

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 et de l'Environnement  
Laboratoire d'Ecologie Microbienne



**MÉMOIRE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**MASTER**

**Option : Environnement et Santé Publique**

*Thème*

**Contribution à l'étude des bactéries  
endosymbiotiques à intérêt  
environnemental**

**Soutenue le: 19 /06/2017**

**Réalisé par :**

M<sup>elle</sup> khidour Dallal

M<sup>elle</sup> Messaoudi Nour El Houda

**Membres du Jury :**

Présidente : M<sup>me</sup> Djouad Salima

Examineur : M<sup>r</sup> Kacel Ahmed

Promotrice : M<sup>me</sup> Boulila Farida

Co-promotrice : M<sup>elle</sup> Salmi Adouda

**Année Universitaire : 2016 / 2017**

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*Aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie et qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études.*

*À mon très cher père qui a toujours été là pour moi et mes frères et sœur, à nous aider et conseiller pour choisir toujours le bon chemin à suivre.*

*À ma noble mère, cette grande et douce amie qui a toujours su garder le sourire et me reconforter même dans les moments les plus difficiles.*

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

*À ma très cher sœur : Hasna ;*

*À mes très chers frères : Mohamed Amine et Chams Eddine "Oussama" ;*

*À Nour el Houda, ma très chère binôme et amie pour toute sa patience, sa compréhension et sa bonne humeur.*

*À toute la promotion d'Environnement et santé publique 2016/2017.*

***Dallal***

A close-up photograph of several vibrant pink roses in full bloom, with some buds still forming. The petals are layered and show a gradient of pink colors. The background is softly blurred, focusing attention on the flowers.

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes très chères parents, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie, qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études.*

*À mes très chères sœurs : Fatima,*

*(À la mémoire de moi Amel que Dieu ait son âme).*

*À mes frères : Elomri, Abd El wahab, Kaddour.*

*À mes belles soeurs : Mabrouka et Noura.*

*À Dallal, ma très chère binôme et amie pour toute sa patience, sa compréhension et sa bonne humeur.*

*À toutes mes amies sans exception.*

*À tous ceux qui ont une place dans mon cœur.*

***Nour El Houda***



# Remerciements

*Nous remercions avant tous Allah de nous avoir donné la volonté et la santé et la patience pour faire ce travail.*

*Nos vifs remerciements sont adressés aux membres de jury : M<sup>me</sup> Djouad Salima et M<sup>r</sup> Kacel Ahmed pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger notre travail.*

*Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude ainsi que notre plus grand respect à notre Promotrice M<sup>me</sup> Boulila Farida pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de nous encadrer, pour son accueil au sein de son laboratoire ainsi que pour ses recommandations et ses conseils qui ont beaucoup enrichi notre recherche.*

*Nous remercions particulièrement notre Co-promotrice M<sup>elle</sup> Salmi Adouda pour sa patience et son soutien, pour ses conseils et ses orientations ainsi que pour ses encouragements et son suivi durant notre travail.*

*Nous aimerons remercier aussi tout le personnel du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de nous avoir aidé à chaque fois qu'on en avait besoin.*

*Un grand merci à tous nos enseignants, qui ont contribué à notre formation durant toutes nos études à l'Université d'Abderrehman Mira.*

*Nous n'oublions pas de remercier toute personne ayant participé et aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

***Dallal et Nour El Houda.***



# Sommaire

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Liste des abréviations*

*Introduction* .....01

## ***Chapitre I : Synthèse bibliographique***

<b>I.</b>	Azote.....	02
<b>II.</b>	Cycle de l'azote.....	03
<b>III.</b>	Fixation de l'azote.....	04
	<b>III-1.</b> Fixation industrielle de l'azote.....	04
	<b>III-2.</b> Fixation biologique de l'azote.....	04
	<b>III-2-1.</b> Fixateurs libres.....	05
	<b>III-2-2.</b> Fixateurs symbiotiques.....	05
<b>IV.</b>	Légumineuse.....	05
	<b>IV-1.</b> Définition.....	05
	<b>IV-2.</b> Taxonomie des légumineuses.....	06
	<b>IV-3.</b> Intérêt des légumineuses.....	06
<b>V.</b>	Rhizobia.....	07
	<b>V-1.</b> Caractères des rhizobia.....	07
	<b>V-1-1.</b> Caractères morphologiques et culturaux.....	07
	<b>V-1-2.</b> Caractères biochimiques.....	08
	<b>V-1-3.</b> Caractères physiologiques.....	08
	<b>V-1-4.</b> Caractères symbiotiques.....	08
	<b>V-2.</b> Classification des rhizobia.....	09
<b>VI.</b>	Symbiose rhizobia –légumineuse.....	09
	<b>VI-1.</b> Processus de la nodulation.....	10
	<b>VI-2.</b> Les substances responsables de la nodulation.....	12
	<b>VI-3.</b> Facteurs influençant la symbiose rhizobia-légumineuse.....	12

## ***Chapitre II : Matériel et méthodes***

<b>I.</b>	Matériel biologique.....	14
<b>II.</b>	Caractérisation phénotypique des souches bactériennes.....	14
<b>II-1.</b>	Caractérisation cytologique des souches bactériennes.....	14
<b>II-2.</b>	Caractérisation morphologique des colonies.....	14
<b>II-3.</b>	Caractérisation physiologique.....	14
<b>II-3-1.</b>	Effet du pH sur la croissance des souches.....	14
<b>II-3-2.</b>	Effet de la température sur la croissance des souches.....	15
<b>II-3-3.</b>	Effet de NaCl sur la croissance des souches.....	15
<b>II-4.</b>	Caractérisation biochimique des souches bactériennes.....	15
<b>II-5.</b>	Étude de la sensibilité et de la tolérance des souches aux antibiotiques.....	16
<b>II-6.</b>	Caractérisation symbiotique.....	17
<b>II-6-1.</b>	Test de nodulation croisé.....	17

## ***Chapitre III : Résultats et discussion***

<b>I.</b>	Caractérisation phénotypique des souches bactériennes.....	19
<b>I-1.</b>	Caractérisation cytologique des souches bactériennes.....	19
<b>I-2.</b>	Caractérisation morphologique des colonies.....	19
<b>I-3.</b>	Caractérisation physiologique.....	20
<b>I-3-1.</b>	Effet du pH sur la croissance des souches.....	20
<b>I-3-2.</b>	Effet de la température sur la croissance des souches.....	21
<b>I-3-3.</b>	Effet de NaCl sur la croissance des souches.....	22
<b>I-4.</b>	Caractérisation biochimique des souches bactériennes.....	23
<b>I-5.</b>	Étude de la sensibilité et de la tolérance des souches aux antibiotiques.....	25
<b>I-6.</b>	Caractérisation symbiotique.....	27
<b>I-6-1.</b>	Test de nodulation croisé.....	27
	<b><i>Conclusion et perspectives</i></b> .....	29

### ***Références bibliographiques***

### ***Annexes***

### *Liste des tableaux*

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de page
I	Résultats de la caractérisation biochimique	23
II	Résultats du test de sensibilité et de tolérance des souches aux antibiotiques	26

### *Liste des figures*

Numéro de figure	Titre de la figure	Numéro de page
1	Le cycle de l'azote	2
2	Les étapes du Processus de la nodulation racinaires chez les légumineuses	11
3	Graines mises à germée de <i>Vigna unguiculata</i> <i>R.monosperma</i> , <i>R.sphaerocarpa</i> et <i>Calycotum spinosa</i>	18
4	Observation microscopique à l'état frais d'une Suspension bactérienne	19
5	Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif	19
6	Aspect morphologique des colonies	20
7	L'effet du pH sur la croissance des souches	20
8	L'effet de la température sur la croissance des souches	21
9	L'effet de NaCl sur la croissance des souches	22
10	Exemple de résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galerie	25
11	Exemple de résultats de croissance des souches en présence de différents antibiotiques	26
12	Aspect des nodules obtenus lors du test de nodulation croisé	28

## *Liste des abréviations*

**ADH** : Arginine DiHydrolase.  
**ADI** : Acide ADIrique.  
**ARA**: ARAbinose.  
**ATP**: Adenosine Tri-phosphate.  
**CAP** : Acide CAPrique.  
**CIT**: trisodium CITrate.  
**CO<sub>2</sub>**: Dioxyde de carbone.  
**D.O**: Densité Optique.  
**EPS**: ExoPolySaccharides.  
**ESC**: ESCuline.  
**Fe**: fer.  
**GEL**: CELatine.  
**GLU**: GLUcose.  
**GNT**: Potassium GlucoNaTe.  
**H<sub>2</sub>**: Di Hydrogène.  
**MAL**: MALtose.  
**MAN**: MANnitol.  
**MLT**: MaLaTe.  
**mm**: millimètre.  
**MNE**: ManNosE.  
**N<sub>2</sub>**: Diazote.  
**NaCl**: Chlorure de sodium.  
**NAG**: N-Acétyl-Glucosamine.  
**NH<sub>3</sub>**: Ammoniaque.  
**NH<sub>4</sub>**: Ammonium.  
**NIT**: NITrite.  
***nod***: Gène de nodulation.  
**NO<sub>3</sub>/N<sub>2</sub>**: Nitrate/Nitrite réductase.  
**PAC**: Acide phénylACétique.  
**pH**: potential Hydrogène.  
**PHB**: Poly-β HydroxyButrates.

**PNG:** Para-Nitrophényl- $\beta$  D-Galctopyranosidase

**TRP:** Tryptophane.

**URE:** UREase.

**YMA:** Yeast Mannitol Agar.

**YMB:** Yeast Mannitol broth.

**mmol:** millimole.

# Introduction

L'azote est l'élément chimique le plus abondant dans l'atmosphère terrestre, il s'y trouve sous sa forme moléculaire normale diatomique  $N_2$  non assimilable par les plantes (Duc et *al.*, 2010). L'acquisition d'azote métaboliquement utilisable est essentielle pour la croissance et la survie de tout organisme. Dans les systèmes de production agricole, après l'eau, l'azote est l'élément nutritif qui limite le développement des végétaux (Burns et Hardy, 1975).

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes, elles jouent un rôle très important dans la restauration des sols pauvres et dégradés de plus elles sont connues pour leur capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec des micro-organismes telluriques appelés les rhizobia. Cette symbiose se manifeste par la formation sur les racines des légumineuses hôtes des organes spécialisés "nodosités" qui sont le site de fixation d'azote. La symbiose rhizobia-légumineuses présente beaucoup d'intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés, cette association symbiotique est considérée par conséquent comme un moyen intéressant pour l'utilisation dans les projets environnementaux, de ce fait la connaissance des deux partenaires symbiotiques s'avère de première nécessité.

C'est dans cette optique que ce travail est mené visant à caractériser les bactéries nodulant quelques légumineuses pour pouvoir les utiliser dans les projets de restauration et lutte contre la désertification.

Ce mémoire est constitué de trois chapitres: une synthèse bibliographique qui présente des généralités sur les deux partenaires (légumineuses et rhizobia) et leurs interactions (symbiose rhizobia-légumineuse), chapitre matériel et méthodes et le dernier rassemble la discussion de tous les résultats obtenus.

# Synthèse bibliographique

## I. Azote

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes, il représente 78% de l'atmosphère. C'est le quatrième constituant des plantes, il est utilisé dans l'élaboration de plusieurs biomolécules importantes telle que la chlorophylle (contient 4 atomes d'azote), les acides nucléiques (ADN, ARN), les hormones, mais aussi dans toutes les protéines structurales et enzymatiques (Epstein, 1972).

D'autre part, cet élément stimule chez les végétaux le développement et l'activité racinaire, favorisant l'utilisation des hydrates de carbone, l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Cependant l'insuffisance ou la carence de cet élément se traduit chez les plantes par une chlorose, un nanisme, une stérilité,...etc (Tourte et *al.*, 2005).

Cet élément se transforme sans cesse d'une forme minérale à une forme organique. La matière organique qui contient l'azote se décompose grâce à des microorganismes telluriques, ensuite cette décomposition permet la production de l'azote sous forme minérale. C'est le cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic, 2009).

## II. Cycle de l'azote

Dans ce cycle, trois processus de base sont impliqués dans le recyclage de l'azote atmosphérique: la fixation de l'azote diatomique ( $N_2$ ), la nitrification et la dénitrification (Voir la figure1).

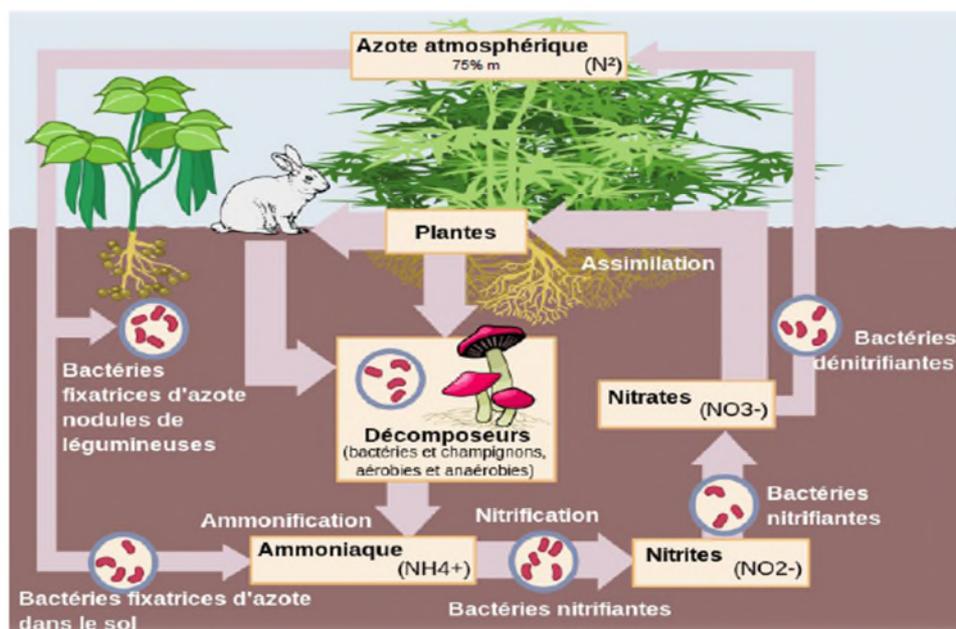
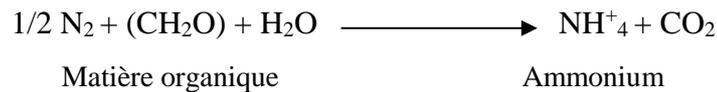


Figure 1: Le cycle de l'azote (Pujic, 2009).

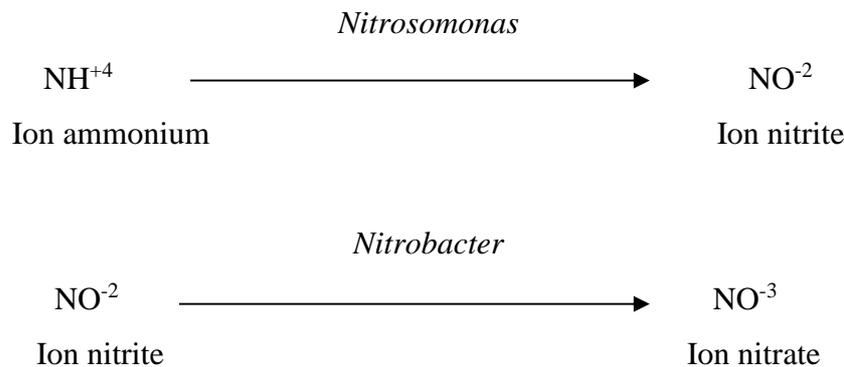
### II-1. La fixation de l'azote diatomique (N<sub>2</sub>)

Cette réaction se fait dans les sols où le pH est élevé, elle nécessite un apport de l'énergie de la photosynthèse (cyanobactérie, les symbiotes de légumineuses). Cette fixation tend à produire des composés ammoniums (NH<sup>+</sup><sub>4</sub>) et l'ammoniac (NH<sub>3</sub>), et la réaction de réduction de l'azote se fait par l'intermédiaire des substances organiques, selon l'équation suivante:



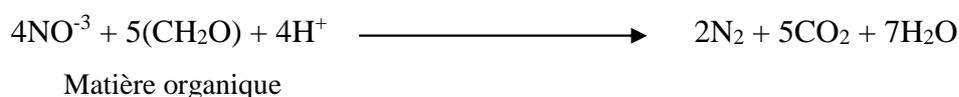
### II-2. La nitrification

La nitrification est une réaction d'oxydation qui se fait par catalyse enzymatique reliée à des microorganismes dans les sols (*Nitrosomonas* ou *Nitrobacter*). Les produits de fixation (NH<sup>+</sup><sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>) sont transformés en nitrites et nitrates (NO<sup>-2</sup>, NO<sup>-3</sup>) (Hopkin, 2003). Selon les équations suivantes:



### II-3. La dénitrification

Il s'agit d'une réaction de réduction de (NO<sup>-3</sup>) par l'intermédiaire des microorganismes tels que (*Pseudomonas*, *Paracoccus*, ...) qui réduisent les nitrates (NO<sup>-3</sup>) en azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) (Pujic, 2009). Ce processus nécessite la présence des matières organiques suivant l'équation:

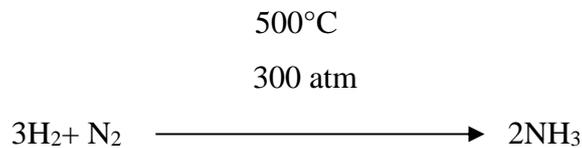


### III. Fixation de l'azote

La fixation de l'azote correspond à la conversion de l'azote atmosphérique gazeux en forme oxydé. Cette fixation de l'azote est réalisée soit par un procédé industriel ou bien par voie naturelle et biologique.

#### III-1. Fixation industrielle de l'azote

La fixation industrielle ou artificielle s'effectue grâce au procédé de Haber-Bosch, qui consiste à synthétiser l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) par hydrogénation du diazote ( $\text{N}_2$ ) gazeux atmosphérique avec le dihydrogène ( $\text{H}_2$ ) gazeux, suivant l'équation :

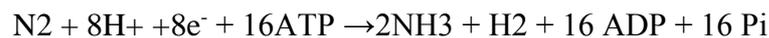


Ce processus est très coûteux, car il nécessite environ 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté par ce procédé. Environ 80 à 109 Kg d'ammoniac sont fabriqués chaque année par ce processus (Benabdour et *al.*, 2012).

#### III-2. Fixation biologique de l'azote

Depuis plus de 100 ans, la fixation biologique de l'azote a attiré l'attention des scientifiques, et elle a été largement exploitée en pratique agricole (Zahran, 1999).

Ce type de fixation est catalysé par un complexe enzymatique appelé "nitrogénase", cette enzyme est très conservée tant au niveau biochimique que génétique. Ce complexe est constitué de deux métalloprotéines: dinitrogénase (MoFe), dinitrogénase réductase (Fe) favorisant la réduction d'azote gazeux ( $\text{N}_2$ ) en ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), et la réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :



Cette fixation est assurée par des microorganismes fixateurs d'azote qui sont classiquement réparties en deux groupes: les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques. Les fixateurs libres ne requièrent pas l'hôte pour effectuer le processus. En revanche, les

fixateurs symbiotiques fixent l'azote seulement en association avec certaines plantes (Madigan et al., 2007).

### III-2-1. Fixateurs libres

C'est le type de microorganismes qui se trouvent en forte concentration dans la rhizosphère (Elmeriche et al., 1993). On distingue principalement:

- Des bactéries aérobies chimioorganotrophes: *Azotobacter*, *Aospirillum*, *Diazotrophicus*.
- Des aérobies facultatives: *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*.
- Des bactéries anaérobies strictes: *Clostridium*.
- Des cyanobactéries: *Synechococcus*.
- Des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique: *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*.

### III-2-2. Fixateurs symbiotiques

Certains microorganismes rentrent en symbiose avec des plantes. Parmi ces microorganismes, on trouve les bactéries telles que rhizobia qui vont fixer et réduire l'azote atmosphérique au niveau des nodosités, qui sera alors assimilable par la plante. Cette association symbiotique avec les rhizobia est considérée comme un processus indispensable à la plante pour acquérir les produits de la fixation bactérienne de l'azote, mais aussi une occasion à la bactérie pour obtenir les composés carbonés, l'énergie nécessaires pour son développement (Torche et al., 2010).

## IV. Légumineuses

### IV-1. Définition

C'est un ensemble de plantes, très abondantes et diversifiées qui appartiennent à la famille des fabacées qui est constitué par environ 750 genres et 19300 espèces, comprenant des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales, des plantes herbacées dans les région tempérées, mais aussi des arbustes ou des lianes (Andrews, 2016).

Les légumineuses se caractérisent par la présence d'un gonflement au niveau des racines appelées nodosités, dans lesquelles les rhizobia réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac disponible pour la nutrition azotée de la plante (Raven et al., 2000).

## IV-2. Taxonomie des légumineuses

La classification des légumineuses reste en constante évolution, cette famille est subdivisée en 3 sous familles : *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*, *Papilionoideae* (Andrews, 2016).

### a/*Caesalpinioideae* :

Elle comporte environ 170 genres et 2250 espèces qui sont sous forme d'arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux, leurs fleurs sont irrégulières. Ces espèces se regroupent en 4 tribus : *Caesalpinieae*, *Cassieae*, *Cercideae* et *Detarieae*.

### b/*Mimosoideae* :

Il s'agit de plantes légumineuses caractérisées par nombreuses petites fleurs régulières. La plupart de ces plantes sont des arbres et arbustes des régions tropicales et subtropicales, cette sous famille regroupe environ 80 genres et 3270 espèces, regroupés en 2 tribus (*Acacia*, *Mimosa*) qui sont majoritairement nodulées.

### c/*Papilionoideae* :

C'est la sous famille la plus abondante avec 480 genres et 13800 espèces, et environ 28 tribus. Elle constitue des plantes herbacées ou ligneuses ainsi que des arbres et arbustes dans les régions tempérées. Elle se caractérise par des fleurs irrégulières.

## IV-3. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses présentent plusieurs intérêt tels que:

### IV-3-1. Intérêt environnemental

Les légumineuses jouent un rôle important dans la restauration des milieux dégradés et la fertilisation des sols pauvres grâce à l'association symbiotique entre les deux partenaires (rhizobia, légumineuse) (Duc et *al.*, 2010). Ce type de plante contribue à la diminution d'utilisation des engrais azotés, ce qui permet la réduction de l'émission de gaz à effet de serre (Giraud, 2007).

### IV-3-2. Intérêt économique

Du point de vu économique, les légumineuses sont utilisées comme des aliments, mais aussi participent dans la fabrication des gommages, teintures, résines, huiles, en plus leurs bois est utilisé en construction et pour chauffage (Wathman, 1967). À noter aussi la réduction des coûts et bilans énergétiques suite à la diminution d'utilisation des engrais azotés dans le domaine agricole.

### IV-3-3. Intérêt alimentaire

Les légumineuses ont une excellente valeur nutritive dans l'alimentation humaine et animale, elles sont riches en protéines (Duc et *al.*, 2010). Par conséquent elles constituent un apport en protéines peu coûteux mais néanmoins important (18% à 30% de la graine sèche).

### IV-3-4. Intérêt médical

Quelques travaux ont démontré l'efficacité de quelques plantes dans le contrôle de la glycémie et la prévention des maladies cardiovasculaires.

En outre, certaines légumineuses ont été utilisées dans le traitement de plusieurs problèmes de santé tels que l'eczéma, le rhumatisme, les piqûres de scorpion et les blessures sous forme d'infusion, tisanes, poudres ou compresse (Hamrouni, 2001).

## V. Rhizobia

Les rhizobia sont généralement définie comme des bactéries du sol capables d'induire la formation des nodules chez les légumineuses.

Ces bactéries symbiotiques échangent des signaux moléculaires avec la plante hôte qui lui confère les sucres et son partenaire bactérien aboutissant à la formation des nodosités, dont lesquelles il réduise l'azote atmosphérique en ammoniac (Yaw Boakye et *al.*, 2016).

### V-1. Caractères des rhizobia

#### V-1-1. Caractères morphologiques et cultureux

Morphologiquement, les rhizobia sont des bactéries à Gram négatif non sporulantes, aérobies, elles sont généralement mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou bien deux à six flagelles péritriches (Werner, 1992). Dans le sol ces bactéries sont sous forme de bâtonnets de taille moyenne (0,5 - 0,9µm de largeur et 1,2 - 3µm de longueur) (Jordan, 1984).

D'après Somasegaran et Hoben (1994), les rhizobia sont réparties en trois groupes. Le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours avec une vitesse de dédoublement chaque 2-4 heures. Le deuxième comprend les *Mésorhizobium* qui sont des bactéries à croissance moyenne, elles produisent une turbidité dans le milieu liquide en 3-4 jours. Alors que les *Bradyrhizobium* désignent le

troisième groupe de rhizobia à croissance lente qui produisent un trouble dans le milieu liquide au bout de 4-5 jours.

Le milieu le plus utilisé pour la culture des rhizobia est le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) contenant des sels minéraux, du Mannitol, de l'extrait de levure et de l'agar (Vincent, 1970). Les souches peuvent apparaître au bout de 3 à 5 jours, elles ont une forme circulaire, incolore ou de couleur blanches, crème, opaques ou translucides, humides, comme elles peuvent être aussi brillantes. Les colonies jaunes sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

### **V-1-2.Caractères biochimiques**

Les caractères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différents enzymes tels que le glutamate déshydrogénase, la nitrate réductase, l'uréase, le glucose 6-phosphate déshydrogénase, l'adénylate kinase et l'indole- phénol oxydase, ainsi que d'autres enzymes impliqués dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés (El-Hilali, 2006).

Les rhizobia à croissance rapide présentent un spectre d'assimilation très large vis-à-vis des substrats carbonés par rapport aux rhizobia à croissance lente (Graham, 1963). Cependant la majorité des souches à croissance lente préfèrent le pentose. Les rhizobia n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante hôte et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour leur développement à l'état libre (Pelmont, 1995).

### **V-1-3.Caractères physiologiques**

Les caractères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie à différentes température, la tolérance aux variations du pH et à différentes concentrations en sels, mais aussi la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. La croissance des rhizobia est optimale à une température de 28°C et un pH entre 6 et 7 (Burton et Elkan, 1985). Mais certaines souches peuvent tolérer des milieux acides (pH=4) comme les *Bradyrhizobium japonicum*.

### **V-1-4.Caractères symbiotiques**

Les caractères symbiotiques indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée. Alors que l'infectivité des rhizobia exprime le pouvoir de la bactérie à noduler la plante hôte. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées. L'efficacité est la capacité de réduire efficacement l'azote

atmosphérique en ammonium et la compétitivité représente la résistance de la souche bactérienne considérée aux micro-organismes antagonistes et la concurrence avec les souches indigènes pour la nodulation (El-Hilali, 2006).

## V-2. Classification des rhizobia

Actuellement, les rhizobia comportent 13 genres et 117 espèces (Weir, 2016). Elles appartiennent à la subdivision alpha des protéobactéries dans les genres de: *Rhizobium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* (Zakhia et De Lajudie, 2001). Au cours des dernières années des rhizobia ont été aussi découverts dans les bêta protéobactéries dans les genres *Shinella*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum*. Les différentes espèces reconnues des rhizobia sont fondues dans les genres décrits ci- dessous:

- *Rhizobium* (Frank, 1889), qui contient 49 espèces.
- *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), qui 21 contient espèces.
- *Ensifer* autrefois *Sinorhizobium* (Young, 2003), contient 17 espèces.
- *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), qui contient 9 espèces.
- *Burkholderia*, (Chen et al., 2007) contient 7 espèces.
- *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), qui contient 2 espèces.
- *Microvirga*, (Arley et al., 2011), qui contient 3 espèces.
- *Phyllobacterium*, (valverd et al., 2005), qui contient 3 espèces.
- *Ochrobactrum*, (Zurdo-Piñeiro et al., 2007), qui contient 2 espèces.
- *Methylobactérieum* qui contient 1 espèce.
- *Cupriavidus* qui contient 1 espèce.
- *Devosia* qui contient 1 espèce.
- *Shinella* (Lin et al., 2008), qui contient 1 espèce.

## VI. Symbiose rhizobia-légumineuse

La symbiose rhizobia- légumineuses fournit chaque année, au niveau de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, elle joue donc un rôle écologique et économique considérable. D'un point de vue fondamental, cette relation symbiotique constitue un matériel de choix pour l'étude des interactions plantes-microorganismes (Benabdour et al., 2012).

La symbiose rhizobia-légumineuse est le phénomène qui désigne l'ensemble des associations symbiotiques entre les légumineuses et les bactéries du sol, les rhizobia.

L'interaction symbiotique commence par la communication entre ces deux partenaires grâce à des signaux moléculaires, en premier des flavonoïdes émis par la plante hôte agissant sur la transcription des gènes *nod* chez la bactérie (Perret et *al.*, 2000). Les facteurs *nod* produits sont impliqués dans la reconnaissance de la plante hôte, ils se lient à des récepteurs spécifiques situés sur l'épiderme de la racine. Par la suite, les rhizobia vont infecter les racines de la plante, ce qui permet la formation des nodosités et le processus est appelé nodulation (Shimoda et *al.*, 2012).

### **VI-1. Processus de la nodulation**

La nodulation est un processus qui permet la formation sur les racines de la plante hôte d'un organe végétal spécifique appelé "nodule" qui est le site de fixation de l'azote atmosphérique, et ce développement se fait selon les étapes suivantes: pré-infection, l'infection, le développement et la formation des nodules (Sanchez et *al.*, 1991) (voir la figure 2).

#### **VI-1-1. Pré-infection**

C'est la phase préliminaire qui détermine la spécificité symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses suite à un échange des signaux moléculaires ciblant le système racinaire de la plante hôte (Yang et *al.*, 2010). Une fois ce signal perçu par les rhizobia, induit la production du facteur nod.

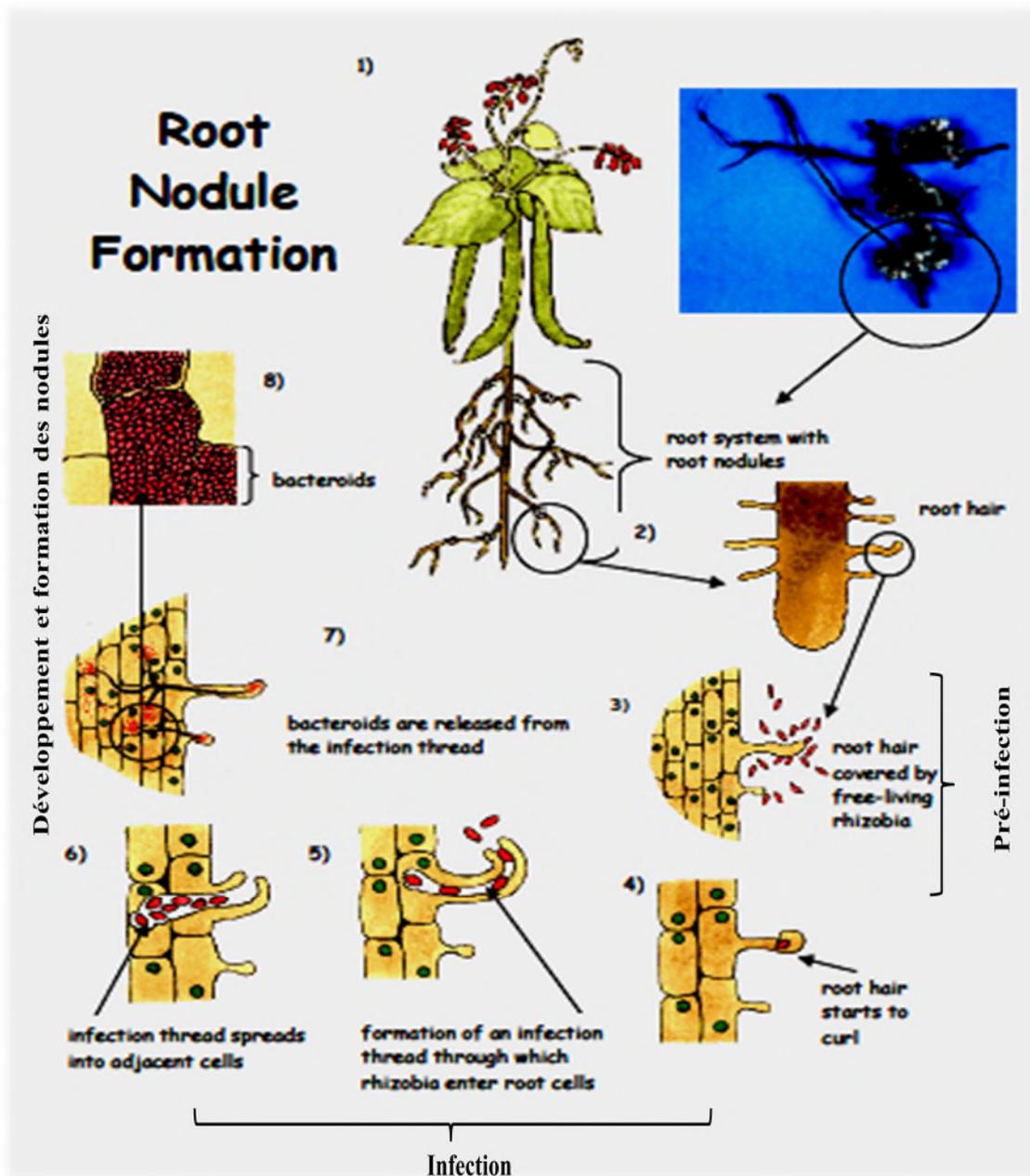
#### **VI-1-2. Infection**

L'infection débute juste après que le rhizobia s'attache aux racines de la plante hôte, cette infection se fait en deux voies : voie intracellulaire à travers des poils absorbants ou des blessures et voie intercellulaire lorsque les bactéries pénètrent dans les cellules radiculaires par des filaments infectieux (Estrada-Navarrete, 2016), puis elles deviennent des bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique (Spraink et Blodergoen, 1998). Enfin la croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées.

#### **VI-1-3. Développement et formation des nodules**

Au cours de cette étape, une série de divisions cellulaires se réalise au niveau du cortex de la racine infectée. De ce fait une structure appelée prénodule est observée, ce prénodule contient beaucoup des cellules corticales infectées par la bactérie fixatrice d'azote, puis un primordium nodulaire est initié suite à des divisions dans une zone proche du prénodule (Geurts et Franssen, 1996).

Un nodule mature est constitué de plusieurs lobes nodulaires chacun possédant une vascularisation centrale et un cortex divisé en trois zones: zone méristématique, zone d'infection et une zone pour la fixation d'azote (Benabdour et *al.*, 2012).



**Figure 2 :** Les étapes du Processus de la nodulation racinaires chez les légumineuses (Burdass, 2000).

## **VI-2. Les substances responsables de la nodulation**

### **VI-2-1. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques émises par les racines des légumineuses, ces substances sont très importantes du point de vue symbiotique (Boukli, 2006). Ils appartiennent en générale à trois groupes chimiques: les flavons, les flavanones et les isoflavones, ces composés constituent les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez les rhizobia l'expression et la synthèse des facteurs nod qui jouent un rôle essentiel dans l'infection aussi bien que dans le développement des nodules.

### **VI-2-2. Facteurs nod**

Ces facteurs sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCOS) produits par les différents gènes (*nod*, *nol* et *næ*) (Perret et al., 2000). Ils sont regroupés en trois catégories de gènes:

- ✓ Les gènes régulateurs (*nod D*) qui codent la synthèse des protéines constituant le facteur de transcription (Hrish, 1992, Dénerie et al., 1996).
- ✓ Les gènes communs (*nod A*, *B*, *C*) qui codent pour les enzymes catalysant la synthèse des facteurs nod.
- ✓ Les gènes spécifiques qui codent pour les substitutions et les sécrétions des facteurs nod (Long, 1996).

Les facteurs nod induisent la déformation des poiles racinaires, la division corticales des cellules et enfin la formation de nodule primordium.

## **VI-3. Facteurs influençant la symbiose rhizobia- légumineuses**

Plusieurs conditions environnementales sont des facteurs limitant la croissance et l'activité des plantes ainsi que le processus de la fixation d'azote qui est fortement lié à la physiologie de la plante, parmi ces facteurs on cite:

### **VI-3-1. Stress salin et osmotique**

La salinité est une menace pour l'agriculture dans les régions arides et semi-arides. Près de 40% de la surface terrestre mondiale peut être classée comme ayant des problèmes potentiels de salinité.

Les symbioses rhizobia-légumineuses ainsi que la formation des nodules sur les racines des légumineuses sont très sensibles au stress salin ou osmotique que les rhizobia, donc ce facteur inhibe l'étape initiale des symbioses rhizobia-légumineuses (Zahran, 1999).

### VI-3-2. Stress thermique

Les températures élevées du sol dans les zones tropicales, subtropicales et désertiques posent un problème majeur pour la fixation biologique de l'azote (Michiels et *al.*, 1994).

La nodulation et la fixation symbiotique de l'azote dépendent de la souche nodulante ainsi que la plante. Chez les haricots (*Phaseolus sp.*) le processus de nodulation est optimal entre 25 et 30 ° C (Zahran, 1999).

Pour la plupart des rhizobia, la température optimale pour la croissance est 28°C, et beaucoup sont incapables de se développer à 37°C, toutefois, 90% des souches de rhizobia obtenus à partir de l'environnement chaud et sec sont bien développées à 40°C (Graham, 1992).

### VI-3-3. Stress hydrique

Ce facteur représente un des facteurs environnementaux qui affectent l'initiation, le développement et le fonctionnement nodulaire qui pourrait être attribué à l'altération de l'activité métabolique des nodules (Hungria et Vargas, 2000).

### VI-3-4. L'acidité

L'acidité du sol constitue un problème important pour la production agricole dans de nombreuses régions du monde et limite la productivité des légumineuses. Certaines espèces, comme la luzerne (*M. Sativa*), sont extrêmement sensibles au pH, tandis que d'autres, comme *Lotus tenuis*, tolèrent un pH relativement faible du sol.

L'acidité du sol limite la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> à la fois limitant la survie et la persistance du rhizobia dans les sols, et ces souches sont habituellement mieux dans les conditions acides du sol mais pas toujours (Zahran, 1999).

### VI-3-5. Métaux lourds

La présence des métaux lourds semble avoir un effet sur la croissance, la morphologie et l'activité des microorganismes ainsi que la fixation de l'azote atmosphérique (Gusmão-Lima et *al.*, 2005).

Plusieurs auteurs ont montré que les métaux lourds tels que le cadmium, le mercure et le plomb sont considérés toxiques même à de faibles concentrations. Le cadmium affecte la croissance et l'activité microbienne ce qui diminue le nombre des nodules. D'autre comme le zinc, le cuivre, le nickel et le chrome sont essentiels pour la survie des plantes et des microorganismes mais à de faible concentrations. Cependant le zinc par exemple lorsque il est présent en fortes teneurs induit la réduction de la fixation d'azote et l'inhibition de la formation des nodosités (Zhang et *al.*, 1998).

# Matériel et méthodes

## I. Matériel biologiques

Six souches de rhizobia appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne et deux souches de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium* ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique qui est considérée comme une contribution à l'étude des bactéries endosymbiotiques à intérêt environnemental.

## II. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes

### II.1. Caractérisation cytologique des souches bactériennes

La forme, la mobilité et la présence des poly  $\beta$ -hydroxybutyrates (PHB) ont été déterminées par observation à l'état frais au microscope optique (grossissement 8 x 40) d'une culture bactérienne sur le milieu YMB âgée de 6 jours. Le test Gram est pratiqué selon la méthode classique de microbiologie qui consiste à réaliser une coloration spéciale d'un frottis bactérien, l'observation est faite au microscope optique (grossissement 8 x 100).

### II.2. Caractérisation morphologique des colonies

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

### II.3. Caractérisation physiologique

Les souches isolées ont subi une série de tests physiologiques impliquant plusieurs paramètres afin d'évaluer leur aptitude à croître en des conditions de pH, de température et de salinité.

#### II.3.1. Effet du pH sur la croissance des souches

L'effet des différents pH sur la croissance des souches bactériennes a été étudié sur milieu YMB, la gamme de pH utilisé varie de 4 à 10, trois répétitions ont été utilisées pour chaque souche. Les tubes contenant 5 ml du milieu YMB sontensemencés par une suspension bactérienne contenant  $10^7$  cellules dénombrées avec la cellule Malassez, ces cultures ont été incubées à 28°C pendant 06 jours. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda = 630$  nm.

### **II.3.2. Effet de la température sur la croissance des souches**

La croissance des souches bactériennes à différentes températures a également fait l'objet d'une étude sur milieu YMB à raison de 3 répétitions par souche. Les cultures sont incubées à différentes températures : 20°C, 24°C, 28°C, 32°C. Après 06 jours d'incubation, la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda = 630$  nm.

### **II.3.3. Effet du NaCl sur la croissance des souches**

La tolérance des souches au NaCl a été testée sur le milieu YMB additionné de concentrations croissantes en NaCl : 100, 200, 300, 400 mmol à raison de 3 répétitions par souche. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 06 jours. La croissance bactérienne est aussi évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda = 630$  nm.

Dans les trois tests un témoin négatif non inoculé a été utilisé.

### **II.4. Caractérisation biochimique des souches bactériennes**

Afin de caractériser les souches biochimiquement un test de galerie Api 20 NE a été réalisé.

La galerie est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactérie et non fastidieux. Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substances déshydratés.

#### **❖ Préparation et inoculation de la galerie**

La préparation de la galerie se fait d'abord par la répartition de 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour reconstituer les milieux.

Pour inoculer la galerie, les cupules de la galerie sont remplies par une suspension bactérienne contenant  $10^7$  bactéries. Concernant les trois tests (GLU, ADH, URE), un remplissage de l'huile de paraffine a été ajouté pour former un ménisque convexe. La lecture et l'interprétation se font après 06 jours d'incubation.

Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs comme dans le cas des deux tests  $\text{NO}_3$  et TRP:

**• Test de NO<sub>3</sub>**

Une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 est ajoutée dans la cupule, la lecture se fait après 5 min :

- Une couleur rouge indique une réaction positive, qui signifie la réduction de nitrate en nitrite.
- Le résultat incolore indique une réaction négative, Ceci est synonyme d'absence de nitrite dans le milieu mais cela peut être dû à deux raisons: la bactérie n'a pas de nitrate, ou elle a un nitrite réductase qui transforme les nitrites en azote atmosphérique.

Pour distinguer ces deux cas, il suffit juste d'ajouter une pincée de poudre de zinc. Cette poudre, très réductrice, réduit en quelques minutes les nitrates en nitrites et la coloration rouge apparaît, la bactérie est donc (nitrate<sup>-</sup>). Si aucune coloration n'apparaît, c'est qu'il ne reste plus de nitrates dans le bouillon, donc la bactérie est (nitrate<sup>+</sup> ; réductrice de nitrites en azote).

**• Test de TRP**

Ajouter une goutte de réactif de JAMES dans la cupule correspondante, la diffusion d'une couleur rose dans toute la cupule indiquant ainsi une réaction positive, se traduit par la formation d'indole.

La fermentation de glucose se traduit par une couleur jaune, la même couleur est considéré positif concernant la présence de  $\beta$ -galactosidase. L'orange, le rose ou le rouge est témoin d'une réaction positif dans le cas de l'arginine dihydrolase ainsi que l'uréase. Concernant l'esculine qui est un hétéroside qui libère par hydrolyse, du glucose et de l'esculetine, cette dernière produite lors de l'hydrolyse forme un précipité noir en présence du fer. Enfin le résultat positif dans le cas de la gélatine est révélé par la diffusion d'un pigment noir.

**II.5. Etude de la sensibilité et de la tolérance des souches aux antibiotiques**

La sensibilité ou la résistance des souches aux antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur le milieu YMA selon la démarche suivante :

- Préparation de suspension bactérienne à 0.5 Mac farland.
- Ensemencement à l'aide d'écouvillon en stries très serrées.
- Dépôt des disques d'antibiotiques à la surface de la gélose
- Incubation à 28°C pendant 10 jours.

- ❖ Quatre agents antimicrobiens de différentes familles sont utilisés : Tétracyclines (30µg), Erythromycines (15µg), Gentamycines (10µg), Oxacillines (1µg).

## II.6. Caractérisation symbiotique

### II.6.1. Test de nodulation croisé

Un test de nodulation croisé a été réalisé afin de démontrer l'aptitude des souches bactériennes à induire des nodules sur les racines de plusieurs plantes.

#### II.6.1.1. Stérilisation et germination des graines

Quatre types de graines ont été utilisés dans ce test de nodulation croisé (*Vigna unguiculata*, *R.monosperma*, *R.sphaerocarpa* et *Calycotum spinosa*). Pour *Vigna unguiculata*, les graines sont mises dans un bain de l'éthanol pendant 30 secondes puis dans un bain de l'eau de Javel à 3% pendant 3 à 5 minutes afin de stériliser la surface de la graine, suivie d'un rinçage cinq fois avec l'eau distillée. Les graines de *R.monosperma* et *R.sphaerocarpa*, sont immergées dans de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pendant 3 heures, et environ 1heure et 30minutes pour les graines de *Calycotum spinosa*, suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'acide sulfurique.

Les graines ainsi stérilisées, ont été mises à germer dans des boîtes de pétri contenant du papier absorbant imbibés d'eau distillée et incubées à l'obscurité à une température 20°C (Figure 3).

Après 5 à 8 jours d'incubation, les graines ayant germées sont transférées aseptiquement dans des flacons contenant du milieu Jensen stérile (Boulila et *al.*, 2009).



**Figure 3:** Graines mises à germée de *Vigna unguiculata* *R.monosperma*, *R.sphaerocarpa* et *Calycotum spinosa*.

### II.6.2. Inoculation des plantules

Les plantules axéniques ont été inoculées après 24 heures de leur transfert sur milieu Jensen avec 1 ml d'une suspension bactérienne. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche et pour chaque plante.

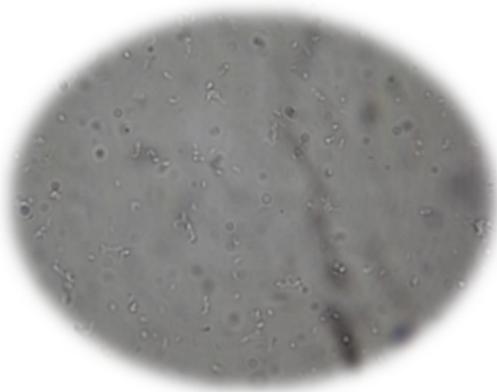
Après l'inoculation des plantules, la partie racinaire a été recouverte pour lui procurer l'obscurité et les cultures sont exposées aux conditions naturelles de lumière et de température, l'apparition des nodules a été suivi après 1 mois de l'inoculation pour les plantules de *Vigna unguiculata* et 2 mois pour les trois autres plantules (Boulila et *al.*, 2009).

# Résultats et discussion

## I. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes

### I.1. Caractérisation cytologique des souches bactériennes

L'observation microscopique à l'état frais d'une suspension bactérienne âgée de 6 jours, montre des cellules qui ont la forme de bâtonnets à extrémités arrondies et mobiles (Figure 4). Ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly  $\beta$ -hydroxybutyrate (Pedrosa, 1988). La coloration de Gram réalisée a montré leurs appartenances aux bactéries Gram négatif (Figure 5).



**Figure 4:** Observation microscopique à l'état frais d'une suspension bactérienne (Grossissement 8x40).



**Figure 5:** Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (Grossissement 8x100).

### I.2. Caractérisation morphologique des colonies

Les isolats étudiés forment des colonies qui ont une forme ronde, avec contours réguliers et des diamètres allant de 1 à 2 mm. Elles sont beiges, opaques et ont un aspect gluant, d'autres sont opaques et de couleur blanche (Figure 6). Toutes les souches étudiées possèdent des exopolysaccharides à l'exception la souche S<sub>347</sub>. L'apparition des colonies après 10 jours d'incubation à 28°C permet de classer ces souches en bactéries à croissance lente. (Jordan, 1982, 1984).

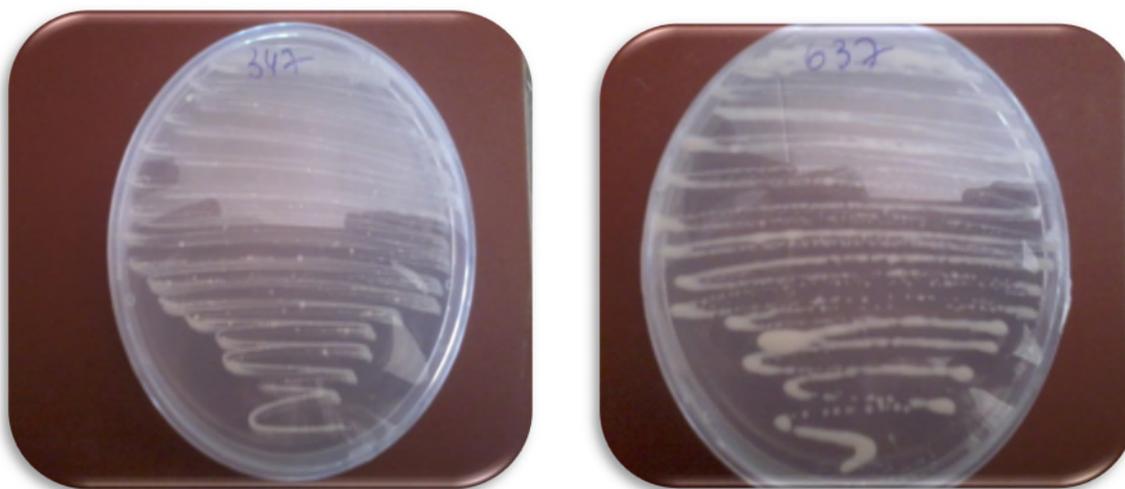


Figure 6: Aspect morphologique des colonies.

### I.3. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, l'effet du pH, de la température et de la salinité sur la croissance des souches bactériennes à été étudié.

#### I.3.1. L'effet du pH sur la croissance des souches

Les résultats de l'effet de pH sur la croissance des souches sont présentés dans la (Figure 7).

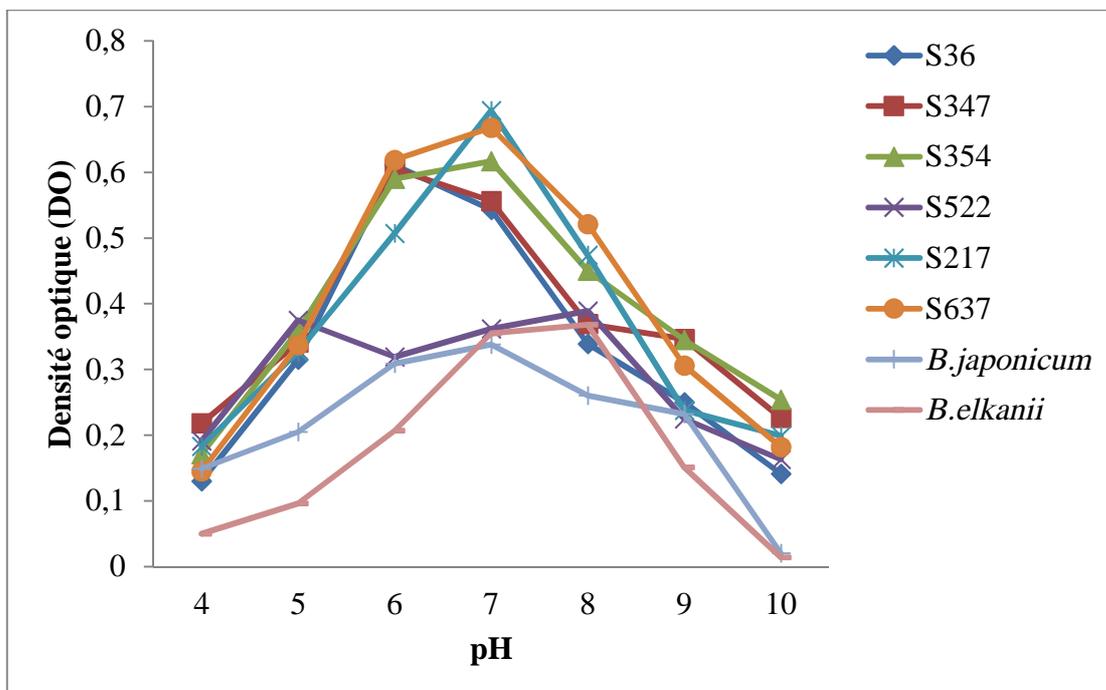
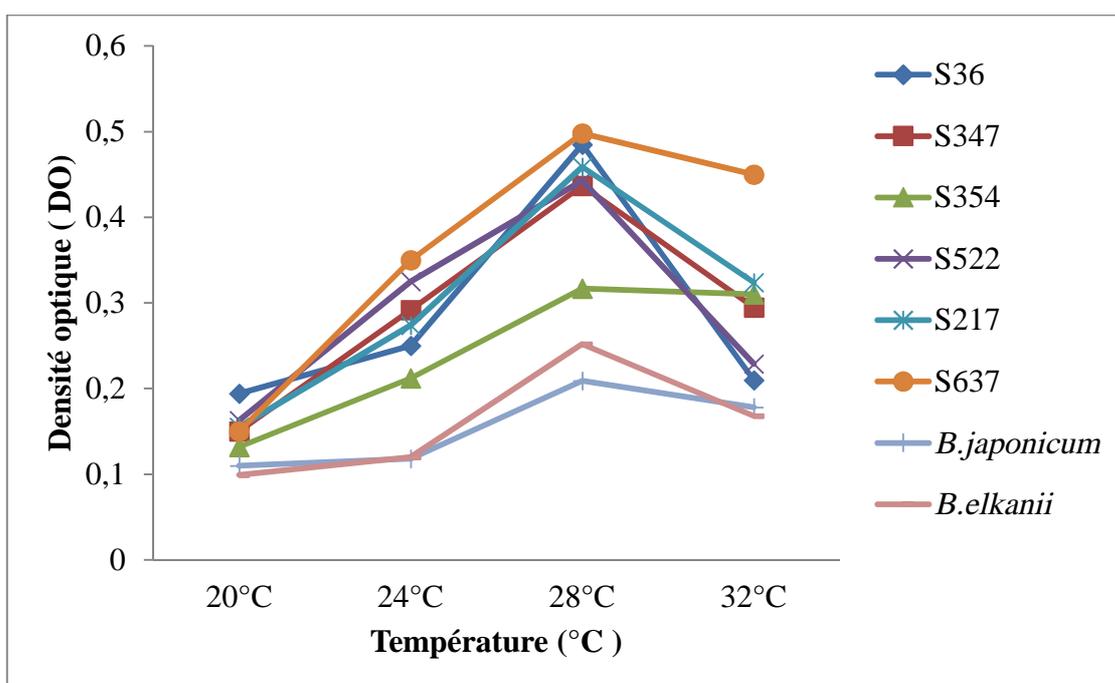


Figure 7: L'effet du pH sur la croissance des souches.

Les résultats montrent que toutes les souches y compris *B.japonicum* présentent une très bonne croissance entre pH 6 et 7 à l'exception de *S522* et *B.elkanii* qui ont une bonne croissance à pH 8. Aucune croissance n'a été observée à pH 4 et pH 10. Ces résultats sont également en accord avec ceux de Kishinevsky et al. (2002) qui ont montré qu'aucune des souches de rhizobia isolées à partir d'*Hedysarum spinosissimum* n'est capable de croître à un pH 4 et que leur optimum de croissance est situé entre pH 7 et pH 8, alors que Rasa et al. (2001) ont rapporté que les rhizobia de deux espèces *L.luteus* et *L.angustifolius* tolèrent des pH allant de 4 à 10.

### I.3.2. Effet de la température sur la croissance des souches

Les résultats obtenus lors du test de température (Figure 8) montrent une variabilité du comportement des souches vis-à-vis de la température.



**Figure 8:** L'effet de la température sur la croissance des souches.

En effet, dans la gamme de température étudiée, l'optimal de croissance de toutes les souches étudiées y compris les souches de référence *B.japonicum*, et *B.elkanii* se situe à 28°C, mais aussi présentent une bonne croissance entre 24°C et 32°C. Par contre leur croissance est très faible à 20°C.

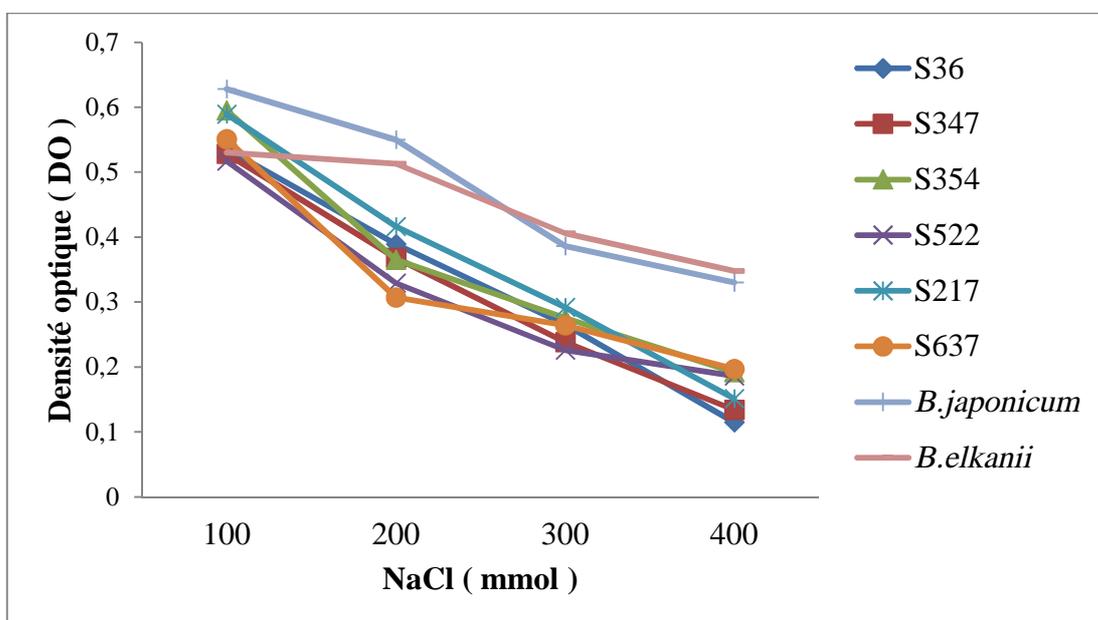
Les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par Graham (1992) qui a rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles pouvant se développer à des

températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches tend vers 28°C.

Il a été rapporté que les températures basses inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation (Zhang et al., 1996). A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999). Piha et Munns (1987) ont rapporté que les nodosités de la fève formées à 35°C étaient de petite taille et que l'activité de la nitrogénase était très basse.

### I.3.3. Effet du NaCl sur la croissance des souches

Les résultats obtenus lors du test de NaCl (Figure 9) montrent que les souches présentent une variabilité de tolérance vis-à-vis du NaCl.



**Figure 9:** L'effet du NaCl sur la croissance des souches.

La courbe de croissance de toutes les souches y compris les souches de référence présente presque la même allure. En effet, plus on augmente la concentration en NaCl plus la croissance diminue. Cependant les souches de référence *B.japonicum* et *B.elkanii* tolèrent des concentrations allant jusqu'à 200 mmol.

La plupart des rhizobia sont inhibés par des concentrations de 100 mmol NaCl (Singleton et al., 1982). Différentes souches de *Bradyrhizobium* sont complètement inhibées entre 50 et 90 mmol NaCl. Cependant, il existe des souches très tolérantes au

NaCl, par exemple *Sinorhizobium meliloti* qui peut croître à des concentrations variant de 300 à 700 mmol NaCl.

Miller et Wood (1996) ont rapporté que les rhizobia sont des bactéries sensibles à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais elles peuvent tolérer des concentrations élevées. Cette tolérance est en rapport avec des mécanismes d'adaptation qui permettent de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs. Certains auteurs ont rapporté aussi que les rhizobia sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Swaraj et Bishnoi, 1999).

#### I.4. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

20 tests biochimiques ont été réalisés sur six souches étudiées et deux souches de référence (tableau I).

**Tableau I:** Résultats de la caractérisation biochimique.

Souches	NO <sub>3</sub> /N <sub>2</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
S <sub>36</sub>	+/+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
S <sub>217</sub>	+/+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S <sub>354</sub>	+/+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
S <sub>522</sub>	+/+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
S <sub>347</sub>	+/+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S <sub>637</sub>	+/+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>B.japonicum</i>	-/+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.elkanii</i>	-/+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Test négatif

+: Test positif.

-/+ : Nitrite réductase

+/+ : Nitrate réductase.

#### I-4-1. Résultats des tests conventionnels

Les tests sur galerie (Figure 10) montrent que la plupart des souches étudiées possèdent la nitrate réductase à l'exception de *B.japonicum* qui possède la nitrite réductase.

Les résultats obtenus révèlent que toutes les souches y compris les souches de référence ne possèdent pas la tryptophane hydrolase, elles fermentent toutes le glucose sauf la souche S<sub>217</sub>. Cependant l'arginine n'est pas hydrolysé par toutes les souches à l'exception de S<sub>637</sub>, *B.japonicum*, et *B.elkanii*. L'urée est hydrolysée par toutes les souches à l'exception des souches S<sub>217</sub> et S<sub>637</sub>.

Les résultats trouvés par le test de l'hydrolyse d'esculitine révèlent que toutes les souches sont capables de produire du glucose et de l'esculitine. La présence d'une gélatinase a été révélée par la diffusion du pigment, le résultat est positif pour toutes les souches à l'exception des souches de référence *B.japonicum*, et *B.elkanii*. Le test de PNPG montre que toutes les souches ne possèdent pas la  $\beta$ -galactosidase contrairement aux souches de référence *B.japonicum*, et *B.elkanii*.

#### I-4-2. Résultats des tests d'assimilations

L'utilisation des glucides comme seule source de carbone et d'énergie à été étudiée, six sucres ont été utilisés : D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acétyl-glucosamine, et D-maltose. Les résultats montrent que toutes les souches assimilent le D-mannitol. Cependant, la plupart des souches n'assimilent pas le N-acétyl-glucosamine sauf les souches S<sub>36</sub>, S<sub>522</sub>. Le D-glucose n'est assimilé que par les souches: S<sub>36</sub>, S<sub>347</sub> et *B.japonicum*. L'arabinose est également très utilisé par toutes les souches contrairement aux souches de référence *B.japonicum*, et *B.elkanii* qui ne peuvent pas l'utiliser. Enfin, toutes les souches utilisent le D-mannose à l'exception de S<sub>36</sub>, S<sub>347</sub>, *B.japonicum*, et *B.elkanii*. Les souches: S<sub>637</sub>, *B.japonicum* et *B.elkanii*, semblent être les seules souches qui n'utilisent pas le D-maltose.

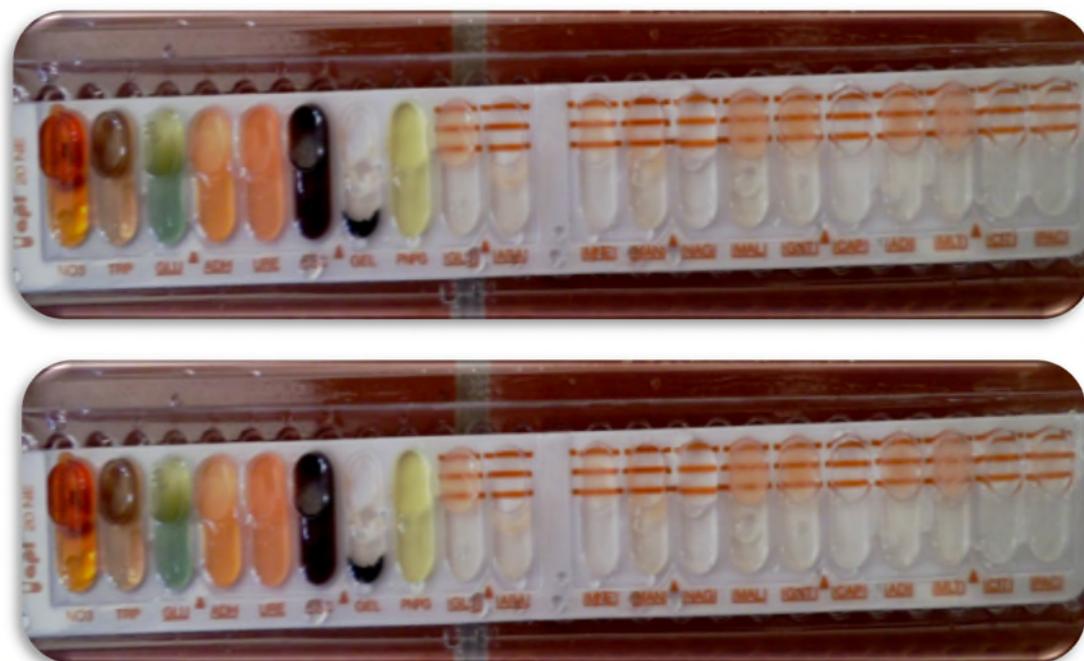
Certains travaux indiquent que les rhizobia peuvent utiliser différentes sources de carbone ce qui les caractérisent (Cepeda-Hernandez, 2005). L'étude de l'assimilation de diverses sources de carbone par différentes souches appartenant au genre *rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les mono, et les disaccharides. Cependant les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides et moindre pour les disaccharides (Stowers, 1985).

Un test d'utilisation de deux acides gras (acide caprique, acide adipique ) et deux acides organiques (acide malique et acide phénylacétique) par les souches à été également réalisé. Les résultats trouvés révèlent que l'acide phénylacétique est assimilé par toutes les

souches à l'exception de *B.japonicum*, et *B.elkanii*. Les souches S<sub>36</sub> et S<sub>217</sub> sont les seules qui n'assimilent pas l'acide caprique. En outre, l'acide malique et adipique ne sont pas assimilés que par les souches: S<sub>637</sub>, *B.japonicum*, et *B.elkanii*.

Les tests d'assimilation du trisodium citrate, comme seule source de carbone appelé aussi le citrate de sodium, montre qu'aucune souche n'assimile le trisodium citrate.

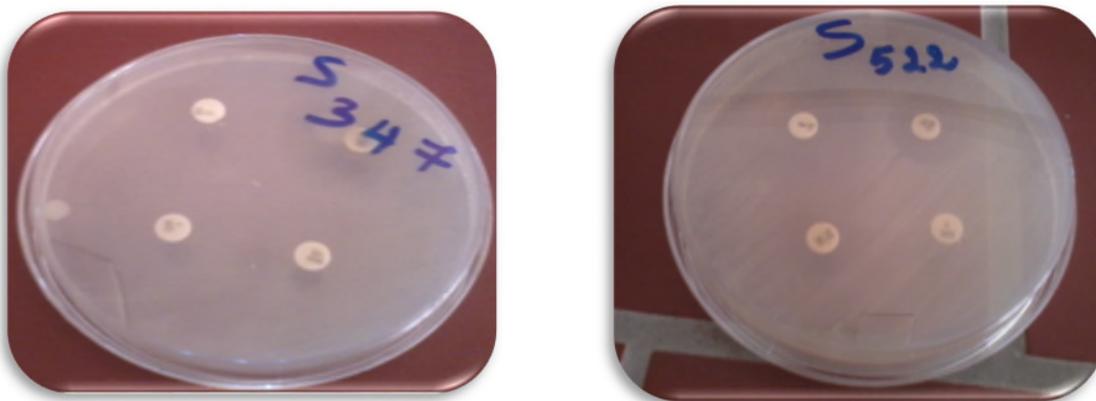
Les tests biochimiques réalisés sur les rhizobia ont été largement étudiés montrant ainsi une diversité de caractères traduisant une variabilité importante de l'équipement enzymatique des souches de rhizobia étudiées (Kedjar, 2001 ; Bensaid, 2002).



**Figure 10:** Exemple de résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries.

### I.5. Etude de la sensibilité et de la tolérance des souches aux antibiotiques

Après incubation, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus sont mesurés autour des disques d'antibiotiques (Figure 11). Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau II.



**Figure 11:** Exemple de résultats de croissance des souches en présence de différents antibiotiques.

**Tableau II:** Résultats du test de sensibilité et de tolérance des souches aux antibiotiques.

Antibiotiques Souches	Tétracycline	Erythromycine	Gentamycine	Oxacilline
S <sub>36</sub>	T	S	S	S
S <sub>347</sub>	T	S	S	S
S <sub>354</sub>	T	S	S	S
S <sub>522</sub>	T	S	S	S
S <sub>217</sub>	T	I	S	S
S <sub>637</sub>	T	S	S	S
<i>B.japonicum</i>	T	T	I	I

**I:** intermédiaire, **S:** sensible, **T:** tolérante.

Ces résultats montrent que toutes les souches y compris la souche de référence *B.japonicum* sont tolérantes à la Tétracycline, par contre elles sont toutes sensibles à: Erythromycine, Gentamycine et Oxacylline.

Schwinghamer (1967) et Brockwell et *al.* (1977) ont rapporté que les antibiotiques peuvent affecter extrêmement la capacité des rhizobia à infecter leur plante hôte voir même entraîner la perte de leur capacité symbiotique.

Les antibiotiques agissent globalement sur les enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) et sur la synthèse des protéines et des acides nucléiques par des mécanismes spécifiques (Karanja et Wood, 1988). Le mode d'action de ces molécules varie en fonction du type de l'antibiotique (Graham, 1963) ainsi qu'en fonction de la concentration testée (Lindström et Lehtomäki, 1988).

Le mécanisme de résistance aux antibiotiques le plus répandu chez les bactéries Gram négatives est l'inactivation extra ou intracellulaire de l'antibiotique, ce qui aboutit à la

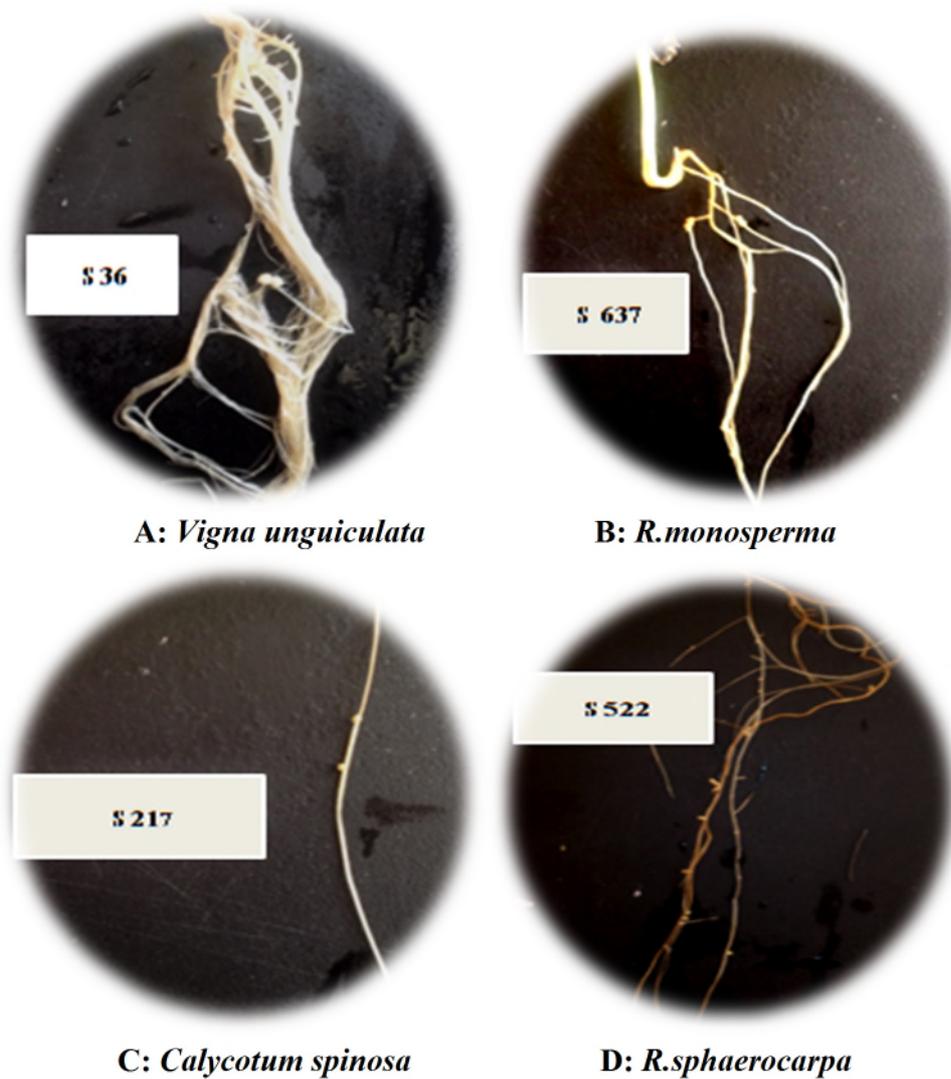
perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Un autre mode connu de résistance consiste à la modification de la cible de l'antibiotique (Weaver et Frederick, 1982).

## I.6. Caractérisation symbiotique

### I.6.1. Test de nodulation croisé

Le test de nodulation a révélé la capacité des souches étudiées à induire une nodulation. En effet tous les tests sont considérés comme des tests positifs, puisque toutes les souches sont capables d'infecter *Vigna unguiculata*, *R.monosperma*, *R.sphaerocarpa* et *Calycotum spinosa*, ceci suggère la non spécificité et le large spectre de nodulation de ces souches. Les nodules observés sur les racines de *Vigna unguiculata* sont blancs ce qui se traduit par le fait que les souches ne fixent pas l'azote atmosphérique ceci s'explique par le fait que *Vigna unguiculata* n'appartient pas à la tribu des *Genisteeae*. Cependant les nodules formés sur les racines de *R.monosperma*, *R.sphaerocarpa* et *Calycotum spinosa* sont bruns donc les souches sont efficaces dans la fixation de l'azote atmosphérique (Voir la figure 12).

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



**Figure 12:** Aspect des nodules obtenus lors du test de nodulation croisé.

Conclusion  
et  
perspectives

Dans cette étude nous avons réalisé une caractérisation phénotypique de six souches isolées à partir de quelques légumineuses et deux souches de référence appartenant au genre de *Bradyrhizobium* prises à titre de comparaison dans le but de contribuer à l'étude des bactéries endosymbiotiques pour une éventuelle utilisation dans des buts environnementaux.

L'étude de la croissance des souches a été réalisée sur milieu solide YMA et liquide YMB. Les résultats obtenus ont montré que les souches étudiées sont à croissance lente et présentent des aspects morphologiques et culturels suggérant leur appartenance au genre de *Bradyrhizobium*.

Les tests physiologiques, montrent des optima de croissance sont à 28°C et la plupart des souches testées présentent une très bonne croissance entre pH 6 et 7 et au-delà d'une concentration de 100 mmol de NaCl la croissance des souches est remarquablement inhibée. La caractérisation biochimique a révélée une variabilité de comportement vis-à-vis des tests effectués.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition a permis de déterminer la sensibilité des souches aux antibiotiques. En effet les résultats obtenus montrent que toutes les souches y compris la souche de référence *B.japonicum* sont tolérantes à la Tétracycline, contrairement aux autres antibiotiques qui semble inhiber la croissance de toutes les souches testées.

Le test de nodulation croisé réalisé dans des conditions contrôlées sur *Retama monosperma*, *Retama sphaerocarpa*, *Calycotum spinosa* et *Vigna unguiculata* a révélé la capacité des souches testées à induire une nodulation, ce qui suggère que ces souches ont un large spectre de nodulation.

En perspective, il serait intéressant de:

- Continuer la caractérisation phénotypique par des tests d'assimilation des sources de carbone et d'azote, l'effet des métaux lourds et des pesticides sur la croissance des rhizobia et d'élargir la gamme de la plante utilisée.
- Compléter cette étude par une analyse moléculaire et génotypique des rhizobia étudiés.
- Évaluer les potentialités des couples symbiotiques et de tester leur pouvoir adaptatif aux différents environnements répondant ainsi aux objectifs du développement national et régional.

# References bibliographiques

A

- ↻ **Andrews M., Andrews M.E. (2016).** Specificity in legume-Rhizobia symbiosis. Faculty of agriculture and life sciences. **1.** pp 1-7.

B

- ↻ **Benabdour M., Gherbi H., Djekoun A., Bogusz D., Franche C., Ykhlef N. (2012).** Fixation biologique de l'azote : la symbiose Actinorhizienne. *Casuarina-Frankia. Scien. Technol C-N°35.* 17p.
- ↻ **Bensaid k. (2002).** Caractérisation phénotypique des rhizobia isolés de *Medicago polymorpha* de la région de Bejaia et étude de l'effet de NaCl sur leur symbiose. Mémoire de Magister en Biologie. Université d'Abderrahmane Mira-Bejaia. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 67p.
- ↻ **Boukli N.M., Sundeasan E., Bartsev A., Hochstrasser D., Perret X., Bijourson A.J., Krause A., Brouhton W.J. ( 2006 ).** Early legume responses to inoculation with *Rhizobium* sp. NGR 234. *J. plant physiol.* pp 1-13.
- ↻ **Boulila F., Depret G., Boulila A., Belhadi D., Benallaoua S., Laguerre G. (2009).** *Retama* species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst .Appl. Microbiol.* **32.** pp 245-255.
- ↻ **Brockwell J., Schwinghamer E.A., Gault R.R. (1977).** Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. A critical examination of the stability of antigenic streptomycin resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* **9.** pp 19-24.
- ↻ **Burdass D. (2000).** *Rhizobium* foot nodules and Nitrogen fixation. *Soc. Gen Microbiol.* 16p.
- ↻ **Burns R.C., Hardy R.W.F. (1975).** Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **21.** pp 1-189.
- ↻ **Burton M., Elkan G. (1985).** Multiple antibiotic resistances in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37.** pp 867-870.

C

- ☞ **Cepeda Hernandez M. L. (2005).** Phenotypic characterization of rhizobia that nodulate ball clover. Thèse de Magister Texas A et M university. Condition and in arid climate. *Micobiol. Molec. Rev.* **63 (4)**. pp 968-989.

D

- ☞ **Dénarie J., Debelle F., Prome J.C. (1996).** *Rhizobium* lipo-chito-oligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann Rev. Biochem.* **65**. pp 503-535.
- ☞ **Duc G., Mignolet C., Carrouée B., Huyghe C. (2010).** Importance économique passée et présentes de légumineuses: Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Inn. Agro.* **11**. 24p.

E

- ☞ **El-Hilali I. (2006).** La symbiose *Rhizobium*-LUPIN: biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université de Rabat. pp 22-23.
- ☞ **Elemerich C. (1993).** Fixation de l'azote et interaction bactéries-plantes.
- ☞ **Epstein E. (1972).** Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Wiley. 124p.
- ☞ **Estrada-Navarrete G., Cruz-Mireles N., Lascono R., Alvarado-Affantranger., Hernández-Barrera A., Barraza A., Olivares J.E., Arthikala M-K., Cárdenas L., Quinto C., Sanche F. (2016).** An Autography-Related kinas essential for the symbiotique relationship between *Phaseplus Vulgaris* and both rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi the plant cell. **28**. 2326p.

G

- ☞ **Geurts R., Franssen H. (1996).** Signal transduction in *Rhizobium* induced nodule formation. *Plant. Physiol.* **112**. pp 447-453.
- ☞ **Giraud E. (2007).** Symbiose *Rhizobium*-légumineuse : un nouveau sésame M/S n°6-7. **23**. 663p.
- ☞ **Gittoni N. E., Buenos M.A. (1996).** Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity. *Symbiosis.* **20**. pp 117-127.

- ∞ **Graham P.H. (1963).** Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria. *Aust. J. Biol. Sci.* **16.** pp 557-559.
- ∞ **Graham P.H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under diverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38 (6).** pp 475-484.
- ∞ **Gusmão-Lima A.I., Figueira E., Almeida M.P., Pereira S.I.A. (2005).** Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* **51.** pp 7-14.

H

- ∞ **Hirsch A.M. (1992).** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122.** pp 211-237.
- ∞ **Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. Ed De Boeck et Larcier S.A, Paris. 514p.
- ∞ **Hungria M., Vargas M.A.T. (2000).** Environmental factors affecting Nitrogen fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research.* **65 (2-3).** pp 151-164.

J

- ∞ **Jordan D.C. (1982).** Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32.** pp 136-139.
- ∞ **Jordan D.C. (1984).** Family III. *Rhizobiaceæ*. In: N.R. Kreig and J. G .Holt (ed). *Bergey's manual of symbiomatic bacteriology.* The Williams & Wlkins Co. Baltimore. **1.** pp 234-254.

K

- ∞ **Karanja N. K., Wood M. (1988).** Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya. Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant Soil.* **112.** pp 15-22.
- ∞ **Kedjar F. (2001).** Caractérisation phénotypique et analyse des protéines en SDS/PAGE de souches de *Rhizobium meliloti* isolées de la région de Bejaia. 82p.
- ∞ **Kishinevsky B.D., Nandasena k.G., Yates R. J., Nemas C., Howieson J.G. (2002).** Phenotypic and diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarium* species: *H.spinosissimum*, *H.coronarium* and *H.flexuosum*. *Plant and soil.* **251.** pp 143-154.

L

- ∞ **Lindström K., Lehtomäki S. (1988).** Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensitivity of *rhizobium* sp. (Galega) compared with others fast growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **50.** pp 277-287.
- ∞ **Lindström k., Terefework Z., Suominen L., Lortet G. (2002).** Signalling and development of Rhizobium-legume symbiosis. *Biology and Environment: Royal Irish Academy* vol 102B, NO. 1. pp 61-64.
- ∞ **Long S.R. (1996).** *Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective.* *Plant cell.* **8.** pp1885-1898.

M

- ∞ **Madigan M., Martink J. (2007).** Brock Biologie des microorganismes. Edition: Person Education France. pp 599-601.
- ∞ **Michiels J., Verreth C., Vanderleyden. (1994).** Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60 (4).** pp 1206-1212.
- ∞ **Miler K.J., Wood J.M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphère bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **50.** pp 101-136.

P

- ∞ **Pedrosa F.O. (1988).** Physiology biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root associated Nitrogen-fixing bacteria. *C.R.Scein.* **6.** pp 345-348.
- ∞ **Pelmont J. (1995).** Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. Office des publications universitaires. **2.** pp 541-572.
- ∞ **Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **64 (1).** pp 180-201.
- ∞ **Piha M. I et Munnus D.N. (1987).** Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil.* **98.** pp 183-194.
- ∞ **Pujic P., Normand P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofactur.* **28. (298).** pp 26-29.

R

- ☞ **Rasa S., Jornsgard B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L. (2001).** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) stains to Salinity, PH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* **32 (6)**. pp 379-383.
- ☞ **Raven P.H., Evert R.F., Eichlorn S.E. (2000).** Biologie végétale. Édition : de boeck université. 6<sup>ème</sup> Édition. Paris-Fance. 968p.

S

- ☞ **Sanchez-Conizaresa C., Rey L., Duran D., Temprano F., Sanchez-Jiméneza P., Navarroc A., Polajnard M., Imperiala J., Ruiz-Argüeso T. (2011).** Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *lupins mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.***34**. pp 207-215.
- ☞ **Schwinghamer E. A. (1967).** Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek. *J. Microbiol. Serol.* **33**. pp 121-136.
- ☞ **Shimoda Y., Luhan., Yannazak T., Suzuki R., Hayashi M., Imaizumi-Anraki H. (2012).** Rhizobial and Fungal Symbiosis Show Different Requirement for Calmodulin Binding to Calcium Calmodulin-Dependent Protein Kinase in *Lotus japonicus*. *The plant cell.* **24**. 304p.
- ☞ **Singleton P. W., El Swaify S. A., Bohlool B.B. (1982).** Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.***44**. pp 884-890.
- ☞ **Somasegaran P., Hoben H.J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. In. 450p.
- ☞ **Spraink H.P., Blodergoen M.R. (1998).** Gènes and signal molecules involved in the rhizobia. *Curr. Opin. Plant. Biol.***1**. 353p.
- ☞ **Stowers M.D. (1985).** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev Microbiol.* **39**. pp 89-108.
- ☞ **Swaraj K., Bishnoi N.R. (1999).** Effect of salt stress on nodulation and Nitrogen fixation temperature and phage sensivity of *Rhizobium* sp. (Galets) compared with other fast-growing.

T

- ☞ **Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli B., Benhizia H., Khelifi D., Squartini A. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées a partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hédysarum* : *H.pallidum* des f., *H. spinosissimum* subs.*capitatum*, *M. cornosum* des f.et *H.naudinianum* *coss.* *Scien. Technol.* C-N°**32**. pp 43-44.
- ☞ **Tourte Y., Bordonean M., Henry M. (2005).** Le monde des végétales organisations, physiologie et génomique. De DUNOD. Paris. France.

V

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

W

- ☞ **Wathman F. (1967).** Fleurs du bassin méditerranéen. Ed. Paris.VI.24p.
- ☞ **Weaver R. W., Frederick L.R. (1982).** *Rhizobium*. In Methods of Soil Analysis. Part2- Chemical and Microbiological Properties, 2<sup>nd</sup> ed. (A. L. Page, R. H. Miller and D. R, Keeny, Eds). *Am. Soc. Argo.* pp 1043-1070.
- ☞ **Weir B.S. (2016).** The current taxonomy of rhizobia. NZ rhizobia. [http :](http://www.rhizobia.co.nZ/taxonomy/rhizobia.html)
- ☞ **Werner D. (1992).** Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium. Fredii.* *Acad. Sin.*39p.

Y

- ☞ **Yang S., Tang F., Gao M., Koishnam H.B., Zhu H. (2010).** R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *PNAS.***107.** 18735p.
- ☞ **Yaw Boakeye E., Dotse Lawson I.Y., Akyea Danso S.K., Kwame offei S. (2016).**Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis.***69.** 89p.

Z

- ☞ **Zahrn H.H. (1999).** *Rhizobium*-legume symbiosis and Nitrogen fixation under server condition and in an arid climate. *Microbiol. Molec. Bio. Rev.***63 (4).** 968p.
- ☞ **Zakhia F., De Lajudie P. (2001).** Taxonomy of rhizobia. *Agronomie, EDP. Scien.* **21 (6-7).** pp 569-576.

- ☞ **Zhang F., Charles T. C., Pan B et Smith D. L. (1996).** Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum* nod genes at low temperatures. *Soil Biol. Biochem.* **28.** pp 1579-1583.
- ☞ **Zhang Z.Q., Wong M.H., Nie X.P., Lan C.Y. (1998).** Effects of zinc (zinc sulfate) on Rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculaeformis*) symbiotic. *Associate. Biol. Technol.* **64.** pp 97-104.

# Annexes

**Annexe 1:** Composition des milieux de cultures (pour 1 litre) (Vincent, 1970).

**Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)**

Mannitol .....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> 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 <sub>4</sub> .....	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1g
7H <sub>2</sub> O, MgSO <sub>4</sub> .....	2.5g
NaCl.....	1g

• Dilution (X1)

Solution stock .....	100ml
FeCl <sub>2</sub> .....	0.3ml
Solution d'oligoélément .....	1ml
H <sub>2</sub> O .....	3.5l

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

## Annexe 2: Composition des réactifs.

<b>JAMES</b>	5 ml	R1 : HCl 1N R2 : Composant J 2183 (confidentiel)	100 ml 0,66 g
<b>NIT 1</b> <u>CORROSIF</u> : R34, S2, S23, S26	5 ml	Acide sulfanilique Acide acétique H <sub>2</sub> O	0,4 g 30 g 70 ml
<b>NIT 2</b> <u>CORROSIF</u> : R34, S2, S23, S26	5 ml	N,N-diméthyl-1-naphtylamine Acide acétique H <sub>2</sub> O	0,6 g 30 g 70 ml

## Annexe 3: pH (moyenne de trois déterminations).

<b>pH</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>S<sub>36</sub></b>	0.130	0.315	0.611	0.543	0.339	0.250	0.141
<b>S<sub>347</sub></b>	0.218	0.341	0.605	0.556	0.369	0.346	0.226
<b>S<sub>354</sub></b>	0.171	0.359	0.590	0.617	0.450	0.345	0.254
<b>S<sub>522</sub></b>	0.191	0.375	0.319	0.362	0.389	0.225	0.163
<b>S<sub>217</sub></b>	0.183	0.327	0.507	0.694	0.474	0.238	0.199
<b>S<sub>637</sub></b>	0.145	0.337	0.619	0.668	0.521	0.306	0.182
<b><i>B.japonicum</i></b>	0.149	0.205	0.309	0.338	0.260	0.232	0.02
<b><i>B.elkanii</i></b>	0.05	0.096	0.207	0.355	0.368	0.151	0.014

## Annexe 4: Température (moyenne de trois déterminations).

<b>T°C</b>	<b>20°C</b>	<b>24°C</b>	<b>28°C</b>	<b>32°C</b>
<b>S<sub>36</sub></b>	0.194	0.250	0.485	0.210
<b>S<sub>347</sub></b>	0.150	0.292	0.437	0.295
<b>S<sub>354</sub></b>	0.132	0.212	0.317	0.310
<b>S<sub>522</sub></b>	0.163	0.325	0.443	0.229
<b>S<sub>217</sub></b>	0.155	0.274	0.459	0.324
<b>S<sub>637</sub></b>	0.150	0.350	0.495	0.450
<b><i>B.japonicum</i></b>	0.110	0.118	0.209	0.178
<b><i>B.elkanii</i></b>	0.099	0.120	0.252	0.168

## Annexe 5: Salinité (moyenne de trois déterminations).

[NaCl] Souches	100	200	300	400
	S <sub>36</sub>	0.536	0.389	0.265
S <sub>347</sub>	0.528	0.368	0.238	0.134
S <sub>354</sub>	0.595	0.365	0.275	0.192
S <sub>522</sub>	0.517	0.329	0.226	0.186
S <sub>217</sub>	0.589	0.416	0.292	0.151
S <sub>637</sub>	0.551	0.307	0.264	0.197
<i>B.japonicum</i>	0.628	0.550	0.386	0.330
<i>B.elkanii</i>	0.530	0.513	0.406	0.348

## Annexe 6: Tableau de lecture des galeries.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incoloré      rose-rouge	
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min rose      incolore	
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptOphane)	JAMES / immédiat incoloré vert pâle / jaune      rose	
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- $\beta$ D- galactopyranoside	0,22	$\beta$ -galactosidase (Para-NitroPhényl- $\beta$ D- Galactopyranosidase)	incoloré	jaune
[GLU]	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (MaNosE)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
[CAP]	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
[PAC]	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

## Annexe 7: Résistance des souches aux antibiotiques.

<b>Antibiotiques</b> <b>Souches</b>	<b>Tétracycline</b>	<b>Erythromycine</b>	<b>Gentamycine</b>	<b>Oxacylline</b>
<b>S<sub>36</sub></b>	35 mm	11 mm	15 mm	0 mm
<b>S<sub>347</sub></b>	32 mm	12 mm	13 mm	0 mm
<b>S<sub>354</sub></b>	32 mm	13 mm	13 mm	0 mm
<b>S<sub>522</sub></b>	34 mm	14 mm	13 mm	0 mm
<b>S<sub>217</sub></b>	40 mm	20 mm	15 mm	0 mm
<b>S<sub>637</sub></b>	10 mm	11 mm	12 mm	0 mm
<b><i>B.japonicum</i></b>	33 mm	36 mm	20 mm	20 mm

## Résumé

Six souches de rhizobia ont fait l'objet de plusieurs tests afin de les caractériser phénotypiquement, à travers l'étude des caractères cellulaires, morphologiques, culturels, physiologiques et biochimiques, ces tests sont complétés par l'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques. L'étude de leur potentiel symbiotique avec quatre genres de légumineuses a été réalisée afin de déterminer leur capacité à former des nodules,

Cette étude a montré que les souches étudiées ont une bonne croissance 28°C, et entre pH 6 et 7, cependant le NaCl affecte négativement la croissance lorsque sa concentration dépasse 100 mmol. Ces souches présentent des caractères biochimiques différents et la plupart sont sensibles aux antibiotiques utilisés et n'ont aucune spécificité de nodulation.

**Mots-clés :** caractérisation phénotypique, rhizobia, légumineuse.

## Abstract

Six strains of rhizobia has been studied through many experiments in the purpose of phenotypic characterisation through cellular, morphological, cultural, biochemical and physiological characters, this experiment was completed with study of the antibiotics resistance and also to confirm their capacity symbiotic using four types of legumes,.

This study showed that the strains have a good growth in the temperature 28°C, and between pH 6 and 7, but concentrations up to 100 mmol NaCl has a negative effect on the rhizobia growth. These strains present a different biochemical characters and the majority of the strains was sensitive to the antibiotics used in this study, this rhizobia showed also a capacity to nodulate other plants belonging to *Genisteeae* tribe.

**Key words:** phenotypic characterisation, rhizobia, legume.

## ملخص

تمت دراسة ستة سلالات من الريزوبيا، وذلك عن طريق عدة تجارب تم القيام بها بهدف تمييزها ظاهريا، من خلال المميزات الخلوية الشكلية، الزراعية، الفيزيولوجية والبيوكيميائية وتم إستكمال هذه التجارب بدراسة مقاومة سلالات الريزوبيا للمضادات الحيوية، وأيضا دراسة الميزة التعايشية لهذه السلالات مع أربعة أنواع من البقوليات وقدرتها على تشكيل العقيدات الجذرية لدى هذا النوع من النباتات،

هذه الدراسة بينت أن السلالات المدروسة لها نمو جيد ما عند وضعها في 28 درجة مئوية و درجة الحموضة بين 6 و7، أما بالنسبة للملوحة فهي تؤثر سلبا على النمو كلما تجاوز تركيز كلوريد الصوديوم 100 ملي مول. إضافة إلى خصائصها الكيميائية المختلفة فان اغلبها حساس للمضادات الحيوية ولا تملك أية خصوصية في تشكيل العقيدات الجذرية.

**الكلمات المفتاحية:** الوصف المظهري، ريذوبيا، البقوليات.