

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie de l'environnement



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Caractérisation phénotypique des
bactéries nodulant *Vicia sativa* L. et
Vicia tetrasperma L.**

Présenté par :

KADI Fahem & KHELIL Hassina

Soutenu le : 13 Juin 2015

Devant le jury composé de :

M. BELHADI Djellali
M. RAMDANI Nacer
M^{me} SAIDANI Karima

MAA
MAA
MAA

Président
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Nous avons eu la chance et le grand plaisir d'effectuer ce travail au sein du laboratoire de biologie des sols de l'université Abderrahmane-Mira -Béjaia.

Nous tenons à remercier, tout d'abord, Allah, le tout puissant, qui nous a donné la force, santé et courage pour achever ce modeste travail.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance et gratitude à tous ceux qui ont apporté leur aimable contribution à ce travail de près ou de loin par leurs conseils, remarques, encouragements et leurs compétences en particulier:

Notre promoteur M^r **Ramdani Nacer**, Maître Assistant classe A, non seulement pour l'aide très précieuse qu'il nous a apporté, son enthousiasme communicatif, sa patience et sa générosité, ainsi que sa totale disponibilité pour l'encadrement de ce travail.

Notre président de jury M^r **Belhadi Djellali**, Maître Assistant classe A, d'avoir accepté de juger notre travail et nous avoir guidés et soutenus.

Notre examinatrice M^{me} **SAIDANI Karima**, Maître Assistante classe A, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Mes remerciements vont également à M^{me} **Ramdani T.** et M^{me} **Ziane D.**, pour leur simplicité, sympathie et leur gentillesse.

Nous tenons à remercier aussi tous les travailleurs de département de Microbiologie sans exception.

«Les difficultés que tu traverseras tout au long de la vie, ne sont pas là pour te détruire, mais

Pour t'aider à réaliser ton plein potentiel »

Fahem et Hassina

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents et grands parents,

Ainsi que toute ma famille,

Qui ont attendu avec patience les fruits de leur bonne éducation, pour toutes les privations et sacrifices consentis, pour faire de moi la femme que je suis aujourd'hui, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'il m'ont fait.

A tous mes enseignants,

En témoignage du respect et de ma gratitude que je leur doit.

A mes tendres et chères sœurs et frères,

Avec qui j'ai partagé tous les moments de ma vie.

Mes dédicaces sont également adressées à tous mes chères amies:

Sylia, Mimi, Hayat, Akila, Samra, Nassima, Lydia, Zoubida, Zina, Mounira,

Samiha, Lyna, Kamilia, Nawal, Hanane, Fouzia.

A ma copine Sabrina Melloui et son oncle Melloui Zoubir et Dakli et sa famille

Sans oublier de remercier mon binôme Fahem et toute sa famille.

A ma 2^{ème} famille : tous mes collègues et amis du laboratoire, Namir, Mounia, Fatiha et Kahina pour leurs amitiés et leur aide précieuse.

Enfin à toute la promotion : 2014-2015

HASSINA.

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | |
| Dédicaces | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| INTRODUCTION | 1 |
| Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 3 |
| 1 .Généralités sur la fixation biologique de l'azote atmosphérique | 3 |
| 1.1. Bactéries fixatrices d'azote | 3 |
| 1.1.1. Fixateurs libres | 4 |
| 1.1.2. Fixateurs symbiotiques | 4 |
| 1.2. Nitrogénase | 5 |
| 2. Symbiose rhizobia-légumineuses | 5 |
| 2.1. Partenaire bactérien : rhizobia | 6 |
| 2.1.1. Définition et caractéristiques | 6 |
| 2.1.2. Diversité taxonomique des rhizobia | 6 |
| 2.2. Partenaire végétal : légumineuse | 7 |
| 2.2.1. Importance des légumineuses | 8 |
| 2.2.1.1. Intérêt agronomique des légumineuses | 8 |
| 2.2.1.2. Intérêt alimentaire des légumineuses | 8 |
| 2.3. Intérêts de la symbiose | 8 |
| 2.4. Spécificité de la symbiose | 9 |
| 2.5. Dialogue moléculaire Rhizobia-légumineuse | 9 |
| 2.6. Nodulation | 10 |
| 2.6.1. Substances responsables de la nodulation | 10 |
| 2.6.1.1. flavonoïdes | 10 |
| 2.6.1.2. Facteurs Nod | 10 |
| 3. Méthodes d'études de la diversité des BNL | 11 |
| 3.1. Méthodes phénotypiques | 11 |
| 3.2. Méthodes génotypiques | 11 |
| 4. Genre Vicia | 12 |
| 4.1. Vicia sativa L. | 12 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. <i>Vicia tetrasperma</i> L..... | 12 |
| CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES..... | 12 |
| 1. MATERIELS..... | 14 |
| 1.1. Sites de collecte des échantillons..... | 14 |
| 2. METHODES..... | 15 |
| 2.1. Analyse physico-chimiques des sols..... | 15 |
| 2.1.1. Analyse physique..... | 15 |
| ➤ Analyse granulométrique..... | 15 |
| ➤ Potentiel d'hydrogène..... | 15 |
| ➤ Conductivité électrique..... | 15 |
| ➤ Humidité du sol..... | 16 |
| 2.1.2. Analyse chimique..... | 16 |
| ➤ Dosage du calcaire total..... | 16 |
| ➤ Dosage du calcaire actif..... | 16 |
| ➤ Dosage du carbone organique..... | 16 |
| ➤ Dosage de l'azote total..... | 16 |
| ➤ Dosage du phosphore assimilable 'Olsen'..... | 17 |
| ➤ Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC)..... | 17 |
| ➤ Dosage du Ca ²⁺ et Mg ²⁺ | 17 |
| 2.2. Isolement des bactéries à partir des nodules de <i>Vicia</i>..... | 17 |
| 2.2.1 Stérilisation des nodules..... | 18 |
| 2.2.2. Extraction des bactéries des nodules..... | 18 |
| 2.2.3. Purification des souches..... | 18 |
| 2.2.4. Test d'authentification..... | 18 |
| ➤ <i>Désinfection des graines</i> | 18 |
| ➤ <i>Germination des graines</i> | 19 |
| ➤ <i>Inoculation des plantules</i> | 19 |
| 2.3. Identification des souches..... | 20 |
| 2.3.1. Caractérisation cellulaires et morphologiques..... | 20 |
| 2.3.2 Caractérisation biochimique..... | 21 |
| 2.3.3. Analyse numérique..... | 22 |
| Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION..... | 23 |
| 1. Caractérisation physico-chimique du sol..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Isolement et authentification des souches | 24 |
| 3. Caractérisation des bactéries isolées des nodules des plantes du genre <i>Vicia</i> | 25 |
| 3.1. Caractérisation phénotypique | 25 |
| 3.1.1. Caractères culturaux | 25 |
| 3.2. Caractères morphologiques des bactéries | 27 |
| 3.3. Caractérisation biochimique | 27 |
| 3.3.1. Croissance bactérienne | 27 |
| 3.3.2. Recherche de quelques activités enzymatiques et caractères biochimiques | 29 |
| 3.3.3. Utilisation des sucres | 30 |
| 3.4. Caractérisation physiologique | 31 |
| 3.4.1. Effet de la température | 31 |
| 3.4.2. Effet du pH | 32 |
| 3.4.3. Résistance intrinsèques aux antibiotiques | 33 |
| 3.5. Analyse numérique des caractères phénotypiques | 35 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 37 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 39 |
| ANNEXES | |

LISTE DES TABLEAUX

| | Pages |
|--|-----------|
| Tableau I : Résultats des analyses physico-chimiques du sol | 23 |
| Tableau II : Résultats du test d'authentification..... | 24 |
| Tableau III : Caractères cultureux des colonies..... | 25 |
| Tableau IV : Temps de génération des souches..... | 28 |
| Tableau V : Caractérisation biochimique des souches | 30 |
| Tableau VI : Utilisation des sucres par les bactéries | 31 |
| Tableau VII : Résultats de l'antibiogramme | 34 |
| Tableau VIII : Caractères phénotypiques utilisés dans l'analyse numérique | (annexe3) |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Photo de des plantes de <i>Vicia</i> étudiées | 14 |
| Figure 02 : Germination des graines de <i>Vicia sativa</i> sur milieu Jensen gélosé | 19 |
| Figure 03 : Test d'inoculation des souches en association avec <i>Vicia sativa</i> | 20 |
| Figure 04 : Aspects morphologique des colonies bactériennes sur milieu YMA | 26 |
| Figure 05 : Résultats du test de Bleu de bromothymol sur milieu YMA..... | 27 |
| Figure 06 : Effet de la température sur la croissance des bactéries | 32 |
| Figure 07 : effet du pH sur la croissance des bactéries..... | 33 |
| Figure 08 : Exemple de résultat de l'antibiogramme sur milieu Muller Hinton | 34 |
| Figure 09 : Dendrogramme généré de l'analyse numérique des caractères phénotypiques.... | 35 |

LISTE DES ABBREVIATIONS

A: Agiles

ADH: Arginine déshydrogénase

AM: Ampiciline

BNL : Bactéries nodulant les légumineuses

BTB: Bleu de bromothymol

CEC : Capacité d'échange cationique

CMC: CarboxyMéthylCellulose

CN: Gentamycine

E: Erythromycine

KDa : Kilo Dalton

LF: limons fins

LG: limons grossiers

LDC: Lysine décarboxylase

nif: gène de fixation d'azote

Nod : Facteurs de nodulation

nod : gène de nodulation

noe : gène de nodulation

nol : gène de nodulation

ODC: Ornithine Décarboxylase

OX: Oxaciline

P: pénicilline

ppm : partie par million

PRL: Pipéracilline

RM : Rouge de méthyle

SF: Sables fins

SG: Sables grossiers

SXT: trimethoprine sulphamethoxazole

TDA: Tryptophane Désaminase

TE: Tetracycline

TIC: ticarcilina

USDA: United State Diagramme of Agriculture

VP: Voges-Proskauer

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol Broth

INTRODUCTION

L'azote est l'un des éléments majeurs de la matière vivante. Sous sa forme gazeuse, constitue les trois-quarts de l'atmosphère, mais n'est pas directement assimilable par les végétaux, ces derniers ne peuvent l'utiliser que sous forme combinée, organique ou minérale.

La réduction de l'azote moléculaire en azote combinée s'effectue de façon chimique lors de la production d'engrais azotés, mais cette production industrielle est fort coûteuse en énergie. De plus, les engrais chimiques qui sont utilisés pour améliorer la fertilité des sols, entraînent sur le long terme, une réduction des périodes de jachères, une dégradation des propriétés physico-chimiques, suivie d'une baisse de la fertilité des sols et de la pollution des nappes phréatique et des eaux de surface (Hopkins, 2003).

Dans une perspective de gestion durable des sols, de préservation de l'environnement et de diminution des apports de fertilisants chimiques, le retour vers les pratiques biologiques conservatrices de l'environnement et assurant une sécurité alimentaire, devrait constituer une solution appropriée pour la restauration de la fertilité des sols cultivés. Ainsi, la fixation biologique d'azote permet un enrichissement naturel du sol en azote et son exploitation à des fins agronomiques comme alternative aux engrais azotés semble très prometteuse pour l'avenir. En effet, les légumineuses grâce à leurs multiples usages nutritionnels, représentent un candidat incontournable dans la restauration de la fertilité des sols appauvris. Par leur grande diversité, les légumineuses sont utilisées dans les rotations biennales céréales-légumineuses fourragères pour améliorer les productions de matière sèche et de protéines du fourrage destiné à l'alimentation des ruminants, et aussi dans la lutte contre l'érosion en améliorant la structure du sol (Abbas et al., 2006) et (Oram, 1956, cité par Abdelmoneim, 1992).

Parmi les légumineuses fourragères cultivables sur les jachères, les espèces annuelles du genre *Vicia* peuvent être utilisées comme foin ou en grain pour l'alimentation du bétail. Ces vesces se cultivent en association avec une céréale fourragère (l'avoine, l'orge ou le triticale) et donnent un foin d'excellente qualité (Rihawy et al., 1987). Ce genre parmi les légumineuses, contracte une symbiose avec certaines bactéries fixatrices d'azote qui représentent les partenaires les plus prépondérants de cette symbiose, car elles sont responsables de la formation des nodules fixateurs d'azote au niveau des racines de ces

plantes. Cependant, cette association symbiotique se trouve limitée par les conditions défavorables de l'environnement telles que la sécheresse, le pH défavorables et la salinité. De ce fait, la nécessité de connaître la diversité des deux symbiotes est un préalable à toute utilisation des potentialités de ce phénomène (Graham, 1992)..

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui a pour but principal l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries associées à deux espèces de légumineuses du genre *Vicia* (*Vicia sativa* L. et *Vicia tetrasperma* L.), collectées au niveau du site de l'université de Bejaia (campus de Targa Ouzemour).

Ce mémoire est structuré en trois chapitres : le premier traite les généralités sur la fixation symbiotique et les deux partenaires de la symbiose, le deuxième chapitre présente les matériels et méthodes suivis pour sa réalisation, le troisième est consacré à la présentation des résultats et leurs discussions et enfin, nous terminerons par une conclusion et quelques perspectives.

SYNTESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur la fixation biologique de l'azote atmosphérique

Après l'eau, l'azote est l'un des éléments majeurs de la matière vivante. C'est un facteur limitant majeur de la production agricole, car il intervient dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle (Hopkins, 2003).

L'azote combiné, directement assimilable par les êtres vivants, représente l'infime pourcentage de 0,001 % de l'azote total de la biosphère; alors que l'atmosphère terrestre est constituée de 79% d'azote moléculaire gazeux (N_2). Ce dernier constitue la principale réserve naturelle d'azote pour la biosphère. Cependant cette source quasi inépuisable n'est pas assimilable par la plupart des êtres vivants supérieurs, seuls les organismes appartenant au groupe des procaryotes, appelés fixateurs d'azote ou diazotrophes, sont capables de le réduire sous une forme combinée assimilable (Newton, 1998).

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère de l'environnement. Les bactéries fixatrices d'azote possédant un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, assurent la réduction de l'azote moléculaire (N_2) en azote ammoniacal (NH_3). Cette forme d'azote combiné représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote dans le squelette carboné (Hopkins, 2003).

L'intérêt de la fixation biologique de l'azote par la culture des légumineuses a été mis en avant de longue date comme support de la fourniture d'azote aux systèmes cultivés et demeure stratégique dans le contexte actuel de mise au point de modes de production agricoles plus économes énergiquement et plus respectueux de l'environnement (Vertès et *al.*, 2010 ; Thiébeau et *al.*, 2010).

1.1. Bactéries fixatrices d'azote

Les bactéries diazotrophes présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux. Ils vivent soit à l'état libre dans le sol, éventuellement

en association avec un végétal, soit en symbiose avec un végétal (Luttge et *al.*, 1994, Vilain, 1997). Ils se regroupent en deux grandes catégories :

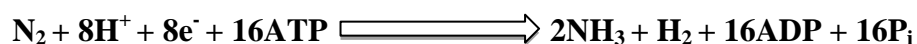
1.1.1. Fixateurs libres (appelés aussi bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques), vivant dans le sol, appartiennent à des genres très divers, ce sont principalement :

- Des bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas*
- Des bactéries anaérobies : *Clostridium*.
- Des bactéries associatives, représentées essentiellement par les *Azospirillum* (Luttge et *al.*, 1994).

1.1.2. Fixateurs symbiotiques comprennent :

- Le groupe des rhizobia qui établissent une association symbiotique avec les légumineuses dans des structures racinaires ou caulinaires organisées appelées nodosités ou nodules. La formation de ces nodosités exige une relation génétique intime entre les deux partenaires de la symbiose (Hopkins, 2003 ; Perry et *al.*, 2004).
- Les symbioses Frankia-plantes actinorhiziennes où les bactéries actinomycètes du genre Frankia infectent les racines de plantes des genres *Alnus* et *Casuarina*. Ils forment des nodules au niveau des racines et dans lesquels, des filaments bactériens se développent à l'intérieur des cellules, celles-ci se différencient en vésicules sièges de la fixation de l'azote (Tortora et *al.*, 2003 ; Perry et *al.*, 2004). Les cyanobactéries (algues bleu vert), vivant à la surface des racines des plantes ou même dans les tissus de certains végétaux, développent des symbioses avec un grand nombre de plantes : Nostoc et Celothrix chez les lichens, Anaebaena chez les champignons, les fougères ainsi que certains Arbres (Hopkins, 2003 ; Pelmont, 2005).

Ces microorganismes sont capables de réduire l'azote gazeux suivant la réaction globale :



Cette réaction se déroule sous des conditions normales de température et de pression, grâce à la nitrogénase (Newton, 1998).

1.2. Nitrogénase

La nitrogénase est un complexe enzymatique qui contient du molybdène, du fer, et de sulfate dans ces groupements prosthétiques. Ces éléments sont donc indispensables à la fixation de l'azote. La nitrogénase utilise également de grandes quantités d'ATP comme source d'énergie ce qui fait de la fixation de l'azote un processus métabolique onéreux.

Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez les procaryotes. Le complexe nitrogénase est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. Elle est constituée de deux composantes :

1) Composante I, appelée aussi molybdoprotéine ou MoFe protéine, c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités tétramériques ($\alpha_2\beta_2$) de 220KDa. Chaque monomère contient un centre (4Fe-4S) reliés entre eux deux par deux. Ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8Fe et 2atomes de molybdène (Mo), utilisés pour réduire N_2 en NH_3 (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

2) Composante II, appelée dinitrogénase réductase, fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques de 64KDa, elle contient du fer et se comporte comme une réductase (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

2. Symbiose rhizobia-légumineuses

La symbiose fixatrice d'azote la plus répandue et la mieux étudiée est celle qui associe les rhizobia et les plantes de la famille des légumineuses (Allen et Allen, 1981). Certains rhizobia sont capables également de s'associer symbiotiquement avec une plante non-légumineuse du genre *Parasponia* (Young 1996 ; Behm et al., 2015 *in press*).

L'association symbiotique est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie, à la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire notamment. La bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines de véritables organes spécialisés, appelés nodules ou nodosités, à l'intérieur desquels la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Gibson et al., 2008). Certaines légumineuses appartenant aux genres *Sesbania*, *Neptunia*, *Discolobium*, ou *Aeschynomene* sont également capables de former des nodules sur les

tiges, appelés nodules caulinaires (Dreyfus et Domergue, 1981a ; Boivin et *al.*, 1997 ; Giraud et Fleischman, 2004).

La mise en évidence d'un nodule fixateur d'azote est le résultat d'une série d'étapes complexes mettant en jeu les deux partenaires symbiotiques (Djordjevic et *al.*, 1987).

2.1. Partenaire bactérien : rhizobia

2.1.1. Définition et caractéristiques

Rhizobiums ou rhizobia est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les racines des légumineuse et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose (Zakhia et de Lajudie, 2006). Ce terme a été substitué par le terme de BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuse) (Zakhia et *al.*, 2004).

Les rhizobiums sont des micro-symbiotes facultatifs qui se trouvent soit à l'état libre ou à l'état symbiotique sous forme de bactéroïdes avec une taille dix fois plus grande (Van Berkum et *al.*, 1998). Elles se présentent sous forme de coccobacilles ou en bâtonnets réguliers de 0.6 à 0.8µm de large et 1 à 4µm de long (Domergue et Mangenot, 1970). Généralement très mobiles, elles sont munies d'un seul flagelle polaire, ou de 2 à 6 flagelles péritriches (Jordan, 1984a ; Bergey's Manual Trust, 2001). Ces bactéries sont des Gram négatives et asporulées. Elles sont strictement aérobies (Pelmont, 1993) et la plupart sont des chimio-organotrophes, capables de se développer en présence d'une simple source de carbone et d'azote (Young et *al.*, 2001). Elles nécessitent des sels minéraux telle que Ca et Mg, qui sont indispensables pour la construction de leur membrane cellulaire (Rezki, 1990 ; Chenine, 1991). Les rhizobiums à croissance rapide forment des colonies circulaires convexes, généralement translucides avec un diamètre de 2 à 4mm après 3 à 5jours sous des conditions optimales d'incubation. En revanche, les souches à croissances lente du genre *Bradyrhizobium* forment des colonies circulaires convexes et rarement translucides avec un diamètre de 1 à 2mm après 5 à 7jours d'incubation (Vincent, 1970).

2.1.2. Diversité taxonomique des rhizobia

La classification des rhizobia est en changement permanent (Zakhia et de Lajudie, 2001; Weir, 2012). Ceci est dû aux progrès technologiques dans chacun des critères utilisés pour la taxonomie : la morphologie la physiologie et l'analyse des séquences.

Les rhizobia comportent 98 espèces réparties en 13 genres (Weir, 2012: <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>). Tous classés dans les protéobactéries. La plupart appartiennent à la subdivision alpha des protéobactéries dans les genres, *Rhizobium* (Frank, 1889 in Jarvis et al., 1992), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) et *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Devosia* (Rivas et al., 2003), *Ochromobactrum* (Ngom et al., 2004) et *Phyllobacterium* (Mantelin et al., 2006).

Au cours de ces dernières années des rhizobia induisant des nodules, moins fréquemment isolés, ayant une distribution géographique réduite et un spectre d'hôtes limité, ont été aussi découverts dans la subdivision des bêta protéobactéries, dans les genres *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), *Cupriavidus* (Chen et al., 2001 ; Vandamme et Coenye, 2004), *Herbaspirillum* (Valverde et al., 2003) et *Shinella* (Lin et al., 2008). D'autres études auraient également identifié la présence de protéobactéries de la subdivision gamma dans les nodules des légumineuses (Benhizia et al., 2004), mais ces résultats restent sujet à controverse (Muresu et al. 2008)

2.2. Partenaire végétal : légumineuses

Les légumineuses ou fabacées, constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les Angiospermes, avec près de 20000 espèces végétales réparties dans 800 genres (Petr Smýkal et al., 2015). C'est l'une des familles les plus diversifiées du groupe des plantes supérieures qui comprend trois sous-familles, les *Papilionoïdées*, les *Mimosoïdées* et les *Caesalpinioïdées* (Guignard et Dupont, 2005). Elle constitue de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven et al., 2000). Elle doit son unité à son fruit appelé gousse ou légume, d'où le nom des légumineuses sous lequel cette famille est plus connue (Ozenda, 1991). Elle renferme aussi bien des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses, tempérées, tropicales, et même arctiques du globe terrestre (Allen et Allen, 1981 ; Young et al., 1989). Seul un petit nombre de ces espèces a été examiné (à peu près 20 %) pour leur capacité à induire une nodulation (Allen et Allen, 1981). On estime cependant, que 80 % d'entre elles forment des symbioses racinaires. La nodulation par les rhizobia est plus fréquente dans les sous-familles des *Papilionoïdées* (97 %) et des *Mimosoïdées* (90 %), que dans la sous-famille des *Caesalpinioïdées* (23 %) (Polhill et Raven, 1981).

2.2.1. Importance des légumineuses

2.2.1.1. Intérêt agronomique

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote (Journet et *al.*, 2001). Elles ne nécessitent aucune fertilisation azotée et contribuent naturellement à enrichir le sol en azote, ce qui permet de réduire les coûts de production et de diminuer les pertes dues à l'érosion. Elles ont la capacité également de solubiliser des phosphates de calcium et le phosphore par leurs exsudats racinaires (Lazrak, 2008).

2.1.1.2. Intérêt alimentaire

Compte tenu de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, les légumineuses produisent des protéines en abondance (leurs graines contiennent 3 fois plus de protéines que ceux des céréales), sans fertilisation azotée. Ainsi, dans de nombreuses régions pauvres de la planète, ces espèces adaptées constituent une importante source de nourriture humaine (pois chiche, haricot, pois, lentilles, arachide...) et elles représentent pour les populations un apport en protéines peu coûteux, néanmoins important (18% à 33% de la graine sèche) (Baudoin, 2001). Elles constituent aussi une source de revenu (huile, gomme,...), de fourrage (luzerne, trèfle,...) et de bois (Acacia, Dalbergia,...). Ainsi, les légumineuses couvrent globalement 66% des besoins de subsistance des communautés rurales dans les pays en voie de développement, tout en assurant un maintien durable de la fertilité des sols et de l'équilibre des écosystèmes (Domergue, 2006).

2.3. Intérêts de la symbiose

La fixation de l'azote par association symbiotique entre les rhizobia et la grande famille des légumineuses apparaît d'un intérêt stratégique renforcé tant pour sa capacité à fournir de l'azote à faible coût aux systèmes de culture que pour ses répercussions environnementales (Germon, 2013). On estime à environ 60 millions de tonnes par an l'azote fixé de cette manière par les légumineuses cultivées. Les légumineuses sont principalement utilisées dans l'alimentation humaine et animale pour leur teneur élevée en protéines, elles couvrent environ 33% de nos besoins alimentaires en azote, principalement sous forme de grain (Graham et Vance, 2003). Ces cultures représentent un marché mondiale d'environ 2 milliards de dollars par an (Lindstrom et *al.*, 2010).

Au-delà de cet aspect agronomique, certaines espèces de plantes non cultivées et d'arbres de la famille des légumineuses sont aussi d'un grand intérêt dans les écosystèmes naturels en permettant la colonisation de milieux pauvres en azote grâce à cette capacité symbiotique (Graham et Vance, 2003).

2.4. Spécificité de la symbiose

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobium- légumineuse est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de rhizobium donnée n'est capable, en général, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même, une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de rhizobium. (William, 2003). Cette spécificité serait contrôlée par les lectines de l'hôte qui reconnaissent certains glucides des capsules bactériennes. Les lipopolysaccharides sont un des composés minoritaires de la membrane bactérienne externe qui jouent aussi un rôle important dans la spécificité rhizobiums légumineuses (Lerouge et *al.*, 1990 ; Dénarié et *al.*, 1996).

2.5. Dialogue moléculaire rhizobia-légumineuse

La symbiose rhizobium-légumineuse est le résultat de l'interaction complexe entre la bactérie et son hôte. Ces interactions débutent par une reconnaissance mutuelle faisant intervenir un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. Les flavonoïdes libérés par les racines de la plante constituent le premier signal moléculaire; ils sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes, les protéines NodD. L'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol* collectivement appelés gènes *nod*) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices (*nodbox*) situées en amont des gènes *nod*. Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochito-oligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod (Lerouge et *al.*, 1990 ; Dénarié et *al.*, 1996), qui sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante (Kouchi et *al.*, 2010). Ces facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire. Par la suite, l'activation de nombreux gènes permet la mise en place et le contrôle de l'infection et de la différenciation du nodule (Dénarié et *al.*, 1996 ; Perret et *al.*, 2000).

2.6. Nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Anna, 2008 ; Lohar et *al.*, 2009).

2.6.1. Substances responsables de la nodulation

2.6.1.1. Flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes *nod*

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol (Taylor et Grotewold, 2005; Gibson et *al.*, 2008), induisant l'expression des gènes de nodulation chez rhizobium (Cooper 2007; Zhang et *al.*, 2009).

Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes (Cooper, 2004; Perret et *al.*, 2000) dont les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses (Brencic et Winans, 2005).

2.6.1.2. Facteurs Nod

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

La longueur et la saturation des composants de substitués d'acides gras du noyau lipooligosaccharide, le type et la position des divers substitués sur les facteurs Nod, jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

3. Méthodes d'études de la diversité des BNL

3.1. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques incluent toutes les techniques ne faisant pas appel aux acides nucléiques et reposent sur la détermination des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des bactéries via des techniques standardisées (Graham et *al.*, 1991 ; Vandamme et *al.*, 1996). Les critères morphologiques fournissent des renseignements concernant les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, présence de flagelles, coloration de Gram, présence d'endospores) et l'aspect des colonies observées sur la boîte de culture (taille, forme, couleur, état de la surface). Les principales méthodes biochimiques sont basées sur la détermination de l'activité de différents enzymes caractéristiques de certains groupes de bactéries. L'étude des caractères physiologiques impliqués dans l'identification bactérienne repose sur la détermination de la vitesse de croissance, la capacité d'utiliser différentes sources de carbone, la croissance à différentes variations de température, du pH, de sels, d'antibiotiques et de métaux lourds. Ces analyses physiologiques sont souvent influencées par les facteurs environnementaux.

Les caractéristiques phénotypiques classiques sont toujours admises comme étape primordiale pour la description et l'identification des souches d'une même espèce (Vandamme et *al.*, 1996). Il est important de noter que les taxonomistes bactériens prescrivent que ces critères phénotypiques soient pris en compte lorsqu'un auteur veut donner un nom à une nouvelle espèce.

3.2. Méthodes génotypiques

Ces méthodes sont basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments du chromosome ou de plasmides bactériens. Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons beaucoup plus fines entre les bactéries et une classification plus rigoureuse. Si la classification des rhizobiums était longtemps basée sur leur capacité de nodulation et leurs caractéristiques morphologiques, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Woese et *al.*, 1984), puis d'autres gènes dans le cadre des études MLSA (Multi-Locus Sequence Analysis), s'est progressivement imposée comme critère essentiel pour la taxonomie et la classification phylogénétique des rhizobiums indépendamment de leur caractéristiques phénotypiques ou symbiotiques (Rivas et *al.*, 2009). Graham et *al.* (1991) ont suggéré des normes minimales pour la validation de nouvelles espèces

bactériennes, qui sont fondées sur les caractéristiques génotypiques (séquençage du gène ARNr 16S, hybridation ADN-ADN, analyse RFLP...) et la description des caractéristiques morphologiques et symbiotiques.

4. Genre Vicia

Vicia est un genre de plantes herbacées de la famille des *Fabaceae* (ou Légumineuses), sous famille *Papilionoideae* et la tribu des *Fabeae*. Certaines espèces sont cultivées comme plantes fourragères (*Vicia sativa* L., vesce cultivée) ou comme légumes (fèves ; *Vicia faba*). Ce genre réunit quelques 160 à 200 espèces annuelles et vivaces, originaires pour la plupart de l'hémisphère nord tempéré ; quelques-unes croissent dans les Andes sud-américaines et dans l'Est africain. Le plus souvent elles sont grimpantes, se hissent sur la végétation ou sur divers supports grâce à leurs vrilles de leurs feuilles. La fève, *Vicia faba*, fait exception, avec ses tiges dressées sans vrille (Petr Smýkal et *al.*, 2015).

Notre modèle d'étude a porté sur deux espèces du genre *Vicia* : *Vicia sativa* et *Vicia tetrasperma*, dont les principales caractéristiques botaniques sont déterminées selon la description de Quezel et Santa (1962-1963).

4.1. *Vicia sativa* L. (ou Vesce cultivée).

C'est une plante herbacée annuelle de 30-80 cm, pubescente, grimpante et à tige grêle. Les feuilles sont paripennées, stipulées et composées de 5 paires de folioles ovales dont le dernier se transforme en vrilles. L'inflorescence est de type cyme, composée de 1 à 3 fleurs sessiles à l'aisselle des feuilles. Les feuilles sont purpurines. Le calice est composé de 5 sépales rectilignes. La corolle est composée de 5 pétales dont les ailes sont violacées et longues de 20 à 30 mm. L'androcée est monadelphie et composé de 10 étamines toutes soudées. Le gynécée est composé d'un carpelle uniloculaire contenant 5 à 7 ovules. Le fruit est sec et déhiscent sous forme d'une gousse aplatie et grande de 40-60 x 6-10 mm, ensuite plus ou moins cylindrique à maturité.

4.2. *Vicia tetrasperma* L. (Vesce à 4 graines)

C'est une plante herbacée annuelle de 20-30cm, à tige ramifiée, grimpante, velue, presque glabre. Les feuilles sont alternées, stipulées de 3-8 paires de folioles linéaires, étroites, extrémités très arrondies et bords entiers. Vrilles terminales sont simples

ou bifurquées. L'inflorescence de type racème de 1-3 fleurs, à long pédoncule. Fleurs blanc bleuâtre, solitaires ou par 2, longues de 4–7 mm. Calice pentalobé. La corolle irrégulière (zygomorphe), violet clair, 5-8 mm de long. Cinq pétales ; le pétale dressé a la forme d'un étendard, les deux latéraux des ailes, et les deux inférieurs sont réunis pour former une carène. L'androcée est monadelphie et composé de 10 étamines, filaments à bases soudées. Calice glabre, 2 fois plus court que la corolle. Gousses de 9-12 x 3-4 mm, subcylindriques, arrondies au sommet et sans bec, presque toujours glabres, à 4 graines.

MATERIELS et METHODES

1- MATERIELS

1.1. Site de collecte des échantillons

Le matériel végétal utilisé dans le cadre de cette étude est constitué de deux plantes de la famille des légumineuses. Il s'agit de *Vicia sativa* et *Vicia tetraspermae* (Figure 01). Ces deux espèces sont récoltées à partir d'un site de l'université de Béjaia (campus Targa Ouzemour) durant le mois de Mars 2015 en plein floraison.

Les plantes de *Vicia* ont été déterrées soigneusement en creusant environ 15 cm autour de la plante et environ 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son système racinaire. Le sol adhérent au niveau des racines est débarrassé délicatement en évitant d'endommager les nodules.

De même, nous avons prélevé sur ce site un échantillon de sol ainsi que les gousses des deux espèces de *Vicia*. Les plantes et leurs appareils racinaires avec leurs nodules ainsi que le sol sont transportés au laboratoire pour analyse.

L'identification des espèces du genre *Vicia* est faite par l'équipe d'enseignants du laboratoire de Biologie et Physiologie végétale de l'université de Béjaia en se référant à la flore de Quezel et Santa (1962-1963).



Source : forestryimages.org



Source : actaplantarum.org

Figure 01: Photo des plantes de *Vicia* étudiées (A : *Vicia sativa* B : *Vicia tetrasperma*)

2. METHODES

2.1. Analyses physico-chimiques du sol

Le sol est étalé sur du papier journal et laissé sécher à l'air libre, puis tamisé à 2 mm pour éliminer les éléments grossiers et les débris organiques, ensuite il est conservé dans une boîte en plastique pour subir une série d'analyses physico-chimiques afin de définir ses principales caractéristiques pédologiques.

Les analyses physico-chimiques du sol ont concerné les paramètres suivants : le pH, le phosphore assimilable, la salinité du sol à travers la mesure de la conductivité électrique (CE), la capacité d'échange cationique (CEC), les bases échangeables (Ca^{2+} et Mg^{2+}), la texture, le carbone, l'azote, le calcaire total et le calcaire actif.

2.1.1. Analyses physiques

➤ *Analyses granulométriques*

La texture du sol est révélée par son analyse granulométrique selon la méthode internationale à la pipette de Robinson, dont le principe est basé sur la destruction de la matière organique par une attaque à l'eau oxygénée et la dispersion des agrégats par l'hexmétaphosphate de sodium. Les particules fines (argiles et limons fins) sont prélevées à l'aide de la pipette de Robinson, dans des allonges à sédimentation, à des profondeurs et des moments déterminés par application de la loi de Stockes. Ensuite, les sables grossiers, sables fins et les limons grossiers sont déterminés par tamisage après élimination de la fraction fine par siphonage (Aubert, 1978).

➤ *Potentiel d'hydrogène*

La mesure du pH a été réalisée par la méthode électrométrique à l'aide d'un pH mètre à électrode de verre sur une suspension de terre fine dont le rapport sol/eau = 1/2.5, après 1 heure d'agitation puis décantation. Deux mesures de pH sont effectuées : pH_{eau} et pH_{KCl} (Soltner, 2005).

➤ *Conductivité électrique*

La conductivité électrique a été mesurée à l'aide d'un conductimètre et selon un rapport (sol/eau = 1/5). La CE du sol est exprimée en microSiemens par centimètre ($\mu\text{s}/\text{cm}$) (Baize, 2000).

➤ ***Humidité du sol***

L'humidité est déterminée par pesée du sol avant et après passage dans une étuve à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant ; elle est calculée par la formule suivante : $(P_F - P_S / P_S) \times 100$ (avec : P_F : Poids du sol humide, P_S : Poids du sol sec) (Soltner, 2005).

2.1.2 Analyses chimiques

➤ ***Dosage du calcaire total***

Le calcaire total est déterminé par la méthode gazométrique dont le principe consiste à décomposer les carbonates du sol par l'acide chlorhydrique (HCl, 1/2) et à mesurer le volume de gaz carbonique (CO₂) dégagé grâce au calcimètre de Bernard (Soltner, 2005).

➤ ***Dosage du calcaire actif***

Le calcaire actif concerne la fraction fine du calcaire total. Son dosage s'effectue par la méthode Drouineau-Galet. On utilise la propriété que possèdent les oxalates d'ammonium de se combiner au calcium pour former de l'oxalate de calcium insoluble. L'excès d'oxalate d'ammonium est ensuite dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique (Soltner, 2005).

➤ ***Dosage du carbone organique***

Le carbone organique est dosé par la méthode Anne modifiée (1945). Ainsi, Le carbone du sol est oxydé à chaud par du bichromate de potassium en milieu sulfurique. L'excès de bichromate de potassium est titré par une solution de sel de Mohr de titre connu en présence de diphénylamine (Aubert, 1978).

La matière organique est déterminée par la formule suivante : **MO % = C % x 1,72.**

➤ ***Dosage de l'azote total***

Les teneurs en azote total du sol sont déterminées par la méthode classique de Kjeldahl. Cette méthode consiste en une minéralisation de la matière organique à chaud par de l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) en présence d'un catalyseur renfermant du sélénium. L'azote ammoniacal (NH₄⁺) est déplacé de sa forme combinée par l'addition de soude, après distillation grâce à l'appareil de distillation VELP. L'ammonium libéré est recueilli dans une solution d'acide borique que l'on dose avec H₂SO₄ de titre connu.

➤ **Dosage du phosphore assimilable 'Olsen'**

Le dosage du phosphore assimilable du sol est basé sur la formation et la réduction d'un complexe formé par l'acide phosphorique et l'acide molybdique. Le complexe phosphomolybdique, en présence du SnCl_2 , développe une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de la solution en orthophosphates (Aubert, 1978).

Le phosphore du sol est extrait avec une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO_3 , 0.5M, pH 8.5), suivie d'une filtration. Le phosphore assimilable dans le sol est déterminé par colorimétrie à une longueur d'onde $\lambda = 660$ nm, en présence de molybdate d'ammonium et de SnCl_2 . Les teneurs du phosphore du sol sont déterminées à partir d'une courbe standard, puis exprimées en ppm (annexe 1).

➤ **Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC)**

La capacité d'échange cationique (CEC) correspond à la quantité de charges positives portées par les cations susceptibles d'être fixés, de façon réversible, sur les sites chargés négativement de certains constituants du sol. Elle est déterminée par la méthode Metson.

L'échantillon de sol est d'abord saturé en ions ammonium (NH_4^+) par percolations successives d'une solution d'acétate d'ammonium (1N, pH7). Après avoir éliminé l'excès d'ions ammonium par percolations à l'éthanol, on procède ensuite à leur échange par une solution de chlorure de potassium à 1 mol/L. Les ions ammonium déplacés sont dosés par la méthode Kjeldahl décrite précédemment. Les concentrations trouvées sont converties en meqg/100g de sol (Baize, 2000).

➤ **Dosage du Ca^{2+} et Mg^{2+}**

Les teneurs du sol en Ca^{2+} et Mg^{2+} échangeables sont déterminées par complexométrie à l'EDTA sur le percolât obtenu par extraction à l'acétate d'ammonium (Aubert, 1978).

2.2. Isolement des bactéries à partir des nodules de *Vicia*

Les racines des plantes de *Vicia* sont délicatement lavées à l'eau de robinet afin d'éliminer le sol adhérent sans toutefois endommager les nodules, puis éponnées sur du papier absorbant. À l'aide d'une lame, les nodules sont extraits en laissant quelques millimètres de racine de par et d'autre du site d'attache.

2.2.1. Stérilisation des nodules

Les nodules récupérés sont désinfectés par l'alcool à 95° pendant 30 secondes puis à l'eau de javel (3°) pendant 3mn pour éliminer le plus de bactéries possibles de la rhizosphère. Ensuite, ils sont rincés abondamment à l'eau distillée stérile.

2.2.2. Extraction des bactéries des nodules

Les nodules désinfectés sont écrasés aseptiquement à l'aide d'une tige dans des tubes eppendorf stériles contenant 0,5ml d'eau physiologique stérile. Un repiquage en strie est enfin effectué à partir de cette suspension de bactéries sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA additionné du rouge Congo à 0,25% (Vincent, 1970) dont la composition figure en annexe 02. Ces boîtes sont mises à incuber pendant 3 jours à 28°C.

2.2.3. Purification des souches

Après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C, les colonies ayant peu ou pas absorbées le rouge Congo sur milieu YMA ont été purifiées par repiquages successifs sur le même milieu. Après plusieurs cycles de purification, les colonies sont conservées à 4°C sur milieu YMA tamponné avec du CaCO₃ (3g/l) en tubes inclinés, puis désignées par un numéro de code.

2.2.4. Test d'authentification

La capacité d'induire la formation de nodosités sur les racines de la légumineuse hôte reste le seul critère de base pour l'authentification des isolats (Vincent, 1970 ; Beck et *al.*, 1993). De ce fait, la capacité infective des isolats a été évaluée par la présence de nodules observables sur les racines de *Vicia sativa*, utilisée comme plante hôte. La réalisation de ce test a nécessité les étapes suivantes :

➤ Désinfection des graines

Les graines de *Vicia sativa* ont été stérilisées selon la méthode préconisée par van Spronsen et *al.* (2003). Les semences non endommagées sont mises dans un flacon contenant du H₂SO₄ concentré pendant 40 minutes afin de ramollir les téguments. Après élimination de l'acide par lavage abondant à l'eau distillée stérile, les graines sont désinfectées en surface par immersion dans une solution d'eau de javel commerciale à 12° pendant 10 minutes. Après une série de rinçages à l'eau distillée stérile, les graines sont laissées pendant une nuit dans une solution d'eau de javel à 1 %, puis abondamment

rincées à l'eau distillée stérile. Après ces traitements, les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Jensen solide (1.8% d'agar). Les boîtes sont ensuite enveloppées avec du papier aluminium et placées à l'obscurité à 4°C pendant 5 jours; puis incubées à l'obscurité et à 28°C jusqu'à germination.

➤ ***Germination des graines***

Les plantules ayant une racicule d'environ 1,5 à 2 cm (Figure 02) sont transférées aseptiquement dans des tubes de volume 30 ml remplis de milieu minéral de Fahraeus stérile, exempt de toute source d'azote et de carbone, à raison d'une plantule par tube. Les tubes ainsi préparés sont couverts du papier aluminium pour assurer l'obscurité de la partie racinaire, puis sont placés dans des conditions ambiantes de température et de luminosité du laboratoire.

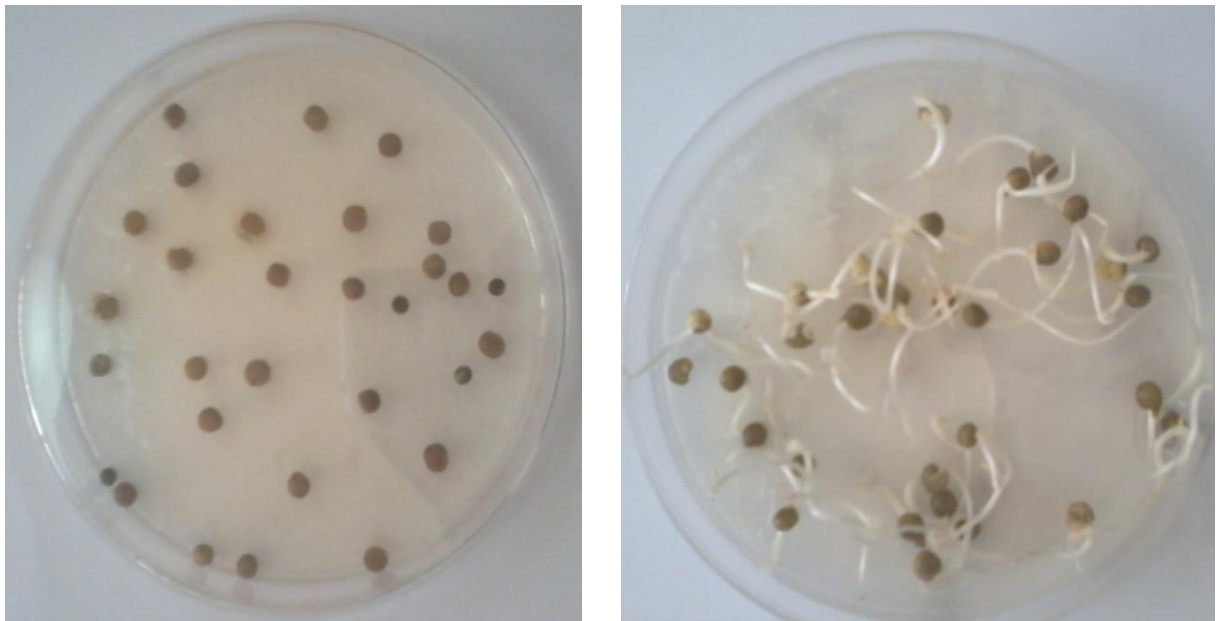


Figure 02: Germination des graines de *Vicia sativa* sur milieu Jensen gélosé

➤ ***Inoculation des plantules***

Les souches à tester sont cultivées sur milieu YMB liquide, sous agitation à 150 t/min. Après incubation à 28°C/48h, les cultures sont centrifugées à 3000 rpm/10 min. Les culots

obtenus sont lavés par 1 ml d'eau physiologique stérile (8,5g/l NaCl) puis repris finalement dans 1,5ml. Les suspensions bactériennes lavées serviront à inoculer les plantules.

Chaque plantule a été inoculée par 0,4 ml de la suspension bactérienne lavée. Trois tubes contenant chacun une seule plante ont été utilisés pour chaque souche. Nous avons prévu dans cet essai deux tubes contenant des plantules non inoculées mais renfermant de l'azote minéral (80mg/ml de NH_4NO_3) pris comme témoin positif (TN) et deux autres tubes non inoculés ont été utilisés comme témoin négatif (T0). Les tubes sont ensuite placés dans des conditions ambiantes de température et de luminosité du laboratoire (Figure 03).



Figure 03: Test d'inoculation des souches en association avec *Vicia sativa*.

L'infectivité des souches a été évaluée par la présence de nodules sur les racines de la plante. Les souches ayant induit la formation d'au moins une nodulation par plante sur l'ensemble des 3 répétitions sont maintenues pour une caractérisation phénotypique.

2.3. Identification des souches

2.3.1. Caractérisation cellulaires et morphologiques

L'identification des souches isolées est déterminée par une approche phénotypique, basée sur l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

Les caractères morphologiques et biochimiques des souches ont été déterminés selon les techniques de Marchal et Bourdon (1982).

Afin de situer le regroupement des souches isolées des nodules des deux espèces du genre *Vicia*, nous avons inclus dans cette étude une souche de référence : *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv 3841).

L'observation morphologique des colonies (forme, taille, couleur, aspect, élévation, mucoidité et transparence) et microscopique des bactéries (coloration de Gram, forme, mode de groupement, production des granules de Poly β -Hydroxy Butyrate et mobilité) permet une orientation préliminaire.

2.3.2. Caractérisation biochimique

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YMA a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré le Bleu de Bromothymol (BTB) à une concentration de 0.0024% (p/v). Les boîtes inoculées sont incubées à 28°C pendant 24 à 48 heures. A pH acide, la couleur du milieu est jaune, puis verte à la neutralité, pour devenir bleue si le pH devient alcalin.

La β -galactosidase, l'oxydase, la catalase, l'uréase, l'arginine dihydrolase (ADH), la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC), la tryptophane désaminase (TDA) et de la nitrate réductase, ont été déterminées sur des cultures bactériennes âgées de 48h.

L'utilisation des sucres par les souches a été déterminée sur milieu MEVAG en tubes, contenant l'une des sources de carbone suivantes : Levullose, Mannose, Adonitol, Sorbitol, Arabinose, Maltose, Saccharose, Cellobiose, Salicine, Mannitol, Lactose et Glucose, à une concentration de 0,1%. Les tubes sont inoculés par piqure centrale avec des souches âgées de 48 heures et incubés à 28°C pendant 24 heures, 48 heures et 72 heures.

La présence d'une cellulase est déterminée par la méthode au rouge Congo. Une colonie bactérienne est mise en culture pendant 5 jours sur boîte contenant le milieu YMA modifié et additionnée de 0.25% de CarboxyMéthylCellulose (CMC). Après incubation à 28°C, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 28°C. La solution de rouge Congo est rincée par une solution de NaCl (1M) et les boîtes sont ensuite laissées à température ambiante puis l'excès de la solution de NaCl a été jeté. Un halo jaune orangé entourant les colonies indique la présence de l'enzyme.

La dégradation de l'amidon, de la cellulose, du citrate, la production d'indole et la réaction de Voges-Proskauer sont également réalisés.

Les caractères physiologiques testés se sont limités à la tolérance des souches aux facteurs suivants : pH, température et antibiotiques.

Les tolérances aux facteurs (pH et température) ont été effectuées par culture des souches dans des tubes contenant 5 ml de milieu liquide YMB et inoculés par une pré-culture en phase exponentielle ($DO_{600\text{ nm}} = 0,01$). Après une incubation à 28°C pendant 2 jours, la limite de tolérance aux différents facteurs étudiés a été évaluée par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde $\lambda = 600\text{ nm}$.

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la technique de l'antibiogramme. Les souches ont étéensemencées par écouvillonnage sur les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton. Ensuite les disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface du milieu. Les boîtes ainsi préparées sont placées à 4°C pendant 10 minutes pour permettre la diffusion de l'antibiotique, puis incubées à 28°C/48h. La sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques testés a été évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

2.3.3. Analyse numérique

Pour bien situer le degré de rapprochement et le regroupement entre les souches isolées des nodules des deux espèces du genre *Vicia*, d'une part, et entre ces souches et la souche de référence *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv 3841) d'autre part, les résultats de l'ensemble des caractères phénotypiques étudiés ont été soumis à une analyse numérique. La comparaison entre les souches prises deux à deux a été réalisée par la méthode UPGMA, appuyée par une Classification Ascendante hiérarchique (CAH), basée sur le calcul des distances Euclidiennes à l'aide du logiciel XL STAT (2009).

Dans cette méthode, nous avons réalisés une matrice (tableau VIII, annexe 03) dans laquelle les variables sont introduites qualitativement et codées « 1 » pour tout résultat positif ou présent et « 0 » pour le négatif ou absent. Les caractères en commun à toutes les souches ont été éliminés, car ils ne sont pas discriminants.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Caractérisation physico-chimique du sol

Les résultats des analyses physico-chimiques du sol présentés dans le tableau (I), nous ont permis de déterminer ses principales caractéristiques pédologiques.

Tableau I : Résultats des analyses physico-chimiques du sol

| Paramètres | Résultats |
|--------------------------------------|------------------|
| % A | 58,22 |
| % LF | 33,20 |
| % LG | 2,48 |
| % SF | 2,93 |
| % SG | 3,17 |
| Texture | Argileuse |
| % Humidité | 14,65 |
| pH _{eau} | 7,3 |
| pH _{KCl} | 7,3 |
| CE ($\mu\text{s}/\text{cm}$ à 25°C) | 0,430 |
| % CaCO ₃ totale | 35,33 |
| % CaCO ₃ actif | 8,17 |
| % N | 0,10 |
| % C | 3,31 |
| % MO | 5,70 |
| C/N | 31,78 |
| P (ppm) | 0,26 |
| CEC (meq/100g sol) | 152 |
| Ca ²⁺ (meq / 100 g sol) | 21,32 |
| Mg ²⁺ (meq / 100 g sol) | 30,26 |

En tenant compte de l'échelle de classification établie par Gaucher (cité par Soltner, 1988), le sol de l'université de Bejaïa est neutre avec une valeur de pH_{eau} de 7,3. D'après le triangle de texture USDA, le sol de l'université de Bejaïa présente une texture argileuse, avec une teneur élevée en argiles (58,22%) suivi des limons fins (33,22%) ; ce sol est qualifié de terre collante et gonflante au contact de l'eau, il est caractérisé par une capacité de rétention en eau élevée (Duchaufour, 1977). De plus le taux élevé en argiles augmente la fertilité chimique du sol, ce qui se traduit dans ce cas par les quantités importantes des cations échangeables (Ca^{2+} et Mg^{2+}) avec des valeurs respectivement de 21,32 et 30,32 meq/100g de sol et une capacité d'échange cationique élevée (152meq/100g de sol).

Le sol étudié présente une faible teneur en azote 0,1%, ce qui est traduit par un rapport C/N de 31,78 qui indique un équilibre entre la minéralisation et l'humification de la matière organique. Le calcaire total est présent en proportion relativement élevée 35,33%, ceci augmente la perméabilité et permet l'échauffement rapide du sol. Toutefois, la présence du calcaire à des teneurs élevées peut bloquer certains éléments fertilisants qui deviennent non disponibles pour les plantes. Enfin, sa teneur en phosphore assimilable est relativement élevée, ce qui favorise l'absorption et la nutrition des plantes.

2. Isolement et authentification des souches

A partir des nodules de *Vicia sativa* et *Vicia tetrasperma*, nous avons constitué une collection de 22 souches bactériennes, présumés appartenir à la famille des *Rhizobiaceae*. 14 souches sont isolées des nodules de *Vicia sativa* et 8 isolées des nodules de *Vicia tetrasperma*. Cependant, seules 09 souches bactériennes ont pu induire la formation de nodules visibles à l'œil nu sur les racines de la plante de *Vicia sativa*, confirmé par le test de nodulation (Tableau II). Notons que les premières nodosités sont apparues à partir de la première semaine d'inoculation de la plante.

Tableau II : Résultats du test d'authentification

| Plantes- hôtes | Nombre d'isolats | Nombre d'isolats Nod ⁺ | Code d'isolats Nod ⁺ |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Vicia sativa</i> | 14 | 07 | VS ₁ , VS ₂ , VS ₃ , VS ₄ , VS ₅ , VS ₆ , VS ₇ |
| <i>Vicia tetrasperma</i> | 08 | 02 | VT ₁ , VT ₂ |
| | VS : <i>Vicia sativa</i> | | VT : <i>Vicia tetrasperma</i> |

3. Caractérisation des bactéries isolées des nodules des plantes du genre *Vicia*

Les souches ayant montré une capacité à former des nodules racinaires sur les plantes du *Vicia sativa* ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique, basée sur des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.

3.1. Caractérisation phénotypique

3.1.1. Caractères cultureux

Les principales caractéristiques morphologiques distinctifs des bactéries nodulant *Vicia sativa* sont résumées dans le tableau (III).

Tableau III : Caractères cultureux des colonies

| Souches | Forme | Aspect | Taille | Couleur | Elévation | Mucoïdité | Transparence |
|-----------------------|-------------|--------|-----------|-------------------|-----------------------|------------------|--------------|
| Rlv | Circulaire | Lisse | 2 à 3mm | Blanche | Bombée | Mucoïdale | Opaque |
| VS₁ | Circulaire | Lisse | 3 mm | Blanche | Bombée | Mucoïdale | Opaque |
| VS₂ | Punctiforme | Lisse | <1mm | Orange claire | Légèreme nt bombée | Non Mucoïdale | Opaque |
| VS₃ | Circulaire | Lisse | <1mm | Blanche | Légèreme nt bombée | Non Mucoïdale | Opaque |
| VS₄ | Circulaire | Lisse | 1,5 à 2mm | Blanche | Bombée | Peu Mucoïdale | Translucide |
| VS₅ | Circulaire | Lisse | 2 à 3mm | Blanche | Bombée | Peu Mucoïdale | Translucide |
| VS₆ | Circulaire | Lisse | <1mm | Blanche | Bombée | Mucoïdale | Translucide |
| VS₇ | Circulaire | Lisse | ≤1mm | Blanche claire | Bombée | Peu Mucoïdale | Transparente |
| VT₁ | Circulaire | Lisse | 2 à 3mm | Blanche | Bombée | Mucoïdale | Opaque |
| VT₂ | Circulaire | Lisse | 1,5 à 2mm | Blanche | Bombée | Mucoïdale | Opaque |

Contrairement aux souches VT1et VT2 isolées des nodosités de *Vicia tetrasperma*, les souches isolées des noudules de *Vicia sativa* forment en milieu YMA des colonies visibles après 24 à 48 heures d'incubation à 28°C, ce qui laisse indiquer qu'elles sont à croissance

rapide. D'après Vincent (1970) et Jordan (1982, 1984b), la vesce, la fève et la luzerne sont classées parmi les espèces de légumineuses nodulées par les souches de rhizobia à croissance rapide.

Les colonies des souches étudiées sont circulaires à punctiformes, à contour régulier, de surface lisse et visqueuse. Elles ont un diamètre compris entre 1 à 3mm, bombées à légèrement élevées. Elles sont de couleur blanchâtre exceptée pour la souche VS₂ dont la colonie est orange claire. Elles sont opaques, mais certaines présentent une texture translucide. A l'exception des souches VS₂ et VS₃, la plupart d'entre elles sont mucoïdales. La souche VS₁ est caractérisée par une forte production d'exopolysaccharides mucilagineux. Enfin, aucune d'entre- elle n'a montré de pigmentation ou de fluorescence naturelle (figure 04).

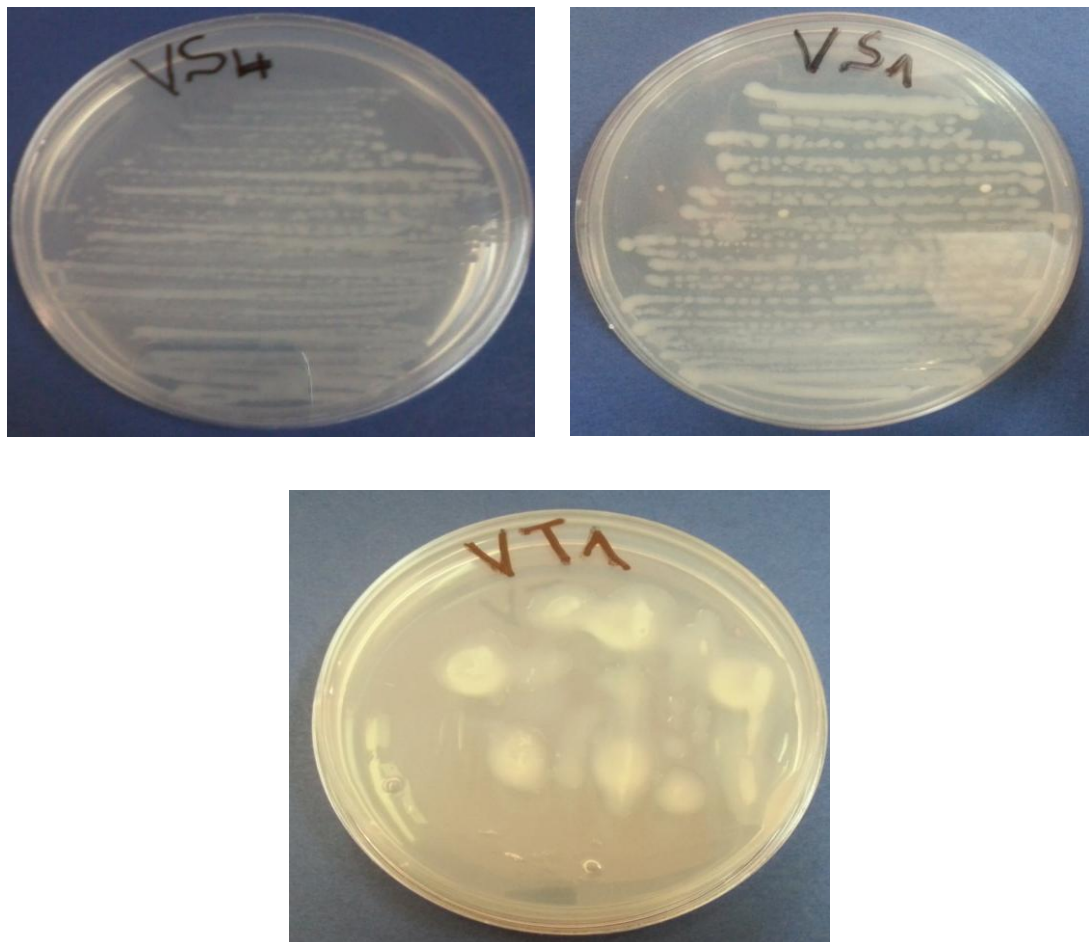


Figure 04 : Aspects morphologique des colonies bactériennes sur milieu YMA

3.2. Caractères morphologiques des bactéries

Comporte deux parties : l'observation à l'état frais et la coloration de Gram.

L'observation microscopique à l'état frais des différentes suspensions prélevées d'une culture sur milieu YMB, indique que la plupart des souches se présentent sous formes de petits bâtonnets à extrémités arrondies, mobiles, de taille variable et présentant un effet réfringent qui résulte de la production de granules de poly- β -hydroxy butyrate (PHB).

La coloration de Gram a confirmé l'appartenance des souches au groupe des bactéries à Gram négatif.

3.3. Caractérisation biochimique

3.3.1. Croissance bactérienne

Le milieu YMA additionné du BTB a été acidifié par les souches (VS1, VS4, VS5) ainsi que la souche de référence (Rlv), qui s'est traduit par le virage de la couleur verte du milieu au jaune, caractéristique des bactéries à croissance rapide (*Rhizobium*). Par contre, il est resté neutre pour les autres souches (figure 05).

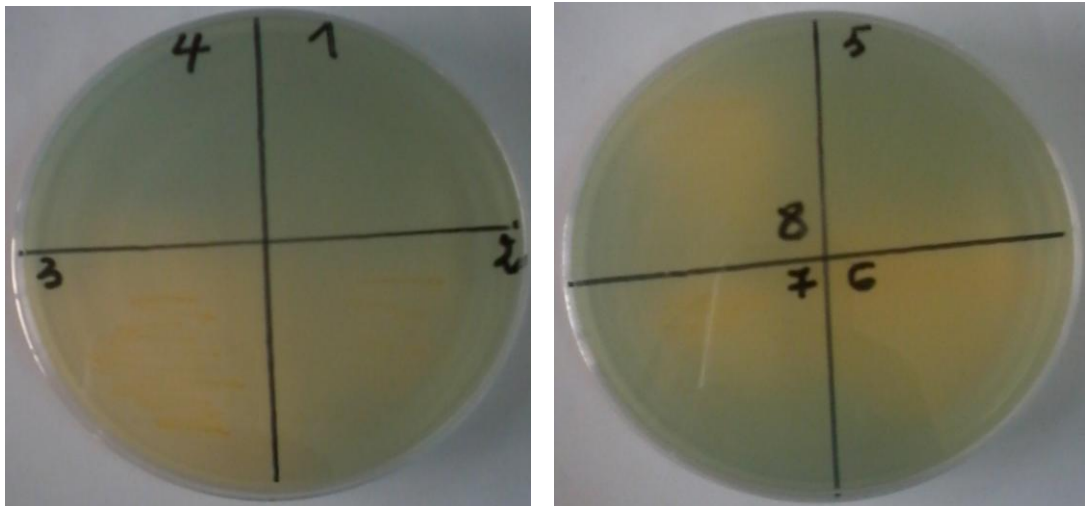


Figure 05 : Résultats du test de Bleu de bromothymol sur milieu YMA

(1 : VT1 ; 2 : VS1 ; 3 : VS2 ; 4 : VT2 ; 5 : VS3 ; 6 : VS4 ; 7 : VS5 ; 8 : VS6)

Nous avons également étudié la croissance des souches isolées des 2 espèces de *Vicia*, en mesurant à des intervalles réguliers la densité optique des cultures sur milieu YMB à l'aide

d'un spectrophotomètre à une longueur $\lambda=600$ nm. Le temps de génération des souches a été calculé selon la formule suivante : $G= 0,693/K$ ou $K=Ln DO_F- Ln DO_I/ t_F-t_I$

Avec DO_F : Densité optique finale ; DO_I : Densité optique initiale ; t_F-t_I : Intervalle de temps

Les souches présentent des temps de génération variant entre 1 et 9 heures (Tableau IV).

Tableau IV : Temps de génération des souches

| Souches | Temps de génération (h) | Type de croissance |
|----------------|--------------------------------|---------------------------|
| VS1 | 2h 27 min | Rapide |
| VS2 | 1h 18 min | Rapide |
| VS3 | 1h 24 min | Rapide |
| VS4 | 1h 39 min | Rapide |
| VS5 | 2h 43 min | Rapide |
| VS6 | 3h 21 min | Rapide |
| VS7 | 3h 55min | Rapide |
| VT1 | 9h 16 min | Lente |
| VT2 | 6h 23 min | Lente |

Les souches isolées des nodules de *Vicia sativa* appartiennent à un genre de bactérie à croissance rapide, puisque le temps de génération ne dépasse pas 4 heures. À l'opposé, les souches VT1 et VT2, isolées des nodules de *Vicia tetrasperma*, sont des bactéries à croissance lente car leur temps de génération dépasse 6 heures. On peut conclure que les souches isolées des nodules de *Vicia sativa* sont acidifiantes et à croissance rapide, contrairement à celles isolées de *Vicia tetrasperma* qui n'ont pas modifié l'indicateur du milieu YMB +BTB, de plus elles présentent des temps de génération élevés.

D'après Trinick (1980) ; Dreyfus et Dommergues (1981b) ; Alazard (1985), le genre *Rhizobium* comportait les bactéries à croissance rapide qui ont un temps de doublement inférieur à six heures dont les espèces représentatives sont *R. leguminosarum*, lui même

composé de trois biovars (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*, bv. *phaseoli* et bv. *viceae*), *R. meliloti*, *R. loti*, *R. tropici*, *R. galegae*, *R. huakii* et *R. fredii*,

Norris (1965) a constaté que sur 717 souches de *Rhizobium*, 61,4% étaient alcalinisantes, alors que seules 38,6% étaient acidifiantes. Les premières ont une croissance lente, alors que les secondes renferment des souches à croissance rapide.

3.3.2. Recherche de quelques activités enzymatiques et caractères biochimiques

A partir des résultats du tableau (V), on constate que l'ensemble des souches testées partagent sept caractères en commun. Elles possèdent toutes une TDA, une catalase et elles se sont révélées capables de réduire les nitrates. Aucune d'entre elles ne présentent une activité amylasique, ni cellulasique. L'activité β galactosidase est absente chez toutes les souches. On note également qu'aucune des souches testées ne possède une tryptophanase, enzyme responsable de la production de l'indole à partir du tryptophane. La citrate perméase n'est retrouvée que chez deux souches VS1 et VS3. Les souches présentent des activités variées pour le reste des enzymes recherchées. Il ya lieu de signaler que les souches VS5 et VS6, non seulement réduisent les nitrates, mais elles les transforment au-delà du stade nitrites, participant ainsi au processus de dénitrification.

Tableau V : Caractérisation biochimique des souches

| Souches | BTB | NR | NIR | RM | VP | Indole | Catalase | Citrate | Oxydase | ONPG | amylase | Cellulase | ODC | LDC | ADH | Uréase | TDA | Gaz |
|-----------------------|-----|----|-----|----|----|--------|----------|---------|---------|------|---------|-----------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|
| Rlv | a | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| VS₁ | a | + | - | - | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + |
| VS₂ | n | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| VS₃ | n | + | - | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | - |
| VS₄ | a | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| VS₅ | a | + | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| VS₆ | n | + | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| VS₇ | n | + | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| VT₁ | n | + | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| VT₂ | n | + | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |

a : acidification n : neutre + : présence - : absence

3.3.3. Utilisation des sucres

Les résultats du tableau (VI), nous montrent que toutes les souches isolées des nodules de *Vicia sativa* et *Vicia tetrasperma* utilisent l'adonitol, le sorbitol et le cellobiose. Par contre, aucune souche n'utilise le lactose. Concernant les autres sucres testés, on constate qu'ils sont utilisés par la plupart des souches (plus de 60% des souches testées), à l'exception de la salicine qui est utilisée uniquement par quatre souches qui sont (VS₄, VS₅, VS₆ et VS₇) et l'arabinose qui est utilisé que par cinq souches (VS₂, VS₃, VS₄, VS₅ et VS₇).

Tableau VI : Utilisation des sucres par les bactéries

| Souches | Levullose | Mannose | Adonitol | Sorbitol | Arabinose | Maltose | Saccharos ^a | Cellobiose | Salicine | Mannitol | Lactose | Glucose |
|-----------------|-----------|---------|----------|----------|-----------|---------|------------------------|------------|----------|----------|---------|---------|
| Rlv | + | - | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + |
| VS ₁ | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | - | + |
| VS ₂ | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| VS ₃ | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| VS ₄ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| VS ₅ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| VS ₆ | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + |
| VS ₇ | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| VT ₁ | - | - | + | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| VT ₂ | - | + | + | + | - | + | - | + | - | + | - | + |

3.4. Caractérisation physiologique

3.4.1. Effet de la température

Les résultats de la figure (06) montrent que la plupart des souches étudiées sont capables de se développer à des températures situées entre 20 et 40°C. Les souches VS₄, VS₅, VS₆, VT₁ ainsi que la souche de référence (Rlv) présentent un optimum de croissance situé à 30°C. Les souches VS₂, VS₃, VS₇ et VT₂ présentent un optimum de croissance situé à 40°C. Cependant, aucune croissance notable n'a été notée à 50°C.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (1984a), et Graham (1992) qui ont montré que la plupart des espèces du genre *Rhizobium* cultive bien entre 20°C et 40°C, avec un

optimum de croissance situé à 30°C et que les températures élevées (50°C) ont un effet néfaste sur la croissance des souches.

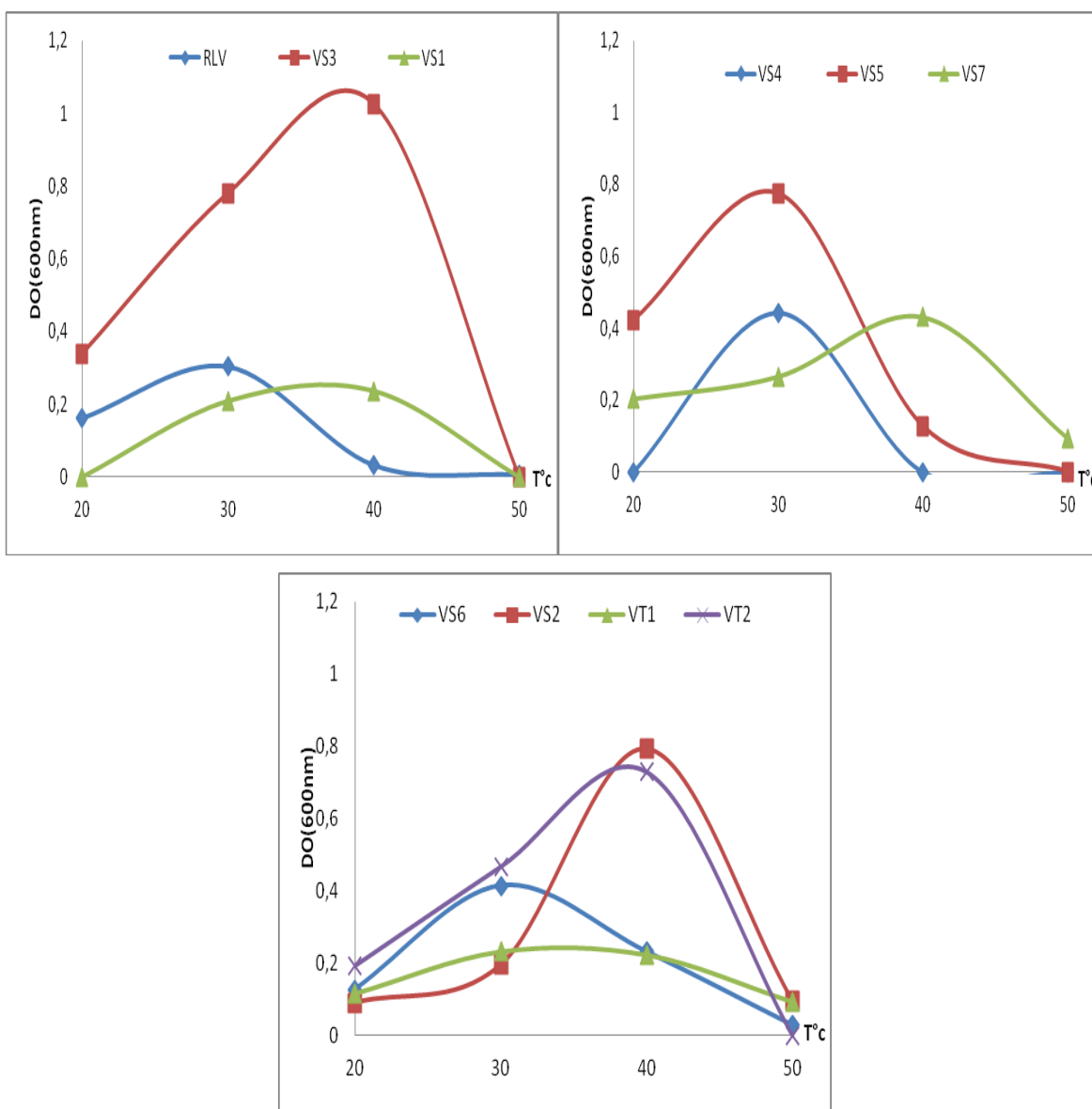


Figure 06 : Effet de la température sur la croissance des bactéries

3.4.2. Effet du pH

La figure (07) montre que la majorité des souches testées présentent des optima de croissance situés entre pH7 et pH9 à l'exception de deux souches (Rlv et VS₆) qui présentent des optima de croissance à pH6. Il y a lieu de noter que la plupart des souches tolèrent des pH basiques que les pH acides.

Les rhizobiums sont en général neutrophiles mais leur réponse face à une variation du pH diffère d'une souche à une autre (Jordan, 1984a ; Graham, 1992).

Glenn et Dilworth (1994) ont rapporté que le groupe des souches bactériennes à croissance rapide a tendance à tolérer des milieux basiques allant jusqu'à un pH de 10.

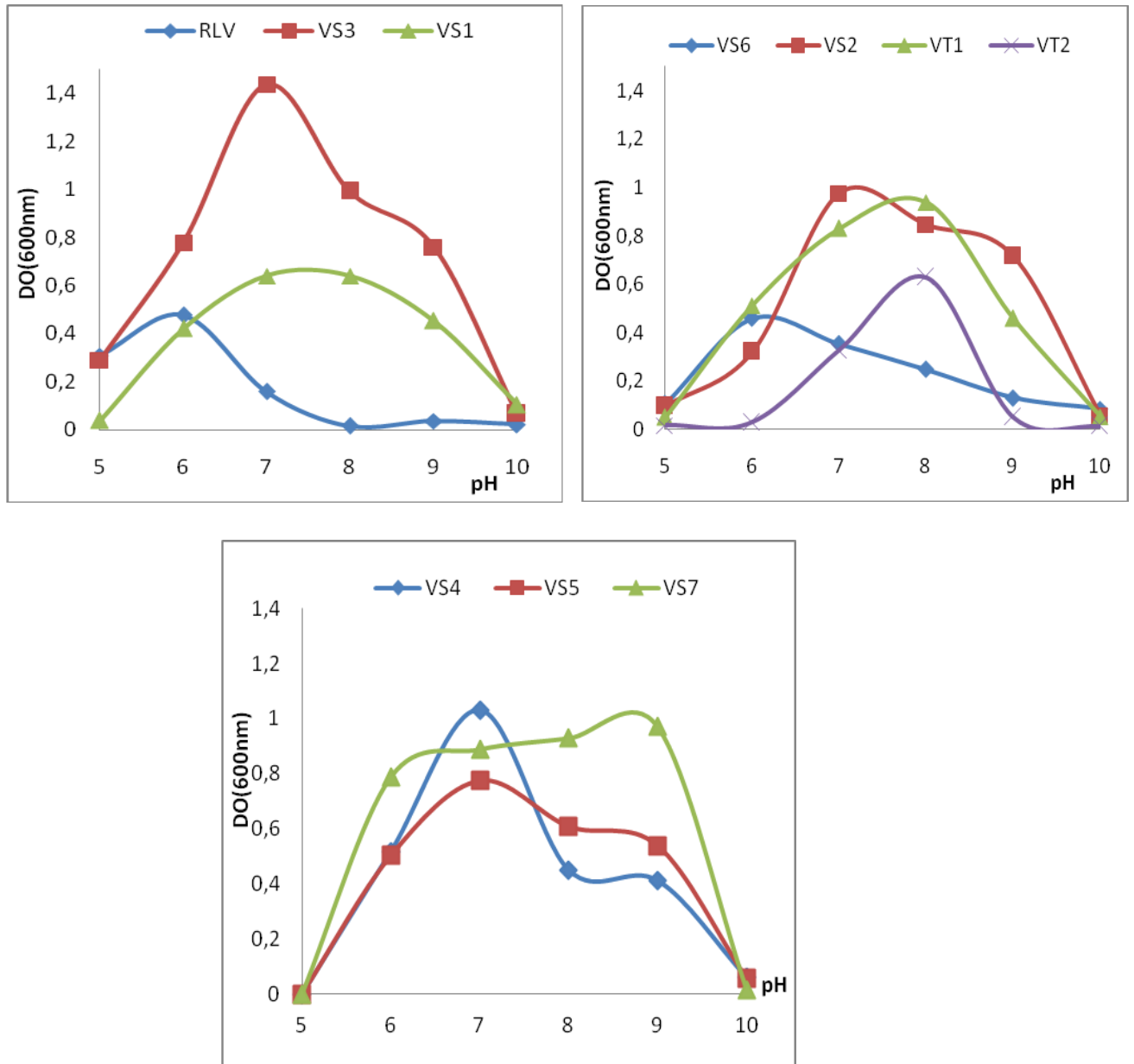


Figure 07 : effet du pH sur la croissance des bactéries

3.4.3. Résistance intrinsèques aux antibiotiques

Les diamètres des zones d'inhibition (figure 09). ont été mesurés, puis comparés aux normes données par la Société Française de Microbiologie afin de déterminer la résistance ou la sensibilité des souches testées. Les résultats de l'antibiogramme sont illustrés dans le tableau (VII). Les résultats indiquent que les souches montrent des

réponses variables aux différents antibiotiques. En effet, 30% des souches testées sont résistantes à l'oxaciline, 10% à l'érythromycine et au ticarciline. Par contre elles sont toutes sensibles à l'ampicilline, pénicilline, pipéracilline, gentamicine, triméthoprine sulphaméthoxazole et à la tétracycline.

La sélection des souches présentant une résistance multiple aux différents antibiotiques est très intéressante du fait que cette résistance peut être utilisée comme marqueur important pour l'identification des souches et l'étude de leur diversité (Sawada *et al.* 1990).

Tableau VII : Résultats de l'antibiogramme

| Souches | AM | P | PRL | E | CN | SXT | TIC | OX | TE |
|-----------------------|----|---|-----|---|----|-----|-----|----|----|
| Rlv | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| VS₁ | S | S | S | S | S | S | R | R | S |
| VS₂ | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| VS₃ | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| VS₄ | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| VS₅ | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| VS₆ | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| VS₇ | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| VT₁ | S | S | S | R | S | S | S | R | S |
| VT₂ | S | S | S | S | S | S | S | SI | S |

R : Résistante ; **S** : Sensible ; **SI** : Sensibilité intermédiaire

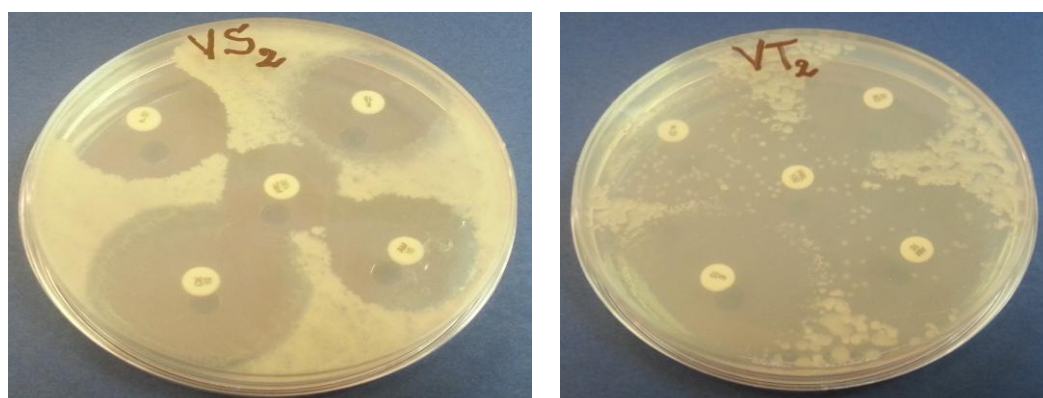


Figure 08 : Exemple de résultat de l'antibiogramme sur milieu Muller Hinton

3.5. Analyse numérique des caractères phénotypiques

La caractérisation phénotypique des 9 souches bactériennes isolées des nodules de *Vicia sativa* et de *Vicia tetrasperma* a été basée sur 29 caractères. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été consignés dans le tableau VIII (annexe 03). Les résultats sont traités par UPGMA, le dendrogramme qui en dérive est représenté par la figure (10).

A une distance euclidienne de 8, les souches bactériennes isolées des nodules racinaires de *Vicia sativa* et *Vicia tetrasperma* se répartissent en trois groupes: A, B et C.

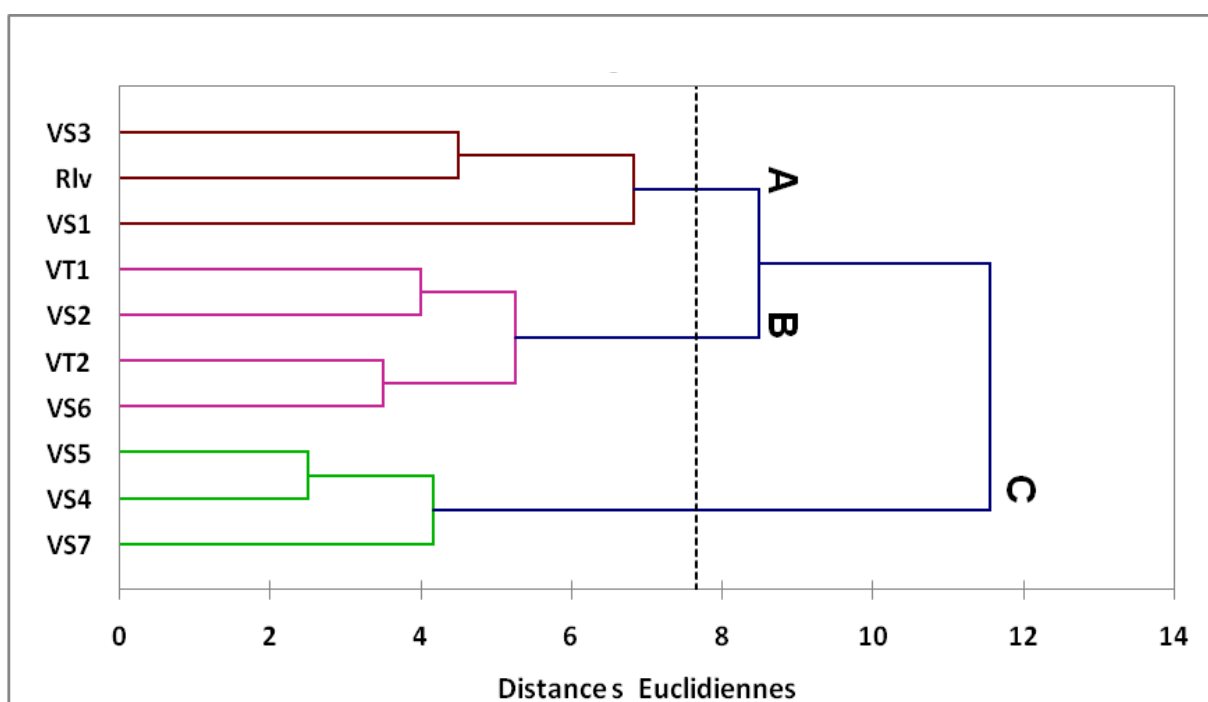


Figure 09 : Dendrogramme généré de l'analyse numérique des caractères phénotypiques

- ✓ Le groupe A est constitué de trois souches (VS1 et VS3), y compris la souche de référence (Rlv). Ces souches partagent 12 caractères en commun sur l'ensemble des caractères étudiés.
 - elles utilisent le levullose et le glucose comme seule source de carbone.
 - elles partagent la présence de quatre enzymes (oxydase, uréase, ODC et ADH).
 - elles ne tolèrent pas une température de 50°C.

- ✓ Le groupe B renferme quatre souches, deux souches isolées des nodules de *Vicia tetrasperma* (VT1, VT2) et deux autres isolées des nodules de *Vicia sativa* (VS2 et VS6). Elles partagent 13 caractères en commun.
 - elles utilisent le maltose comme seul source de carbone,
 - elles possèdent ODC, LDC, ADH, uréase, mais pas la citrate perméase. Elles se développent bien à pH 8, mais elles ne tolèrent pas pH10.
 - elles tolèrent une température de 40°C.
- ✓ Le groupe C regroupe les trois souches restantes (VS4, VS5 et VS7) qui partagent 19 caractères en commun.
 - elles utilisent le levullose, l'arabinose, le maltose, le saccharose et la salicine comme seul source de carbone.
 - elles sont capables de se développer à pH 5, pH 6, pH 8 et à pH 9, mais elles ne tolèrent pas pH10.
 - elles tolèrent une température de 20°C.
 - elles sont sensibles à l'action de l'Erythromycine, ticarciline et l'oxacilline.

Il ressort des résultats obtenus que :

- La souche VS3 est très proche de la souche de référence *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (Rlv).
- Les souches (VS4, VS5 et VS7) sont complètement éloignées des autres souches.
- Les souches VS4 et VS5 sont très proches.
- Les souches VT1 et VT2 isolées des nodules de *Vicia tetrasperma* sont rassemblées dans le même groupe, et qu'elles se rapprochent beaucoup plus des souches VS2 et VS6 isolées des nodules de *Vicia sativa*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail a pour objectif principal l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries nodulantes de deux légumineuses du genre *Vicia* (*Vicia sativa* et *Vicia tetrasperma*), récoltées à partir d'un site de l'université de Bejaïa.

Les résultats de l'analyse physico-chimique du sol du site de récolte des deux légumineuses retenues à l'étude est neutre et présente une texture argileuse. Il est caractérisé par une faible teneur en azote et une teneur élevée en calcaire totale et en phosphore assimilable.

Une collection de 22 isolats issus des nodosités fraîches de *Vicia sativa* (14 isolats) et *Vicia tetrasperma* (8 isolats) a été constituée. Toutefois, le test de nodulation a révélé que seules 9 souches ont pu induire la formation des nodules visibles sur les racines *Vicia sativa* utilisée comme plante-hôte.

L'étude phénotypique, basée sur l'analyse des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques a montré que :

- ✓ Toutes les souches sont Gram négatif. Elles se présentent sous forme de bâtonnet à extrémités arrondies, mobiles et renferment toutes des granules de PHB.
- ✓ Les souches isolées à partir des nodules de *Vicia sativa* ont une croissance rapide. Par contre celles isolées des nodules de *Vicia tetrasperma* (VT1 et VT2) ont une croissance lente.
- ✓ Toutes les souches possèdent une TDA et elles se sont toutes révélées capables de réduire les nitrates. Par contre, aucune des souches ne présente d'activité catalasique, ni amylasique, ni cellulase et elles sont incapables de produire l'indole à partir du tryptophane.
- ✓ Elles utilisent une large gamme de sucres avec des préférences marquées au sorbitol, adonitol, cellobiose et au mannitol. Il y a lieu de noter qu'aucune d'entre elles n'utilise le lactose.
- ✓ La plupart des souches tolèrent les pH basiques que les pH acides ; elles présentent des optima de croissance situés entre pH 7 et pH 9, à l'exception des souches Rlv et VS6, qui présentent un optimum de croissance à pH 6.

- ✓ Les souches étudiées ne tolèrent pas les températures élevées, elles présentent des optima de croissance situés entre 30 et 40°C.
- ✓ Elles sont sensibles à l'action des antibiotiques testées à l'exception de trois souches. La souche VS1 présente une résistance au ticarciline et à l'oxaciline, la souche VS2 présente une résistance à l'oxaciline, alors que la souche VT1 présente une résistance à l'oxaciline et à l'érythromycine.
- ✓ L'analyse numérique des caractères phénotypiques par une CAH montre clairement que les souches bactériennes se répartissent en trois groupes distincts.

En perspective, il serait intéressant :

- ✓ d'étendre la caractérisation phénotypique avec l'étude d'un plus grand nombre de caractères.
- ✓ d'étudier la tolérance des souches aux différents stress environnementaux.
- ✓ d'étudier le potentiel fixateur d'azote des souches.
- ✓ de compléter cette étude par une approche génotypique en utilisant les techniques de biologie moléculaire (PCR/RFLP de l'ADNr 16S, des gènes symbiotiques, des gènes de ménage, séquençage, hybridation), afin de déterminer avec précision la position taxonomique de nos souches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas K, Abdelguerfi Laouar M, Madanit, M'hammedi Bouzina M, Abdelguerfi A. (2006).** Place des légumineuses dans la valorisation de l'espace agricole et pastoral en régions nord d'Algérie. Diversité des fabacées fourragères et de leurs symbiotes : applications biotechnologiques, agronomiques et environnementales, Workshop international, Alger 19-22 février 2006, A. Abdelguerfi éd., 309-320.
- Abdelmoneim AM. (1992).** Agronomic potential of three vetches (*Vicia* spp.) under rainfed conditions. *Agronomy Sc. Crop Science*, 170, 113-120.
- Alazard D. (1985).** Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol*, 511 (3): 732-734.
- Allen ON et Allen EK. (1981).** The leguminosae, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin press. Madison. Aminés chez 2 souches de *Rhizobium meliloti*. Mémoire de DES. Université d'Oran 66 pp.
- Anna M Fortes , Fillipa Santos ,Young H Choi, Marta S Silva , Andreia Figueiredo, Liste Sousa, Fenando Pessoa Bartolomeu Astos, Monica Sebastiana, Klaus Palme, Rui Malho, Rob Verpoort and Maria S Pais. (2008).** Organogenic nodule development in hop (*Humulus lupulus* L.): Transcript and Metabolic responses. *BMC Genomics*.9:445-473.
- Aubert G. (1978).** Méthodes d'analyses des sols. CRDP Marseille. 191 p.
- Baize D. (2000).** Guide des analyses en pédologie. 2ème édition revue et augmentée. INRA Éditions. Paris. 257 p.
- Beck DP, Materon LA et Afandi F. (1993).** Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. Technical manual No 19, ICARDA, 1-389.
- Behm Jocelyn E, Geurts Rene et Toby Kiers E. (2015).** *Parasponia* a novel system for studying mutualism stability. *Trends in Plant Science* (article in press).
- Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A et Squartini A. (2004).** Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol*, 27: 462-468.

Bergey's Manual trust. (2001). Taxonomie outline of the procaryotic Genera, Bergey's Manual of systimatic bacteriology. Second Edition. Edited by Garrity G.M, Winters M, Searles D.B. New York, Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. Avalable: [htt://ww.cme.msu.edu/Bergerys/](http://ww.cme.msu.edu/Bergerys/).

Boivin C, Ndoye I, Molouba F, de Lajudie P, Dupuy N et Dreyfus BL. (1997). Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics. Critical Reviews in Plant Sciences. 16: 1-30.

Boudoin T. (2001). Molcular Symebiotic Characterisation of rhizobia: Toward a Polyphasic approach using Nod factors and Nod genes ,in :Martinez-Romero E., Hernandez G.(Eds), Highlights of Nitrogen fixation Research, Kluwer Academic /Plenum Publishers , New York,pp.295-299.

Brencic A et Winans SC. (2005). Detection and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiology and Molecular Biology

Chenine A. (1991). Contribution à l'étude de l'effet osmoprotecteur des différents acides

Chen WM, Laevens S, Lee, TM, Coenye, T, De Vos, P, Mergeay et Vandamme P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. Int J Syst Evol Microbiol 51, 1729–1735.

Chen WX, Yan GH, Li JL. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 392–397.

Cooper JE. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. Journal of Applied Microbiology. 103: 1355–1365

Cooper JE. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. Advances in Botanical Research. 41: 1–62.

De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kersters K et Gillis M. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. , 44, 715-733

Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarié J et Boivin C. (2001). nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica* Mini review. 48 (2): 359–365.

Dénarié J, Debellé F and Promé JC. (1996). Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 503–535.

Djordjevic SP, Chen H, Batley M, Redmond J W et Rolfe B. G. (1987). Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *Journal of Bacteriology* 169, 5340.

Dommergue O. (2006). Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* , une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'Ecole pratique des Hautes Etudes. .Science de la vie et de terre-France ,33p.

Dommergues Y et Mangenot F. (1970). Ecologie microbienne du sol .Ed Masson et Cie. Paris .796 pp.

Dreyfus BL et Dommergues YR. (1981b). Nodulation of Acacia species by fast-and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Applied and Environmental Microbiology.* 41: 97–99.

Dreyfus BL et Dommergues Y.R. (1981a). Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbio. Lett.* 10, 313-317.

Dreyfus BL, Garcia JL et Gillis M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 89–98.

Duchaufour Ph. (1977). Pédologie. Pédogenèse et classification. Tome I, Ed. Masson, Paris, 477p.

Germon JC. (2013). Quelques apports de la microbiologie des sols à l'agronomie et au développement des plantes cultivées. France 15p.

- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. (2008).** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*. 42: 413–44
- Girand E, Fleischman D. (2004).** Nitrogen–fixing symbiosis between photosynthetic. *Researches*. 82:115-130.
- Glenn AR and Dilworth MJ. (1994).** The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiol Lett* 123, 1–9.
- Graham PH, Sadowsky MJ, Kersters HH, Barnet YM, Bradley RS, Cooper JE, De Ley DJ, Jarvis BDW, Roslycky EB, Strijdom BW, Young JPW. (1991).** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-modulating *bacteria*. *International journal of systematic bacteriology*. 41: 582–587.
- Graham PH. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil condition. *Can. J. Microbiol.* 38, 475-484.
- Graham PH, Vance CP. (2003).** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, 131: 872–877.
- Guignard JL, Dupont F. (2005).** *Botanique*. 13^{ème} édition. Masson.
- Hopkins WG. (2003).** *Physiologie végétale*. Université des Sciences de Lille. Edition de boeck. Pp 99-120.
- Jarvis BDW, Downer HL and Young JPW. (1992).** Phylogeny of Fast-Growing Soybean-Nodulating Rhizobia Supports Synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and Assignment to *Rhizobium fredii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, p. 93-96.
- Jarvis BD, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC et Gillis M. (1997).** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47, 895-898.
- Jordan DC. (1982).** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of systematic Bacteriology*,. Vol. 32, N°. 1, 136-139
- Jordan DC. (1984a).** Family III. Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*,. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins Co. vol. I, pp. 234–242.

- Jordan DC. (1984b).** International committee on systematic bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int.J syst. Bacterial*, 34:248pp.
- Journet EP, El-Gachtouli N, Vernoud V, De Billy F, Pichon M., Dedieu A Arnould C Morandi D, Barker DG et Gianinazzi-PearsonV. (2001).** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 14, 737-748.
- Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M. (2010).** How Many Peas in a Pod Legume Genes Responsible for Mutualistic Symbioses Underground. *Plant Cell Physiol.* 51:1 381–1397.
- Lazrek Benfriha F. (2008).** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin .Thèse de Doctorat –Université Toulouse III-Paul Sabatier, France .254p.
- Leclerc H, Gaillard JL, Simonet M. (1995).** Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs. pp. 412-415.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. (1990).** Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* 344: 781–784.
- Lin DX, Wang ET, Tang H, Han TX, He YR, Guan SH, Chen WX. (2008).** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a novel symbiotic bacterium isolated from root nodule of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58:1409–1413.
- Lindstrom KM , Murwira A, Willems NA. (2010).** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology.* 161(6):453-463.
- Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G, Gresshoff PM. (2009).** Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicas*. *Ann. Bot.* 104:277-285.45
- Luttge G, Pienaar BJ , Braune K, Perrino P. (1994).** Collecting with *Vigna* in Nata and Transvaal (South Africa). *Plant Genetic Ressources Newsletter.* pp. 21-23.

- Mantelin S, Desbrosses G, Larcher M, Tranbarger TJ, CleyetMarel JC et Touraine B. (2006).** Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta* 223, 591–603.
- Marchal N, Bourdon JL, Richard Cl. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries. Doin éditeurs, Paris. 483p.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin Masson C. (2001).** Nodulation of legumes by members of the b subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411, 948-95.
- Muresu Rosella, Elisa Polone , Leonardo Sulas, Barbara Baldan, Alessandra Tondello, Giuseppe Delogu, Piero Cappuccinelli, Sara Alberghini, Yacine Benhizia, Hayet Benhizia, Ammar Benguedouar, Bruno Mori, Roberto Calamassi, Frank B. Dazzo, Andrea Squartini. (2008).** Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*; Volume 63, Issue 3, pages 383–400.
- Newcomb W. (1981).** Fine structure of the root nodules of *Dryas drummondii* Richards (Rosaceae). *Can. J. Bot.* 59 : 2500-2514.
- Newton WE. (1998).** Nitrogénases : fonction et évolution. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*, 13, 238-241.
- Ngom A, Kagawa Y, Sawada H. (2004).** A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the Ochrobactrum clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J Gen Appl Microbiol* 50, 17–27.
- Norris DO . (1965).** Acid production by Rhizobium a unfying concept. *Pl. Soil.* 22: 143-166.
- Ozenda P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris. 3^{ème} édition. 663p.
- Pelment J. (1993).** Bacteries et environnement. Adaptations physiologiques .Pyocins deduced from chimeric molocules .*J.Bacteriol.*, 175 : 6179-6185 pp.
- Pelmont J. (2005).** Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.
- Perret X, Staehelin C et Broughton WJ. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64: 180–201.
- Perry JJ, Staley JJ et Lory S. (2004).** Microbiologie : Cours et questions de révision. Ed. Dunod. Paris. 891p.

- Petr Smýkal, Clarice J Coyne, Mike J Ambrose, Nigel Maxted, Hanno Schaefer, Matthew W Blair, Jens Berger, Stephanie L Greene, Matthew N Nelson, Naghmeh Besharat, Tomáš Vymyslický, Cengiz Toker, Rachit K Saxena, Manish Roorkiwal, Manish K Pandey, Jinguo Hu, Ying H Li, Li X Wang, Yong Guo, Li J Qiu, Robert J Redden et Rajeev K Varshney. (2015).** Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding, Critical Reviews in Plant Sciences, 34:1-3, 43-104.
- Polhill RM et Raven PH. (1981).** .Advances in Legume Systematics. Royal Botanic Gardens, Ke.
- Prescott LM, Harley JP et Klein DA. (2003).** Microbiologie. Ed. De Boeck université. 1137p.
- Quezel P et Santa S. (1962-1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 vols, CNRS (Ed.). Paris, 1170p
- Raven PH, Evert RF et Eichlorn S E. (2000).** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.
- Redden et Rajeev K. Varshney. (2015).** Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding, Critical Reviews in Plant Sciences, 34:1-3, 43-104.
- Rezki MA. (1990).** L'impact de stress salin sur le contenu protéique de trois espèces de Rhizobium. Mémoire de DES .Université d'Oran ,60 pp
- Rihawy SL, Capper BS, Osman AE et Thomson EF. (1987).** Effect of crop maturity, weather conditions and cutting height on yield, harvesting losses and nutritive value of cereal. Legumes mixtures grown for hay production, Exp. Agric. 10-23, 398- 459.
- Rivas R, García-Fraile P et Velázquez E. (2009).** Taxonomy of bacteria nodulating legumes. Microbiology Insights. 2: 51–69.
- Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS, Mateos PF, Dazzo FB, Kroppenstedt RM, Martinez-Molina E, Gillis M, Velázquez E. (2003).** Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. That nodulates and fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. Systematic and Applied Microbiology, 26, 47-53.
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM. (2003).** Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen- fixing legume symbionts. J. Gen .App. Microbial; 49;155-179.49.
- Sawada Y, Miyashita K, Yokoyama T. (1990).** Diversity within sero groups of Japanese

isolates of *Bradyrhizobium* as indicated by intrinsic antibiotic resistance. Soil Sci. Plant Nutr. 30, 501-504.

Soltner D. (1988). Les grandes productions végétales, les collections sciences et techniques agricoles, 16^{ème} Edition. 464 P.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B. (2001). Methylo-trophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. Journal of bacteriology, 183, 214-220.

Taylor LP, Grotewold E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. Current Opinion in Plant Biology. 8: 317–323.

Terefework Z. (2002). Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki.

Thièbeau P, Lo-Pelzer E, Klumpp K. (2010). Conduite des légumineuses pour améliorer l'efficacité énergétique et réduire les émissions de gaz à effet de serre à l'échelle de la culture et de l'exploitation agricole. Innovations agronomiques, 11, 45-58.

Tortora GJ, Funke B.R et Case CL. (2003). Introduction à la microbiologie. Ed. Renouveau Pédagogique Inc. 945p.

Trinick MJ. (1980). Relationships among the fast growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. J. Appl. Bacteriol. 39-53.

Valverde Angel, Encarna Velázquez, Carmen Gutiérrez, Emilio Cervantes, Antonio Ventosa and José-Mariano Iguá. (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int J Syst Evol Microbiol. 53, 1979–1983.

Van Berkum, P Beyene D, Bao GP, Campbell T.A, Eardly BD. (1998). *Rhizobium mongolence* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen –fixing symbioses with *Medicago ruthenica* (L) Ledebour. International journal of systematic bacteriology , 48:13-22pp.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiology Research.60:407–

Vandamme Peter and Tom Coenye. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 2285–2289.

Vertès F.1, Jeuffroy M-H, Justes E., Thiébeau P, Corson M. (2010). Connaître et maximiser les bénéfices environnementaux liés à l'azote chez les légumineuses, à l'échelle de la culture, de la rotation et de l'exploitation. *Innovations Agronomiques*, 11. 25-44.

Vilain M. (1997). La production végétale : les composantes de la production. Ed. TEC et DOC. 478p.

Vincent JM1. (1970). A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No 15 Oxford, Edinburgh Blackwell Sci Publ, 164 p.

Weir B.S. (2012). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia. Website: <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>

William GH. (2003). *Physiologie Végétale*: page 103- 104

Woese CR, Stackebrandt E, Weisburg WG. (1984). The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*. 5: 315–326.

Young JPW, Johnston AWB. (1989). the evolution of specificity in the legume *Rhizobium* symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 341-349.

Young, JPW et Haukka, K.E. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol*, 133: 87-94.

Young JM, Kuykendall LD, Marinez-Romero F, Kerr A and Sawada H. (2001). A revision of *Rhizobium* frank, 1889, with an emended description of the genus and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajude, et. al. 1998 as new combinations, *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol*. 51: 89-100.

Zakhia F, de Lajudie P. (2001). La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques ; Application à la caractérisation des Bactéries Nodulantes des Légumineuses (BNL). *Canadian Journal of Microbiology*. 52(3):169-181.

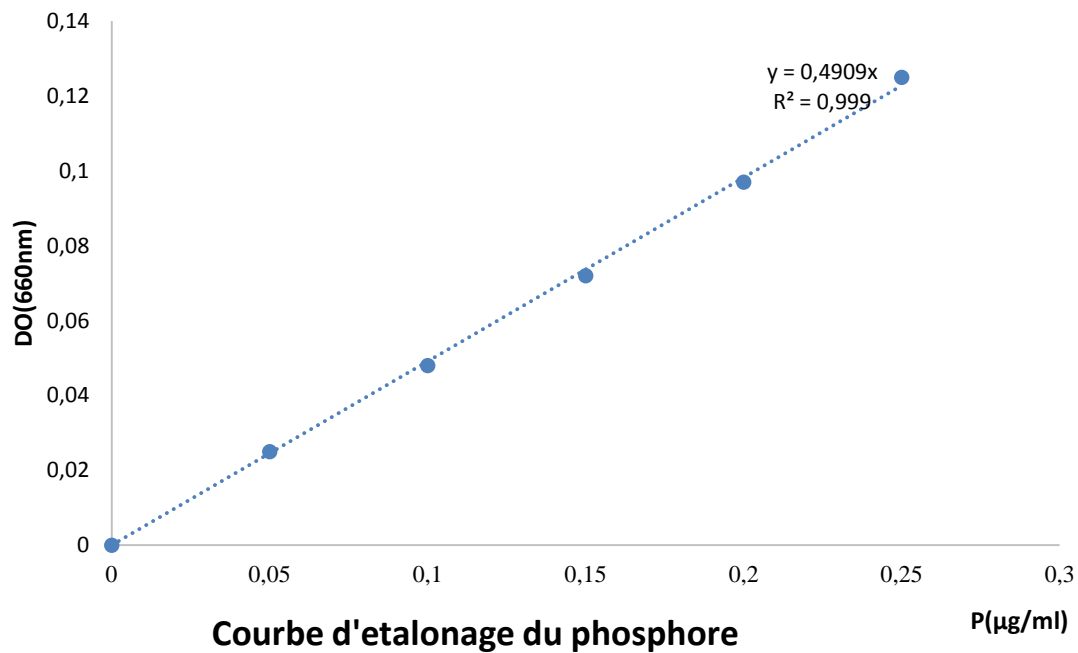
Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willemes A, Cleyet, Marel J.C, Gillis M, Dreyfus B, De Lajudie P. (2004). Characterization of legume-nodulating bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. *Syst . Appl . Microbiol* ; 27:380-395pp.

Zakhia F, de Lajudie P. (2006). La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques– application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol* ; 52 :169-181 pp.

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. *Syst. Appl. Microbiol.* pp 380-395.

Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O. (2009). Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Journal.* 57: 171–183.

Annexe 01



Annexe 02 : Composition des milieux de culture utilisés (Vincent, 1970)

1. Milieu YMA

- Mannitol 10g
 - Extrait de levure 0,4g
 - K_2HPO_4 0,5g
 - $MgSO_4, 7H_2O$ 0,2g
 - NaCl 0,1g
 - Agar 15g
 - Eau distillée ajusté à 1000 ml
- pH ajusté à 6,8

2. Milieu YMB

- Mannitol 10g
- Extrait de levure 0,4g
- K_2HPO_4 0,5g
- $MgSO_4, 7H_2O$ 0,2g
- NaCl 0,1g
- Eau distillée ajusté à 1000 ml

pH ajusté à 6,8

3. Milieu Muller Hinton

- Infusion de viande de bœuf 300 g
- Hydrolysate de caséine 17,5 g
- Amidon 1,5 g
- Gélose 17 g
- Eau distillée ajusté à 1000 ml

pH final 7,4

Milieu utilisés pour la culture des légumineuses

Milieu Fahraeus

- KH_2PO_4 100 mg
- Na_2HPO_4 150 mg
- $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 120 mg
- Fe citrate 5 mg
- Solution d'oligo-éléments 1 ml
- Eau distillée ajusté à 100 ml

pH ajusté à 6,5

Milieu Jensen (1,8% d'Agar)

- $\text{CaHPO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$ 1g
- KH_2PO_4 0,2 g
- MgSO_4 0,2 g
- NaCl 0,2 g
- FeCl_3 0,2 g
- Solution stock 0,1 ml
- Agar 18 g
- Eau distillée ajusté à 100 ml

pH ajusté a 7

Annexe 3

Tableau VIII: caractères phénotypiques utilisés pour l'analyse numérique

| Souches | BTB | NIR | RM | VP | Cit | Oxy | ODC | LDC | ADH | Uréase | Levullose | Mannose | Arabinose | Maltose | Saccharose | Salicine | Glucose | Gaz | pH5 | pH6 | pH8 | pH9 | pH10 | T20 | T40 | T50 | E | TIC | OX |
|---------|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----------|---------|-----------|---------|------------|----------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|---|-----|----|
| RLV | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VS1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| VS2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| VS3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VS4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VS5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VS6 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VS7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| VT1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| VT2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Résumé

Vingt deux souches bactériennes ont été isolées des nodules racinaires de *Vicia sativa* et *Vicia tetrasperma*, collectées du site de l'université de Bejaïa. Cependant, le test de nodulation a permis de confirmer l'appartenance de 09 souches à la famille des *Rhizobia*, du fait de leur capacité à former des nodules visibles sur les racines de *Vicia sativa* L. utilisée comme plante hôte.

Les isolats authentifiés ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique, basée sur l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques, suivie d'une analyse numérique.

La plupart des souches tolèrent des pH alcalins ou légèrement acides. Les souches isolées des nodules de *Vicia sativa* sont à croissance rapide, alors que celles isolées des nodules de *Vicia tetrasperma* sont à croissance lente. L'analyse numérique des caractères phénotypiques étudiés a permis de répartir les souches en trois groupes. La souche VS3 est étroitement rattachée à *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv 3841).

Mots clés : *Vicia sativa* L., *Vicia tetrasperma* L., Rhizobia, caractérisation phénotypique.

Abstact

Twenty two bacterial strains were isolated from root nodules of the leguminous plants *Vicia sativa*, and *Vicia tetrasperma* collected on the University of Bejaia. However, the nodulation test confirmed the membership of 09 strains of the family *Rhizobia*, due to their ability to form visible nodules on the roots of *Vicia sativa* L. used as the host plant.

Authenticated isolates have been phenotypic characterization, based on the study of morphological, biochemical and physiological, followed by a numerical analysis.

Most strains tolerate alkaline pH or slightly acidic. The strains isolated from *Vicia sativa* nodules are fast growing, while those isolated nodules of *Vicia tetrasperma* are slow growing. The numerical analysis of phenotypic characters studied allowed distributing stem into three groups. The VS3 strain is closely related to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv 3841).

Key words: *Vicia sativa* L., *Vicia tetrasperma* L., Rhizobia, phenotypic characterization.