

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 des Sciences Biologiques de l'Environnement
Filière : Santé et Environnement
Option : Environnement et Santé Publique



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

MASTER

Thème

**Isolement et caractérisation phénotypique
des bactéries nodulant *Spartium junceum* L.**

Présenté par :

DJEHICHE Widad & KADIR Hadjir

Soutenu le : 20-06-2017

Devant le jury composé de :

M ^{me} BENHAMICHE S.	MCB	Présidente
M ^{me} BOULILA F.	MCA	Examinatrice
M ^r RAMDANI N.	MAA	Promoteur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Tout d'abord nous remercions le DIEU de nous avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir au mieux ce travail.

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude, notre plus grand respect aux membres de jury : M^{me} BENHAMICHE S., M^{me} BOULILA F et Monsieur : RAMDANI N. (MAA) qui a assuré la direction de notre thème. Ces mois passés à ses côtés ont été très riches en travail efficace .

Nos remerciements et notre reconnaissance s'adressent également à et M^{me} BOULILA F. pour sa bonne hospitalisation au niveau de son laboratoire aussi à M^r BELHADI Dj., M^r BENADJAOU D., M^{elle} BOUDEHOUCHE Wafa et M^{elle} BOURBABA Yasmina pour leurs aides et guides.

Et M^{me} MESSAOUDANE F. la technicienne de laboratoire biologie du sol.

Nous exprimons également notre gratitude et reconnaissance tous les enseignants ayant contribué à notre formation.

Hadjer&Widad

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail á mes chers parents Fadila & Mohamed, que le DIEU
les protège et les garde.

Egalement je n'oublie pas de dédie ce mémoire à mes sœurs : Asma, Nada, Amina,
ma chérie Siwar et mes frères : Abdelmounaim, Farid, Badreddine et toute personne
qui porte le nom KADIR. Aussi à mes vertueux professeurs :

M^r ZEMMOURI Abdelkader, M^r DJELLABI Tahar, M^r KHOUKHOU Abdelkader,

M^r GUESSOM Abdrrahim, Mr BENAOUA Badreddine, M^{me} FKIH Soumia,

M^r BENYAYA Abderrezzak, M^r BENHAMED Abdennaceur, M^r DJELLALI Lezhari,

M^{me} REMILI Siham, M^{me} BESRA Hayat, M^{me} HAMMADI Malika, M^r DOUGHA

Abdennaceur, M^r FEDEL Mohamed Salim, M^r BOUKHEZZA Boualem, M^{me} MESSAOUDI

Asma, M^{me} GUESSOM Fadila, M^r BOUKHALFA Abdelghani, M^r BENTALEB Abdelmalek,

M^r SALHI

A mes amies et mes camarades de promotion.

A tous qui m'a connu et m'aime, malgré mes défauts.

Merci.



Dédicaces

Je dédicace ce modeste travail à mes chérés parents, que je ne cesserai jamais de remercier. Leur amour, leur soutien et leurs encouragements ont été et resteront mes meilleurs atouts pour le futur. Puisse dieu me les garder.

A mon ami Abdelhak, qui a toujours été à mes côtés, surtout dans les moments les plus difficiles.

Je n'oublierai pas mes très chers frères : Khemessi, Abdel latif, Samir, Saïd, Sahraoui, Yassine ;chez lesquels j'avais trouvé aide, conseils et réconfort.

Et mes belles sœurs Fatiha, Djamaa, Souad, Faireuze, Djaoiher.

A mon adorable petit Radia, Marwa, Chahed, Hiba, Azize, Mohamed, Kaouther et Abobaker.

Quant à mes amies Sarah, Fatima, Fatiha, Laila, Ilham, Chaima, Meriem, Yamina et Malika, qu'elles sachent que je ne les oublierai pas dans mes dédicaces : elles ont été là quand j'avais besoin d'elles.

A toutes et tous qu'ils trouvent en ce mémoire, ma profonde gratitude et mon éternelle reconnaissance.

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. L'azote dans l'air.....	3
II. Cycle d'azote.....	3
III. Fixation biologique d'azote.....	6
IV. Symbiose Rhizobiums- légumineuses.....	6
IV.1. Généralités.....	6
IV.2. Mécanisme de nodulation.....	8
V. Rhizobium.....	9
VI. Légumineuses.....	10
VI.1. Généralités.....	10
VI.2. Classification de légumineuses.....	10
VI.3. L'importance et l'utilité des légumineuses.....	11
VI.4. Tribu des <i>Genistae</i>	12
VI.4.1. Généralités.....	12
VI.4.2. <i>Spartium junceum</i> L (Gênet d'Espagne).....	12
VI.4.3. Description botanique de <i>Spartium junceum</i> L.....	13
VI.4.4. Intérêt du genêt d'Espagne.....	13
CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES	
I. MATERIELS.....	14
I.1. Echantillonnage.....	14
I.2. Souches de référence.....	14
II. Méthodes.....	15
II.1. Analyses physico-chimiques du sol d'Ifran.....	15
II.1.1. Mesure du pH.....	15
II.1.2. Dosage du carbone.....	15
II.1.3. Dosage de l'azote total.....	16

II.1.4. Dosage du calcaire total.....	16
II.1.5. Dosage du calcaire actif.....	16
II.1.6. Mesure de la Conductivité électrique.....	16
II.1.7. Analyse granulométrique.....	16
II.2. Isolement des bactéries nodulant <i>Spartium junceum</i> L.....	17
II.2.1. stérilisation des nodules.....	17
II.2.2. Extraction des bactéries à partir des nodules.....	17
II.2.3. Isolement des souches et purification des colonies.....	18
II.2.4. Conservation des souches.....	18
II.3. Test d'authentification.....	18
II.3.1. Préparation des plantes axéniques.....	18
II.3.2. Culture en tube.....	18
II.3.3.. Inoculation des plantules.....	19
II.4. Identification des bactéries nodulant <i>Spartium junceum</i> L.....	20
II.4.1. Caractéristiques morphologique.....	20
II.4.2. Caractéristiques biochimiques.....	20
II.4.3. Caractéristiques physiologiques.....	24
II.5. Analyse numérique.....	24

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Analyses physico-chimiques du sol d'Ifran.....	25
II. Isolement et authentification des souche.....	26
III. Caractérisation phénotypiques des B.N <i>Spartium junceum</i> L.....	26
III.1. Caractéristiques morphologiques des colonies et des cellules.....	26
III.2. Caractéristiques biochimiques.....	27
III.3. Caractéristiques biochimiques sur la galerie API 20 NE.....	29
III.3.1. Assimilation des sucres.....	31
III.3.2. Résistance aux antibiotiques.....	33
III.4. Caractéristiques physiologiques.....	34
III.4.1. Effet de la salinité sur la croissance bactérienne	34
III.4.2. Effet du Ph sur la croissance bactérienne.....	36

III.4.3. Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	37
III.5. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique.....	38
Conclusion et perspective.....	40
Références bibliographiques	
Annexes	

A: Argile.

ADH : Arginine dishydrolase.

ADI : Adipate.

ARA: Arabinose.

BNL: Bactérie Nodulant Légumineuse

BTB: Blue de bromothymol.

CAH: classification Ascendante Hiérarchique.

CAP : Captrate.

CAT : Catalase.

CE : Conductivité électriques.

CIT : Citrate.

ESC : Esculine.

GEL: Gélatine.

Glu: Glucose.

GNT : Gluconate.

Ind: Indole.

Lac: Lactose.

LDC : Lysine décarboxylase.

Lf : Limons fins.

Lg : limons grossier.

LPWG: Legume Phylogeny Working Group

MAL: Maltose.

MAN: Mannithol.

MLT: acide malique

MNE: Mannose.

MO : Matière Organique.

NAG: N-acetyl-glucosamine.

Nod : Nodulation

NR : Nitrate Réductase.

ODC : Ornithine décarboxylase.

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside

OX: Oxydase.

PAC: acide phénylacétique.

PHB : β -hydroxybutyrate.

RC: Rouge Congo

RM: Rouge Méthyle

Sf : Sable fin.

Sg : Sable grossier.

TRP: Tryptophane.

UAMB: Université Abderrahmane Mira de Bejaia

VP: Voges-Proskauer

YMA: Yeast Mannitol Agar.

YMB: Yeast Mannitol broth.

β -gal : β -galactosidase,

Tableau I : Rôles des micro-organismes dans ce cycle de l’azote.....4

Tableau II: Résultats des analyses physico-chimiques du sol d’Ifra.....25

Tableau III : résultats du test de nodulation.....26

Tableau IV : Résultats des analyses morphologiques des colonies.....27

Tableau V : Résultats des tests biochimiques des souches.....28

Tableau VI : Résultats des tests biochimiques effectués sur la galerie API 20 NE.....30

Tableau VII : Résultats d’assimilation des sucres par bactérie isolé des nodules *Spartium Junceum*.....32

Tableau VIII: Résultats des analyses de la résistance aux antibiotiques.....33

Figure 01 : Schéma simplifié le cycle de l'azote.....	5
Figure 02 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse.....	7
Figure 03 : Photo de <i>Spartium junceum</i> L.....	12
Figure 04 : Les différents échantillons utilisés dans l'étude.....	14
Figure 05 : Stérilisation des nodules.....	17
Figure 06 : Ecrasement des nodules.....	17
Figure 07 : Dispositifs de germination utilisés pour le test de nodulation.....	19
Figure 08 : résultats du test de Bleu de bromothymol.....	29
Figure 09 : Effet de la salinité sur la croissance bactérienne.....	34
Figure 10 : Effet du Ph sur la croissance bactérienne.....	36
Figure 11 : Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	37
Figure 12 : Dendrogramme généré par les caractères phénotypiques	38

INTRODUCTION

Les bactéries telle que *Rhizobium*, sont d'une importance considérable en agriculture et en foresterie à cause de leur capacité à former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. Ces dernières peuvent jouer un rôle important dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols. A côté des applications potentiellement importantes de ces légumineuses, les recherches portent également sur l'adaptation de leurs rhizobiums aux conditions édaphiques défavorables des sols surexploités (épuisés) (**Ndoye, 1999**).

Le climat qui règne sur les pays du bassin méditerranéen et sur une partie de l'Australie, est caractérisé par une sécheresse estivale due à un été sec et long et un hiver froid et humide (**Quatrini et al., 2002**). Les températures et les précipitations moyennes varient d'une région à une autre au sein des pays méditerranéens (**Saxena, 1990**).

Certains écosystèmes méditerranéens présentent des problèmes particuliers comme par exemple des sols affectés par la salinité ou pauvres en matière organique, dégradation du couvert végétal et érosion des sols suite à la pression zooanthropique (surpâturage, abattement d'arbres pour bois de chauffage, exploitation de carrières...). D'autre part, il existe un déficit en fourrage dans de nombreux pays de la région. Les légumineuses constituent une des plus grandes familles de plantes, adaptées à de nombreuses situations pédoclimatiques (aridité, salinité...) et leur association symbiotique avec les Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL) est un élément important à prendre en compte pour introduire l'azote combiné dans les sols pauvres (**Franco, Defaria, 1997**).

Les sols dégradés (par une action humaine, plus ou moins intempestive ou indispensable à la bonne économie d'un pays), ou par l'action de phénomènes naturels (eau, éruptions volcaniques, glaces...) se caractérisent essentiellement par la disparition des horizons de surface et ils deviennent des sols "stériles" pour lesquels la recolonisation végétale spontanée est très aléatoire, même par des espèces réputées très frugales (**Daniere et al., 1986**).

Deux caractéristiques principales rendent les arbustes de légumineuses préférables aux arbres ou aux espèces herbacées pour la restauration des sols pauvres et la végétation des zones dégradées dans les régions méditerranéennes arides ou semi-arides. Tout d'abord, ces arbustes sont adaptés au stress hydrique grâce à leurs systèmes racinaires étendus, leur fermeture des stomates, leurs résistances aux feux de forêt et les feuilles de sclérophylle (**Valladares et al, 2008; Moreira et al, 2011; Prieto et al, 2012**).

Deuxièmement, les arbustes de légumineuses, comme la plupart des légumineuses, établissent une symbiose avec des bactéries fixatrices de N₂ connues sous le nom de rhizobium, fournissant ainsi une entrée nette d'azote dans les écosystèmes. Ce dernier trait améliore la fertilité des sols, facilite la croissance d'autres espèces végétales et prévient l'érosion et la désertification (Requena et al., 2001; Rodriguez-Echeverria et Pérez-Fernandez; 2003; Zakhia et al., 2004; van der Heijden et al., 2006; Cardinale et al., 2010).

En Algérie, les arbustes de la famille des *Genistae* occupent une place importante, mais la diversité des bactéries nodulant les légumineuses reste peu étudiée. Dans ce travail, nous nous sommes intéressées à étudier les bactéries associées aux nodules des racines d'une espèce de légumineuses du genre *Spartium junceum* L.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'azote dans l'air

L'azote est l'élément constitutif de la plante le plus important après le carbone. Il peut représenter jusqu'à 7% de la matière sèche et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif (Tourte *et al.*, 2005).

Cet élément est nécessaire pour tous les organismes vivants pour la synthèse des protéines, des acides nucléiques et d'autres composés azotés. Il favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Stenvenson, 1986). Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (Lamaze *et al.*, 1990).

Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Hageman 1984; Layzell, 1990). Les carences azotées dans le sol sont souvent le principal facteur limitant la croissance des plantes, par conséquent la production végétale agricole (Roger, 1996 ; Raven *et al.*, 2007).

L'atmosphère terrestre contient près de 80% d'azote gazeux. Il ne peut pas être utilisé sous cette forme par la plupart des organismes vivants jusqu'à ce qu'il soit réduit sous forme combiné (combiné avec l'hydrogène), à l'ammoniac. Les plantes vertes, les principaux producteurs de matière organique, utilisent cette source d'azote fixe pour fabriquer des protéines qui pénètrent dans la chaîne alimentaire. Les micro-organismes décomposent les protéines dans les excréments et les organismes morts, libérant des ions ammonium. Ces deux processus font partie du cycle de l'azote (Burdass, 2002).

II. Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substances organiques et de nouveau à l'azote dans la nature. C'est un cycle continu qui est maintenu par les décomposeurs et les bactéries azotées. Le cycle de l'azote peut être divisé en quatre types de réactions et les micro-organismes jouent tous des rôles dans ce cycle, comme le montre le (tableau I) et la (figure 01).

Tableau I : Rôles des micro-organismes dans le cycle de l'azote (Burdass, 2002).

Réactions	Micro-organismes	Conditions	Processus
La fixation d'azote	Bactérie fixant l'azote EX : Rhizobium	Aérobic / anaérobic	La première étape de la synthèse de pratiquement tous les composés azotés. L'azote gazeux est fixé dans des formes que d'autres organismes peuvent l'utiliser.
Ammonification (décroissance)	Bactéries amoniacantes (décomposeurs)	Aérobic / anaérobic	Les décomposeurs, certaines bactéries et champignons du sol, décomposent les protéines dans les organismes morts et les déchets d'animaux qui libèrent des ions ammonium qui peuvent être transformés en d'autres composés azotés.
Nitrification	Bactéries nitrifiantes, Ex : Nitrosomonas & Nitrobacter	Aérobic	La nitrification est un processus en deux étapes. Les ions ammonium ou ammonium sont d'abord oxydés en nitrites puis en nitrates, la forme la plus utilisable par les plantes.
Dénitrification	Bactéries dénaturantes	Anaérobic	Les nitrates sont réduits en azote gazeux, en renvoyant de l'azote vers l'air et en complétant le cycle.

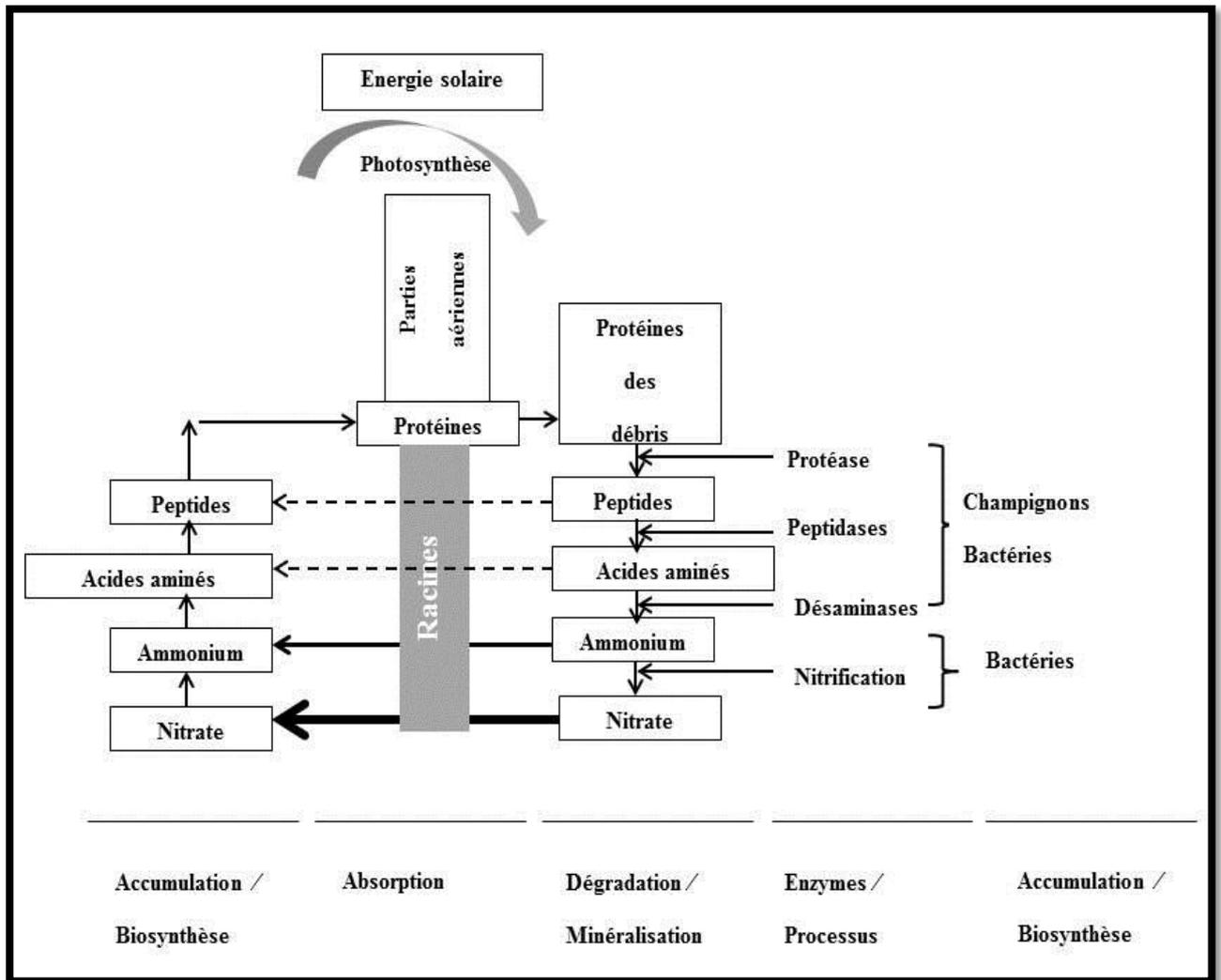


Figure 01 : schéma simplifié du cycle de l'azote montrant les différentes étapes permettant la minéralisation de l'azote organique synthétisé par les végétaux après absorption de formes minérales (ammonium et nitrate) ou organique (acides aminés) (Briat et Job., 2017).

III. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de N_2 a représenté, jusqu'au début du XXe siècle, la seule source d'azote combiné de notre planète et représente encore aujourd'hui, à l'échelon mondial, un apport environ 1,5 fois supérieur à celui des engrais. Elle est estimée à environ 195 millions de tonnes d'N par an (**Smil, 2002**).

La fixation se produit chez des bactéries qui vivent soit en association symbiotique avec des plantes comme les légumineuses, soit chez des bactéries libres. La réduction de l'azote en ammoniac est catalysée par une enzyme, la nitrogénase (**Lidmemann, 2003**).

IV. Symbiose Rhizobium – légumineuses

IV.1. Généralités

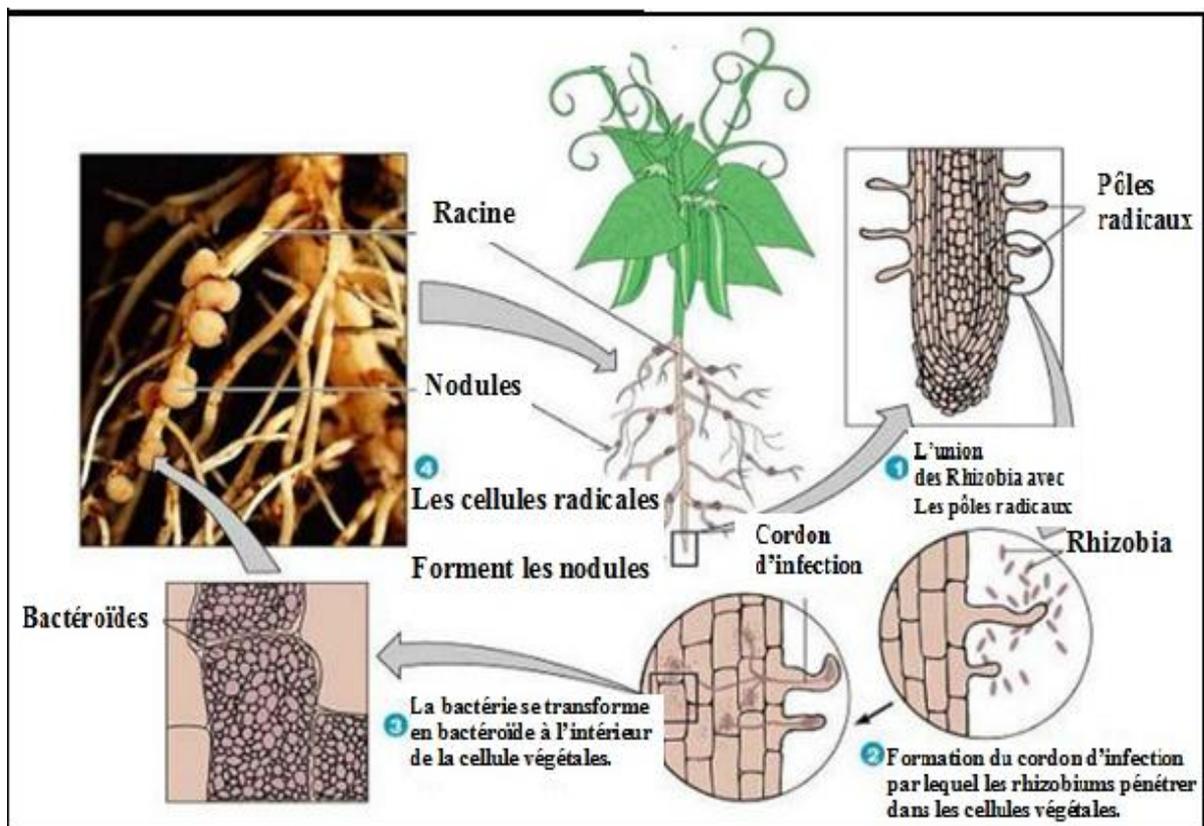
Il s'agit d'un véritable dialogue moléculaire permettant la reconnaissance entre deux partenaires (**Parniske et Downie, 2003**). La symbiose Rhizobium–légumineuses s'établit au sein d'excroissances racinaires spécifiques, appelées « nodosités », qui hébergent les bactéries symbiotiques. La symbiose est à bénéfices réciproques: la bactérie fournit à la plante le N_2 fixé; en retour, la plante apporte l'énergie nécessaire à la synthèse des nodosités et à leur fonctionnement (**figure 01**). De ce fait, la fixation d'azote atmosphérique a un coût en carbone à l'échelle de la plante. Au sein des nodosités, du carbone est en effet utilisé pour la production de substrats énergétiques et de squelettes carbonés impliqués dans la synthèse et la maintenance des tissus des nodosités, ainsi que pour leur activité fixatrice de N_2 et pour l'exportation de composés organiques azotés hors des nodosités. Les assimilats carbonés nécessaires, issus de la photosynthèse, sont fournis aux nodosités aux dépens des autres organes, principalement les racines, et dans une moindre mesure également aux dépens des parties aériennes. Les systèmes racinaires de légumineuses associés à des bactéries fixatrices de N_2 sont par conséquent moins développés que les systèmes racinaires dépourvus de nodosités (**Voisin et al., 2002**).

Une symbiose réussie nécessite une limitation de la croissance bactérienne au sein des nodules. Les légumineuses contrôlent cette croissance de différentes façons. Tout d'abord, bien que les rhizobia produisent NH_3 , ils ne peuvent pas l'utiliser pour la croissance, car ils émettent leur glutamine synthase, l'enzyme primaire pour l'assimilation du NH_3 (**Downie, 2014**).

La symbiose fixatrice d'azote est le résultat d'un équilibre délicat entre une plante supérieure et une bactérie. Il est important de bien connaître les conditions optimales de cette fixation pour pouvoir en faire bénéficier la plante,

- Bonne structure du sol (sol aéré).
- Pas de carence en molybdène et bore.
- Peu d'azote combiné dans le sol.
- Présence de souches de Rhizobium spécifique en nombre suffisant.
- Conditions favorables de développement de la plante (climat, techniques culturales adaptées, absence de maladies...).

En résumé il est nécessaire de supprimer au maximum ces facteurs limitant du développement de légumineuse pour que la fixation d'azote atmosphérique soit active (FAO, 1992)



https://www.researchgate.net/figure/256456838_fig1_Figure-I-1-Differentes-etapes-de-1%27etablissement-de-la-symbiose-rhizobia-legumineuse.

IV.2.Mécanisme de la nodulation

Le processus de nodulation pour presque toutes les légumineuses étudiées est initié par la production de légumineuses d'un mélange de composés, principalement des flavonoïdes, qui induisent la synthèse de la protéine NodD dans le rhizobium (**Wang et al., 2012 ; Downie, 2014**).

Différents légumes produisent différents types de composés. La protéine NodD active la transcription d'autres gènes impliqués dans le processus de nodulation, y compris ceux requis pour produire des facteurs Nod, les molécules ' signal ' produites par les rhizobia et détectées par la plante, qui induisent une organogenèse de nodule (**Oldroyd et al.,2008**). Les gènes *nodABC* codent pour les protéines requises pour créer la structure du facteur Nod de noyau (**Wang et al., 2012**). Les facteurs Nod provenant de différents rhizobia ont une structure similaire d'un squelette de 'oligosaccharide de la N-acétyl glucosamine de type chitine avec une chaîne acyle grasse à l'extrémité non réductrice, mais différent dans leur longueur du squelette de l'oligosaccharide N-acétyl glucosamine et la longueur et la saturation de la chaîne des acides gras.Le noyau du facteur Nod est modifié par des protéines spécifiques à l'espèce, ce qui entraîne diverses substitutions, y compris l'acétylation, la glycosylation, la méthylation et la sulfatation. La perception du signal du facteur Nod dans les légumineuses est initiée par les récepteurs du facteur Nod, qui sont des kinases réceptrices de la serine / thréonine localisées dans une membrane plasmique dans le cas des légumes modèles *Lotus japonicas* et *Medicago truncatula* (**Wang et al., 2012 ; Downie, 2014**).

Les données disponibles indiquent que le rhizobium entre dans les racines de la plupart des espèces de légumineuses par l'infection par les racines (**Sprent et al., 2013**). Ici, les rhizobia entrent dans les poils absorbants des racines et le matériau de la paroi cellulaire de l'hôte se développe autour de l'infection, formant un fil d'infection, qui croît à travers le

cortex de la racine, se ramifiant à plusieurs reprises. Généralement, les rhizobia sont libérés des extrémités de ces fils d'infection dans des structures liées à la membrane dans des cellules hôtes appelées symbiosomes où elles se différencient par leur forme de fixation N₂ connue sous le nom de bactéroïdes. Cependant, toutes les espèces examinées dans les Caesalpinioideae, à l'exception des *Chamaecrista* spp herbacées et quelques espèces dans les Papilionoideae, conservent leur rhizobie dans les fils d'infection (Sprent et al., 2013).

Les bactéroïdes varient considérablement selon leur niveau de différenciation et leur viabilité en fonction de l'hôte des légumineuses (Sprent et al., 2013 ; Czernic et al., 2015). Le processus d'infection des cheveux radiculaires peut conduire à la formation de nodules déterminés ou non. Un deuxième mode d'infection de rhizobium se produit avec des espèces dans le genre *Dalbergiae* (nodules d'eschynémonoïdes) où les rhizobia entrent dans les racines des sites d'émergence de racine latérale (entrée de «fissure») et les fils d'infection ne sont pas impliqués dans le processus d'infection (Okubo et al., 2012 ; Bianco, 2014).

Troisièmement, pour au moins certains membres des *Genisteae* (par exemple, *Lupinus* spp.) et *Crotalariae* (par exemple, *Listia* spp.), Les rhizobia entrent directement dans les racines à travers l'épiderme de la racine à la jonction entre les cellules épidermiques, et encore une fois, les fils d'infection ne sont pas impliqués dans le processus d'infection (González-Sama, 2004 ; Ardl, et al., 2013 ; Czernic et al., 2015).

V. Rhizobium

Les rhizobia sont des bactéries du sol, appartenant à la famille des Rhizobia, ils sont des Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulants (Jordan, 1984). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992). Leur croissance est optimale à une température de 28 °C et un pH entre 6 et 7. Ces bactéries infectent les racines des légumineuses et donnent naissance à des excroissances de

type tumoral appelées nodosités. Le centre de chaque nodosité mature contient des milliards de bactéries qui fixent l'azote.

Quelques auteurs considèrent les rhizobia comme des bactéries qui sont capables de noduler. D'autres distinguent entre les vrais rhizobia appartenant à la classe des *Alphaproteobacteria* et qui inclut actuellement 5 genres: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, et les bactéries non-rhizobia mais qui sont capables aussi de noduler et elles sont constituées des souches de quelques espèces appartenant aux classes *Beta* et *Gammaproteobacteria* et qui incluent les genres *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Cupriavidus* et *Burkholderia* (Hopkins, 2003).

VI. Légumineuses

VI.1. Généralités

Les légumineuses (Fabaceae) constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes, constituent un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifié (Allen et Allen, 1981 ; Broughton, 1984).

Elle est composé d'environ 19.300 espèces dans les 750 genres qui se produisent comme des herbes, des arbustes, des vignes ou des arbres dans des habitats principalement terrestres et sont des composants de la plupart des types de végétation du monde (Lewis et al., 2005 ; LPWG 2013).

VI.2. Classification de légumineuses

Actuellement, la famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles, les Caesalpinioideae, Mimosoideae et Papilionoideae (LPWG ,2013et Cardoso, 2013).

VI.2.1. Les Mimosoideae : Les Mimosoideae sont regroupés en deux tribus, les Ingeae et Mimoseae avec environ 80 genres et 3270 espèces.

VI.2.2. Les Caesalpinioideae : Les membres des Caesalpinioideae sont regroupés en quatre tribus, les Caesalpinieae, Cassia, Cercideae et Detarieae comprenant environ 170 genres et 2250 espèces.

VI.2.3. Les Papilionoideae : se composent de 28 tribus avec environ 480 genres et 13 800 espèces.

Cependant, une nouvelle classification des légumineuses a été proposée avec six sous-familles basées sur les séquences de *matK* gène plastidiques à partir de 20% de toutes les

espèces des légumineuses à travers 90% de tous les genres actuellement reconnus (**LPWG 2013**).

Les six sous-familles proposées sont : des Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae et Papilionoideae. Les espèces dans les Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae et Duparquetioideae ne nodulent pas (**Allen et al** „1981, **LPWG 2013**).

VI.3. Importance des légumineuses

Particulièrement liée à leur capacité à fixer l'azote dans leurs nodosités. Cependant, des facteurs de l'environnement tels que la salinité peuvent avoir un effet négatif sur le rhizobium, sur la légumineuse hôte ou sur leur relation symbiotique. La tolérance des végétaux aux sels notamment la famille des légumineuses, joue un rôle important dans le maintien de la productivité en agriculture, cette tolérance représente un phénomène complexe qui implique des particularités morphologiques et développementales avec des mécanismes physiologique et biochimiques variés. Les communautés microbiennes telluriques, qui jouent un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et d'autres éléments, exercent également des effets bénéfiques ou délétères sur la croissance et la santé des plantes. Parmi les éléments qui peuvent contribuer à augmenter la production végétale et le rendement chez les légumineuses, la mise à profit de la symbiose légumineuse-Rhizobium à travers l'apport d'inoculum (**Claude et al., 2008**).

Aussi, les légumineuses participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote, en s'établissant comme flore pionnière, initiatrice d'une succession écologique. Elles constituent par ailleurs une source d'alimentation extrêmement importante aussi bien pour l'homme (soja, pois, haricot...) que pour l'animal (trèfle, luzerne...). Si les légumineuses ont été utilisées empiriquement depuis l'Antiquité pour améliorer ou entretenir la fertilité des sols, il n'y a qu'une quinzaine d'année que le mécanisme moléculaire régissant la mise en place de cette symbiose a été découvert (**Lerouge et al., 1990**).

VI.4. Tribu des *Genistae*

VI.4.1. Généralités

La tribu des *Genistae*, apparue il y a environ 30 millions d'années (Käss et Wink, 1995), compte environ 20 genres et 450 espèces. La plupart des membres de la tribu sont des arbustes localisés en Europe, en Afrique du Nord et en Méditerranée. Le bassin méditerranéen est considéré comme le principal centre de diversification de la tribu (Cristofolini et Feoli-Chiapella, 1977; Ainouche et al., 2003).

La tribu s'étend aussi aux îles Canaries, au nord de l'Europe et aux Amériques (pour le genre *Lupinus*). Les *Genistae* ont un grand impact écologique dans les pays de l'Europe de l'Ouest non seulement en raison de leur grand nombre d'espèces mais aussi en raison de leur rôle important en tant qu'espèces colonisatrices de régions déforestées (Pardo et al., 2008).

VI.4.2. *Spartium junceum* L. (Gênet d'Espagne)

Spartium junceum L est un arbuste de la famille des légumineuses. Il est la seule espèce du genre *Spartium*. Son habitat est la région méditerranéenne de l'Europe du Sud, Asie du Sud- Ouest et en Afrique du Nord-Ouest (Kovačević et al., 2010).



Figure 03 : photo de *Spartium junceum* L.

<http://www.biolib.cz/en/image/id2966/>

VI.4.3. Description botanique de *Spartium junceum* L.

D'après **Kovačević et al (2010)**, *Spartium junceum* L. est un arbrisseau de 1 à 3 mètres, non épineux, dressé, à rameaux effilés, cylindriques, jonciformes, compressibles, finement striés, très glabres, d'un vert glauque, peu feuillés - feuilles simples, oblongues-lancéolées, entières, glabres en dessus, à poils appliqués en dessous – fleurs jaunes, grandes, odorantes, en grappes terminales - calice scarieux, glabre, fendu jusqu'à la base en une seule lèvre coupée obliquement et terminée par 5 petites dents - étendard grand, orbiculaire, redressé - carène en bec acuminé - étamines monadelphes - style courbé au sommet - gousse de 6-8 cm sur 7 mm linéaire, presque glabre, noire à la maturité, à 12-18 graines non caronculées. *Spartium junceum* L. produit intensément jaune fleurs entre mai et Juillet et ses légumes viennent à échéance entre Août et Octobre. Les fleurs ont des hommes et organes femelles pollinisées par les insectes. Il a beaucoup de fleurs, un à deux centimètres de diamètre couverture collines, se transformant en une belle couleur jaune, tandis que son parfum agréable est particulièrement aimé par les femmes. Spanish Broom pousse le plus souvent dans le sol frais et suffisamment humide, mais il pousse aussi très bien en sol très sec et rocheux, chutes de pierres et de gravières d'inondation. Il a également une caractéristique particulière de plantes xérophiiles.

VI.4.4. Intérêt du genêt d'Espagne

Spartium junceum L. a eu une large gamme d'applications, par exemple : la production de parfums et colorants à partir des fleurs, des paniers des tiges et des matières textiles des fibres (**Bischof et Kovačević, 2013**). Comme les fibres restent encore le principal produit, il existe aujourd'hui une valeur importante pour leur production. Les fibres ont des propriétés similaires aux fibres de lin et sont principalement utilisées dans la production de textiles (**Kovačević et al., 2012**). De telles fibres pourraient être largement applicables, en particulier dans l'industrie automobile, dans le développement d'intérieurs de voitures, par ex. des tapis, des garnitures sur la porte intérieure, couvrent les pièces de rechange roue (**Sindhuphak, 2007; Huda et al., 2008; Partanen et Carus, 2016; Poulidikou et al., 2016**).

**MATERIELS
ET
METHODES**

I. MATERIELS

I.1. Echantillonnage

Les échantillons des nodules de *Spartium junceum* L. ainsi que le sol ont été récoltés de la station d'Ifran (36°45'48.23"N ; 4°54'42.44"E et une altitude de 350m), située dans la commune de Toudja de la wilaya de Béjaia (**Figure 04**).

La récolte est effectuée en hiver durant le mois février de l'année 2017.

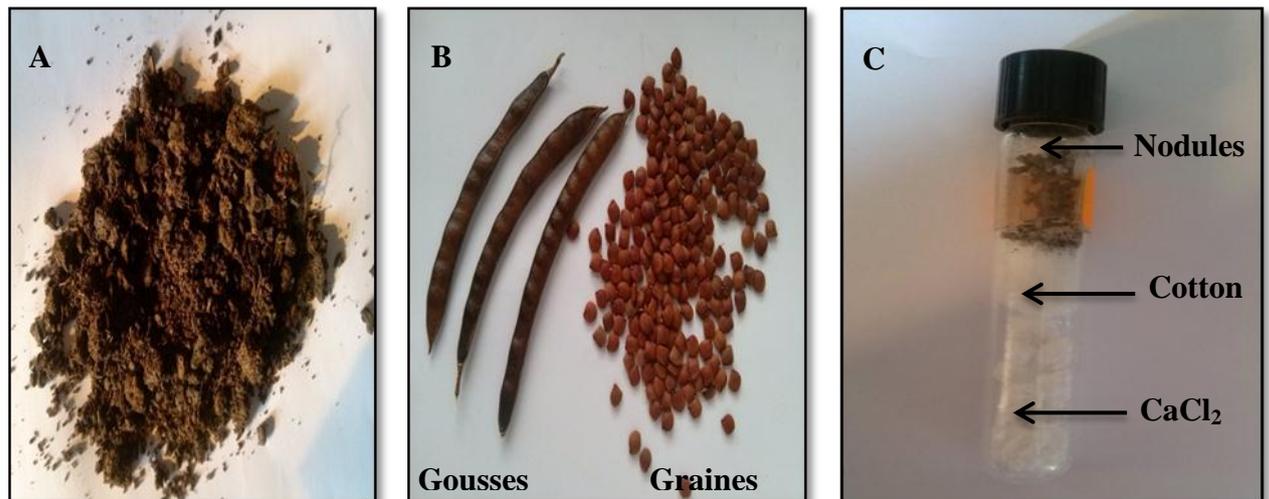


Figure 04 : Les différents échantillons utilisés dans l'étude.

A : Le sol, B : Les gousses et les graines de *Spartium junceum* L.; C : (CaCl₂+Coton+ Les nodules)

Le sol a été transporté dans des sachets en plastique et les nodules dans des tubes contenant le CaCl₂ (qui absorbe l'humidité), surmonté du coton. Par contre les graines sont disponibles au niveau du laboratoire de biologie des sols UAMB.

I.2. Souches de référence

Deux souches de référence du genre *Bradyrhizobium* ont été utilisées. Il s'agit de *Bradyrhizobium elkanii* (USDA76) et de *Bradyrhizobium jaboricum* (USDA6), pour comparer les résultats obtenus par nos isolats à ceux avec des souches de référence.

II. METHODES

II.1. Analyses physico-chimiques du sol

Le sol destiné à l'analyse pédologique a été séché à l'air libre pendant une semaine, puis tamisé à 2 mm de diamètre. La fraction fine obtenue a été soumise à une caractérisation physico-chimiques comportant, le pH, le carbone organique, l'azote total, le calcaire total, le calcaire actif, la conductivité électriques (CE) et la granulométrie.

II.1.1. Mesure du pH

Le pH du sol est déterminé par l'emploi d'un pH-mètre à électrode de verre préalablement étalonné à l'aide des solutions tampons de pH connu. La réaction du sol est déterminée sur une suspension aqueuse dans laquelle le rapport sol/eau = 1/2,5.

Deux mesures de pH ont été déterminées :

- pH_{eau} ou acidité actuelle qui exprime la concentration en ions H^+ dissociés présents dans la solution du sol à un instant donné, en équilibre avec les radicaux qui les ont libérés et avec les autres ions dans le milieu.
- pH_{KCl} ou acidité potentielle qui correspond à la quantité totale des ions H^+ échangeables, capables d'être remplacés par un certain ion métallique (KCl) au fur et à mesure d'une neutralisation.

II.1.2 Dosage du carbone

La teneur du carbone organique du sol est déterminée par la méthode Anne modifiée. Le carbone de la matière organique est oxydé à chaud en CO_2 par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique concentré. L'excès de bichromate de potassium non réduit est titré à froid par une solution réductrice de sel de de Mohr de titre connu en présence du diphenylamine.

Le taux de matière organique du sol est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ MO} = \% \text{ C} \times 1.72$$

II.1.3. Dosage de l'azote total

L'azote total du sol est déterminé par la méthode de Kjeldahl. Cette méthode est basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(NH_4)_2SO_4$ par l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique et en présence d'un mélange catalyseur renfermant du sulfate de cuivre, de sulfate de potassium et de sélénium. L'ammoniac est libéré de sa forme combinée par distillation après alcalisation à l'aide d'une base forte (NaOH), recueilli dans une solution borique, puis dosé en retour par une solution d'acide sulfurique de titre connu.

II.1.4. Dosage du calcaire total

Le calcaire total du sol est déterminé par la méthode gazométrique grâce au calcimètre de Bernard, préalablement étalonné avec des quantités connues de CaCO_3 pur.

Son principe repose sur la propriété du carbonate de calcium (CaCO_3) de se décomposer sous l'action d'un acide (HCl). Le gaz carbonique dégagé est recueilli dans un tube gradué et son volume ainsi facilement mesuré. Le volume de CO_2 dégagé est proportionnel à la quantité de carbonate présent dans le sol.

La teneur en carbonates, exprimée en %, est donnée par la formule suivante :

$$\text{CaCO}_3 (\%) = \frac{P \times v}{p \times V} \times 100$$

Avec :

- P** : poids de CaCO_3 utilisé pour l'étalonnage
- p** : poids de la prise d'essai de sol
- V** : volume de CO_2 dégagé par le poids d'échantillon de sol
- v** : volume de CO_2 dégagé par le poids de CaCO_3 .

II.1.5. Dosage du calcaire actif (Méthode Drouineau Gallet)

La détermination du calcaire actif concerne la fraction la plus fine du calcium des carbonates qui est précipitée par une solution d'oxalate d'ammonium puis un dosage de l'oxalate d'ammonium résiduel par du permanganate de potassium de titre connu en milieu sulfurique.

II.1.6. Mesure de la conductivité électrique

L'échantillon de sol est extrait dans un rapport d'extraction de 1:5 (m/V) avec de l'eau distillée, afin de dissoudre les électrolytes. La conductivité électrique (CE) de l'extrait filtré est mesurée à l'aide d'un conductimètre et exprimée en $\mu\text{S}/\text{cm}$ et le résultat est corrigé à une température de 25°C .

II.1.7. Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique permet de déterminer la texture, en classant par catégorie de diamètre les particules minérales du sol selon l'échelle d'Atteberg. Elle est effectuée par la méthode internationale modifiée par l'emploi de la pipette de Robinson.

La méthode consiste à détruire la matière organique par une attaque à l'eau oxygénée puis dispersions des ions enrobant les particules par l'hexamétopHospHate de sodium sous agitation. Les éléments les plus fins (argiles, limons fins) sont prélevés à la pipette Robinson au cours de la sédimentation suivant la loi de Stockes et les autres (limons grossiers, sables fins et sables grossiers) sont séparés par tamisage.

II.2. Isolement des Bactéries Nodulant *Spartium junceum* L.

L'isolement des bactéries nodulant *Spartium junceum* L. a été effectué en conditions stériles selon la technique de Vincent (1970).

II.2.1. Stérilisation des nodules

Au laboratoire, les racines sont rincées à l'eau courante et les nodules racinaires sont prélevés à 1-2 cm de leur point d'attache. Ils sont ensuite immergés dans de l'éthanol 96% pendant 30 secondes, puis trempés dans une solution d'eau de javel à 5% pendant 3 minutes. Ensuite, ils sont rincés abondamment à l'eau distillée stérile (**Figure 05**)

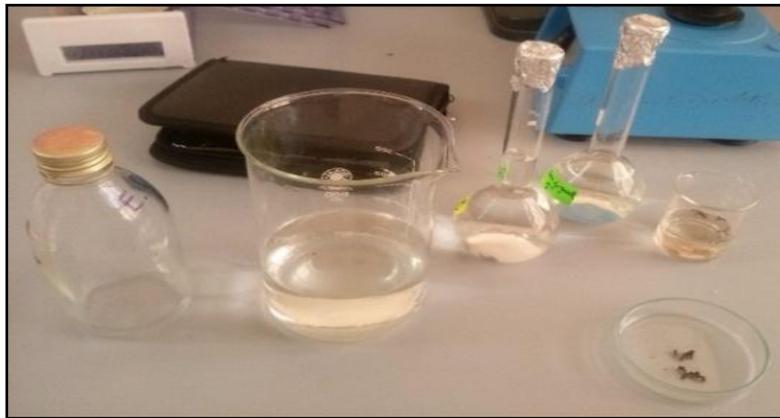


Figure 05 : Stérilisation des nodules.

II.2.2. Extraction des bactéries à partir des nodules

Les nodules désinfectés sont introduits dans un tube eppendorf contenant 0,5 ml d'eau distillée stérile, puis sont écrasés à l'aide d'une tige en plastique stérile, afin de libérer les bactéries et obtenir un broyat qui sert à ensemercer le milieu YMA (**Figure 06**).

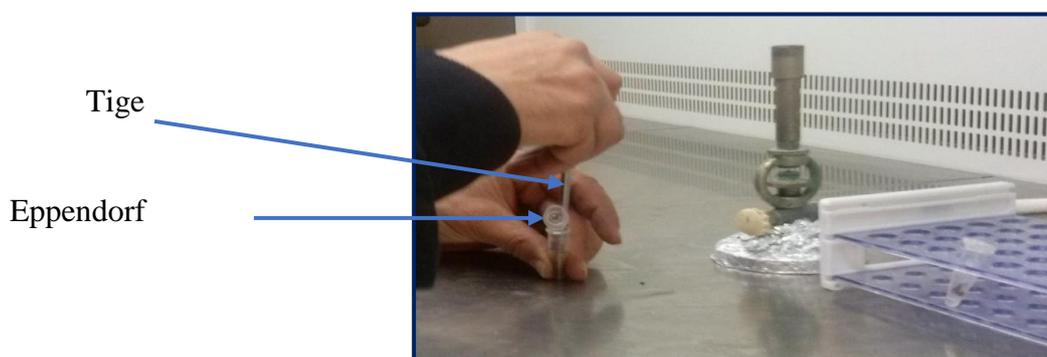


Figure 06 : Ecrasement des nodules.

II.2.3. Isolement des souches et purification des colonies

A l'aide d'une anse de platine, le jus nodulaire obtenu par écrasement, est déposé dans une boîte de Pétri contenant le milieu YMA gélosé, additionné de RC (0,025%) (**Annexe 01**). A partir du dépôt, des stries d'épuisement sont effectuées sur le milieu gélosé. Toutes les boîtes sont scellées avec du Paraffineet mises en incubation pendant une semaine à 15 jours à 28°C.

Les colonies bactériennes bien isolées sont purifiées de nouveau par des repiquages successifs sur d'autres boîtes de Pétri contenant le même milieu YMA gélosé.

II.2.4. Conservation des souches

Les souches ainsi purifiées sont ensemencés sur milieu YMA gélosé en tubes inclinés et incubés à 28°C pendant plusieurs jours, puis conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

Toutes les manipulations sont effectuées sous des conditions microbiologiquement contrôlées, sur des milieux stériles, à proximité du bec Bunsen et sous une hotte à flux lumineaire.

II.3. Test d'authentification

Ce test a pour but principal l'évaluation de la capacité de nos souches à induire de nouveau la formation de nodules sur leur plante hôte d'origine (Vincent, 1970).

II. 2.1. Préparation de plantes axéniques

✓ Stérilisation et pré-germination des graines

Pour lever l'inhibition tégumentaire, les graines de *Spartium junceum* L. sont traitées à l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) pendant 30 min et rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile, puis déposées stérilement dans des boîtes de Pétri en verre stériles, tapissées du papier filtre humidifié avec de l'eau distillée stérile. Les boîtes sont enveloppées avec du papier aluminium et incubées à 25°C à l'obscurité, jusqu'à germination des graines.

✓ Culture en tube

Des jeunes plants de *Spartium junceum* L. obtenus après germination ont été repiqués dans des tubes contenant le milieu Fahraeus dont la composition est indiquée en annexe. Un orifice a été percé sur le papier aluminium qui sert pour introduire la racine des plantules dans le tube et pour l'inoculation de la plantule avec une culture bactérienne. La partie inférieure de tube est recouverte avec du papier aluminium pour éviter toute exposition des racines à la lumière.

✓ **Inoculation des plantules**

L'inoculation des plantules a été réalisée par l'injection de 1 ml d'une suspension bactérienne de chaque souche obtenue sur milieu YMA, après l'ajout de 2ml d'eau physiologique stérile dans chaque tube YMA incliné et agitation.

Les plantes cultivées en tubes ont été placées dans des conditions ambiantes du laboratoire et sous un éclairage supplémentaire fourni par le rayonnement de 2 lampes de 75w et une lampe de néon de 85 w. Les plantules sont examinées chaque semaine afin de suivre l'apparition des nodules sur leur système racinaire, visible grâce à la transparence du milieu Fahraeus (**Figure 07**).



Figure 07:Dispositifs de germination utilisés pour le test de nodulation.

II.4. Identification des bactéries nodulant *Spartiumjunceum* L.

L'identification des bactéries authentifiées par le test de nodulation, a été réalisée à l'aide d'une étude morphologique, biochimique et physiologique.

II.4.1. Caractérisation morphologique

✓ Morphologie des colonies

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu YMA, après 7 jours d'incubation à 28°C. Ce test vise à étudier les caractères suivants : l'aspect, la forme, la couleur, l'élévation, la taille, la mucosité.

✓ Morphologie des bactéries

La mobilité, la forme, la présence des granules de β -hydroxybutyrates ont été mises en évidence effectués par l'observation au microscope photomicrographique ($G \times 100$) à l'état frais d'une suspension bactérienne obtenue sur milieu YMB.

✓ Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer les bactéries dites Gram ⁺ et des bactéries dites Gram ⁻.

La technique consiste à :

Préparer un frottis sur lame de verre, fixé à la chaleur. Couvrir le frottis avec le violet de gentiane et laisser en contact pendant 60 secondes. Couvrir la lame avec la solution d'iode et laisser en contact pendant 30 secondes. Laver soigneusement avec l'eau distillée. Décolorer la lame avec l'éthanol à 95°. Laver immédiatement à l'eau distillée et couvrir le frottis avec la fuchsine (60 secondes). Laver à l'eau distillée et sécher. Examiner le frottis au microscope à un grossissement de 100X.

II.4.2. Caractérisation biochimique (Marchal et al., 1982)

✓ Test de Bleu de bromothymol

Ce test permet de vérifier la capacité d'acidification ou d'alcalinisation des souches. Il se fait sur le milieu YMA + bleu de bromothymol et incubation à 28°C. Le virage du milieu au jaune indique l'acidification du milieu et le virage au bleu indique l'alcalinisation du milieu.

✓ **Production d'indole**

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase ou tryptophane désaminase. Le test est effectué par l'inoculation d'une suspension bactérienne sur le milieu eau peptonée exempt d'indole. Après incubation à 28°C pendant 7 jours, on ajoute 0,5 à 1 ml de réactif de Kovacs à la surface du bouillon.

On agite très légèrement par mouvement rotatif pour faciliter l'extraction. Une réaction positive se caractérise par une coloration rouge cerise en surface du bouillon en moins d'une minute. Par contre une réaction réactive se caractérise par une coloration brunâtre à la surface du milieu.

✓ **Utilisation de Citrate**

Seules les bactéries possédant une citrate perméase peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone. Ce test est effectué par un ensemencement par stries sur la pente du tube contenant le milieu Citrate de Simmons et incubation à 28°C pendant 7 jours.

L'utilisation du citrate provoque un virage au bleu de la pente (réaction alcaline). Une réaction négative se traduit par l'absence de pousse ou une pousse très faible sans changement de couleur du milieu.

✓ **Mise en évidence de la catalase**

Le test consiste à mettre les bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

✓ **Mise en évidence de la β-galactosidase (Test ONPG)**

La β-galactosidase est une enzyme inductible ; elle n'est synthétisée par la bactérie que lorsque celle-ci est en présence de son substrat. La recherche de la β-galactosidase est réalisée sur des disques imprégnés d'un substrat synthétique : l'ortho-nitro-phényl-galactoside (= ONPG) incolore, de structure proche du lactose et capable de pénétrer dans la bactérie sans perméase. Si la bactérie possède la β-galactosidase, on obtient du galactose et de l'orthonitro-phénol de couleur jaune.

✓ **Mise en évidence de la d'oxydase**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Ce test est réalisé sur des disques imprégnés d'un réactif (le

N diméthylparaphénylène diamine). Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air.

✓ **Recherche des décarboxylases (ADH, ODC, LDC)**

Ce test permet de mettre en évidence la présence des enzymes : ADH, ODC et LDC qui catalysent respectivement la décarboxylation de l'arginine, de la lysine et de l'ornithine présent dans le milieu.

A partir des ampoules stériles contenant les milieux LDC, ODC, ADH, 1ml de chaque ampoule est prélevé dans des tubes eppendorff stériles qui sont ensuiteensemencés par 0.2ml des suspensions bactériennes sur milieu YMB. Les tubes sont incubés à 28°C pendant 3 jours.

Une réaction positive se traduit par le jaunissement du milieu.

✓ **La réduction des nitrates**

Ce test permet de mettre en évidence la présence d'une enzyme du métabolisme énergétique : la nitrate réductase. Ce test est effectué par la culture d'une suspension bactérienne dans des tubes qui contiennent le milieu bouillon nitraté. Après incubation à 28°C sous agitation, la réduction des nitrates est mise en évidence par l'ajout des gouttes de réactif NR1 et NR2.

- Si le milieu devient rose ou rouge, les nitrates sont réduits en nitrites : les bactéries possèdent la nitrate réductase positive (NR⁺).
- Si le milieu reste incolore, ajouter un peu de poudre de zinc (réducteur des nitrates), si le milieu devient rouge, il reste des nitrates : nitrate réductase négative (NR⁻), par contre si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, dans ce cas les bactéries ont réduit les nitrates au-delà du nitrite : Nitrate réductase très positive (NR⁺⁺⁺), les bactéries possèdent la nitrate et nitrite réductases

✓ **Recherche de l'acétone et production d'acide**

Ce test est réalisé dans le milieu Clark et Lubs qui permet l'étude de la voie de fermentation du glucose. Les produits de fermentation peuvent être des acides mixtes qui sont mis en évidence par le test RM (Rouge de Méthyle), ou des acétones qui sont mis en évidence par le test VP (Voges-Proskauer).

Le milieu Clark et Lubs réparti en tube estensemencé par une suspension bactérienne. Après incubation à 28°C sous agitation, on ajoute quelques gouttes de réactif de Kovacs. La présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu, alors que l'absence d'indole se traduit par la formation d'un anneau jaunâtre (teinte original de réactif).

✓ **Fermentation du glucose, du lactose, et production de gaz et d'H₂S**

Ce test effectué sur le milieu Kligler-Hajna (KIA) par des cultures à partir de colonies par piqûre centrale et par stries sur la pente de la gélose. Laisser les bouchons légèrement dévissés. La lecture se fait après incubation à 28°C pendant 7 jours.

✓ **Assimilation des sucres**

L'utilisation des sucres comme source de carbone par les bactéries est effectuée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA modifié par l'élimination du Mannitol. Ce dernier a été remplacé à chaque fois par l'un des sucres suivants : Maltose, Mannose, Lactose, Lévuiose, Cellobiose, Glycérol, Arabinose Tréhalose, Raffinose, Galactose et Rhamnose.

Les boîtes sont subdivisées en carrés et chaque carré a étéensemencé en spot à partir des colonies prélevées sur milieu YMA. Les boîtes sont incubées pendant 07 jours à 28°C. L'assimilation de sucres par des souches est évaluée par la présence des colonies bactériennes.

✓ **Galerie API 20 NE**

API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries.

La galerie API 20NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique.

✓ **Sensibilité des souches aux antibiotiques**

C'est un test qui permet de mesurer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Il consiste en l'ensemencement des cultures diluées par inondation sur le milieu Mueller-Hinton. Ensuite appliquer

les disques chargés d'antibiotiques à la surface du milieu. Après une semaine d'incubation à 28°C, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

Les valeurs obtenues sont interprétées selon les valeurs limites du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**Annexe 02**).

II.4.3. Caractérisation physiologique

✓ **Effet du pH sur la croissance bactérienne**

On prépare des bouillons YMB ajustés à des différents pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), les isolats sont mis en culture dans des tubes contenant 10ml de milieu YMB ajusté à des différents pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). La croissance bactérienne est évaluée par lecture de la densité optique (DO) à 570nm, après 7 jours d'incubation sous agitation à 28°C.

✓ **Effet de salinité sur la croissance**

Les isolats bactériens sont mis en culture dans 10 ml du r milieu YMB, additionné de quantités croissantes de NaCl (0 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM et 600 mM). La valeur de la croissance bactérienne est obtenue par lecture de la densité optique à 570nm, après 7 jours d'incubation sous agitation à 28°C.

✓ **Effet de la température sur la croissance**

Les isolats sont mis en culture dans 10ml du milieu YMB et incubés à différentes températures (10°C, 20°C, 30°C et 40°C). La croissance bactérienne est évaluée par lecture de la densité optique (DO) à 570nm, après 7 jours d'incubation sous agitation à 28°C.

II.5. Analyse numérique

Pour estimer le degré de liaison et de regroupement des souches entre elles, ainsi qu'entre les souches et les souches références *Bradyrhizobium melkanii* (USDA76) et de *Bradyrhizobium jaboricum* (USDA 6), les résultats de tous les caractères phénotypiques ont été soumis à une analyse numérique. Cette dernière est basée sur le principe de la Classification Ascendante Hiérarchique(CAH), qui permet de calculer les distances de similarité par le logiciel XLSTAT (2017). Nous avons effectué cette analyse par l'établissement d'une matrice dans laquelle les variables sont codés comme suit : (0) : absence du caractère ou faible ; (1) : présence du caractère ou fort. Les caractères en communs entre les souches ont été exclus car ne sont pas discriminants.

**RESULTATS
ET
DISCUSSIONS**

I. Analyses physico-chimiques du sol d'Ifran

Les résultats de l'analyse physico-chimique du sol prélevé de l'endroit où les nodules de *Spartium junceum* L. ont été récoltés sont présentés dans le (**Tableau II**).

Tableau II : Résultats des analyses physico-chimiques du sol d'Ifran.

Paramètres	Résultats
pH (eau)	8.05
pH (Kcl)	7.40
%C	3.33
%MO	5.72
%N	0.337
%A	33,81
%Lf	11,70
%Lg	6,47
%Sf	18,33
%Sg	29,68
Couleur	2.5YR4/2 (darkgrayishbrown)
Texture	Argilo-sableuse
%CaCO ₃ total	36.36
%CaCO ₃ actif	3.09±0.042
CE (μS/cm) à 25°C	323

Ces résultats montrent que le sol d'Ifran, avec un $pH_{eau}=8.05$ et $pH_{kcl}=7.40$, apparaît légèrement alcalin ; riche en calcaire (36.36%) et en matière organique (5.72) et il présente des teneurs relativement élevées en azote (0.337).

D'après le triangle de texture USDA, le sol d'Ifran a une texture argilo-sableuse, avec des proportions en argiles et en sables respectivement de 33,81% et 48,01%. Ce type de sol présente les propriétés des sols à texture équilibrée.

Les résultats de notre analyse montrent que le sol d'Ifran a une conductivité électrique de (323 $\mu S/cm$ à 25°C), indiquant qu'il est non salé, par conséquent sa salinité n'a pas un effet néfaste appréciable sur le rendement (**Durand J.H. 1983**).

II. Isolement et authentification des souches

Nous avons réalisé une collection de 14 souches bactériennes, isolées des nodules de *Spartium junceum* L. Cependant, l'inoculation successive des isolats à leur plante hôte d'origine, indique que seules 07 souches bactériennes ont pu former des nodules, confirmant leur appartenance à la famille des *Rhizobia* (**Tableau III**).

Tableau III : Résultats du test de nodulation.

Nombre d'isolats total	Nombre d'isolats Nod ⁺	Code des isolats Nod ⁺
14	07	A, B, C D, E, F, J

III. Caractérisation phénotypiques des Bactéries Nodulant *Spartium junceum* L.

Les souches ayant induit la formation des nodules sur leur plante-hôte d'origine (*Spartium junceum* L.), ont été soumis à la caractérisation phénotypique, appuyée par des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.

III.1. Caractéristiques morphologiques des colonies et des cellules

Les résultats du (**Tableau IV**) montrent que les colonies bactériennes ont une forme circulaire à punctiforme, un aspect lisse, de couleur blanchâtre à crème et elles sont toutes bombées avec une taille qui varie entre 1mm et 2mm de diamètre. Elles sont visibles qu'après 7 jours de culture, ceci indique que les bactéries ont un rythme de croissance lent.

Tableau IV: Résultats des analyses morphologique des colonies.

Souches	Caractères					
	Forme	Couleur	Aspect	Elévation	Mucoïdité	Taille (Ø)
A	Circulaire	Blanche	lisse	Peu bombée	/	<1mm
B	Circulaire	Crème	lisse	Bombée	/	1mm
C	Punctiforme	Blanche	lisse	Peu bombée	/	2mm
D	Circulaire	Crème	lisse	Bombée	/	1mm
E	Punctiforme	Crème	lisse	Bombée	/	1a2mm
F	Punctiforme	Transparente	lisse	Bombée	/	2mm
J	Circulaire	Blanche	lisse	Bombée	/	1mm

/ : Non muqueuse

Par ailleurs, l'observation des suspensions bactériennes sous microscope a montré que toutes les souches ont une forme de petits bâtonnets à extrémités arrondies et elles sont mobiles, à Gram négatif et présente des granules de β -hydroxybutyrate (PHB).

III.2.Caractéristiques biochimiques

Les résultats du (**Tableau V**) révèlent que toutes les souches sont catalase et oxydase positive. Elles ont la capacité d'alcalinisation le milieu YMA+ BBT ; par contre elles sont incapables de produire l'indole et l' H_2S . Toutes les souches ont la β -galactosidase sauf les souches A, B, USDA6.

A l'exception des souches A, E et USDA6 qui produisent de l'acétoïne (VP^+) dans le milieu, le reste des souches sont capables d'acidifier le milieu (RM).

Les enzymes décarboxylases (ODC, LDC) sont retrouvées dans la majorité des souches, tandis que l'arginine déshydrogénase (ADH) et l'uréase sont absentes chez toutes les souches.

Tableau V : Résultats des tests biochimiques des souches

Souches	Caractères																
	CAT	BTB	NR	β -gal	RM	VP	Ind	Cit	H ₂ S	Gaz	Lac	Glu	ADH	ODC	LDC	URE	OXD
A	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
B	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
C	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
D	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
E	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
F	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
J	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
USDA6	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
USDA76	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+

CAT : Catalase, **BTB** : Blue de bromothymol, **NR** : Nitrate Réductase, **β -gal** : β -galactosidase, **RM** : Rouge Méthyle, **VP** : Voges Praskaeur, **Ind** : Indole, **Cit** : Citrate, **Lac** : Lactose, **Glu** : Glucose

Comme le montre la (**figure 08**), la réaction positive du test de Bleu de bromothymol (alcalinisation du milieu YMA additionné du bleu de bromothymol) est manifestée par toutes les souches, à l'exception des souches K, R, I. qui ont acidifié le milieu qui devient jaune. Cette réaction présentée par le virage du milieu au bleu foncé indique que les bactéries sont à croissance lente ; caractéristique des *Bradyrhizobium* (EL-Hilali, 2006).

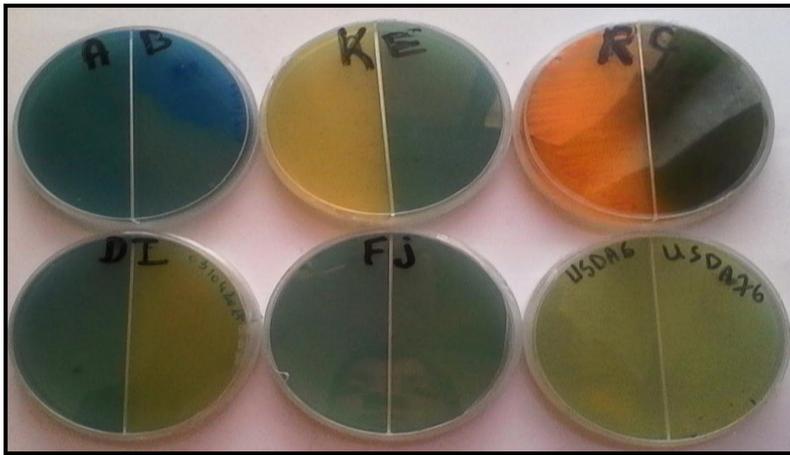


Figure 08 :résultats du test de Bleu de bromothymol

III.3.Caractéristiques biochimiques sur la galerie API 20 NE

20 tests biochimiques ont été réalisés sur les souches étudiées par le système de galerie API 20NE. Les résultats obtenus sont consignés dans le (**Tableau VI**).

Tableau VI: Résultats des tests biochimiques effectués sur la galerie API 20 NE

Souches	NO ₃	TRP	GLU ⁺	ADH	URE	ESC	GEL	ONPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
C	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
E	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
J	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
USDA6	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
USDA76	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

+ : Test positif.

- : Test négatif

GLU⁺ : Glucose fermenté

Il ressort du (**Tableau VI**) que toutes les souches étudiées possèdent un nitrate réductase active. Par contre, elles ne produisent pas d'indole à partir du tryptophane, ni hydrolysent l'arginine, ce qui suggèrent l'absence de l'arginine hydrolase. Les résultats obtenus révèlent aussi qu'aucune souche ne fermente le glucose. Enfin, seules les souches D et USDA6 possèdent l'uréase.

Par ailleurs, les résultats indiquent que la pluparts des souches sont capables d'hydrolyser l'esculine à l'exception de la souche A. De même, l'hydrolyse de la gélatine, révélée par la diffusion du pigment noir, est positive pour toutes les souches à l'exception des souches A, B, C, F et USDA76. Pour le test ONPG, seules les souches C, D, E, F, J et USDA76 possèdent la β -galactosidase

Les résultats des tests d'utilisation des glucides, comme seule source de carbone et d'énergie, montrent que toutes les souches assimilent le N-acetyl-glucosamine, maltose et gluconate sauf la souche A.

Cette dernière n'assimile pas le D-maltose A. Par contre, l'arabinose n'est pas utilisé par les souches A, F et USDA6. L'assimilation de mannose n'est possible que par les souches A et USDA6. Ces dernières n'assimilent pas le glucose. Enfin, le mannitol est assimilé par toutes les souches.

Les tests biochimiques réalisés sur les rhizobia ont été largement étudiés montrant ainsi une diversité de caractères traduisant une variabilité de l'équipement enzymatique des souches de rhizobia étudiées.

III.3.1. Assimilation des sucres

Les résultats du (**tableau VII**) montrent le degré d'utilisation des sucres diffère d'une souche à l'autre. On remarque que le lévulose est assimilé par toutes les souches. La souche de référence (USDA76) assimile tous les sucres testés sauf le lactose.

Aussi on note que le Maltose est assimilé par toutes souches sauf la souche A. L'Arabinose n'est pas assimilé par les souches A, F et USDA6. Le Galactose n'est utilisé que par les souches B, C, D, E et USDA76 ; alors que seules les souches A et USDA6 n'utilisent pas le Mannose. Le Rhamnose est assimilé par les souches de référence. Le Trissaccharide (Raffinose) est assimilé uniquement par les souches A, B et les 2 souches de référence (USDA6 et USDA76). Enfin, le Glycérol n'est pas assimilé par les souches B et C.

Tableau VII: Assimilation des sucres par les bactéries nodulant *Spartium junceum* L.

Souches	A	B	C	D	E	F	J	USDA6	USDA76
Pentoses									
Arabinose	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Hexoses									
Galactose	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Mannose	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Lévulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Dissaccharides									
Cellobiose	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tréhalose	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Trissaccharides									
Raffinose	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Polyalcools									
Glycérol	+	-	-	+	+	+	+	+	+

(+): assimilation. (-) : pas d'assimilation

III.3.2. Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de la sensibilité des souches aux antibiotiques, déterminée selon l'échelle donnée par la Société Française de Microbiologie, sont consignés dans le (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Résultats des analyses de la résistance aux antibiotiques.

Antibiotiques	Souches								
	A	B	C	D	E	F	J	USDA6	USDA76
Tétracycline ₃₀	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ampiciline ₁₀	+	+	-	-	-	-	-	+	+
acide Nalidixique ₃₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamycine ₃₀	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Gentamicine ₁₀	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Peniciline ₁₀	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tobramycine ₁₀	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Cefotaxime ₃₀	+	-	+	-	+	-	-	-	+
Erythromycine ₁₅	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Oxaciline ₁	+	+	+	+	+	-	-	-	+

(+): Résistante

(-): Sensible

Toutes les souches sont sensibles à l'acide Nalidixique. La souche F est sensible aux différents antibiotiques testés. Par contre, la souche USDA76 est résistante à tous les antibiotiques testés, sauf à l'acide Nalidixique et la Tobramycine. Toutes les souches sont sensibles à la Tétracycline, Gentamicine, Pénicilline et Erythromycine à l'exception de la souche USDA76.

Seules les souches J, USDA6 et USDA76 sont résistantes à la Kanamycine. La majorité des souches sont sensibles à la Tobramycine, à l'exception de la souche J.

Il ya lieu de noter que les souches A, C, E, USDA76 présentent une résistance au Céfoltaxime ; tandis que les souches F, J, USDA6 sont sensibles à l'Oxacilline.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que la résistance ou la sensibilité aux antibiotiques diffèrent d'une souche à l'autre. En effet, il a été rapporté que le degré de la résistance peut varier d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce. (Shishido et Pepper, 1990 ; Odee et al., 1997).

III.4. Caractéristiques physiologiques

III.4.1. Effet de la salinité

La (Figure 09) nous indique l'influence de différentes concentrations de NaCl sur la croissance bactérienne.

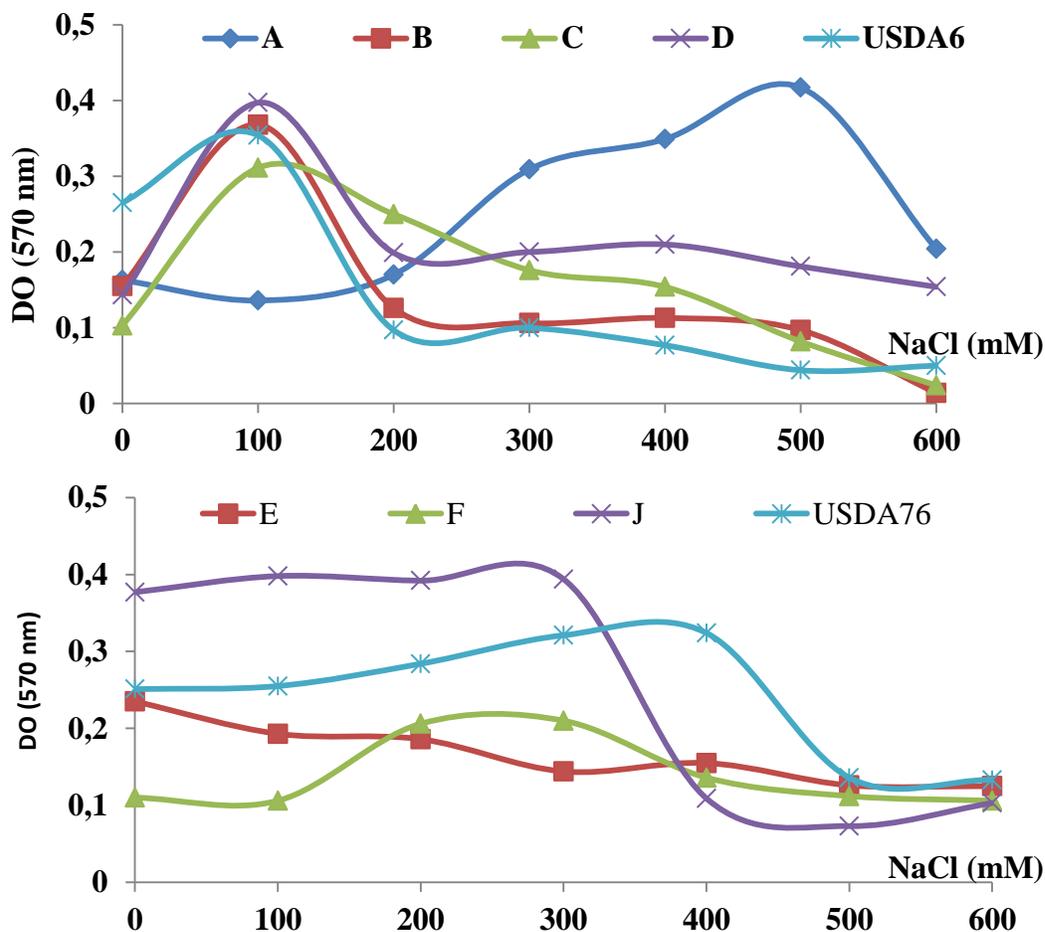


Figure 09 : Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Les courbes de croissance de toutes les souches présentent presque la même allure. Cependant, une grande variabilité dans les réponses des souches aux différentes concentrations de NaCl a été observée. En effet, les souches B, C, D, J et la souche de référence (USDA6) présentent un optimum de croissance à 100mM de NaCl, tout en restant tolérantes aux concentrations allant jusqu'à 400mM. Au-delà de cette concentration, la croissance de ces souches diminue progressivement pour s'annuler aux concentrations supérieures à 500mM. Les souches USDA76 et A présentent un optimum de croissance respectivement à 400mM et 500mM de NaCl et que la souche A ne semble pas être affectée par les concentrations élevées en NaCl, elle présente une croissance relativement stable jusqu'à 600 mM.

La souche F présente une croissance optimale à 200mM et semble tolérer des concentrations élevées allant jusqu'à 500mM.

La tolérance des souches A, F et USDA 76 à la salinité serait due selon **Zahran (1999)** à leur faculté de synthèse d'osmoprotecteurs endogènes tel que la glycine-bétaïne.

III.4.2. Effet du pH

La (Figure 10) indique l'effet du pH sur la croissance des bactéries isolées des nodules racinaires de *Spartium junceum* L.

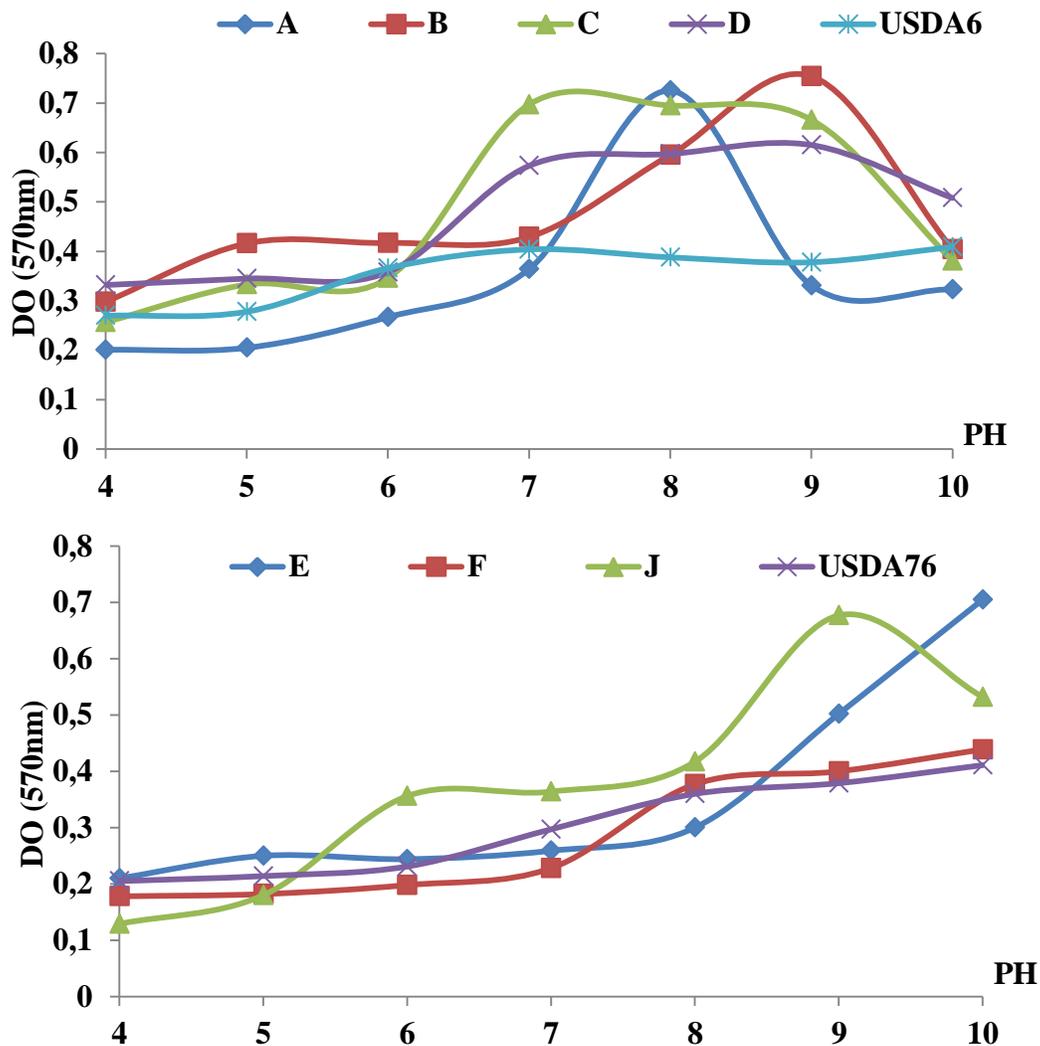


Figure 10 : Effet du PH sur la croissance bactérienne

L'optimum de croissance de la plupart des souches testées se situe entre pH 7 et 9. La souche E présente un optimum de croissance à pH 10. Elles ont par contre une croissance faible à pH 4.

D'après les résultats obtenus, la plupart des souches étudiées tolèrent plus les milieux basiques que les milieux acides. La tolérance des souches à l'alcalinité du milieu serait due au fait qu'elles proviennent toutes des sols légèrement alcalins à alcalins.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Yadav et Vyas (1973) et Jordan (1984)** qui ont rapporté que les souches à croissance lente (*Bradyrhizobium*) ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 alors qu'elles sont sensibles aux pH acides.

III.4.3. Effet de la température

La plupart des souches présentent une croissance optimale à 30°C (**figure 11**), à l'exception les souches E, J qui présentent un optimum de croissance à 20°C.

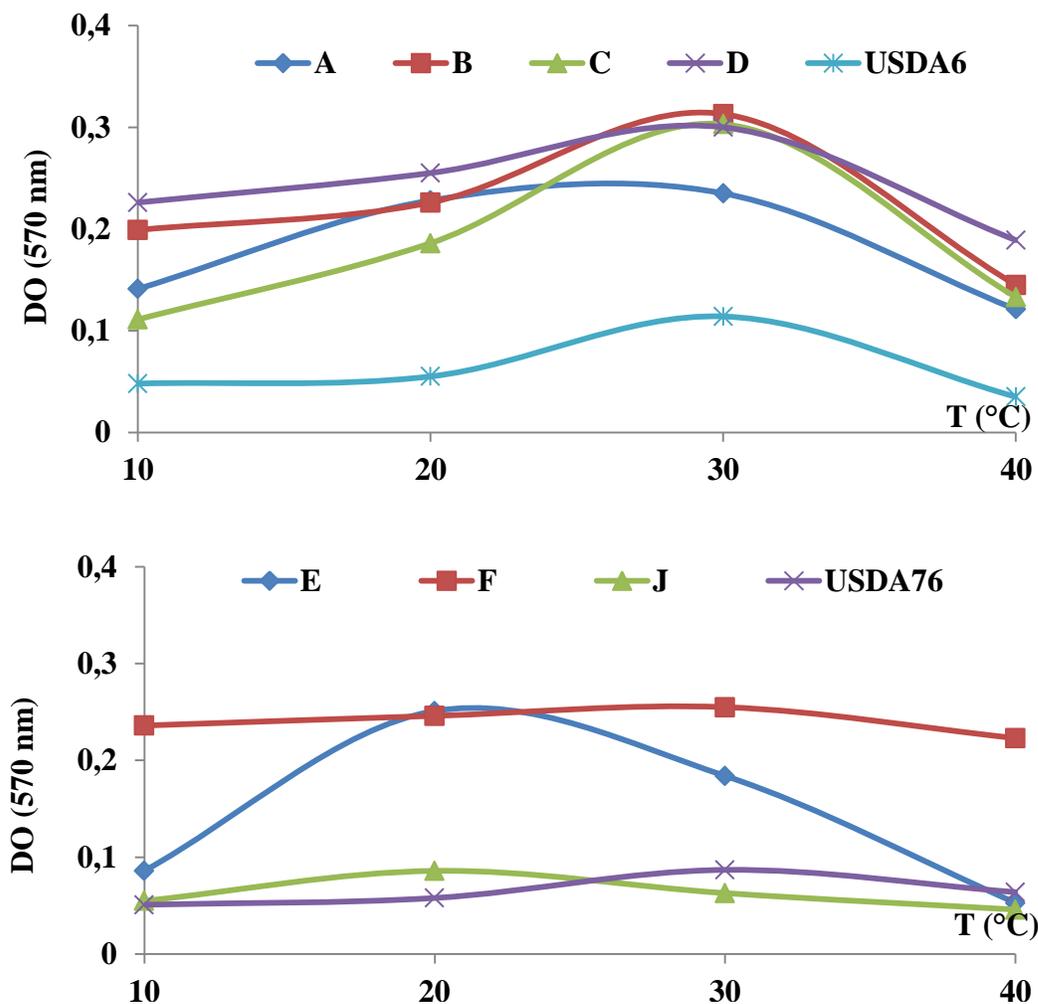


Figure 11 : Effet de la température sur la croissance bactérienne

Les souches B, D et F présentent une bonne croissance à 10°C et que les autres souches, au contraire sont fortement affectées dès que la température dépasse 30°C.

Il y a lieu de remarquer que les deux souches J et F garde presque la même allure de croissance dans les différentes températures

L'influence des bases températures sur la croissance et la survie des BNL a été étudiée, Pour la plupart des BNL, l'intervalle de température de croissance est de 28-30 °C, et beaucoup sont incapables de pousser à 37 °C (Zahran, 1999).

III.5. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique

L'analyse numérique a été réalisée à partir de 54 caractères phénotypiques. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été groupés dans une matrice, puis traités par une CAH, basée sur le calcul de l'indice de similarité de Gower. Le dendrogramme qui dérive de cette analyse est représenté par la (Figure 12).

A une distance de similarité de 3.5, les souches bactériennes isolées des nodules racinaires de *Spartium junceum* L. se répartissent en quatre clusters bien distincts.

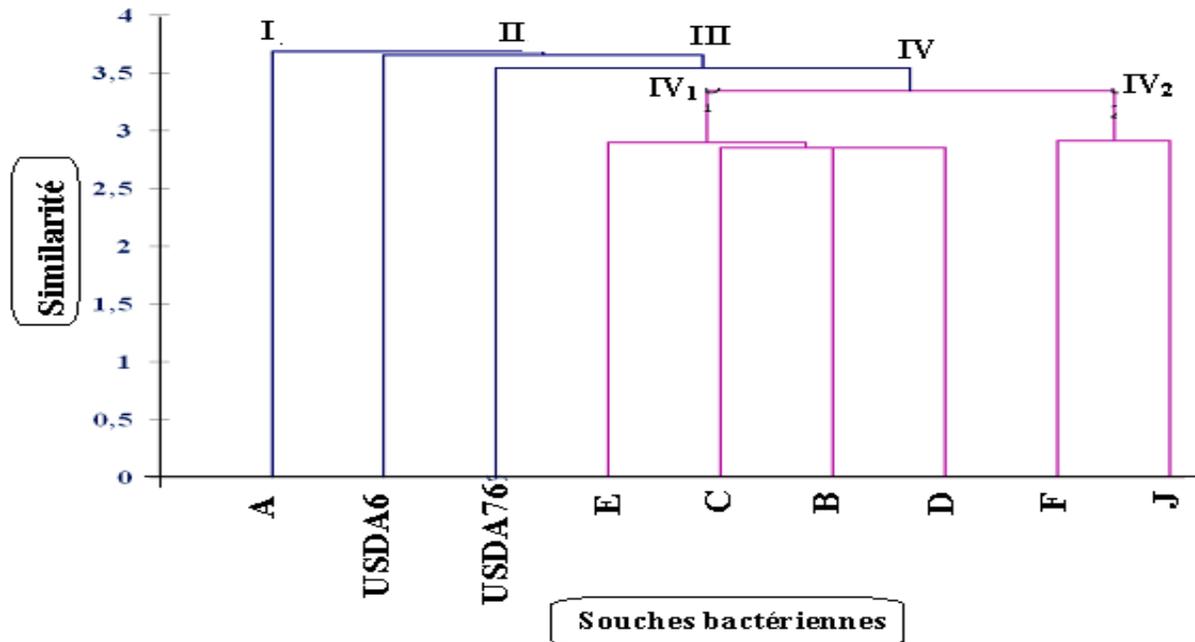


Figure 12 : Dendrogramme indiquant les similarités phénotypiques entre les souches nodulantes *Spartium junceum* L.

Le cluster I est constitué exclusivement de la souche A. Les clusters II et III regroupent successivement les souches de référence *Bradyrhizobium japonicum* (USDA6) et *Bradyrhizobium elkani* (USDA76). Le dernier cluster IV est principalement composé de la majorité des souches

isolées des nodules de *Spartium junceum* L. ; lui-même est subdivisé en deux sous-clusters : sous-cluster (IV₁) et sous-cluster (IV₂).

Le 1^{ère} sous-cluster (IV₁) englobe les souches E, C, B, D qui partagent 19 caractères en communs sur l'ensemble des caractères étudiés. Ces souches sont capables d'hydrolyser, possèdent la Lysine décarboxydase. Elles utilisent N-acétylglucosamine, Gluconate, Maltose, Mannose, l'Arabinose, Glucose, Galactose, Cellobiose et Tréhalose comme sources de carbone. Par contre elles n'utilisent le Rhamnose, Elles sont sensibles à l'Erythromycine, Tobramycine, Pénicilline, Gentamycine, Kanamycine et Tétracycline, mais elles sont toutes résistantes à l'Oxaciline. Enfin, ces souches elles n'assimilent pas l'acide phénylacétique.

Le sous-cluster (IV₂) quant à lui comporte seulement deux souches F et J. qui partagent 24 caractères en communs. Ces souches sont incapables de produire du gaz, elles possèdent toutes une uréase et une β -galactosidase, mais pas la nitrate réductase et elles sont capables d'acidifier le milieu (RM⁺). Elles sont sensibles à la pénicilline, gentamycine, tétracycline, érythromycine, ampicilline, cefotaxine et l'oxaciline. Elles assimilent le mannose, N-acétylglucosamine, maltose, Gluconate et glucose par contre elles n'utilisent pas le rhamnose, galactose, cellobiose, lactose, tréhalose et raffinose comme sources de carbone et d'énergie. Enfin, elles sont sensibles à la température de 40°C.

Les résultats du dendrogramme (**Figure 12**) montrent une diversité entre les souches isolées du même site et également par rapport aux souches de références. En effet, le cluster IV, contenant la majorité des souches isolées des nodules de *Spartium junceum* L., montre plus de rapprochement avec les clusters II et III formés de souches de référence, par rapport au cluster I composé uniquement de la souche A, ce qui laisse entrevoir, sous réserve d'autres tests, un fort rapprochement des souches du cluster IV au genre *Bradyrhizobium*.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Notre présente étude est une contribution à la connaissance de la biodiversité des bactéries symbiotiques de *Spartium junceum* L. dans le cadre de la réhabilitation des sites dégradés.

Dans ce travail nous avons pu isoler des Bactéries Nodulant la légumineuse (*Spartium junceum* L.) récoltée du site d'Ifran ; situé dans la région Ouest de Bejaia.

Le sol du site d'Ifran se caractérise par une texture argilo-sableuse, légèrement alcalin, riche en calcaire et en matière organique, avec une CE moyenne.

Une collection de 14 isolats issus des nodosités fraîches de *Spartium junceum* L. a été réalisée. Toutefois, le test de nodulation simple montre que seuls 7 isolats induisent à nouveau la formation des nodules visibles sur les racines de leur plante hôte d'origine.

L'étude des caractères phénotypiques a permis, d'une part, de déterminer le niveau de variabilité morphologique entre les 07 souches isolées à partir des nodules de *Spartium junceum* L. et d'autre part, d'évaluer le comportement de la croissance bactérienne de ces isolats aux différentes conditions environnementales.

L'étude phénotypique, basée sur l'analyse des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques a montré que les souches isolées sont de petits bâtonnets, mobiles et à Gram-.

Elles présentent une grande diversité morphologique et physiologique sur le milieu de culture YEM. Elles développent des colonies punctiformes, visibles après plus d'une semaine de culture à 28°C.

Les caractères physiologiques ont révélé une diversité de réponse des bactéries vis-à-vis des facteurs testés à savoir la température, le pH et la salinité. La température optimale de croissance pour l'ensemble des souches est située entre 28°C et 30°C. Elles tolèrent les pH basiques que les pH acides ; elles présentent des optima de croissance situés entre pH 7 et pH 9. La plupart des isolats ne tolèrent pas la salinité au-delà de 100 mM de NaCl.

Les souches étudiées présentent une grande aptitude à assimiler les sucres comme source de carbone avec une variabilité d'assimilation qui diffère d'une souche à l'autre. La réponse aux antibiotiques est différente d'une souche à l'autre et ce caractère semble être discriminatif.

Enfin, l'analyse numérique, basée sur la CAH des caractères phénotypiques, a réparti les souches bactériennes dans quatre clusters distincts dont un cluster est composé de la majorité des souches isolées des nodules de *Spartium junceum*, proches de souche de la référence *Bradyrhizobium elkani* (USDA76).

En perspective, cette étude de caractérisation phénotypique devra être soutenue par des techniques de biologie moléculaire (hybridation ADN/ADN, séquençage de l'ADNr 16S et des gènes de ménage : *glnI*, *recAdu*) afin de situer avec précision le statut taxonomique de nos souches.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Ainouche, A., Bayer, R. J., Cubas, P. et Misset, M. T. 2003. Phylogeny relationship within tribe Genisteae (Papilionoideae) with special reference to genus *Ulex*. In: B. B. Kligtgaard et A. Bruneau, Advance in Legume systematics part 10, Higher Level Systematics: 239-252. *Royal Botanic Gardens*, Kew, London.

Allen, O.N. and Allen, E.K., 1981. The *Leguminosae*: a source book of characteristics, uses and nodulation. London & Basingstoke: MacMillan Publ. Ltd. lxiv, 812p.-illus. En Icones. Geog, pp. 1-7.

Ardley, J.K., Reeve, W.G., O'hara, G.W., Yates, R.J., Dilworth, M.J. and Howieson, J.G., 2013. Nodule morphology, symbiotic specificity and association with unusual rhizobia are distinguishing features of the genus *Listia* within the southern African crotalarioid clade *Lotononis* sl. *Annals of botany*, p.mct095.

Bianco, L., 2014. Rhizobial infection in *Adesmia bicolor* (Fabaceae) roots. *Archives of microbiology*, 196(9), pp.675-679.

Bischof, S. and Kovačević, Z., 2013. Parts of the plant. *From Weed to Fabric, Faculty of Textile Technology. University of Zagreb, Zagreb*, pp.25-38.

Bourguignon, C. et Bourguignon, L., 2008. Le sol, la terre et les champs: pour retrouver une agriculture saine. Lulu. P68-83

Briat, J.F. et Job, D., 2017. Les sols et la vie souterraine: Des enjeux majeurs en agroécologie. Quae. P.149

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

Burdass, D., 2002. Rhizobium, Root Nodules and Nitrogen Fixation. In *Society for General Microbiology*.

Cardinale, M., Brusetti, L., Lanza, A., Orlando, S., Daffonchio, D., Puglia, A.M. and Quatrini, P., 2010. Rehabilitation of Mediterranean anthropogenic soils using symbiotic wild legume shrubs: plant establishment and impact on the soil bacterial community structure. *Applied soil ecology*, 46 (1), pp. 1-8.

Cardoso, D., Pennington, R.T., De Queiroz, L.P., Boatwright, J.S., Van Wyk, B.E., Wojciechowski, M.F. and Lavin, M., 2013. Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *South African Journal of Botany*, 89, pp.58-75

- Cristofolini, G. et Feoli-Chiapella, L. 1977.** Serological systematics of the tribe Genisteae (Fabaceae). *Taxon* **26**: 43-56.
- Czernic, P., Gully, D., Cartieaux, F., Moulin, L., Guefrachi, I., Patrel, D., Pierre, O., Fardoux, J., Chaintreuil, C., Nguyen, P. and Gressent, F., 2015.** Convergent evolution of endosymbiont differentiation in dalbergioid and inverted repeat-lacking clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. *Plant physiology*, *169*(2), pp.1254-1265.
- Daniere, C., Capellano, A. and Moiroud, A., 1986.** Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'*Alnus incana* (L.) Moench. *Acta oecologica. Oecologia plantarum*, *7*(2), pp. 165-175.
- Downie, J.A., 2014.** Legume nodulation. *Current Biology*, *24*(5), pp.R184-R190.
- Durand J.H. 1983.** Les sols irrigable, Etude pédologique. Ed. Département de géographie de l'université de Paris – Sorbonne, 389p.
- EL-Hilali. 2006.** la symbiose rhizobium.-lupin : biodiversitédes microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de Doctorat. Université MohammedV- Agdal. Faculté des sciences, Maroc. 205p.
- Food & Agriculture Organisation., 1992.** Fiche technique fixation d'azote légumineuse/rhizobium
- Franco, A. A. et S. M. De Faria 1997.** The contribution of N₂ fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem.* *29*: 897-903..Faria, S.D.,
- González-Sama, A., Lucas, M.M., De Felipe, M.R. and Pueyo, J.J., 2004.** An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytologist*, *163*(2), pp.371-380.
- Hageman, R. H. 1984.** Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. In. Nitrogen in crop production. ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, 67-85.
- Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. Ed DeBoek et Larcier S.a, Paris. 514P
- Huda, MS, Drzal, LT, Ray, D, Mohanty, AK & Mishra, M 2008.** Natural-fiber composites in the automotive sector. in *Properties and Performance of Natural-Fibre Composites*. Elsevier Inc., pp. 221-268.

- Jordan D. C. 1984.** Genus I, Rhizobium. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. ed. Holt, J.G. & Kreig, N. R. pp. 235- 242. London; Williams & Wilkins Co.
- Käss, E. et Wink, M. 1995.** Molecular phylogeny of the Papilionoideae (family Leguminosae):*rbcL* gene sequences versus chemical taxonomy. *Botanica Acta* **108**: 149-162.
- Kovačević, Z., Vukušić, S.B. and Zimniewska, M., 2012.** Comparison of Spanish broom (*Spartium junceum* L.) and flax (*Linum usitatissimum*) fibre. *Textile Research Journal*, 82(17), pp.1786-1798.
- Kovačević, Z.; Krnčević, M.; Katović, A.; Katović, D., 2010.** Brnistra – zaboravljena tekstilna sirovina, *Tekstil* (9): 410-421.
- Lamaze, T.; S. Khamis; C. Foyer; J. Farineau,; M. H. Valadier et J. F. Morot-Gaudty 1990.** Effet d'une limitation en N sur la photosynthèse chez le maïs. In : Physiologie et production du maïs. INRA, Paris, 113-121.
- Layzell, D. B 1990.** N₂ fixation, NO₃⁻ reduction and NH₄ assimilation. In: Plant physiology, biochemistry and molecular biology. D. T. Denis and D. H. Turpin (Eds), Longman Scientific & Technical, Singapore, 389-413.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F. and Truchet, G., 1990.** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344(6268), p.781.
- Lewis, G.A.; Schrire, B.B.; Mackinder, B.C.; Lock, M.D, 2005.** Legumes of the World; Kew: Royal Botanic Gardens, London, UK,
- Lewis, G.P., Sprent, J.I. and Sutherland, J.M., 1989.** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist*, 111(4), pp. 607-619.
- Lindemann, W.C. et Glover, C.R., 2003.** Nitrogen Fixation by Legumes. [En ligne]. <http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec10/lindemann.html> (page consultée le 30 janvier 2013).
- LPWG, 2013.** Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62(2), pp.217-248.

- Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, Cl., 1982.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Biologie appliquée* collection publiée sous la direction de A. Oubé, R. Buttiaux. doin éditeurs-Paris. 459 pages.
- Moreira, F., Viedma, O., Arianoutsou, M., Curt, T., Koutsias, N., Rigolot, E., Barbati, A., Corona, P., Vaz, P., Xanthopoulos, G. and Mouillot, F., 2011.** Landscape–wildfire interactions in southern Europe: implications for landscape management. *Journal of environmental management*, 92(10), pp.2389-2402.
- Ndoye, I., 1999.** Caractérisation taxonomique des bactéries fixatrices d'azote nodulant *acacia nilotica* var. *andansonii* et var. *tomentosa* (mimosoideae, sous famille des acacieae). *Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier (France)*. P.1
- Odee, D.W., Sutherland, J.M., Makatiani, E.T., McInroy, S.G. and Sprent, J.I., 1997.** Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil*, 188(1), pp.65-75.
- Okubo, T., Fukushima, S. et Minamisawa, K., 2012.** Evolution of Bradyrhizobium–Aeschynomene Mutualism: Living Testimony of the Ancient World or Highly Evolved State?. *Plant and Cell Physiology*, 53 (12), pp. 2000-2007.
- Oldroyd, G.E. et Downie, J.A., 2008.** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, pp.519-546.
- Pardo, C., Cubas, P. et Tahiri, H. 2008.** Genetic variation and phylogeography of *Stauracanthus* (Fabaceae, Genisteae) from the Iberian Peninsula and northern Morocco assessed by chloroplast microsatellite (*cpSSR*) markers. *American Journal of Botany* 95: 98-109.
- Parniske, M. et Downie, J.A., 2003.** Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature*, 425(6958), pp.569-570.
- Partanen, A., Carus, M., 2016.** Wood and natural fiber composites current trend in consumer goods and automotive parts. *Reinf. Plast.* 60, 170–173
- Poulikidou, S., Jerpdal, L., Bjorklund, A., Akermo, M., 2016.** Environmental performance of self-reinforced composites in automotive applications – case study on a heavy truck component. *Mater. Des.* 103, 321–329

- Prieto I, Armas C, Pugnaire FI 2012.** Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytol* 193:830–841
- Quatrini P., Scaglione G., Cardinale M., Caradonna F. et Puglia A.M., 2002.** Bradyrhizobium sp. Nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology*. 92 :13-21
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. 2007.** Biologie végétale. 2e édition. Edition de boeck. Paris France. pp 653-660
- Requena N, Pe´rez-Solis E, Azco´n-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM 2001.** Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 67:495–498.
- Rodríguez-Echeverría, S. and Pérez-Fernández, M.A., 2003.** Soil fertility and herb facilitation mediated by *Retama sphaerocarpa*. *Journal of Vegetation Science*, 14 (6), pp.807-814.
- Roger P., 1996.** La fixation biologique de l’azote: quelles potentialités pour le développement ? Conférence débat de l’ORSTOM. Paris Xe France
- Saxena, M. C. 1990.** Status of chickpea in the Mediterranean basin. *Options Méditerranéennes - Séries Séminaires*. N°9: 17 - 24.
- Shishido, M. and Pepper, I.L., 1990.** Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(1), pp.11-16.
- Sindhuphak, A., 2007.** Bioproducts of automotive accessories: rethinking design materials through corn starch, sugarcane and hemp. *KMITL Sci. Tech. J.* 7, 160–170.
- Smil, V., 2002.** Nitrogen and food production: proteins for human diets. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), pp.126-131.
- Sprent, J.I., Ardley, J. et James, E.K., 2017.** Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist..* Volume 215, pp 40–56
- Sprent, J.I., Ardley, J.K. et James, E.K., 2013.** From North to South: a latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany*, 89, pp.31-41.

Stevenson, J. F 1986. Cycles of soil. *carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley & Sons, New York.

Tourte, Y., Bordonneau, M., Henry, M. and Tourte, C., 2005. Le monde des végétaux: organisation, physiologie et génomique. Edition : Dunod.

Valladares, F., Zaragoza-Castells, J., Sánchez-Gómez, D., Matesanz, S., Alonso, B., Portsmouth, A., Delgado, A. and Atkin, O.K., 2008. Is shade beneficial for Mediterranean shrubs experiencing periods of extreme drought and late-winter frosts?. *Annals of Botany*, 102(6), pp. 923-933.

Van Der Heijden, M.G., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., Van Logtestijn, R. and Staehelin, C., 2006. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), pp.178-187.

Voisin, A.S., Salon, C., Munier-Jolain, N.G. and Ney, B., 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum L.*). *Plant and Soil*, 243 (1), pp.31-42.

Wang, D., Yang, S., Tang, F. and Zhu, H., 2012. Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism. *Cellular microbiology*, 14(3), pp.334-342.

Werner, D., 1992. *Symbiosis of plants and microbes*. Chapman & Hall. Germany. Burton 1985

Yadav, N.K. and Vyas, S.R., 1973. Salt and pH tolerance of Rhizobia. *Folia microbiologica*, 18(3), pp.242-247.

Zahran, H.H., 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), pp.968-989.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B. and De Lajudie, P., 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), pp.380-395.

ANNEXES

Annexes 01

1. Milieux de culture utilisés pour la croissance des rhizobia

1.1. Milieu YMA (Yeast Manitol Agar) en g/l (Vincent., 1970)

Compositions

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ ,7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Agar.....	15g
Eau distillée, qsp.....	1000ml
Ph ajusté à 6,8	

1.2. Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent., 1970).

Compositions

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ ,7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Eau distillée, qsp.....	1000ml
Ph ajusté à 6,8.	

1.3. Milieu YMA+ Rouge Congo en g/l

Compositions

YMB1000 ml

Solution stock de Rouge Congo..... 10 ml

Agar..... 18g

pH 6.8 .Autoclavage 120 °C pendant 20 min Après l'ajustement de pH on ajoute 10 ml de Rouge Congo (0.25 g Rouge Congo dans 100 ml d'eau distillé) puis on ajoute l'agar.

1.4. Milieu YMA+ BTB (bleu de Bromothymol) en g/l

Compositions

YMB..... 1000ml

Solution stock de bleu de Bromothymol....5ml

Agar..... 15g

pH 6.8 Autoclavage 120°C pendant 20minutes Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de Bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

2. Milieux de culture utilisés pour les plantes

2.1. Milieu de Fahraeus

✓ Macroéléments :

KH₂PO₄.....0,2g

NaH₂PO₄.....0,3g

CaCl₂.....0,2g

MgSO₄.....0,427g

Citrate de fer 0.005g

Eau distillée.....1000ml

✓ **Microélément stock1 :**

H₃PO₃.....2.86g

MnSO₄(H₂O).....2.08g

ZnSO₄(7H₂O).....0.22g

CuSO₄(5H₂O).....0.08g

Na₂MO O₄.....0.11g

Eau distillée.....1L

Agiter 1ml de stock 1 à la solution Macroéléments

Ph ajusté à 6,8

Annexe 02

Tableau des valeurs limites du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Antibiotiques	Charge de disque µg	Diamètres (mm)	
		DS	D R
TETRACYCLINE ₃₀	30	≥19	<17
AMPICILINE ₁₀	10	≥ 19	< 14
ACIDE ALIDIXINE ₃₀	30	≥ 20	< 15
KANAMYCINE ₃₀	30	≥ 17	< 15
CENTAMICINE ₁₀	10	≥ 16	< 14
PENICLINE ₁₀	10	≥ 29	< 8
TOBRAMYCINE ₁₀	10	≥ 16	< 14
CEFOTAXILE ₃₀	30	≥ 21	< 15
ERYTHROMYCINE ₁₅	15	≥ 22	< 17
OXACILINE ₁	1	≥ 20	< 20

Isolement et caractérisation phénotypique des bactéries nodulantes *Spartium junceum* L.

Résumé

Parmi 14 souches bactériennes isolées des nodules racinaires de la légumineuse du genre *Spartium junceum* L, récoltée de la station d'Ifran, de la région de Bejaïa, 07 souches seulement ont pu former des nodules sur leur plante-hôte d'origine, confirmant leur appartenance au *Rhizobia*.

Après une série de tests morphologiques, biochimiques, physiologiques, appuyée par une analyse numérique fondée par une CAH, a permis de répartir les souches en quatre groupes distincts dont la plupart sont liées à la souche de référence *Bradyrhizobium elkani* (USDA76).

Les mots-clés : Caractérisation phénotypique, BNL, *Spartium junceum* L.,

Abstract

Among 14 bacterial strains isolated from the root nodules of the legume *Spartium junceum* L harvested from the Ifran plant in the Bejaia region, only 7 strains were able to form nodules on their host plant of origin, confirming Belonging to the *Rhizobia* family.

After a series of morphological, biochemical and physiological tests, supported by a numerical analysis based on a CAH, the strains were divided into four distinct groups, most of which are linked to the reference strain *Bradyrhizobium elkani* (USDA76).

Key Word: Caractérisation phénotypique, BNL, *Spartium junceum* L.,

ملخص

من بين 14 سلالة بكتيرية معزولة من العقد الجذرية للبقوليات من نوع *Spartium junceum* L من محطة إفران منطقة بجاية, فقط 07 سلالات لها القدرة على تكوين عقد على النبتة الأصلية المضيفة مثبتة انتماءها لعائلة *Rhizobia*.

بعد سلسلة من الاختبارات المظهرية، البيوكيميائية والفيزيولوجية المعتمدة على التحليل الرقمي المعتمد التصنيف التصاعدي الهرمي الذي يسمح بتوزيع السلالات إلى أربع مجموعات معظمها مرتبطة بالسلالة المرجعية *Bradyrhizobium elkani* (USDA76).

الكلمات المفتاحية: التشخيص الظاهري, BNL, *Spartium junceum* L.