

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
Filière : Sciences Biologiques
Option : Ecologie Microbienne



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Caractérisation des souches isolées de

Hedysarum coronarium

Présenté par :
BOUKECHA Ouissam
HAMMADI Linda

Soutenu le : **18/06/2017**

Devant le jury composé de :

M ^r : BELHADI D	MAA	Président
M ^{me} : BOULILA Farida.	MCA	Encadreur
M ^{elle} : BOUREBABA Y.	Dr	Co-Encadreur
M ^r : NABTI E.	Pr	Examineur

Année universitaire : 2016 / 2017



Remerciements

Nous tenons à remercier en premier dieu le tout puissant pour nous avoir donné la force et le courage d'accomplir ce modeste travail.

Ce travail ne serait pas aussi riche sans l'aide de notre promotrice Mme BOULILA Farida, on la remercie pour la qualité de son encadrement.

A notre Co promotrice Melle BOUREBABA Yasmina, nous tenons à la remercier pour sa gentillesse, pour son aide et ses nombreuses orientations durant la préparation de ce travail mais surtout notre initiation à la recherche.

Nous tenons également à remercier les membres de notre jury : Mr BELHADI Djellali et Mr NABTI Abdelhafid, d'avoir accepté de présider et d'examiner ce travail.

Nos profonds remerciements vont à l'ensemble du personnel du Laboratoire d'Ecologie Microbienne.

Tout comme nous exprimons les mêmes sentiments de gratitude à tous les enseignants qui nous ont comptés parmi leurs étudiants tout au long de notre formation.

Enfin nous finirons par remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

C'est avec un cœur rempli de joie que je dédie ce travail

À la mémoire de mon très cher cousin Rachid, à qui je dois beaucoup, tant le souvenir de ses conseils que de ses encouragements constants.

*À ma mère et mon père, pour leurs conseils, leurs encouragements et leurs soutiens inconditionnels dans les moments importants de ma vie qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs. Aucune dédicace ne saurait être assez expressive pour exprimer ma gratitude pour tous vos sacrifices pour moi.
Merci pour tout.*

À mes chers frères Faycel et Naim, à mes sœurs Nadjette et sa famille (Amer et Omar), Souhila, Zahou et Niha aux quels je souhaite beaucoup de réussite.

Je remercie toute ma famille pour son affection au cours de mes études surtout Nana et Da Zahir.

Je ne peux pas oublier de remercier chaleureusement mes très chers amis Cheri, Danouche, Dida, Souad, Chahou et Halim pour l'ambiance cordiale et l'aide qu'ils m'ont apportés à tout moment. Je leurs souhaite, à tous bonne continuation et beaucoup de réussite.

À mon très cher binôme Lynda avec laquelle j'ai partagé ce travail. À sa famille et à ces amies.

À tous ceux qui me connaissent.

Ouissam



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers et adorables parents qui m'ont toujours fort encouragé, aider dans la recherche du savoir durant tout mon parcours avec beaucoup de tendresse, de dévouement, de gentillesse, d'amour, d'affections et qui ont toujours éclairé mes chemins.

À mes tendres sœurs Sassa et Djamilia pour leurs amours et leurs générosités.

À mes frères Fouad, Mamine et Habib qui ont été très patient avec moi et qui m'ont toujours encouragé afin d'aller toujours plus loin.

À ma très chère amie Sabrina qui m'a toujours soutenu depuis six ans et qui a été la petite sœur que j'ai toujours souhaitée d'avoir et qui a été là pour moi.

À mes grands-parents Djedi Moho, Djedi Smail et Yama Baya. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent.

À mes tante Wassila, Faroudja, Radia et sa famille surtout Nassima, pour leurs soutien moral et leurs encouragements permanents.

À tous mes amies Rozina, Lila, Nadjou, Thiziri et Sonia pour leur présence, leur compréhension et leur bonne humeur de tous les jours.

À mon très cher binôme Ouissam et ces copines Radia, Chrifa, Chaho, Danouch et Zaho.

Linda



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Partie Bibliographique

I. Description du genre *Hedysarum*..... 03

I.1. Aperçu général de ce genre..... 03

I.2. Systématique des sullas 04

I.3. Description botanique et écologique 04

I.4. *Hedysarum coronarium* 06

I.5. Intérêts et exploitation du sulla 07

II. Rhizobia 07

II.1. Description des rhizobia 08

II.2. Taxonomie des rhizobia 08

II.3. Partenaire symbiotique d'*Hedysarum coronarium*..... 09

III. Association rhizobium-légumineuse 10

III.1. Symbiose rhizobium-légumineuse 10

III.2. Gènes impliqués dans la nodulation 11

III.2.1. Génétique de la plante 11

III.2.2. Génétique du rhizobia..... 12

III.3. Processus de la nodulation 12

III.4. Paramètres affectant la réussite de la nodulation 13

III.5. Importance de la symbiose rhizobia - sullas 15

Partie Pratique

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Collecte des nodules racinaires d' <i>Hedysarum coronarium</i>	16
II. Isolement et purification de bactéries symbiotiques	17
II.1. Stérilisation des nodules racinaires	17
II.2. Ensemencement et purification des bactéroïdes	17
III. Conservation des isolats	17
III.1. Conservation à 4°C.....	17
III.2. Conservation à – 80°C.....	18
IV. Authentification des isolats bactériens	18
IV.1. Germination aseptique des graines	18
IV.2. Préparation des cultures bactériennes.....	18
IV.3. Inoculation des plantules d' <i>Hedysarum coronarium</i>	19
V. Caractérisation phénotypique des isolats	19
V.1. Tests culturaux et cellulaires	19
V.1.1. Caractérisation morphologique	19
V.1.2. Caractérisation cellulaire	19
V.1.3. Détermination du temps de génération.....	19
V.2. Tests physiologiques	20
V.2.1. Effet de la température sur la croissance	20
V.2.2. Effet du pH sur la croissance	20
V.2.3. Effet du NaCl sur la croissance	20
V.3. Tests biochimiques	20
V.3.1. Galerie APi ₂₀ NE	20
V.3.2. Réduction des nitrates	21
V.3.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)	21
V.4. Test nutritionnel	21
V.5. Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques.....	22
VI. Caractérisation symbiotique des isolats bactériens	22
VI.1. Test de nodulation croisé	22

Chapitre II : Résultats et discussions

I. Echantillonnage	23
I.1. Collection bactérienne nodulant <i>Hedysarum coronarium</i>	24
I.2. Test de nodulation simple	24
II. Caractérisation phénotypique des isolats de sulla	24
II.1. Caractérisation cultural et cellulaire	25
II.2. Caractérisation physiologique	26
II.2.1. Effet de la température sur la croissance	26
II.2.2. Effet du pH sur la croissance	27
II.2.3. Effet du NaCl sur la croissance.....	29
II.4. Caractérisation biochimique	30
II.4.1. Galerie APi ₂₀ NE.....	30
II.4.2. Test de réduction des nitrates	32
II.4.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)	33
II.4.4. Test nutritionnel	33
II.5. Résistance et sensibilité aux antibiotiques	34
III. Analyse de la diversité symbiotique des isolats bactériens.....	35
III.1. Spectre d'hôte des isolats (test croisé)	35
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographiques	38

Annexes

Résumé

Liste des Abréviations

%	Pourcentage	m	Mètre
°	Degré	MAL	D-maltose
ADI	Acide adipique	MAN	D-mannitol
ARA	L-arabinose	Mg	Magnésium
BTB	Bleu de bromothymol	mg	Milligramme
C°	Degré Celsius	min	Minute
Ca	Calcium	ml	Millilitre
CAP	Acide caprique	MLT	Acide malique
CIT	Trisodium citrate	mm	Millimètre
cm	Centimètre	MNE	D-mannose
DO	Densité optique	MO	Matière organique
EPS	exopolysaccharides	N	Azote
g	Gramme	N₂	Azote gazeux
GLU	D-glucose	Na	Sodium
GNT	Potassium gluconate	NaCl	Chlorure de sodium
h	Heure	NaOH	Hydroxyde de sodium
H	Humidité	NAG	N-acétyl-glucosamine
H.	<i>Hedysarum</i>	NH₃	Nitrate
HCl	Acide chlorhydrique	NH₄	Ammonium
HgCl₂	Chlorure mercurique	nm	Nanomètre
H₂SO₄	Acide sulfurique	nod	Nodulation
j	Jours	pH	Potentiel hydrogène
K	Potassium	pSym	Plasmide symbiotique
KCl	Chlorure de potassium	T°	Température
Kg	Kilogramme	µl	Microlitre
KNO₃	Nitrate de potassium	µm	micromètre
l	Litre	W/V	Poids / Volume
LPS	Lipopolysaccharides	YMA	Yeast Extrat mannitol Agar
M	Molaire	YMB	Yeast Extrat mannitol Brouth

Liste de figures

Figure 01 : Quelques espèces appartenant au genre <i>Hedysarum</i>	03
Figure 02 : Description morphologique du genre <i>Hedysarum</i>	04
Figure 03 : Répartition géographique des différentes espèces du genre <i>Hedysarum</i> ainsi que les contextes bioclimatiques en Algérie	05
Figure 04 : Le Sulla du nord (<i>Hedysarum coronarium</i>).	06
Figure 05 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur le séquençage ARNr 16s.....	09
Figure 06 : <i>Rhizobium sllae</i> . (A) Colonies de <i>Rhizobium sllae</i> sur milieu solide, (B) Observation de <i>Rhizobium sllae</i> sous microscope électronique.....	10
Figure 07 : Symbiose : les échanges réciproques de nutriments, d'énergie et d'azote entre légumineuse et rhizobia.....	10
Figure 08 : Mécanisme d'interaction plante-rhizobia	11
Figure 09 : Différentes étapes permettant la formation des nodules racinaires	13
Figure 10 : Site de prélèvement des nodules racinaires d' <i>H. coronarium</i> (Campus de Targua Ouzemour).....	16
Figure 11 : Stérilisation des nodules racinaires d' <i>H. coronarium</i>	17
Figure 12 : Etapes de germination des graines d' <i>Hedysarum coronarium</i>	18
Figure 13 : <i>Hedysarum coronarium</i> et ces nodules racinaires.	23
Figure 14 : Différents aspect nodulaires d' <i>H. coronarium</i>	24
Figure 15 : Aspect des colonies sur milieu YMA.	25
Figure 16 : Observation sous microscope optique (X100) des souches rhizobiennes.	25
Figure 17 : Effet de la température sur la croissance des isolats d' <i>Hedysarum coronarium</i>	27
Figure 18 : Tolérance des isolats d' <i>H. coronarium</i> aux différents pH.....	28

Figure 19 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats nodulant <i>Hedysarum coronarium</i>	29
Figure 20 : Résultats d'identification par la galerie APi 20 NE.....	30
Figure 21 : Résultats de certaines souches pour la réduction des nitrates.....	32
Figure 22 : Test du bleu de bromothymol sur YMA.....	33
Figure 23 : Croissance des souches en présence des différents sucres testés	34
Figure 24 : Résultats de l'antibiogramme pour Hc9.	35
Figure 25 : Résultats du test de nodulation croisé pour la souche Hc9 avec les différentes légumineuses testées.	36

Liste des tableaux

Tableau I : Résultats de la galerie APi_{20} NE	32
--	----

Introduction

Dans les systèmes de production agricole, l'azote est un élément nutritif essentiel à la croissance des végétaux, notamment pour la synthèse des acides nucléiques, des protéines et des enzymes de la photosynthèse. Il favorise l'utilisation des hydrates de carbone et stimule le développement et l'activité racinaire, facilitant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux.

L'azote est abondant sur la globe terrestre et représente 78% de l'atmosphère terrestre. La disponibilité de cet élément est fortement limitant aussi bien dans les écosystèmes naturels que cultivés et il a une grande influence à la fois sur le rendement et la qualité du produit.

Les plantes acquièrent cet élément par l'assimilation de l'azote minéral (nitrate, ammonium) et pour certaines d'entre elles en mobilisant l'azote atmosphérique par le biais de leur association avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote que l'on nomme rhizobia.

Les légumineuses sont des plantes à teneur élevée en protéines et en vitamines qui peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides grâce à leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique (**Boussaïd et al., 1995**).

La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses est intéressante car en plus du niveau de fixation d'azote qui est très élevé, responsable à elle seule de près de 30% de la fixation d'azote annuelle (**Galloway et al., 2003**), elle concerne un groupe de plantes très important pour l'homme et les animaux.

En Algérie, on constate un important déficit fourrager. Le genre *Hedysarum* constitue un patrimoine phytogénétique performant pour la production de fourrage, la protection contre l'érosion et la valorisation des sols dégradés (**Abdelguerfi-berrekia et Abdelguerfi, 1986 ; Abdelguerfi et Abdelguerfi-Berrekia, 1987**). En effet, parmi les dix espèces d'*Hedysarum* que compte l'Algérie (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991**) dont certaines typiques des zones arides et semi-arides (**Abdelguerfi-berrekia, 1985**), ces espèces méritent d'être étudiées et valorisées.

C'est donc dans cette optique que nous nous sommes intéressé à l'étude des interactions rhizobia-*Hedysarum coronarium* afin de mieux comprendre cette association symbiotique et déterminer l'effet des différents facteurs environnementaux sur les deux partenaires. Cette

diversité devrait être exploitée dans les programmes d'amélioration de la production agricole qui constituent l'épine dorsale de toute sécurité alimentaire d'un pays.

Notre objectif est d'étudier dans un premier temps la caractérisation phénotypique et symbiotique des souches de *Rhizobium* isolés à partir d'*Hedysarum coronarium* à travers des caractères morphologiques, culturaux, biochimiques et physiologiques ainsi que leur sensibilité et résistance vis-à-vis des différents antibiotiques.

Ce travail est structuré en trois parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique rassemblant les principales informations sur *Hedysarum* en tant que plante fourragère et valorisante des sols ainsi que sur sa distribution géographique en Algérie mais aussi sur la symbiose *Rhizobium-Hedysarum*.
- La deuxième partie du mémoire concerne la partie pratique depuis l'échantillonnage à l'isolement des bactéries et leur caractérisation qu'elle soit phénotypique ou symbiotique.
- La troisième et dernière partie est réservée aux principaux résultats obtenus et leur interprétation.

Partie Bibliographique

Les légumineuses (Luzerne, trèfle, pois, soja, sulla, lupin,...) sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des fabacées (Dreyfus, 1997 ; Lewis et al., 2005), qui représente la troisième famille de plante la plus importante en genre avec plus de 720 genres et 20 000 espèces (Duhoux et Nicole, 2004). Elles se répartissent en trois sous familles : *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée, *Mimosoideae* avec une fleur régulière et *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon (Dreyfus et al., 1997 ; Brunton, 2002).

Leurs présences dans le système de production agricole jouent un rôle majeur dans l'augmentation de la diversité et l'équilibre des systèmes agro-écologique (Schneider et Huyghe, 2015).

I. Description du genre *Hedysarum*

I.1. Aperçu général de ce genre

Hedysarum est un genre de plante herbacée de la famille des *Fabaceae* (Baatout et al., 1990), légumineuse fourragère, spontanée, composée d'un grand nombre d'espèces (environ 100) (Figure 01) avec une répartition très étendue dans le monde surtout dans le bassin méditerranéen (Boussaïd et al., 1995). Son nom commun utilisé est sulla ou sainfoin d'Espagne (Trifi-Farah et al., 1989) puis récemment reclassé en *Sulla coronaria* (Choi et Ohashi, 2003).

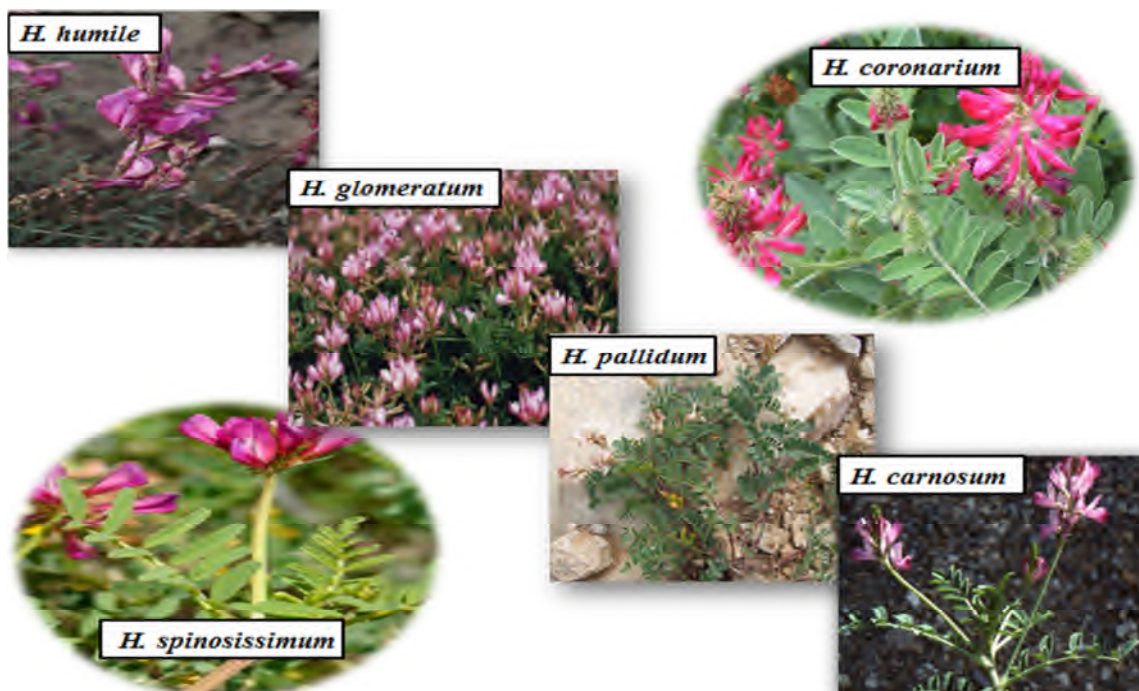


Figure 01 : Quelques espèces appartenant au genre *Hedysarum*.

I.2. Systématique des sillas

Selon **Quezel et Santa** en **1962**, le genre *Hedysarum* appartient au règne des *Plantae*, à l'embranchement des *Spermaphyta*, au sous embranchement des Angiosperme à la classe des Dicotylédone, à la sous classe *Rosidae*, à l'ordre des Fabale, à la tribu de *Hedysareae*, super famille *Legumineusae* et à la famille des *Papilionoideae*.

Ce genre regroupe diverses espèces (**Squartini et al., 2002**) qui se différencient entre autres par leur morphologie, leur mode de reproduction, leur cycle biologique, les aires de répartition ainsi que les caractéristiques bioclimatiques (**Trifi et al., 1983**).

I.3. Description botanique et écologique

Hedysarum est un genre diversifié dans la famille des légumineuses. Il comprend aussi bien des espèces annuelles que pérennes herbacées caractérisés par un système racinaire pivotant à axe principale bien dressé de 50 à 150 cm avec des ramifications latérales pouvant égaler l'axe principale (**Abdelguerfi-Berrekia, 1985**). La tige est dressée cylindrique et pleine, d'une hauteur qui varie de 0,3 à plus de 1,5 m (**Slim et Ben jeddi, 2011**). Les feuilles sont composées de 03 à 05 paires de folioles (2.5 - 4.5 cm), ovales ou arrondies avec une foliole terminale qui est munie d'une pilosité blanchâtre sur les bords (**Ben jeddi, 2005**). Il produit des fleurs qui sont longue de 1.4 à 2.0 cm et pédonculées de différentes couleurs selon les espèces (**Quezel et Santa, 1962**) et donne des gousses contenant des graines allongées de 04 à 05 mm, réniformes, luisantes et de couleur jaunâtre à marron (**Boussaïd, 1995**) (Figure 02).



Figure 02 : Description morphologique du genre *Hedysarum*.

Ce genre est adapté aux différentes conditions écologiques. L'aire de répartition des *Hedysarum* est l'Europe tempérée ainsi que les régions méditerranéennes de l'Afrique du Nord (Hyam et Pankhurst, 1995).

En Algérie, on compte la présence de 10 espèces dont plusieurs sont des endémiques très localisées et chaque région géographique est caractérisée par une espèce particulière de ce genre. Nous citons l'exemple d'*H. carnosum* qui est une espèce des régions arides; elle est rencontrée surtout dans les zones pré-désertiques constantinoises et au pied de l'Aurès. *H. spinosissimum* se développe relativement plus au Nord du pays mais toujours dans des régions sèches sur la steppe, sur les hauts plateaux, dans le Sahara septentrional et d'une façon générale, dans les régions pré-désertique.

A l'Ouest on retrouve *H. aculeolatum*, sous les étages subhumides et semi-arides chauds. *H. coronarium* semble se limiter à l'Est et croit essentiellement dans des régions arrosées. *H. flexuosum* est une espèce du centre Nord de l'Algérie et se développe sous les étages humide et subhumide. *H. glomeratum* qui serait très commune dans le Tell mais très rare ailleurs. *H. pallidum* qui présente une répartition bien plus large (Est, Ouest, Centre), *H. humile* dans le Tell constantinois et l'Atlas Tellien. *H. perrauderianum*; endémique d'Algérie; se trouve à Batna et à Sétif et *H. naudinianum*; espèce assez rare et endémique d'Algérie; elle se rencontre dans le Tell constantinois (Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991) (Figure 03).

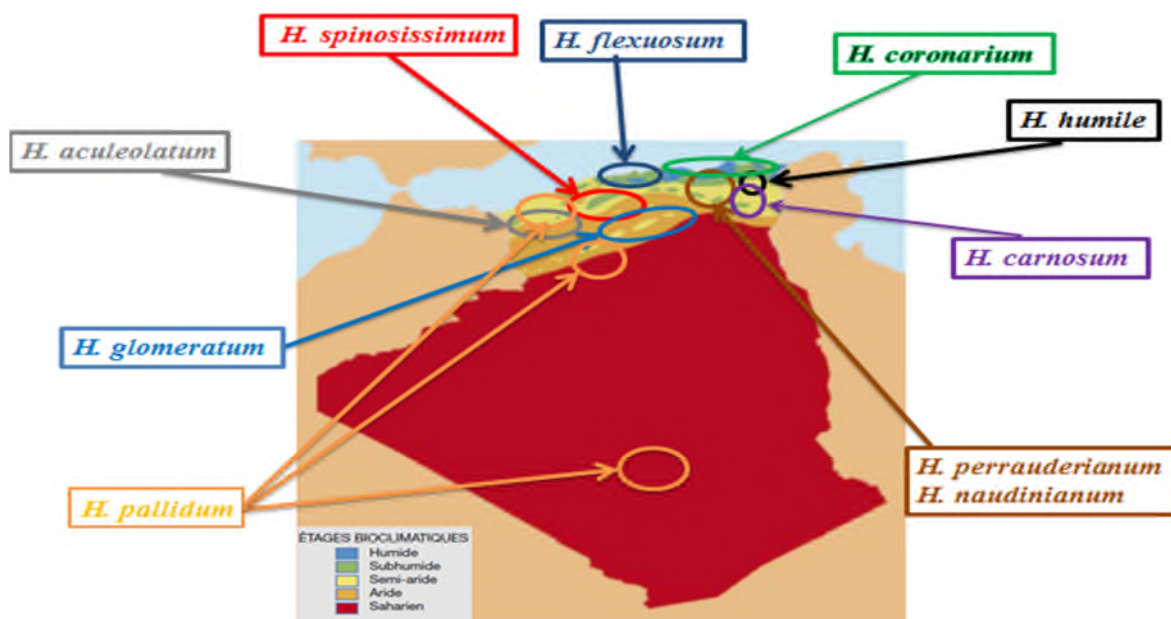


Figure 03 : Répartition géographique des différentes espèces du genre *Hedysarum* ainsi que les contextes bioclimatiques en Algérie (Amirouche et Misset, 2009 modifiée).

I.4. *Hedysarum coronarium*

C'est une espèce fourragère endémique des pays du pourtour méditerranéen (**Gutierrez-Mas, 1983**), annuelle, allogame à faible degré d'autogamie (**Grimaldi, 1961**). Cette plante rampante peut atteindre 1.5 m de longueur.

Son système racinaire est pivotant, profond (jusqu'à 2 m), avec de nombreuses racines secondaires (**Prosperi et Balfourier, 1995 ; Moore et al., 2006**). Les feuilles sont longuement pétiolées et se composent de 7 à 15 paires de folioles ovales avec une foliole terminale (**Moore et al., 2006**). Les folioles sont munies d'une pilosité blanchâtre sur les bords (**Prosperi et Balfourier, 1995**).

Les tiges sont épaisses, boisées, simples ou ramifiées et généralement creuses (**Frame, 2000**). Les fleurs de *Hedysarum coronarium* (1,5 - 2 cm), brièvement pédonculées. La corolle est généralement rouge vif ou violacée mais peut aussi être blanche (**Prosperi et Balfourier, 1995**). Les fleurs sont réunies en racème jusqu'à 35 fleurs.

Les gousses d'*Hedysarum coronarium* sont droites, larges de 4 à 5 mm, à articles couverts d'aiguillons (**Quezel et Santa, 1962**), épineuses et ont de 3 à 8 segments, chaque segment contient une semence crème, à brune clair de 3 mm de diamètre, aplati avec un profil presque circulaire (**Frame, 2000**). Les graines sont réniformes ou ovoïdes (**Prosperi et Balfourier, 1995**).



Figure 04 : Sulla du nord (*Hedysarum coronarium*).

En Algérie, cette espèce semble se limiter au Nord-Est du pays et paraît étroitement localisée sous l'effet des facteurs pédologiques et climatiques à la fois. Elle ne se trouve que sous des pluviométries supérieures à 650 mm (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991**) sur les sols lourds des régions bien arrosées, à des altitudes variables, d'une texture fine à moyenne, à conductivité très faible à moyenne, généralement pauvres en potassium et en calcaire total mais qui présente des potentialités d'adaptation aux différentes conditions écologiques du milieu d'origine (**Issolah et al., 2002**).

I.5. Intérêts et exploitation du Sulla

Le sulla est considéré comme étant une des espèces fourragères les plus utilisés pour l'alimentation du bétail de part le monde (**Abdelguerfi et Ramdane, 2003**). Par exemple, il est utilisé au sud de l'Italie et en Sicile comme foin, ensilage et fourrage vert. Leurs apports nutritionnels peuvent être comparables à ceux du trèfle et de la luzerne (**Barry, 1998**).

Il joue un rôle agronomique important dans l'amélioration de la fixation biologique et la fertilité organo-chimique du sol (**Slim et al., 2008**). Grâce à son système racinaire puissant et pivotant, il a l'avantage de protéger et de lutter contre l'érosion des sols (**Watson, 1982**) d'où l'intérêt de son installation dans les terrains accidentés et marginaux très vulnérables à l'érosion (**Zouaghi, 2001 ; Slim, 2004 ; Slim et Ben Jeddi, 2011**). Il a d'ailleurs été utilisé avec succès pour la revégétalisation des terres dans un certain nombre de pays tel que la Nouvelle Zélande. Il a un rôle clé dans les systèmes basés sur les céréales dans les régions semi-arides car apportés en résidus comme amendement organique permet de résoudre en partie le problème de fertilité des sols dégradés par la culture intensive de ces premières (**Bouajila et al., 2014**).

En Algérie, cette plante est utilisée comme secours pour l'élevage en raison de son rendement et de sa résistance à la sécheresse et à la chaleur (**Hannachi-salhi et al., 2004**).

II. Rhizobia

L'observation de nodules sur les racines des légumineuses remonte au 17^{ème} siècle et ce n'est qu'en 1888 que Beijerinck a pu prouver que ce sont des bactéries qui sont à l'origine de la formation de nodules racinaires. Du grec rhiza : racine et bios : vie. Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, *Rhizobium* décrit au 19^{ème} siècle comme étant des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel de noduler les légumineuses (**Frank, 1889**).

II.1. Description des rhizobia

Ce sont des bactéries du sol fixatrice d'azote, à Gram négatif, de forme bacille de 0.6 à 0.9 μm de large et de 1.2 à 3 μm de longueur, strictement aérobies, non sporulés et chimioorganotrophe (Jordan, 1984). Ils sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou alors 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992). Ces bactéries ont la capacité d'interagir en symbiose avec les légumineuses en formant des nodules soit au niveau des racines ou plus rarement sur les tiges de celles-ci (Schneider et Huyghe, 2015).

Ce sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C avec un optimum de croissance à 28°C. Le pH optimal de croissance des rhizobia se situe entre 6 et 7, mais certaines souches tolèrent des milieux acides (pH = 4) (Somasegaran et Hoben, 1994).

Sur la base du temps de génération des rhizobia on distingue deux groupes : Ceux à croissance rapide après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C et dont le temps de génération est entre 2 et 4 heures avec un diamètre des colonies allant de 2 à 4 mm et ceux à croissance lente, représentés par le genre *Bradyrhizobium*, après 3 à 10 jours d'incubation et dont la vitesse de dédoublement est située entre 6 et 8 heures avec un diamètre des colonies de 1 à 2 mm (Jordan, 1984).

Sur milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), les colonies de rhizobia sont circulaires, convexes, blanches ou crèmes, opaques ou translucides, humides et brillantes (Allen et Allen, 1950). Il est à noter que seules les bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson et al., 2006).

II.2. Taxonomie des rhizobia

La taxonomie des microorganismes et bien-sûr des rhizobia est continuellement en changement. Selon le **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (2007), les rhizobia appartiennent au domaine des *Eubacteria*, au phylum des *Proteobacteria* et à la classe des Alpha et bêta.

D'après Weir en 2016, les rhizobia sont répartis en 13 genres et plus de 98 espèces. Parmi les α -*Proteobacteria*, on distingue plusieurs genres entre autre : *Rhizobium* (Frank, 1889), *Ensifer* plus communément appelé *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005), *Ochrobactrum*

(Trujillo et al., 2005), *Devosia* (Rivas et al., 2002), *Shinella* (Lin et al., 2008) et *Microvirga* (Ardley et al., 2012).

Les β -*Proteobacteria* beaucoup plus rares en symbiose, on retrouve le genre *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) et *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (Chen et al., 2001) (Figure 05).dyyghmjokpl

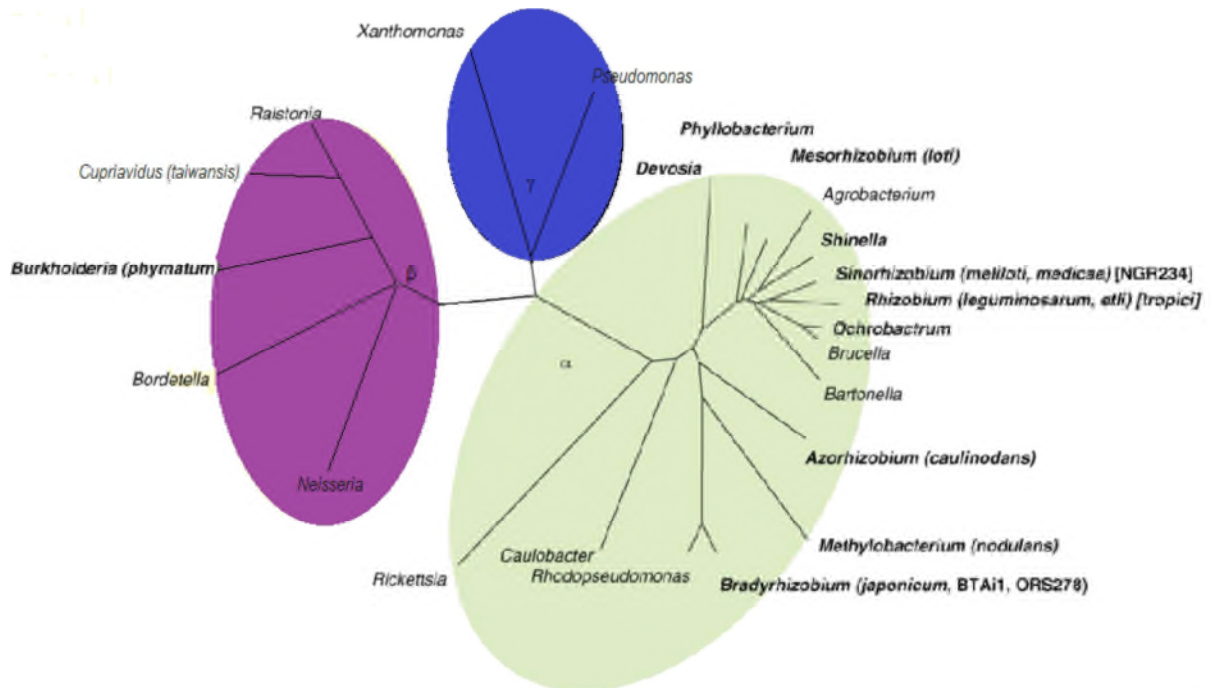


Figure 05 : Classification phylogénétique des rhizobia basée sur le séquençage ARNr 16s (Masson Boivin et al., 2009).

II.3. Partenaire symbiotique d'*Hedysarum coronarium*

Plusieurs études faites sur les microsymbiotes d'*H. coronarium* ont permis de noter la présence d'une spécificité d'hôte (Squartini et al., 2002).

L'association symbiotique est généralement très spécifique; chaque souche n'infecte qu'une espèce ou une gamme très limitée d'hôtes. Cette espèce-là a été définie provisoirement comme *Rhizobium hedysari* (Casella et al., 1984 ; Toffanin et al., 1996) puis elle a été renommé *Rhizobium sullae* (Figure 06) après le développement des techniques moléculaires tel que ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) par Squartini et al. en 2002. Les études réalisées par Glatzle et al. en 1986 ont montrés que l'inoculation de *Rhizobium hedysari* sur d'autre légumineuses n'a donné aucune nodulation sauf chez *H. flexuosum* où on a pu observer la formation de nodules mais qui étaient non fixateurs d'azote atmosphérique (Squartini et al., 2002).

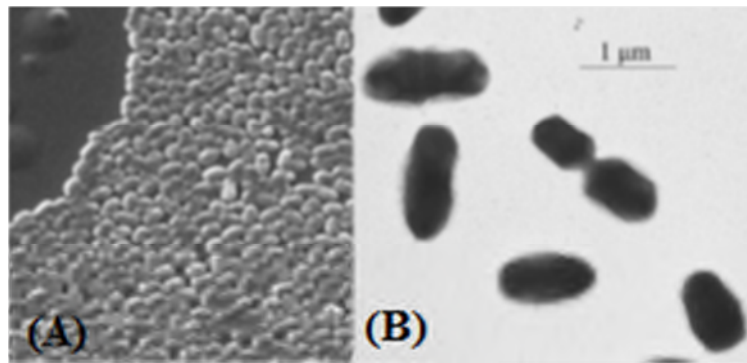


Figure 06 : *Rhizobium sllae*. (A) microscopie électronique à balayage de *Rhizobium sllae* sur milieu solide, (B) Observation de *Rhizobium sllae* sous microscope électronique (Yates et al., 2015).

III. Association rhizobia-légumineuses

III.1. Symbiose rhizobium-légumineuses

Les bactéries du sol appartenant au rhizobia établissent avec les plantes de la famille des légumineuses des relations symbiotiques qui se manifestent par un grand nombre de modifications anatomiques, physiologiques et biochimiques chez les deux partenaires grâce à un dialogue moléculaire permanent.

Cette association se traduit par la formation de nodosités, localisées sur les racines ou les tiges des légumineuses hôtes au sein desquelles le rhizobia fixe l'azote (N_2) au bénéfice de la plante et en échange la plante lui fournit l'énergie et les nutriments nécessaires à son métabolisme comme le montre la figure 07 (Bacle et Tailliez, 2017).

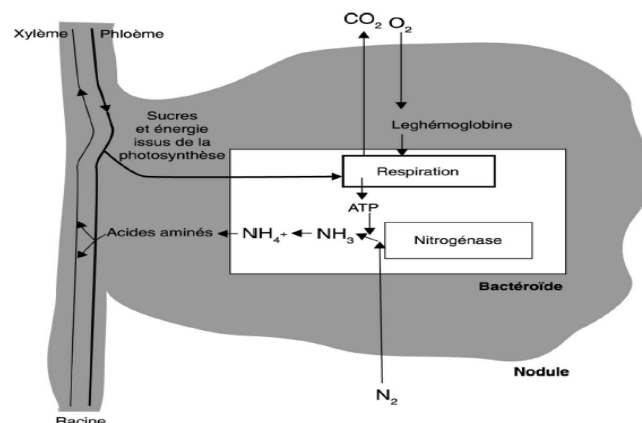


Figure 07: Symbiose : les échanges réciproques de nutriments, d'énergie et d'azote entre légumineuse et rhizobia (Schneider et Huyghe, 2015).

III.2. Gènes impliqués dans la nodulation

La reconnaissance entre les rhizobia et la plante hôte induit la formation des nodosités et exige une étroite collaboration génétique entre les bactéries et la plante comme le montre la figure 08 (Klinger, 2016).

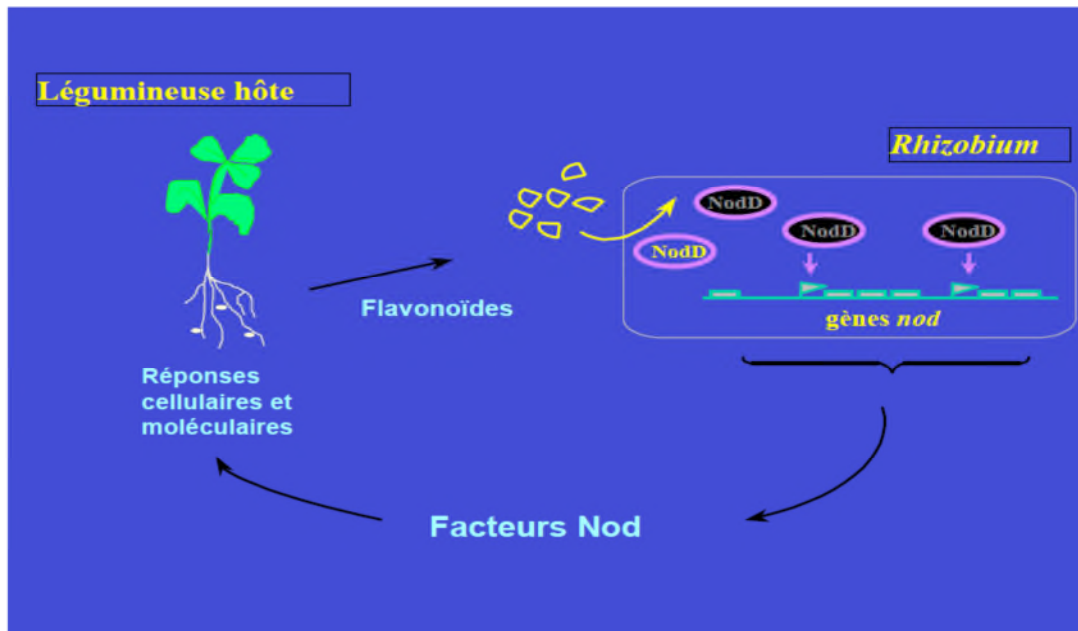


Figure 08 : Mécanisme d'interaction plante-rhizobia (Heulin et al., 2014).

III.2.1. Génétique de la plante

Lorsque les légumineuses se développent, elles sécrètent certaines substances tel que les flavonoïdes qui vont déclencher toute une série de réactions en chaîne pour la formation de nodules fixateurs d'azotes.

Les flavonoïdes sont des produits de type poly-phénolique du métabolisme secondaire de la plante (Cooper, 2007). Ces molécules sont sécrétées par les racines des légumineuses comme molécules signales pour attirer les rhizobia par activation des gènes *nod* contrôlant la synthèse des facteur Nod, émis par la bactérie qui sont à l'origine de la spécificité et la reconnaissance entre symbiotes, ce qui permet la formation des nodules (Zhang et al., 2009 ; shneider et Huyghe, 2015).

III.2.2. Génétique des rhizobia

Plusieurs gènes de nodulation (gènes communs et gènes de spécificité) sont impliqués dans la synthèse d'un signal bactérien. Ils ne sont exprimés qu'en présence de molécules signal émises par la plante (Trifi *et al.*, 1989).

- **Gènes communs**

Il existe une série de gènes de nodulation (*nodABCIIJ*) qui ont une structure très conservée chez la plupart des rhizobia et qui sont qualifiés donc de gènes communs (Dénarié *et al.*, 1996). La mutation d'un seul de ces gènes *nodABC* entraîne la perte de la capacité de déformer les poils absorbants ou à initier la division des cellules corticales de la plante et de ce fait à la nodulation (Claude *et al.*, 1996).

- **Gènes de spécificité**

Les gènes (*nodFE*, *nodG*, *nodH*, *nodL*) sont impliqués dans la spécificité de l'interaction plante / microorganisme. Ces gènes ne peuvent pas être complétés par un gène d'une autre espèce (Claude *et al.*, 1996).

- **Gènes de régulation *nodD***

Le gène *NodD* est très important dans la régulation de la nodulation. Il est exprimé de façon constitutive et joue un rôle important dans la spécificité d'hôte. Il code pour une protéine qui serait le récepteur des flavonoïdes libérés par la plante.

La protéine du gène *nodD* d'une espèce donnée de *Rhizobium* active l'expression des gènes *nod* dès qu'elle est au contact des flavonoïdes sécrétés par la légumineuse-hôte (Claude *et al.*, 1996).

- **Gènes de la fixation de l'azote *nif* et *fix***

Les gènes *nif* sont nécessaires à l'établissement de la symbiose. Ils codent pour la synthèse de l'enzyme fixatrice d'azote, la nitrogénase (Gourret et Strullu, 1980).

Les gènes *fix* sont impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules lors de la fixation symbiotique azotée. Chez la plupart des rhizobia, ces gènes symbiotiques sont situés sur un grand plasmide symbiotique (Selosse, 2001).

III.3. Processus de la nodulation

Ce processus est contrôlé par un ensemble de gènes spécifiques au rhizobia pour infecter une plante donnée. Les différentes étapes de nodulation sont dirigées par les gènes

nod des rhizobia qui sont stimulés par les flavonoïdes émis par la plante pour produire les facteurs Nod. Ces facteurs Nod vont se lier aux récepteurs spécifiques situés sur l'épiderme de la racine (la reconnaissance de la plante hôte) et déclenchent en suite les réactions qui vont conduire à l'infection des racines par les rhizobia (Schneider et Huyghe, 2015).

Les bactéries associées à l'extrémité des poils absorbants induisent leur courbure et leur déformation formant des nodosités.

Dans les nodosités, les bactéries sont intégrées dans le cytoplasme du cortex des racines pour évoluer en bactéroïdes qui seront encerclés par une membrane plasmique pour former des symbiosomes (Schneider et Huyghe, 2015).

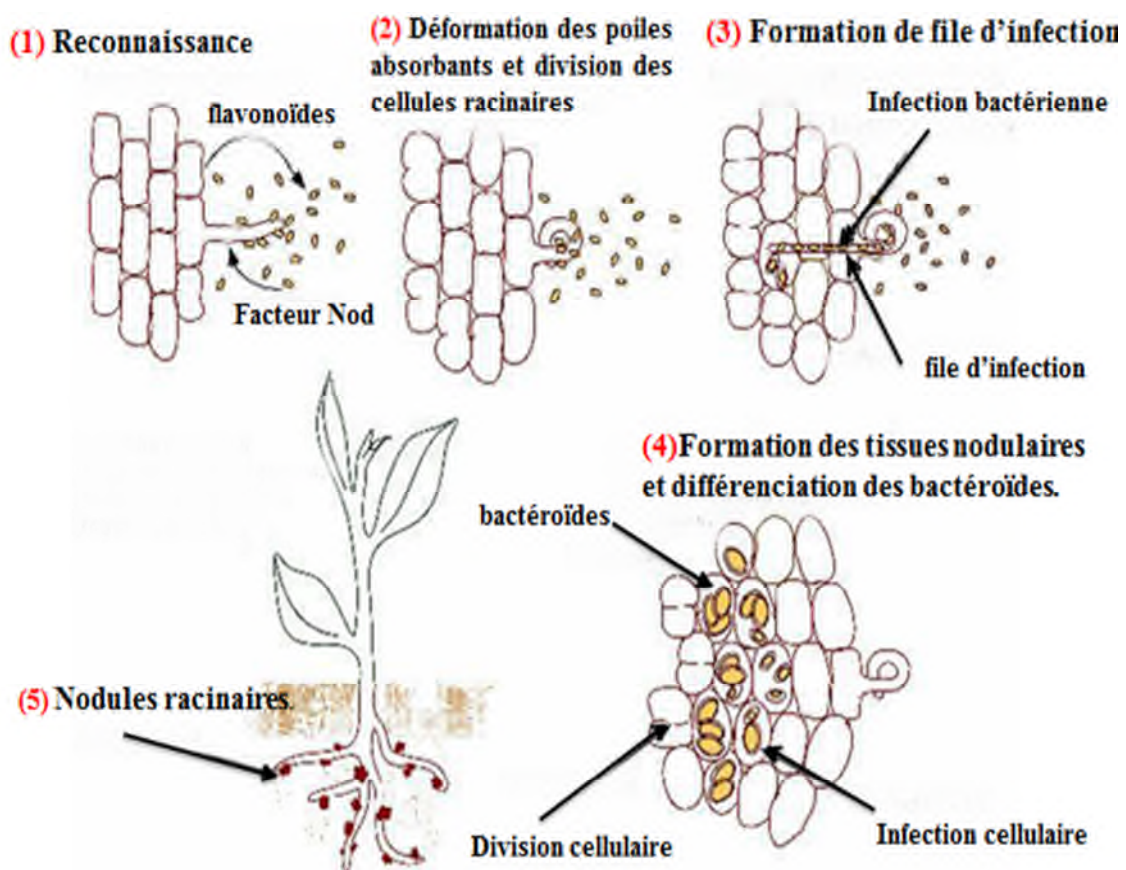


Figure 09 : Différentes étapes permettant la formation des nodules racinaires (Heulin, 2014).

III.4. Paramètres affectant la réussite de la nodulation

La quantité d'azote fixée par une légumineuse peut largement varier sous l'influence de plusieurs facteurs tels que :

- **Stress thermique**

L'augmentation de la température provoque le dysfonctionnement des protéines LPS et l'inhibition de la mobilité des bactéries et leur attachement aux poils absorbants (**Hamdi, 1999**). Les basses températures augmentent le délai entre l'infection et l'apparition des nodosités (**Schneider et Huyghe, 2015**).

- **Stress salins et osmotique**

La salinité des sols conduit à des perturbations enzymatiques, des modifications morphologiques, biochimiques, physiologiques et minérales au niveau de la plante en inhibant la phase initiale de la nodulation (**Hamdi, 1999**).

- **Etat structurel du sol**

L'état structurel dégradé d'un sol réduit l'alimentation hydrique et minérale des cultures avec accumulation de matière sèche et d'azote par la culture ce qui diminue de ce fait le rendement et la teneur en protéines (**Schneider et Huyghe, 2015**).

- **Acidité et alcalinité du sol**

L'acidité du sol réduit la fixation d'azote atmosphérique en limitant la survie ainsi que la persistance des rhizobia et engendre une diminution de la nodulation. L'alcalinité du sol provoque l'affaiblissement de la nodulation (**Hamdi, 1999**).

- **Carence en nutriments**

Le manque de nutriments tels que le calcium, le zinc, le manganèse et le potassium inhibe l'attachement des rhizobia sur les poils absorbant et la formation des nodosités (**Schneider et Huyghe, 2015**).

- **Stress hydrique**

L'augmentation du niveau d'eau dans le sol réduit le nombre et la taille des nodules et inhibe l'infection de la plante par les rhizobia (**Hamdi, 1999**).

- **Maladies et ravageurs**

Les agents pathogènes et les ravageurs s'attachent aux nodosités et provoquent des pourritures du système racinaire ce qui limite leur croissance et indirectement la fixation symbiotique (**Schneider et Huyghe, 2015**).

III.5. Importance de la symbiose rhizobia – sulla

La plante nécessite beaucoup d'éléments tels que l'oxygène, le CO₂, l'eau, l'azote, le phosphore et le potassium pour sa croissance et sa survie. En association légumineuse-rhizobia, ces derniers participent à différents processus qui permettent de garantir les besoins de la plante. En effet, les rhizobia qui se trouvent en association avec sulla jouent un rôle essentiel dans l'assimilation des éléments nutritifs à partir du sol pour leur propre nutrition ainsi que pour la nutrition de leur partenaire symbiotique (**Khelifi, 2008**).

La symbiose rhizobia-légumineuses est responsable de la fixation d'environ 50% d'azote fixé biologiquement par an (**Trinchant et al., 1997**). Elle est considérée comme le système symbiotique le plus évolué car chacun des acteurs de cette association a développé une voie de métabolisation capable de capter une substance inorganique présente dans l'atmosphère et de la transformer en éléments assimilables, subvenant à des besoins complémentaires : la bactérie, par la voie diazotrophe, assure la couverture mutuelle des besoins en matières azotées; et la plante, par la photosynthèse, assure la couverture des besoins énergétiques **Broughton et Perret (1999)**.

Matériel et Méthodes

Afin d'étudier les endosymbiotes d'*Hedysarum coronarium*, il est nécessaire d'effectuer plusieurs caractérisations qu'elles soient phénotypiques ou symbiotiques. Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'université de Bejaia (LEM/UAMB).

I. Collecte des nodules racinaires d'*Hedysarum coronarium*

Le prélèvement des nodules racinaires de la légumineuse *Hedysarum coronarium* a été effectué au niveau du Campus Targua Ouzemour de Bejaia.

L'échantillonnage a été réalisé vers la fin du mois de mars en début de floraison car les nodules sont bien développés et en pleine activités selon la méthode de **Vincent (1970)**. Il s'agit de creuser manuellement environ 15 cm autour de la plante et 20 cm de profondeur pour arracher la plante avec ses racines nodulés qui ont été ensuite placés dans des sacs en plastiques, étiquetés et transportés au laboratoire.

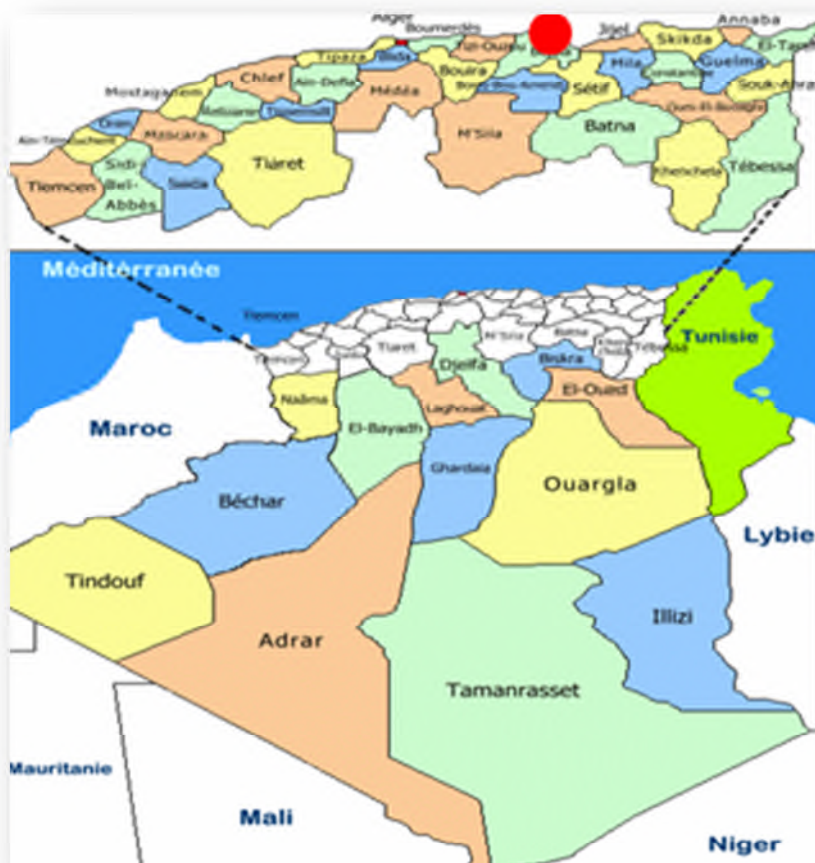


Figure 10 : Site de prélèvement des nodules racinaires d'*H. coronarium* (Campus de Targua Ouzemour).

II. Isolement et purification de bactéries symbiotiques

II.1. Stérilisation des nodules racinaires

Au laboratoire, les racines nodulées ont été lavées délicatement à l'eau du robinet afin d'enlever toute la terre. Les nodosités ont été coupées et introduites dans de l'éthanol à 70° pendant 30 secondes ensuite transférées dans de l'eau de javel à 3% pendant 5 min puis rincées abondamment (10 fois) à l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).



Figure 11 : désinfection des nodules racinaires d'*H. coronarium*.

II.2. Ensemencement et purification des bactéroïdes

Sous une hotte à flux laminaire, les nodules désinfectés ont été placés dans des eppendorfs stériles puis écrasés à l'aide d'une tige métallique préalablement stérilisée. Le broyat nodulaire a été ensuiteensemencé sur des boîtes de Pétri contenant du YMA et incubé à 28°C pendant plusieurs jours (Vincent, 1970). La purification des isolats a été faite par repiquage successifs jusqu'à l'obtention de culture pure.

III. Conservation des isolats

III.1. Conservation à 4°C

Appeler aussi conservation à court terme, des colonies prélevés à partir des isolats pures ont été ensemencées sur des tubes contenant le milieu YMA incliné puis incubés à une température de 28°C jusqu'à avoir une bonne croissance (4 jours) et enfin conservés à 4°C (Vincent, 1970).

III. 2. Conservation à – 80°C

Appeler aussi conservation à long terme, des colonies prélevées à partir de cultures purifiées ont été ensemencées dans des tubes contenant du milieu YMB liquide et incubées à 28°C pendant 4j. Dans des eppendorfs stériles, 800 µl de la culture liquide ont été prélevés et additionnés de 200 µl de glycérol stérile puis homogénéisés. Les eppendorfs étiquetés du nom de la souche ont été stockés à – 80 °C.

IV. Authentification des isolats bactériens

La capacité d'induire la formation de nodosités sur les racines de la légumineuse hôte est un critère de base pour l'authentification des rhizobia.

IV.1. Germination aseptique des graines

Les graines d'*Hedysarum coronarium* de la tribu des *Hedysareae* ont été stérilisées à l'alcool concentré à 70° pendant 30 seconde, puis transférées dans de l'eau de javel à 3% pendant 3 min, ensuite rincer abondamment (10 fois) avec de l'eau distillée stérile. Après rinçage, les graines ont été placés dans des boîtes de Pétri en verre stérile contenant du papier absorbant imbibé avec de l'eau distillée stérile. Les boîtes ont été placées à l'obscurité et à 20°C pendant plusieurs jours (Vincent, 1970).



Figure 12 : Germination des graines d'*Hedysarum coronarium*.

IV.2. Préparation des cultures bactériennes

Sous une haute à flux laminaire, la préparation d'une pré-culture s'est faite par le prélèvement d'une colonie et ensemencement dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu YMB liquide. Ces derniers ont été incubés pendant 4j à 28°C.

IV.3. Inoculation des plantules d'*Hedysarum coronarium*

Après germination, les graines ont été transférées dans des tubes contenant le milieu Jensen stérile, puis inoculées avec 1 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance. Un contrôle négatif non inoculé a également été réalisé. Enfin, les tubes ont été placés dans une chambre de culture à température ambiante et sous luminosité contrôlée pendant huit semaines.

V. Caractérisation phénotypique des isolats

Cette caractérisation a été faite sur les différentes souches d'*Hedysarum coronarium* isolées et à titre comparatif une souche de référence *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T a été prise en considération.

V.1. Tests culturaux et cellulaires

V1.1. Caractérisation morphologique

Les caractères morphologiques des souches ont été mis en évidence à partir de colonies développées sur le milieu YMA après 4j d'incubation à 28°C. Les colonies obtenues ont été décrites selon la forme, la taille, la couleur, l'aspect, l'opacité, la présence ou l'absence des exopolysaccharides extracellulaires (EPS) et la durée d'apparition des colonies.

V.1.2. Caractérisation cellulaire

➤ Coloration de Gram

Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées. Elle a été effectuée à partir de culture de 4j sur milieu YMA. Elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et de se fait de les distingues entre Gram positif et Gram négatif. Elle a été réalisée selon le protocole en Annexe II.

➤ Etat frais

Cette technique a été effectuée après une culture de 4j sur le milieu YMB. Elle permet de déterminer la mobilité de la bactérie. Elle est réalisée entre lame et lamelle en déposant une goutte de suspension bactérienne et visualisation sous microscope optique à l'objectif (X40).

V.1.3. Détermination du temps de génération

Le temps de génération est le temps nécessaire au doublement de la population bactérienne. La croissance bactérienne a été étudiée dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu liquide YMB stérile inoculés de 0,1 ml d'une pré-culture bactérienne et incubés à 28°C

pendant plusieurs jours. L'estimation de la croissance a été réalisée par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à t_0 après inoculation puis chaque 24h. Les courbes de croissance ont été tracées et le temps de génération « μ » a été déterminé pendant la phase exponentielle de croissance de chaque souche à l'aide de la formule suivante :

$$G = t \log 2 / (\log N_2 - \log N_1)$$

N: nombre de division.

t : temps.

V.2. Tests physiologiques

V.2.1. Effet de la température sur la croissance

Dans des tubes contenant 5 ml de milieu YMB stérile, 100 μ l d'une pré-culture bactérienne contenant 10^7 cellules/ml ont été inoculés et incubés à différentes températures : 20°C, 24°C, 28°C, 32 et 37°C pendant 4j dans le but de déterminer l'intervalle de croissance de ces souches ainsi que leurs optimum de croissance. Pour chaque souche trois répétitions ont été effectuées. Après incubation, la mesure des densités optiques (DO) de chaque culture a été faite à une longueur d'onde de 600 nm (**Nour et al., 1994**).

V.2.2. Effet du pH sur la croissance

La croissance bactérienne a été étudiée dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu YMB liquide stérile à différents pH 4, 6, 7, 8 et 10 inoculés de 0,1 ml d'une pré-culture bactérienne contenant 10^7 cellules/ml et incubés à 28°C pendant 4 jours. L'estimation de la croissance a été mesurée par la DO à 600 nm.

V.2.3. Effet du NaCl sur la croissance

La tolérance des souches à la salinité a été étudiée dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu YMB à différentes concentrations en NaCl : 0.5%, 1%, 2% et 3%. Les tubes ont été inoculés avec 0,1 ml d'une pré-culture bactérienne de 10^7 cellules/ml et incubés à 28°C pendant 4 jours. Cette tolérance a été par la suite estimée en mesurant la densité optique à 600 nm.

V.3. Tests biochimiques

V.3.1. Identification par galerie APi₂₀ NE

La galerie APi₂₀ NE est un système standardisé pour identifier les bacilles à Gram négatif non entérobactéries. Elle contient 08 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation.

L'ensemencement de cette galerie a été réalisé par introduction des cultures bactériennes dans les tubes qui constituent la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air. Les tubes et les cupules des tests GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT et PAC ont été remplis alors que les tubes des tests soulignés : ADH, GLU, URE ont été recouverts d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe. Enfin, les boîtes ont été refermées puis incubées à 28°C pendant 4 jours.

V.3.2. Réduction des nitrates

Les bactéries ont été mises en culture sur bouillon nitraté pendant 4 jours à 28°C. Après incubation, on a ajouté dans chaque tube le réactif nitrate réductase 1 et le réactif nitrate réductase 2. L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates ont été réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition de la poudre de zinc pour vérifier la présence ou l'absence des nitrates dans le milieu, après quelques minutes, l'apparition d'une tinte rouge signifie la présence des ions nitrate dans le milieu donc le résultat est négatif. Si l'on observe l'absence de coloration du milieu donc il n'y a pas d'ions nitrate dans le milieu ce qui indique un résultat positif.

V.3.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)

Ce test permet d'évaluer la capacité des souches à alcaliniser ou acidifier le milieu. Le bleu de bromothymol a été additionné au milieu YMA à une concentration de 0.0025% (W/V). Les boîtes ont été ensemencées par spot de 10 µl puis mises en incubation à 28°C pendant 4 jours. Les réactions ont été identifiées par le changement de la couleur du milieu. L'apparition de couleur jaune indique une réaction acide et la couleur bleu foncé indique une réaction basique.

V.4. Test nutritionnel

➤ Utilisation de la source de carbone

Les isolats ont été mis en culture dans des tubes contenant 5 ml de milieu YMB où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : galactose, rhamnose, sorbitol ou sucrose et l'extrait de levure a été remplacé par du NH₄Cl puis incubés à 28°C pendant 4j. (Somasegaram et Hoben, 1985). L'utilisation de la source de carbone par la souche se traduit par un trouble bien apparent par rapport au témoin négatif et les DO ont été mesurés à 600 nm.

V.5. Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques

La résistance ou la sensibilité aux ATB des souches isolées d'*Hedysarum coronarium* à été évaluée selon la méthode de l'antibiogramme standard sur milieu YMA qui a été réalisé comme suit : Ensemencer les boites YMA par écouvillonnage à partir des prés-cultures et déposer les disques d'antibiotiques (Gentamycine, Oxacilline, Tétracycline et Erythromycine) sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. Les boites ont été incubées à 28°C pendant 4j.

VI. Caractérisation symbiotique des isolats bactériens

VI.1. Test de nodulation croisé

Ce test permet de vérifier si une bactérie isolée d'une espèce de légumineuse donnée peut induire la formation des nodosités chez d'autres espèces de légumineuses.

Les graines de *Pisum sativum* de la tribu *Fabeae*, *Lens culinaris* de la tribu des *Fabeae* ou *Vicieae* et *Vigna unguiculata* de la tribu *Phaseoleae* ont été désinfectés à l'alcool concentré à 70° pendant 30 secondes, puis transférées dans de l'eau de javel à 3% pendant 3 min, ensuite rincer 10 fois avec de l'eau distillée stérile.

Après rinçage les graines ont été placées dans des boites de Pétri en verre stériles contenant du papier absorbant imbibé avec de l'eau distillée stérile. Les boites ont été placées à l'obscurité et à 20°C pendant plusieurs jours.

Après germination, les graines de *Vigna unguiculata* ont été plantées dans des flacons de 250 ml contenant le milieu Jensen stérile, les graines de *Pisum sativum* et de *Lens culinaris* ont été plantées dans des tubes contenant le milieu Jensen semi-solide stérile. Par la suite, les plantules ont été inoculées avec 1 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance.

Un control négatif non inoculé a également été réalisé pour chaque légumineuse. Enfin, les tubes ont été placés dans une chambre de culture à température ambiante et sous luminosité contrôlée pendant huit semaines.

Résultats et Discussions

I. Echantillonnage

Au cours de ce travail, nous avons étudiés les isolats bactériens formant des endosymbioses avec *H. coronarium* (Figure 14) localisée à Bejaia (Targua Ouzemour).

Nous avons procédé à la collecte de 03 plantes au niveau de ce site. Un échantillon de sol a également été prélevé pour une analyse du pH.

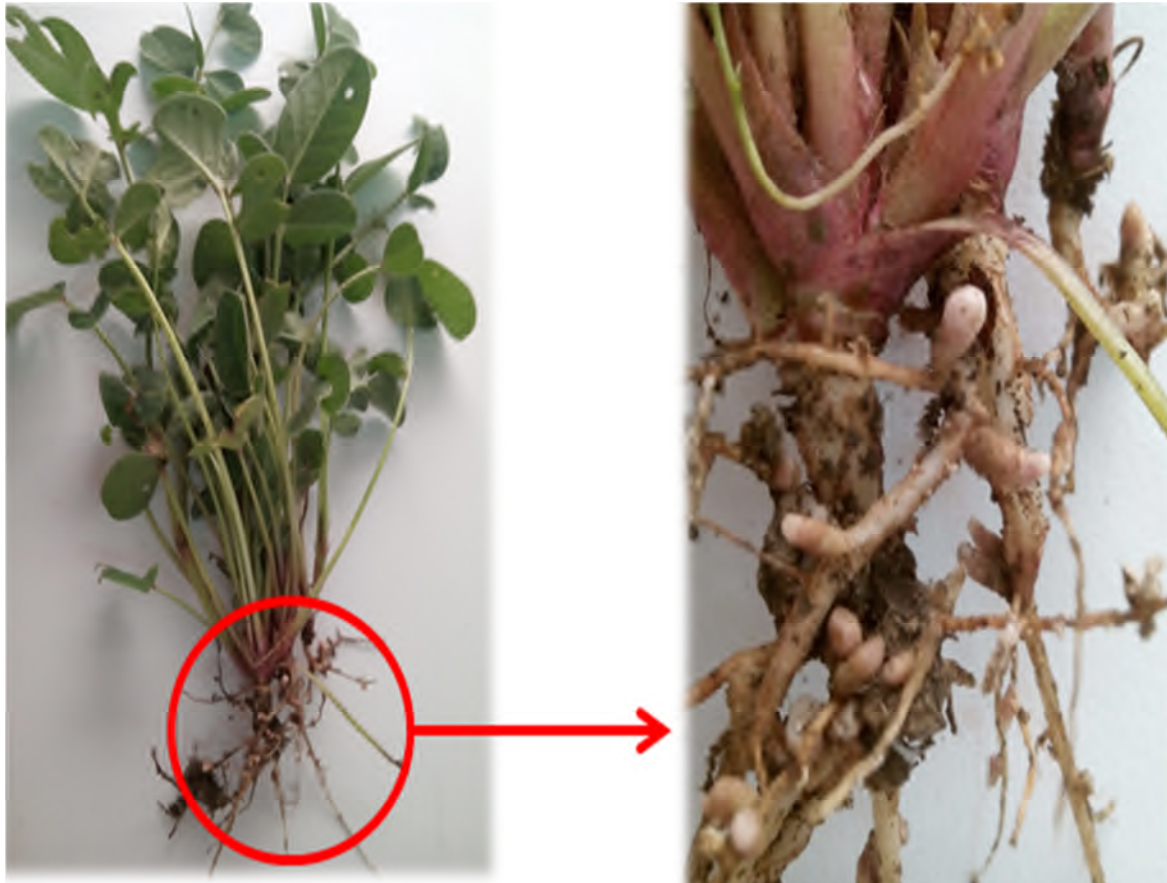


Figure 13 : *Hedysarum coronarium* et ces nodules racinaires.

Les nodules obtenus étant de couleur rose due à la présence de la légghémoglobine, protéine transporteur d'oxygène qui facilite la diffusion de l'oxygène aux bactéroïdes car la nitrogénase bactérienne est très sensible à une concentration élevée d'oxygène.

Leur aspect était allongé, de 2 à 5 mm de diamètre, relativement aux contours régulières, unilobés, bilobés ou plurilobés et de surface lisse comme le montre la figure 15 qui suit. Le nombre de nodule par pied était assez variable allant de 4 à 9.

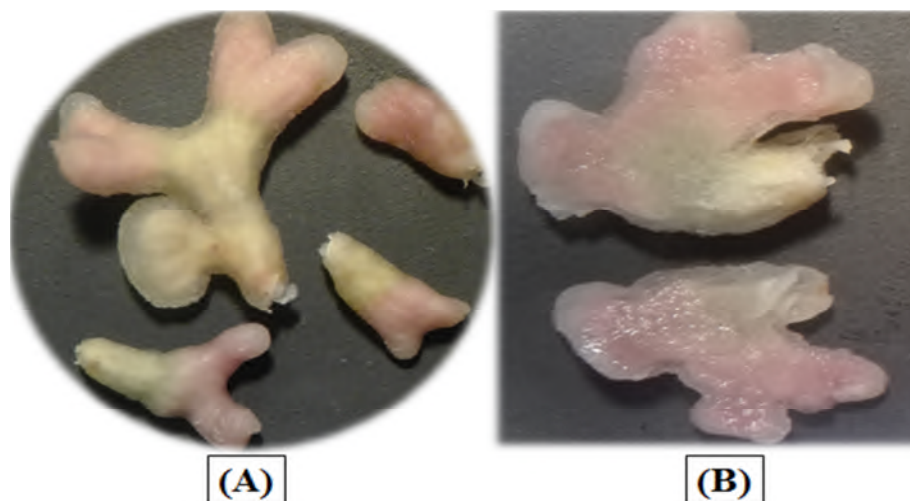


Figure 14 : Différents aspects nodulaires d'*H. coronarium*. (A) Observation sous la loupe (X0.8), (B) Coupure transversal d'un nodule.

I.1. Collection bactérienne nodulant *Hedysarum coronarium*

A partir des 3 plants d'*H. coronarium* qui contenaient entre 6 et 10 nodules par pied. Un totale de 25 nodules ont été obtenues. L'isolement bactérien à partir de ces nodules nous permis d'obtenir un totale de 20 souches présumé appartenir aux rhizobia. La nomenclature choisis pour ces souches correspond à « Hcn° » relatif à *Hedysarum coronarium* et n° c'est le numéro de la souche.

I.2. Test de nodulation simple

Après plus de 2 mois d'inoculation d'*Hedysarum coronarium*, on a observé que les plantules ne se sont pas développées correctement et qu'elles n'ont pas encore noduler. Ceci est dû aux conditions environnementales défavorables à la nodulation tel que la température trop élevée qui est connus dans la littérature pour être un facteur qui réduit la mobilité des rhizobia et de ce fait limite l'attachement de ces derniers sur les poils absorbants racinaires des légumineuses et donc limite l'infection et la nodulation (Hamdi, 1999).

II. Caractérisation phénotypique des isolats de sulla

Les isolats de *H. coronarium* ont subies une caractérisation phénotypique dans le but de déterminer leur diversité, cette caractérisation a été faite en les comparants avec la souche de référence *R. leguminosarum viciae* 3841^T.

II.1. Caractérisation culturelle et cellulaire

➤ Caractères culturels

Les cultures des souches sur YMA, ont permis d'obtenir des colonies circulaires aux contours réguliers, d'un diamètre variant de 0.5 à 3 mm, bombés, de couleur blanche à crème, opaques et muqueuses du fait de leur production d'EPS (Figure 16).

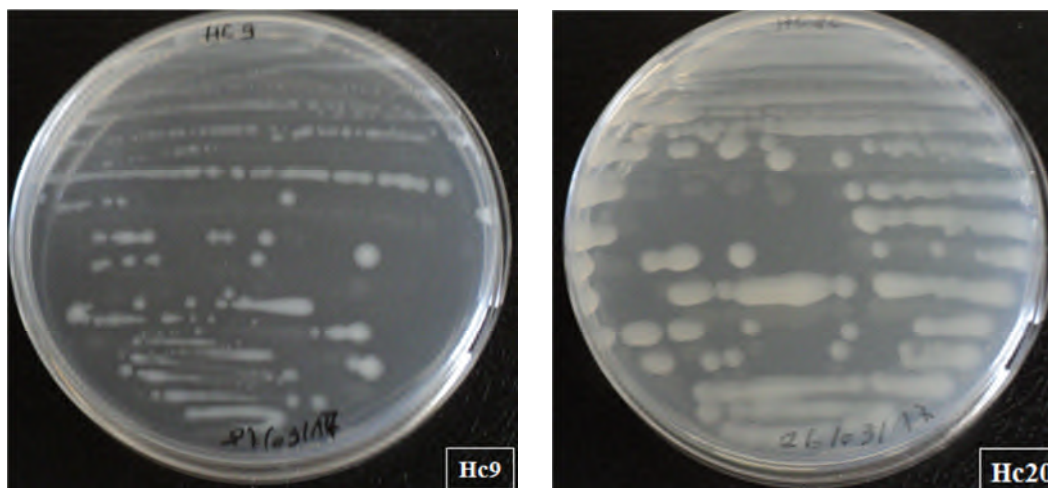


Figure 15 : Aspect des colonies sur milieu YMA après 4 jours d'incubation à 28°C.

➤ Caractères cellulaires

Une coloration de Gram a été réalisée et l'observation microscopique a montré que l'ensemble de nos isolats sont pour certaines des coccobacilles et pour d'autres de petits bacilles, aux extrémités arrondies bien isolées et à Gram négatif comme l'indique la figure 17.

Toutes les espèces de rhizobia montrent une couleur rose et sont donc Gram négatif (Beck, 1993).

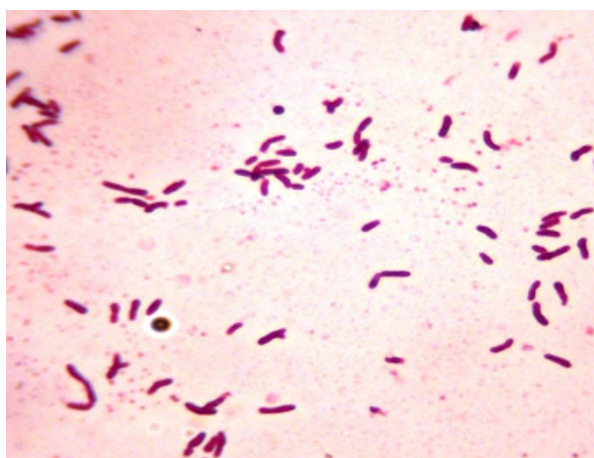


Figure 16 : Observation sous microscope optique (X 100) des isolats.

A l'état frais, l'observation microscopique a montré que l'ensemble de nos isolats sont mobiles aux bouts arrondis. Cette description concorde avec celle donnée dans la littérature concernant les rhizobia (**Jordan, 1982, 1984**).

➤ Détermination du temps de génération

La mesure de la croissance des isolats d'*H. coronarium* cultivés sur milieu YMB ajusté à pH 6.8 et incubé à 28°C a été effectuée chaque 24h pendant 7 jours.

Les temps de génération obtenues sont variables d'une souche à une autre et sont proche de celui de *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T. Il était compris entre 1h03min et 3h80min.

Ces résultats sont en accord avec les études réalisés par **Jordan** en **1982**, qui a rapporté que le temps de génération des souches de genre *Rhizobium* sur milieu YMB est inférieur à 6 heures.

II.2. Caractérisation physiologique

Dans cette partie nous avons étudiés l'effet de certains facteurs abiotiques tels que la température, le pH et la salinité sur la croissance des rhizobia isolés de *Hedysarum coronarium*.

II.2.1. Effet de la température sur la croissance

La mesure de la DO des isolats montre que toutes les souches testées y compris la souche de référence *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T présentent une bonne croissance entre 20 et 32°C avec un optimum à 28°C et au-delà de cette température on remarque une faible croissance (à 37°C). 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.

Ces résultats sont en accord avec les études réalisés par **Graham** en **1992** qui a rapporté que la température optimale de croissance est située entre 28°C et 31 °C.

Les rhizobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer de 10 à 37°C et qui ont une température optimale de croissance à 28°C (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

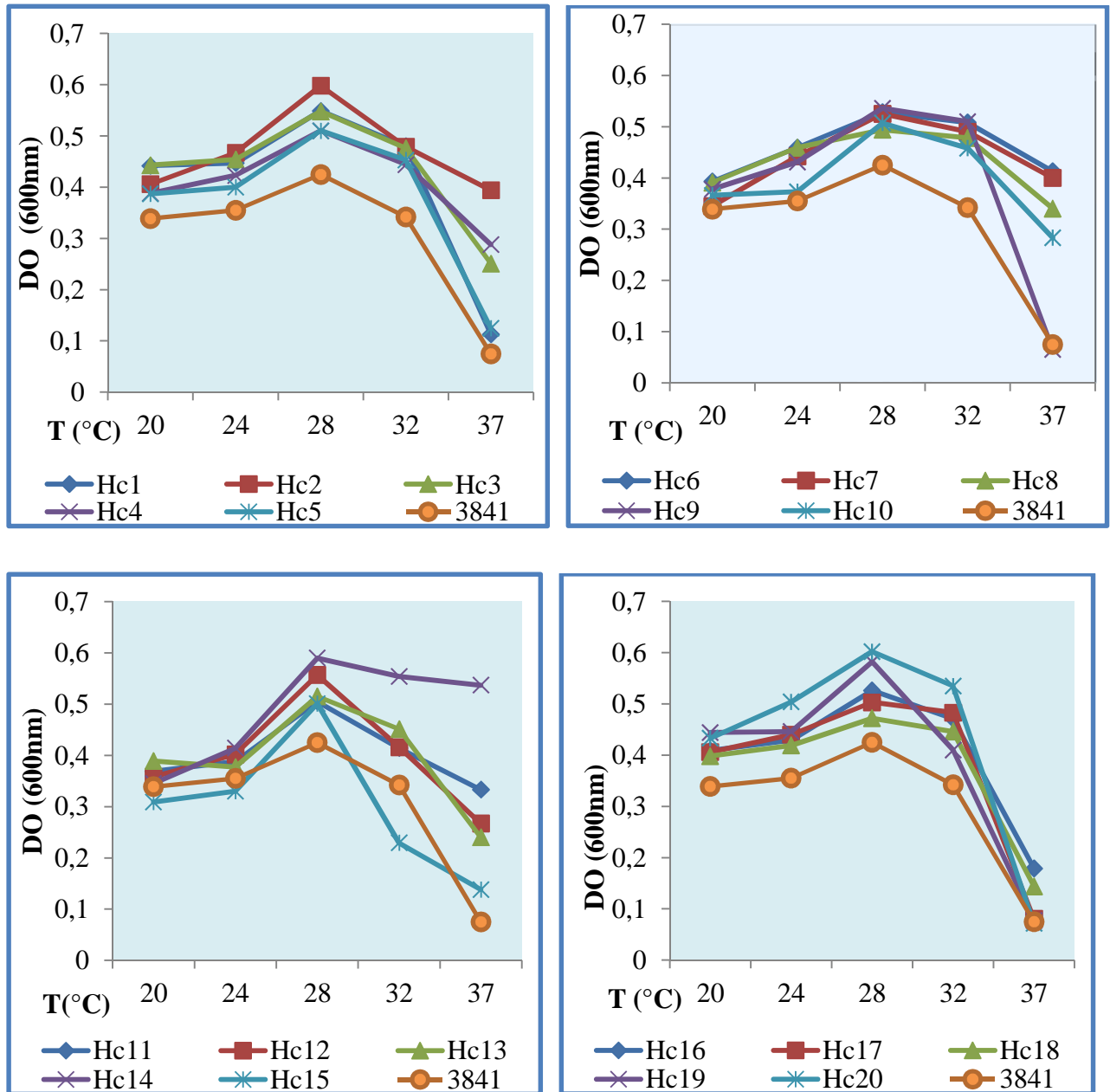


Figure 17 : Effet de la température sur la croissance des isolats d'*Hedysarum coronarium*.

II.2.2. Effet du pH sur la croissance

La mesure de la DO des isolats permet d'avoir les résultats indiqués dans la figure 19.

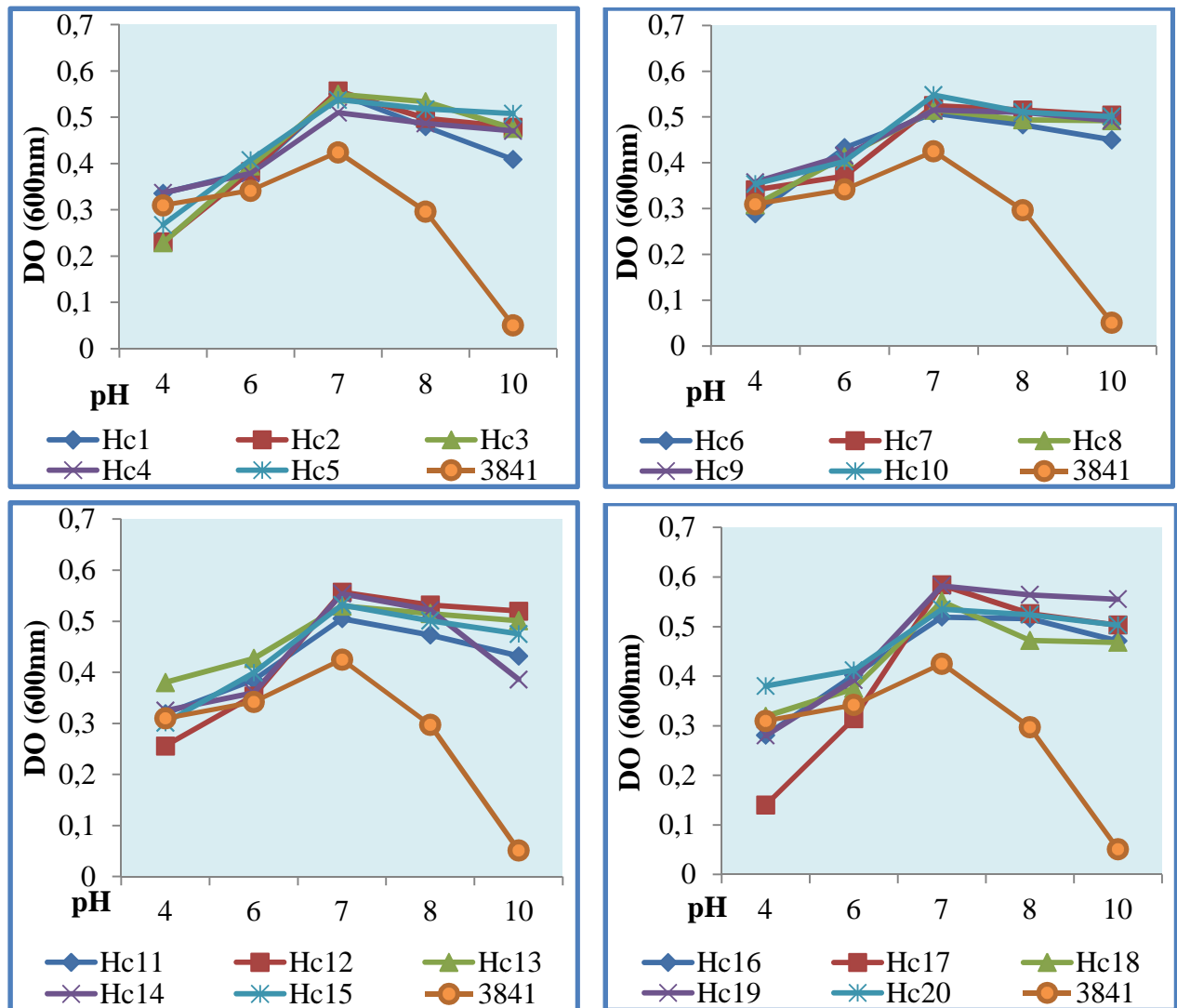


Figure 18 : Tolérance des isolats d'*H. coronarium* aux différents pH après 4jours d'incubation à 28°C.

Ces résultats montrent que ces isolats sont capables de croître dans un intervalle de pH allant de 4 à 10 avec un optimum de croissance entre 6 et 8 (Figure 19). Les pH alcalins sont plus tolérés par nos souches que les pH acides.

Nos résultats confirment ceux trouvés par **Graham et al. (1999)** qui ont constaté que les bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, tolèrent parfaitement les pH allant de 4.5 à 9. En outre **Yadav et Vyas (1971)** ont montrés que certaines souches de rhizobia ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10.

II.2.3. Effet du NaCl sur la croissance

La mesure de la DO des isolats montre les résultats illustrés dans la figure 20. Cette dernière indique clairement que les isolats d'*Hedysarum coronarium* ont toléré une concentration en NaCl allant de 0.5% (85 mM), à 1% (170 mM). Au-delà, les souches Hc6, Hc8, Hc11, Hc12, Hc15, Hc16, Hc17 et Hc18 tolèrent jusqu'à 2% (340 mM) et seulement quatre d'entre elles poussent jusqu'à 3 % (510 mM) de NaCl, il s'agit des souches Hc11, Hc15, Hc17 et Hc18.

Cependant, Les résultats de obtenus par **Squartini et al., (2002)** ont montré que les rhizobia isolés d'*Hedysarum coronarium* de la région de Constantine ont un optimum de croissance de 0.5 à 1% de NaCl.

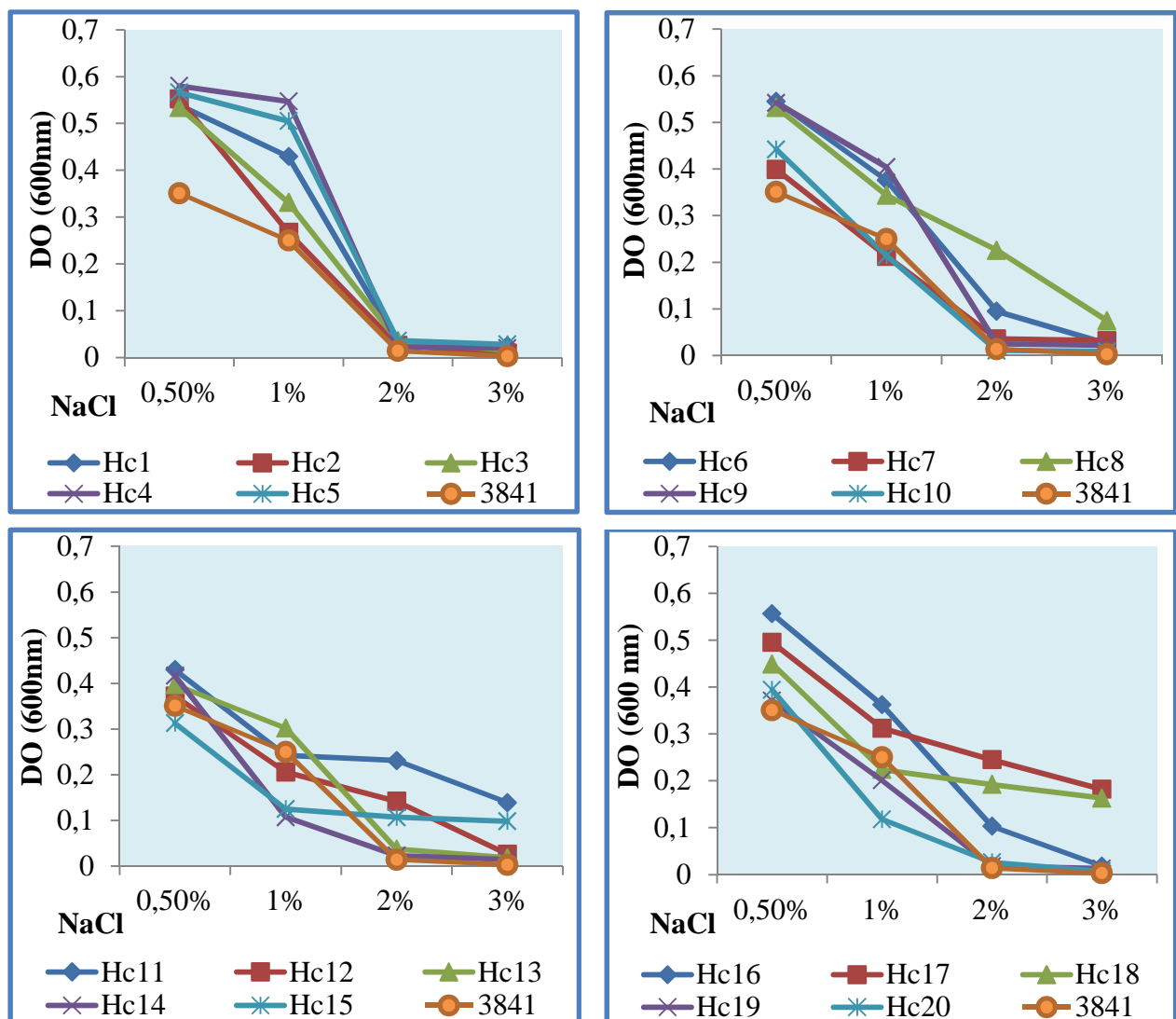


Figure 19 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats nodulant *Hedysarum coronarium*.

Les résultats obtenus par **Kassem et al. en 1985** confirment que la limite de tolérance à la salinité entre les rhizobia peut varier considérablement et même entre les souches de la même espèce.

II.4. Caractérisation biochimique

II.4.1. identification par la galerie APi 20 NE

Les résultats obtenus des galeries APi 20 NE sont présentés dans le tableau I qui va suivre. Ce test a été réalisé dans le but de pouvoir déterminer la source carbonée assimilée, ainsi que les autres caractéristiques des différentes souches étudiées, c'est une base de l'identification biochimique.



Figure 20 : Résultats d'identification par la galerie APi 20 NE.

Les résultats montrent une réponse assez variable des souches. En effet, ils indiquent que toutes les souches testées utilisent le nitrate de potassium (en nitrites et azote) à l'exception de la souche Hc10.

En ce qui concerne le test de TRP (Tryptophane), toutes les souches ne produisent pas d'indole à l'exception de la souche Hc10.

Tous les isolats présentent une réaction positive concernant la PNPG (β -galactosidase). En ce qui concerne la gélatinase (GEL), l'uréase (URE), l'ESC (β -glucosidase) et l'arginine dihydrolase (ADH), nous avons noté des réactions variables d'une souche à une autre.

Les observations montrent également que la plupart des souches testées donnent une absence de développement pour le glucose (GLU), l'arabinose (ARA), le mannose (MNE), le mannitol (MAN), le N-acétyl-glucosamine (NAG) et le maltose (MAL) à l'exception de quelques isolats.

La consommation des substrats été absente pour le potassium gluconate (GNT), l'acide caprique (CAP), l'acide adipique (ADI). Pour l'acide malique (MLT). Concernant le citrate trisodique (CIT), l'acide malique (MLT), citrate trisodique (CIT) et l'acide phénylacétique (PAC) à l'exception de quelques souches.

Ceci traduit la présence d'une diversité des isolats nodulant *H. coronarium*.

Tableau I : Résultats de la galerie APi 20 NE.

Tests																				
Souches	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
Hc1	++	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc3	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc4	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc5	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc6	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc7	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc8	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc9	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc10	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc11	++	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc12	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc13	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc14	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc15	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc16	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Hc17	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Hc18	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hc19	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Hc20	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3841 ^T	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

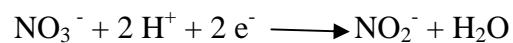
+ : Positif
 - : Négatif
 ND : Non déterminé

II.4.2. Test de réduction des nitrates

Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs nitrate I et II à la culture bactérienne, on observe un virage de la couleur du milieu vers le rouge à l'exception des souches Hc10 et Hc11.

Après l'ajout de poudre de zinc, on a observé l'apparition d'une tinte rouge qui signifie la présence des ions nitrate dans le milieu contenue Hc10 et absence de coloration rouge dans le milieu contenant Hc11 ce qui signifie l'absence des ions nitrate dans le milieu (Figure 22).

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites qui donnent une réaction colorée rouge en présence d'acide sulfanilique « nitrate I » et l'alpha naphthylamine « nitrate II » en solution dans de l'acide acétique concentré.



Après l'ajout de poudre de zinc, on a observé l'apparition d'une tinte rouge qui signifie la présence des ions nitrates dans le milieu contenant Hc10 donc le résultat est négatif et absence de coloration rouge dans le milieu contenant la souche Hc11, ce qui signifie l'absence des ions nitrate dans le milieu donc le résultat est positif.

De nombreuses études réalisés, montrent que les nitrates inhibent l'activité de la nitrogénase dans les nodules des légumineuses (**Lucinski et al., 2002**).

Les résultats de la réduction de nitrate sont identiques à ceux de la galerie APi 20 NE.

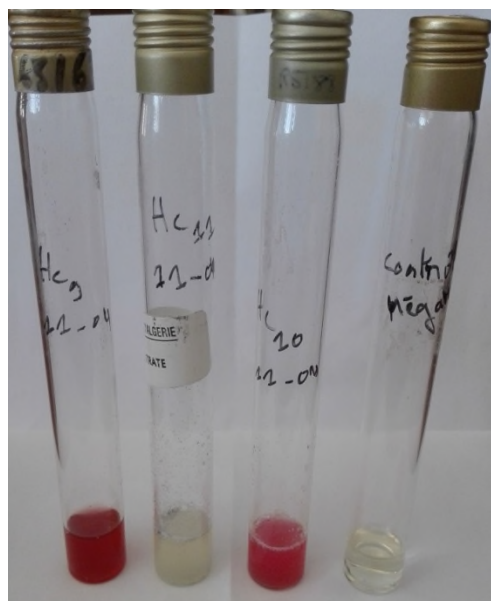


Figure 21 : Résultats de certaines souches pour la réduction des nitrates.

II.4.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)

Après 4j d'incubation des isolats sur milieu YMA+BTB, le résultat observé est l'apparition des colonies avec virage du milieu vers la couleur jaune comme on peut l'observer sur la figure 23. Cette couleur est justifiée par la production d'acide et donc virage de l'indicateur coloré qui est le bleu de bromothymol.

Les résultats obtenus concordent parfaitement avec ceux de **Squartini et al., (2007)** qui ont constatés que les isolats d'*Hedysarum coronarium* provoquent une réaction acide sur YMA-BTB et avec ceux de **Jordan, (1984)** qui ont notés que les bactéries qui changent la coloration du BTB vers le jaune sont considérées comme des bactéries acidifiantes à croissance rapide. Par conséquent, les bactéries qui alcalinisent le milieu sont considérées comme des bactéries alcalifiantes à croissance lente.

D'après **Jordan (1982)**, les souches à croissance rapide comprennent entre autre le genre *Rhizobium*.

Donc, ces résultats viennent appuyer ceux du temps de génération et confirme que nos isolats appartiennent bien au groupe de souches à croissance rapide.

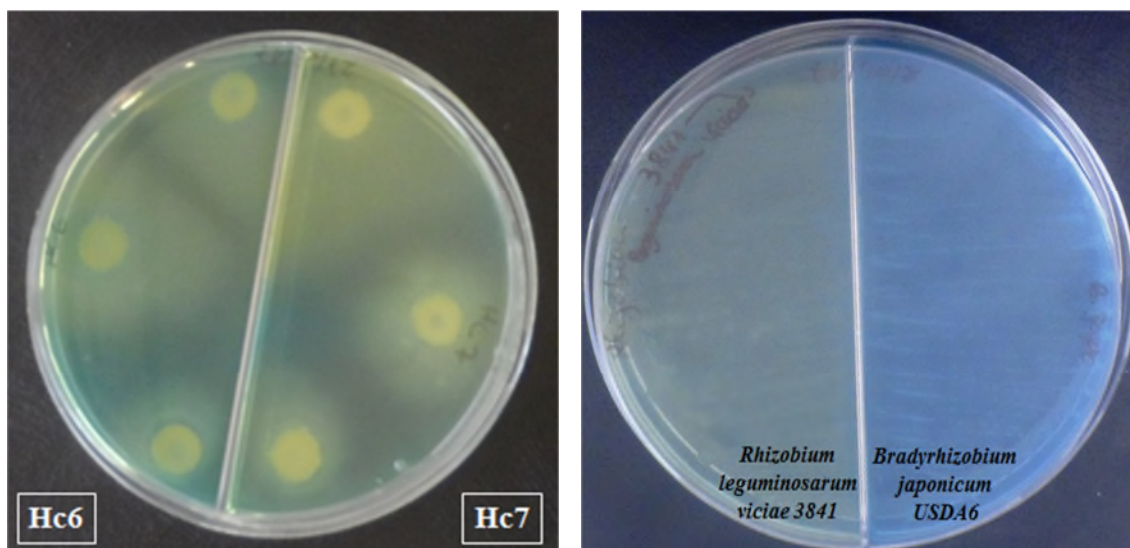


Figure 22 : Test du bleu de bromothymol sur YMA.

II.4.4. Test nutritionnel

➤ Utilisation de la source de carbone

Après 4 jours d'incubation à 28°C, la mesure de la densité optique (DO) a été réalisée à une longueur d'onde égale à 600 nm.

Les valeurs de la DO obtenues (Annexe III) indiquent que les souches d'*H. coronarium* ainsi que celle de référence peuvent utiliser une large gamme des hydrates de carbone pour leur croissance. Elles ont assimilé préférentiellement le galactose et le sucrose et présentent une assimilation moindre pour le rhamnose et le sorbitol (Figure 24).

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par **Graham, (1964)** et **Zhang et al. (1991)** où ils ont démontrés l'existence d'une variabilité de l'utilisation des substrats carbonés chez les rhizobia.

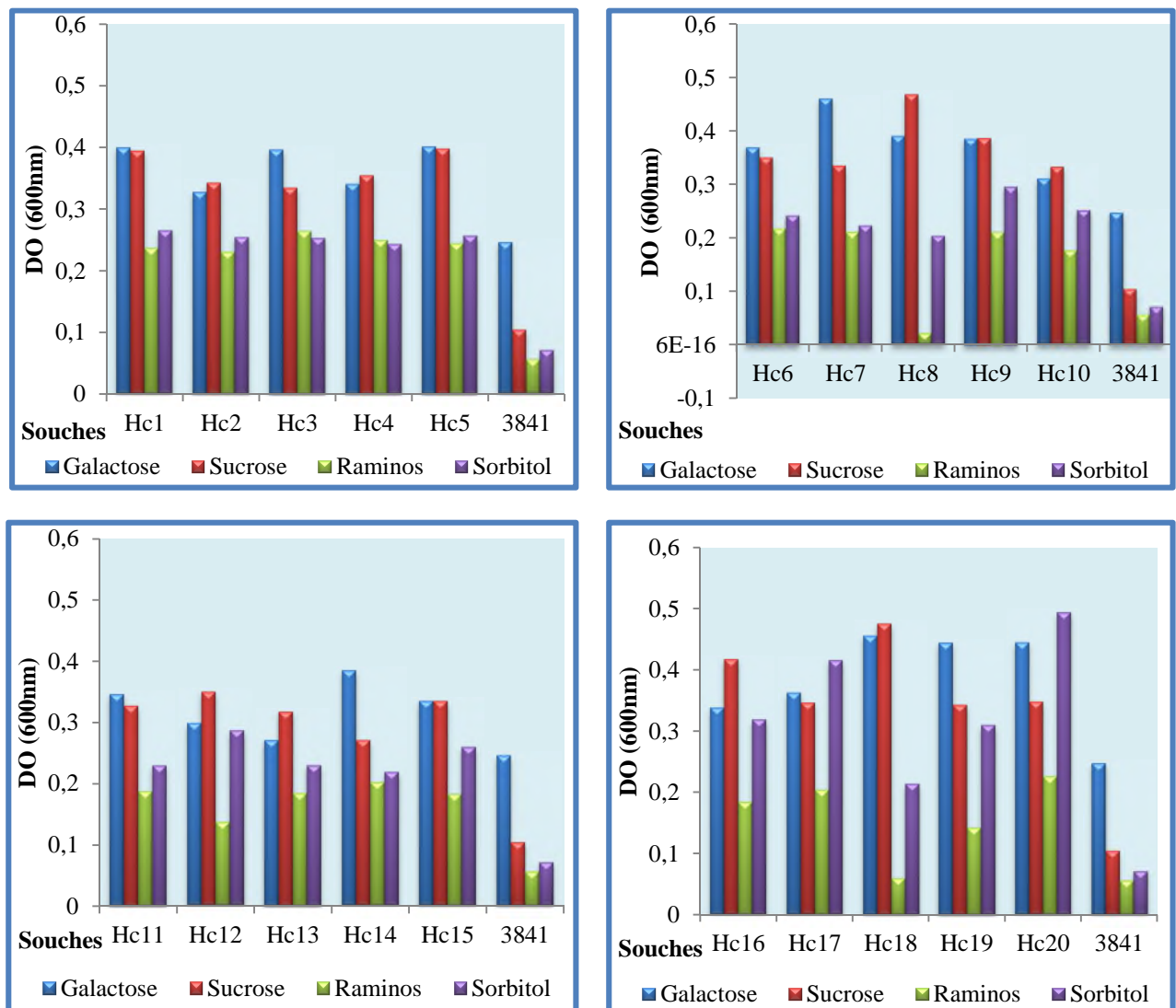


Figure 23 : Croissance des souches en présence des différents sucres testés.

II.5. Résistance et sensibilité aux antibiotiques

Les isolats de *H. coronarium* ont subis une caractérisation de leur résistance ou sensibilité à certains antibiotiques. Les résultats obtenus montrent une forte résistance à

l'oxacilline d'une concentration de 1 µg/disque et une plus faible tolérance à la gentamycine (10 µg/disque), à l'érythromycine (15 µg/disque) et à la tétracycline (30 µg/disque).

Les études réalisées par **Aarons et Graham** en **1991** ont montré que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.

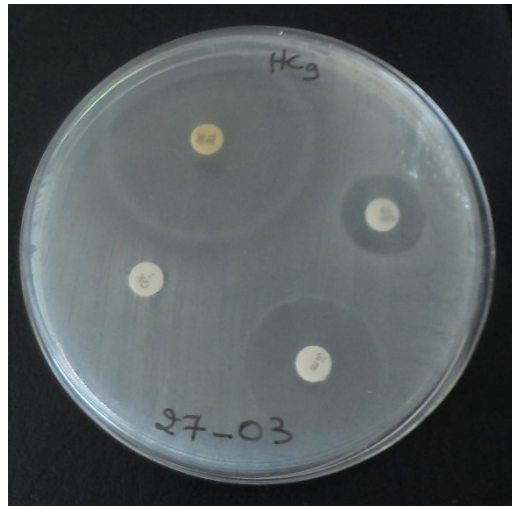


Figure 24 : Résultats de l'antibiogramme pour Hc9.

III. Analyse de la diversité symbiotique des isolats bactériens

III.1. Spectre d'hôte des isolats (test croisé)

Nous avons inoculés des plantules de différentes espèces de légumineuses appartenant à diverses tribus à savoir *L. culinaris*, *P. sativum* et *V. unguiculata* avec les isolats bactériens de la légumineuse *Hedysarum coronarium* appartenant à la tribu des *Hedysareae* afin de pouvoir déterminer leur spectre d'hôte.

Les résultats des tests d'inoculation croisés indiquent que les isolats de *Hedysarum coronarium* sont incapables de noduler les autres légumineuses testées comme *Lens culinaris*, *Pisum sativum* et *Vigna unguiculata* comme on peut l'observer sur la figure 26. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'il y'ai une spécificité d'hôte très importante.

Les études réalisées par **Glatzle et al. (1986)** ont montrés que l'inoculation de *Rhizobium sulla* sur d'autres légumineuses (*Trifolium repens*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Glycine max*, *Cicer arietinum*, etc.) n'a donné aucune nodulation. **Squartini et al., (2002)** ont

également remarqué un grand niveau de spécificité d'hôte des *Rhizobium* isolés à partir du sulla.

Jusqu'à présent, aucune souche isolée des nodules d'*H. coronarium* n'a été capable de noduler une autre espèce qu'elle soit du même genre ou d'autres espèces de genres différents car le couple, *R. sulae* - *H. coronarium* présente un haut degré de spécificité (Benhizia et al., 2004).

Cabrera et Ruiz-Argüeso (1979) ont également rapporté l'absence de nodulation croisée entre le sulla et les différentes autres légumineuses testées.

D'après toutes ces études, nos résultats vont dans le même sens et peuvent être expliqués par la spécificité d'hôte entre les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote et leurs plantes hôtes reposant sur un dialogue moléculaire où sont impliquées des flavonoïdes libérés par la plante et les produits des gènes de nodulation de la bactérie.

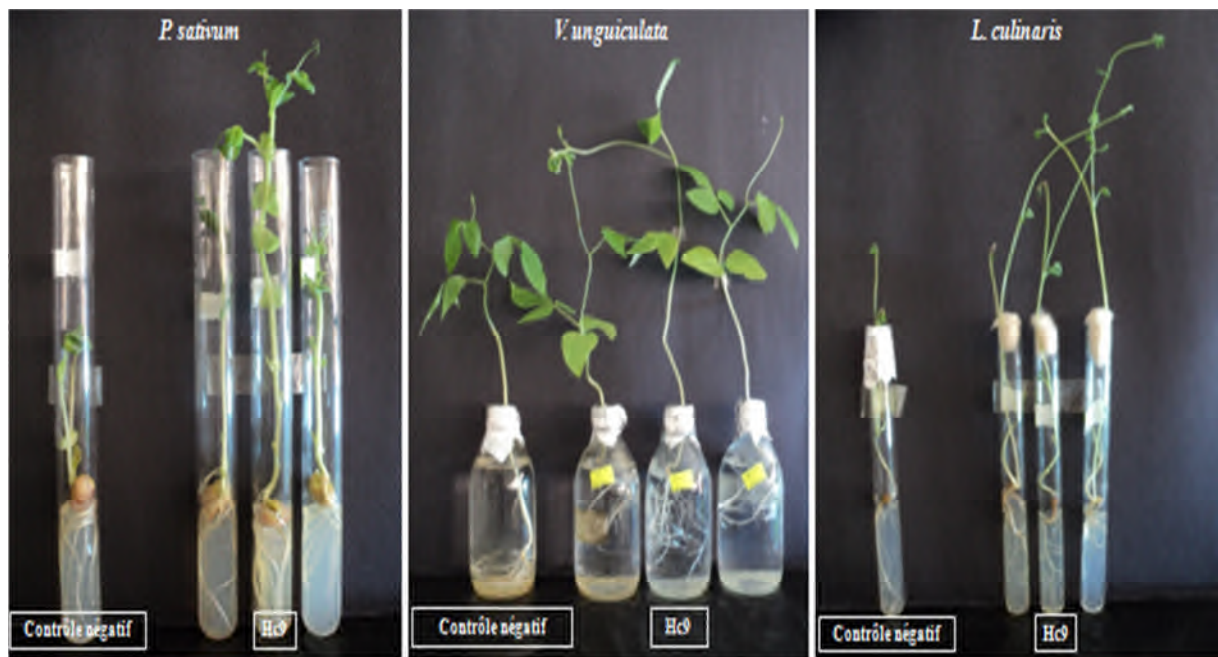


Figure 25 : Résultats du test de nodulation croisée pour la souche Hc9 avec les différentes légumineuses testées.

Conclusion et Perspectives

Cette étude réalisée au niveau du Laboratoire d'Ecologie Microbienne sur la symbiose des isolats d'*Hedysarum coronarium* nous a permis de les caractériser phénotypiquement et symbiotiquement. En effet, les caractères cellulaires et culturales de ces souches indiquent qu'il s'agit de bacilles à Gram négatif, à extrémités arrondies, mobiles, formant des colonies circulaires de 0.5 à 3 mm, d'un aspect bombé, de couleur crème et productrices d'EPS. Le temps de génération nous a permis de dire que ces souches sont à croissance rapide.

La caractérisation physiologique de ces isolats a permis la mise en évidence d'un caractère mésophile et croissance entre des pH situés entre 6 et 10. En outre ces souches ont un comportement variable vis-vis du NaCl.

La caractérisation biochimique montre que toutes les souches étudiées possèdent une nitrate réductase à l'exception de Hc10. L'utilisation des différents substrats carbonés a montré également un profil d'assimilation très variable. Ces souches ont un pouvoir acidifiant sur milieu YMA-BTB. En outre, ces isolats présentent une résistance importante à l'oxacilline et une moindre tolérance à la gentamycine, à l'érythromycine et à la tétracycline.

Un test de nodulation croisé réalisé sur *L. culinaris*, *P. sativum* et *V. unguiculata* a montré que les isolats d'*H. coronarium* sont incapables de noduler les autres légumineuses testés. Ceci permet de suggérer que ces souches présentent un spectre d'hôte étroit.

En perspectives, il est intéressant d'élargir la collection à d'autres espèces et à différents sites écologiques et géographiques pour apporter d'autres informations et enrichir la base de données actuelle sur les *Hedysareae* ainsi que de protéger et de sauvegarder ces deux partenaires symbiotiques pour une éventuelle application dans le futur.

*Références
Bibliographiques*

A

- Abdelguerfi, A., Abdelguerfi-Berrekia, R. (1987)** Réflexions sur la valorisation de quelques espèces fourragères adaptées aux zones arides et semi-arides. AINA. El-Harrach. 11(2),1-10.
- Abdelguerfi, A., Ramdane, M. (2003)** Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. PDNB. TOME XI.MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31.
- Abdelguerfi-Berrekia, R. (1985)** Contribution à l'étude du genre *Hedysarum* L. en Algérie. Thèse Magister. INA. Alger. 131.
- Abdelguerfi-Berrekia, R., Abdelguerfi, A. (1986)** Valorisation des ressources phylogénétiques locales d'intérêt fourrager dans l'aménagement des zones de montagnes.AINA. El-Harrach. 10(1),1-11.
- Abdelguerfi-Berrekia, R., Abdelguerfi, A., Bounaga, N., Guittonneau G.C. (1991)** Répartition des espèces spontanées du genre *Hedysarum* selon certains facteurs du milieu en Algérie. Fourrages.12(6), 187-207.
- Aarons, S. R., Graham, P.H. (1991)** Response of *rhizobium leguminosarum* bv. Phaseolito acidity. PS. 134(1), 145-151.
- Allen, O.N., Allen, E.K. (1950)** Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. Bacterial. Rev. 14, 273-330.
- Amirouche, R., Misse, M. (2009)** Flore spontanée d'Algérie : différenciation éco géographique des espèces et polyploïdie.CA. 18(6), 474-480.
- Ardley, J.K., De Trengove, R.D., Dilworth, M.J., Howieson, J.G., Meyer, S.E., O'Hara, G.W.,Parker, M.A.,Reeve, W.G., Willems, A., Yates, R.J. (2012)** *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov., and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are *Alphaproteobacterial* root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. IJSEM. 62 (11), 2579-2588.

B

- Bacle, E.B.B., Tailliez, R. (1985)** Etude de la symbiose rhizobium-legumineuse: Préparation de cellules isolées pour l'étude invitro / Study of the symbiosis rhizobium-legume : Preparation of isolated cells for invitro study. 88, 223-230.
- Baatout, H., Marrakchi, M., Pernes, J. (1990)** Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Hedysarum capitatum* and autogamous *Hedysarum euspinosissimum*, PS. 69, 49-64.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Murzsu, R., Giacomini, A., Squartini, A. (2004)** Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *hedysarum*. SAM. 27, 462-468.
- Beck, D.P; Materon, L.A., Afondi, F. (1993)** Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. ICARDA. Syria.
- Ben jeddi, F. (2005)** *Hedysarum coronarium L.* Variation génétique, création variétale et utilisation dans des rotations tunisiennes, thèse de doctorat en Sciences Biologiques Appliquées, FSBUG. Belgique, 232. Ministère de l'agriculture, IRESA, BouSalem, Tunisie, 1-3.
- Boivin-Masson, C., De Lajudie, P., Dreyfus, B., Garcia, Giraud, E., N., Gillis, M., Jourand, P., Neyra, M., Prin, Y., Sy, A., Willems, A. (2001)** *Methylophilic Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J.B. 183, 214-220.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009)** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? TR. 17(10), 458-466.
- Bouajila, K., Ben, Jeddi, F., Sanaa M. (2014)** Effet de la décomposition des résidus de sulla (*Hedysarum coronarium L.*) sur l'évolution des caractéristiques chimiques de deux types de sol en climat aride Tunisien. JMES. 5 (3), 723-730.
- Broughton, W.J., Perret, X. (1999)** Genealogy of leegume-Rhizobium symbioses. COPB. 2(4), 305-311.

Brunton, J. (2002) Plantes toxiques, végétaux toxiques pour l'homme et les animaux. TD. Paris, 618.

Boussaid, M., Ben, Fadhel, N., Trifi-Farah, N., Abdelkefi, A., Marrakchi, M. (1995) Les espèces méditerranéennes du genre *Hedysarum* L. In : Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. BRG/INRA. France, 115-130.

C

Casella, S., Leporini, C., Nuti, M.P. (1984) Nitrous oxide production by nitrogen-fixing fast growing rhizobia. ME. 10, 107-114.

Chen, W.X., Li, J.L., Yan, G.H. (1988) Numerical taxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. IJEM. 38, 392-397.

Chen, W.M., Coenye, T., De Vos, P., Laevens, S., Lee, T.M., Mergeay, M., Vandamme, P. (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of acystic fibrosis patient. IJSEM. 51, 1729-1735.

Choi, B.H., Ohashi, H. (2003) Generic criteria and infrageneric system for *Hedysarum* and related genera (*Papilionoideae-Leguminosae*). Taxon. 52(3), 567-576.

Claude, J., Marel, C., Rome, S., Salducci, X., Wery, J. (1996) Importance des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes: exemple des relations *Rhizobium*/légumineuses, ABG1. 143(6), 521-529.

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

D

Dénarie, J., Debelle, F., Prome, J.C. (1996) *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors : Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. ARB. 65, 503-535.

Dreyfus, B., Garcia, J.L., Gillis, M. (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov, sp.nov, a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbaniarostrata*. IJSB. 38, 89-98.

Dreyfus, B. (1997) *Sesbania rostrata* et *Medicago arborea* : des légumineuses fixatrices d'azote. Dossiers thématiques de l'IRD 'Le jardin planétaire'. www.orstom.fr/fr/inst/actualites/dossiers/jardin/legume.shtml.

F

Frame, D. (2000) *Hedysarum coronarium* L., *Leguminosae* F.A.O.

Frank, B. (1889) Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 7, 332-346

G

Galloway, J.N., Aber, J.D, Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J. (2003) The nitrogen cascade. *BS*.53(4), 341-356.

Gourret, J.P., Strullu, D.G. (1980) Données ultra structurales sur l'intégration cellulaire de quelques parasites ou symbiotes de plantes. I. Procaryotes, Bulletin de la Société BFAB, 127(1), 85-96.

Graham, P.H. (1964) The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *JGM*.35(5), 11-517.

Graham, P. H. (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *CJM*.38(6), 475-484.

Grimaldi, A. (1961) Osservazioni e ricerche morfobiologiche sopra la zulla (*Hedysarum coronarium* L.). Ann. Fac. Agr. Perugia. 16, 3-28.

Gutierrez-Mas, J.C. (1983) La Zulla. La reina de las forrajeras de secano. *Agricultura* 11, 576- 677.

Glatzle, A., Schulte-Batenbrock, T., Brockwell, J. (1986). Symbiotic incompatibility between two forage species of *Hedysarum* grown in Morocco, and their homologous rhizobia. *FEMS ML* 37, 39-43.

H

Hamdi, H.Z. (1999) *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogène Fixation UnderSévère Conditions and in an ArideClimate.in :MMBR. beni-suef,62511 egypt, 63(4), 968–989.

Hannachi salhi, A., Combes, D., Baatout, H., Figier, J., Marraakchi, M., Boussaid, M., Trifi-Farah, N. (2002) Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI-FAO.130, 65-72.

Heulin, T., Vriet, C.(2014) Symbiosis plantes-Microorganismes.LGBP.95.

Hyam, R., Pankhurst, R. (1995) Plants and their names. In. "A concise dictionary". RBGE. (Oxford University Press, ed.), 545p.

I

Issolah, R., Tahar, A., Derbal, N., Zidoun, F., Ait Meziane., M, Oussadi, A., Dehiles, I., Bradai, R., M, Ailane., Terki, N., Aziez, F., Zouahra, A., Djellal, L. (2002) Caractérisation écologique de l'habitat naturel du *Sulla*(*Fabaceae*) dans le Nord -Est de l'Algérie.*Rev. Écol. (Terre Vie)*, 67,295-304.

J

Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M.(1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobiummediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. IJSB. 47, 895-898.

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. IJSB. 32 (1), 136-139.

Jordan, D.C. (1984) Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In : N.R. Kreig and J.H. Holt (ed.). BMSB. vol.1 The Williams & Wlikins Co. Baltimore. 234-242.

K

Kassem, M., Capellano, A., Gounot, A.M. (1985) Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficience de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN J.* 1, 63-65.

Khelifi, H. (208) Etude de comportement de quelques variétés ou population de luzerne pérenne (*Medicago sativa L.*) et de sullaa (*Hedysarum coronarium L.*). INAEH, 184.

L

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

Lin, D.X., Wang, E.T., Tang, H., Han, T.X., He, Y.R., Guan, S.H., Chen, W.X. (2008) *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *IJSEM.* 58(6), 1409-1413.

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

M

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *TM.* 17, 458-466.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001) Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *N.* 411(6840), 948-950.

Moore, G., Sanford, P., Wiley, T. (2006) Perennial pastures for Western Australia. Sulla (*Hedysarum coronarium*). Herbaceous perennial legumes. Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth.

N

Nour, S.M., Fernandez, M.P., Normand, P., Cleyet-Marel, J. C. (1994) *Rhizobium*

ciceri sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpea (*Cicer arietinum* L.). *IJSB*. 44, 511-522.

Prosperi J.M., Guy P., Balfourier F. (1995) Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. Edition, BRG : Bureau des Ressources génétiques et INRA. Paris, France. 219.

Q

Quezel, P., Santa, S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. ECMRS.558p.

R

Rivas, R., Velazquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Gillis, M., Dazzo, F.B., Martínez-Molina, E. (2002) A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *AEM*. 68, 5217-5222.

S

Selosse, M.A. (2001) La symbiose: structure et fonctions, rôle écologique et évolutif. M-V. Paris: 154p.

Shneider, A., Huyghe, C. (2015) Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Quae RD10, 78026

Slim, S. (2004) Amélioration fourragère et protection des terres par le *Sulla* "Bikra21" dans les gouvernorats de Zaghuan et de Siliana. Projet de Fin d'Etudes. INAT. 81 p.

Slim S., Ben Jeddi, F., Belghith, A., Zouaghi, M. (2008) Revue de l'INAT. 23 N°1, 199-206.

Slim, S., Ben Jeddi F. (2011) Protection des sols des zones montagneuses de la Tunisie par le *Sulla* du Nord (*Hedysarum coronarium* L.). *Sécheresse* 22, 117-24.

Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1985) Methods in legume-*Rhizobium* technology, 128-138.

Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1994) Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.

Squartini, A., Struffi, P., Doring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin E., Velazquez, E., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., B. Dazzo, F., Casella, S., Nuti, M.P. (2002) *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *IJSEM*. 52(4), 1267–1276.

Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., Dreyfus, B. (2001) *Methylotrophic Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *JB*. 183(1), 214-220.

T

Trifi-Farah N., Chatti W.S., Marrakchi, M., Pernes, J. (1989) Détermination génétique de dix systèmes enzymatiques chez *Hedysarum coronarium* L. *Agronomie*. 9, 503-510.

Trifi-Farah N., Chatti W.S., Marrakchi, M., Pernes, J. (1989) Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. *Agronomie*. 9(6), 591-598.

Trinchant J.C., Drevon J.J., Rigaud J. (1997) Fixation symbiotique de l'azote. *In*: Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris, 133-147.

Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. *AEM*. 71, 1318-1327.

V

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

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

W

Watson, M.J. (1982) *Hedysarum coronarium*, a legume with potential for soil conservation and forage. N. Z. J. Agric. Sci. 16, 189-193.

Werner, D. (1992) Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. BBAS. 39, 261-267.

Y

Yates, R., Howieson, J., Sofie, E., De Meyer, T.R, Seshadri, R., Pati, A., Woyke, T., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpides, N., Loi, A., Nutt, B Garau, G., Sulas, L., Reeve., W. (2015) High-quality permanent draft genome sequence of *Rhizobium sullae* strain WSM1592: a *Hedysarum coronarium* microsymbiont from Sassari. ISGS, 1-6.

Z

Zhang, X.X., Harper, R., Karsisisto, M., lindström, K. (1991) Diversity of bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *IJSB*.41, 104-113

Zhang, J., Song, F., Xin, YH., Fang, C. (2009) *Microvirga guangxiensis* sp. Nov., a novel Alpha proteo bacterium from soil, and emended description of the genus *Microvirga*. *I.J.S.E.M*.59, 1979-2001.

Zouaghi, M. (2001) Rôle du Sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L.) dans les systèmes de culture selon les principes de base d'une agriculture durable. Journée d'étude sur les nouveautés dans la recherche. 5 Avril 2001 : l'amélioration du Sulla local comme source durable pour l'alimentation animale. INAT- CCSPS. Medjez El Bab. Tunisie.

Annexes

Annexe I

Composition des milieux de cultures

(Pour 1 litre d'eau distillé) (Vincent, 1970)

Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

Mannitol	10g
Extrait de levure	0,4g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Agar	15g

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol	10g
Extrait de levure	0,4g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2g
NaCl	0.1g
Eau distillé.....	1l

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Milieu Jensen

- Solution stock (X10)

CaHPO ₄	5g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2.5g
NaCl	1g

- Dilution (X1)

Solution stock.....	100ml
FeCl ₂	0.3ml

Solution d'oligoélément 1ml
H₂O 3.5l

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Préparation de la solution du BTB (Bleu de Bromothymol) à 0.0025% (w/v)

Bleu de Bromophénol 0.5 g
Ethanol 100 ml

Stériliser par filtration et conserver à 4°C

Bouillon nitraté

Macération 1000 ml
Péptone trypsique 15 g
NaCl ou KCl 05 g
Nitrite de Sodium (NaNO₂) 01 ml

Ajuster à pH 7.0

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Annexe II

Protocole de la coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre.
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes.
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes.
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant.
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe III

Résultats des différents tests phénotypiques

Tableau AI : Résultats du temps de génération des bactéries isolées d'*H. coronarium*.

Souches	Temps de génération (h)	Taux de croissances (h ⁻¹)
Hc1	1.76	0.56
Hc2	2.17	0.46
Hc3	2.57	0.38
Hc4	2.18	0.45
Hc5	2.48	0.40
Hc6	2.67	0.37
Hc7	3.61	0.27
Hc8	1.80	0.55
Hc9	2.57	0.38
Hc10	3.61	0.27
Hc11	2.00	0.50
Hc12	2.77	0.36
Hc13	3.80	0.26
Hc14	3.28	0.30
Hc15	2.12	0.47
Hc16	3.43	0.29
Hc17	3.14	0.31
Hc18	1.31	0.76
Hc19	2.77	0.36
Hc20	2.77	0.36
3841 ^T	1.03	0.97

Tableau AII : Résultats de l'effet de la température sur la croissance des bactéries isolées d'*H. coronarium* (DO_{600nm}).

Souche N°	20°C	24°C	28°C	32°C	37°C
Hc1	0.442	0.447	0.549	0.480	0.113
Hc2	0.406	0.467	0.598	0.479	0.394
Hc3	0.443	0.454	0.548	0.476	0.251
Hc4	0.388	0.423	0.510	0.444	0.288
Hc5	0.387	0.495	0.510	0.453	0.125
Hc6	0.393	0.459	0.508	0.413	0.528
Hc7	0.345	0.442	0.525	0.497	0.490
Hc8	0.391	0.459	0.494	0.478	0.340
Hc9	0.378	0.431	0.536	0.510	0.065
Hc10	0.366	0.373	0.507	0.458	0.283
Hc11	0.369	0.388	0.505	0.414	0.333
Hc12	0.358	0.402	0.557	0.416	0.267
Hc13	0.377	0.389	0.515	0.451	0.240
Hc14	0.345	0.414	0.590	0.554	0.537
Hc15	0.309	0.330	0.501	0.229	0.138
Hc16	0.409	0.429	0.526	0.471	0.179
Hc17	0.406	0.440	0.503	0.483	0.081
Hc18	0.398	0.419	0.472	0.446	0.144
Hc19	0.430	0.446	0.582	0.410	0.077
Hc20	0.433	0.504	0.602	0.535	0.072
3841 ^T	0.355	0.399	0.425	0.342	0.075

Tableau AIII : Résultats de l'effet du pH sur la croissance des bactéries isolées *d'H. coronarium*(DO_{600nm}).

Souche N°	4	6	7	8	10
Hc1	0.336	0.382	0.551	0.480	0.409
Hc2	0.231	0.383	0.557	0.498	0.479
Hc3	0.229	0.395	0.550	0.534	0.476
Hc4	0.337	0.379	0.510	0.487	0.471
Hc5	0.286	0.408	0.538	0.518	0.508
Hc6	0.289	0.433	0.508	0.483	0.450
Hc7	0.341	0.371	0.525	0.515	0.504
Hc8	0.309	0.413	0.515	0.494	0.492
Hc9	0.358	0.416	0.515	0.510	0.492
Hc10	0.354	0.403	0.548	0.511	0.501
Hc11	0.319	0.385	0.505	0.473	0.432
Hc12	0.256	0.354	0.557	0.532	0.520
Hc13	0.427	0.380	0.530	0.515	0.501
Hc14	0.325	0.360	0.554	0.522	0.386
Hc15	0.301	0.399	0.532	0.501	0.475
Hc16	0.281	0.402	0.519	0.516	0.471
Hc17	0.140	0.314	0.584	0.526	0.503
Hc18	0.319	0.375	0.551	0.472	0.468
Hc19	0.280	0.392	0.582	0.564	0.555
Hc20	0.412	0.390	0.535	0.524	0.503
3841 ^T	0.310	0.342	0.425	0.297	0.051

Tableau AIV : Résultats de l'effet du NaCl sur la croissance des bactéries isolées d'*H.coronarium* (DO_{600nm}).

Souche N°	0.5%	1%	2%	3%
Hc1	0.539	0.429	0.025	0.029
Hc2	0.552	0.267	0.026	0.009
Hc3	0.534	0.331	0.036	0.015
Hc4	0.580	0.547	0.023	0.020
Hc5	0.566	0.505	0.028	0.036
Hc6	0.545	0.376	0.095	0.026
Hc7	0.399	0.213	0.036	0.032
Hc8	0.532	0.344	0.226	0.075
Hc9	0.542	0.404	0.025	0.022
Hc10	0.442	0.214	0.011	0.009
Hc11	0.430	0.242	0.139	0.231
Hc12	0.430	0.206	0.142	0.026
Hc13	0.372	0.397	0.037	0.018
Hc14	0.302	0.107	0.023	0.014
Hc15	0.417	0.125	0.098	0.107
Hc16	0.313	0.362	0.018	0.130
Hc17	0.556	0.312	0.245	0.182
Hc18	0.495	0.163	0.192	0.224
Hc19	0.449	0.201	0.013	0.018
Hc20	0.371	0.118	0.029	0.007
3841 ^T	0.394	0.011	0.014	0.003

Tableau AV : Profil d'assimilation des sucres par les souches isolées d'*H. coronarium* (DO_{600nm}).

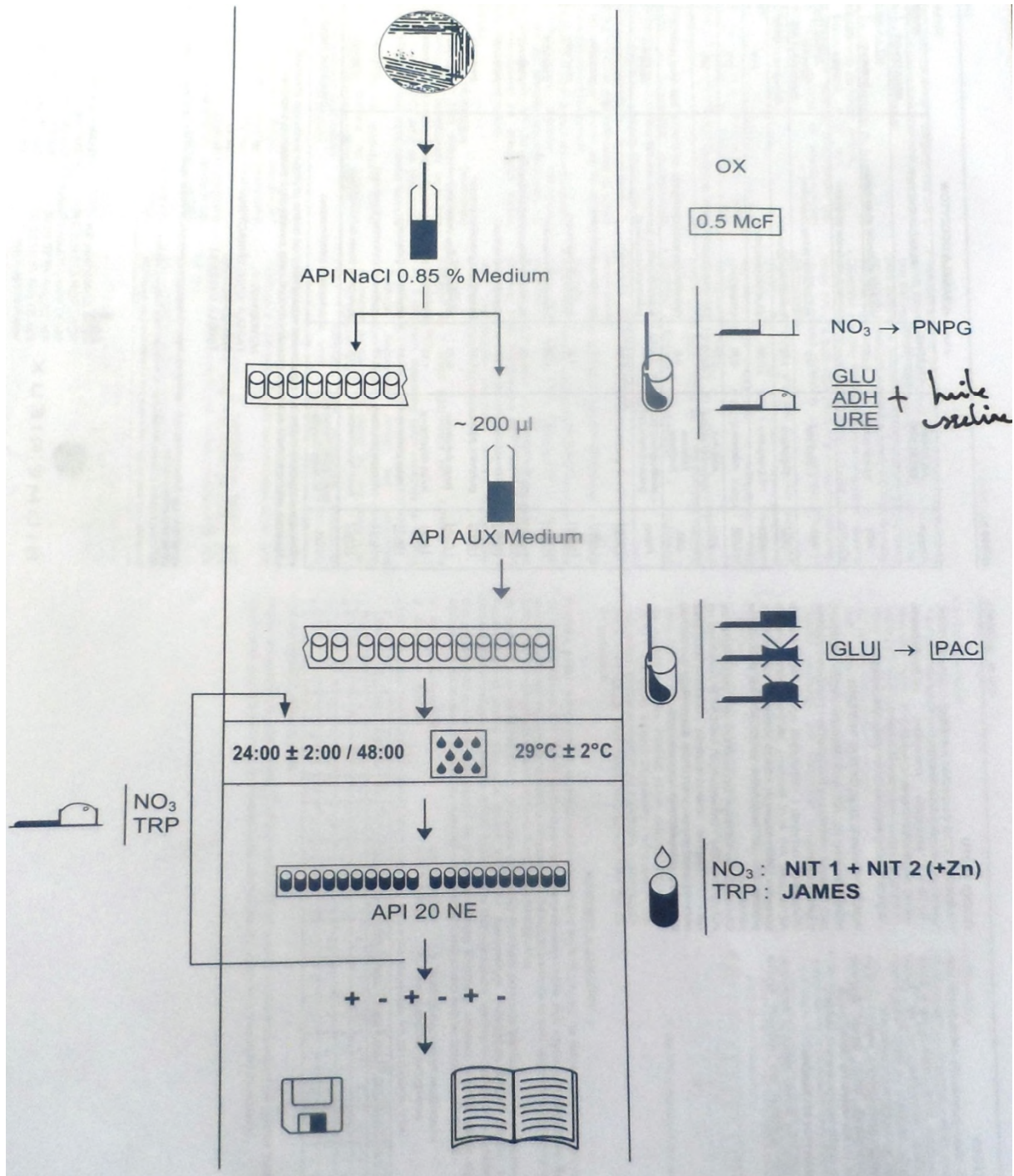
Souche \ Sucres	Galactose	Sucrose	Rhamnose	Sorbitol
Hc1	0.399	0.394	0.236	0.265
Hc2	0.327	0.342	0.230	0.254
Hc3	0.396	0.334	0.264	0.253
Hc4	0.340	0.354	0.249	0.243
Hc5	0.400	0.397	0.244	0.256
Hc6	0.368	0.349	0.217	0.241
Hc7	0.460	0.335	0.211	0.223
Hc8	0.390	0.468	0.021	0.203
Hc9	0.385	0.386	0.211	0.296
Hc10	0.310	0.332	0.176	0.251
Hc11	0.345	0.326	0.187	0.229
Hc12	0.298	0.349	0.136	0.286
Hc13	0.270	0.316	0.184	0.229
Hc14	0.384	0.270	0.201	0.218
Hc15	0.334	0.334	0.182	0.259
Hc16	0.338	0.417	0.184	0.219
Hc17	0.362	0.346	0.204	0.415
Hc18	0.455	0.475	0.060	0.214
Hc19	0.443	0.342	0.142	0.309
Hc20	0.445	0.348	0.226	0.494
3841 ^T	0.246	0.104	0.056	0.071

Tableau AVI : Résultats d'antibiogramme des bactéries isolées d'*H.coronarium* (DO_{600nm}).

Souches	Gentamycine	Oxacilline	Erythromycine	Tétracycline
HC1	S	R	S	S
HC2	S	R	S	S
Hc3	S	R	S	S
Hc4	S	R	S	S
Hc5	S	R	S	S
Hc6	S	R	S	S
Hc7	S	R	S	S
Hc8	S	R	S	S
Hc9	I	R	S	S
Hc10	S	R	I	S
Hc11	S	R	S	S
Hc12	S	R	S	S
Hc13	I	R	S	S
Hc14	S	R	S	S
Hc15	S	R	S	S
Hc16	S	R	S	S
Hc17	S	R	S	S
Hc18	S	R	S	S
Hc19	S	R	I	S
Hc20	S	R	I	S
3841 ^T	S	R	I	S

Annexe IV

Fiche technique de la galerie API 20NE



Résumé

20 souches bactériennes isolées à partir de nodules racinaires d'*Hedysarum coronarium* collectés à Bejaia ont été étudiées d'un point de vue phénotypique pour trouver les caractères cellulaires, culturels, physiologiques, nutritionnels et biochimiques mais aussi symbiotiques (test de nodulation simple et croisé). Une souche de référence *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T a été prise en considération pour la comparaison des résultats.

Les souches testées ont présenté une bonne croissance entre 20 et 32°C avec un optimum à 28°C, entre pH 6 et 10 et ont une tolérance modérée pour la salinité. Elles acidifient le milieu et ont un temps de génération compris entre 2 et 4h. Ces résultats indiquent donc que ce sont des rhizobia à croissance rapide et qu'ils sont incapables de noduler les différents types de légumineuses testés du fait de leur spécificité d'hôte élevée.

Mots clés : *Hedysarum coronarium*, caractérisation phénotypique, nodulation, rhizobia, symbiose.

Abstract

20 bacterial strains isolated from roots nodules of *Hedysarum coronarium* collected from Bejaia were studied phenotypically like characters cellular, cultural, physiologic, nutritional and biochemical as well as symbiotic (nodulation test and cross inoculation test). A reference strain *Rhizobium leguminosarum viciae* 3841^T was used as a control for comparing the results.

The strains showed a good growth between 20 and 32°C with an optimum at 28°C, between pH 6 and 10 and have a moderate tolerance to the salinity. These strains also acidified the medium and the generation time is comprised between 2 to 4 h. These results indicate that these strains are a group of fast growing rhizobia and can't nodulate the other tested legumes because of here specificity of nodulation.

Key words : *Hedysarum coronarium*, phenotypic characterization, nodulation, rhizobia, symbiosis.