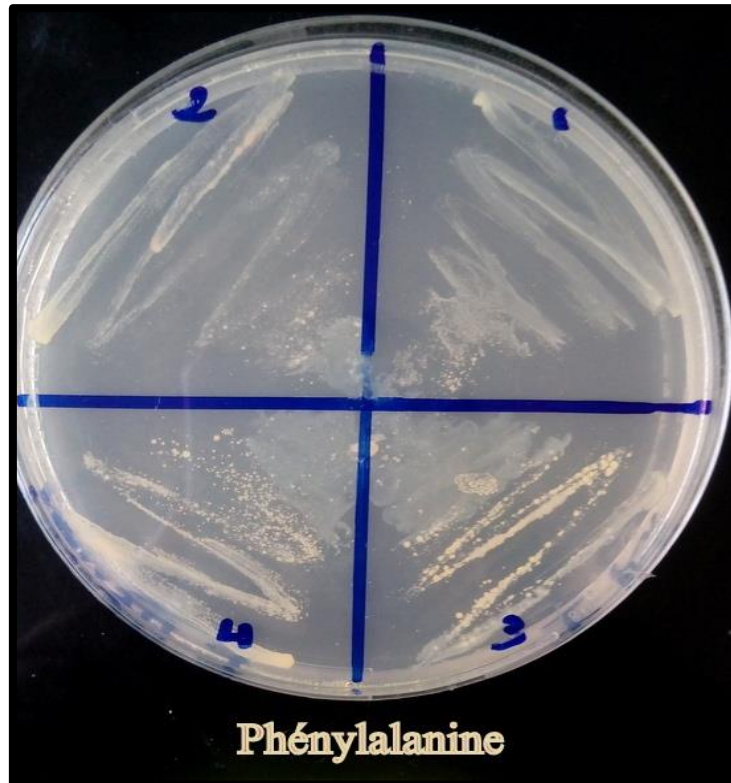


Figure 12 : Utilisation de Phénylalanine par nos 4 isolats.

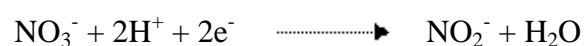
3.3. Tests biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques)

Presque tous nos isolats, donnent des réactions positives avec les enzymes spécifiques, enzymes liés au processus de nodulation (Cellulase) ou liés au métabolisme azoté du sol (uréase, nitrate-réductase).

3.3.1. Réduction des nitrates

Les isolats HS1 et HS2 réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition des réactifs **I** et **II** du nitrate réductase, alors que le reste des isolats ont donné une réaction négative, mais après l'addition de la poudre de zinc la couleur est restée presque jaunâtre ce qui indique un résultat positif (**Figure 13**).

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



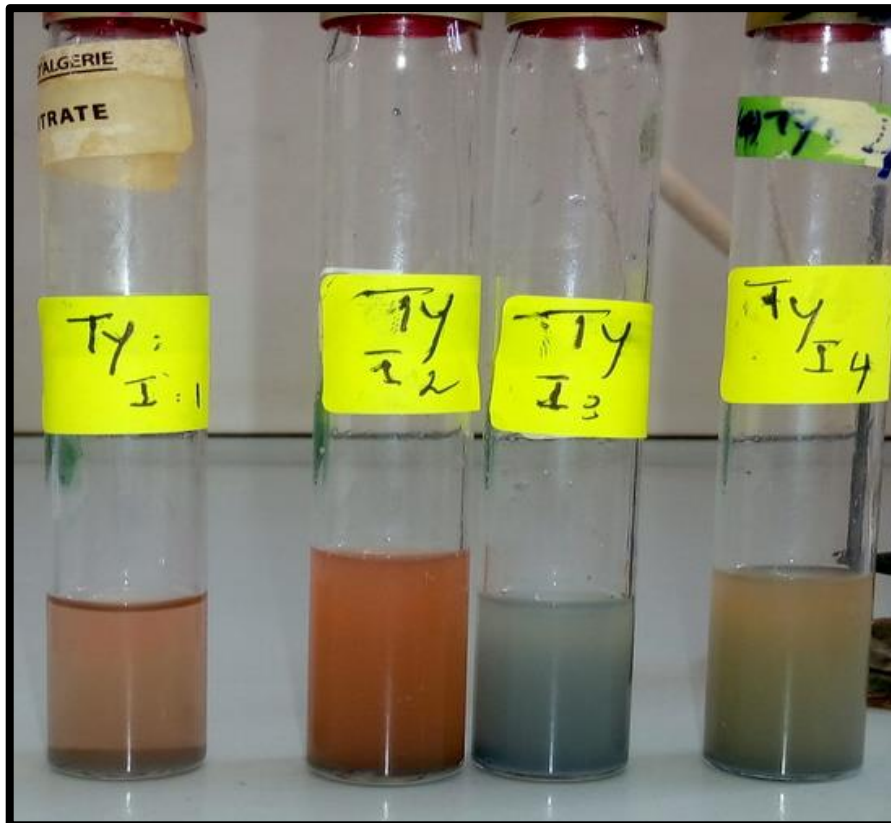


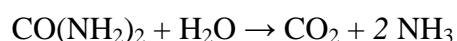
Figure 13 : Réduction des nitrates

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.

Le milieu contient de l'urée, et si la bactérie produit de l'uréase ceci va provoquer une alcalinisation du milieu. L'alcalinisation va faire virer l'indicateur coloré vers le rose (Bibirou,2016)

L'alcalinisation du milieu par conséquent est due à la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998), selon la réactions suit :



Après l'incubation, tous les isolats donnent un virage de couleurs vers le 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 précédente. **(Figure 14)**



Figure 14 : Test de l'Uréase

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 tous nos isolats on a pu remarquer la présence d'un halo jaune et donc l'activité cellulolytique est positive **(Figure 15)**.

Les résultats obtenus dans cette étude ont été concordants avec ceux obtenus par d'autres études précédentes, qui ont montré la capacité des rhizobactéries à produire la cellulase (Oliveira et *al.*, 2007, Sudto et *al.*, 2008).

On peut dire que, l'activité des enzymes cellulolytiques dépend de l'origine de la souche et de la composition des milieux de culture (Howieson et Dilworth, 2016). D'autres auteurs ont montré que le rhizobium produit l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques des parois cellulaires des cellules végétales, et facilite au rhizobium de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos et *al.*, 1992).

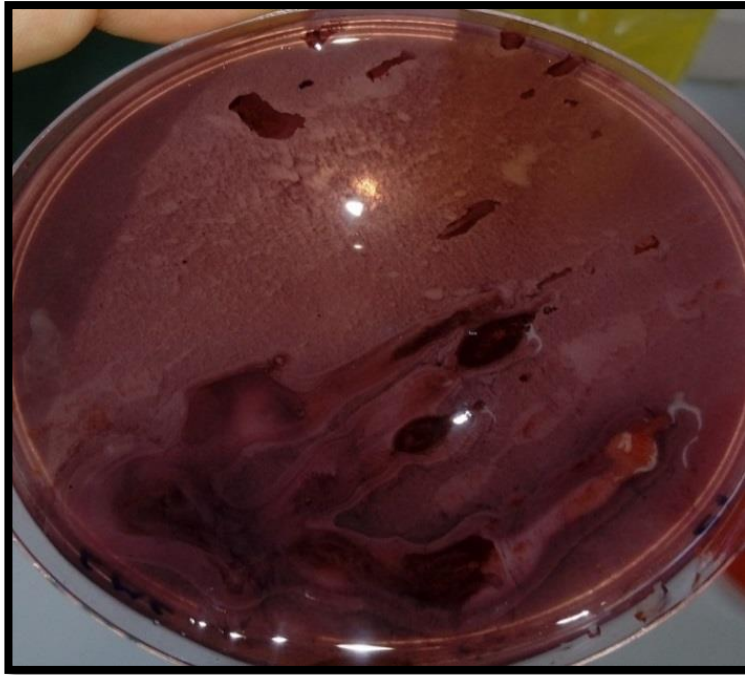


Figure15 : Activité cellulosique des isolats

3.4. Tests physiologiques

3.4.1. Effet de température

Nos isolats sont incapables de croître dans deux température 4°C et 45°C par contre, sur une température entre 28°C et 37°C. (**Figure.16**)

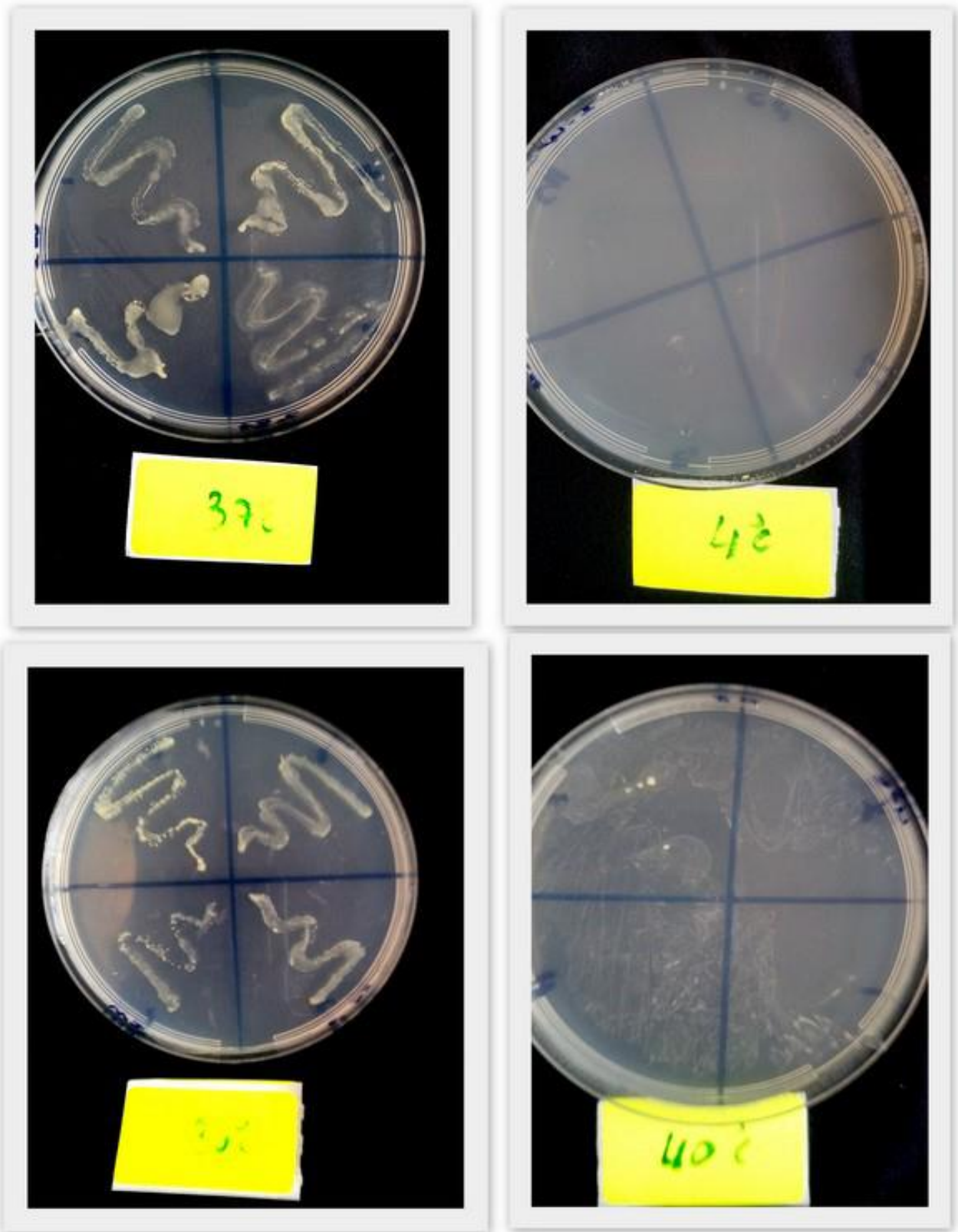


Figure 16: Test de culture sur différentes températures

3.4.2. Effet de NaCl

Tous nos isolats testés croissent en présence de différentes concentrations de NaCl (0.25%, 0.50%,1%,3%) (**Figure.17**)

Miller et Wood (1996) ont rapportés que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin.

Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs (Csonka et Hanson 1991). Certains auteurs ont rapporté que les rhizobia sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Zahran 1999, Swaraj et Bishnoi 1999), l'effet d'inhibition de la salinité sur la nodulation a été attribué par les même auteurs à la diminution de la colonisation des rhizobia, et le manque de formation des poils racinaires.

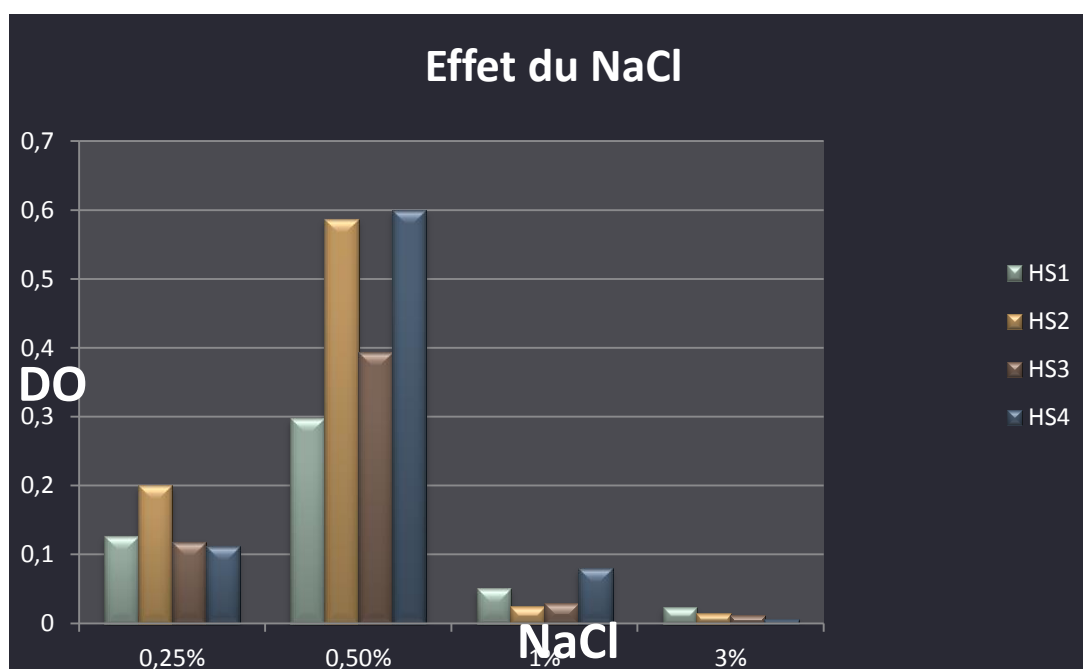


Figure 17 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats

3.4.3. Effet de PH

La DO montre que l'ensemble de nos isolats tolèrent les quatre valeurs de pH utilisés (4,5,6.8,9). (**Figure 18**)

L'optimum de croissance de tous les isolats testés est observé sur le pH 6.8, d'une façon globale nos isolats sont tolérants a l'alcalinité (pH=9) et a l'acidité (pH=4).

La tolérance des rhizobia à un pH acide dépend de leur capacité de maintenir un pH intracellulaire entre 7.2 et 7.5, même à un pH acide externe.

Des différences dans la composition en lipopolysaccharides, accumulation des polyamines cellulaires (Fujihara et *al.*, 1993) ont été associés avec la croissance des cellules à pH acide. La composition et la structure de la membrane externe pourraient également être un facteur de tolérance au pH acide (Graham et *al.*, 1994).

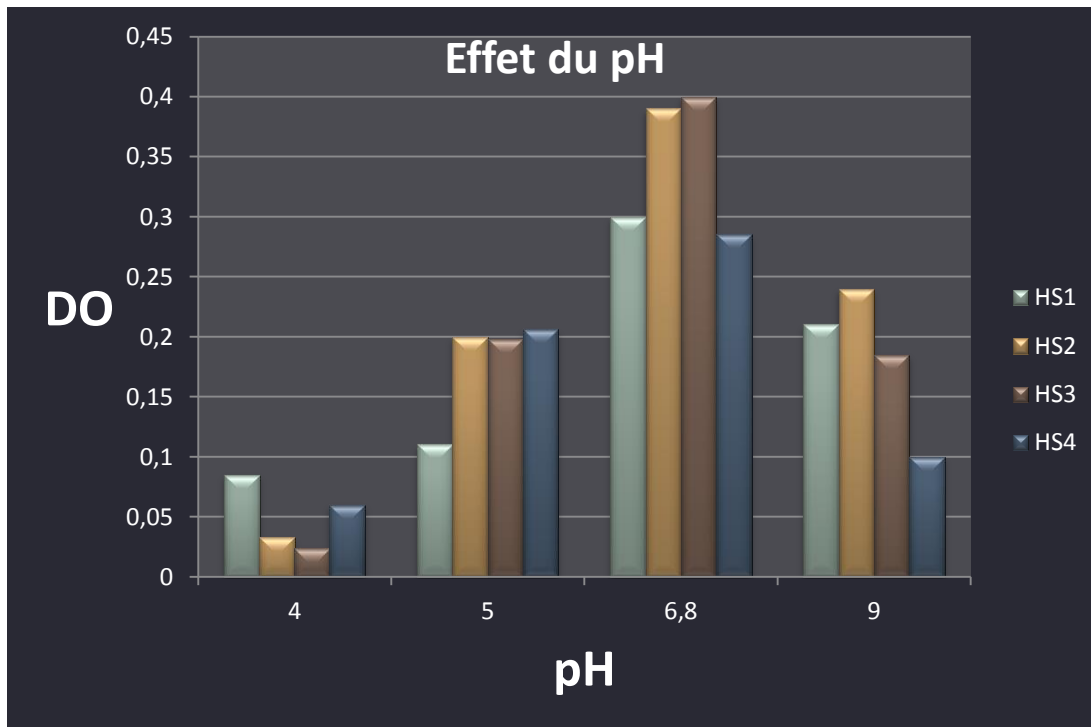


Figure 18 : Effet du pH sur la croissance des isolats

Conclusion

Nous avons procédé dans ce travail à une caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse fourragère *Hedysarum spinosissimum* L., poussant dans la région de Ain El Bey à la Périphérie de la ville de Constantine.

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

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*.

Les tests nutritionnels dévoilent que nos isolats ont tendance à utiliser une large gamme de sucre comme source de carbone et d'acide aminé comme source d'azote, le degré diffère d'une souche à une autre.

Les isolats possèdent les enzymes spécifiques au processus d'infection ce qui les regroupe dans le groupe des bactéries nodulant les légumineuses (BNL).

A travers l'étude écologique, nos isolats répondent à la majorité des caractères du genre *rhizobium* dont l'influence des facteurs abiotiques (pH, NaCl, température).

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). 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 d'une étude phénotypique approfondie et un examen génotypique basé sur les techniques moléculaires ce qui ouvre le champ sur un certain nombre de perspectives en relation avec la diversité des BNL.

*Références
bibliographiques*

-A-

Allen E. K., et Allen O.N., (1950) - Biochemical and Physiological properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* **14**:173-330.

-B-

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

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

Benguedouar A., (2000) - Contribution à l'étude de la symbiose légumineuse : caractérisation de l'espèce *Rhizobium* « *hedysari* » nodulant la légumineuse *hedysarum coronarium*. Thèse de doctorat d'état en biologie appliquée. Université de Constantine.

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

Beringer, J.E. (1974) - R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*

Bibirou., (2006) - tests utilises en bacteriologie, biologie technique de laboratoires pour laboratoire de brousse.

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.

Breuer G., Evers W. A., de Vree J.H., Kleinegris D. M., Marteus D. E., Wijffels R. H., (2013)- Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *J. Vis. Exp.* (80), e50628, doi :10.3791 /50628.

Brundu G, Camarda I, Caredda M, Garau G, Maltoni S & Deiana P. (2004)- A contribution to the study of the distribution of *Medicago-Rhizobium* symbiosis in Sardinia (Italy). *Agr Med* .**134**: 33-48.

Baldwin, I. L., Fred E. B., (1929)- Nomenclature of the root nodule bacteria of the leguminosae. *J. Bacteriol.* **17**: 141-150.

Bonnier G.,(1934)- Flore complète illustrée en couleurs de France Suis et Belgique(comprenant la plupart des plantes d'Europe).Tome troisième.84-85.

-C-

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.

Coenye, T., Vandamme, P. (2003)- Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* **5(9)**: 719-729

Csonka L.N., et Hanson A.D (1991) - Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology *Annu. Rev. Plant Physiol.* **45**: 569-606.

-D-

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

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

Dyole J.J; (1998)- Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* **3**,473-478p.

-E-

Eardly B. D., Materon L. A. N., Smith H., Johnso D. A., Rumbangh M. D., et Selander R. K., (1990) -Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *appl. Environ. Microbiol.* **56** : 187-194.

Engelhard, M., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek., (2000)-Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus spp.*, in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* **2**, 131-141.

Esseling J,J Lhuissier F.G.P, Emons A.M.C., (2003)- Nod Factor-Induced Root Hair Curling Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application In *Plant Physiol.* **132**: 1982-1988.

-F-

Fred, E. B., Baldwin I. L., McCoy E., (1932)- Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis.

Fujihara S., Yoneyama T., (1993)- Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 59, No. 4 pp 1104-1109.

Fernand Wathman .(1967) - fleurs du bassin méditerranéen. Paris VI édition.

-G-

Graham, P.H. ; M.J. Sadowsky ; H.H. Keyser ; Y.M. Barnet ; R.S. Bradley ; J.E. Cooper ; D.J. De Ley ; B.D.W. Jarvis ; E.B. Roslycky ; B.W. Strijdom ; and J.P.W. Young .(1991)- Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int.J. Syst. Bacteriol.* **41**: 582-587

Graham P.H. (1994) - Legume nodule symbiosis. Methods of soil analysis. Part2 Microbiological and biochemical properties. Books series N°5. p.199-221. Madison. USA.

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

Guignard J.L., Dupont F., (2005)-Botanique. 13ème Edition Masson.Sprent: 164-179.

-H-

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

Hordé P., (2015) - Fabaceae-définition, journal des Femmes Santé, France.

Howieson J.G., et Dilworth M.J., (2016) - Working with Rhizobia ; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale. P :312.

-J-

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

Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. & Stevens P. (2001) - Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

-K-

Krieg, N.R., Holt, J.G., (1984) – Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1, The William and Wilkins Co., Baltimore and London.

-L-

Limpens E., Bisseling T., (2003) - Signaling in symbiosis. *Current Opinion In Plant Biology* 6.343-350.

LongS.R, and Staskawicz B.J. (1993) - *Cell* 73, 921-935.

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.* Volume92 Issue 6 Page 1043.

-M-

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

Mateos P.F., Jiménez-Zurdo J.L., Chen J.A.S., Squartini S.K., Haack E.M., Maolina D.H., Hubbell F., et Dazzo B., (1992) - Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizium leguminosarum* bv *trifolii*. Appl Environ Microbiol. **58(6)**: 1816-1822.

Miller K J., J.M Wood. (1996) - Osmoadaptation by rhizosphère bacteria. Ann. Review. Microbiol., **50**: 101-136.

Mottareale G., (1898) -Di alcuni organi particolari delle radici tubercolifere dello *Hedysarum coronarium* in relazione al *Bacillus radicolica* e alla *Phytomyxa leguminosarum*. Atti R. Ist. incoragg. Napoli. **11**: 1-7

Moulin, L., Munve, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C., (2001) - Nodulation of legumes by members of β subclass of Proteobacteria. Nature. **411**: 948-950.

Muresu. R., Polone E., Sulas. L., Baldan., Tondello.A., Delogu .G., Cappuccinelli. P., Alberghini. S., Benhizia.Y., Benhizia.H., Benguedouar.A., Mori. B., Calamassi.R., Dazzo F.B., et Squartini.A.(2008) - Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. FEMS Microbiol Ecol. 1-18.

Michel. N., Emile. D., (2004) -Biologie Végétale : Associations et interactions chez les plantes. France : Edité par I.M.E.Baume -les -dames.2p.

-N-

N'zoué, A., Domergue, O., Moulin, L., Avarre, J.-C. and de Lajudie P., (2006) - Tropical Legume Nodulating Bacteria. Molecular Biology of Tropical Plants.pp 105-141.

Neyra M. (1992)-Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote legumineuse/Rhizobium.190

Ngom, A., nakagawa, Y., sawada, h., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., suzuki, A Hgashi, S.,and Abe,M., (2004) - A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the Ochrobactrum clade isolated from root nodules of Acacia mangium.J. Gen. appl. Microbiol. **50(1)**: 17-27.

-O-

Ott, T., van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K. (2005)- Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Curr Biol **15**, 531-535.

Ozenda P., (1977) - Flore du Sahara. CNRZ, 2ème edition, Paris, 306.

-P-

Paau AS, Bloch CB & Brill WJ .(1980) - Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **143**: 1480–1490.

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.*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.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S., (2004)- Microbiologie. Edition Dunod, Paris.

Pouget Pl., (1980) - Les relations sol-végétation dans les steppes Sud-Algéroises. ORSTOM. Paris. 1 -555.

-Q-

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

-R-

Riggs, PJ., Chelius, MK., Iniguez, AL., Kaeppler, SM., Triplett, EW. (2001)-Enhanced maize productivity by inoculation with diazo- trophic bacteria. *Aust J plant physiol* **.28(9)**: 829-836.

-S-

Scheleifer K. H ., et Klander O ., (1992) - Peptidoglycane types of bacterial cell walle and their taxonomic implications . *Bacteriol* **.36**: 407-477.

Somasegaran, P., Hoben H.J. (1994)- Handbook for Rhizobia. Sringer verlage New York. P 466.

Stackebrandt E., & Liesack W., (1993) - Nucleic acids and classification. In Handbook of new bacterial systematics Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. London: Academic press. pp. 152-189.

Swaraj K., et Bishnoi N.R (1999) - Effet of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. Indian J. Exp Biol. **37 (9)** :843-848.

taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60** pp 407-438.

Sprent J.I. (1995)- Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. Soil Biol. Biochem **27**:401-407.

-T-

Terefework Z., Kaijalainen S, et Lindstro., (2001) -AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae*.J. Biotech.**91** :169-180.

Timmers ACJ, Soupe`ne E, Auriac MC, de Billy F, Vasse J, Boistard P et Truchet G .(2000) - Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. Mol Plant–Microbe Interact **13**: 1204–1213.

Torche, A. (2006) - Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister. Département de Biologie. Université de Constantine.

Tristan A., Meyronet D., Benito Y., Celard M., Vandenesch F.,(2004) - Apport de la PCR diagnostique. Antibiotique, 6 : 257-261.

-U-

Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N.,and Matsuguchi, T.,(1995) - phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of nodC segment.J.Bacteriol.**177**:468-472.

-V-

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

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

Vos P., Hogers R., Beeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Kuiper M., (1995) - AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, **23**: 4407-4414.

-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) - symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. *Acad sin*: 39.

Wilson, J. K. (1944)- Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Sci*. **58** :61-69.

Weir B.S., (2016)- The current taxonomy of *Rhizobia*. NZ *Rhizobia* website.
<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: X Jan.

-Y-

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

Young J. P. W., (1985) - Rhizobium population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans, and lucerne grown at the same site. *J. Gen. Microbiol*. **131** :2399-2408.

Young N.D., Mudge J., Ellis T.H.,(2003)- Legume Genomes :More than peas in a pod. *Current Plant Bio*16,199-24.

-Z-

Zahran H.H (1999) - *Rhizobium* legume symbioses and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Molec. Rev*. **63(4)**: 968-989.

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

Zakhia F. & de Lajudie P. (2006) -La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques application à la caractérisation des bactéries nodulantes des légumineuses(BNL). *Canadian Journal of Microbiology*. **52**:169.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie P., (2004) - Characterisation of wild legumes nodulating bacteria(LNB). In the infrared zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol*. **27**: 143-153.

Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela botanica. (2011).
www.tela-botanica.org.

Journet E.P. (2004)- Symbioses racinaires. Fiche 4.L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. www.crdp-toulouse.fr.

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.

Milieu: Tryptone-Yeast (TY) (Beringer, 1974)

Tryptone.....	5.0 g
Extrait de levure.....	3.0 g
CaCl ₂ . H ₂ O.....	0.87 g
L'eau distillé.....	1000 ml
pH.....	6.8 -7.2

Autoclave 120°C pendant 20 minutes

ANNEXES 2 –Coloration de Gram

Préparer des frottis à partir des cultures sur YMA, on prépare des lames bien étalées en couche mince, séchée et fixée, puis colorées selon les étapes suivantes :

- ❖ Couvrir la lame de Violet de Gentiane pendant une minute.
- ❖ Chasser le violet avec du Lugol, ensuite couvrir la lame avec le Lugol pendant 30 secondes.
- ❖ Décolorer au mélange alcool-acétone (v/v) jusqu'à la décoloration totale du frottis.
- ❖ Laver à l'eau de robinet courante.
- ❖ Couvrir la lame d'une solution de Fushine pendant 1 minute.
- ❖ Laver à l'eau, sécher la lame et observer a immersion à l'objectif x100.

ANNEXES 3- Mesure de la Densité Optique (DO600)

Influence des facteurs abiotiques

- NaCl

pH	4	5	6,8	9
HS1	0,085	0,11	0,3	0,21
HS2	0,033	0,2	0,39	0,24
HS3	0,024	0,198	0,4	0,185
HS4	0,06	0,206	0,285	0,1

- pH

Na Cl (M)	0,25%	0,50%	1%	3%
HS1	0,127	0,297	0,05	0,023
HS2	0,2	0,587	0,024	0,014
HS3	0,118	0,393	0,03	0,012
HS4	0,111	0,6	0,08	0,006

**MISE EN ÉVIDENCE DES BNL DE LA LÉGUMINEUSE FOURAGERRE
HEDYSARUM SPINOSISSIMUM L. POUSSANT DANS LA RÉGION DE
CONSTANTINE (AIN EL BEY)**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie Microbienne.

Ce travail a été réalisé sur quatre isolats bactériens isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Hedysarum spinosissimum* L. récoltée du haut plateau d'Ain El Bey à la Périphérie de la ville de Constantine, dans le but d'évaluer et de caractériser la diversité phénotypique existante des endophytes. La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique qui nous a permis d'obtenir des colonies homogènes d'une forme circulaire, un contour régulier et 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 spinosissimum* L, Caractérisation., Gram, Isolats.

Laboratoire de recherche : Laboratoire 8 département de Microbiologie.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *RIAH Nassira* (Maitre de conférence - UFM Constantine),
Rapporteur : *BENHIZIA Yacine* (Professeur - UFM Constantine),
Examineur : *CHABI Rabeh* (Maitre-assistant - UFM Constantine).

Date de soutenance : 18/06/2018