

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA- BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie

Mémoire

Présenté par

M^{elle} SALMI Adouda

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière: Biologie

Option: Microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes

Thème

Caractérisation phénotypique des bactéries symbiotiques nodulant

Retama sp. du Nord-Est d'Algérie

Soutenu le

Devant le Jury composé de:

M^{me} BENABDESSALAM Fadila Professeur

Univ. de Béjaïa Présidente

M^r AISSAT Kamel Maître de conférence A

Univ. de Béjaïa Examineur

M^{me} BEDJOU Fatiha Professeur

Univ. de Béjaïa Examinatrice

M^r TOUATI Abdelaziz Professeur

Univ. de Béjaïa Rapporteur

M^{me} BOULILA Farida Maître de conférence B

Univ. de Béjaïa Invité

Année 2012-2013

Remerciements

Au terme de ce travail, je rends grâce a Dieu qui m'a donné la volonté et le courage de mener à bien ce travail.

En premier lieu, ma reconnaissance et mes sincères remerciements s'adressent à M^{me} BOULILA qui m'a ouvert les portes de son laboratoire, m'a proposé cette thématique et qui a toujours été là pour m'aider, me diriger, me conseiller et m'a entouré de confiance.

Qu'elle puisse trouver ici mon profond respect.

Mes remerciements les plus vifs vont à M^r TOUATI qui a accepté de prendre en charge l'encadrement de ce sujet et qui m'a permis d'avancer dans mes études.

Je remercie M^{me} BENABDESLAM, professeur à l'Université A/MIRA de Bejaia pour l'honneur qu'elle me fait d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance

J'adresse mes remerciements également à M^{me} BEDJOU, professeur à l'Université A/MIRA de Bejaia et à M^r AISSAT maitre de conférence à l'Université A/MIRA de Bejaia pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté d'examiner ce mémoire

Mes sincères remerciements vont à Hadjira, Karima et Yasmine qui m'ont beaucoup aidé, merci les filles, ainsi qu'à l'ensemble du personnel du Laboratoire d'Ecologie Microbienne.

Un grand merci à Tomas Ruiz-Argüeso qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a initié aux techniques de la biologie moléculaire, ainsi qu'à Juan Imperial, Luis Rey et tout le personnel du Centre de Biotechnologie et Génomique (GBGP) des Plantes de Madrid

Merci à tous ceux qui ont toujours été là pour moi

Dédicaces

En guise de reconnaissance je dédie ce travail à

Mes très chers parents, mon père et ma mère

qui m'ont beaucoup soutenu

*Que Dieu les garde pour moi en bonne santé et leurs donne une longue vie pour
qu'ils assistent à tous mes succès.*

Ma sœur Linda

Mes frères Faouzi, Arezki, Salim, Lounes et en particulier à Fatah

Tous ceux qui me sont chers.

Sommaire

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des photos

Introduction 1

Partie I: Synthèse Bibliographique

I. Fixation de l'azote

I.1. Azote 3

I.2. Fixation de l'azote 3

 I.2.1. Fixation industrielle de l'azote 3

 I.2.2. Fixation biologique de l'azote 4

 a)- Fixateurs libres 4

 b)- Fixateurs symbiotiques 4

 I.2.3. Mécanisme enzymatique de la fixation: La Nitrogénase 5

II. Légumineuses

II.1. Intérêts des légumineuses 8

II.2. Le genre *Retama* 9

 II.2.1. Description botanique et distribution géographique des espèces *Retama*..... 9

 II.2.2. Vertus de *Retama*..... 12

III. Rhizobia

III.1. Caractéristiques des rhizobia... 14

 III.1.1. Caractères morphologiques et culturels 14

 III.1.2. Caractères biochimiques..... 15

 III.1.3. Caractères physiologiques 15

 III.1.4. Caractères génétiques 15

III.2. Méthodes d'étude des rhizobia 16

 III.2.1. Taxonomie phénotypique 16

 III.2.2. Méthode numérique 19

 III.2.3. Méthodes génotypiques 19

III.3. Classification des rhizobia 22

IV. Interaction légumineuse-rhizobia

IV.1. Nodulation..... 28

 1)- Pré infection..... 28

 2)- Infection 28

3)- Développement du nodule	29
IV.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie	30
IV.2.1. Gènes <i>nod</i>	31
IV.2.2. Gènes <i>nif</i>	31
IV-2-3. Gènes <i>fix</i>	31
IV.2.4. Autres gènes	31
IV-3- Génétique de la nodulation chez la plante	32
IV.3.1. Substances responsables de la nodulation	32
IV.3.1.1. Flavonoïdes.....	32
IV.3.1.2. Facteurs nod.....	33
IV.3.1.3. Autres substances	33

Partie II: Matériel et Méthodes

I. Présentation du matériel biologique	34
II. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes	35
II.1. Caractérisation morphologique des colonies	35
II.2. Caractérisation cytologique des souches bactériennes	35
II.3. Détermination du temps de génération et du taux de croissance	35
II.4. Caractérisation physiologique	36
II.4.1. Effet du pH sur la croissance	36
II.4.2. Effet de la température sur la croissance	36
II.4.3. Effet du NaCl sur la croissance.....	36
II.5. Caractérisation nutritionnelle	36
II.5.1. Assimilation des sucres comme seul source de carbone.....	36
II.5.2. Assimilation des acides aminés comme seul source d'azote	37
II.6. Résistance et sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourdes.....	37
II.6.1. Réponse à l'action des antibiotiques.....	37
II.6.2. Réponse à l'action des métaux lourds.....	38
II.7. Caractérisation biochimique	38
a- Recherche de l'acétoïne: Réaction de Voges-Proskauer (VP)	38
b- Production d'acide: Réaction au rouge de méthyle.....	39
c- Utilisation du glucose, du lactose production de gaz et d'H ₂ S.....	40
d- Type respiratoire ..	40
e- Recherche d'enzymes.....	40
e.1. Utilisation du citrate.....	40
e.2. Production d'indole.....	41
e.3. Réduction des nitrates	41
e.4. Recherche de la β -galactosidase et β -galactoperméase.....	42

II.8. Test de nodulation simple et croisé	42
II.9. Analyse numérique	43
II.10. Caractérisation génotypique des souches symbiotiques	43
II.10.1. Extraction d'ADN.....	43
II.10.2. Amplification de l'ADNr 16S par PCR.....	44
II.10.3. Visualisation des produits d'amplification par PCR.....	44
II.10.4. Purification des produits de PCR.....	44
II.10.5. Dosage de l'ADN.....	45
II.10.6. Séquençage de L'ADN	45

Partie III : Résultats et Discussions

III. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes	46
III.1. Caractérisation morphologique des colonies	46
III.2. Caractérisation cytologique des souches bactériennes	46
III.3. Détermination du temps de génération et du taux de croissance.....	47
III.4. Caractérisation physiologique	48
III.4.1. Effet du pH sur la croissance	48
III.4.2. Effet de la température sur la croissance	49
III.4.3. Effet du NaCl sur la croissance	50
III.5. Caractérisation nutritionnelle	52
III.5.1. Assimilation des sucres comme seul source de carbone.....	52
III.5.2. Assimilation des acides aminés comme seul source d'azote.....	53
III.6. Résistance et sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourdes	54
III.6.1. Réponse à l'action des antibiotiques.....	54
III.6.2. Réponse à l'action des métaux lourds	56
III.7. Caractérisation biochimique	59
III.8. Test de nodulation simple et croisé	59
III.9. Analyse numérique	62
III.10. Caractérisation génotypique des souches symbiotiques	65
Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques	69

Annexes

Liste des figures

Numéro de figure	Titre de la figure	Numéro de Page
1	Structure de la nitrogénase	6
2	Cycle de la nitrogénase	7
3	Répartition géographique des espèces de <i>Retama</i> en Algérie	11
4	Arbre phylogénétique ML basé sur l'alignement de 1289 pb de séquences nucléotidiques du gène de l'ARNr 16S	25
5	Arbre phylogénétique ML basé sur alignement de 569 bp de séquences nucléotidiques de l'IGS ADNr 16S-23S	26
6	Interaction légumineuse-rhizobia	27
7	Types nodulaires chez les légumineuses	29
8	Processus de la nodulation	30
9	Effet du pH sur la croissance des souches de rhizobia	48
10	Effet de la température sur la croissance des souches de rhizobia	50
11	Effet du NaCl sur la croissance des souches de rhizobia	51
12	Assimilation des sucres par les souches de rhizobia	52
13	Assimilation des acides aminés par les souches de rhizobia	53
14	Dendrogramme de la CAH de 10 souches de rhizobia isolées de <i>Retama sp.</i>	64
15	Arbre phylogénétique ML basé sur alignement de 1330 bp de séquences nucléotidiques du gène 16S.	66

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de page
I	Les microorganismes fixateurs d'azote	5
II	Systématique de <i>Retama</i>	10
III	Pouvoir discriminant des différentes techniques de la taxonomie polyphasique	21
IV	Classification des bactéries nodulants les légumineuses	22
V	Souches utilisées dans cette étude	34
VI	Volumes utilisés pour la réalisation du test d'antibiotiques	38
VII	Résultats des temps de génération et des taux de croissances des souches	47
VIII	Sensibilité et résistance des souches aux antibiotiques	56
IX	Sensibilité et résistance des souches aux métaux lourds	58
X	Résultats du test de nodulation	60
XI	Coefficient de similitudes inter-souches de rhizobia	63

Liste des photos

Numéro de photo	Titre de la photo	Numéro de page
1	Aspect des plantes de <i>Retama</i>	11
2	Aspect des colonies sur YMB	46
3	Aspect des cellules sous microscope optique $\times 40$	47
4	Aspect des nodules obtenus lors du test de nodulation simple et croisé.	62
5	Electrophorégramme des produits PCR de l'ADNr 16S des isolats bactériens de <i>Retama</i> .	65

Introduction

La steppe algérienne qui représente un milieu de richesse naturel très important, subit depuis quelques décennies une dégradation intense ; à cet effet l'étude et la valorisation de ces ressources génétiques d'origine végétale et les micro-organismes qui y sont associés s'avère de plus en plus nécessaire pour la conservation des écosystèmes et de la diversité biologique (Mahnane, 2010).

Les Retames qui sont des légumineuses arbustives, possédant à la fois des intérêts pharmacologiques et écologiques, sont caractérisées par une distribution géographique très diversifiée en partant des pourtours de la côte méditerranéenne jusqu'aux régions semi-arides et arides (Algérie, Maroc, Tunisie, Sud de l'Espagne et du Portugal). Elles représentent un moyen naturel de lutte contre la désertification et peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi et *al.*, 2004). Par conséquent, les Retames peuvent constituer un modèle indiqué à la recherche de couples symbiotiques légumineuse-rhizobia efficaces pour la réhabilitation des écosystèmes dégradés et la fixation des dunes de sables désertiques qui ne cessent d'avancer à grande vitesse.

De ce fait, la nécessité de lancer des investigations pour leurs descriptions génotypiques et phénotypiques et de connaître la diversité des deux symbiotes est un préalable à toute utilisation des potentialités de ce phénomène. Dans ce contexte, en Algérie, une caractérisation génotypique a été effectuée par Boulila et *al.* (2009) sur les symbiotes de deux espèces de *Retama* d'Algérie (*R. raetam* et *R. sphaerocarpa*) de plusieurs sites de prélèvement s'étalent sur un axe allant des dunes littorales d'étage climatique humide à la zone intérieure semi-aride a permis de classer ces souches parmi le genre *Bradyrhizobium*. Cette caractérisation basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S ; du fragment intergénique spacer IGS ; des gènes de ménage et des gènes symbiotiques a montré que ces souches sont complètement différentes des espèces connues dans ce genre et qu'elles pourraient former trois nouvelles espèces sous réserve d'une analyse complète du génome et d'une caractérisation phénotypique montrant une différence par rapport aux espèces appartenant à ce genre. Cette étude a pour but de caractériser phénotypiquement ces souches pour pouvoir les décrire comme nouvelles espèces (Boulila et *al.*, 2009).

Le présent travail entre dans le cadre du projet de recherche algéro-espagnol PCI/AECID (A1/038234/11) qui vise à caractériser et sélectionner les symbiotes des

arbustes légumineuses de plusieurs régions d'Algérie afin de les utiliser dans d'éventuels projets de restauration des sols dégradés.

Une opportunité de stage d'un mois au Centre de Biotechnologie et Génomique (GBGP) des Plantes en Espagne m'a été offerte dans le cadre de ce projet pour me permettre un apprentissage des méthodes de biologie moléculaire nécessaires à l'étude des rhizobia. Par ailleurs, une actualisation de l'analyse phylogénétique des isolats de *Retama* étudiés, basée sur les séquences nucléotidique de l'ADNr 16S, nous a permis de les comparer aux nouvelles espèces décrites dans ce genre jusqu'à ce jour.

Ce document est composé de trois parties : une synthèse bibliographique retraçant particulièrement des généralités concernant la taxonomie et les méthodes d'études rhizobia, la partie matériel et méthodes puis la discussion des résultats obtenus.

*Synthèse
bibliographique*

I. Fixation de l'azote

I.1. Azote

La plus grande partie de l'atmosphère, 78% en volume, est constituée d'azote (N_2 ou diazote) un gaz incolore et inodore (Hopkins, 2003).

C'est un élément essentiel pour toutes les formes de vie découvertes sur notre planète (Hopkins, 2003), par rapport à leur masse de matière sèche. Il est le 4^{ème} élément nutritif des plantes, constituant essentiel du protoplasme (Madigan et *al.*, 2007), des protéines, des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes. Il est donc combiné à la matière organique mais on le trouve aussi à l'état minéral sous forme de NH_4^+ , NO_3^- et NO_2^- (Hopkins, 2003).

L'azote favorise chez les végétaux l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Babo, 2002).

L'insuffisance ou la carence de cet élément chez les plantes se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (Tourte et *al.*, 2005). Les feuilles matures entrent en sénescence puisque leur azote est redirigé vers les feuilles croissantes. S'il y a excès, l'élongation des tiges est favorisée au détriment de la maturation et le développement racinaire est inhibé, pouvant mener à un approvisionnement inadéquat en eau et en éléments minéraux (Parent, 1999).

I.2. Fixation de l'azote

L'azote atmosphérique est fixé soit par un procédé industriel soit par voie naturelle et biologique.

I.2.1. Fixation industrielle de l'azote

L'industrie utilise le procédé Haber-Bosch pour briser le lien dans le diazote et le convertir en ammoniac, ce qui nécessite environ 500 et 450 bar et il faut l'équivalent de 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté par ce processus. Environ 80 à 109 kg d'ammoniac sont fabriquées chaque année par ce procédé. L'ammoniac produit peut être utilisé directement ou converti en nitrates ex. nitrate de sodium $NaNO_3$ ou nitrate d'ammonium NH_4NO_3 .

La moitié de l'engrais azoté utilisé en agriculture est absorbée par les plantes cultivées. Le reste est absorbé par d'autres plantes ou lessivé. Les hauts rendements

agricoles qui permettent de nourrir la population mondiale ne seraient pas possibles sans cette production industrielle d'engrais azoté (Peret, 2007).

I.2.2. Fixation biologique de l'azote

Les micro-organismes jouent un rôle important dans la fixation de l'azote atmosphérique.

Dans un système biologique fixateur d'azote, les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N₂ et une température de 30-35°C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères : pression de 250 à 1000 atm de N₂ et température de 450°C (Peret, 2007).

Ces microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à des groupes taxonomiques très divers regroupant une cinquantaine d'espèces bactériennes et de nombreuses cyanobactéries (Tableau I). Selon leur relation avec les plantes, on peut les classer en deux groupes:

a) Fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers: bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Azobacter*, *Aospirillum*, *diazotrophicus*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*), des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*), et des cyanobactéries (*Synechococcus*). Certains fixateurs libres dont *Azospirillum*, *Azotobacter paspali*, *Alcaligenes* et *Campilobacter* ont été décrits comme formant de véritables associations avec les racines de plantes (Elmerich et al., 1993).

Les associations vont de la plus simple multiplication bactérienne à la surface de la racine à la colonisation des espaces intracellulaires, caractéristiques des bactéries endophytes (Dobereiner et al., 1995).

b) Fixateurs symbiotiques

C'est le cas des systèmes associant des plantes de la famille des légumineuses et les rhizobia ou Bactéries Nodulant les Légumineuses (Moulin, 2002). D'autres actinomycètes du genre *Frankia* (bactéries Gram positif, filamenteuses et sporulantes) nodulent des plantes ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones tels que les aulnes (Benson et Silvester, 1993).

Dans la symbiose légumineuse-rhizobia, les plantes utilisent les produits de la fixation bactérienne de l'azote. En contrepartie, la plante hôte fournit aux bactéroïdes des composés carbonés, de l'énergie (Richter, 1993).

Chez les légumineuses, le symbionte est une bactérie appartenant à treize genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, ou *Azorhizobium* etc... (Davet, 1996).

Tableau I: Les microorganismes fixateurs d'azote (Dixon & Wheeler, 1988)

Micro-organismes libres	
Archaeobactéries	<i>Methanosarcina, Methanococcus</i>
Eubactéries	
Anaérobies	<i>Clostridium, Desulfovibrio, Desulfotomaculum</i>
Anaérobies facultatives	<i>Klebsiella, Erwinia, Enterobacter</i>
Microaérobies	<i>Azospirillum, Aquaspirillum, Arthrobacter</i>
Aérobies	<i>Azotobacter, Beijerinckia, Derrxia</i>
Photosynthétiques	<i>Rhodospseudomonas, Rhodospirillum, Chromatium</i>
Cyanobactéries	<i>Anabaena, Calothrix, Nostoc</i>
Systèmes symbiotiques	
Rhizobium - Légumineuses	
A croissance rapide	<i>Pisum, Trifolium, Vicia, Medicago, Lotus</i>
A croissance lente	<i>Arachis, Glycine, Vigna</i>
Rhizobium-non Légumineuses	
	<i>Parasponia</i>
Symbiose actinorhizienne	
	<i>Alnus, Casuarina, Myrica</i>
Associations Cyanobactéries -	
Angiospermes	<i>Gunnera</i>
Gymnospermes	<i>Agathis, Cycas, Macrozamia</i>
Ptéridophytes	<i>Azolla</i>
Bryophytes	<i>Anthoceros, Blasia, Caricula</i>
Lichens	<i>Collema, Lichina, Peltigera</i>

I.2.3. Mécanisme enzymatique de la fixation: la nitrogénase

Le complexe enzymatique de la nitrogénase, présent uniquement chez les procaryotes, est responsable de la fixation de l'azote moléculaire, c'est est une enzyme complexe, constituée de deux protéines associées : l'une est appelée la dinitrogénase (ou la nitrogénase II ou MoFe protéine) et l'autre est une réductase appelée la dinitrogénase réductase (la nitrogénase I ou Fe protéine) (Leclerc, 1995 et Rasanen, 2002).

La Fe-protéine contient un cluster unique de quatre ions fer liés à quatre groupements soufre (Fe₄S₄). La Mo- Fe-protéine contient deux ions molybdène sous la forme d'un cofacteur fer-molybdène-soufre, avec des clusters (Fe₄S₄) dont le nombre n'est pas connu avec précision (Werner, 1992; Hopkins, 2003) (Figure 1).

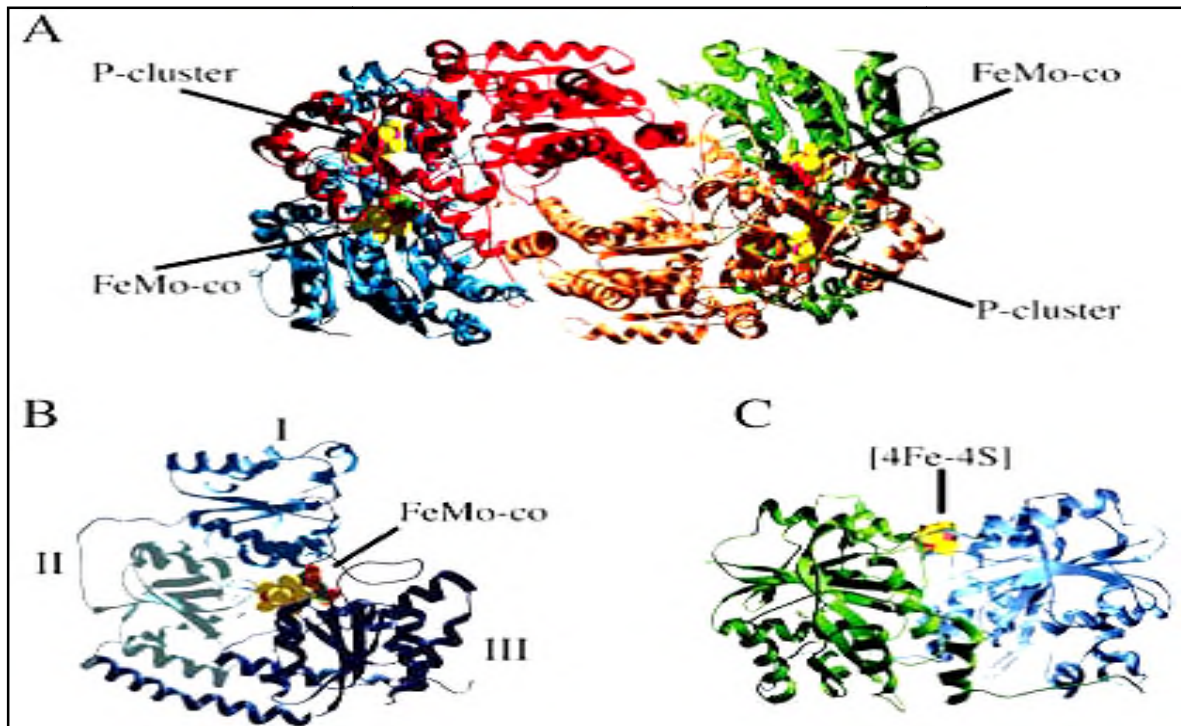
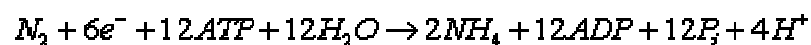


Figure 1: Structure de la nitrogénase (Rubio et Ludden, 2005).

Le complexe nitrogénase catalyse la réaction de fixation de l'azote atmosphérique. Cette enzyme n'existe que chez les organismes procaryotes. Elle est constituée de deux composants : le composant I est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités α représentées en bleu et vert et deux sous-unités β représentées en rouge et orange (A), le détail de la sous-unité α est donné (B) et le composant II est un homodimère (C).

La nitrogénase est le complexe enzymatique qui catalyse la réaction globale suivante :



Dans cette réaction (Figure 2):

- 1) la réductase qui, grâce à l'ATP modifie son potentiel redox et transmet alors des électrons à l'autre partie de l'enzyme.
- 2) la nitrogénase qui réduit l'azote moléculaire.

Le fonctionnement du complexe enzymatique qui est donc celui de réactions d'oxydoréduction ne peut se faire sans une alimentation en électron et un apport élevé en ATP

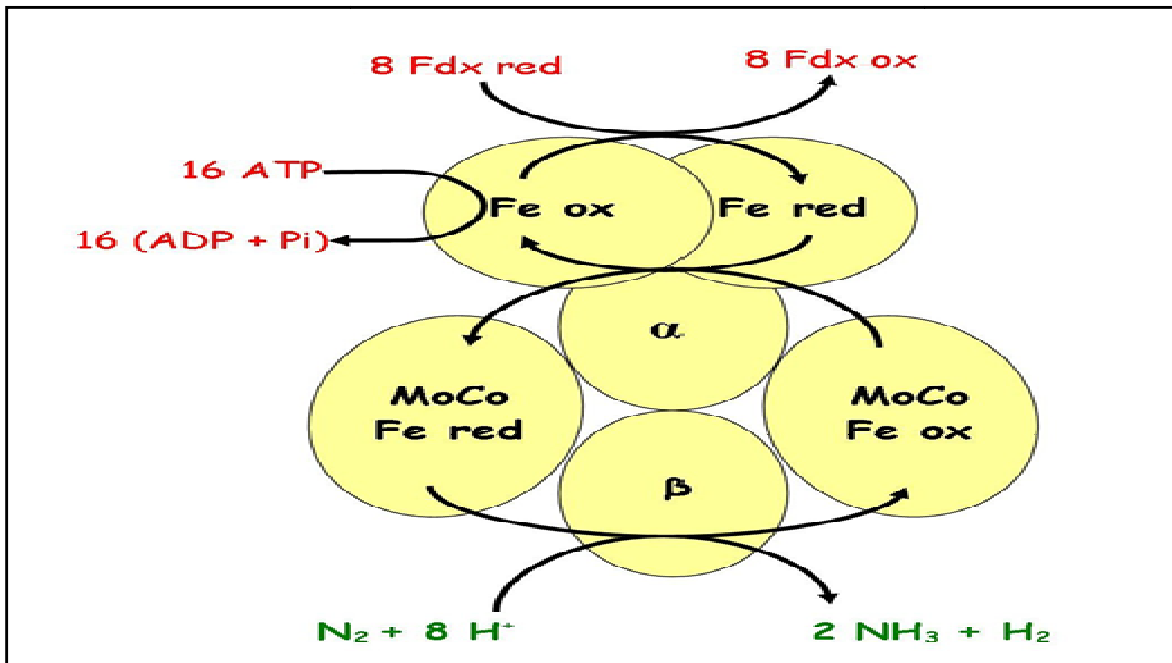
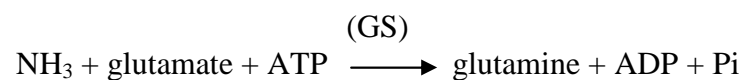


Figure 2: Cycle de la nitrogénase (Yann, 2006).

De plus, l'activité de la nitrogénase est contrôlée non seulement par la concentration du milieu en NH₄ mais également par la concentration en oxygène dont les molécules peuvent endommager de manière irréversible par oxydation l'enzyme. Dans les nodules des légumineuses, l'apport d'oxygène est régulé en grande partie par une protéine qui lie l'oxygène, la leghémoglobine (Werner, 1992; Davet, 1996).

Un dispositif intéressant de la fixation de l'azote, qui distingue les bactéries nodulaires des diazotrophes vivants libres, est le fait que l'ammoniac fixé est immédiatement excrété sans une autre assimilation par la bactérie. Cet ammoniac est alors assimilé dans les chloroplastes de la plante hôte par l'action combinée de deux enzymes : la glutamine synthétase (GS) et la glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) selon l'équation suivante :



Dans ce cas là, la glutamine représente un réservoir d'azote. Les deux acides glutamiques serviront dans un cas à transférer l'azote et l'autre à refixer un groupement amine (Brewin et al., 1992).

II. Légumineuses

De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales. Elles constituent une famille cosmopolite des zones froides aux zones tropicales (Graham et Vance, 2003). On y trouve des arbres, la plupart exotiques, voire des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles (Guignard et *al.*, 2004). Souvent volubiles et grimpantes, soit par enroulement soit grâce à des vrilles.

Les légumineuses sont classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones (Judd et *al.*, 2001), comprenant plus de 650 genres et environ 18000 espèces (Guignard et *al.*, 2004). Elles sont divisées en trois sous familles: les Papilionoïdées, les Mimosoïdées et les Caesalpinoïdées (Udvardi et *al.*, 2005).

- Les Papilionacées: devenues la famille des fabacées avec environ 500 genres et 1000 espèces ex : genêt, trèfle, que l'on rencontre majoritairement dans les régions tempérées.
- Les Mimosacées: avec environ 2000 espèces ex : *mimosa*, *acacia*.
- Les Césalpiniacées: comportant près de 2000 espèces ex : arbre de Judée.

La plus grande partie des légumineuses, 88% des espèces étudiées, interagissent avec des rhizobia pour former des nodules fixateurs d'azote (de Faria et *al.*, 1989 ; Hirsch et *al.*, 2001). De ce fait, les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Patriarca et *al.*, 2004 ; Gage, 2004 ; Stacey et *al.*, 2006).

II.1. Intérêts des légumineuses

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin et *al.*, 2001).

Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet et *al.*, 2006).

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40

millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001), qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une agriculture "durable" (réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote) (Journet et *al.*, 2001). Ainsi on réduit les coûts agricoles à travers une diminution des engrais industriels et la suppression de la contamination de l'environnement. Leur intérêt en tant que source importante de protéines pour alimentation des animaux peut venir dans la culture des espèces et / ou des variétés qui sont naturellement tolérantes au sel. Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols et la création de microsystème pour d'autres plantes. Elles jouent par ailleurs un rôle primordial dans la rotation des cultures (Baudoin et *al.*, 2001).

L'intérêt alimentaire est évident, en effet cette famille représente le 2ème rang mondial derrière les céréales. Ces plantes sont une source essentielle de protéines et de lipides, soit par les graines pour l'alimentation humaine, soit comme fourrage pour l'alimentation animale (Journet et *al.*, 2001). Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18% à 30% de la graine sèche) (Baudoin et *al.*, 2001).

Les légumineuses ont un grand intérêt économique. Elles sont utilisées comme aliments, gommés, teintures, résines, huiles et nombreux bois de construction (Wathan, 1967). La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants (Pinochet et *al.*, 2006).

II.2. Genre *Retama*

Les Retames sont des légumineuses arbustives, occupant les zones arides, semi-arides et côtières, qualifiées de plantes fixatrices de dunes.

II.2.1. Description botanique et répartition géographiques de *Retama*

Le genre *Retama* comprend trois espèces: *R. monosperma*, *R. raetam* et *R. spherocarpa* (Quezel et Santa, 1962) (Tableau II).

- *R. monosperma* (L.)Boiss

C'est un arbuste de 3m, dressé et aux rameaux pendants et soyeux lorsqu'ils sont jeunes. Les feuilles sont simples et caduques. Les fleurs sont blanches de 14-15 mm et réunies en grappes lâches. Les gousses à suture ventrale dilatée, ovoïdes (14mm) et rugueuses. L'étendard plus court que la carène.

- ***R. raetam* (Forska) Webb et Berth**

C'est un arbrisseau saharien de 1 à 3,5m, dressé et à rameaux veloutés rapidement aphyllés et sphéroïdes. Les feuilles sont simples, caduques et soyeuses. Les fleurs sont blanches de 8-10 mm et réunies en grappes lâches. Les gousses sont ovales (15 mm), terminées en bec et non dilatée sur sa suture ventrales (voir photo 1).

- ***R. sphaerocarpa* (L). Boiss**

R. sphaerocarpa est une légumineuse arbustive, endémique de la région méditerranéenne occidentale. Appelée également Retam à fruits ronds. C'est un arbrisseau atteignant 2 m, très ramifié et plus au moins dressé. Les feuilles sont simples, très petite et disposées en spirale. Les fleurs sont jaunes, petites (5 à 8mm), en grappe latérales dense, disposées sur rameaux âgés. Les gousses sont globuleuses, jaunes bruns (8 mm) et lisses. (voir photos 1).

Tableau II: Systématique de *Retama* (Quezel et Santa, 1962).

Règne	Eucaryote
Sous règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Ordre	Fabales
Famille	<i>Leguminoseae</i>
Sous famille	<i>Papillonoideae</i>
Genre	<i>Retama</i>
Espèces	<i>R. monosperma</i> <i>R. raetam</i> <i>R. sphaerocarpa</i>



Photos1: Aspect des plantes de *Retama* (Boulila et al., 2009).

Retama se localise sur les pourtours du bassin méditerranéen: Maroc, Algérie, Égypte, Espagne (Andalousie), Portugal, Italie, et dans le désert sud asiatique (Quezel et Santa, 1962; Unesco, 2012).

En Algérie (Figure 3) les rétames occupent une surface considérable du nord vers le sud (Benmiloud et al., 2011).

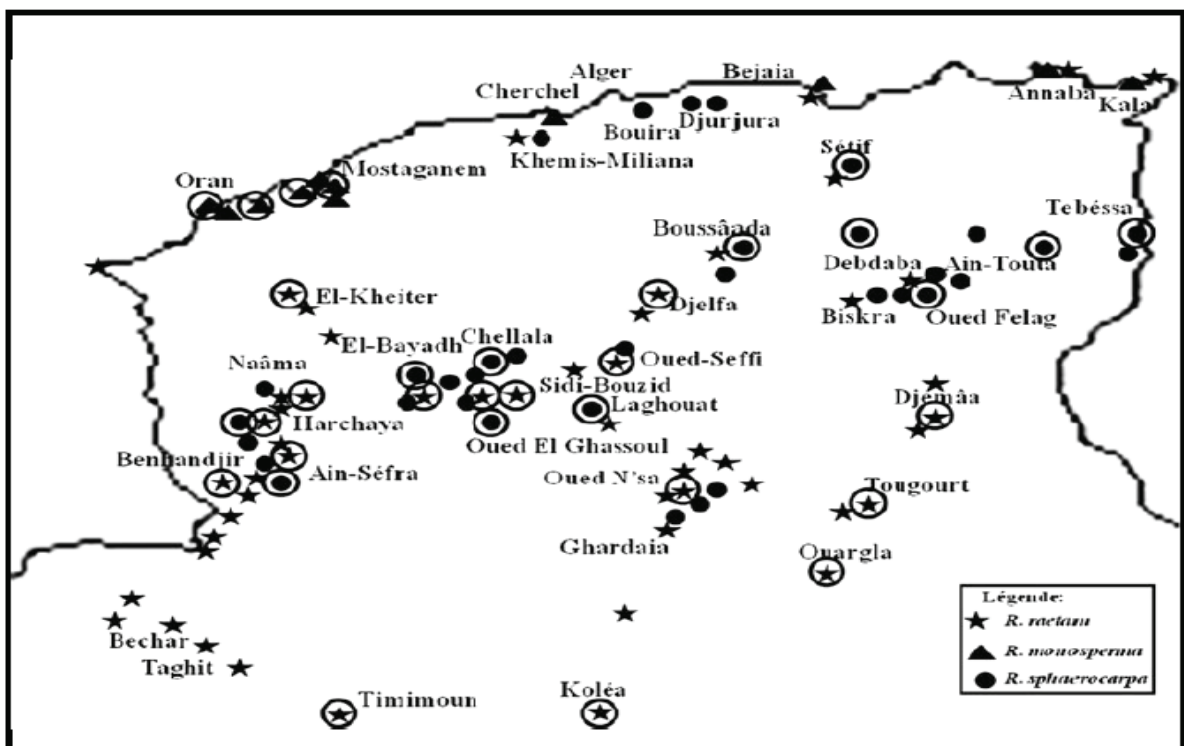


Figure 3: Répartition géographique des espèces de *Retama* en Algérie (Benmiloud et al., 2011).

Retama monosperma colonise de larges étendues sur le littoral oranais, le littoral algérois, et le long du littoral de la région de Jijel. *Retama raetam* est localisé dans le sud oranais, sud de Djelfa, Ain Safra, Touggourt, Bejaia, à l'est de Biskra (Ighil, 1962), également à Ouargla (Allal-benfakih, 2006), c'est une plante commune des écosystèmes arides qui entourent la méditerranée. Cette plante utilise comme stratégie d'acclimation une dormance partielle pour résister aux longues périodes de sécheresse (Mittler et al., 2000). *Retama sphaerocarpa* se trouve principalement au Djurdjura, Bouira, Ghardaïa, Djebel Amour et les plaines de Batna (Zohary, 1962).

II.2.2. Vertus de *Retama*

Retama sphaerocarpa joue un rôle majeur dans la revégétation et la fertilisation des sols des zones arides et semi-arides grâce aux associations symbiotiques avec les rhizobias et les mycorhizes (Boulila et al., 2009 ; Algacil et al., 2011). Cette plante a montré une résistance élevée contre des agents polluants des terres affectées (Moreno-Jiménez et al., 2008). Elle contribue également à la diminution de l'utilisation des engrais azotés et à la réduction de l'émission des gaz à effet de serre tel que les émissions en CO₂ et N₂O.

Les retames s'adaptent aux conditions les plus extrêmes de sécheresse et de salinité grâce à leurs morphologies et leurs structures xéromorphiques. Selon Mittler et al., 2000, *Retama raetam* s'adapte bien aux conditions les plus extrêmes, elle développe un mécanisme moléculaire qui lui permet de résister aux changements climatiques (manque de nutriments et stress hydrique) et cela en entrant dans une phase de dormance partielle, en inhibant l'expression de certains gènes, grâce à une enzyme de défense qui est l'ascorbate peroxydase (APx).

Sur le plan pharmaceutique et médicinal ; les trois espèces du genre *Retama* contiennent une trentaine d'alcaloïdes plus précisément des quinolizidines (la retamine, la spartéine et la cytisine) qui possèdent des activités hypoglycémiques, hypotensives, antipyrétiques et antibactériennes (El-Shazly et al., 1996). L'espèce *R. raetam* est utilisée en Tunisie comme un traitement traditionnel de l'hypertension et contre quelques maladies rénales (Edziri et al., 2007), alors qu'au Maroc elle est employée comme remède contre le diabète (Maghrani et al., 2003 ; Algandaby et al., 2010). En effet, des travaux, effectués sur des rats, ont montré que *R. raetam* contribue à la diminution du taux de triglycérides et du cholestérol dans le sang (Maghrani et al., 2004). Elle est également utilisée dans le traitement de plusieurs maladies comme l'eczéma, elle est utilisée dans le sud dans les soins en cas de morsures de serpents (El Hamrouni, 2001).

Les travaux réalisés par Louaar et *al.* (2007) sur *Retama spherocarpa* ont révélé que les extraits de ses feuilles possèdent une activité antibactérienne contre deux souches de *Staphylococcus aureus*. Tandis que, les travaux d'Edziri et *al.* (2007) et (2008), faits sur l'effet antibactérien des extraits floraux de *R. raetam* vis-à-vis de quelques souches Gram positif et Gram négatif, ont révélé une importante activité contre *S. aureus* et *E. coli*, ce qui ouvre la voie vers son éventuelle exploitation dans l'industrie pharmaceutique.

Les retames sont considérés comme un excellent fourrage, de plus leur bois est utilisé en chauffage. Ils sont riches en fibre, dont la longueur moyenne atteint 1,93mm (Bahi, 1991). Ils pourraient donc être valorisés dans l'industrie papetière. Les retames sont aussi des plantes ornementales en raison de leurs multiples fleurs odorantes, l'activité allélopathique de *Retama raetam* a été aussi mise en évidence, évoquant ainsi une potentielle utilisation pour le développement d'herbicides respectueux de l'environnement (Mitra, 2012).

III. Rhizobia

La symbiose rhizobia-légumineuses est de loin la plus étudiée car elle concerne beaucoup d'espèces d'intérêt agronomique (alimentation humaine et animale) et écologique. La biodiversité microbienne forme une ressource naturelle énorme pour l'humanité.

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

L'optimisation de la symbiose qui est généralement spécifique entre les légumineuses et le microsymbionte exige la présence dans la rhizosphère de souches compatibles, compétitives et infectives qui sont hautement effectives pour la fixation de l'azote et présentes par un nombre suffisant pour maximiser la nodulation (Vessey et Chemining, 2006).

III.1. Caractéristiques des rhizobia

III.1.1. Caractères morphologiques et culturels

D'un point de vue morphologique et microscopique les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) se présentent sous forme de bâtonnets à Gram négatif, mobiles (grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches) avec des dimensions approximatives de 0.5 à 0.8 μm de largeur et 1.3 à 3.0 μm de longueur (Werner, 1992).

Les BNL se trouvent sous deux formes :

- **La forme végétative** : les rhizobia sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 μm de largeur sur 1,2 à 3 μm de longueur. Pour les rhizobiums à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobiums à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **La forme bactéroïde** : à l'intérieur des cellule du cortex racinaire, les rhizobiums se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et *al.*, 2004).

Les rhizobia se développent facilement dans un milieu de culture proche de la neutralité avec une source de carbone et une source d'azote, à une température optimale de croissance de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Deux groupes de rhizobia se distinguent. Le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h. Le deuxième est le groupe des rhizobia à croissance lente, ce sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de rhizobiums (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou translucides, humides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994). Il est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson et *al.*, 2006).

III.1.2. Caractères biochimiques

Les rhizobia sont des bactéries chimioorganotrophes; elles utilisent des carbohydrates relativement simples et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances. 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. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose.

(Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobia n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

III.1.3. Caractères physiologiques

Le rhizobium est un micro-organisme aérobic ou micro-aérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6.8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Bradyrhizobium japonicum*. La température optimale se situe entre 25 - 30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

III.1.4. Caractères génétiques

La génétique du rhizobia n'est pas simple en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Pelmont, 1995).

Le génome des rhizobia 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 inférieur 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) sont situés sur ce simple réplicon symbiotique. Des gènes codant 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 de ce plasmide signifie un échange dans la spécificité de l'hôte (Pelmont, 1995). L'existence de séquences répétitives d'ADN est une caractéristique du génome. Elles peuvent fournir des emplacements pour la recombinaison et des réarrangements génomiques et des délétions d'ADN ayant pour résultat la perte ou des changements des propriétés symbiotiques. Cette instabilité génétique compromet l'utilisation des souches de *Rhizobium* dans la production commerciale d'inoculum (Raposeiras et al., 2002).

III.2. Méthodes d'étude des rhizobia

La taxonomie a pour but de rassembler des organismes partageant des caractéristiques communes en groupes ou taxons bien délimités (Zakhia et al., 2006), elle

comporte la classification, la nomenclature, et l'identification. La taxonomie bactérienne moderne est polyphasique, ceci signifie qu'elle est basée sur plusieurs techniques, chacune qui recherche l'information à différents niveaux cellulaires (protéines, acides gras, ADN...) (Tableau III). Les résultats obtenus sont combinés et analysés pour atteindre une "taxonomie de consensus" d'un micro-organisme.

Jusqu'en 1970, un nombre restreint de techniques de classification étaient disponibles pour des microbiologistes (principalement la caractérisation phénotypique a été exécutée: des capacités de nodulation d'espèce de légumineuse pour rhizobium, par exemple), cependant, la taxonomie basée sur le concept des groupes d'inoculation croisée a échoué en raison des nombreuses exceptions dans cette règle. Avec le développement des techniques basées sur la réaction en chaîne de polymérase pour la caractérisation, la classification des bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) a subi de grands remaniements dus à de nouvelles données phylogénétiques et polyphasiques menant finalement à la description de nouveaux taxons (Zakhia et De Lajudie, 2001).

Les premières classifications se basent sur les tests d'inoculation croisées entre les rhizobia et les plantes hôtes pour leur identification, la plante hôte n'était pas le critère unique tenu en compte pour la classification de *Rhizobium*, les espèces du *Rhizobium* ont été classifiées en deux genres : le *Rhizobium* et le *Bradyrhizobium* (Vincent, 1970).

- Le genre *Rhizobium*: regroupait les espèces à croissance rapide, *R. leguminosarum* avec les trois biovars (*viciae*, *trifolii*, *phaseoli*), *R. meliloti* et *R. loti*, *R. galegae*, *R. tropici*, *R. itli*; *R. huakuii*, *R. cicer*, *R. sullae*.
- Le genre *Bradyrhizobium* : regroupe les bactéries à croissance lente avec les espèces *B. japonicum*, *B. lupini*, *B. elkanii* (Zakhia et De Lajudie, 2001).

III.2.1. Taxonomie phénotypique

Les microorganismes sont caractérisés par une série de tests basés sur la vitesse de croissance, tolérance aux variations de pH et concentration en sels, croissance à différentes températures, la capacité d'utiliser les carbohydrates et acides aminés, la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ainsi que d'autres tests.

Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différents enzymes tels que la glutamate déshydrogénase, la glucose 6-phosphate déshydrogénase,

l'indole- phénol oxydase, la nitrate réductase, l'uréase, l'adénylate kinase ainsi que d'autres enzymes impliqués dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés.

Les systèmes commerciaux sont basés sur des systèmes miniaturisés et automatisés (API, BIOLOG....). Il s'agit d'une batterie de tests de caractérisation de microorganismes en présence de substrats (activité enzymatique, croissance,). Ces systèmes permettent de créer des bases de données intéressantes mais ils restent tout de même coûteux (Saoudi, 2008).

La taxonomie phénotypique aborde essentiellement :

a) Composition des parois cellulaires :

Cette analyse est beaucoup plus utilisée pour caractériser les bactéries à Gram positif pour la raison que leurs parois contiennent une diversité d'éléments informatifs (Schleifer et Kandler 1972).

b) Analyse des acides gras ou FAME ("fatty acid methyl ester")

Les acides gras sont les composants majoritaires des lipides cellulaires. Etant donné la variabilité de longueur de leur squelette lipidique, de la position de la double liaison ou aussi la variabilité des groupes de substitution présents sur leur chaîne, leur utilisation en taxonomie de procaryotes a donné de bons résultats (Jones et Krieg 1984; Suzukiet *al.*, 1993).

La technique FAME a été introduite pour la caractérisation des BNL par Jarvis et Tighe (1994). Cette méthode consiste en l'extraction des acides gras totaux de la cellule bactérienne et l'obtention de profil d'acides gras qui sont caractéristiques de la souche étudiée. Cependant cette méthode doit procéder à une standardisation du milieu et des conditions de culture, car la composition d'acides gras dans les cellules peut varier selon les conditions environnementales.

So et *al.* (1994) ont appliqué cette méthode pour étudier la diversité d'isolats de *Bradyrhizobium* isolés d'Aeschynomene, et la technique FAME donnait un résultat concordant avec les résultats obtenus avec le séquençage de l'ADNr 16S. Cette technique a un pouvoir résolutif qui peut aller jusqu'à la séparation des différentes espèces de bactéries nodulant les légumineuses (les espèces de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Agrobacterium*).

c) Profil des protéines cellulaires totales sur SDS-PAGE

Une cellule bactérienne contient plus de 2000 protéines différentes. Cela constitue une source d'information importante. La méthode SDS-PAGE consiste en l'extraction des protéines cellulaires totales que l'on fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, on obtient ainsi des profils caractéristiques de chaque souche bactérienne.

Deux microorganismes très proches doivent avoir des profils électrophorétiques similaires ou identiques. Le profil électrophorétique d'une souche donnée est le reflet du bagage génétique du microorganisme, et sa comparaison avec les profils d'autres bactéries permet de mesurer le degré de parenté avec ces microorganismes.

Robert et *al.* (1982) ont étudié la diversité de BNL en utilisant cette technique et depuis, son application a été très importante dans la taxonomie des BNL. Cette technique produit une discrimination variable selon les groupes bactériens étudiés. Cependant, elle trouve sa limitation dans le fait qu'elle nécessite un degré de standardisation très poussé (méthodologie précise, qualité des produits constante) qui rend les bases de données peu exportables d'un laboratoire à l'autre, et pose parfois des problèmes de reproductibilité dans le temps.

d) Electrophorèse multi locus des enzymes

Cette technique est présentée par Selander et *al.* (1986). La discrimination entre les isolats se fait sur la base de variation de la mobilité électrophorétique de certaines enzymes bactériennes (allozymes=variante de la même enzyme codée par le même gène mais par des allèles différents). En effet, la variation de mobilité observée est due à une différence dans la séquence d'acide aminé de l'enzyme et donc reflète une différence dans la séquence des paires de bases du gène codant pour cette enzyme. Au cours de l'analyse par MLEE, les enzymes bactériennes sont extraites et chargées sur gel d'amidon. Ensuite les bandes sont mises dans des solutions pour révéler la présence ou l'absence d'une enzyme. Dans le cas où l'enzyme est présente, sa mobilité est comparée pour les différents isolats.

La MLEE est relativement facile à mettre en œuvre, peu coûteuse et puissante. Elle renseigne sur plusieurs loci et permet des analyses génétiques. Cependant les modifications post traductionnelles peuvent constituer un écueil à l'analyse populationnelle.

III.2.2. Méthode numérique

La taxonomie numérique étudie un nombre important la fois de caractères phénotypiques pour une seule souche, la présence du caractère est codée par 1, l'absence du caractère est codée par 0. Elle permet le rassemblement des individus semblables dans ne

classe de similitude. Cependant cette étude ne permet pas d'évaluer tout le potentiel génétique d'une bactérie (Sneath et Sokal, 1973).

III.2.3. Méthodes génotypiques

Ces techniques ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Elles constituent les méthodes prépondérantes de la taxonomie moderne. Ceci est lié, d'une part, aux progrès technologiques réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire, et d'autre part, au fait que la nouvelle conception de la taxonomie doit refléter les similarités entre les génomes (Saoudi, 2008).

a) Détermination du pourcentage guanine et cytosine (%G+C):

Le premier élément des acides nucléiques à avoir été utilisé en taxonomie est le pourcentage de bases G et C (Johnson, 1984). Ce pourcentage varie chez les bactéries de 24% et 76%, notamment chez les rhizobia. Cette valeur de % G+C est généralement donnée dans la description d'une nouvelle espèce, d'autant qu'il est nécessaire de la détermination pour définir les conditions d'hybridation ADN/ADN.

b) Hybridation moléculaire ADN/ADN

L'hybridation de deux ADN provenant de deux souches différentes est un indicateur de la similarité des séquences d'ADN (Grimont et *al.*, 1980). Les méthodes classiques reposent sur la radioactivité de l'un des deux ADN afin de reconnaître l'origine de chaque brin, mais les plus couramment utilisées sont les techniques spectrophotométriques du taux de renaturation initiale (de Ley et *al.*, 1970) et la méthode de la nucléase S1 (Grimont et *al.*, 1980). L'hybridation ADN/ADN est aussi utilisée pour détecter le degré de parenté entre deux microorganismes (Tortora et *al.*, 2003).

c) Etude de l'homologie de séquence des gènes ribosomaux

Les ARN ribosomiques (5S, 16S, et 23S) constituent un outil de choix pour étudier les relations phylogénétiques grâce à sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que des parties à séquences variables (Stackebrandt et Goebel, 1994). Le développement de nouvelles techniques moléculaires a permis aux microbiologistes de faire l'étude comparative des molécules d'ARNr. La première molécule à être séquencée pour plusieurs bactéries est l'ARNr 5S grâce à ses structures primaires et secondaires moins complexes.

L'utilisation d'amorces conservées et de transcriptase inverse pour séquencer l'ARNr 16S a constitué une avancée importante dans la phylogénie bactérienne en

permettant l'augmentation spectaculaire du nombre de séquences. Toutes ces techniques sont principalement remplacées par le séquençage direct de toute ou partie de l'ADNr 16S ou 23S en utilisant les techniques de PCR et des amorces appropriées (Saoudi, 2008).

d) Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP)

La RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) consiste en la coupure de fragments d'ADN amplifiés ou non par des enzymes de restriction à des sites spécifiques composés par 4, 6 ou 8 bases nucléotidiques.

Dans la PCR-RFLP, les fragments amplifiés par PCR sont digérés par des enzymes de restriction puis révélés par électrophorèse. Le nombre et la différence de migration des différents fragments obtenus permettent l'évaluation et l'analyse du polymorphisme apparent. Une des techniques qui dérive de cette méthode est la PCR-RFLP du gène de l'ADNr 16S connu également par l'ARDRA (Vanechoutte et *al.*, 2004). Cette technique est largement utilisée pour l'étude de la diversité génétique ainsi que la classification des rhizobia (Laguerre et *al.*, 1994 ;1997).

e) Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

La PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) est un cas particulier de la RFLP. L'ADN est digéré avec des enzymes à faible fréquence de restriction. Par conséquent, les fragments obtenus sont plus faibles en nombre et plus grands en taille. L'analyse électrophorétique de ces fragments se fait par des modifications de la direction de migration à travers des changements successifs du courant. La vitesse de migration et la réorientation des fragments se fait selon leurs tailles respectives (Huber et Selenka-Pobell, 1994 ; Morton et *al.*, 2001).

f) Méthodes utilisant des amorces aléatoires (RAPD, l'AP-PCR, DAF)

La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) est une technique d'amplification aléatoire par PCR des séquences dispersées sur tout l'ADN génomique. Les amorces utilisées sont courtes, généralement 10 nucléotides, et sont non spécifiques, par conséquent l'amplification génère de nombreux fragments de différentes tailles qui permettent de caractériser une souche de rhizobium d'une autre (Vinuesa et *al.*, 1998).

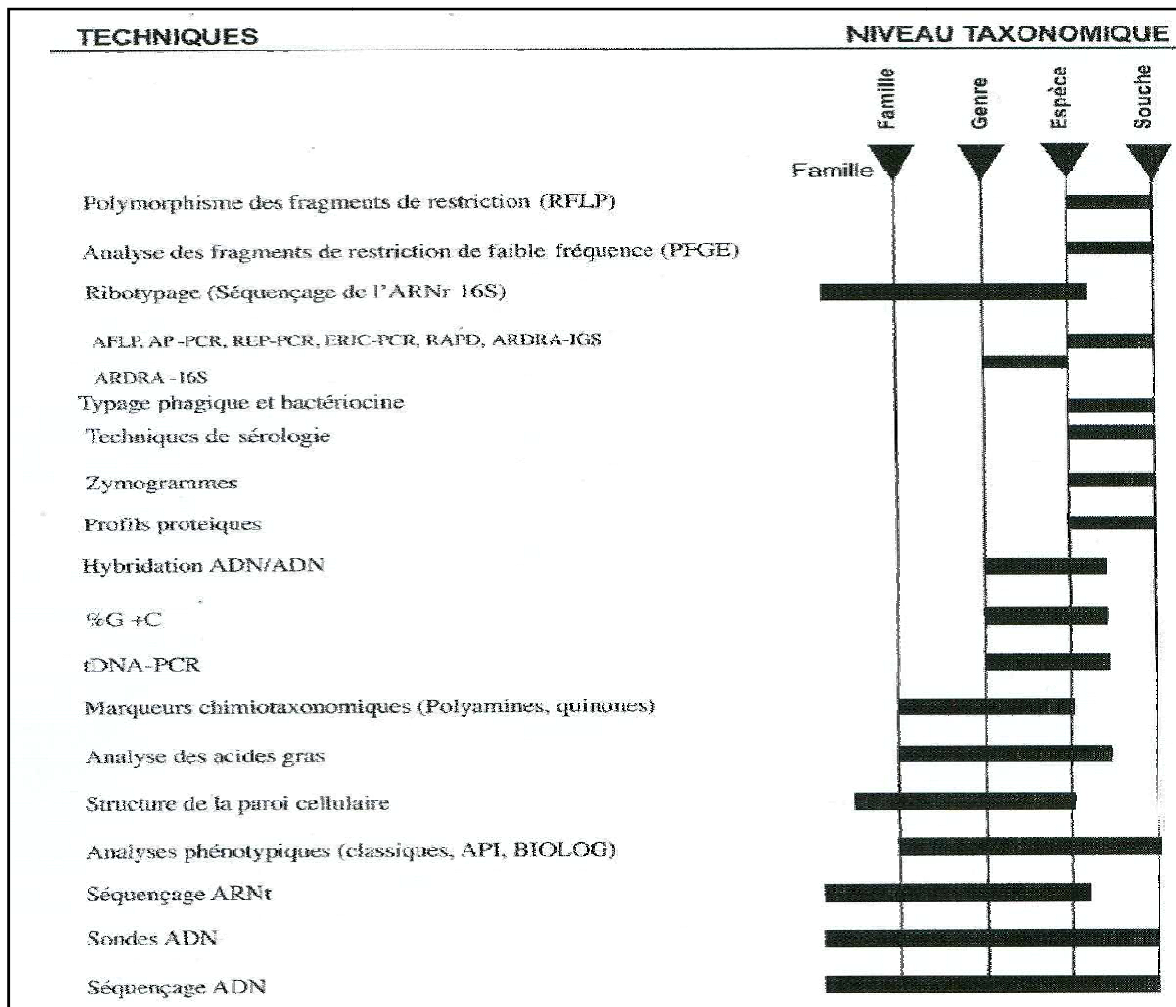
L'AP-PCR (Arbitrary primed PCR) utilise des amorces arbitraires de 10 à 20 nucléotides (Welsh et McClelland, 1990) alors que la technique DAF (DNA amplification fingerprinting) utilise des amorces dont la taille varie entre 5 et 10 nucléotides (Caetano-Anollés et Gresshoff, 1991). Ces techniques sont très sensibles aux variations infimes de la

concentration de l'ADN, des ions magnésium, de la polymérase et exigent une grande pureté de l'ADN (Berg et al., 1994) ce qui rend leur reproductibilité très limitée.

g) Polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (AFLP)

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est l'amplification sélective de fragments de restriction à partir de l'ADN génomique totalement digéré (Vos et al., 1995). La technique de l'AFLP permet une grande résolution génétique et elle est plus reproductible que les autres méthodes (Terefework et al., 2001).

Tableau III: Pouvoir discriminant des différentes techniques de la taxonomie polyphasique (d'après Vandamme et al., 1996, modifié par Zakhia et de Lajudie, 2001).



III.3. Classification des rhizobia

Les recommandations concernant les critères nécessaires pour classer les rhizobia au niveau du genre et de l'espèce ont fait l'objet d'une publication de l'*International Committee of Systematic Bacteriology* (<http://www.cme.msu.edu/Bergeys/>). Ces critères,

basés sur des données phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques constituent un guide pour la validation de nouveaux taxons (Graham *et al.*, 1991). 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 ET Beta (Chen *et al.*, 2007).

Weir, 2013 a fait une synthèse de tous les rhizobia (voir tableau IV), d'après cet auteur les rhizobia constituent 12 genres et 95 espèces.

Tableau IV: Classification des bactéries nodulants les légumineuses (Weir, 2013).

<i>Rhizobium</i>	
<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al. (2009)
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	Lu et al. (2009b)
<i>Rhizobium cellulosityticum</i>	García-Fraile et al. (2007)
<i>Rhizobium daejeonense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	López-López et al. (2011)
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium galegae</i>	
<i>Rhizobium gallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium hainanense</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Ren et al. (2011b)
<i>Rhizobium huautlense</i>	
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Espèce type.
<i>Rhizobium loessense</i>	Autrefois <i>Rhizobium huanglingense</i>
<i>Rhizobium lusitanum</i>	
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin et al. (2009)
<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu et al. (2008)
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han et al. (2008)
<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng et al. (2008)
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou et al. (2009)
<i>Rhizobium sullae</i>	Autrefois <i>Rhizobium hedysari</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang et al. (2011)
<i>Rhizobium undicola</i>	Autrefois <i>Allorhizobium undicola</i>
<i>Rhizobium vignae</i>	Ren et al. (2011)
<i>Rhizobium yanglingense</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i>	
<i>Mesorhizobium albiziae</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	Chen et al. (2010)

<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
<i>Mesorhizobium australicum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Chen et al. (2011)
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Autrefois <i>Rhizobium ciceri</i>
<i>Mesorhizobium gobiense</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium huakuui</i>	Autrefois <i>Rhizobium huakuui</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	Autrefois <i>Rhizobium loti</i> , espèce type
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Autrefois <i>Rhizobium mediterraneum</i>
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	Vidal et al. (2009)
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	Zhou et al. (2010)
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	Lu et al. (2009)
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
<i>Mesorhizobium tarimense</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Autrefois <i>Rhizobium tianshanense</i>
<i>Ensifer</i> (autrefois <i>Sinorhizobium</i>)	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i>	
<i>Ensifer abri</i>	
<i>Sinorhizobium americanum</i>	
<i>Ensifer arboris</i>	
<i>Ensifer fredii</i>	Autrefois <i>Rhizobium fredii</i> , forme Type de <i>Sinorhizobium</i>
<i>Ensifer garamanticus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer indiaense</i>	
<i>Ensifer kostiensis</i>	
<i>Ensifer kummerowiae</i>	
<i>Ensifer medicae</i>	
<i>Ensifer meliloti</i>	Autrefois <i>Rhizobium meliloti</i>
<i>Ensifer mexicanus</i>	Lloret et al. (2007)
' <i>Sinorhizobium morelense</i> '	
<i>Ensifer adhaerens</i>	
<i>Ensifer numidicus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer saheli</i>	
<i>Ensifer sojae</i>	Li et al. (in press)
<i>Ensifer terangae</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i>	
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	Autrefois <i>Blastobacter denitrificans</i> ;
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	Islam et al. (2008)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Autrefois <i>Rhizobium japonicum</i> , sp type
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)

<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	
<i>Burkholderia</i>	
Classe: <i>Betaproteobacteria</i> Ordre: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i>	
<i>Burkholderia caribensis</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	
<i>Burkholderia mimosarum</i>	
<i>Burkholderia nodosa</i>	Chen et al (2007)
<i>Burkholderia phymatum</i>	
<i>Burkholderia sabiae</i>	Chen et al (2008)
<i>Burkholderia tuberum</i>	
<i>Microvirga</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Methylobacteriaceae</i>	
<i>Microvirga lupini</i>	Nouveau: Ardley et al. (in press)
<i>Microvirga lotononidis</i>	Nouveau: Ardley et al. (in press)
<i>Microvirga zambiensis</i>	Nouveau: Ardley et al. (in press)
<i>Azorhizobium</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i>	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Espèces type Dreyfus et al. en 1988
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	Autrefois <i>Azorhizobium johannae</i>
<i>Ochrobactrum</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Brucellaceae</i>	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	Zurdo-Piñeiro et al. 2007
<i>Ochrobactrum lupini</i>	
<i>Methylobacterium</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Methylobacteriaceae</i>	
<i>Methylobacterium nodulans</i>	
<i>Cupriavidus</i>	
Classe: <i>Betaproteobacteria</i> Ordre: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i>	
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	
<i>Devosia</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i>	
<i>Devosia neptuniae</i>	
<i>Shinella</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i>	
<i>Shinella kummerowiae</i>	Lin et al. (2008)

L'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S et IGS 16S-23S de l'ADNr des symbiotes isolés des nodules racinaires de *R. raetam* des régions arides de Tunisie a montré que ces isolats s'apparentent à *Mesorhizobium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* et *Rhizobium* (Mahdhi et Mars, 2006 ; Mahdhi et al., 2008). D'autres travaux (Rodriguez - Echevarría et al., 2003) sur l'analyse de séquences partielles de l'ADNr 16S des isolats de *R.*

sphaerocarpa d'Espagne ont montré leur appartenance au genre *Bradyrhizobium*. Actuellement 9 espèces de *Bradyrhizobium* ont été décrites (voir tableau IV).

Les travaux effectués sur l'analyse phylogénétique basée sur les séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S des 67 isolats de *Retama sphaerocarpa* et *Retama raetam* d'Algérie ont montré leur appartenance au genre *Bradyrhizobium* (voir la figure 4). En outre l'arbre phylogénétique basé sur l'ADNr 16S-23S (IGS) (voir la figure 5) et les gènes de ménages de ces souches ont déterminés trois groupes qui pourraient être décrits comme nouvelles espèces (Boulila et *al.*, 2009).

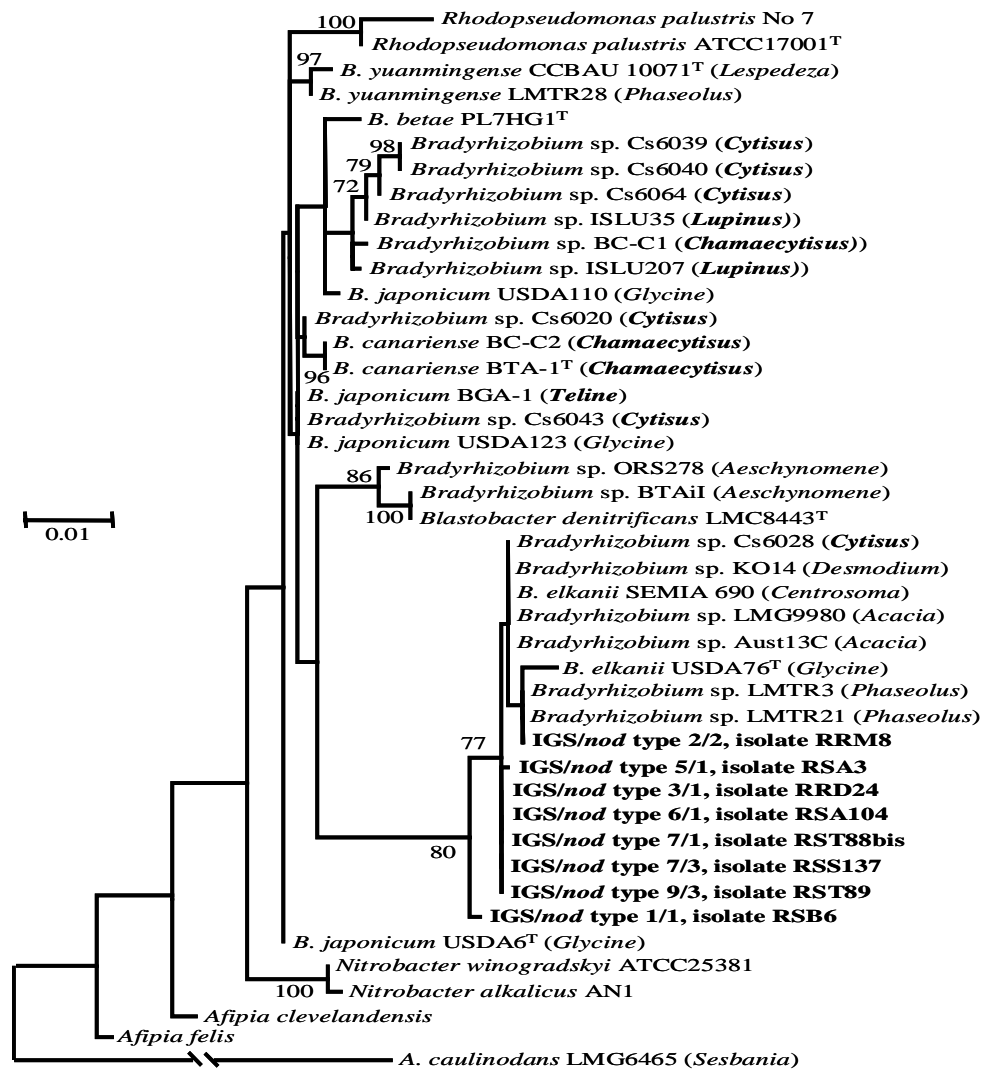


Figure 4: l'arbre phylogénétique ML basé sur l'alignement de 1289 pb de séquences nucléotidiques du gène de l'ARNr 16S. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont $\geq 70\%$. Les isolats de *Retama* sont indiqués en gras. La lettre "T" indique la souche type de l'espèce. L'abréviation des genres bactériens est comme suit: A, *Azorhizobium*; B, *Bradyrhizobium*. Les numéro d'accèsion des séquences extraites à partir de GenBank sont comme suit: LMG6465, X67221; *Afipia felis* M65248; *Afipia clevelandensis*, M69186; USDA123, AF208504; CS6043, AJ810373; BGA-1, AJ558024; USDA110, BA000040; LMC8443^T, S46917; BTAiI, CP000495 (génom complet); ORS 278, CU234118 (génom complet); PL7HG1^T, AY372184; CS6039, AJ810376; CS6040 AJ810377; ISLU207, AJ558028; BC-C1, AJ558030; ISLU35, AJ558031; CS6064, AJ810375; KO14, AB367695; LMTR21, AY923031; LMTR3, AY923030; CS6028;

AJ810378; USDA76^T, U35000; SEMIA 690, FJ025107; LMG9980, X70404; Aust13C, AY603956; BTA-1^T, AJ558025; BC-C2, AY577427; CS6020, AJ810374; USDA6^T, U69638; CCBAU 10071^T, AF193818; LMTR28, AF485365; ATCC17001, AF123087; No.7, AF184626; AN1, AF069956; ATCC2581, L35506 (Boulila et al., 2009).

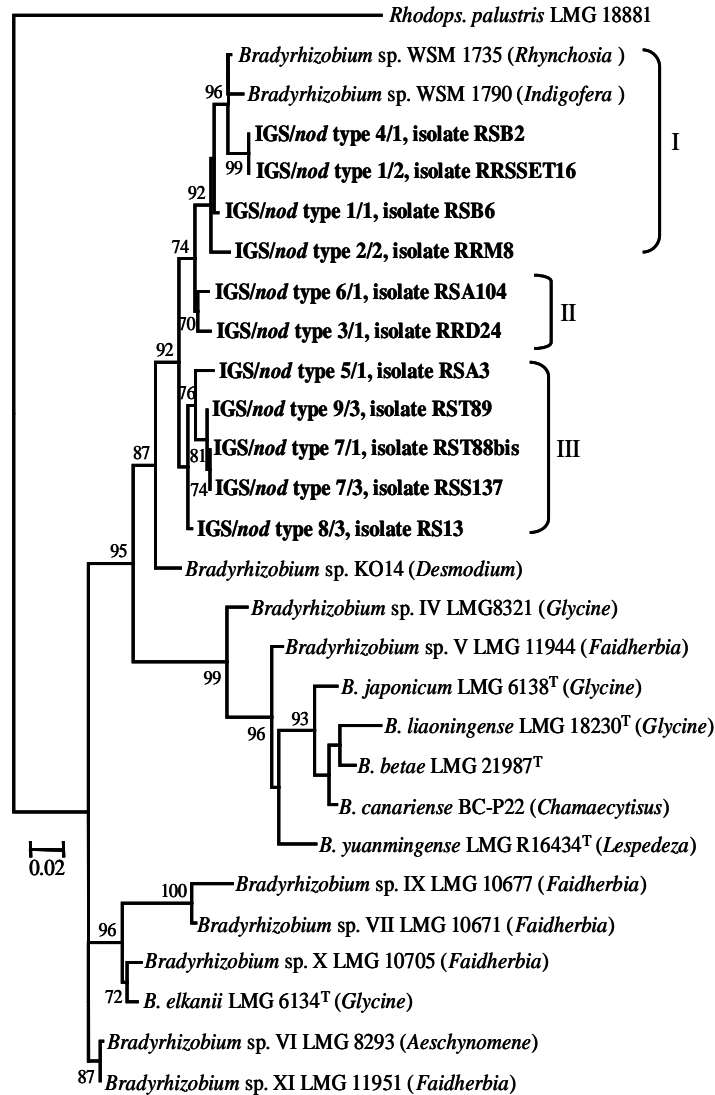


Figure 5: Arbre phylogénétique ML basé sur alignement de 569 bp de séquences nucléotidiques de l'IGS ADNr 16S-23S. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont $\geq 70\%$. Les isolats de *Retama*, représentant chaque haplotype sont indiqués en gras. La lettre "T" indique la souche type de l'espèce. *Rhodops* veut dire *Rhodopseudomonas*. Les numéros d'accès des séquences extraites de GenBank sont les suivants: LMG 18881, AJ534608; WSM 1735, AJ891244; WSM 1790, AJ891246; KO14, AB367716; LMG 8321, AJ279317; LMG 11944, AJ279287; LMG 6138^T, AJ279264; LMG 18230^T, AJ279301; LMG 21987^T, AJ631967; BC-P22, AY386706; LMG R16434^T, AJ534605; LMG 10677, AJ534597; LMG 10671, AJ279272; LMG 10705, AJ534592; LMG 6134^T, AJ279308; LMG 8293, AJ279311; LMG 11951, AJ534594 (Boulila et al., 2009)

IV. Interaction légumineuse-rhizobia

Les légumineuses établissent une relation symbiotique avec les bactéries du sol, le rhizobium, cette association se manifeste par la formation sur les racines des légumineuses

hôtes des organes spécialisés, les nodosités. Au sein desquels, les rhizobia réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, assimilable par les plantes (Lindström et *al.*, 2002; Dénarié et *al.*, 2004) (Figure 6). La formation de ces nodosités exige une collaboration génétique intime entre les bactéries et la plante (Michelle, 2006).

L'association entre les rhizobia et les légumineuses est facilitée par l'interférence moléculaire qui a lieu dans la rhizosphère (Terefework, 2002). L'interaction plante – rhizobia est hautement spécifique. Une espèce bactérienne n'affecte et nodule qu'un nombre défini d'espèce végétale, néanmoins le degré de spécificité est variable selon la souche bactérienne et la plante hôte (Debellé et *al.*, 2001). En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries et le processus est appelé nodulation (Brewin et *al.*, 1992).

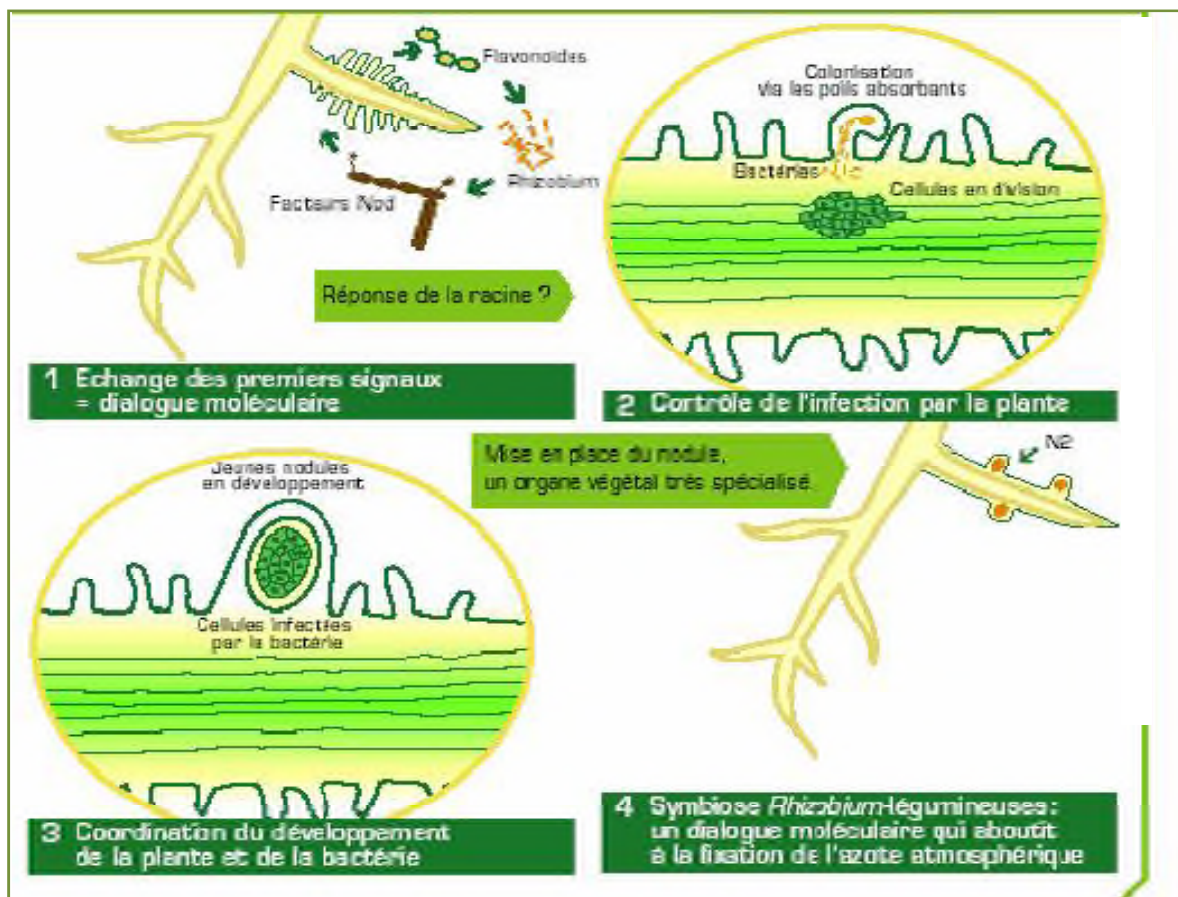


Figure 6: Interaction légumineuse-rhizobia (Journet, 2004).

IV.1. Nodulation

Le processus d'infection et de formation des nodules (Figure 9) est divisé en quatre étapes majeures: la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Sanchez et *al.*, 1991).

1)- Préinfection

Lors de l'étape de pré-infection (de quelques heures à 24h post inoculation), les bactéries provoquent au niveau des différents tissus racinaires de la plante hôte, diverses réponses qui sont présumées préparer les étapes d'infection / organogenèse nodulaire. Il est bien établi que cette étape s'initie par un dialogue moléculaire spécifique entre les deux partenaires. Dans un premier temps, les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires de la plante vont induire chez la bactérie des gènes *nod* qui codent pour des protéines impliquées dans la biosynthèse et la sécrétion de facteurs « Nod » ou FNods.

Les FNods sont des signaux symbiotiques clés requis pour la reconnaissance plante hôte-bactérie, ainsi qu'au cours des étapes d'infection et d'initiation de l'organogenèse nodulaire (Cooper et *al.*, 2007)

Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques physiologiques et moléculaires chez la plante hôte. La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures après inoculation chez *M. sativa* (Wais et *al.*, 2002). Elle fait intervenir des changements dans l'arrangement des microtubules (Timmers et *al.*, 2007).

2)- Infection

L'infection consiste en la pénétration des rhizobiums en différents points du système racinaire (Hopkins, 1999). On distingue deux types d'infection : la voie intracellulaire et la voie intercellulaire.

Au cours de l'infection intracellulaire (Figure 8), la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire qui crée une zone confinée dans laquelle la bactérie est entourée par la paroi végétale. Un cordon d'infection est initié à partir de ce point par hydrolyse de la paroi (Mateos et *al.*, 2001), invagination de la membrane végétale et production de matériel pariétal par la plante (Gage et Margolin, 2000; Gage, 2004).

Le cordon d'infection est une structure tubulaire qui croît à l'intérieur de la cellule et dans laquelle la bactérie prolifère (Van Brussel et *al.*, 1992).

L'infection intercellulaire se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, ou bien parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Pawlowski et Bisseling, 1996). Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection.

3)- Développement du nodule

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi, 2000). Les nodules de type indéterminé (Figure 7, A) (*M. truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les

nodules de type déterminé (Figure 7, B) (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe. La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée (Timmers et al., 1999). Toutes les cellules du cortex ne se divisent pas, ce qui semble indiquer que la susceptibilité de ces cellules pourrait être liée à un statut particulier, notamment une modification de la concentration en hormones (Mathesius et al., 2000a). De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de préinfection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (Van Brussel et al., 1992). Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation.

L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de « pseudonodules » (Fang et Hirsch, 1998) suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule. De plus, les facteurs Nod produits par rhizobium avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante.

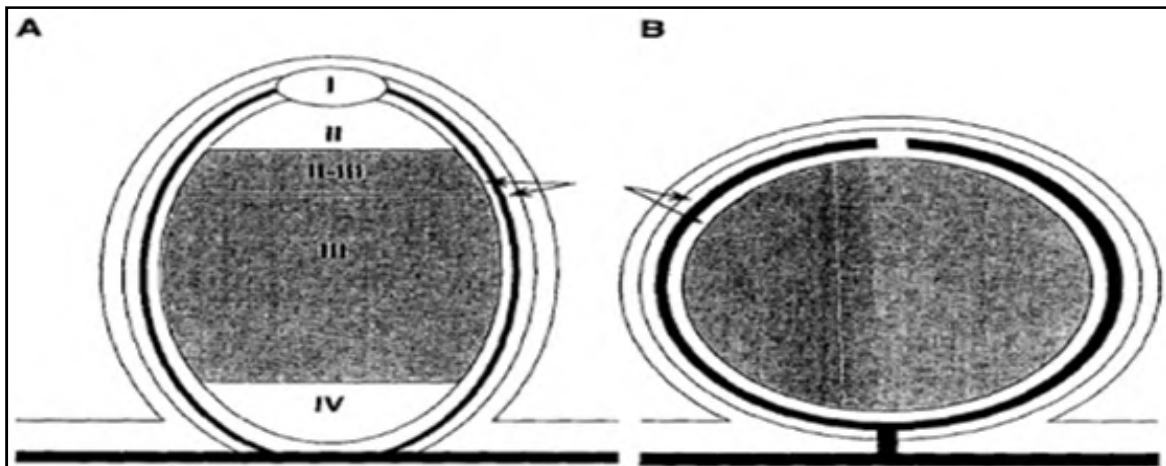


Figure 7: Types nodulaires chez les légumineuses (Pawlowski et Bisseling, 1996). Nodule de type indéterminé présentant une zone méristématique (I), une zone de préfixation (II), une zone de fixation (III) et une zone de sénescence (IV) (A). Nodule de type déterminé (B). pn : parenchyme nodulaire.

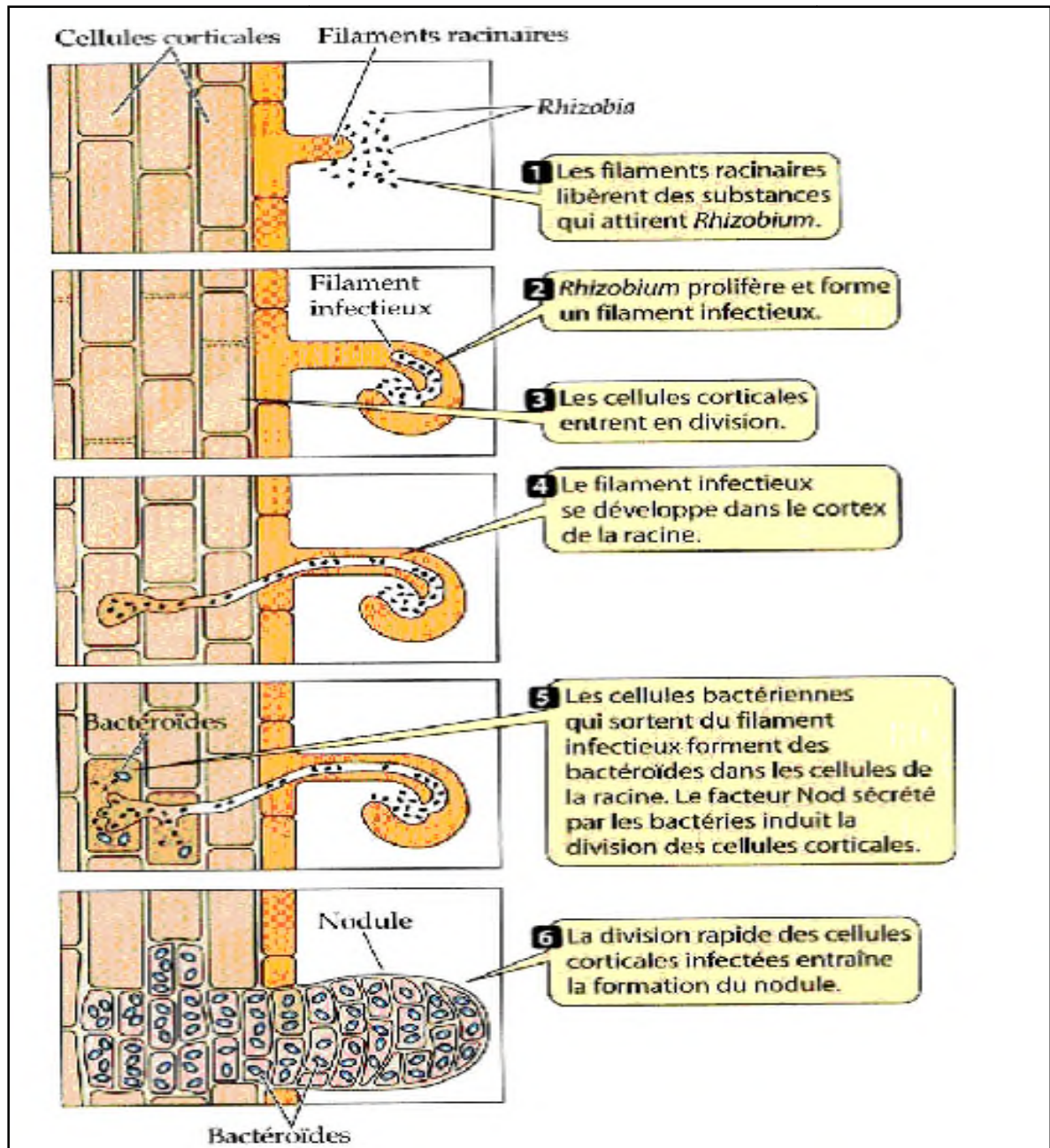


Figure 8: Processus de la nodulation (Perry et al., 2004).

IV.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie

Un certain nombre de gènes bactériens indiqués *nod* et *nol* est exigé pour la nodulation. Ces gènes sont localisés sur un grand plasmide appelé plasmide Sym, mais de tels gènes sont situés sur le chromosome chez le *Bradyrhizobium* et le *Azorhizobium* (Sharma et al., 1993). Plusieurs groupes de gènes de microsymbionte contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote.

IV.2.1. Gènes *nod* : Trois ensembles de gènes interviennent dans les premières étapes de la nodulation :

☞ **Les gènes *nod* communs** : les gènes *nod* ABCJI sont présents chez tous les rhizobia étudiés jusqu'ici et les mutations dans ces gènes mènent à un phénotype Nod. Ces gènes codent pour les étapes conservées évolutives essentielles pour le processus de nodulation (Sharma et al., 1993). Les gènes *nod* communs comportant *nod* A, B, C, J et I sont situés sur un opéron duquel *nod* ABC sont essentiels pour la nodulation. Ces derniers sont fonctionnellement interchangeables entre les espèces et nécessaires notamment pour induire le curling et inciter les cellules végétales à se diviser (Pelmont, 1995).

☞ **Les gènes *hsn*** : (host specific nodulation) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables (Pelmont, 1995). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia (Sharma et al., 1993). Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet, 1996).

☞ **Les gènes *nodD*** : gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoides (Pelmont, 1995).

IV.2.2. Gènes *nif* : La synthèse de la dinitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (Hopkins, 2003). Ces gènes comprennent les gènes structuraux de la nitrogénase ; *nifH*, *nifD*, *nifK* dont *nifH* code pour la réductase et *nifD* et *nifK* pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Pelmont, 1995). Aussi les gènes par exemple, *nifB*, *nifE* sont impliqués dans la synthèse du cofacteur FeMo qui est nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase (Brewin et al., 1992).

IV.2.3. Gènes *fix* : Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Brewin et al., 1992 ; Hopkins, 2003).

IV.2.4. Autres gènes : Les gènes affectant les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides (*exo* et *lps*) et les déterminants pour la prise d'acide dicarboxilique par les bactéroïdes (*dct*) peuvent être nécessaires pour la symbiose mais pas uniquement exprimés en état symbiotique (Brewin et al., 1992).

IV.3. Génétique de la nodulation chez la plante

Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite la production par les cellules hôtes d'un certain nombre de protéines nommées nodulines en réponses à des stimuli

provenant des bactéries symbiotiques. Ces protéines sont codées par des gènes NOD localisés dans le génome des cellules hôtes (Davet, 1996; Hopkins, 2003). Une distinction est parfois faite entre les nodulines tardifs, qui sont exprimés autour du début de la fixation de l'azote, et les nodulines précoces, qui sont exprimés aux étapes initiales de l'infection et du développement de nodule (Brewin et *al.*, 1992).

Certaines nodulines sont des enzymes du métabolisme azoté (glutamine synthétase, GOGAT) ou carboné (saccharose synthase, PEP carboxylase). La plus spectaculaire est une protéine qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la légghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène, et ce dispositif est indispensable à la fixation de l'azote (Pelmont, 1995).

IV.3.1. Substances responsables de la nodulation

IV.3.1.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés excrétés des plantes, les plus importants de la perspective symbiotique (Perret et *al.*, 2000). Ces substances phénoliques sont les facteurs les plus subtils qui aident les associés à s'assortir (Broughton et *al.*, 2000). Les flavonoides, qui incluent des isoflavones, des chalcones, des flavonols, des flavones, et des anthocyanidines et autres composés relatifs induisent des gènes pour la nodulation (Terefework, 2002), déclenchent spécifiquement leur expression (Perret et *al.*, 2000), et interagissent avec les protéines NodD qui servent comme sondes environnementales et activateurs de transcription (Broughton et *al.*, 2000). Parfois, les flavonoides sont catabolisés et leur dégradation pourrait mener à l'apparition de quelques composés qui peuvent être des inducteurs plus efficaces des gènes *nod* qu'eux même (Broughton et *al.*, 2000). Bien que des petites quantités sont excrétés sans interruption, les concentrations des flavonoides dans la rhizosphère augmentent en réponse des rhizobia compatibles (Broughton et *al.*, 2000). Habituellement, les rhizobia les plus promiscueux sont induits par un grand nombre de flavonoides et de composés relatifs (Terefework, 2002). La capacité induisant change avec les flavonoides et le rhizobia et dans certains cas des flavonoides telles que le chrysin peuvent contrarier l'induction des gènes *nod* (Perret et *al.*, 2000 ; Terefework, 2002).

En plus de l'induction des gènes *nod*, les flavonoides semblent avoir des rôles multiples pendant plusieurs étapes du développement du nodule et de la plante (Terefework, 2002), et leur production est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle la plupart des nodules se développent plus tard (Broughton et *al.*, 2000).

IV.3.1.2. Facteurs Nod

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia, est une étape essentielle dans la nodulation. Les signaux Nod, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod sont des molécules lipochitoooligosaccharidiques (Terefework, 2002). Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial. La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nodABCD* qui codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs Nod, et les gènes *hsn* qui codent pour les diverses substitutions des facteurs Nod (Debellé et *al.*, 2001). La longueur et la saturation des composants de substitués d'acides gras du noyau lipooligosaccharide, le type et la position des divers substitués sur les facteurs Nod, jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

IV.3.1.3. Autres substances

D'autres produits semblent être nécessaires pour le développement continu du fil d'infection et de l'organogenèse du nodule, et ceux-ci représentent un troisième ensemble de signaux, tel que: les polysaccharides extracellulaires (EPS), les lipopolysaccharides, les K antigènes, les glucanes cycliques, les lectines et les protéines exportés par le système de sécrétion de type trois (TTSS) (Broughton et *al.*, 2000; Terefework, 2002).

Matériel et méthodes

I. Présentation du matériel biologique

Cette étude porte sur la caractérisation phénotypique de 10 souches appartenant au Laboratoire d' Ecologie Microbienne (voir tableau V). Ces souches sont représentatives d'une collection obtenue des nodules racinaires de *Retama* du Nord-Est d'Algérie (Boulila et al., 2009), identifiées comme appartenant a genre *Bradyrhizobium*. 6 souches types appartenant au même genre sont utilisées comme références.

Tableau V: Souches utilisées dans cette étude

Souches	Plante –hôte	Source
RST88 Bis	<i>R. spherocarpa</i>	Boulila et al., 2009
RST6	<i>R. spherocarpa</i>	
RSB2	<i>R. spherocarpa</i>	
SSET16	<i>R. spherocarpa</i>	
RS13	<i>R. spherocarpa</i>	
RM8	<i>R. monosperma</i>	
RSA104	<i>R. spherocarpa</i>	
RD24	<i>R. raetam</i>	
RST89	<i>R. spherocarpa</i>	
RSA3	<i>R. spherocarpa</i>	
<i>B. jicamae</i> PAC6P	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramirez–Bahena et al., 2009
<i>B. betae</i> PL7HG1	<i>Beta vulgaris</i>	Rivas et al.,2004
<i>B. cytisi</i> CTAW11	<i>Cytiss villosus</i>	Chahboune et al., 2012
<i>B. japonicum</i> USDA6	<i>Glycine max</i>	Jordan, 1982
<i>B. pachyrhizi</i> PACU8	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramirez–Bahena et al., 2009
<i>B. elkanii</i> USDA76	<i>Glycine max</i>	Kuykendall et al., 1992

II. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes

II.1. Caractérisation morphologique des colonies

Les caractéristiques morphologiques des colonies sont étudiées à travers la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect de la surface, l'élévation et la production des exopolysaccharides. Cette description se fait sur des colonies obtenues sur milieu YMA après 10 jours d'incubation à 28°C.

II.2. Caractérisation cytologique des souches bactériennes

La forme, la mobilité et la présence des poly β -hydroxybutyrates (PHB) ont été déterminées par observation au microscope photonique (grossissement 100) à l'état frais d'un frottis bactérien issu d'une colonie âgée de 6 à 10 jours. Le test Gram est pratiqué selon la méthode classique de microbiologie qui consiste à réaliser une coloration spéciale d'un frottis bactérien.

II.3. Détermination du temps de génération et du taux de croissance

La détermination du temps de génération et du taux de croissance a été réalisée sur milieu YMB. Les tubes ont été ensemencés par quelques colonies prélevées d'une culture sur milieu YMA. Une absorbance a été mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$ dès l'inoculation des tubes et a été considérée comme étant la D.O à $t = 0$. L'incubation a été réalisée à 28°C et la cinétique de croissance est suivie par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$ avec un intervalle de 24 h pendant 12 jours.

Le temps de génération et le taux de croissance sont déterminés par l'équation suivante :

$$G = t \log 2 / (\log X - \log X_0)$$

D'où : $T = 1/G$

G : temps de génération (h).

T : taux de croissance (h^{-1}).

II.4. Caractérisation physiologique

Les souches ont subi une série de tests physiologiques impliquant plusieurs paramètres afin d'évaluer leur aptitude de croissance dans des conditions de température, de pH et de salinité différentes.

Pour tous les tests, les milieux sont inoculés par 10^7 cellules bactériennes dénombrées sur cellule Malassez. L'évaluation de la croissance est estimée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde $\lambda = 630$ nm.

II.4.1. Effet du pH sur la croissance

L'étude de l'effet du pH sur la croissance des souches bactériennes a été réalisée sur milieu YMB ajusté à des pH allant de 4 à 11. L'incubation se fait à 28°C pendant 6 jours. Trois répétitions sont réalisées pour chaque pH.

II.4.2. Effet de la température sur la croissance

L'effet de la température sur la croissance des souches a été étudié sur milieu YMB dont le pH a été ajusté à 6,8, après inoculation, les tubes sont incubés pendant 6 jours à des températures de 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C et 36°C. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque température.

II.4.3. Effet du NaCl sur la croissance

L'effet de la salinité sur la croissance des souches a été déterminé sur milieu YMB ajusté à pH 6,8 additionné de quantité croissante en NaCl : 100, 200, 300, 400, 500 et 600 mM. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 6 jours. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration.

II.5. Caractérisation nutritionnelle

II.5.1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone

L'utilisation des glucides comme seule source de carbone et d'énergie a été étudiée sur milieu YMB dont l'extrait de levure a été remplacé par du NH_4Cl à 0,1% et le mannitol par le sucre à tester à une concentration de 1%. Les sucres utilisés dans ce test sont:

sorbose, célebiose, rhamnose, tréhalose, D-glucose, D-xylose et arabinose(El Hilali, 2006). Un témoin négatif a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales sans l'addition d'aucune source de carbone.

Les tubes sont inoculés à une concentration de 10^7 bactérie/ml. Après 6 jours d'incubation à 28°C, l'assimilation des sucres testés comme seule source de carbone a été estimée par mesure de l'absorbance à 630 nm. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque sucre.

II.5.2. Assimilation des acides aminés comme seul source d'azote

Ce test est réalisé sur milieu YMB dont l'extrait de levure a été remplacé par un des acides aminés suivant: L-alanine, leucine, méthionine, sérine, histidine, asparagine, cystéine, lysine et isoleucine. Les solutions stockes des acides aminés sont stérilisées à l'aide d'un filtre de 0.20µm de diamètre puis additionnées au milieu YMB à une concentration finale de 0,1% (El Hilali, 2006). Un témoin négatif a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales sans aucune source d'azote.

Les tubes sont inoculés à une concentration de 10^7 bactérie/ml. Après 6 jours d'incubation à 28°C l'assimilation des acides aminés testés comme seule source d'azote a été estimée par mesure de l'absorbance à 630 nm. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque acide aminé.

II.6. Résistance et sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourdes

II.6.1. Réponse à l'action des antibiotiques

La résistance ou la sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée sur milieu solide Mueller-Hinton (El Hilali, 2006).

Le tableau VI montre les antibiotiques et les concentrations finales utilisées. L'antibiotique a été rajouté au milieu Mueller Hinton. L'ensemencement a été effectué par spots de 10 µl prélevés d'une culture bactérienne jeune de 10^6 cellules/ml. Un témoin négatif a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales sans l'addition d'antibiotique. Les boites ont été incubées à 28°C pendant 6 à 10 jours. Une croissance visible à l'œil nu est considérée comme un résultat positif.

Tableau VI: volumes utilisés pour la réalisation du test d'antibiotiques.

Antibiotiques	Concentration solution stock	Volume ajouté a 100ml du milieu	Concentration finale
Ampicilline	10 η g/ml	1ml	100 μ g/ml
Tétracycline	5mg/ml	0.05ml	5 μ g/ml
Espectinomycine	20mg/ml	0.25ml	50 μ g/ml
Kanamycine	10mg/ml	0.5ml	50 μ g/ml
Streptomycine	10mg/ml	0.1ml	10 μ g/ml
Erythromycine	10mg/ml	0.5ml	50 μ g/ml

II.6.2. Réponse à l'action des métaux lourds

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à cinq différents types de métaux lourds tous sous forme de chlorures.

Les solutions de différents métaux ont été stérilisées par filtration (Millipore 0,20 μ m, Sigma) puis additionnées au milieu YEM gélosé pour aboutir à des concentrations en μ g/ml variant de 100 à 400 pour $ZnCl_2$, de 100 à 600 pour $CuCl_2$, de 5 à 50 $CdCl_2 \cdot 2 H_2O$ et $HgCl_2$, de 400 à 2800 pour le plomb. Un témoin négatif a été réalisé sans l'addition de métaux lourds. Trois répétitions ont été faite dans chaque cas (El Hilali, 2006).

II.7. Caractérisation biochimique

Les test biochimiques sont réalisés selon les techniques utilisées par Marchal et *al.*(1982)

La fermentation du glucose conduit à la production :

- soit de nombreux acides par la voie des fermentations acides mixtes qui sont mis en évidence par le test RM (au rouge de méthyle),
- soit d'acétoïne produit par fermentation butanediolique qui est mise en évidence par le test VP (Voges-Proskauer).

II.7.1. Recherche de l'acétoïne: Réaction de Voges-Proskauer (VP)

La fermentation butanediolique conduit à des quantités moins importantes d'acides organiques, une proportion non négligeable du pyruvate étant transformée en un produit neutre: l'acétoïne, en général réduite en butanediol.

La réaction de Voges Proskauer (VP) consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, le butanediol et l'acétoïne. Elle acidifie moins le milieu que la précédente. Elle produit aussi des gaz (CO_2 et H_2).

L'acétoïne est recherchée sur milieu Clark et Lubs (CL), ensemencé avec une culture bactérienne prélevée sur milieu YMB et incubé à 28°C pendant 6 jours, après incubation 03 gouttes du réactif VP1 et VP2 sont rajoutés, après 10 minutes on note le résultat :

- **VP +** : coloration rouge cerise.
- **VP -** : coloration jaune citrin ou rose pale.

II.7.2. Production d'acide: Réaction au rouge de méthyle

Les acides produits par les micro-organismes sont des acides organiques plus ou moins forts (acide succinique, malique, oxalique, éthanoïque (acétique), butanoïque (butyrique), méthanoïque (formique) . . .) et du CO_2 acide faible et volatil.

Le test du RM consiste à apprécier le pH du milieu après 48 heures de culture :

- soit le pH est supérieur à 7 : le test est dit négatif : il y a eu une faible alcalinisation ou une réalcalinisation.
- soit le pH est inférieur à 4,5 : le test est dit positif : il y a eu une forte acidification qui s'est maintenue.

Ce test est réalisable sur le milieu de Clark et Lubs utilisé soit sous un faible volume, donc bien aéré et susceptible de bien libérer le CO_2 produit. Cela laisse supposer que :

- les bactéries RM + sont des bactéries produisant des acides organiques (éthanoïque...) par la voie des acides mixtes
- les bactéries RM - sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO_2 . Par la voie butane-diolique.

Cette distinction des deux voies peut justifier une règle parfois contestable mais fréquemment vérifiée: les bactéries VP + sont toujours RM -, les bactéries RM + sont VP -.

La production d'acide est mise en évidence sur milieu Clark et Lubs (CL), ensemencé avec une culture bactérienne prélevée sur milieu YMB, incubé à 28°C pendant 6 jours, puis quelques gouttes de la solution de rouge de méthyle sont rajoutées.

- RM + : Teinte rouge.
- RM - : Teinte jaune.

II.7.3. Utilisation du glucose, du lactose production de gaz et d'H₂S (gélose KIA)

A partir d'une suspension bactérienne, la surface de la gélose KIA est ensemencée par stries, puis le culot par pique centrale. Incubation à 28°C pendant 6 jours. La lecture se fait comme suit:

- Fermentation du glucose : virage au jaune du culot.
- Fermentation du lactose : virage au jaune de la pente.
- Production de gaz : craquement de la gélose.
- Production d'H₂S : noircissement du milieu.

II.7.4. Type respiratoire

Afin de déterminer le type respiratoire, des tubes fins et longs remplis avec le milieu VF (Viande-foie) ont été ensemencés en surface puis en piqures centrale avec une culture jeune 6. L'incubation a été faite à 28°C pendant 6 jours. Le type respiratoire sera déterminé en fonction de la croissance :

- Aérobie stricte: croissance à la surface de la gélose.
- Aéro-anaérobie : croissance à la surface et autour de la pique centrale.
- Anaérobie stricte : croissance uniquement en fond de la pique centrale

II.7.5. Recherche d'enzymes

II.7.5.1. Utilisation du citrate

La mise en évidence de l'utilisation du citrate et de la présence d'une citrate perméase et hydrolase a été menée sur milieu citrate Simmons incliné. La pente du milieu a été ensemencée par stries longitudinales à partir d'une culture de 6 jours prélevée sur

milieu YMB. Après incubation à 28°C pendant 6 jours, l'utilisation du citrate se manifeste par l'alcalinisation du milieu et l'apparition d'une couleur bleu du milieu.

II.7.5.2. Production d'indole

Grace à la tryptophansase les bactéries dégrade le tryptophane en indole, acide pyruvique et NH_3 .

La mise en évidence de la production d'indole est réalisée dans le milieu eau peptonée exempte d'indole. Ce dernier estensemencé avec une culture bactérienne prélevée sur milieu YMB. Après incubation à 28°C pendant 6 jours, 5 gouttes du réactif de Kovacs sont rajoutées au milieu. La formation d'un anneau rouge en surface se traduit par la production d'indole à partir du tryptophane.

II.7.5.3. Réduction des nitrates

Au cours de ce test, la recherche la production d'une enzyme: la nitrate réductase par les bactéries est réalisé. Cette étude consiste donc à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification

Pour déterminer si les souches bactériennes produisent une nitrate réductase, des cultures sont menées sur bouillon nitraté contenant des ions nitrate mais dépourvu de nitrite. Après incubation de 6 jours à 28°C, on ajoute quelques gouttes de réactif de Griess.

La réduction des nitrates en nitrites se traduits par l'apparition d'une coloration rouge. Si aucune couleur n'est apparue, ceci est synonyme d'absence de nitrite dans le milieu mais cela est peut être due à deux raisons:

- La bactérie n'a pas de nitrate
- Elle a en plus, une nitrite réductase qui transforme les nitrites en azote dès leur apparition.

Pour distinguer ces deux cas, il suffit juste d'ajouter une pincée de poudre de zinc. Cette poudre, très réductrice, réduit en quelques minutes les nitrates en nitrites et la coloration rouge apparait. La bactérie est donc (nitrate-). Si aucune coloration n'apparait,

c'est qu'il ne reste plus de nitrates dans le bouillon, donc la bactérie est (nitrate+ ; réductrice de nitrites en azote).

II.7.5.4. Recherche de la β -galactosidase et β -galactoperméase

Le test d'ONPG permet de rechercher directement de la présence d'une β -galactosidase qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose, en lui fournissant à la bactérie son substrat qui est l'orthonirophényl β -D galactopyranoside.

A partir d'une colonie isolée de chaque souche à tester, une suspension dense a été réalisée dans l'eau distillée stérile en tube à hémolyse, après homogénéisation de la suspension un disque d'ONPG (9mm, 1.2mg/disque) a été placé au fond du tube contenant la suspension. La lecture a été faite après 15min, 30min, 1h et 24 heures si nécessaire. Le virage du milieu au jaune révèle un résultat positif.

II.8. Test de nodulation simple et croisé

Un test de nodulation croisé a été effectué afin d'analyser la spécificité de la nodulation et de démontrer l'aptitude des souches bactériennes à former des nodules sur les racines de plantes autres que leur plante-hôte.

Les graines ont été mise dans une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 pure afin de les désinfecter et de ramollir leurs téguments ceci pendant : environ 3h pour les graines de *Retama spherocarpa* et *Retama monosperma*, 1h pour les graines de *Spartium junceum* et 30min pour les graines de *Calicotum spinosa* et *Genista ferox*. Les graines de *Vingna unguiculata* ont été désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium pendant 3 min.

Les graines ainsi désinfectées ont été mise à germer dans des boites de Pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau distillée stérile. Les boites ont été incubées à l'obscurité à 20°C.

Après 5 à 8 jours d'incubation, les graines ayant germées ont été transférées aseptiquement dans des flacons de 250 ml contenant le milieu Jensen stérile, la partie racinaire a été recouverte par du papier aluminium afin d'établir l'obscurité nécessaire.

Les plantules axéniques ont été inoculées après 48 h de leur transfert avec 1 ml d'une culture rhizobiale contenant environ 10^9 bactéries/ml. Trois souches bactériennes ont

été testées. Cette expérience a été menée en trois exemplaires et en présence de trois témoins négatifs sans inoculation. La nodulation est surveillée par l'apparition des nodules sur les racines (Boulila et *al.*, 2009).

II.9. Analyse numérique

L'analyse des caractères phénotypique permet de calculer le coefficient de similitude des souches selon la formule de Sneath et Collins (1974):

$$Cs = (A + C) / (A + B + C) \times 100$$

Cs : coefficient de similitude entre deux souches.

A : nombre de tests positifs aux deux souches.

B : nombres de tests différents entre deux souches.

C : nombres de tests négatifs communs aux deux souches.

Tous les caractères phénotypiques ont été convertis en une matrice afin d'effectuer un traitement numérique des données en utilisant un logiciel XLSTAT Pro version 7.5.2.

Les variables qualitatives sont codées « 1 » pour positif ou présent et « 0 » pour négatif ou absent. La classification ascendante et hiérarchique (CAH) permet de classer les souches par degré de ressemblance en allant des plus proches aux plus éloignées.

II.10. Caractérisation génotypique des souches symbiotiques

II.10.1. Extraction d'ADN

5 ml d'une culture rhizobiale ont été centrifugée à 14000 rpm/min pendant 5 min, après centrifugation, le surnageant est éliminé et 20 µl d'une solution de lyse (composée de 25µl de NaOH à 2N, de 25µl de SDS à 1% et de 950 µl d'H₂O) a été additionnée au culot, le mélange a été mis dans un thermobloc à 90°C pendant 15min. La réaction a été arrêtée par addition de 100 µl de H₂O MilliQ et a été suivit par une autre centrifugation à 14000 rpm/min, le surnageant contenant l'ADN a été récupéré. Les échantillons d'ADN obtenus sont conservés à -20°C (Sanchez-Canizares et *al.* 2011).

II.10.2. Amplification de l'ADN 16S par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La région du gène ADNr 16S a été amplifiée en utilisant deux amorces 41F et 1488R. L'amplification a été effectuée dans un mélange réactionnel de 25µl contenant de l'ADN (1µl), 10mM de chaque dNTP (Roche), 1.25µl de chlorure de magnésium (MgCl₂) (Biotools), buffer 2.5µl 10×PCR (Biotools), 2.5U Taq polymérase (Biotools), 10µM de chaque amorce (Sigma) et de 17.25µl d'eau milliQ stérile (Herrera-Cervera et *al.*, 1999).

L'amplification comporte une dénaturation, une hybridation et une élongation (extension) Sanchez-Canizares et *al.* (2011).

- Dénaturation de l'ADN pendant 2 minutes à 94°C.
- Hybridation se fait en 35 cycles, les 10 premiers cycles se déroulent en 3 étapes : un chauffage à 94°C pendant 40 secondes suivit d'un abaissement de température à 60°C pendant 1 minutes puis un autre chauffage à 72°C pendant 2 minutes. Les 25 derniers cycles se déroulent également en trois phases: chauffage à 94°C pendant 40 secondes, abaissement de température à 50°C pendant 1 minute puis chauffage à 72°C pendant 2 minutes.
- l'extension des amorces se fait à 72°C pendant 3 minutes et en fin la température baisse et reste maintenue à 4°C.

II.10.3. Visualisation des produits d'amplification par PCR

La visualisation des produits d'amplification par PCR a été faite sur gel d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium.

Chaque puits du gel d'agarose 1% est chargé par 13 µl d'un mélange composé de 5 µl d'ADN amplifié, 5 µl d'H₂O MilliQ et 3 µl de bleu de charge. L'électrophorèse s'est déroulé dans une cuve contenant du tampon TBE (Tris-Borate 89Mm, EDTA 2Mm, pH 8.3), le voltage est réglé à 100 Volts.

II.10.4. Purification des produits de PCR

Les produits obtenus après amplification par PCR sont purifiés à l'aide d'un kit de purification (NucleoSpin Extract II) qui assure l'élimination de tous les résidus pouvant gêner au cours du séquençage de l'ADN.

II.10.5. Dosage de l'ADN

Afin d'estimer la quantité d'ADN obtenue après chaque étape, un dosage de l'ADN total a été réalisé après extraction de l'ADN à l'aide d'un NanoDrop, un autre dosage a été également fait après PCR et un dernier après purification.

II.10.6. Séquençage de L'ADN

Le séquençage de l'ADN a été fait par Macrogen (Korea). Le blast des séquences d'ADNr 16S obtenues après séquençage a été réalisé en ligne sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.

Les séquences obtenues des produits de PCR ont été rassemblées avec un logiciel appelé Sequencher (Gene Code Corporation, Ann Arbor, MI, USA), ces dernières et des séquences appropriées relevées de GenBank database, ont été alignées en utilisant SINA alignment service de SILVA database (<http://www.arb-silva.de/aligner>). L'analyse phylogénétique a été faite en utilisant le logiciel MEGA Version 5.1.

Résultats et discussions

III. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes

Les souches isolées de *Retama* ont subi une caractérisation phénotypique dans le but de les décrire, cette caractérisation a été faite en présence de souches de références.

III.1. Caractérisation morphologique des colonies

Les souches cultivées sur YMA et incubées à 28°C forment des colonies au bout de 6 à 10 jours (Photo 2). Les colonies sont rondes à contours réguliers, lisses, bombées, opaques avec absence d'exopolysaccharides, elles sont d'environ 0.5 à 2 mm de diamètre, et sont de couleur crème claire qui a tendance à devenir plus foncé avec le temps. Cette description correspond à celle des souches du genre *Bradyrhizobium* décrites par Jordan (1982, 1984).

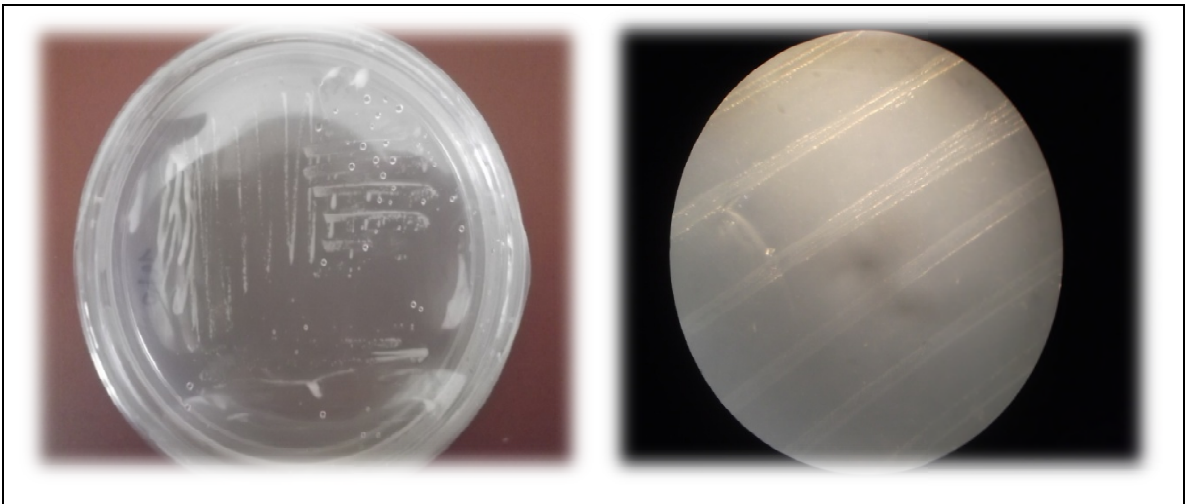


Photo 2 : Aspect des colonies sur YMB

III.2. Caractérisation cytologique des souches bactériennes

L'observation au microscope optique d'une suspension bactérienne (Photo 3), âgée de 6 jours, montre des bactéries en forme de bâtonnets à extrémités arrondies, mobiles et très petites. Ces bactéries présentent un aspect réfringent qui révèle la présence des poly β -hydroxybutyrates (Pedrosa, 1988). La coloration de Gram a confirmé leur appartenance aux bactéries Gram négatif. Ces résultats sont en accord avec la description donnée pour les *Bradyrhizobium* isolés par Vinuesa et al. (2005).

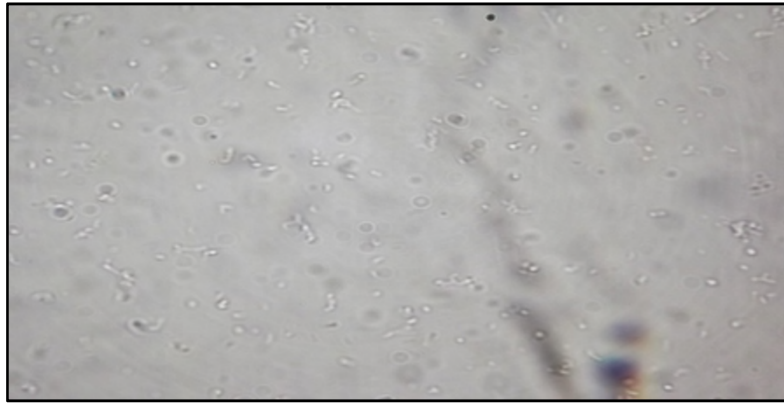


Photo 3: Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique $\times 40$

III.3. Détermination du temps de génération et du taux de croissance

Le calcul du temps de génération (Tableau VII), déterminé à partir de la phase exponentielle des courbes de croissances de chaque souche (Voir Annexe 2), montre que toutes les souches étudiées ont un temps de génération supérieur à 5 heures.

Tableau VII: Temps de génération et taux de croissances des souches étudiées.

Souches	Temps de génération(h)	Taux de croissance (h^{-1})
RST88 Bis	19.26	0.051
RSB6	29.60	0.033
RSB2	31.91	0.031
SSET16	18.09	0.055
RS13	6.26	0.190
RM8	6.87	0.145
RSA104	5.12	0.195
RD24	23.39	0.042
RST89	23.66	0.042
RSA3	21.95	0.045
<i>B. jicamae</i> PAC6P	14.06	0.071
<i>B. betae</i> PL7HG1	8.05	0.124
<i>B. cytisi</i> CTAW11	11.87	0.084
<i>B. japonicum</i> USDA6	10.66	0.093
<i>B. pachyrhizi</i> PACU8	57.62	0.017
<i>B. elkanii</i> USDA76	64.92	0.015

Ces temps de génération confirment l'appartenance de ces souches au genre *Bradyrhizobium*. En effet, il a été rapporté que les rhizobia ayant un temps de génération inférieur à 4 heures sont des bactéries à croissance rapide, celles ayant un temps de génération supérieur à 5 heures sont dites rhizobia à croissance lente (Jordan, 1982, 1984).

III.4. Caractérisation physiologique

III.4.1. Effet du pH sur la croissance

Les résultats du test de l'effet du pH sur la croissance des rhizobia (Figure 9), montrent que toutes les souches y compris les souches de références présentent une bonne croissance entre pH 6 et pH 9 avec un optimum de croissance situé entre pH 7 et pH 8. Les souches RSB6, RS13, RST89 et RSA3 sont plus sensibles au pH acide. Aucune croissance n'a été observée à pH 10 et pH 11.

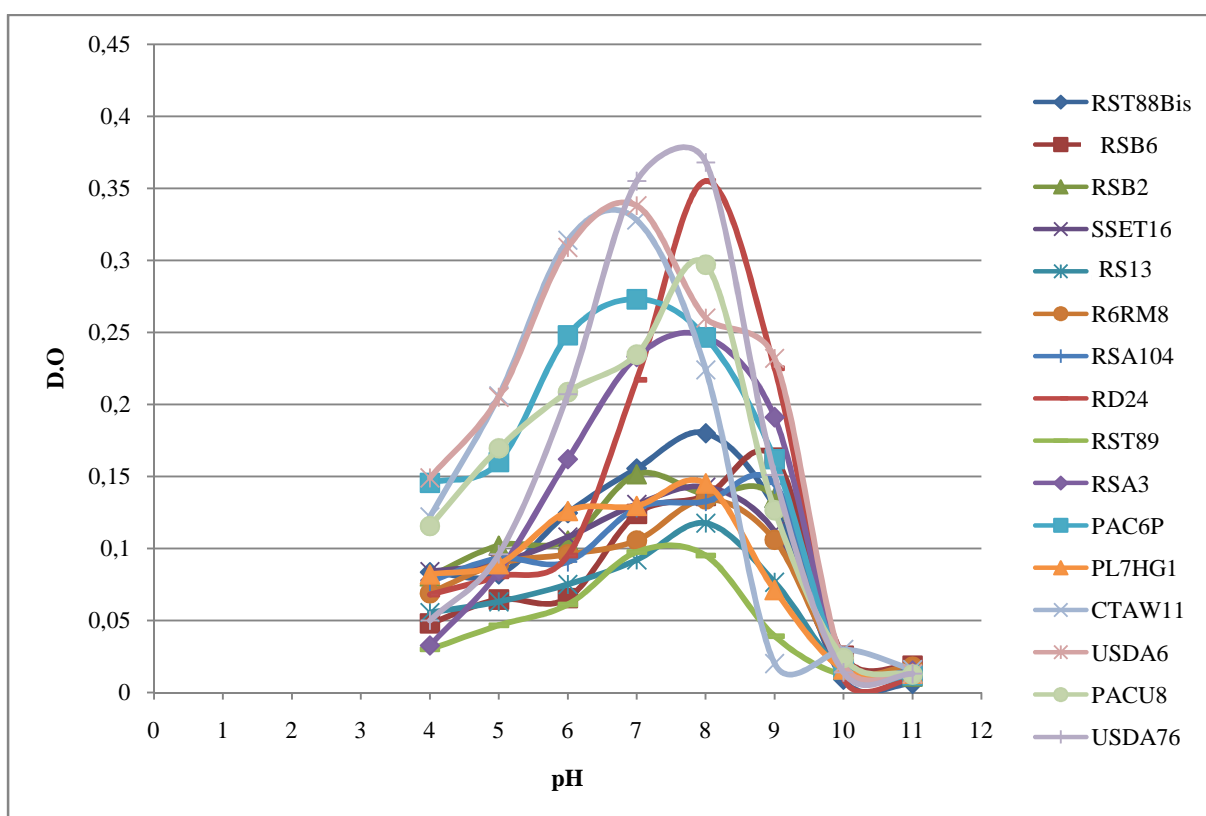


Figure 9: Effet du pH sur la croissance des souches de rhizobia

Les souches de références testées sont également sensibles au pH acide à l'exception de *B.jicamae* PAC6P, *B.japonicum* USDA6, *B.pachyrhizi* PACU8 et *B.cytisi* CTAW11 (Chahboune et al., 2012).

Les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par Sanchez-Canizares et *al.* (2011) qui ont isolé des souches de *Bradyrhizobium nodulans* *Lupinus mariae-josephie*, en effet, ces souches ont une bonne croissance à pH 8. Il a été rapporté que la majorité des rhizobiums peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9 (Jordan, 1984 ; Zerhari et *al.*, 2000 ; Mâatallah et *al.*, 2002).

Le pH optimal pour les diverses phases de la croissance des rhizobia peut varier, mais en général ce sont des bactéries neutrophiles (El Hilali, 2006). D'après, Correa et Barneix (1997) la résistance aux pH acide ou alcalin n'est pas corrélée avec le temps de croissance des souches et la capacité de produire des substances alcalinisantes ou acidifiantes du milieu. Il a été rapporté que l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobia. Cependant, l'effet négatif que représente le pH alcalin du sol est relié à l'indisponibilité des minéraux autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (Bordeleau et Prévost, 1994).

Les mécanismes d'adaptation possibles comprennent la réglementation du pH cytoplasmique: L'exclusion et/ou l'extrusion des protons, la production des exopolysaccharides et les changements d'hydrophobicité de la membrane plasmique. Ces mécanismes ont été décrits comme étant une réponse adaptative au pH du milieu chez des rhizobia (Correa et Barneix, 1997).

III.4.2. Effet de la température sur la croissance

La figure 10 montre l'effet de la température sur la croissance des souches testées. La plupart des souches y compris les souches de références montrent une croissance entre 26°C et 32° avec un optimum de croissance situé entre 28°C et 30°C. La souche de référence *B. elkanii* USDA76 et la souche RSB2 se distinguent de toutes les autres souches en continuant de croître même à 36°C qui est une température inhibitrice pour toutes les autres souches. Ces résultats sont également en accord avec ceux de Graham (1991), qui a rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles pouvant se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance tend vers 28°C (Chahboune et *al.*, 2012).

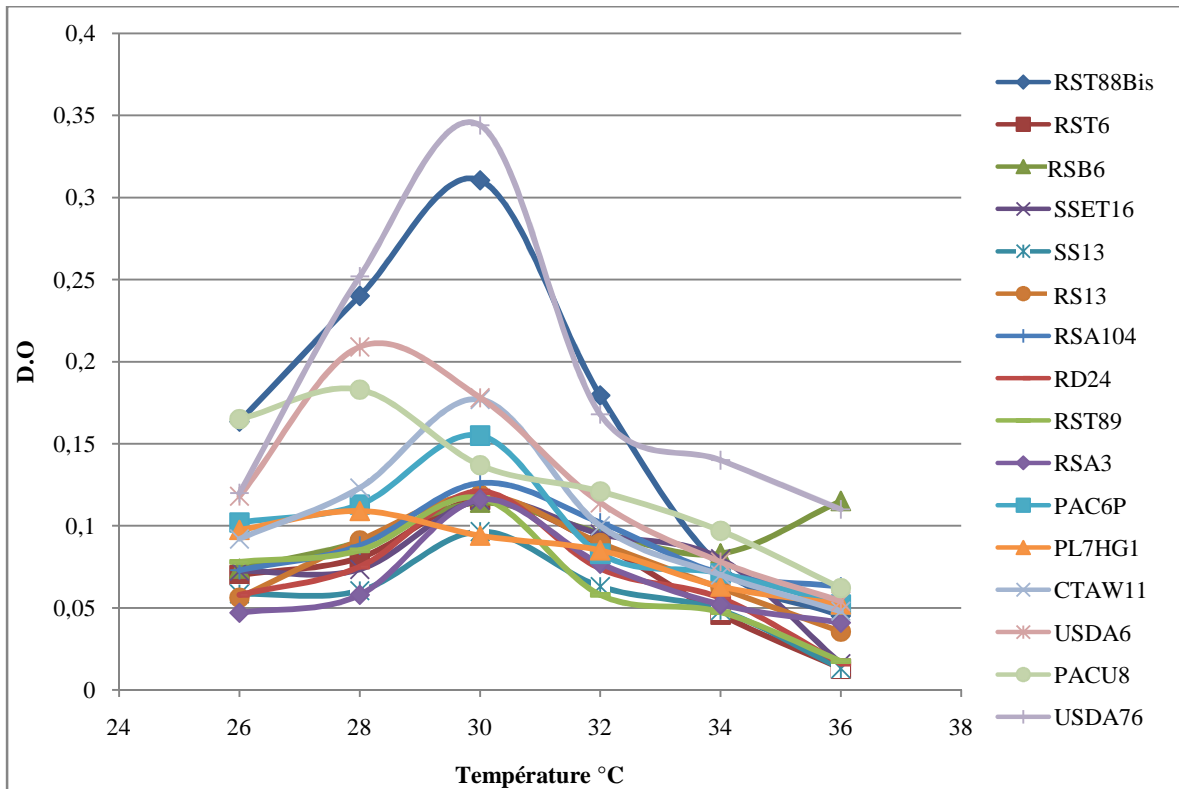


Figure 10 : Effet de la température sur la croissance des souches de rhizobia

Matallah et *al.* (2002) ont signalé que la tolérance des rhizobia à la température n'est pas corrélée avec la température du site de prélèvement. Cependant, la température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat de cette espèce (El Hilali, 2006).

Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes. (Cloutier et *al.*, 1992).

III.4.3. Effet du NaCl sur la croissance

Les résultats de l'effet du NaCl sur la croissance des souches de rhizobia sont présentés dans la figure 11. Ces résultats montrent que la plupart des souches y compris les souches de référence ont la même allure. En effet, plus on augmente la concentration en NaCl plus la croissance diminue. Les souches SSET16, RS13, RM8 et RST89 sont les plus sensibles au NaCl.

La tolérance aux sels qui caractérise les souches étudiées pourrait être en rapport avec le taux de salinité du site d'isolement. Différentes souches de *Bradyrhizobium* sont complètement inhibées entre 50 et 90mM NaCl. Toutefois, des souches à croissance lente

nodulant le genre *Vigna* pouvant tolérer des concentrations élevées en NaCl de l'ordre de 4 % à 5,5 % ont été caractérisées par Mpeperek et *al.*(1997).

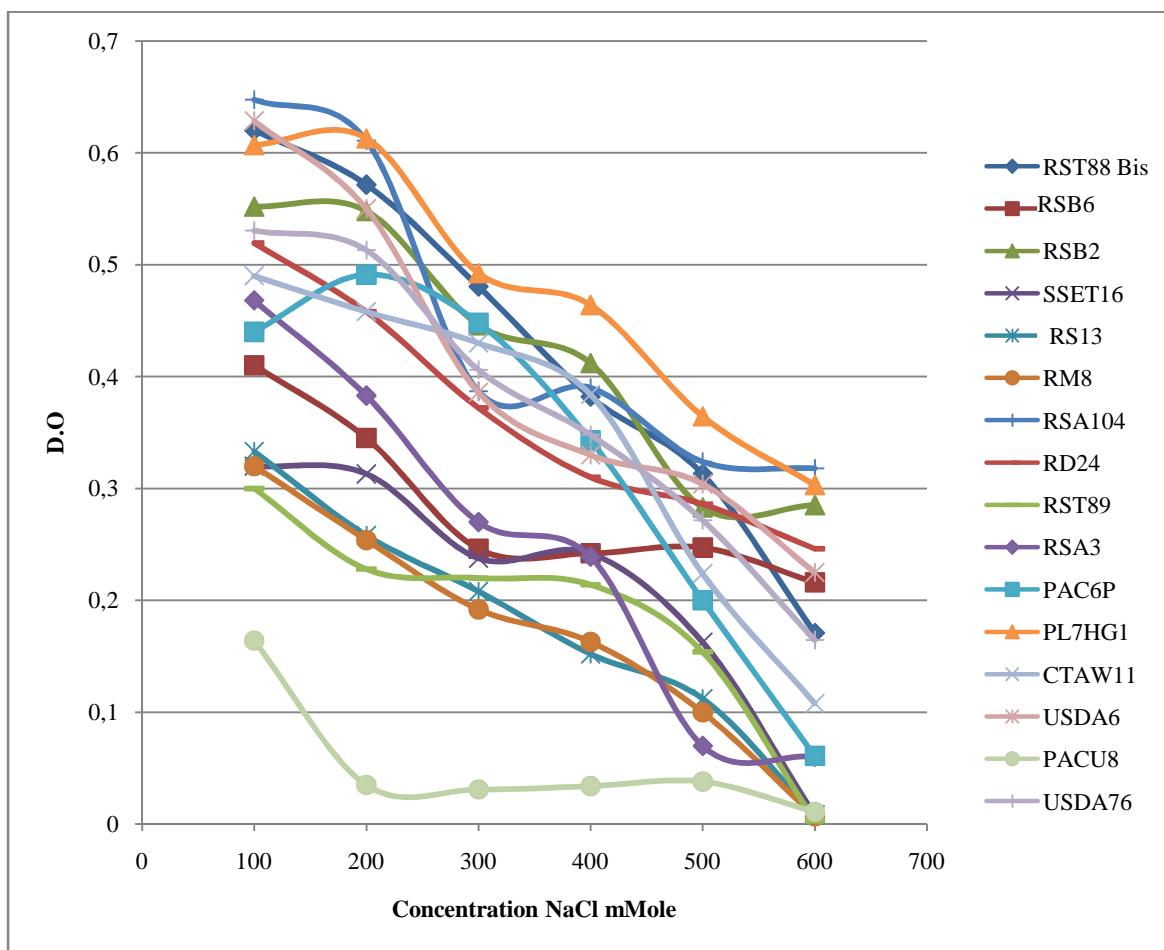


Figure 11: Effet du NaCl sur la croissance des souches de rhizobia

Des résultats similaires ont été trouvés avec des souches isolées *R. sphaerocarpa* qui montrent une résistance à des concentrations élevées de NaCl 2.5–3% (Boddey, 1997).

Miller et Wood (1996) ont rapportés que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, cependant, 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. Les cellules de rhizobia exposées aux concentrations élevées de sel accumulent souvent des osmolytes organiques protecteurs tels que des acides aminés comme la proline, la bétaine (et dérivés), l'acétoïne et le glutamate ou des carbohydrates comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Botsford et Lewis, 1990 ; Brhada et *al.*, 1997 ; Boncompagni et *al.*, 1999 ;Gouffi et *al.*,1999).

III.5. Caractérisation nutritionnelle

III.5.1. Assimilation des sucres comme seul source de carbone

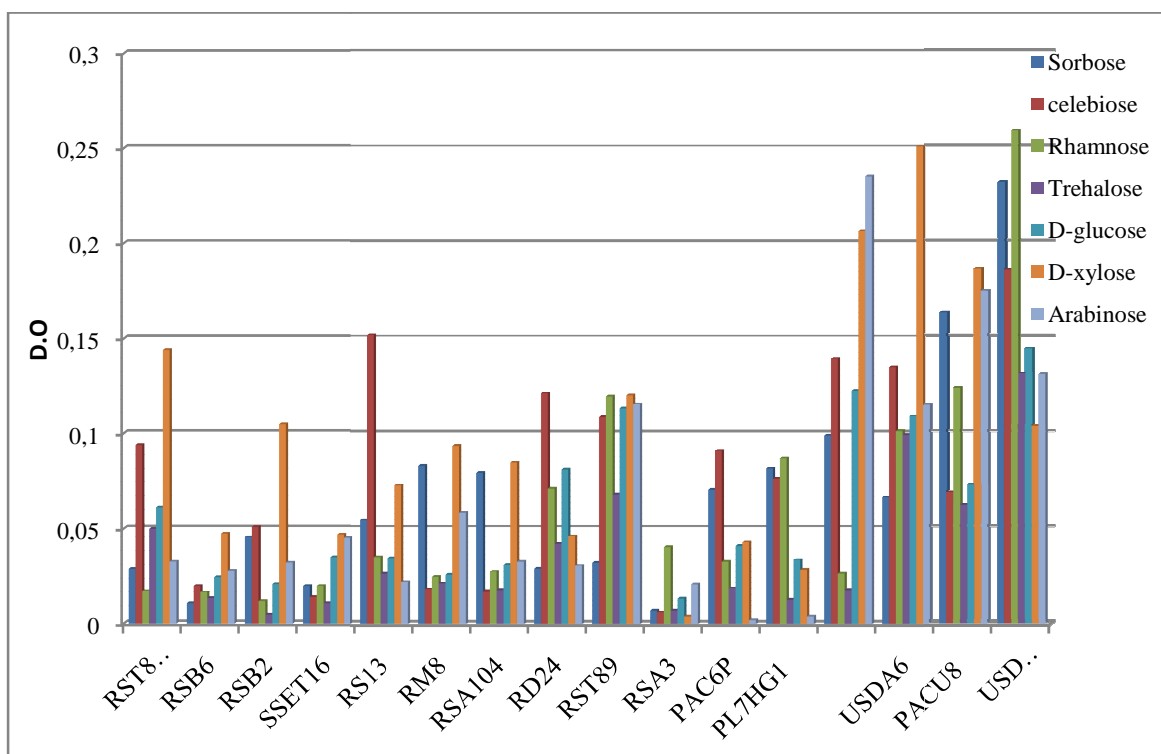


Figure 12: Assimilation des sucres par les souches de rhizobia.

La figure 12 montre une diversité de réponse parmi les souches de *Retama* vis à vis des différentes sources de carbone testées. Toutefois les souches RSB6 et RSA3 et SSET16 montrent une faible croissance en présence de tous les sucres testés. Le célébiose est mieux assimilé par RD24 et RS13. Le D-xylose qui est un monosaccharide est le sucre le plus assimilé par toutes les autres souches.

Il semble que les souches de référence à l'exception de *B. jicamae* PAC6P et *B. betae* PL7HG1 assimilent mieux les sucres testés comparés aux souches obtenus de *Retama* (Figure 12). *B. jicamae* PAC6P et *B. betae* PL7HG1 semblent avoir le même comportement vis-à-vis des sucres que les souches de *Retama* étudiées. Les souches de *Bradyrhizobium* nodulant *Retama sphaerocarpa* et *Retama monosperma* isolées par Guerroudj *et al.* (2013) semblent différentes des isolats de *Retama* d'Algérie. En effet, elles sont capables de croître en présence uniquement : du glucose, du xylose et de l'arabinose

par contre aucune croissance n'a été notée en présence du célebiose ou du tréhalose cependant l'assimilation du rhamnose a été variable.

Plusieurs études ultérieures ont indiqué que les rhizobiums montrent une bonne croissance par l'utilisation préférentielle des disaccharides. Cet aspect a permis à Jordan (1984) de faire la distinction entre les deux genres établis à l'époque, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Les bactéries du genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les mono- et les disaccharides, et d'une manière restreinte les trisaccharides et les polyalcools. A l'opposé, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (Stowers, 1985). Des résultats ont été rapportés par Xu et al. (1995) pour *Bradyrhizobium liaoningense* et *Bradyrhizobium japonicum* qui présentent une utilisation rare pour les monosaccharides et une utilisation variable pour les disaccharides. D'autres auteurs ont constaté également un degré de différence dans l'assimilation des hydrates de carbone (El Essawi et Abdelghaffor, 1967 ; Mulongoy et Elkan, 1977 ; Rodriguez et al., 1987 ; Struffi et al., 1998). Stowers (1985) et van Rossum et al. (1995) ont rapporté que les rhizobia à croissance rapide ont une grande gamme de substrat carboné comparées aux rhizobia à croissance lentes.

III.5.2. Assimilation des acides aminés comme seul source d'azote

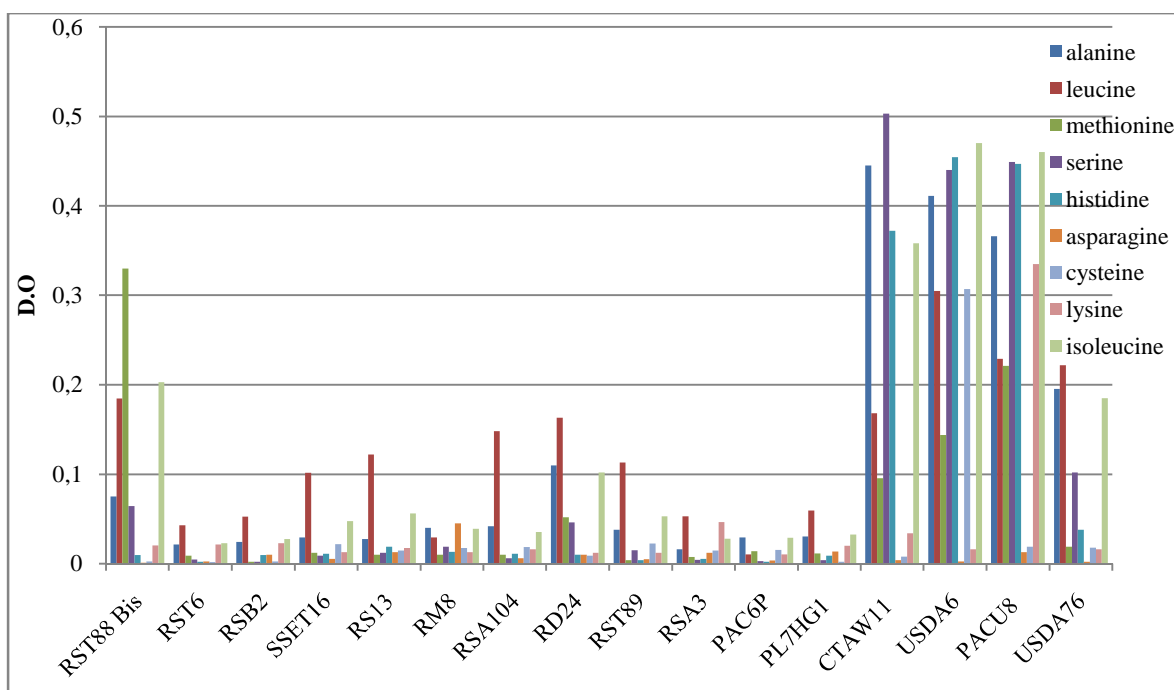


Figure 13 : Assimilation des acides aminés par les souches de rhizobia

La figure 13 présente la croissance des souches de rhizobia en présence d'acides aminés comme seule source d'azote. Les résultats montrent la aussi qu'à l'exception de *B. jicamae* PAC6P et *B. betae* PL7HG1, les souches de référence assimilent mieux les acides aminés testés. Les souches de *Bradyrhizobium* isolées de *Retama* semblent avoir le même comportement vis-à-vis des acides aminés testés que *B. jicamae* PAC6P et *B. betae* PL7HG1.

Parmi les souches de *Retama*, RST88 Bis semble être la plus différente. Les optima de croissance sont obtenus en présence de la leucine à l'exception de RST88 Bis qui assimile mieux la méthionine. La souche RM8 présente une croissance presque similaire avec tous les acides aminés.

Yang et al. (2008) ont montré que les rhizobia assimilent différemment les acides aminés. Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Jordan, 1984). Cependant, l'histidine et l'alanine peuvent être les acides aminés les plus assimilés (Liu et al., 2005).

III.6. Résistance et sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourds

Dans cette étude la résistance et sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourds ont été testés chez les isolats de *Retama* comparés aux souches de références du genre *Bradyrhizobium*

III.6.1. Réponse à l'action des antibiotiques

Le test de sensibilité ou de résistance aux antibiotiques sur milieu Mueller Hinton a révélé que les souches présentent différentes réponses vis-à-vis des antibiotiques testés (Tableau VIII) à savoir Erytromycine, Kanamycine, Tétracycline, Espectinomycine et Ampicilline.

Les isolats de *Retama* semblent être plus sensibles aux antibiotiques testés comparés aux souches de références qui se sont montrées plus résistantes à ces antibiotiques testés.

Tableau VIII: Sensibilité et résistance des souches aux antibiotiques

Antibiotiques Souches	Erytromycine 50µg/ml	Kanamycine 50µg/ml	Tétracycline 5µg/ml	Espectinomycine 50µg/ml	Ampicilline 100µg/ml
RST88 Bis	++	-	-	-	+
RS13	-	ND	ND	ND	-
RSA104	++	+	++	-	+
RST89	+	-	+	-	-
RSA3	-	ND	ND	ND	-
PAC6P	+++	+	++	+	+
PL7HG1	+++	+	++	+	+
CTAW11	++	-	++	-	+
USDA6	++	+	+	+	+
PACU8	++	+	++	+	+

(+): pousse sur milieu additionné d'antibiotique.

(-): ne pousse pas sur milieu additionné d'antibiotique.

ND: non déterminé.

La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée dans les études rhizobiales en tant que moyen d'identification des souches et est considérée comme un bon trait pour comparer les différentes souches (Beck et *al.*, 1993). Il a été rapporté sur les bactéries à croissance lente sont plus sensibles aux antibiotiques (Jordan, 1984) que celles qui sont à croissance lente (Madrzak et *al.*, 1995).

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

Le mode d'action de ces molécules varie en fonction du type de l'antibiotique (Graham, 1963) ainsi qu'en fonction de la concentration testée (Lindström et Lehtomäki, 1988). La résistance intrinsèque aux antibiotiques a été étudiée aussi bien chez les souches de *Rhizobium* (Eaglesham, 1987 ; Zhang et *al.*, 1992) que celles de *Bradyrhizobium* (Kuykendall et *al.*, 1988). Le degré de la résistance peut varier d'une espèce à une autre et

même entre les souches de la même espèce (Shishido et Pepper, 1990 ; Zhang et *al.*, 1991 ; Odee et *al.*, 1997).

En effet, les résultats obtenus par Maatallah et *al* (2002) montrent que les souches de rhizobia sont résistantes aux kanamycine et érythromycine contrairement à Batzli et *al.* (1992) qui présentent des souches avec grande tolérance aux tétracyclines et une faible tolérance à la kanamycine

Le mécanisme de résistance aux antibiotiques le plus répandu chez les bactéries Gram négatif est l'inactivation extra ou intracellulaire de l'antibiotique, ce qui aboutit à la perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Un autre mode connu de résistance consiste en la modification de la cible de l'antibiotique (Weaver et Frederick, 1982).

III.6.2. Réponse à l'action des métaux lourds

Globalement toutes les souches y compris les souches de références, présentent une sensibilité vis-à-vis du Mercure et du Zinc (voir tableau X), voir une croissance inhibée en présence du Cadmium et du Cuivre. Il a été rapporté que le Cadmium est néfaste aussi bien pour les micro-organismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (Tiller et *al.*, 1994 ; Purchase et *al.*, 1997; Gusmao-lima et *al.*, 2005). En effet il n'a aucune fonction biologique et sa toxicité est 20 fois plus grande que celle des autres métaux lourds (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Un excès de Zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des rhizobia mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques (Casella et *al.*, 1988 ; Giller et *al.*, 1998). Les ions mercuriques sont également extrêmement toxiques pour les bactéries à cause de leurs interactions avec les groupes thiol (-SH) des protéines (Monchy, 2007).

Cette étude montre également que le Plomb semble être moins néfaste sur les souches, en effet, les souches RST88 Bis, RSA104, RSA3, *B. betae* PL7HG1 et *B. japonicum* USDA6 peuvent résister jusqu'à 2000 µg/ml de Plomb. Ces souches pourraient être intéressantes dans les projets de restauration des sols contaminés par le Plomb.

Biro et *al.* (1995) déterminent que la sensibilité aux métaux lourds a une importance primaire pour la sélection des isolats qui sont écologiquement divers, Angle et

al. (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1994) ont suggéré que les souches de *Bradyrhizobium* comparées aux rhizobia sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'ils ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement. Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Kinkle *et al.*, 1987).

Selon Giller *et al.*, (1998), l'effet des métaux lourds dépend de la durée de l'exposition, de la dose et du type de métal utilisé.

Les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance qui immobilisent, mobilisent ou transforment les métaux lourds, et donc elles peuvent influencer la solubilité des métaux lourds par l'altération de leurs propriétés chimiques (Gremion, 2003). Ils consistent soit à la synthèse de protéines ou de polymères extracellulaires qui adhèrent au métal, soit par compartimentation à l'intérieur des cellules et soit par le moyen le plus commun, la diminution de l'assimilation et l'activation de l'exportation (Ross, 1993 ; Tomsett, 1993). Ces mécanismes diffèrent des véritables résistances aux métaux lourds qui sont eux liés à la présence de gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. Ceux-ci portent des déterminants de résistance qui assurent l'extrusion des métaux (CDF «Cation Diffusion Facilitator», RND «Resistance-Nodulation-Cell Division», ATPases de type P) (Monchy, 2007)

Tableau IX : Résultats de la sensibilité ou de la résistance aux métaux lourds. Résistant: (+), sensible: (-), intermédiaire: (+/-).

Souches	Mercure (µg/ml)								Cadmium (µg/ml)						Cuivre (µg/ml)						Zinc (µg/ml)				Plomb (µg/ml)							
	5	10	15	20	25	30	35	40	5	10	15	20	25	30	100	200	300	400	500	600	100	200	300	400	400	800	1200	1600	2000	2400	2800	
RST88 Bis	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	
RSB6	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	
RSB2	+	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	
SSET16	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	
RS13	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	
RM8	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
RSA104	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	
RD24	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
RST89	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	
RSA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-	-	
PAC6P	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	
PL7HG1	+	+	+	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	
CTAW11	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	
USDA6	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+/-	-	
PACU8	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	
USDA76	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	

III.7. Caractérisation biochimique

Des tests biochimiques ont été effectués sur les bradyrhizobia isolés de *Retama* et les souches de références, les résultats montrent que toutes les souches produisent de l'acétoïne à partir de l'acide pyruvique (VP+) ce qui indique l'utilisation de la voie de fermentation butylène glycol engendrant la synthèse de différents métabolites.

Ce résultat est confirmé par le test (RM -) qui affirme que se sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO₂ par la voie butane-diolique.

Les différentes souches testées y compris les souches de références sont incapables de produire de l'indole à partir du tryptophane et d'utiliser le citrate comme source de carbone et donc l'absence d'une tryptophanase et d'une citrate hydrolase et perméase.

La plupart des souches ne présentent que l'activité nitrate réductase, cependant, les souches RM8, RD24 et RST89 possèdent en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase.

Les souches testées y compris les souches de référence ne fermentent pas le glucose par contre elles ont le pouvoir de fermenter le lactose, par ailleurs, le test d'ONPG positif a révélé la présence d'une β -galactosidase et une β -galactoperméase, cette fermentation n'est pas accompagnée par une production d'H₂S ou de CO₂.

La culture de toutes les souches sur milieu viande foie a montré une croissance à la surface et l'absence de la croissance tout au long de la pique centrale ce qui suggère que les souches testées sont aérobies. Ces tests biochimiques effectués n'ont pas montré une différence comparés avec les souches de références.

En effet, Shahzad *et al.*, (2012) ont trouvé des résultats similaires lors d'une caractérisation biochimique des rhizobia nodulant *Medicago sativa*.

III.8. Test de nodulation simple et croisé

Le test de nodulation simple a mis en évidence la capacité des souches testées à induire une nodulation chez les plantes hôtes confirmant ainsi leur appartenance aux rhizobia et constituant aussi un test d'authentification. Le test concernant uniquement *R.*

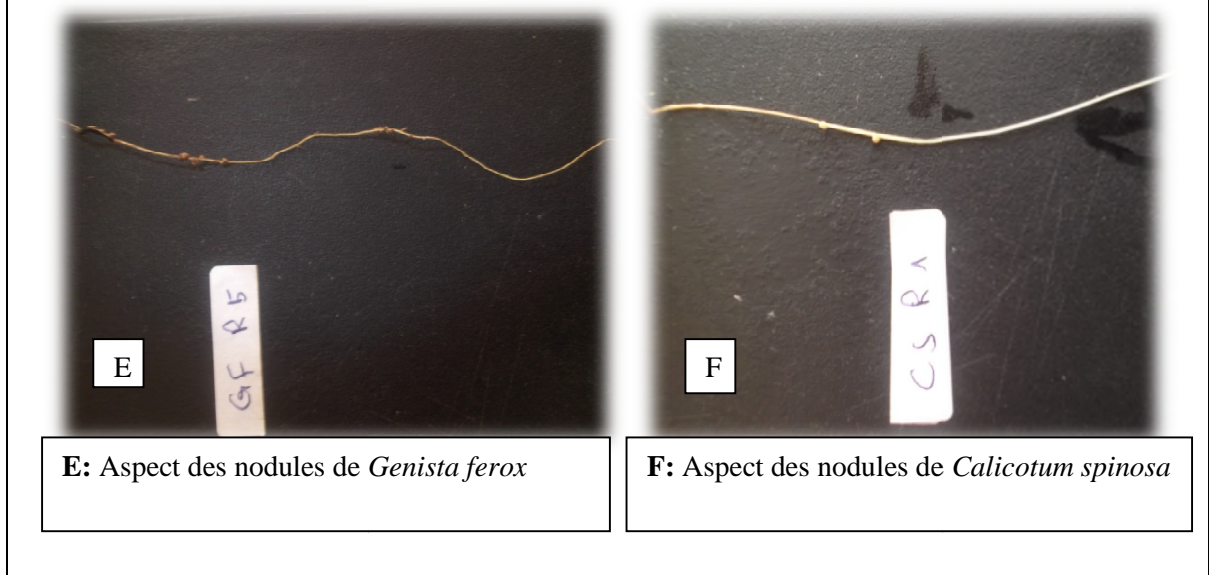
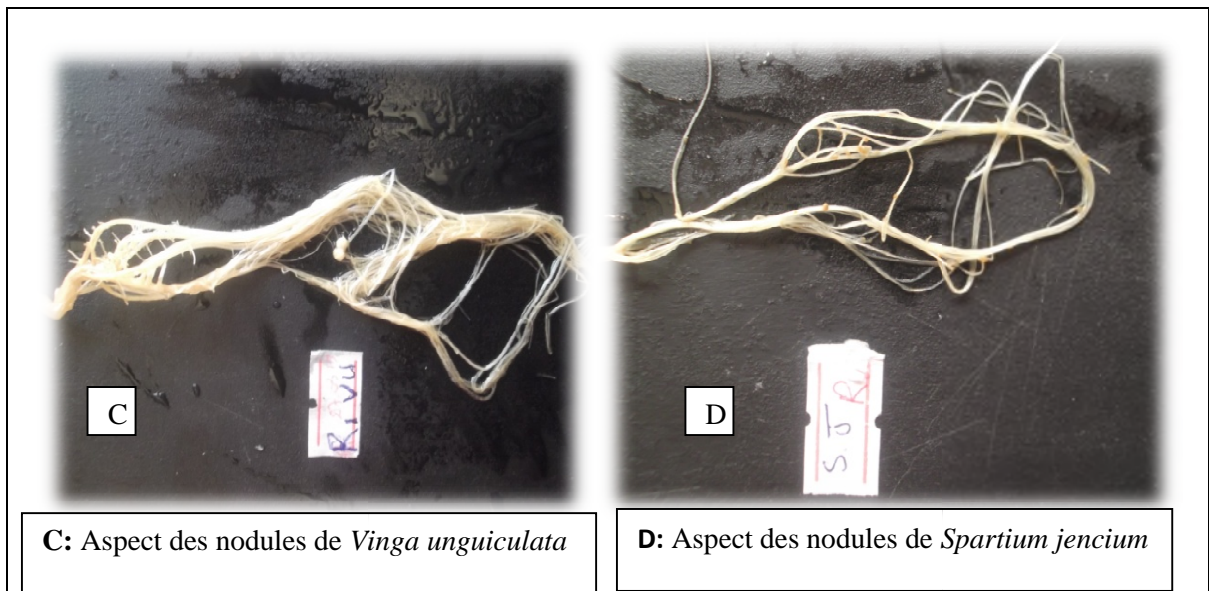
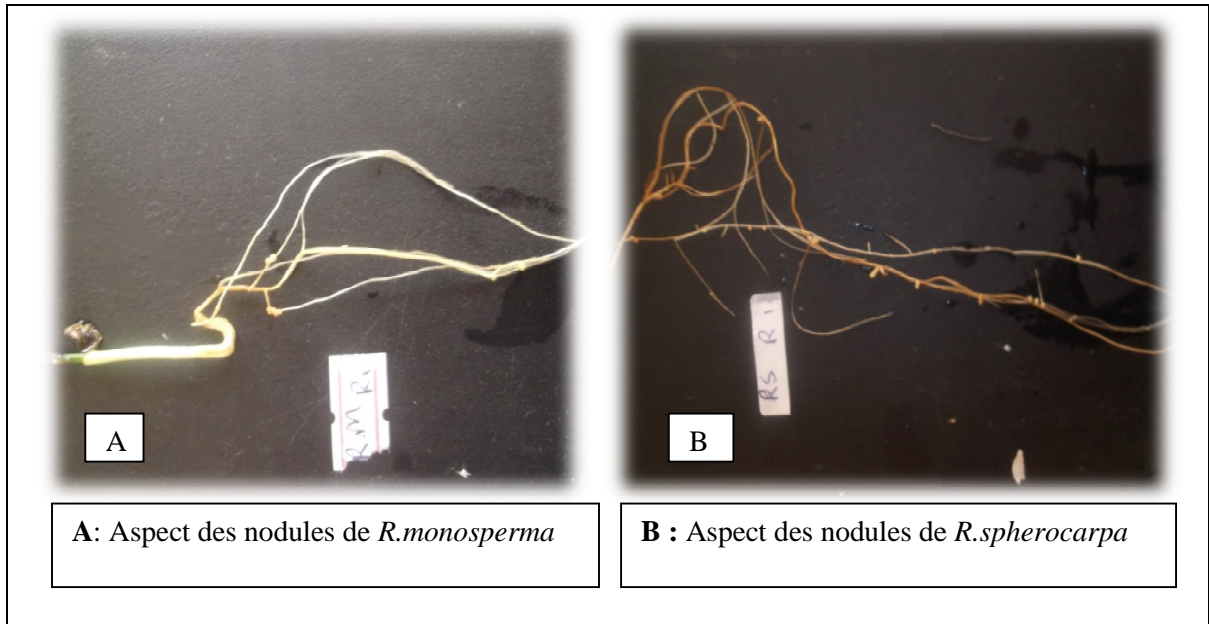
spherocarpa est considéré comme test témoin positif. Le test de nodulation croisé permet de montrer la spécificité et la promiscuité avec les autres légumineuses (Tableau X, Photos 4). A l'exception de RS13 qui ne nodule pas *Calicotum spinosa*, toutes les souches peuvent infecter *R. monosperma*, *Spartium jencium*, *Genista ferox* et *Vinga unguiculata*, ceci est expliqué par la non spécificité et le large spectre de nodulation de ces souches.

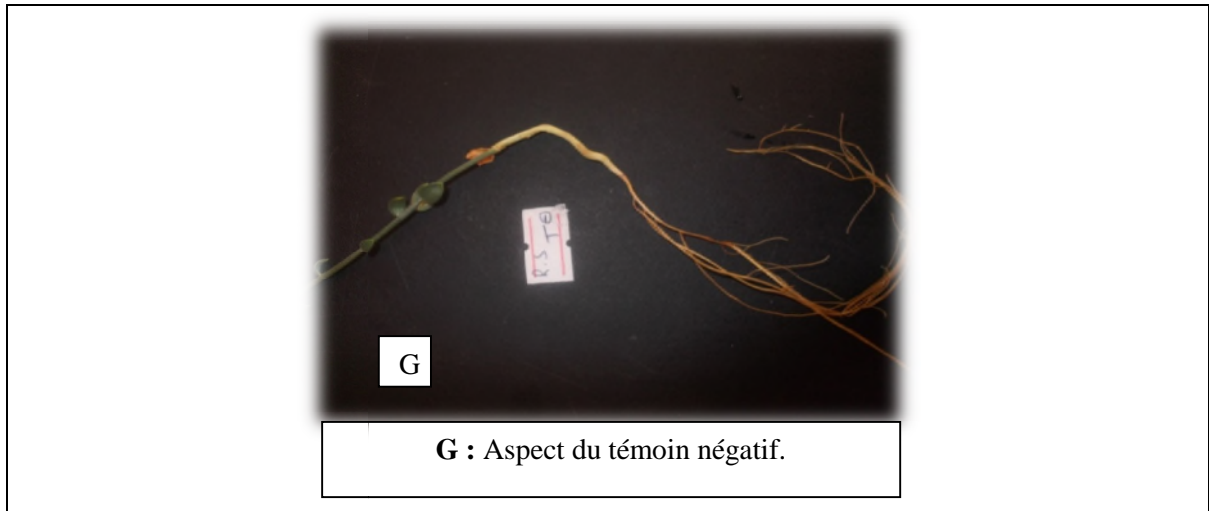
Tableau X : résultats du test de nodulation simple et croisé.

Souches Plantes	RST88 Bis			RS13			RSA3		
	<i>R. spherocarpa</i>	26	16	2	5	10	7	5	5
<i>R. monosperma</i>	5	0	10	8	0	0	6	17	5
<i>Spartium jencium</i>	0	1	2	2	23	23	2	1	ND
<i>Calicotum spinosa</i>	2	2	2	0	0	0	1	3	1
<i>Genista ferox</i>	13	12	10	2	2	2	5	6	7
<i>Vinga unguiculata</i>	2	3	2	2	4	3	2	2	3

La plus part des nodules formés sont bruns ou rouges ce qui suggère que les souches étaient efficaces dans la fixation de l'azote atmosphérique, cependant les nodules blancs observés sur les racines de *Vinga unguiculata* (photo 4) qui se traduit par le fait que les souches ne fixent pas l'azote atmosphérique chez *Vinga unguiculata* qui n'appartient pas à la tribu des *Genisteae*.

Il est bien évident que le degré de spécificité de la plante hôte change énormément parmi les rhizobia. Quelques souches ont une gamme très étroite de plantes hôtes, telle que *R. leguminosarum bv trifolii*, alors que d'autres, comme *Rhizobium* sp. NGR234, ont une gamme très large de plantes hôtes. Il est clair que les rapports symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia sont tout à fait complexes, *Rhizobium* sp. NGR234 peut noduler au moins 35 genres différents de légumineuse. *R. leguminosarum bv viciae* et *R. leguminosarum bv. trifolii* sont très semblables en ce qui concerne leurs gènes symbiotiques. Cependant, leurs gammes de plantes hôtes sont très différentes. Un seul changement dans un gène du microsymbionte peut modifier la gamme des hôtes des deux biovars (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995).





Photos 4: Aspect des nodules obtenus lors du test de nodulation simple et croisé.

III.9. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique

Les 66 caractères phénotypiques étudiés ont permis d'effectuer une analyse numérique. Le calcul du coefficient de similitude (Tableau XI) a permis de classer les souches en fonction de leur ressemblance. En effet, les 16 souches étudiées partagent plus de 73% de ressemblance. Les souches RST88 Bis, RSB6, SSET16, RS13, RM8, RSA104, RST89, RSA3 et la souche de référence *B. elkanii* USD76 partagent plus de 95% de similitude. Cependant, *B. japonicum* USDA6 et *B. pachyrhizi* PACU8 présentent les coefficients de similitudes les plus faibles avec le reste des souches testées. Il est également à noter que RM8 et RSB6 sont semblables à 98%.

Tableau XI: Coefficient de similitudes inter-souches de rhizobia

RST88Bis	100																
RSB6	95,200	100															
RSB2	95,200	95,200	100														
SSET16	95,200	95,200	93,400	100													
RS13	91,700	95,200	91,700	93,400	100												
RM8	93,400	98,400	93,400	95,200	95,200	100											
RSA104	95,200	96,800	93,400	96,800	95,200	96,800	100										
RD24	93,400	93,400	89,800	91,700	91,700	93,400	93,400	100									
RST89	86,000	89,400	86,000	89,800	95,200	91,700	89,800	87,900	100								
RSA3	95,200	93,400	95,200	93,400	89,800	93,400	93,400	91,700	83,900	100							
PAC6P	91,700	91,700	91,700	91,700	87,900	91,700	91,700	89,800	81,800	95,200	100						
PL7HG1	90,800	94,300	92,600	90,800	92,600	94,300	90,300	89,800	90,800	88,900	90,800	100					
CTAW11	86,000	86,000	86,000	87,900	86,000	83,900	86,000	89,800	83,900	83,900	89,800	88,900	100				
USDA6	86,000	79,600	83,900	81,800	77,400	77,400	79,600	86,000	77,400	86,000	87,900	80,700	93,400	100			
PACU8	82,900	76,100	80,700	82,800	73,800	76,200	80,700	80,700	73,800	85,000	87,000	75,000	87,000	92,600	100		
USDA76	87,900	83,900	86,000	86,000	81,800	81,800	83,900	89,800	81,800	89,900	87,900	85,000	91,700	95,200	88,900	100	
RST88 Bis	RSB6	RSB2	SSET16	RS13	RM8	RSA104	RD24	RST89	RSA3	PAC6P	PL7HG1	CTAW11	USDA6	PACU8	USDA76		

Les tests phénotypiques sont convertis en une matrice qui a permis d'établir une classification ascendante hiérarchique CAH (Figure 14).

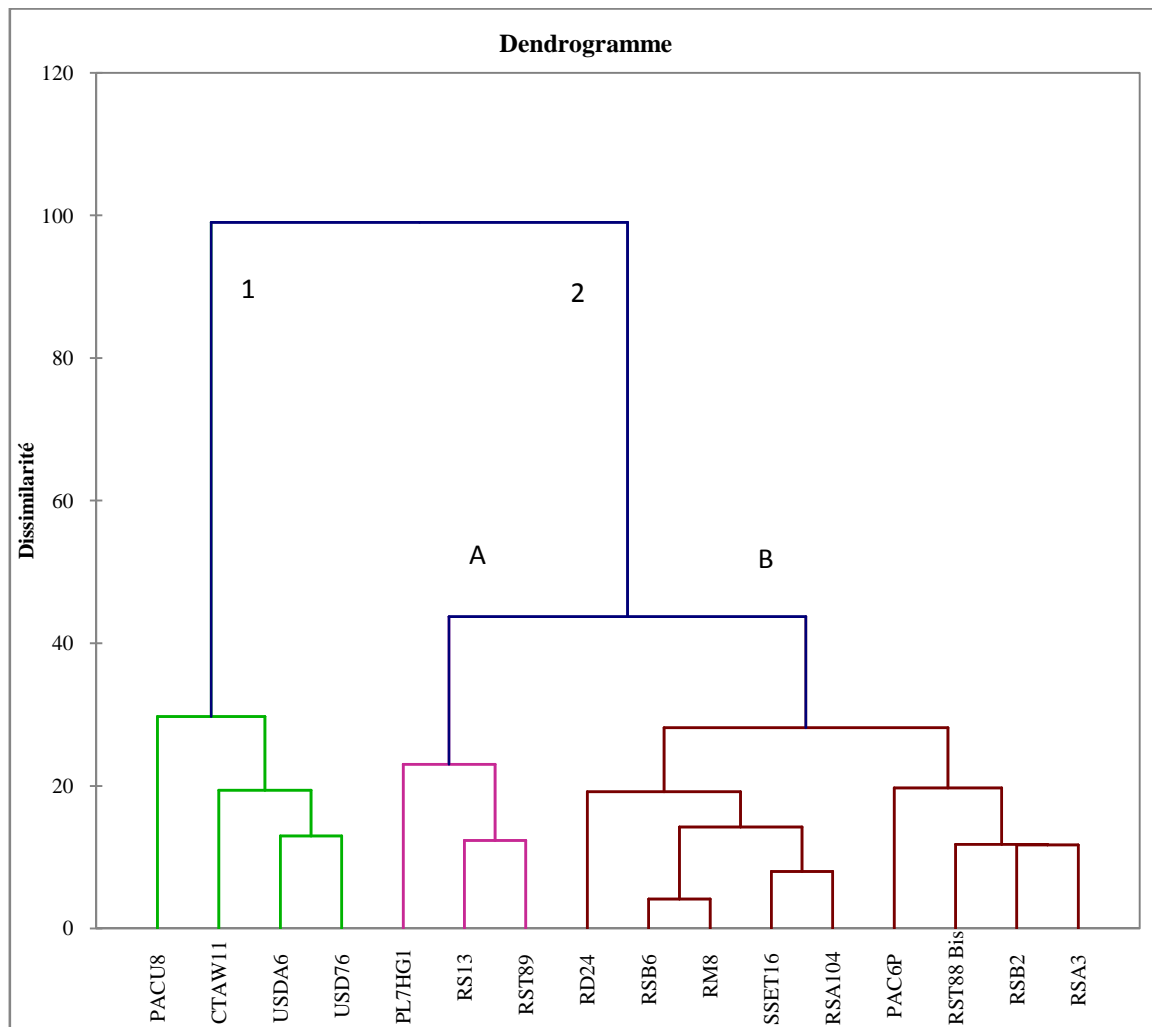


Figure 14: Dendrogramme de la CAH de 10 souches de rhizobia isolées de *Retama* sp. du Nord-Est de l'Algérie et de 6 souches de référence *B. jicamae* PAC6P, *B. betae* PL7HG1, *B. cytisi* CTAW11, *B. japonicum* USDA6, *B. pachyrhizi* PACU8 et *B. elkanii* USDA76.

Cette analyse révèle que les souches étudiées sont groupées en deux branches. La branche 1 constitue les souches de références *B. pachyrhizi* PACU8, *B. cytisi* CTAW11, *B. japonicum* USDA6 et *B. elkanii* USDA76. La branche 2 elle-même se divise en deux clusters A et B. Le cluster A comporte RS13, RST89 Bis et *B. betae* PL7HG1. Le cluster B est constitué de RD24, RSB6, RM8, SSET16, RSA104, RST88 Bis, RSB2, RSA3 et *B. jicamae* PAC6P.

Le regroupement des isolats de *Retama* avec *B. jicamae* PAC6P et *B. betae* PL7HG1 au niveau du cluster A et B est justifié par le fait qu'elles présentent la même

assimilation des sucres et des acides aminés testés ainsi qu'une résistance au Plomb que de celles de *B. betae* PL7HG1 et *B. jicamae* PAC6P.

III.10. Caractérisation génotypique des souches symbiotiques

L'amplification de l'ADNr 16S a été effectuée sur deux souches RD24 et RST88 Bis. L'électrophorégramme des produits de PCR (photo 5) permet de situer une bande au environ de 1500 pb correspondant à l'ADNr 16S.

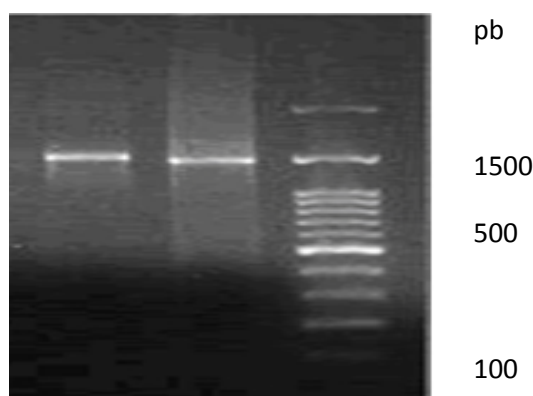


Photo 5: Electrophorégramme des produits PCR de l'ADNr 16S des isolats bactériens de *Retama* en présence de marqueurs 100 pb DNA ladder H3RTU Nippon Genetics.

Les séquences de la totalité du gène de l'ADNr 16S de deux isolats de *Retama* (RD24 et RST88 Bis) ont été confrontées à plusieurs séquences de *Bradyrhizobia* notamment celle isolées de la tribu des *Genisteeae* à laquelle appartient le genre *Retama*. Il est à noter que ces deux souches représentent une similitude de 99,9% entre elles.

La figure 15 montre l'arbre phylogénétique ML basé sur alignement de 1330 bp de séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S des isolats de *Retama*, des souches de référence *B. japonicum*, *B. elkani*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. canariense*, *B. betae* et des *Bradyrhizobium* sp. décrits chez les *Genisteeae*. Cet arbre montre que les espèces appartenant au genre *Bradyrhizobium* se divisent en deux groupes. Les souches de rhizobia isolées de *Retama* d'Algérie se situent dans le groupe de *B. elkani*, *B. pachyrhizi*, *B. lablabi*, *B. jicamae*, *B. retamae*. Cependant les *Bradyrhizobium* nodulant *Retama* d'Algérie sont différents de *B. retamae* nodulant *Retama* du Maroc.

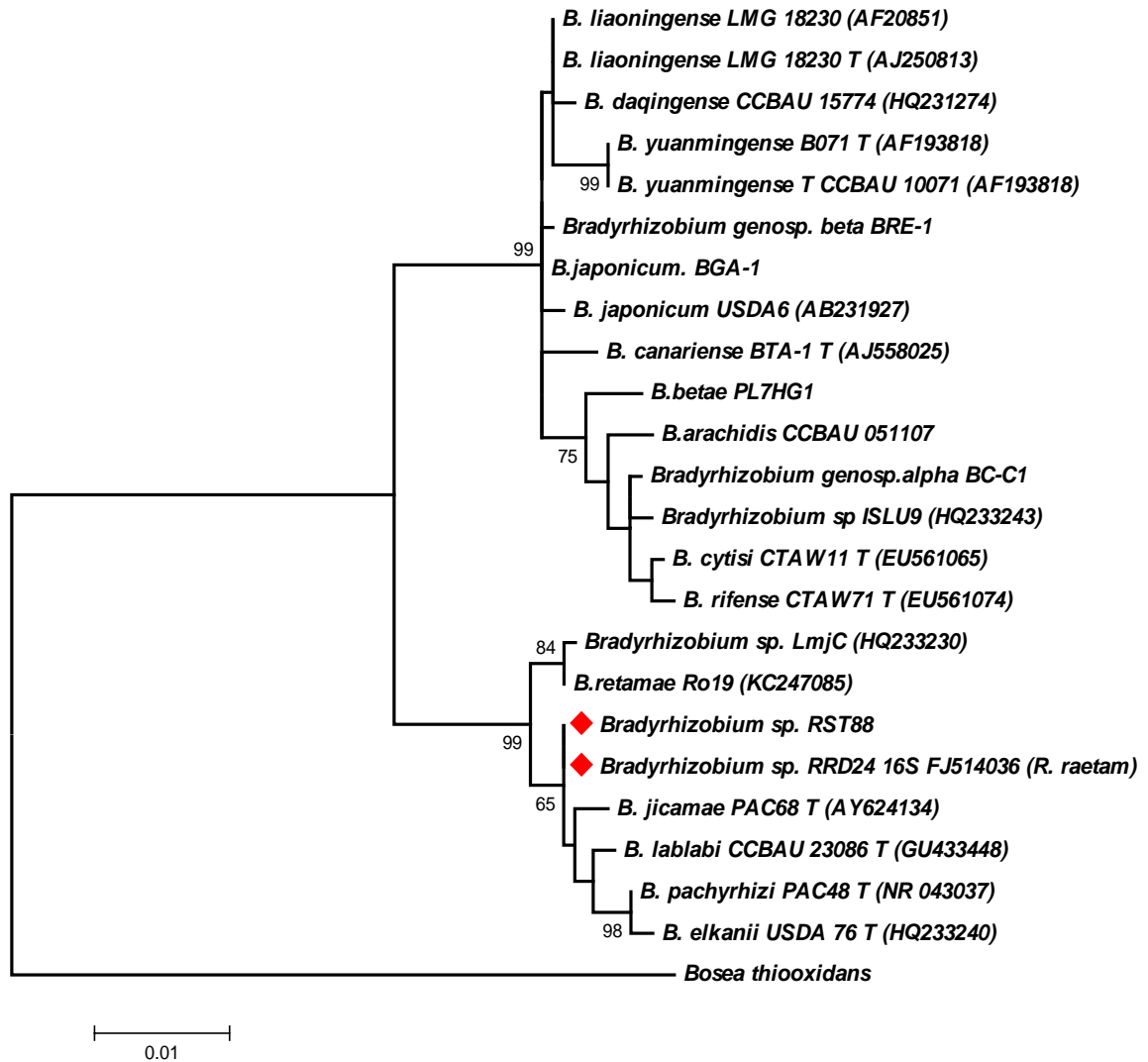


Figure 15: Arbre phylogénétique ML basé sur alignement de 1330 bp de séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont >65%. Les isolats de *Retama* sont indiqués en rouge

Conclusion
et
perspectives

Cette étude a été réalisée dans le but de caractériser 10 souches bactériennes nodulant *Retama* sp. du Nord-Est d'Algérie, à travers plusieurs caractères cellulaires, culturels, physiologiques, nutritionnels, biochimiques, réponse aux antibiotiques et aux métaux lourds ainsi que l'évaluation de la spécificité d'hôte par un test de nodulation simple et croisé. En effet, les caractéristiques cellulaires, morphologiques et culturelles répondent aux critères des rhizobia connus dans la littérature. La mesure du temps de génération de chaque souche a permis non seulement de confirmer leur appartenance au genre *Bradyrhizobium* mais de les distinguer par rapport aux autres espèces décrites.

La plus part des souches y compris les souches de référence présentent un optimum de croissance entre 30°C et 32°C. Le pH optimal de croissance s'avère plutôt alcalin puisqu'il est situé entre pH 7 et pH 8. Au delà d'une concentration de 100 mM de NaCl, la croissance des souches est remarquablement diminuée.

Les souches testées y compris les souches de référence se sont montrées globalement sensibles aux métaux lourds à l'exception du Plomb, cependant, les antibiotiques semblent un caractère discriminatif. En effet, les souches testées sont sensibles aux antibiotiques contrairement aux souches de référence. L'utilisation des sucres et des acides aminés comme seule source de carbone et d'azote respectivement a montré que les 10 isolats de *Retama* sont proches de *B. betae* PL7HG1 et *B. jicamae* PAC6P.

Le test de nodulation croisé, détermine un pouvoir de nodulation de 5 partenaires végétales appartenant à la tribu des *Genistaeae* par les isolats de *Retama*. Ces isolats présentent une gamme de plantes-hôte large.

Le traitement numérique des 66 caractères phénotypiques des isolats de *Retama*, montre leur rapprochement de *B. betae* PL7HG1 et *B. jicamae* PAC6P et l'éloignement de *B. japonicum* USDA6, *B. pachyrhizi* PACU8, *B. elkanii* USD76, *B. cytisi* CTAW11.

L'arbre phylogénétique ML basé sur l'alignement de 1330 bp de séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S de RD24 et RST88 Bis a permis de confirmer leur appartenance au genre *Bradyrhizobium* mais distinctes des espèces déjà décrites dans ce genre y compris de *B. retamae* nodulant *R. monosperma* et *R. spherocarpa* du Maroc.

Cette caractérisation polyphasique doit être accompagnée d'une hybridation ADN/ADN ou d'un séquençage total du génome des isolats de *Retama* pour donner un nom à une (des) nouvelle (s) espèces

Il serait de première nécessité d'apprécier les vraies performances symbiotiques et adaptatives des souches étudiées par l'estimation de la fixation de l'azote (dosage), permettant ainsi la sélection des souches les plus efficaces.

Enfin, il serait également souhaitable d'effectuer des essais à l'extérieur du laboratoire et d'évaluer les potentialités des couples symbiotiques et leurs pouvoirs adaptatifs aux différents environnements répondant ainsi aux objectifs du développement national et régional.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Agnew C. et Warren A. (1996). A framework for tackling drought and land degradation. *J. Arid. Environ.*, **33**(3).309-320.

Algandaby M. M., Alghamdi H. A., Ashour O. M., A., Abdel-Naim B., Ghareib S. A., Abdel-Sattar E. A. et Hajar A. S. (2010). Mechanisms of the antihyperglycemic activity of *Retama raetam* in streptozotocin-induced diabetic rats, *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2448-2453.

Allal-benfakih I. (2006). Recherche quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Orth.Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques .thèse de doctorat N°17-2006.UNIV de limoge. Laboratoire UMR INRA 1061 Institut National Agronomique d'El Harrach. p27.

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

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

Babo B V. (2002). Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophie Doctor. Université Laval, Québec.

Bahi K. (1991). Contribution à l'étude de *Rétama monosperma* étude du système racinaire et recherche des associations de type Rhizobium.in In Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma*(boiss) : mémoire de magistère . UNIV.des sciences et de la technologie d'Oran MOHAMED BOUDIAF (U.S.T.O) Oran.

Baldani J. I. et 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**: pp 549- 579.

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

Batzly J.M., Graves W. R., Vanberkum P. (1992).- Diversity among Rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *Appl environ microbiol.* **58**(7): 2137-2143.

Baudoin J.P. (2001) : Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **5** (4) pp 221– 230 adverse soil conditions. *Can. J. microbial.***38**: 475-484.

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

- Benmiloud R. (2006)** .organisation et différenciation du génome de trois espèces du genre *Retama* in quelles biotechnologies pour une agriculture durable .xème journées scientifiques du réseau biotechnologies végétales :amélioration des plantes et sécurité alimentaire de l'agence universitaire de la francophonie .constantine .algérie ;2006. Ed khlifi.
- Benson D. R et Silvester W.B. (1999)** - biology of *frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev.* **57(2)** : 293-319.
- Berg D. E., Akopyants N. S. et Kersulyte D. (1994)**. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods Mol. Cellular Biol.* **5**, 13-24.
- Biro L. P. , lint Zs. Ba., Kerte K., Vertesy1 Z., Mark G. I., Horvath Z. E., Balazs J., Mehn D., Kiricsi I., Lousse V., Vignerón J.P.(2003)**. Role of photonic-crystal-type structures in the thermal regulation of a Lycaenid butterfly sister species pair. *Physic.rev.* **67**, 021907.
- Boddey R.M., Olivieira O.C., Urquiaga S., Reis V.M., Olvares F.L, Baldani V.L.D. et Dobreiner J. (1995)**. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contribution and prospects for improvements. *Plant and Soil.* **174**, 195-209.
- Boivin-Masson C., Bontemps C.,Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L. (2006)**. Détection et typage du gène *nod C* 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 pp 97-110.
- Boncompagni E., Osteras M., Poggi M.C., et Le Rudulier D. (1999)**. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family of rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2072-2077.
- Bordeleau L. M. et Prévost D.(1994)**. Nodulation and nitrogen fixation under extreme environments. *Plant and Soil.* **161**, 115-135.
- Botsford L., et Lewis T. (1990)**. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti* production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Env. Microbiol.* **56**, 488-494.
- Boulila F., Depret G., Boulila A., Belhadi D., Benallaoua S. et Laguerre G. (2009)**.*Retama* species growing in different ecological–climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the Bradyrhizobium genus. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 245–255.
- Brewin N J., Downie J.A., Young J.P.W.(1992)**Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology. M.R Joshua Lederberg. Rockefeller University New York 3 pp 239-248.
- Brhada F., Poggi M.C. et Le Rudulier D. (1997)**. Choline and Glycine betaine uptake in various strains of Rhizobia isolated from nodules of *Vicia faba* var. *major* and *Cicer arietinum* L.: Modulation by salt, choline and glycine betaine. *Current Microbiol.* **34**, 167-172.
- Broughton W.J., Jabbouri S., et Perret X. (2000)**. Keys to symbiotic harmony. *J. Bact.***182**, 5641-5652.

Caetano-Anolles G., et Gresshoff P. M. (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annu .Rev. Microbiol.* **45**, 345-382.

Casella S., Shapleigh J. P., Lupi F., et Payne W. J. (1988). Nitrite reduction in bacteroids of *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Arch. Microbiol.* **149**, 384-388.

Chahboune R., Carro L., Peix A., Ramírez-Bahena M.H., Barrijal S., Velázquez,E., Bedmar E.J.(2012). Bradyrhizobium rifense sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**,302–305.

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

Correa O. S., et Barneix A. J.(1997). Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 153-157.

Cullimore J.V., Ranjeva R., Bono J. J. (2001): Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* **6**:24- 30.

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

Debellé.F, Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C. (2001). *nod* Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica. Minireview. Vol. 48* No. 2.p. 359–365.

de Faria S.M., Lewis G.P., Sprent J.I. et Sutherland J.M. (1989). Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607-619.

De Ley J., Cattoir H. et Reynaerts A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**(1): 133–142.

Denarie J. (2000): Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.

Dixon R.O.D. et Wheeler C.T. (1986). Nitrogen Fixation in Plants, Chapman & Hall.

Dobereiner J., Baldani V .L.D et ReisV.M. (1995). Enophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In : *Azopsirillum VI* and related microorganisms. Ed. I.Fendrik, M.del gallo, J.Vanderleyden and M.de Zamarocy. Springer verlag, Berlin, Germany.p. 3-14.

Eaglesham A. R. J. etAyanaba A. (1984). Tropical stress ecology of rhizobia, rootnodulation and legume fixation, p. 1-35. In N. S. Subba Rao (ed.), Current developments in biological nitrogen fixation. Edward Arnold Publishers, London, United Kingdom l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.

- Eardly B. D., Young J. P. W., et Selander RK. (1992).** Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. Strain ORS 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**,1809.
- Edziri H., Mastouri M., Chéraif I. et Aouini M. (2010).** Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia, *Nat. Prod. Res.* **24**, 789-796.
- El Essawi T. M. et Abdelghaffar A.S. (1967).** Cultural and symbiobiotic proprties of rhizobia from egyptian Clover (*Trifolium alexandinum*). *J. Appl. Bact.* **30** (2): 354-361.
- El Hamrouni A. (2001)** Conservation des zones humides littorales et des écosystèmes côtiers du Cap-bon. Rapport de diagnostic des sites .partie relative à la flore et la végétation .République Tunisienne .Ministère de l'environnement et de l'aménagement du territoire .agence de protection et d'aménagement du littoral. p.6.
- El-Hilali I. (2006).** La symbiose Rhizobium-Lupin: Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de Doctorat.
- Elmerich C., (1993).** Fixation de l'azote et interactions bacteries-plantes. www.pasteur.fr
- Fang Y.W. et Hirsch A.M.(1998).** Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant. Physiology.* **116**, 53-68.
- El Shazly A., Ateyaa A.M., Witte. L. (1996).** Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R.sphaerocarpa* and *R.monosperma* ,*Zeitschrift für Naturforschung. J . bioscién.* ISSN 0939-5075. 1996, vol. 51, no5-6, pp. 301-30.
- Foucher F., et Kondorosi E. (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant .Molecular. Biology* **43**, 773-786.
- Gage D.J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* **68**: 280-300.
- Gage D. et Margolin W. (2000).** Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current. Op .Microbiol*, **3**(6): 613-7.
- Gouffi K., Pica N., Pichereau V., et Blanco C. (1999).** Disaccharides as a new class of non accumulating osmoprotectants for *Sinorhisobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1491-1500.
- Graham P. et C. Vance (2003)**-Legumes:importance and contraintes to greater use. *Plant.physiol.* **131**, 872- 877.
- Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Kersters, 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**, 582-58.

Gremion F.(2003). Analysis of microbial community structures and functions in heavy metalcontaminated soils using molecular methods. These de Doctorat en sciences de l'Université de Neuchâtel, Lausanne, EPFL.

Grimont, F., and P. A. D. Grimont.(1991). La carte moléculaire des bactéries. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **6**, 9-12.

Grimont, P.A.D., Popoff, M.Y., Grimont, F., Coynault, C., et Lemelin, M.(1980). Reproductibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr.Microbiol.* **4**, 325-330.

Guerrouj K., Ruíz-Díez B., Chahboune R., Ramírez-Bahenad M.E., Abdelmoumen H., Quiñones M. A., Missbah El Idrissif M., Velázquez E., Fernández-Pascualb M., Bedmarh E.J., Peix A. (2013). Definition of a novel symbiovar (*sv. retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp.nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst.Appl.Microbio*.In press.

Guignard J.L, Dupont F. (2004). Botanique : systématique moléculaire. 13eme Ed.Masson. Paris. France pp 164-179.

Hannachi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Boussaid M., Marrakchi M., Trifi-Farah N. (2004). Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, Issue No.130, p.65- 72.

Heller R., Esnart R., Lance C. (1989). Physiologie végétale. 4ème Ed. Masson, Paris.

Herrera-Cervera J.A., Caballero-Mellado J., Laguerre, G., Hans- Volker T., Requena N., Amarger N., Martinez-Romero E., Olivares J. and Sanjuan, J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbio Ecology* **30**, 87–97.

Hirsch A.M., Lum M.R. et Downie J.A . (2001). What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant. Physiol.* **127**, 1484-1492.

Hopkins W.G. (2003). Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Ed. de boeck.

Huber I., et Selenka-Pobell S. (1994). Pulsed–field electrophoresis-fingerprinting, genome size estimation and *rrn* loci number of *Rhizobium galegae*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 528-533.

Ighil H.Z. (1990). Etude du comportement physiologique, biochimique et structurale du *Rétama retam* vis à vis du NaCl.Thèse de *Magister*, Université d’Oran Algérie, 120 p.

Jarvis B.D.W., Pankhurst C.E. et Patel, J. (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**,378-380.

Jiménez-Moreno G., Fauquette S., Suc J.-P., Abdul-Aziz H. (2007). Early Miocene repetitive vegetation and climatic changes in the lacustrine deposits of the Rubielos de Mora Basin (Teruel, NE Spain). *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **250**, 101-113.

Johnson J.L. (1984). bacterial classification. III. Nucleic acids in bacterial classification. Dans *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. sous la direction de: N.R. Krieg et J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. pp. 15-18.

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

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

Journet E.P., van Tuinen D., Gouzy J., Crespeau H., Carreau V., Farmer M.J., Niebel A., Schiex T., Jaillon O., Chatagnier O., Godiard L., Micheli F., Kahn D., Gianinazzi-Pearson V. et Gamas, P. (2002). Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic.Acids Res* **30**, 5579-5592.

Judd A. K., Schneider M., Sadowsky M.J. et de Bruijn F. J. (1993). Use of repetitive sequences ad the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1702-1708.

Kinkle B. K., Angle J. S. et Keyser H. H. (1987). Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 315-319.

KuyKendall, Saxena L. D., B., Devine T. E. et Udell S. E. (1992). Genetic diversity in *bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp nov. *Can. J. Microbiol.* **38**, 501-505.

Laguerre, G., P. van Berkum, N. Amarger, and D. Prévost. (1997). Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4748-4758.

Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. (1994). Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 56-63.

Laranjo M., Branco C., Soares R., Alho L., Carvalho M.D.E. et Oliveira S. (2002). Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *J. Appl. Microbio.* Volume 92 Issue 6 1043p.

Louaar S., Akkal S., Laouer H. et Guilet D.(2007). Flavonoids of *Retama sphaerocarpa* leaves and their antimicrobial activities. *Chem.Nat. Comp.* **43(5)**, 547-972 .

Leclerc H., Gaillard J.L., Simonet M. (1995). Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien. Ed. DOIN EDITEURS.p. 412-415.

Lévêque C., Mounoulou J.C.(2001). Biodiversité, Dynamique biologique et conservation.Ed. Dunod, Paris.

Lindström K., Terefework Z., Suominen L., Lortet G. (2002). Signalling and development of Rhizobium-legume symbiosis. biology and environment: Royal Irish Academy vol. 102B, NO. 1, 61–64.

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

Liu L., McBride K. M. et Reich N. C. (2005). STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 8150-8155.

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

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

Madrzak C. J., Golinska B., Kroliczak J., Pudelko K., Lazewska D., Lampka B. et Sadowsky M. (1995). Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**, 1194-1200.

Mahnane.W. (2010). Appréciation de la diversité génétique du genre *Retama* par les marqueurs biochimique. Mémoire Magister. Université Mentouri Constantine.

Mahdhi M., Mars M., (2006). Genotypic diversity of rhizobia isolated from *Retama raetam* in arid regions of Tunisia, *Ann. Microbiol.* **56**, 305-311.

Mahdhi M., Nzoué A., de Lajudie P., Mars M., (2008). Characterization of root nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils, *Nat. Scien.***18**, 43-49.

Maghrani M., Lemhadri A., Zeggwagh N-H., El Amraoui A., Haloui M., Jouad H. et Eddouks M. (2004). Effect of *Retama raetam* on lipid metabolism in normal and recent-onset diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **90**, 323-329.

Maire R., Quézel P. (1987). Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara). Volume XVI. *Dicotyledonae*. Editions lechevalier S.A.R.L. Paris. pp : 192-207.

Mateos P. F., Jmenez-Zurdo J.I., Chen J., Squartini A. S, Haack S.K., Martinez- Molina E., Hubbell D. H., et B.dazzo F.(1992). Cell- associated pectinolytic and cellulosic Enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58 (6)**:1816- 1822.

Mathesius U., Charon C., Rolfe B.G., Kondorosi A. et Crespi M. (2000a). Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions.

.Michelle I.(2006). Diversity of root nodule bacteria associated with *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* species in south Africa. University of Protoria.

Mitra S., Sharma P.K., Singh A.K., Garg V.K., Mondal S.Ch. (2012). Herbal drugs used as diuretics. *Pharma science monitor, an international journal of pharmaceutical sciences*. On line published 2011; 1349-1358. Document consulté sur le site [www. pharmasm.com](http://www.pharmasm.com).

Mittler R. (2000). Living under a dormant canopy : a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama rætame*. *the plant. j.Blac. ScienceLtd.* **25**(4), 407-416.

Monchy S.(2007). Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de doctorat de l'Université Libre de Bruxelles.

Morton A. C., Begg A. P., Anderson G. A., Takai S., Lammler C., et. Browning G. F. (2001). Epidemiology of *Rhodococcus equi* strains on thoroughbred horse farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2167-2175.

Moulin L. (2002). Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène *nodA* à l'identification de rhizobia au sein des béta-Protéobactéries. Thèse de Doctorat en Sciences Biologie. Université Claude Bernard Lyon I. France. p 289.

Mpepereki S, Makonese F, and A. G. Wollum.(1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis.* **22**, 275-29.

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

Odee D. W., Sutherland J. M., Makatiani E. T., Mc Inroy S. G., et Sprent J. I. (1997). Phenotypic characteristics and composition of the rhizobia associate with woody legumes growing in diverse Kanyen conditions. *Plant & Soil.* **188**, 65-75.

Parent L.E., (1999). Fertilisation azotée et utilisation de testes rapides de dosage des nitrate dans la production brocoli. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) , Université Laval, Québec In : Villeneuve.

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

Pawlowski K. et Bisseling T. (1996). Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant .Cell.* **8**, 1899-1913.

Pedrosa F.O. (1988). Physiology, biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root associated nitrogen-fixing bacteria. *CRP. science.* **6**, 345-384.

Pelmont, J. (1995). Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Vol 2. p. 541 572. Office des Publications Universitaires.

Peret B. (2007). Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II.France.

Perret X., Staehelin C. et Broughton W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbio. Molec. Bio. Rev.* **64**, (1), 180-201.

Perry J.J., Stalex J.T., Lory S. (2004). Microbiologie cours et questions de revision. Ed. DUNOD. Paris. France.

Pinochet X., Salon C., Jeuffroy M. H., Touraine B. et Cleyet-Marel J. C. (2006). Amélioration de la gestion de l'azote par les bactéries favorables à la croissance des plantes. Académie d'Agriculture. 25 octobre 2006.

Presvost D., Antoun H. et Bordeleau L.M. (1987). Effects of low temperature on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. *FEMS Microbio.Eco.* **45**, (4), 205-210.

Quezel P. et Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. p. 462-541. CNRS.

Ramirez-Bahena M.H., Peix A., Rivas R., Camacho M., Rodriguez-Navarro D.N., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Willems A., Veluzquez E. (2009). Bradyrhizobium pachyrhizi sp. nov. and Bradyrhizobium jicamae sp. nov., isolated from effective nodules of Pachyrhizus erosus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1929–1934.

Raposeiras, R; P. P. Patrícia; V.M. P Raul; S. Lucy ; E. Paiva ; M. R. Scotti; N. M.H. S. (2002). Variability of isolated colonies in bean nodulating Rhizobium strains before and after exposure to high temperature. *Braz J of Microbio.* Print ISSN 1517-8382.

Rasanen L. (2002). Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis* thèse de doctorat de l'université de Hlsinki. Finlan.

Raven P. H., Evert R. F., Eichlorn S. E.(2000). Biologie végétale. 6ème Ed. de boeck ,Paris.

Requena J.R., Fu M.X, Ahmed M.U., Jenkins A. J., Lyons T.J., Baynes J.W. et Thorpe S.R.(1997). Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. **322**, 317–325.

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

Rodríguez-Navarro D.N., Camacho M., Leidi E. O., Rivas. R. et Velázquez.E.(2004). Phenotypic and Genotypic Characterization of Rhizobia from Diverse Geographical Origin that Nodulate *Pachyrhizus* species. *System. Appl. Microbiol.* **27**, 737–745.

Robert F. M., Molina J. A. E., et Schmidt E. L. (1982). Properties of *Rhizobium leguminosarum* isolated from various regions of Morocco. *Ann. Microbiol.* **133**, 461-470.

Roger P.(1996). La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le developpement ? Conférence débat de l'ORSTOM. Paris Xe France.

Ross I. S. (1993). Membrane transport processes and response to heavy metals. In Stress Tolerance of Fungi, ed. D. H. Jennings, pp: 97-125. Marcel Dekker, New York.

Rosselio Mora R. et Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes .*FEMS.Microbiol. Rev.*25(1), 39-67.

Rubio L.M. et Ludden P.W. (2005). Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle.

Sanchez F., Padilla J.E., Hector P. and Lara M. (1991). Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 507-528.

Sanchez-Canizaresa C., Rey L., Duran D., Temprano F., Sanchez-Jiménez P., Navarroc A., Polajnard M., Imperiala J, Ruiz-Argüeso T. (2011). Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst and App Microbiol.* **34**, 207–215.

Saoudi M. (2008). Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Département de Biologie Végétale. Université Mentouri de Constantine. Algérie.

Shallaby A., monayer I M., Etman M.A., El Habibi A.M. et Youssef M.P. (1972).. Germination of some desert medicinal plant under different condition .Inst. bull, ARE, 22N2,433p in Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma(boiss)* : mémoire de Magister .Univ.des sciences et de la technologie d'Oran MOHAMED BOUDIAF (U.S.T.O) Oran.

Sharma P. K., Kundu B.S., Dogra R. C. (1993). Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. *Biotech. Adv.* 11:741-779

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

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

Selander R. K., Caugent D. A., Ochman H., Musser J. M., Gilmour M. N., et Whittam T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population geetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 873-884.

Sneath P.H.A. et Sokal R.R. (1973). **Numerical Taxonomiy:** the principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Co San Francisco.

So R.B., Ladha J.H. et Young J.P. (1994). Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* sp. from a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid on r RNA analysis. *Int J Syst Bacteriol.* **44**, 392-403.

Somasegaran P. et Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc p.450.

Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J. et May G.D. (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **9**: 110-121.

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

Stowers M. D.(1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 89-108.

Terefework Z. (2002). Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Academic dissertation in microbiology. University of Helsinki. ISSN 1239-9469.

Thomas J.P. (1968). Ecologie et dynamique de la végétation de la dune littorale dans la région de Djidjelli. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr.nord*, 59: 37-98.

Tiller K., Merry R. et Mc Laughlin M.(1994). Cadmium: a modern day problem. *Rural Research.* **162**, 32-35.

Timmers, A.C., Soupene E., Auriac M.C., de Billy F., Vasse J., Boistard P. et Truchet, G. (2007). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1204-1213.

Tomsett, A. B. (1993). Genetics and molecular biology of metal tolerance in fungi. In Stress Tolerance of fungi, ed. D. H. Jennings, pp: 69-95. Marcel Dekker, New York.

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

Tortora G.J., Funk B.R. et Case C.L. (2003) - Introduction à la microbiologie. Ed. du Renouveau Pédagogique Inc. Nb de page 945.

Tourte Y., Bordonean M., Henry M. (2005). Le monde des végétales organisations, physiologie et génomique. Ed. DUNOD. Paris. France.

Udvardi M.K, Tabata S., Parniske Met Stougaard J. (2005). *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* **10**, 222-228.

Unesco. Recherche sur la zone aride – XIII – Les plantes médicinales des régions arides. Document consulté sur le site unesdoc.unesco.org/images/0006/000681/068198fo.pdf le 10 mai 2012.

Van Brussel A.A., Bakhuizen R., van Spronsen P.C., Spain, H.P., Tak T., Lugtenberg B.J. et Kijne J.W.(1992). Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Scien.* **257**, 70-72.

van Rossum D., Schuurmans F. P., Gillis M., Muyotcha A., van Verseveld H.W., Stotthamer A. H. et Boogerd F. C.(1995). Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogae* L.) roots. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 1599-1609.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438.

Vaneechoutte M., Kampfer, P., De Baere, T., Falsen, E. et Vershraegen G. (2004). *Wautersia* gen. Nov. A novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and relate species, and proposal of *Ralstonia* [Pseudomonas] *syzygii* (Roberts et al 1990) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 317-327.

Van Rhijn P and Vanderleyden . J. (1995) .The *Rhizobium* plant symbiosis Microbiological. Rev. **59**(1), 124-142.

Vessey J.K., Chemining G.N. (2006). The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarium* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Bio & Bioch.* **38**, 153-163.

Vincent J.M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

Vinuesa P., Leon-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Perez- Galdona R., Werner D. et Martinez-Romero E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 569-575.

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

Wais R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetsa, R.V., Cook, D., Gough, C., Denarie, J., and Long, S.R. (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **97**, 13407-13412.

Wathman F. (1967). Fleurs du bassin méditerranéen. Ed. Paris VI.

Weaver R. W. et Frederick L. R.(1982). *Rhizobium*. In Methods of Soil Analysis. Part2- Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. (A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeny, Eds), pp. 1043-1070. Am. Soc. Argonomy.

Weir, B. (2013). The current taxonomy of rhizobia:New Zealand Rhizobia .

Welsh, J., and M. McClelland. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitraryprimers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.

Werner D. (1992). Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. *Acad. Sin:* 39.

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

Yann P., 2006.- Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium* légumineuses. Master Recherche. Microorganisme du génome aux interaction avec l'hôte. Université de Paul Sabatier.Toulouse III.

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. (2002). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie.* **21**,569-576.

Zakhia F., et de Lajudie P.(2006). La taxonomie bacterienne moderne:revue des techniques-application à la caractérisation des bacteries nodulant les légumineuses(BNL).

Zerhari K., Aurag J., Khbaya B., Kharchaf D. et Filali-Maltouf A. (2000). Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 351-357.

Zhang X., Karsisto M. et Lindström K. (1992). Assessment of the competitiveness of fast-growing rhizobia infecting *Acacia Senegal* using antibiotic-resistance and melanin production as identification markers. *W. J. Microbiol. Biotech.* **8**, 199-205.

Zohary M. (1962). Plant life of Palestine, Israel, and Jordan, New York, 1962. *Science.* 11 may 1962: Vol. 163. no.3515,p 523.

Annexes

Annexe1: Milieu de culture utilisés pour : rhizobia et plantes

1- Composition du milieu YMA (Vincent, 1970)

Mannitol.....10g

Extrait de levure.....0.4g

K₂HPO₄0.5gMgSO₄, 7H₂O.....0.2g

NaCl.....0.1g

Eau distillée.....1000ml

Agar.....15g

pH ajusté à 6.8

2-Composition du milieu YMB (Vincent, 1970)

Mannitol.....10g

Extrait de levure.....0.4g

K₂HPO₄0.5gMgSO₄, 7H₂O.....0.2g

NaCl.....0.1g

Eau distillée.....1000ml

pH ajusté à 6.8

3-Composition du milieu Jensen (référence)

Solution stocke dix fois concentrée...100ml

Oligo-éléments.....1ml

FeCl₂300µl

pH ajusté à 7

4-Composition des milieux utilisés pour la caractérisation biochimique

4-1. Milieu au citrate de Simmons

Sulfate de magnésium.....0.2g

Phosphate mono-ammonique.....1g
Phosphate bipotassique.....1g
Citrate de sodium.....2g
Chlorure de sodium.....5g
Bleu de bromothymol.....0.08g
Agar.....15g
pHajusté à 6.8

4-2. Gélose Mueller –Hinton

Infusion de viande de bœuf.....300g
Hydrolysate de caséine.....17.5g
Amidon.....1.5g
Agar.....17g
pHajusté à 6.8

4-3. Bouillon nitraté

Macération.....1000ml
Péptonetrypsique.....15g
NaCl ou KCl.....5g
Nrite de Sodium (NaNO₂).....1ml
pH ajusté à

4-4. Milieu Clark-Lubs

Peptone trypsique de viande.....5g
Phosphate bipotassique.....5g
Glucose.....6g
pH ajusté à 7

4-5. Eaupeptonée

Peptone trypsique.....15g

NaCl.....5g

pH ajusté à

5- Milieu de culture utilisé pour l'assimilation des sucres comme seule source de carbone

NH₄Cl1g

Sucre.....1g

K₂HPO₄0.5g

MgSO₄, 7H₂O.....0.2g

NaCl.....0.1g

Eau distillée.....1000ml

pH ajusté à 6.8

6- Milieu de culture utilisé pour l'assimilation des acides aminés comme seule source d'azote

Mannitol.....10g

Acideaminé.....1g

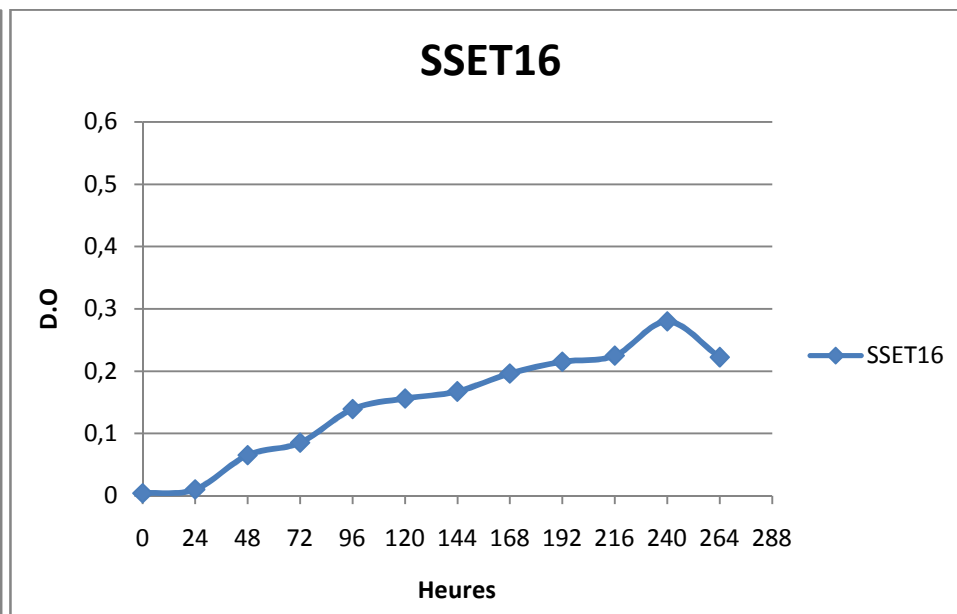
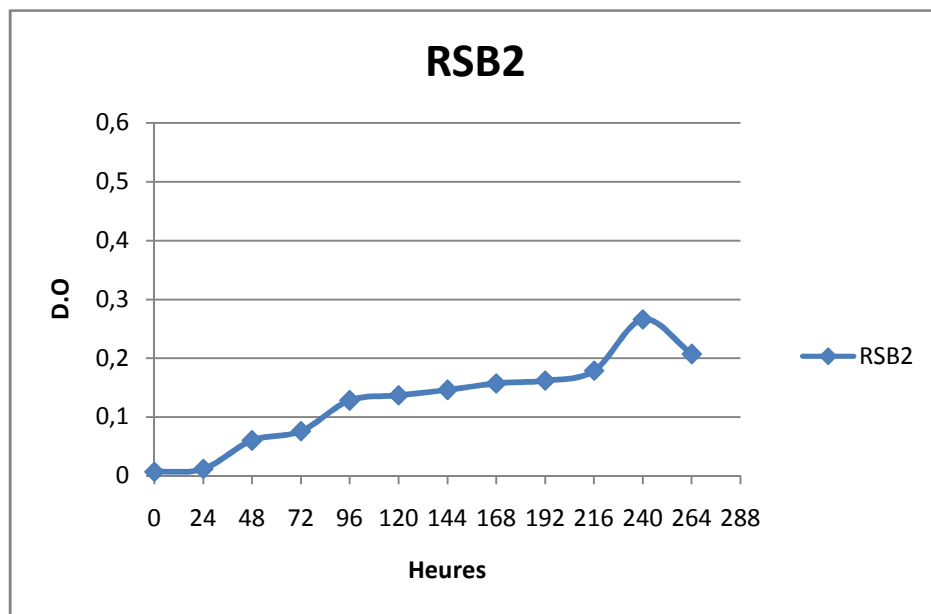
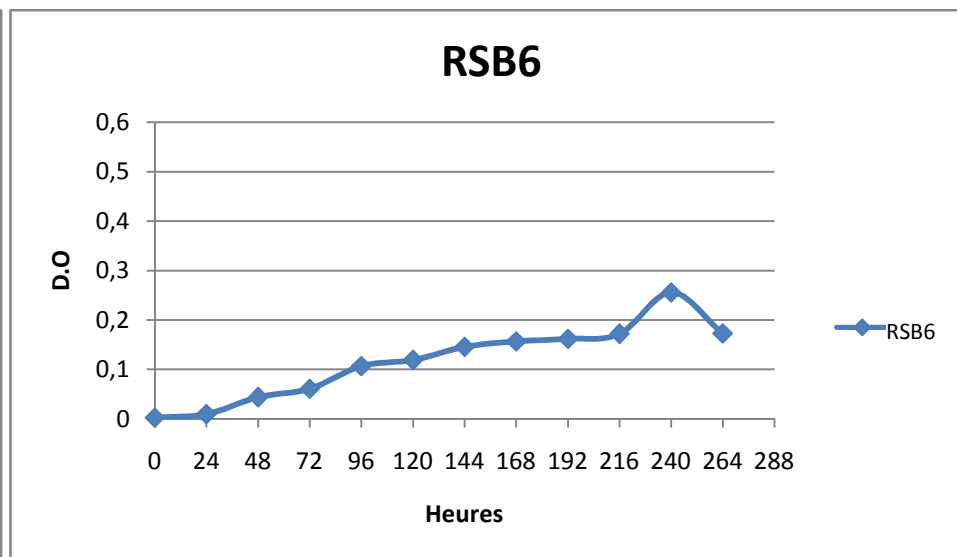
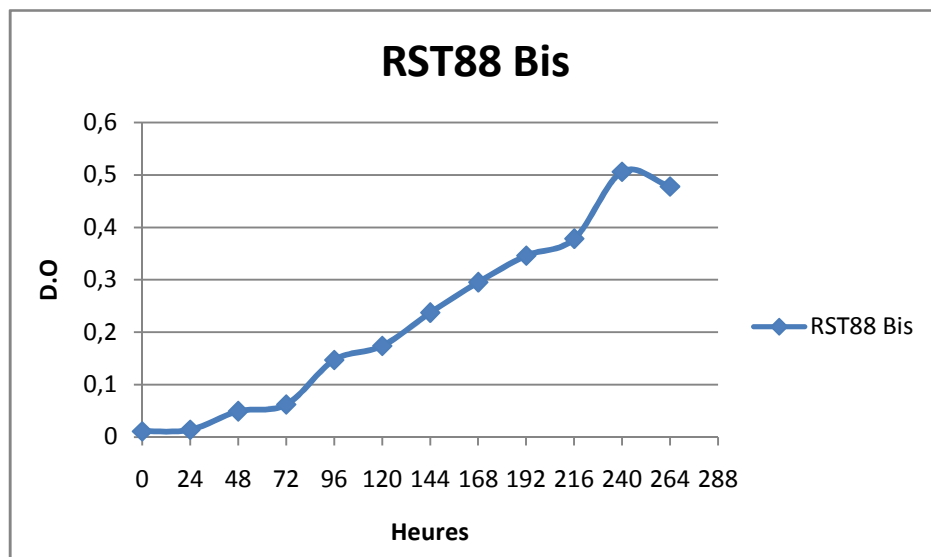
K₂HPO₄0.5g

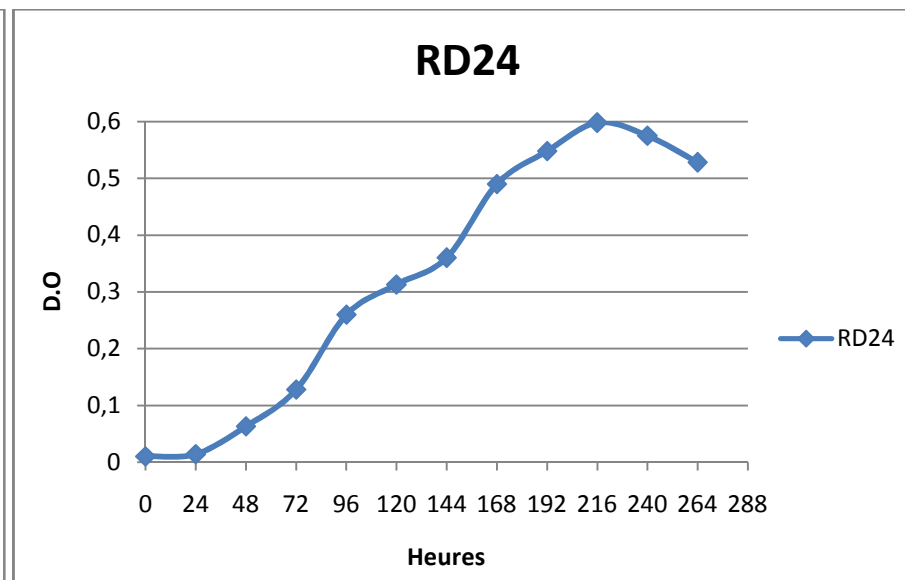
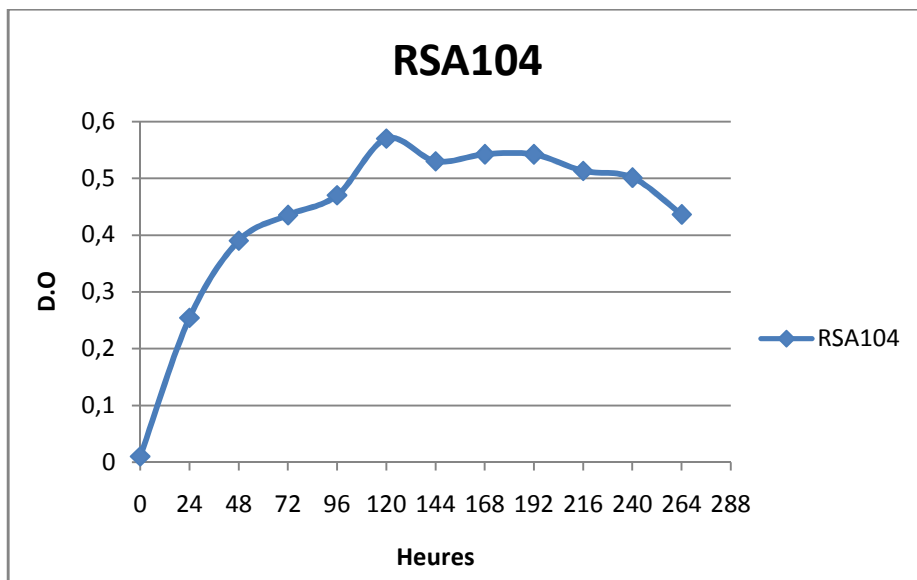
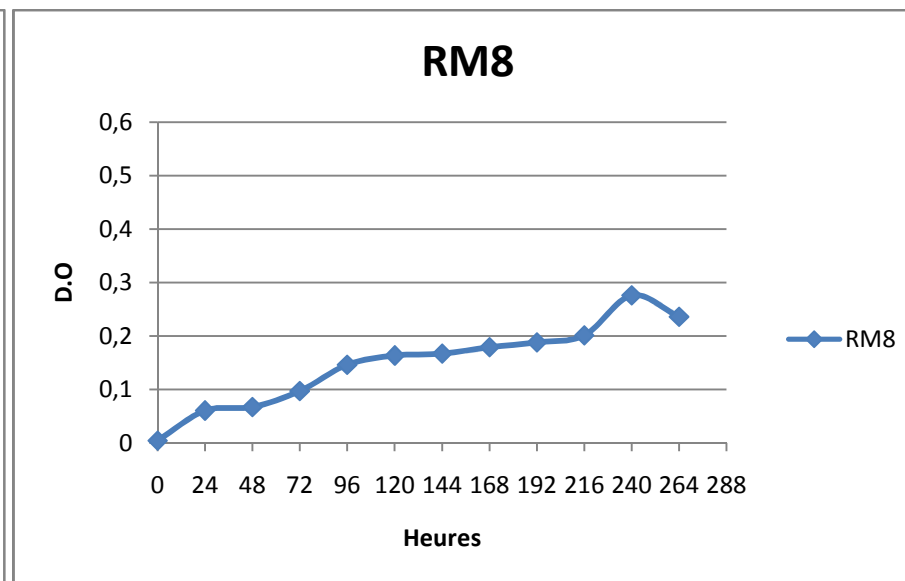
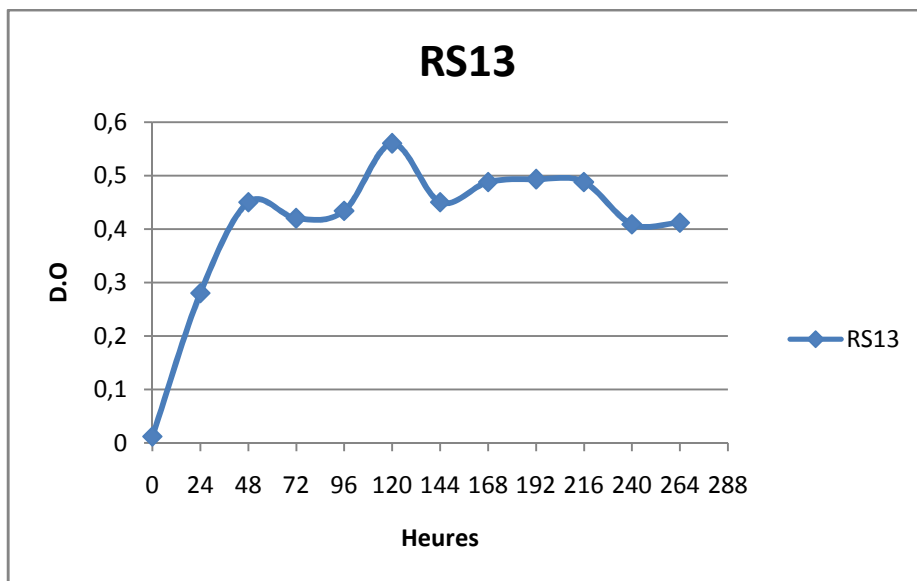
MgSO₄, 7H₂O.....0.2g

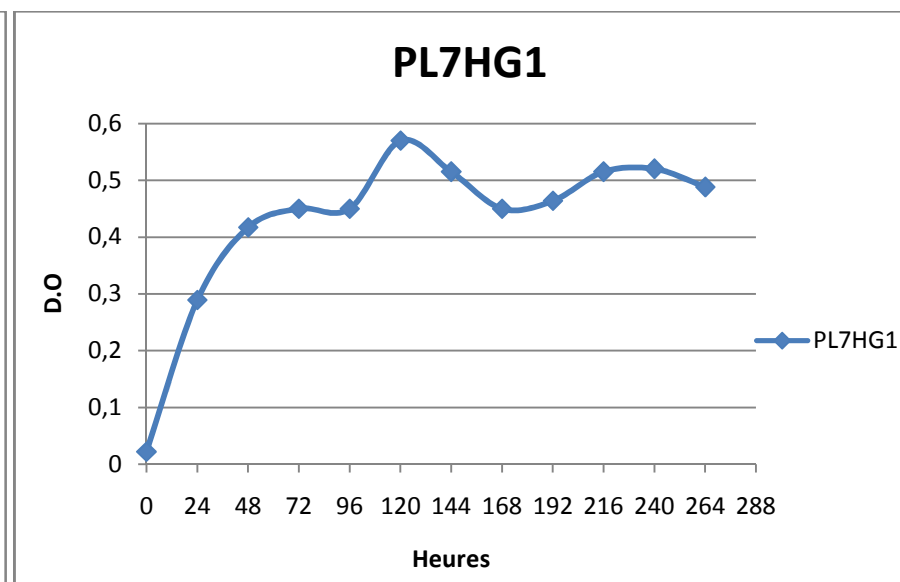
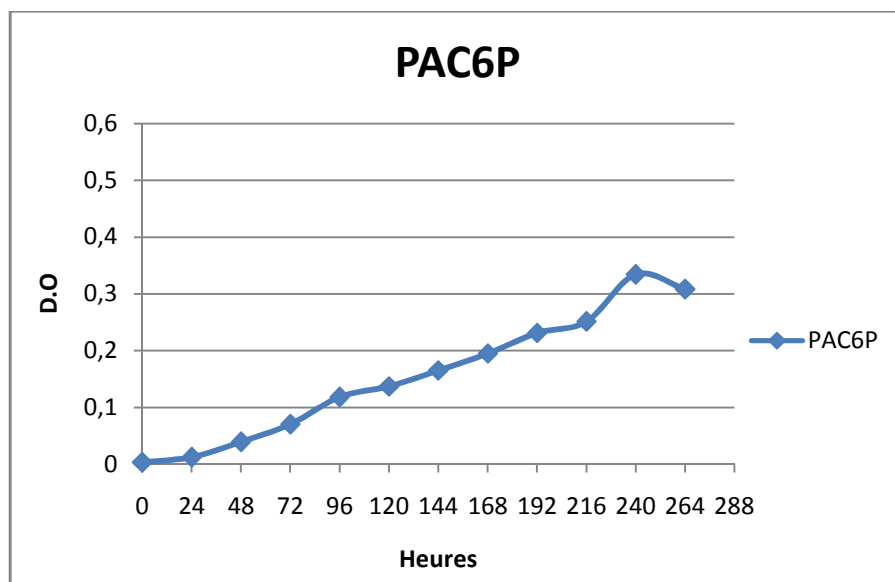
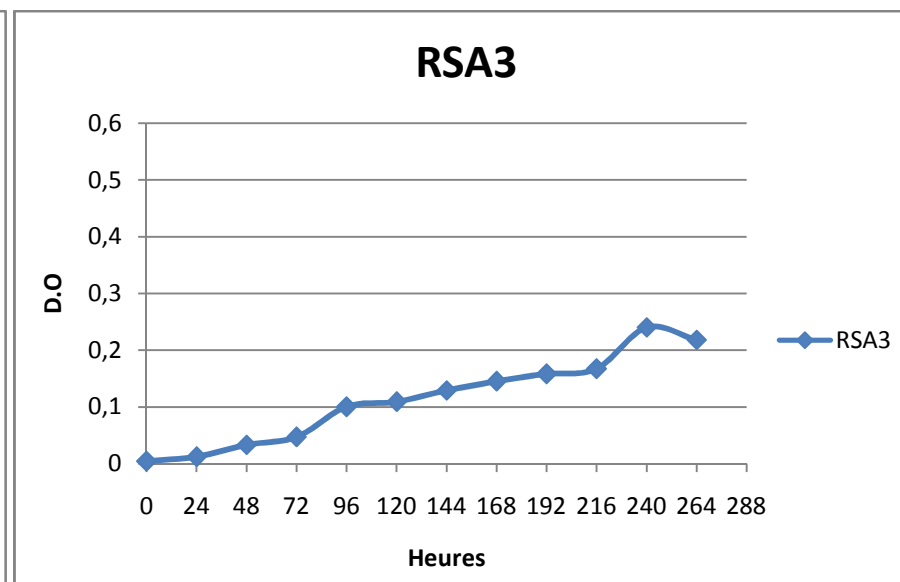
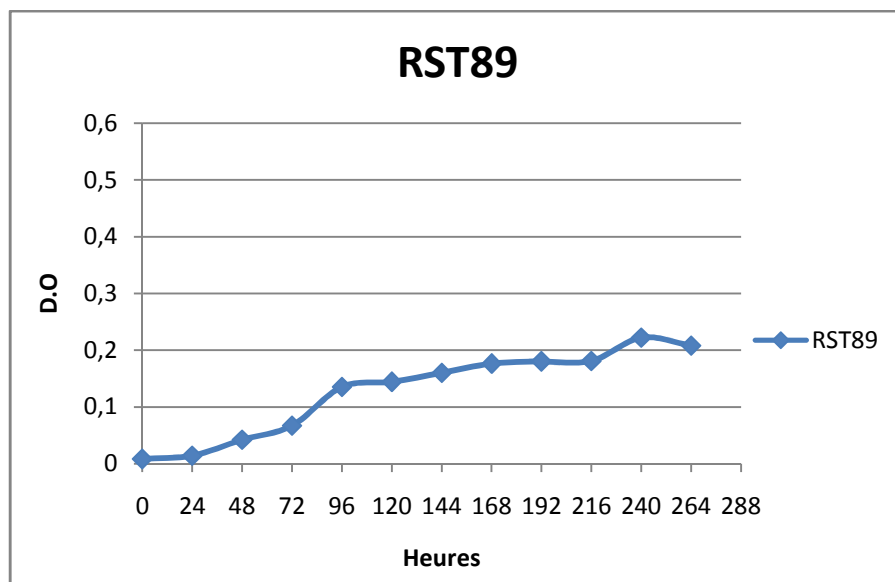
NaCl.....0.1g

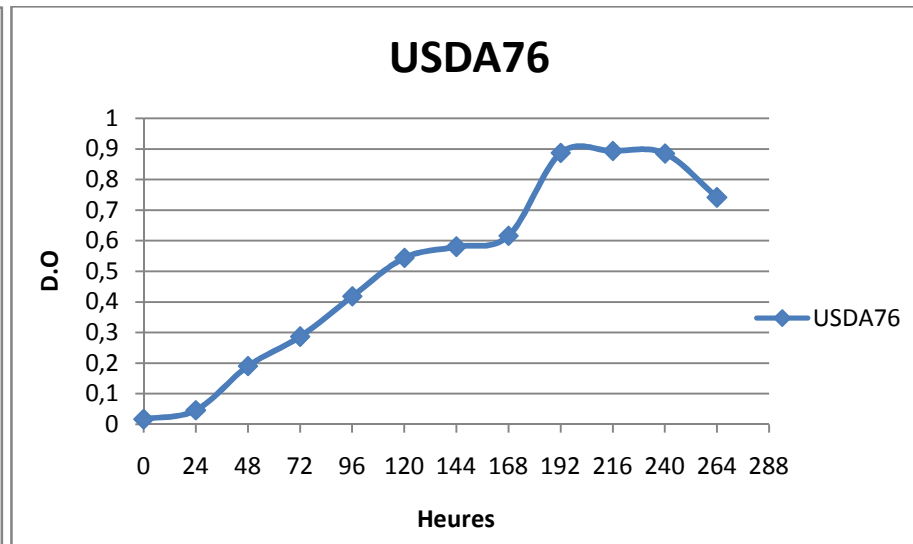
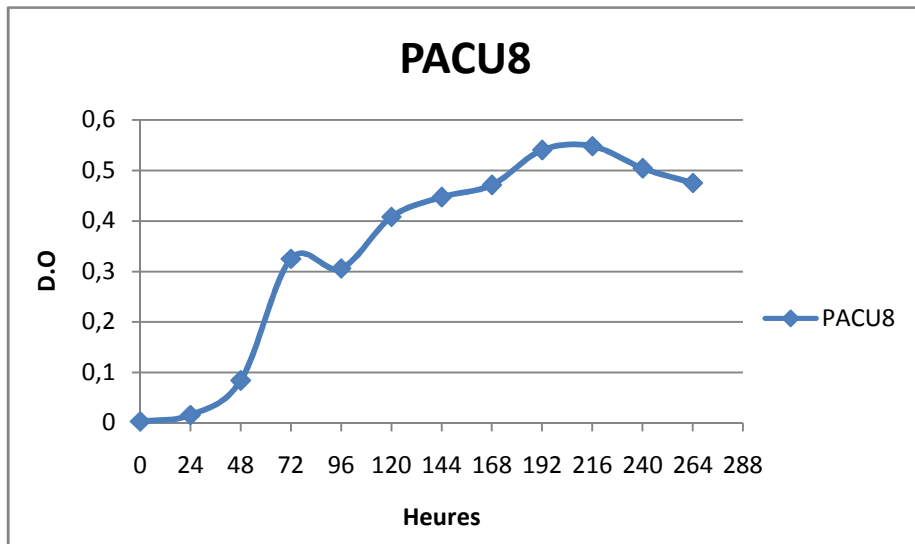
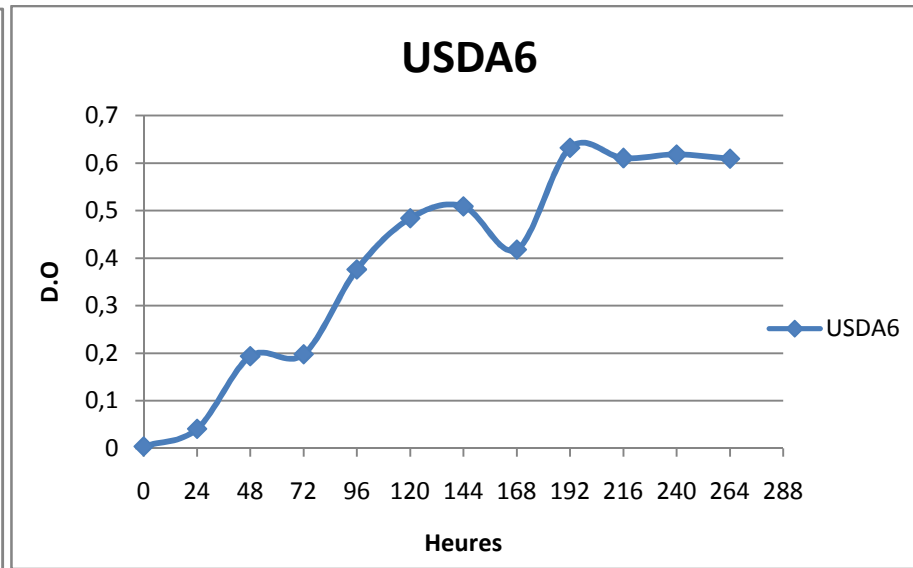
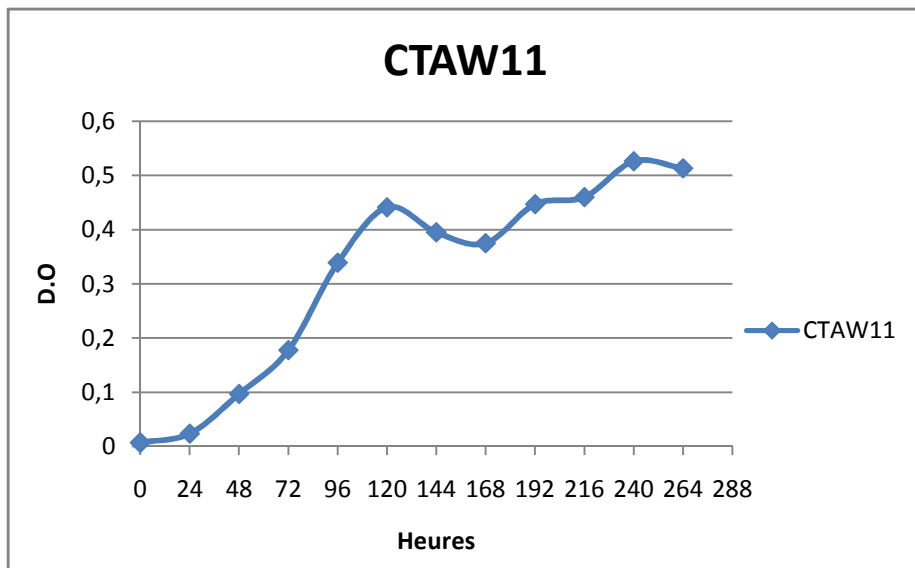
Eau distillée.....1000ml

pH ajusté à 6.8









Annexe 3 : Températures (moyenne de trois déterminations)

Température Souches	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	36°C
RST88 Bis	0,1635	0,24	0,3105	0,1795	0,075	0,045
RSB6	0,07	0,0805	0,116	0,0885	0,046	0,013
RSB2	0,074	0,09	0,114	0,096	0,083	0,115
SSET16	0,0725	0,0735	0,1155	0,095	0,08	0,016
RS13	0,0585	0,0605	0,0965	0,063	0,0485	0,013
RM8	0,0562	0,091	0,119	0,0895	0,062	0,0335
RSA104	0,073	0,088	0,126	0,0102	0,071	0,063
RD24	0,058	0,075	0,121	0,074	0,056	0,016
RST89	0,078	0,085	0,117	0,058	0,0475	0,0175
RSA3	0,047	0,058	0,116	0,077	0,052	0,041
PAC6P	0,102	0,113	0,155	0,083	0,071	0,052
PL7HG1	0,0975	0,109	0,094	0,085	0,063	0,052
CTAW11	0,092	0,123	0,177	0,1	0,07	0,048
USDA6	0,118	0,209	0,114	0,178	0,283	0,202
PACU8	0,165	0,183	0,137	0,121	0,097	0,062
USDA76	0,12	0,252	0,344	0,168	0,14	0,11

Annexe 4 : pH (moyenne de trois déterminations)

Ph Souches	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9	pH=10	pH=11
RST88 Bis	0,084	0,082	0,125	0,156	0,18	0,129	0,009	0,006
RSB6	0,065	0,065	0,066	0,124	0,137	0,163	0,026	0,019
RSB2	0,081	0,102	,0106	0,152	0,138	0,135	0,02	0,011
SSET16	0,084	0,09	0,108	0,131	0,143	0,112	0,016	0,016
RS13	0,056	0,063	0,075	0,092	0,118	0,077	0,015	0,011
RM8	0,069	0,09	0,096	0,106	0,134	0,106	0,019	0,018
RSA104	0,077	0,093	0,091	0,128	0,133	0,145	0,018	0,015
RD24	0,068	0,081	0,095	0,217	0,355	0,225	0,01	0,01
RST89	0,03	0,047	0,061	0,098	0,095	0,039	0,012	0,013
RSA3	0,033	0,084	0,162	0,233	0,247	0,191	0,018	0,015
PAC6P	0,146	0,16	0,248	0,273	0,247	0,162	0,016	0,012
PL7HG1	0,082	0,089	0,126	0,13	0,145	0,071	0,016	0,013
CTAW11	0,122	0,206	0,302	0,328	0,224	0,0201	0,03	0,016
USDA6	0,149	0,205	0,309	0,338	0,26	0,232	0,02	0,013
PACU8	0,116	0,17	0,209	0,235	0,297	0,127	0,024	0,013
USDA76	0,05	0,096	0,207	0,355	0,368	0,151	0,014	0,014

Annexe 5 : Salinité (moyenne de trois déterminations)

Concentration souches	100	200	300	400	500	600
RST88 Bis	0,62	0,5715	0,4805	0,382	0,313	0,171
RSB6	0,41	0,345	0,246	0,242	0,247	0,216
RSB2	0,552	0,548	0,446	0,412	0,283	0,285
SSET16	0,32	0,313	0,2375	0,242	0,1625	0,008
RS13	0,333	0,258	0,208	0,152	0,112	0,008
RM8	0,32	0,254	0,192	0,163	0,1	0,007
RSA104	0,6475	0,0611	0,387	0,39	0,324	0,0318
RD24	0,6475	0,458	0,372	0,31	0,286	0,246
RST89	0,3	0,228	0,22	0,214	0,154	0,003
RSA3	0,468	0,383	0,27	0,239	0,07	0,0603
PAC6P	0,44	0,491	0,448	0,343	0,2	0,061
PL7HG1	0,607	0,613	0,495	0,464	0,3645	0,303
CTAW11	0,49	0,458	0,43	0,384	0,224	0,108
USDA6	0,6285	0,55	0,386	0,33	0,304	0,225
PACU8	0,164	0,035	0,031	0,034	0,038	0,011
USDA76	0,5305	0,513	0,406	0,348	0,271	0,1645

Annexe 6

Signification et valeurs des codes des caractères phénotypiques utilisés pour les analyses numériques (CAH).

CODE	SIGNIFICATION	CODE NUMERIQUE
FRM	Forme	0 : autres formes 1 : arrondies
MOB	Mobilité	0 : non mobile 1 : mobile
ASP	Aspect	0 : rugueux 1 : lisse
CON	Contour	0 : non circulaire 1 : circulaire
CLR	Couleur	0 : non blanchâtre 1 : blanchâtre
PHB	PHB	0 : absence 1 : présence
GRM	Gram	0 : négatif 1 : positif
TR	Type respiratoire	0 : anaérobie 1 : aérobie
TAC	Temps d'apparition des colonies	0 : ≤ 6 jours 1 : >6 jours
DC	Diamètre des colonies	Valeurs mesurées
ASP	Aspect des colonies	0 : rugueux 1 : lisse
ELV	Élévation des colonies	0 : plate 1 : bombée
CC	Contour des colonies	0 : circulaire 1 : non circulaire
MUC	Mucomidité des colonies	0 : non mucoïde 1 : mucoïde 2 : très mucoïde
OPA	Opacité des colonies	0 : opaque 1 : translucide

Caractères biochimique 0 : absence de l'enzyme ou du produit

1 : présence de l'enzyme ou du produit

oNPG	oNPG hydrolase
CITR	Citrate reductase
IND	Tryptophanase
H2S	Production d'h ₂ s
RM	Prodction d'acides
VP	Prodction d'acétoïne

NIT	Nitrate redctase
NIR	Nitrite reductase
GAZ	Production de gaz
LAC	Fermentation lactose
GLU	Ferementation glucose

Assimilation des carbohydrates et des acides aminées 0 : non assimilé

1 : assimilé

Sor	Sorbose
Cel	Cellebiose
Rah	Rahmnose
Tre	Tréhalose
Glu	Glucose
Xyl	Xylose
Ara	Arabinose
Ala	Alanine
Leu	Leucine
Met	Méthionine
Ser	Serine
His	Histidine
Asg	Asparagine
Cys	Cystéine
Lys	Lysine
Iso	Isoleucine

Résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds 0 : sensible

1 : résistant

Ery	Erythromycine
Kan	Kanamycine
Tet	Tétracycline
Esp	Espectinomycine
Amp	Ampicilline
Zn	Zinc
Cu	Cuivre
Pb	Plomb
Cd	Cadmium
Hg	Mercure

Caractères physiologiques absorbance à 630nm

T26	Croissance à 26°C
T28	Croissance à 28°C
T30	Croissance à 30°C
T32	Croissance à 32°C
T34	Croissance à 34°C
T36	Croissance à 36°C
PH4	Croissance à PH4
PH5	Croissance à PH5
PH6	Croissance à PH6
PH7	Croissance à PH7
PH8	Croissance à PH8
PH9	Croissance à PH9
PH10	Croissance à PH10
PH11	Croissance à PH11
100 mM	Croissance à 100 mM
200 mM	Croissance à 200 mM
300 mM	Croissance à 300 mM
400 mM	Croissance à 400 mM
500 mM	Croissance à 500 mM
600 mM	Croissance à 600 Mm

Matrice des caractères phénotypiques codés, pour une analyse ascendante hiérarchique (CAH).

	RST88 Bis	RST6	RSB2	SSET1 6	SS13	RM8	RSA10 4	RD24	RST89	RSA3	PAC6P	PL7H G1	CTA W11	USDA6	PAC U8	US DA 76
FRM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MOB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ASP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CON	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CLR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PHB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GRM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TAC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
ASP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ELV	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MUC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

OPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
oNPG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CITR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NIT	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
NIR	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
GAZ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LAC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GLU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Cel	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
Rah	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
Tre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
Xyl	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
Ara	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
Ala	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
Leu	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
Met	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
Asg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
iso	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
Zn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T26	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1
T28	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
T30	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
T32	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1

T34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
T36	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
PH4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
PH5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
PH6	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
PH7	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
PH8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
PH9	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
PH10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PH11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
200 mM	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
300 mM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
400 mM	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
500 mM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
600 mM	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1

Résumé

Dix souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées à partir de nodules racinaires de *Retama* sp., originaire du Nord -Est d'Algérie et appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, ont fait l'objet d'une étude visant à les caractérisés phénotypiquement à travers les caractères cellulaires, morphologique, culturaux, biochimiques, physiologiques, résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, ainsi que l'étude de la spécificité de la nodulation.

Cette étude a permis de caractériser ces souches par une bonne croissance entre 30°C et 32°C, entre pH7 et pH8, cependant la croissance est faible au-delà de 100mM NaCl ainsi qu'en présence de sucres ou d'acides aminés comme seule source de carbone, elles sont sensibles aux antibiotiques et aux métaux lourds testés et elles ne montrent aucune spécificité de nodulation. Ces résultats regroupés en servis à effectuer une analyses numérique par classification ascendante hiérarchique des 66 caractères étudiés et qui a mis en évidence le regroupement des souches en deux clusters.

Le séquençage de l'ADN 16s de deux souches a déterminé le regroupement ces souches en un seul sous cluster distinct des souches de *Bradyrhizobium* décrites auparavant.

Mots-clés: *Bradyrhizobium* , *Retama* sp., Caractérisation phénotypique.

Abstract

Ten strains of *Bradyrhizobium* isolated from roots nodules of *Retama*.sp, collected in the North-East of Algeria and pertaining to the collection of the Microbial Ecology Laboratory, were the subject of a study aiming to make a phenotypic characterization through cellular, morphological, cultural, biochemical, physiological characters and resistance to antibiotics and heavy metals, as well as the study of the specificity of the nodulation.

This study has allowed the characterization by a good growth between 30°C and 32°C, between pH7 and pH8, however the growth is weak beyond 100mM NaCl as well as in the presence of sugars or of amino acids as the only source of carbon. They are sensitive to antibiotics and to the heavy metals tested and they do not show any specificity of nodulation. The numerical analyses made by hierarchical ascending classification of the 66 studied characters highlighted the regrouping of the strains in two clusters.

The sequences of the ADN 16s of two strains, determined the regrouping of this strains into only one under cluster distinct from the *Bradyrhizobium* strains described before.

Keywords: *Bradyrhizobium*, *Retama* sp., Phenotypic characterization

ملخص

عشرة سلالات من *براديريزوبيوم* معزولة من العقيدات الجذرية لريتما sp. ، منزوعة من شمال شرق الجزائر ملكية مختبر البيئة الميكروبية ، كانت موضوعا لدراسة تهدف إلى تمييز ظاهري من خلال المميزات الخلوية الشكلية، الزراعية، البيوكيميائية، الفسيولوجية ،مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة ، فضلا عن دراسة لخصوصية تكوين العقد الجذرية. هذه الدراسة لوصف هذه السلالات عن طريق نمو جيدة ما بين 30 درجة مئوية و 32 درجة مئوية، و درجة الحموضة بين 7 و 8 ويبدو أن النمو ضعيف اذا تتجاوز 100 ملي مول كلوريد الصوديوم و كذلك بحضور السكريات أو الأحماض الأمينية كمصدر وحيد للكربون و الازوت ، كما انها حساسة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وأنها لا تظهر أي خصوصية في تكوين العقيدات الجذرية. النتائج المتحصل عليها استعملت لتحليل رقمي درس فيها 66 خاصة واطهرت تجمع السلالات في مجموعتين دراسة الحمض النووي 16S لسالتين حدد تجمع هذه السلالات في كتلة واحدة منفصلة عن السلالات المعروفة.

كلمات البحث: *براديريزوبيوم*، ريتاما. sp الوصيف المظهري
