

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de Master

En Microbiologie Appliquée au Génie Biologique

Thème

Caractérisation Phénotypique
des Bactéries Isolées de
Cytisus triflorus

Réalisé par :

DERGUINI Wahiba

GHAZZLI Fariza

Membres du jury :

Président: Belhamiche Nabila

Promoteur : Boulila Farida

Co- Promoteur : Bourebaba Yasmina

Examineur: Belhadi Djellali

Examineur: Fella-Temzi Samira

Promotion : 2011/2012

Remerciements



Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier Dieu de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à bien ce travail.

Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent à notre promotrice Madame BOULILA F., qui n'a jamais épargné ni son temps ni ses efforts pour nous conseiller et orienter vers le meilleur, son suivi et son initiation à la recherche tout au long de ce travail et ces encouragements répétés.

Qu'elle puisse trouver ici nos plus profondes gratitudee.

Nous tenons également à remercier Monsieur BOULILA A. et Bourebaba Y. pour leur aide et leur conseils avisés.

Nous remercions Mademoiselle BELHAMICHE N. qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.

Nous adressons nos sincères remerciements à Madame FELLA-TEMZI S. et Monsieur BELHADI D., d'avoir accepté de juger ce travail de façon objectif et juste.

Tout comme nous exprimons les mêmes sentiments de gratitude à tous les enseignants qui nous ont comptés parmi leurs étudiants tout le long de ces cinq années.

Nous aimerions remercier également tous les membres du laboratoire d'interaction microbienne (Katia, Nawel, Karima et Yasmína) de nous avoir aidées à chaque fois qu'on en avait besoins.

Enfin, Dans le souci de n'oublier personne, que ceux qui nous ont soutenus, encouragées, conseillées et aidées de près où de loin (elles se reconnaîtront sûrement) trouve dans ces lignes l'expression de notre reconnaissance et gratitude.



Fariza et Wahiba

*D*édicaces



Je dédie ce modeste travail particulièrement à :

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

À ma noble mère, cette grande et douce amie qui a toujours su garder le sourire et me reconforter même dans les moments les plus délicats. Je ne saurais comment vous remercier de tous ce que vous faites pour nous et tous les mots de la terre ne sauraient exprimer toute ma gratitude, mon respect et mon admiration pour vous.

Merci et encore merci pour tous.

À mes frères et sœurs (Amine, Lilia, Lamia et Anis) pour leur amour et soutien moral.

À toute la famille Hammoum et Ghazli.

À TOUS mes amis et tous ceux qui me sont chers.

À Wahiba, ma très chers binôme et amie pour toute sa patience sa compréhension et sa bonne humeur de tout les jours.

À TOUS mes amis, je ne citerai pas de nom pour qu'il n'y ai pas de jaloux et de n'oublier personne.

Enfin, à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

À toutes et à tous, que vous trouviez en ce mémoire, ma profonde gratitude et mon éternelle reconnaissance.



Fariza

Dédicaces



En guise de reconnaissance, je dédie ce travail:

Aux deux êtres les plus chers au monde, mes parents, moteur de mon avancé, pour m'avoir écouté, soutenu et guidé vers la réussite. Quoique je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi ; si je suis arrivée là, c'est bien grâce à vous ;

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime et ma reconnaissance. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi, et ce que vous faites jusqu'à présent.

A mes très chers et merveilleux grands parents pour leur soutien.



À mon frère (Nadjim) et mes deux sœurs (Souhila et Wissam) pour leur soutien, leur aide et leurs encouragements.

Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous porte et je remercie dieu de vous avoir protégés pour être témoin de ma réussite.

A Mami pour sa confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux, pour tout son amour et sa tendresse. .

A Fariza, ma très chers binôme et amie pour toute sa patience et sa bonne humeur de tout les jours.



A TOUS mes amis, je ne citerai pas de nom pour qu'il n'y ai pas de jaloux et de n'oublier personne.



Enfin, à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin



Wahiba

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Cycle de l'azote.....	2
2. Fixation biologique de l'azote atmosphérique	4
3. Rhizobia.....	6
3-1. Diversité écologique.....	6
3-2. Diversité taxonomique	6
4. Légumineuses	10
4-1. Taxonomie des légumineuses.....	10
5. Symbiose Rhizobia-légumineuses	12
5-1. Processus de nodulation	12
5-2. Spécificité symbiotique	13
5-3. Gènes impliqués dans la fixation symbiotique.....	14
5-4. Facteurs limitant la symbiose Rhizobia- légumineuses	17
5-4-1. Stress thermique.....	17
5-4-2. Stress salin	18
5-4-3. Stress hydrique.....	18
5-4-4. Acidité et alcalinité du sol.....	19

Chapitre II: Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique.....	20
2. Méthodes.....	20
2-1. Mesure du pH et du calcaire du sol.....	20

2-2. Authentification des souches bactériennes purifiées	21
2-2-1. Préparation des cultures bactériennes	21
2-2-2. Obtention des plantules axéniques	21
2-2-3. Inoculation des plantules	23
3. Caractérisation phénotypique des isolats de <i>Cytisus triflorus</i>	23
3-1. Caractères cellulaires	23
3-2. Temps de génération et taux de croissance	24
3-3. Caractères culturaux	24
3-4. Caractérisation physiologique	24
3-5. Caractérisation nutritionnelle	25
3-6. Caractérisation biochimique.....	26
3-7. Etude de la sensibilité des rhizobia aux antibiotiques.....	29
4. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique.....	30

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Mesure du pH et du calcaire du sol	31
2. Authentification des souches bactériennes étudiées.....	31
3. Caractérisation phénotypique des isolats de <i>Cytisus triflorus</i>	32
3-1. Caractères cellulaires.....	32
3-2. Caractères culturaux.....	33
3-3. Caractérisation physiologique	34
3-4. Caractérisation nutritionnelle	39
3-5. Caractérisation biochimique.....	42
3-6. Etude de la sensibilité des rhizobia aux antibiotiques.....	44
4. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique.....	45
Conclusion et perspectives	50

Références Bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ADNr 16S: ADN ribosomique 16S.

ATP: Adénosine tri phosphate.

bv: biovar.

Ca²⁺: Calcium.

CaCO₃ : carbonate de calcium.

cm : centimètre.

CO₂ : dioxyde de carbone.

e⁻ : électron.

Fe : fer.

Fig: figure.

***fix*:** gène de fixation.

h: heure.

H⁺: proton.

H₂O: eau.

KCl: Chlorure de potassium.

kDa: Kilodalton.

km: Kilomètre.

Log: logarithme décimal.

LPS: lipopolysaccharide.

M : mole.

Mg: magnésium.

ml : millilitre.

mM : milimole.

mm : millimètre.

N₂ : diazote.

NaCl : chlorure de sodium.

NH₃: ammoniac.

NH⁴⁺: ion ammonium.

Nif: nitrogen fixation.

nm: nanomètre.

NO: oxyde d'azote.

NO₂⁻: nitrite.

NO₃ : nitrate.

Nod: gène de nodulation.

Ø : diamètre.

O₂: oxygène.

°C : degré Celsius.

PCR: polymerase chaine replication.

pH : potentiel hydrogène.

pSym: plasmide symbiotique.

sp : species (espèce non déterminée).

YMA: yeast mannitol agar.

YMB: yeast mannitol broth.

µl : microlitre.

µm : micromètre.

Liste des Figures

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
1	Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres	2
2	Processus de nodulation	13
3	Graines et gousses de <i>Cytisus triflorus</i>	20
4	Germination des graines de <i>Cytisus triflorus</i>	22
5	Germination des graines de <i>Vigna unguiculata</i>	23
6	Les nodules observés avec <i>Cytisus triflorus</i> sous la loupe	31
7	Les nodules observés avec <i>Vigna unguiculata</i> sous la loupe	32
8	Observation microscopique de quelques souches sous microscope optique	32
9	Les colonies de bactéries obtenues sur milieu YMA	34
10	Effet de la température sur la croissance des 18 souches testées	36
11	Effet du pH sur la croissance des 18 souches testées	37
12	Effet du NaCl sur la croissance des 18 souches testées	40
13	Assimilation des sucres par les rhizobia isolées de <i>Cytisus triflorus</i>	42
14	Assimilation des acides aminés comme source d'azote par les isolats de <i>Cytisus triflorus</i>	43
15	Assimilation des acides aminés comme source de carbone et d'azote par les rhizobia isolées de <i>Cytisus triflorus</i>	44
16	Dendrogramme de la CAH de 18 souches de rhizobia isolées de <i>Cytisus triflorus</i> sur la base de 64 caractères phénotypiques	49

Liste des Tableaux

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
I	Classification des rhizobia d'après Weir (2012)	7
II	Différents antibiotiques testés.....	29
III	Résultats du taux de croissance et du temps de génération	33
IV	Caractéristiques biochimiques des souches de rhizobia.....	45
V	Phénotype de résistance des souches testées.....	46
VI	Coefficient de similitude inter- souches	48

Introduction

La fixation biologique de l'azote est un processus biochimique qui assure la transformation de l'azote gazeux atmosphérique en ammoniac grâce aux micro-organismes diazotrophes.

La région de l'Est algérien a un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humide, sub-humide et semi aride. Elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées, parmi elles les espèces du genre *Cytisus* tel que *Cytisus trilforus*.

Les préoccupations environnementales croissantes, les réflexions actuelles en terme d'agriculture durable surtout au Nord de la Méditerranée, induisent des utilisations de légumineuses non exclusivement fourragères, mais liées à leur rôle de maintien mais surtout d'accroissement de la fertilité des sols par les symbioses fixatrices d'azote.

L'exploitation effective de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique pour l'amélioration de la production agricole exige pour ce faire non seulement la sélection du meilleur cultivar hôte mais également exige que la population de rhizobia corresponde et soit bien caractérisé.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail qui a pour objectif essentiel l'étude phénotypique des bactéries isolées de *Cytisus triflorus* de la région de Bejaia. Pour ce faire, ces souches ont subit une caractérisation culturale, cellulaire, nutritionnelle, physiologiques et biochimiques ainsi qu'un test de nodulation afin d'authentifier leur appartenance aux rhizobia.

Cette étude rentre dans le cadre d'un projet de recherche du laboratoire d'Ecologie Microbienne qui étudie la possibilité d'utiliser des espèces de légumineuses de la tribu *Genisteae* dans la restauration des sols dégradés.

Ce mémoire comprend trois chapitres essentiels : le premier aborde une synthèse bibliographique ayant pour but de présenter un aperçu général sur deux partenaires symbiotiques (légumineuses et rhizobia) mais surtout leurs interactions (symbiose légumineuse-rhizobia). Le second correspond à la méthodologie de travail adopté et au matériel végétal utilisé et enfin, le dernier rassemble tous les résultats obtenus lors de l'expérimentation.

1. Cycle de l'azote

L'azote atmosphérique représentant les 80% de l'air sec est la principale source d'azote de la planète. Il constitue après l'eau, l'un des facteurs limitant de la production végétale (Peret, 2007).

L'azote se transforme sans cesse d'une forme minérale à une forme organique (fig.1). La matière organique contenant l'azote se décompose dans le sol sous l'action des micro-organismes. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (Saoudi, 2008).

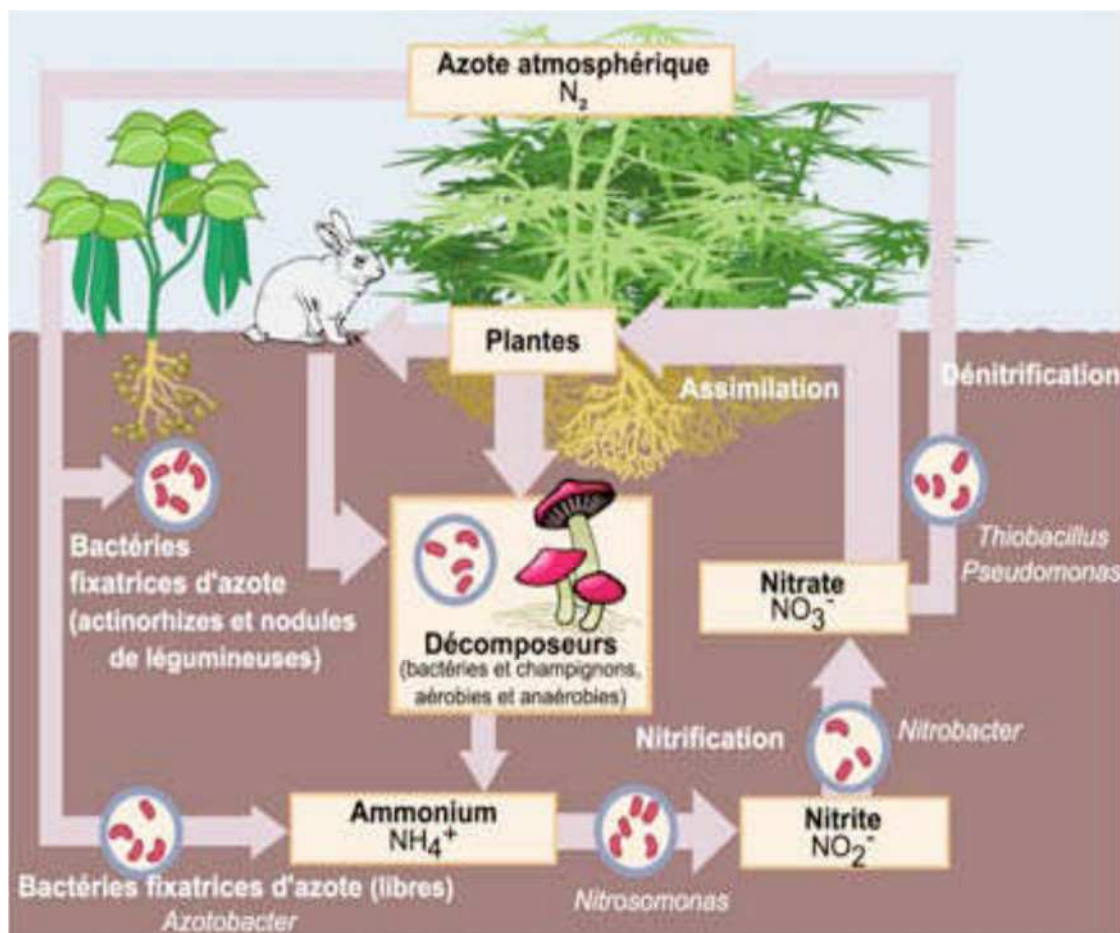


Figure 1 : Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic et Normand, 2009).

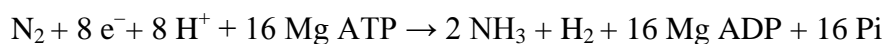
En général, l'azote de l'atmosphère passe successivement par les étapes de fixation, de nitrification et de dénitrification. Les nitrates assimilés par les plantes passent par une décomposition et une ammonification, puis il est de nouveau soumis à une nitrification.

2. Fixation biologique de l'azote atmosphérique

La fixation d'azote moléculaire peut s'opérer soit par un processus naturel, biologique ou non biologique (éclairs, combustions, volcanisme), soit par un procédé artificiel de synthèse (production d'engrais chimiques).

Elle est responsable de 65% de l'apport annuel en ammoniac au niveau de la planète, alors que la production industrielle en est de 25%.

Les micro-organismes fixateurs d'azote sont qualifiés de diazotrophes (Gaudry, 1997). Ils sont capables de réduire l'azote atmosphérique en ammoniac qui est ensuite converti en molécule organique. Cette réaction de réduction est rendue possible grâce à un complexe enzymatique appelé nitrogénase (Madigan *et al.*, 2007) selon la réaction chimique suivante :



Le complexe nitrogénase le plus étudié comprend deux composants métalloprotéiques : une ferroprotéine (protéine Fe) et une ferro-molybdoprotéine (protéine FeMo). Les gènes qui codent ces deux protéines et les autres protéines nécessaires à la réaction ou à sa régulation sont groupés dans un même opéron appelé *nif*. La protéine FeMo est un tétramère de 230 kDa codé par les gènes *nifD* et *nifK*. Elle contient le site réducteur du substrat. La protéine Fe est un homodimère de 64 kDa codé par le gène *nifH*. C'est le composant donneur d'électrons qui contient le site de liaison de l'ATP (Rees et Howard, 2000; Halbleib et Ludden, 2000).

La nitrogénase est sensible au dioxygène qui l'inactive de manière irréversible. Des mécanismes biologiques existent pour protéger l'enzyme de l'oxygène. Un aspect de ces mécanismes est l'induction par les rhizobia de la production dans les nodules de la leghémoglobine qui est analogue à l'hémoglobine des mammifères (Alberts *et al.* 1987). La leghémoglobine en raison de sa très grande affinité limiterait la diffusion de l'oxygène au niveau de la membrane bactérienne où s'effectue la formation de l'ATP indispensable à la réduction de l'azote par la nitrogénase (Gaudry, 1997).

Les micro-organismes fixateurs d'azote sont classiquement répartis en deux groupes: les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques.

2-1. Fixateurs libres

Les fixateurs libres d'azote atmosphériques, notamment les bactéries, sont très répandues. Ils colonisent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de divers animaux (Hopkins, 2003).

L'intensité de la fixation de l'azote par les bactéries libres est très variable selon les lieux et les conditions climatiques. On les rencontre en conditions anaérobies ou micro-aérophiles, mais aussi en conditions aérobies (Davet, 1996).

Les espèces aérobies comme les genres *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus* ont développés plusieurs mécanismes pour protéger leur nitrogénase contre le dioxygène. Les espèces anaérobies telles que *Clostridium pasteurianum* et les aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) possèdent la même aptitude. Plusieurs genres de cyanobactéries comprennent des espèces fixatrices d'azote. Leur nitrogénase est enfermée dans un hétérocyste, une structure cellulaire spécialisée qui fournit les conditions anaérobies nécessaire à la fixation de l'azote (Tortora *et al.*, 2003). La quantité totale d'azote fixé par les bactéries libres représente environ 50 millions de tonnes chaque année (Davet, 1996).

2-2. Fixateurs symbiotiques

Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote. La forme la plus commune d'association symbiotique est celle qui provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées nommées nodules (Hopkins, 2003). Dans cette association symbiotique la plante et la bactérie bénéficient d'une façon réciproque. La plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qui intègrera les protéines végétales (Tortora *et coll.*, 2003).

La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996).

3. Rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol, à Gram négatif, aérobies, non sporulantes. *In vitro*, les rhizobiums se présentent sous la forme de bâtonnets de 0.5-0.9 μm sur 1.2-3 μm . Ils sont généralement mobiles quand ils sont jeunes grâce à un seul flagelle polaire ; ou deux à six flagelles péritriches. Quand ils sont âgés, possèdent un ou plusieurs granules réfringentes de poly- β -hydroxybutyrates (PHB). Les rhizobiums forment des colonies incolores, blanches ou de couleur crème, sur le milieu de culture classique contenant de l'extrait de levure, du mannitol et des sels minéraux (YMA) (Duhoux et Nicole, 2004).

3-1.Diversité écologique

Les rhizobiums sont connus comme étaient des bactéries fixatrices d'azote ayant la faculté d'établir des relations symbiotiques avec plusieurs espèces de la famille des fabacées. Toutefois, une large population de rhizobiums non symbiotiques peut exister dans le sol ou dans la rhizosphère des plantes légumineuses (Sullivan *et al.*, 1996). Ils peuvent également exister comme des cellules viables dans l'eau où ils sont capables d'infecter et de noduler des légumineuses aquatiques telles qu'*Aechynomene spp.* et *Sesbania spp.* (Chaintreuil *et al.*, 2000). En outre, les rhizobiums ont été identifiés comme endophytes de plusieurs non légumineuses telles que le maïs, le riz et le blé (Ueda *et al.*, 1995 Engelhard *et al.*, 2000).

3-2.Diversité taxonomique

La taxonomie se base actuellement sur des données polyphasiques qui prennent en considération tous les facteurs discriminatoires déterminés par les différentes méthodes (taxonomie numérique, profils protéiques, hybridation ADN-ADN, PCR des ARNr 16s et 23s). En outre une nouvelle approche prenant en considération l'analyse des acides gras cellulaires est utilisée par Tighe *et al.*, (2000) pour identifier les souches inconnues de rhizobia.

Ces rhizobia appartiennent au Domaine *Bacteria*, au Phylum *Proteobacteria*. Ils se répartissent en 13 genres comportant 98 espèces, phylogénétiquement intercalés parmi de nombreux autres genres et espèces bactériennes à l'intérieur des α et des β -Protéobactéries

(<http://www.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/>). Les rhizobia de la classe des α -Protéobactéries appartiennent à l'ordre des Rhizobiales, alors que les rhizobia de la classe β -Protéobactéries appartiennent à l'ordre des Burkholderiales.

En effet de nouvelles espèces sont découvertes issues de transfert latéral de gènes symbiotiques. Toutefois une liste est maintenue par la " Sous-commission ICSP sur la taxonomie de *Rhizobium* et *Agrobacterium*."

Malgré tous les aléas de la taxonomie certains auteurs esquissent des classifications qui résultent de compilations de travaux. Ainsi Weir (2012) a dressé une liste de rhizobia qui se base sur les résultats présentés à la 14^e Conférence de la Fixation de l'Azote australienne, la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) et le site Web LPSN (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>).

Tableau I : Classification des rhizobia d'après Weir (2012).

Genre <i>Rhizobium</i> . Ce genre (Frank 1889) était le premier nommé inspiré de la signification latine qui veut dire vit dans la racine. Il contient actuellement 30 espèces.	
<i>Rhizobium alamii</i>	Berge <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizobium algalisoli</i>	Lu <i>et al.</i> , 2009b
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	García-Fraile <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhizobium daejeonense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	Nouvelle (López-López <i>et al.</i> , 2011)
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium galegae</i>	
<i>Rhizobium gallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium hainanense</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Nouvelle (Ren <i>et al.</i> , 2011b)
<i>Rhizobium huautlense</i>	
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>Rhizobium loessense</i>	Autrefois " <i>Rhizobium huanglingense</i> "
<i>Rhizobium lusitanum</i>	
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Confirmée comme espèce (Ramirez-Bahena <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizobium sullae</i>	Autrefois " <i>Rhizobium hedysari</i> "

<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhizobium undicola</i>	Autrefois « <i>Allorhizobium undicola</i> »
<i>Rhizobium vignae</i>	Ren <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhizobium yanglingense</i>	
Genre Mesorhizobium . Ce genre a été décrit par Jarvis <i>et al.</i> en 1997. Plusieurs espèces ont été déplacées du genre <i>Rhizobium</i> vers ce genre qui comporte actuellement 21 espèces.	
<i>Mesorhizobium albiziae</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
<i>Mesorhizobium australicum</i>	Nandasena <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Nouvelle (Chen <i>et al.</i> , 2011)
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Autrefois “ <i>Rhizobium ciceri</i> ”
<i>Mesorhizobium gobiense</i>	Han <i>et al.</i> , 2008b
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Autrefois « <i>Rhizobium huakuii</i> »
<i>Mesorhizobium loti</i>	Autrefois “ <i>Rhizobium loti</i> «
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Autrefois « <i>Rhizobium mediterraneum</i> »
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	Vidal <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	Nandasena <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2010
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	Lu <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
<i>Mesorhizobium tarimense</i>	Han <i>et al.</i> , 2008b
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Autrefois “ <i>Rhizobium tianshanense</i> »
Genre Ensifer autrefois Sinorhizobium . Le genre <i>Sinorhizobium</i> a été décrit par Chen <i>et al.</i> en 1988. Cependant quelques études récentes ont montré que <i>Sinorhizobium</i> et le genre <i>Ensifer</i> (Casida, 1982) appartiennent au même taxon. <i>Ensifer</i> garde la priorité (Young, 2003). La taxonomie de ce genre a été vérifiée en 2007 par Martens <i>et al.</i> Il contient actuellement 17 espèces.	
<i>Ensifer abri</i>	
<i>Sinorhizobium americanum</i>	
<i>Ensifer arboris</i>	
<i>Ensifer fredii</i>	Autrefois “ <i>Rhizobium fredii</i> “
<i>Ensifer garamanticus</i>	Merabet <i>et al.</i> , 2010
<i>Ensifer indiaense</i>	
<i>Ensifer kostiense</i>	
<i>Ensifer kummerowiae</i>	
<i>Ensifer medicae</i>	
<i>Ensifer meliloti</i>	Autrefois « <i>Rhizobium meliloti</i> »
<i>Ensifer mexicanus</i>	Lloret <i>et al.</i> , 2007
' <i>Sinorhizobium morelense</i> '	Pas encore nommée <i>Ensifer</i> (Martens <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ensifer adhaerens</i>	
<i>Ensifer numidicus</i>	Merabet <i>et al.</i> , 2010
<i>Ensifer sahelii</i>	Autrefois “ <i>Sinorhizobium sahelense</i> ”

<i>Ensifer sojae</i>	Li <i>et al.</i> (en attente)
<i>Ensifer terangae</i>	Nommée incorrectement <i>Sinorhizobium terangae</i>
Genre Bradyrhizobium . Ce genre a été décrit par Jordan en 1982 et contient actuellement 9 espèces.	
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	Autrefois " <i>Blastobacter denitrificans</i> "
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	Islam <i>et al.</i> , 2008
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Autrefois " <i>Rhizobium japonicum</i> »
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	
Genre Azorhizobium . Ce genre a été décrit par Dreyfus <i>et al.</i> en 1988. Il est représenté actuellement par 2 espèces.	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	Autrefois « <i>Azorhizobium johanna</i> e »
Genre Methylobacterium . Ce genre est actuellement représenté par une seule espèce.	
<i>Methylobacterium nodulans</i>	
Genre Burkholderia . Ce genre comporte actuellement sept espèces de rhizobia.	
<i>Burkholderia caribensis</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	
<i>Burkholderia mimosarum</i>	
<i>Burkholderia nodosa</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>Burkholderia phymatum</i>	
<i>Burkholderia sabiae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Burkholderia tuberum</i>	
Genre Cupriavidus . D'abord appelé <i>Wautersia</i> puis <i>Ralstonia</i> , ce genre subit actuellement plusieurs révisions taxonomiques et contient une seule espèce.	
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	
Genre Devosia . Il est actuellement représenté par une seule espèce.	
<i>Devosia neptuniae</i>	
Genre Microvirga . Il est actuellement représenté par trois espèces.	
<i>Microvirga lupine</i>	Nouvelle Ardley <i>et al.</i> (en attente)
<i>Microvirga lotononidis</i>	Nouvelle Ardley <i>et al.</i> (en attente)
<i>Microvirga zambiensis</i>	Nouvelle Ardley <i>et al.</i> (en attente)
Genre Ochrobactrum . Il est actuellement représenté par deux espèces.	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	Zurdo-Piñero <i>et al.</i> , 2007
<i>Ochrobactrum lupine</i>	
Genre Phyllobacterium . Il contient actuellement trois espèces.	
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	
<i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006(isolée de nodules sans preuve de capacité de noduler).
<i>Phyllobacterium leguminum</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006 (isolée de nodules sans preuve de capacité de noduler).
Genre Shinella . Il est actuellement représenté par une seule espèce	
<i>Shinella kummerowiae</i>	Lin <i>et al.</i> , 2008

4. Légumineuses

Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*. Elle comporte 727 genres et près de 20 000 espèces (Cronk et al., 2006). Ces espèces vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées. Elles sont extrêmement diversifiées (Guignard et Dupont, 2004).

4-1. Taxonomie des légumineuses

Selon Quezel et Santa, (1962), la famille des légumineuses est classée comme suit:

Règne :	Eucaryote
Phylum :	<i>Planta</i>
Sous règne:	Végétaux (phanérogame)
Embranchement :	Spermaphytes (plantes à graines)
Sous embranchement:	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	<i>Rosidae</i>
Ordre :	<i>Fabales</i>
Famille :	<i>Leguminosae</i>

En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papillioideae*, *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinioideae*) (Guignard et Dupont, 2004).

Caesalpinioideae

Il y'a environ 150 genres et 2200 espèces et sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Très peu de membres de cette sous-famille sont capables de noduler, 30% selon Soltis et al., (1995) contre 90% chez les deux autres sous-familles.

Mimosoideae

Cette sous famille est constituée de 62 genres et environ 2500 espèces qui sont présentement principalement dans les forêts tropicales et subtropicales avec notamment le genre *Acacia* (Young *et al.*, 2003).

Papillionoideae

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » (Guignard et Dupont, 2004).

La sous-famille monophylétique des *Papillionoideae* renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995). Elle est la plus diverse avec 429 genres et environ 12000 espèces (Young *et al.*, 2003). Elle constitue de loin la sous famille la plus importante, participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000). Cependant il y a encore beaucoup de légumineuses qui n'ont jamais été examinées pour la nodulation (Sprent, 1999).

Parmi cette sous famille, une espèce du genre *Cytisus* a été concernée par cette étude il s'agit de *Cytisus triflorus*.

Cytisus triflorus

Le genre *Cytisus* fait partie des légumineuses de tribu des *Genisteae*. Ce sont des arbustes ou arbrisseaux épineux ou non, à floraison abondante, en général à feuilles trifoliolées de couleur jaunes. On reconnaît dans ce genre six espèces: *C.purgans*, *C.linifolius*, *C.fontanisii*, *C.triflorus*, *C.monspessulanus*, *C.arboreus*.

Cytisus triflorus est un arbrisseau de 1 à 1.5 m dressé, robuste, à rameaux allongés. Les jeunes rameaux sont couverts de poils, feuilles pétiolées, fleurs latérales en grappes feuillées sur les anciens rameaux; pédicelles égalant à peu près le calice; calice à poils étalés dressé, allongé, tubuleux, gousses de 25-30 mm, noires, très velues-soyeuses (<http://www.tela-botanica.org>).

5. Symbiose rhizobia-légumineuses

Le développement de la relation symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses est un processus fortement interactif qui inclut la communication moléculaire entre les partenaires. En effet, les flavonoïdes sont les composés excrétés par des plantes. Ces substances phénoliques sont les facteurs les plus subtils qui aident les associés à s'assortir (Broughton *et al.*, 2000), interagissent avec les protéines *nodD*, induisent des gènes pour la nodulation (Terefework, 2002) et déclenchent spécifiquement leur expression (Perret *et al.*, 2000).

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).

5-1. Processus de nodulation

L'interaction entre les plantes légumineuses et les rhizobia nécessite la formation d'un nouveau organe, le nodule ; avec cette structure les bactéries se différencient en bactéroïdes qui fixent l'azote moléculaire pour le bénéfice de la plante (Xi *et al.*, 2000).

L'interaction commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les rhizobia et un échange de molécules-sigales s'établit. Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances (Kape *et al.*, 1991; Waligora *et al.*, 2008).

Dès la reconnaissance du rhizobium spécifique par la plante, des modifications structurales apparaissent dans les premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologiques du poil absorbant : dépolarisations de la membrane plasmique, modification de concentrations du Ca^{2+} intracellulaire, augmentation du pH et fragmentation de l'actine (Duhoux et Nicole, 2004). Une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite cross de berger à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient (Esseling *et al.*, 2003). C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection (Duhoux et Nicole, 2004). Le cordon d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse par endocytose les rhizobiums dans les cellules du méristème nodulaire.

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins *et al.*, 2003). Les rhizobiums se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation d'azote, nommées bactéroïdes (Raven *et al.*, 2007).

Les bactéroïdes restent entourés d'une membrane, nommée membrane péribactéroïdienne. La différenciation en bactéroïdes est marquée par de nombreuses modifications métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'autres facteurs dont l'organisme a besoin pour accomplir sa tâche principale: la fixation d'azote (Hopkins *et al.*, 2003).

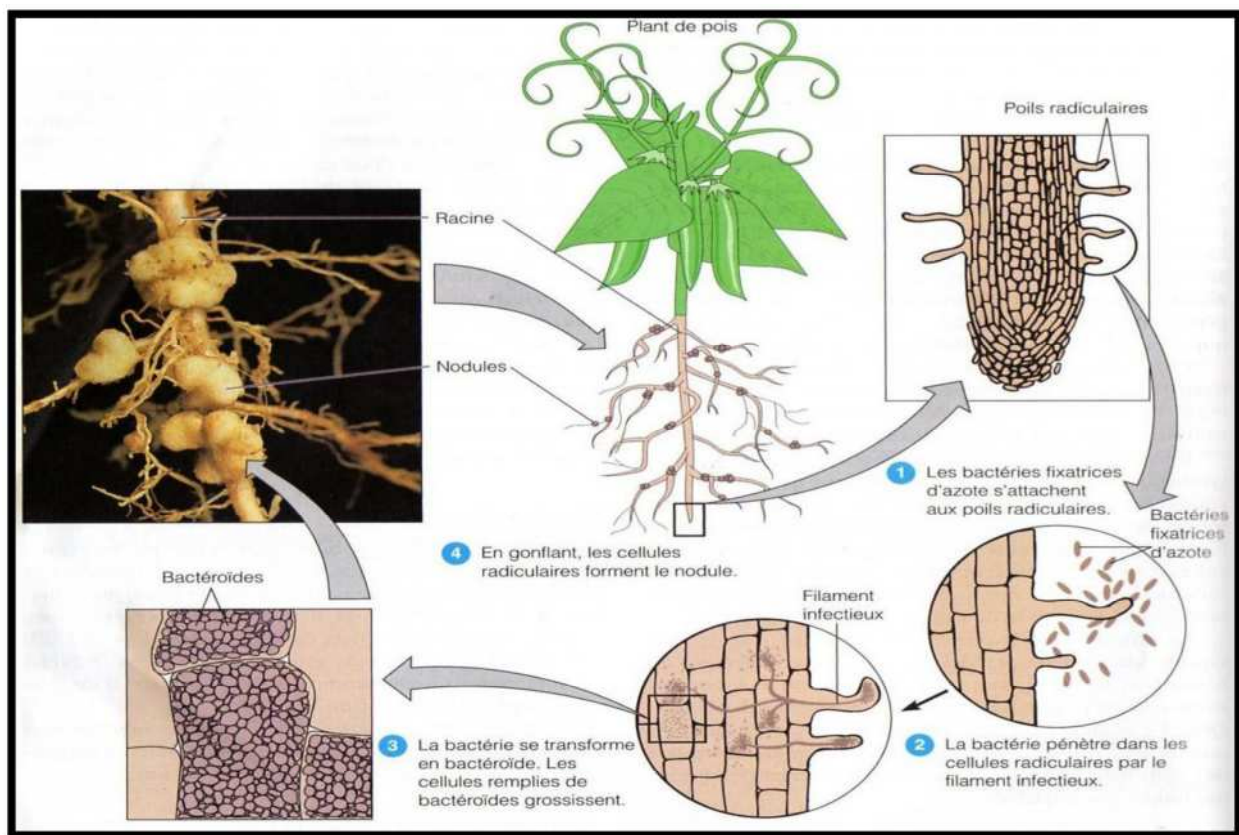


Figure 2: Processus de nodulation (Tortora *et al.*, 2003).

5-2. Spécificité symbiotique

La spécificité d'hôte est l'une des caractéristiques majeures de la symbiose rhizobia-légumineuses. En effet, certaines souches bactériennes ont un spectre d'hôte très large, comme la souche de *Sinorhizobium sp.* NGR 234 qui peut noduler expérimentalement près de 120 genres de légumineuses (Pueppke et Broughton, 1999), ou celles du haricot qui s'associent

à diverses légumineuses tropicales (Hernandez-Lucas *et al.*, 1995). Inversement, le spectre d'hôte est étroit chez *Sinorhizobium meliloti* qui ne s'associe qu'aux espèces végétales des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (Krishnan et Pueppke, 1991) ainsi que chez *Mesorhizobium huakuii* (Chen *et al.*, 1991).

5-3. Gènes impliqués dans la fixation symbiotique

L'analyse génétique de diverses espèces de rhizobium a permis d'identifier des gènes *nod* qui contrôlent la spécificité de l'hôte, l'infection et la formation des nodosités. Ces gènes *nod* sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les partenaires symbiotiques.

5-3-1. Gènes impliqués dans la nodulation *nod*, *nol*, *noe*

La capacité des rhizobia à former des nodules repose sur la présence dans leur génome d'un ensemble de gènes de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*) indispensables à la symbiose. Les gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitoooligosaccharides (facteurs Nod), qui agissent comme molécules signal et induisent la formation des nodules (Boivin-Masson *et al.*, 2006). Ils sont activés par les flavonoïdes des exsudats racinaires émis par l'hôte et sont de localisation différente d'une espèce bactérienne à une autre. Chez *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. tropici*, *Sinorhizobium* sp. NGR 234 et *S. meliloti*, les gènes *nod* sont localisés majoritairement sur des plasmides symbiotiques (pSym). Chez *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Sinorhizobium fredii* ou *Mesorhizobium loti*, les gènes *nod* sont chromosomiques (Martinez -Romero *et al.*, 1990 ; Garcia de los Santos *et al.*, 1996).

Trois ensembles de gènes semblent négocier les premières étapes de la nodulation :

- Les gènes *nod* communs

Les gènes communs *nodA*, *nodB* et *nodC* sont des gènes clés de la nodulation car ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs Nod (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

Ainsi, hormis les gènes *nodA*, *nodB*, *nodC* fonctionnellement interchangeable entre

toutes les espèces de rhizobia (Madigan et Martinko, 2007) est nécessaires notamment pour induire le recourbement des poils absorbant et inciter la division des cellules corticales (Pelmont, 1995). *nodC* code pour une protéine qui s'incorpore sur la membrane de la surface bactérienne et peut intervenir dans le déplacement de la bactérie vers la plante. *nodA* et *nodB* peuvent produire des composants à faible poids moléculaire favorisant la croissance des plantes, en stimulant la division cellulaire (Gage, 2004).

- Les gènes de spécificité d'hôte

Un grand nombre des gènes *nod* détermine la spécificité d'hôte. Ils sont dits: gènes *hsn* (host specificity of nodulation). Ces gènes nommés aussi gènes *nod* EFGH (Hopkins, 2003). Ils sont spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables (Pelmont, 1995), présents chez certaines espèces et non chez d'autres. Ces gènes déterminent la nature des groupements greffés sur la structure tétramérique de base. Ils sont, de ce fait, responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet, 1996).

Une mutation au niveau de ces gènes a pour effet de provoquer un changement de la spécificité de la souche à son hôte; exemple : la mutation au niveau des gènes *nod E* et *nod F* peut réduire ou retarder la nodulation de *Rhizobium leguminosarum* (Pelmont, 1995).

- Les gènes *nodD*

Ce sont des gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoïdes (Pelmont, 1995). Chez *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, le gène *nodD* code pour une protéine régulatrice qui contrôle la transcription des autres gènes *nod* (Madigan, 2007). En effet, les protéines NodD synthétisées vont se lier à la *nod*-box, lieu de régulation des gènes *nodA*, *B* et *C*. Avec la coopération des flavonoïdes, les protéines NodD vont pouvoir promouvoir l'expression des gènes *nodA*, *B* et *C*.

5-3-2. Gènes impliqués dans la fixation de l'azote atmosphérique *nif*, *fix*

Les gènes impliqués dans la fixation de l'azote atmosphérique sont les gènes *nif* et gènes *fix*.

- Gènes *nif*

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes *nif* qui contrôlent la synthèse d'un complexe enzymatique ; nitrogénase, ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le rhizobium libre (Dupuy et Nougier, 2005).

La nitrogénase est une protéine très conservée, et les gènes *nifHDK* qui codent ses composants sont présents chez tous les fixateurs d'azote examinés à ce jour (Madigan *et al.*, 2007). Deux gènes *nif* : *nifD* et *nifK*, par exemple, codent respectivement pour les deux sous-unités de la protéine MoFe. La protéine Fe et la ferrédoxine sont codées respectivement par les gènes *nifH* et *nifF*. D'autres gènes *nif* sont impliqués dans l'insertion du cofacteur de la protéine MoFe qui est nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase (Brewin *et al.*, 1992). Ainsi que dans l'activation et l'assemblage du complexe enzymatique (Hopkins, 2003).

- Gènes *fix*

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Brewin *et al.*, 1992; Hopkins, 2003). Les gènes *fixNOQP* codent pour une cytochrome oxydase, *fixGHIS* code pour la pompe cationiques, *fixABCX* code pour une flavoprotéine, qui sont tous nécessaires pour la fixation de l'azote. Dans l'environnement des nodules racinaires, cette oxydase offre l'énergie nécessaire, alors que la flavoprotéine dirige le flux d'électrons à l'oxydase (Crossman, 2005).

5-4. Facteurs limitant la symbiose rhizobia- légumineuses

Plusieurs conditions de l'environnement sont considérées comme étant des facteurs limitant la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote dans la symbiose rhizobia-légumineuses. Le processus de la fixation de N₂ est fortement lié à l'état physiologique de la plante hôte. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce qu'une souche rhizobienne concurrente et persistante exprime sa pleine capacité pour la fixation de l'azote si les facteurs limitant (salinité, pH défavorable du sol, insuffisance nutritive, toxicité minérale, températures extrêmes, humidité insuffisante ou excessive du sol, photosynthèse non satisfaisante, maladies de la plante et pâturage) imposent des limitations à la vigueur de la légumineuse hôte (Zahran, 1999).

5-4-1. Stress thermique

Le stress thermique (non extrême) induit généralement l'expression de protéines de stress thermique HcP (Heat shock proteins), qui assurent la protection des enzymes clefs de la physiologie microbienne (Cloutier *et al.*, 1992). L'effet des basses températures sur les rhizobiums est moins rapporté par rapport aux températures élevées (Prévost *et al.*, 1987). Il a été rapporté que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation (Zhang *et al.*, 1996). A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999). La température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce. Il a été ainsi rapporté que les températures critiques de la fixation d'azote sont de 30°C pour la trèfle et le pois (Michiels *et al.*, 1994), de 30°C à 33°C pour le Haricot (Piha et Munns, 1987) et varient entre 35°C et 40°C pour les graines de cacahuètes et de soja (Michiels *et al.*, 1994).

5-4-2. Stress salin

Parmi les facteurs environnementaux, la salinité constitue la contrainte majeure limitant le développement et la productivité des plantes cultivées. Environ 40% de la surface terrestre présente des problèmes potentiels de salinité (Cordovilla *et al.*, 1994). Les zones à problèmes se localisent essentiellement dans les régions tropicales et méditerranéennes (FAO, 1988). Le facteur causal de la salinisation des sols est principalement l'irrigation (Szabolcs, 1986). L'augmentation de la teneur en sel est également liée au lessivage des cations, à l'évapotranspiration, aux conditions climatiques et à la nature du sol. Le stress salin affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol. Les cellules de rhizobia exposées aux concentrations élevées de sel accumulent souvent des osmolytes organiques protecteurs tels que des acides aminés comme la proline, la bétaine (et dérivés), l'ectoïne et le glutamate ou des carbohydrates comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Brhada *et al.*, 1997 ; Gouffi *et al.*, 1999).

5-4-2. Stress hydrique

La sécheresse ou la déshydratation est un facteur abiotique majeur qui conduit à la réduction de la production agricole, due au déficit de l'eau. Les réponses des plantes à cet effet seront par des changements cellulaires, métaboliques et moléculaires pour l'adaptation à ce stress (Sazzad, 2007). Elle exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixée car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige (Ganry et Dommergues, 1995).

Le principal résultat de la sécheresse est le déséquilibre métabolique et osmotique de la plante suivit de l'expression de la croissance cellulaire et d'une photosynthèse inadéquate à cause de dioxyde du carbone limité rapidement grâce à la fermeture du stroma (Sazzad, 2007).

5-4-3. Acidité et alcalinité du sol

L'acidité est un facteur chimique qui a un impact direct sur la croissance et la persistance d'initiation des nodules et l'effectivité de la fixation d'azote (Kellman, 2008).

La croissance des rhizobia et de la plante hôte est limitée sur les pH extrêmes. La majorité des légumineuses requièrent un pH du sol neutre ou légèrement acide pour leur croissance spécifique lorsqu'elle dépend de la fixation symbiotique d'azote (Zahran, 1999).

Les mécanismes d'adaptation physiologiques et biochimiques des rhizobiums sous les conditions acides sont nombreux, ces mécanismes incluent entre autres l'exclusion et l'expulsion des protons H^+ , la forte teneur en potassium et en glutamate du cytoplasme des cellules stressées, le changement de la composition du LPS et l'accumulation de polyamines.

L'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums, la majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9. Cependant, l'effet négatif que présente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité des minéraux tels que, le fer et le manganèse, indispensables autant pour les rhizobia que pour la plante hôte (El-Hilali, 2006).

1. Matériel biologique

Cette étude a concerné 18 souches pures présumées appartenir aux rhizobia. Ces souches ont été isolées à partir de nodules racinaires de *Cytisus triflorus* prélevés dans la région d'Oued Dess à environ 40 km à l'Ouest de Bejaia. Ces souches appartiennent à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne.

Les graines de *Cytisus triflorus* (fig.3) utilisées pour l'expérimentation ont été récoltées cette année au niveau du même site d'où proviennent les souches. D'autres graines de *Vigna unguiculata*, provenant du marché local, ont également été utilisées.

Des prélèvements du sol de la même région ont été prévus également.



Figure 3: Graines et gousses de *Cytisus triflorus*.

2. Méthodes

2-1. Mesure du pH et du calcaire du sol

- pH

Le pH est un coefficient qui caractérise l'acidité d'un sol (présence d'ions H^+) ou son alcalinité (généralement due à l'abondance d'ions calcium). Il définit la concentration d'ions H^+ dans la phase liquide du sol. Le pH varie de 0 à 14 et la neutralité est atteinte lorsque le pH est égal à 7. On peut classer le sol selon leur acidité de la manière suivante :

- pH < 4,5 : sols très acides.
- 4,5 < pH < 6 : sols faiblement acides

- $6 < \text{pH} < 7$: sols équilibrés permettant une bonne alimentation minérale
- $\text{pH} > 7$: sols calcaires et /ou salés.

Après avoir séché à l'étuve ($45^{\circ}\text{C}/ 48$ heures) le sol, il a été débarrassé des débris végétaux, et tamisé ($\phi=2$ mm) afin d'obtenir une terre fine qui fera l'objet des tests. Le pH du sol est déterminé par la méthode électro-métrique d'une solution aqueuse de terre fine. Deux mesures de pH sont effectuées:

- pH_{eau} qui correspond à la concentration en ions H^+ dissociés présents dans la solution du sol, à un instant donné (acidité actuelle).
- pH_{KCl} qui permet de connaître les ions H^+ non dissociés, retenues par des molécules organiques ou par des minéraux argileux.

- **Calcaire total**

Le dosage du CaCO_3 total (%) est réalisé par la méthode volumétrique à l'aide du calcimètre de BERNARD, en décomposant les carbonates de calcium par l'acide chlorhydrique ($\text{HCl } 1/2$) (v/v) et mesurant le volume de CO_2 dégagé.

2-2. Authentification des isolats de *Cytisus triflorus*

Le test de nodulation consiste à démontrer l'aptitude des souches à infecter leur plante-hôte à savoir *Cytisus triflorus*. Ce principal critère permet de confirmer l'appartenance des souches aux rhizobia.

2-2-1. Préparation des cultures bactériennes

Les souches ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) (annexe 1a). Après 48 heures d'incubation à 28°C , une suspension bactérienne a été préparée.

2-2-2. Obtention des plantules axéniques

Deux protocoles ont été appliqués l'un sur les graines de *Cytisus triflorus* et l'autre sur les graines de *Vigna unguiculata* pour obtenir des plantules axéniques.

- Concernant les graines de *Cytisus triflorus* :

Les graines sont immergées dans de l'acide sulfurique pure (H_2SO_4) pendant 3 heures, suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile (10 fois) pour éliminer toutes traces d'acide sulfurique. Les graines ainsi stériles sont disposées dans des boîtes de Pétri contenant du papier absorbant imbibés d'eau distillée stérile puis mises à l'obscurité à une température de 20°C (fig. 4). Après 4 à 5 jours, les graines germées ont été transférées aseptiquement dans des tubes à essai (160 x 15mm) contenant le milieu Jensen (annexe 1b). La partie racinaire est gardée à l'obscurité et les cultures sont exposées aux conditions naturelles de luminosité et de température.

- Pour Les graines de *Vigna unguiculata* :

Les graines sont immergées dans de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 3 minute. Ceci est suivi d'un très bon rinçage dans dix bains d'eau distillée stérile pour éliminer tout effet toxique de l'hypochlorite de sodium. Les graines ainsi stérilisées, en surface, ont été mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant du papier absorbant imbibés d'eau distillée stérile et incubées à l'obscurité à une température de 20°C (fig. 5). Après 4 à 5 jours d'incubation, les graines ayant germées sont transférées aseptiquement dans des flacons contenant 250 ml de milieu Jensen stérile (annexe 1b). La partie racinaire est recouverte avec du papier aluminium jusqu'à la limite supérieure du milieu afin de lui assurer l'obscurité nécessaire.



Figure 4 : Germination des graines de *Cytisus triflorus*.



Figure 5: Germination des graines de *Vigna unguiculata*.

2-2-3. Inoculation des plantules

Les plantules axéniques sont inoculées avec 1 ml d'une suspension bactérienne contenant environ 10^9 bactéries. Pour chaque souche bactérienne, au minimum trois répétitions ont été prévues. Les cultures sont exposées aux conditions naturelles de lumière et de température.

3. Caractérisation phénotypique des isolats de *Cytisus triflorus*

3-1. Caractères cellulaires

Toutes les souches ont subi une observation à l'état frais pour révéler la mobilité, la forme et la présence de granules de poly β - hydroxybutyrates. Le test Gram a été effectué sur des souches cultivées sur milieu YMA et incubées à 28°C pendant 48h en suivant le protocole ci-dessous.

- Fixer un frottis à la chaleur ;
- Recouvrir la lame par un colorant basique (le violet de Gentiane) et laisser agir pendant 1 minute ;
- Verser sur la lame la solution iodée (lugol) et laisser agir pendant 30 secondes ;
- Rincer à l'alcool ;
- Laver à l'eau distillée pour arrêter l'action de l'alcool ;
- Recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 minute ;
- Laver à l'eau distillée ;
- Égoutter la lame sur du papier absorbant ;

- Observer sous microscope optique à l'objectif (x100) à immersion en ajoutant une goutte d'huile à immersion.

3-2. Temps de génération et taux de croissance

Le temps de génération (G) correspondant au temps de dédoublement de la biomasse et le taux de croissance qui est constant et atteint sa valeur maximal.

- Lorsque la phase exponentielle est précédé par une phase de latence

$$\text{Log } X = Rt \log 2 + \log X_0 \quad \text{d'où } R = \frac{\text{Log } X - \log X_0}{t \log 2}, \quad (X = 2^{Rt})$$

$$\text{Et } G = \frac{t \log 2}{\text{Log } X - \log X_0}$$

- Lorsque la phase de latence est nulle, R est calculé comme suit :

$$R = \frac{\text{Log } X_2 - \log X_1}{(t_2 - t_1) \log 2}$$

n : nombre de division

t : temps connu

3-3. Caractères cultureux

La forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect des colonies, l'élévation et la production des exopolysaccharides (EPS) sont des paramètres cultureux pris en considération pour la description des colonies bien individualisées obtenues après 48 heures d'incubation à 28°C sur milieu YMA.

3-4. Caractérisation physiologique

A ce niveau sont étudiés les effets de facteurs tels que le pH, la température et la salinité sur la croissance des isolats de *Cytisus triflorus*. Pour chaque expérience, un volume de culture cellulaire contenant environ 10^7 cellules/ml, dénombrées avec la cellule de Malassez a été utilisé, après 48h d'incubation, la croissance des souches est estimée par

l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$. Trois exemplaires ont été pris en considération pour chaque test.

3-4-1. Effet de la température

Des cultures d'isolats de *Cytisus triflorus* ont été réalisées dans des tubes contenant 5 ml du milieu Yeast Mannitol Broth (YMB) (annexe 1a). Ces cultures ont été incubées à différentes températures : 26°C, 28°C, 30°C, 32°C et 34°C.

3-4-2. Effet du NaCl

L'influence du NaCl sur la croissance des souches étudiées a été réalisée sur milieu YMB. Les concentrations choisies pour cette étude sont de 100mM, 200mM, 300mM, 400mM et 500mM de NaCl.

3-4-3. Effet du pH

L'étude de l'effet des différents pH sur la croissance des isolats de *Cytisus triflorus* a été réalisée sur milieu YMB, ajusté à des pH allant de 4 à 10.

3-5. Caractérisation nutritionnelle

Les types nutritionnels sont des caractères très importants pour la classification de ces micro-organismes. Pour ce faire, des volumes contenant environ 10^7 cellules/ml, dénombrées avec la cellule de Malassez, ont été utilisés comme inoculum standard. Après 48 heures d'incubation, la croissance de ces souches est estimée par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$. Chaque test est réalisé en trois exemplaires.

3-5-1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone

L'assimilation des différents sucres comme unique source de carbone a été testée en utilisant un milieu YMB dépourvu de mannitol et de toute autre source de carbone. En effet l'extrait de levure a été remplacé par 0,1% de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) comme source d'azote. Cinq sucres ont été testés à raison de 1% : glucose, dextrine, saccharose, arabinose et glycérol.

3-5-2. Assimilation des acides aminés comme seule source d'azote

L'utilisation des acides aminés par les souches comme source d'azote est recherchée dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu composé de mannitol, de sels minéraux (NaCl, KH₂PO₄, MgSO₄) et un acide aminé comme source d'azote. Cinq acides aminés à raison de 0,1% dans le milieu ont été testés : méthionine, histidine, glycine, arginine et alanine.

3-5-3. Assimilation des acides aminés comme source d'azote et de carbone

Un milieu contenant des sels minéraux (NaCl, KH₂PO₄, MgSO₄) et un acide aminé a testé ajouté à raison de 0,1% a été utilisé. Pour cela, cinq acides aminés ont été employés, il s'agit de la méthionine, histidine, glycine, arginine et alanine.

3-6. Caractérisation biochimique

Les tests biochimiques sont réalisés selon les techniques utilisées par Marchal *et al.* (1982) et les milieux de culture sont commercialisés par l'institut Pasteur d'Alger (I.P.A.).

Les méthodes ont porté sur l'activité de la catalase, nitrate et nitrite réductase, citrate perméase, fermentation du glucose, saccharose et du lactose, production de gaz et de sulfure d'hydrogène (H₂S), production d'acide et/ou d'acétoïne, le type respiratoire et la production d'indole.

3-6-1. Type respiratoire

Cette étude est menée sur le milieu gélose viande foie (VF) (Annexes 1c). Des tubes très fin (9X18mm) contenant du VF ont étéensemencés à l'aide d'une pipette Pasteur scellée et chargée. La pipette est introduite au fond du tube et on remonte en spirale.

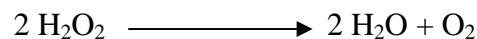
Après 48 heures d'incubation à 28°C, le type respiratoire des souches est déterminé par la position de la zone de croissance.

- **Type aérobic strict** : culture seulement en présence de di-oxygène donc croissance uniquement en surface ;
- **Type aéro-anaérobic** : culture en présence et en absence de di-oxygène donc croissance sur la longueur du tube ;

- **Type anaérobie strict** : culture uniquement en l'absence de di-oxygène (croissance au fond du tube) ;
- **Type micro-aérophile** : culture seulement dans une zone de pression faible en di-oxygène.

3-6-2. Test de la catalase

Il consiste à déposer au centre de la lame quelques colonies prélevées à partir d'une culture pure et à ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10% . Une souche catalase positive se manifeste par une effervescence selon la réaction suivante:



3-6-3. Utilisation du citrate

Nous avons utilisé le milieu citrate de Simmons qui ne contient qu'une seule source de carbone (citrate). Toute croissance indique son utilisation et donc alcalinisation du milieu qui se traduit par un virage au bleu de l'indicateur coloré « bleu de bromothymol ».

3-6-4. Production d'indole

Le milieu utilisé pour ce test est l'eau peptonée exempte d'indole. Celui-ci riche en tryptophane permet de détecter la présence de la tryptophane-désaminase qui dégrade le tryptophane en indole. Les tubes sontensemencés avec 100 µl d'une suspension bactérienne obtenue sur milieu YMB. Après 48 heures d'incubation à 28°C, quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées. La réaction est immédiate par l'apparition d'un anneau rouge en surface.

3-6-5. Fermentation du lactose, du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) nous renseigne sur la dégradation des sucres qui est accompagnée d'une production d'acide. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH, le rouge de phénol, qui en milieu basique devient rouge et en milieu acide devient jaune. Le thiosulfate est réduit en sulfures d'hydrogènes (H₂S) par certaines bactéries. Ce dernier réagit avec un sel de Fer pour donner un précipité noir.

La pente de la gélose est ensemencée par stries serrés, puis le culot par piqûre profonde et centrale. L'incubation se fait à 28°C pendant 48h. La lecture se fait comme suit :

- ✓ Fermentation du lactose et / ou du saccharose : virage au jaune de la pente.
- ✓ Fermentation du glucose : virage du culot au jaune.
- ✓ Production de gaz: apparition de bulles de gaz.
- ✓ Production d'H₂S: noircissement du milieu.

3-6-6. Réduction des nitrates

L'étude de la réduction des nitrates est faite sur le bouillon nitraté. Après ensemencement de ce bouillon on incube à 28°C pendant 48 heures. Une fois les 48h écoulées, on additionne le réactif de Griess NRI (acide sulfanilique) et NRII (α -naphtylamine).

- La coloration rouge cerise traduit la transformation des nitrates en nitrites par la nitrate réductase (NR+).

- L'absence de la coloration n'indique pas une réaction négative. On ajoute alors une pincée de poudre de zinc (réducteur de nitrates). Dans ce cas, si le milieu devient rouge les souches n'ont pas réduit les nitrates, par contre si le milieu demeure incolore, les bactéries ont dégradé les nitrates au-delà du stade nitrite (NR++).

3-6-7. Production d'acide et d'acétoïne

C'est la mise en évidence des dérivés de l'acide pyruvique au cours de la fermentation du glucose. Deux tests sont effectués:

- Réaction au Rouge de Méthyle (RM).
- Réaction de Voges-Proskauer (VP).

Les souches sont ensemencées sur milieu Clark et Lubs puis incubées à 28°C pendant 48h.

➤ Mise en évidence de la production d'acide (RM)

A 3 ml de culture réalisée sur milieu Clark et Lubs, deux gouttes de rouge de méthyle ont été ajoutés. Ce réactif reste rouge lorsque le pH est inférieur à 4,2 ce qui traduit la

production d'acide, dans ce cas la souche est considéré RM +. Si la couleur rouge de méthyle vire au jaune (acidification), la souche est dite RM -.

➤ **Mise en évidence de la production d'acétoïne (VP)**

A 3 ml de culture réalisée sur milieu Clark et Lubs, deux gouttes du réactif VPI puis deux gouttes du réactif VP II ont été ajoutées. La présence d'une coloration rouge nous renseigne sur la présence d'acétoïne (VP +), son absence implique une réaction négative (VP -).

3-7. Etude de la Sensibilité des rhizobia aux antibiotiques

La résistance ou la sensibilité des souches aux antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller-Hinton selon les recommandations du comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2010) (annexe 1). Le procédé est le suivant:

- Inonder toute la surface de la gélose à l'aide de 1ml d'une suspension bactérienne ;
 - Supprimer l'excès du liquide et éliminer les gouttes qui restent coller au bord par aspiration à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ;
 - Sécher les boîtes de Pétri à l'étuve à 28 °C pendant 5 minutes ;
 - Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'un distributeur sur la surface de la gélose ;
 - Incuber à 28°C pendant 48 heures.
- ✓ Quatre agents antimicrobiens de différentes familles, sont utilisés : Doxycycline, Pénicilline, Érythromycine et Amoxicilline.

Tableau II : Différents antibiotiques testés.

Antibiotique	Codes	Charge (µg)	Famille d'antibiotiques	Diamètres critiques (mm)	
				S	R
Doxycycline	DO	30	Tétracyclines	≥ 19	< 17
Pénicilline	P	10	Bêta- lactamine (Pénicillines)	≥ 29	< 18
Érythromycine	E	15	Macrolides	≥ 22	< 17
Amoxicilline	AX	25	Bêta- lactamine (Pénicillines)	≥ 23	< 16

4. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique

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

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

Cs : coefficient de similitude entre deux souches.

A : nombre de tests positifs communs aux deux souches.

B : nombre de tests différents entre deux souches.

C : nombre de tests négatifs communs aux deux souches.

Le calcul permet de comparer les souches deux à deux. Les résultats de l'étude des caractères phénotypiques ont été convertis en une matrice pour un traitement numérique grâce au logiciel XLSTAT Pro version 7.5.2.

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

Le calcul des distances euclidiennes indique l'indice de ressemblance entre les souches. Parmi les différents types d'analyse numérique qui révèlent la structure taxonomique, la plus utilisée est l'analyse des clusters (groupe d'échantillons ou de souches), sous forme d'un diagramme ramifié similaire à un arbre ou dendrogramme où plus les branches sont proches, plus les groupes de souches sont similaires.

1. Mesure du pH et du calcaire du sol

Les mesures du pH de l'échantillon du sol prélevé à Oued Dess, l'endroit où nous avons pris les graines, donnent les valeurs suivantes: le pH eau = 6.3 et le pH KCl = 5.2. Ceci indique clairement que le sol d'Oued Dess est faiblement acide. Ce résultat est confirmé par la mesure du calcaire total. En effet, le sol est pauvre en calcaire (1.57%).

2. Authentification des souches bactériennes étudiées

Le test de nodulation a été réalisé sur *Vigna unguiculata*, considérée comme légumineuse à large spectre d'hôte et sur *Cytisus triflorus* qui est la plante hôte. Ceci a permis d'authentifier les 18 isolats bactériens de *Cytisus triflorus* comme appartenant aux rhizobia (fig.6 et 7). Les nodules sont apparus au bout d'un mois d'inoculation. Le nombre de ces nodules varie de 1 à 22 pour toutes les plantes. Leur taille est faible chez *Cytisus triflorus* (1 à 2 mm) par rapport à celle obtenue chez *V. unguiculata* (1 à 5 mm). La couleur est brune, de forme sphérique et rugueuse.



Figure 6: Les nodules observés avec *Cytisus triflorus* sous la loupe (Grossissement 10 x 0,8).



Figure 7: Les nodules observés avec *Vigna unguiculata* sous la loupe
(Grossissement 10 x 0,8).

3. Caractérisation phénotypique des isolats de *Cytisus triflorus*

3-1. Caractères cellulaires

L'observation microscopique d'une suspension bactérienne, âgée de 48 h, montre des bâtonnets aux extrémités arrondies, mobiles et de taille différente (fig.8). Ces bactéries présentent un aspect réfringent qui correspond selon Pedrosa (1988) à des poly β -hydroxybutyrates (PHB). La coloration de Gram a confirmée leur appartenance aux bactéries à Gram négatif.

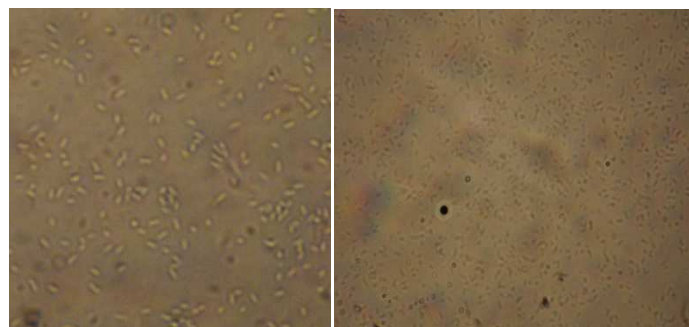


Figure 8: Observation microscopique de quelques souches sous microscope
optique (Grossissement 10 \times 40).

Le calcul du temps de génération (tableau III) montre une diversité parmi les 18 souches de cette collection. Selon la description des rhizobia à croissance rapide ou lente, donnée par Jordan (1982 et 1984), nous pouvons classer les souches S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S10, S11, S13, S15, S16, S17 et S18 à croissance lente (avec un temps de génération supérieur à 4) alors que les souches, S8, S9, S12 et S14 à croissance rapide.

Tableau III: Résultat du taux de croissance et du temps de génération.

Souches	Taux de croissance (h^{-1})	Temps de génération (h)
S1	0,082	12,17
S2	0,116	8,59
S3	0,086	11,53
S4	0,092	10,79
S5	0,175	05,70
S6	0,116	08,58
S7	0,1	10
S8	0,873	0,65
S9	0,564	1,77
S10	0,2	5
S11	0,061	16,28
S12	0,337	2,96
S13	0,119	8,35
S14	0,531	1,88
S15	0,096	10,32
S16	0,116	8,58
S17	0,128	7,79
S18	0,097	10,30

3-2. Caractères cultureux

Les isolats cultivés sur YMA à 28°C forment des colonies de couleur blanche ou crème à bord régulier, de taille variée de 1 à 2 mm avec un aspect opaque, bombées, lisses et plus au moins mucoïdes (fig. 9).

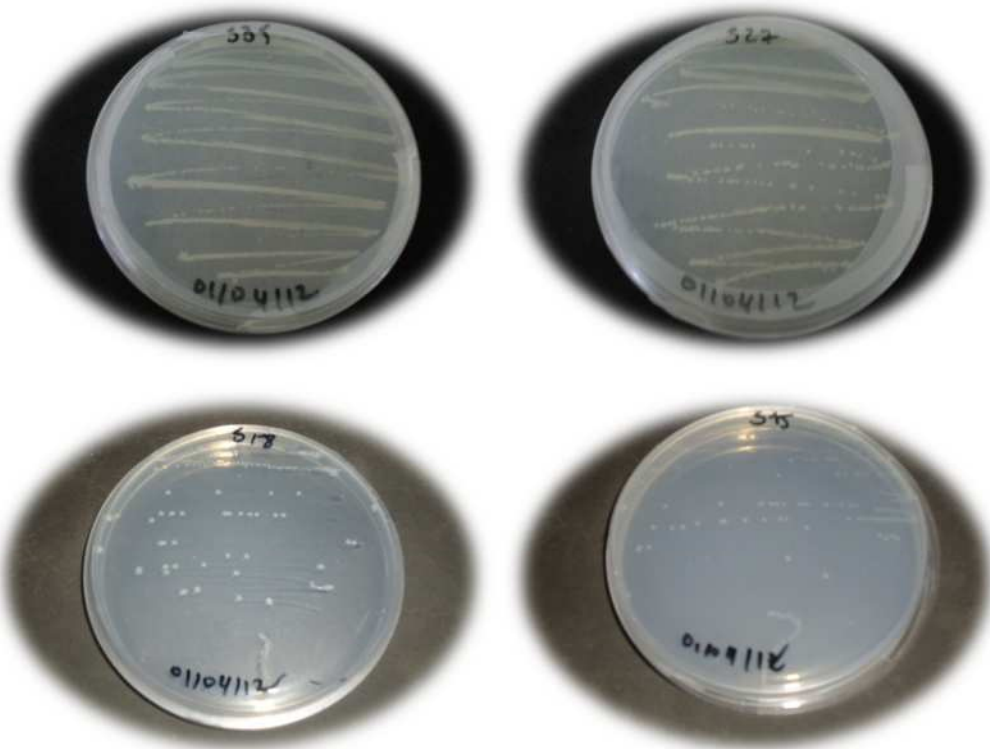


Figure 9: Aspect des colonies obtenues sur milieu YMA.

3-3. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la température, du NaCl et du pH sur la croissance des rhizobia isolées de nodules racinaire de *Cytisus triflorus*. Les souches ont été incubées sur milieu YMB pendant 48 heures. Les valeurs données représentent la moyenne des trois répétitions pour chaque test.

3-3-1. Effet de la température

La gamme de température de croissance choisie s'étale de 26 à 34°C avec un pas de 2°C. Les souches montrent une diversité de réponse vis-à-vis de la température (fig.10). La plupart des souches montrent une croissance entre 26 et 32°C. Certaines d'entre elles résistent au delà de cette limite et leur croissance persiste même à 34°C, température à laquelle certaines souches sont inhibées.

Il convient de retenir que certaines souches (S2, S7, S11, S13 et S15) sont celles présentant la meilleure croissance dans la bande optimale de température. Il semble même que la souche S15 présente la même intensité de croissance entre 26 et 34°C. Cette souche mérite

une attention particulière pour des essais au delà de cette gamme. Enfin, la souche S6 n'arrive pas à croître à cette gamme de température.

Le caractère mésophile des rhizobia a été déjà signalé par Graham (1992) et Zahran (1999) indiquant que la gamme de température optimale pour la croissance des rhizobia est de 28 à 31°C, et beaucoup ne peuvent pas se développer à 37°C.

Il a été ainsi rapporté que les températures critiques de la fixation d'azote sont de 30°C pour la trèfle et le pois (Michiels *et al.* , 1994), de 30°C à 33°C pour le Haricot (Piha et Munns, 1987) et varient entre 35°C et 40°C pour les graines de cacahuètes et de soja (Michiels *et al.* , 1994).

Certains travaux ont montré des capacités d'adaptation des rhizobia au choc thermique ce qui pourrait être expliqué par l'induction de l'expression des protéines de stress thermique HcP (Heat shock proteins) (Cloutier *et al.* , 1992).

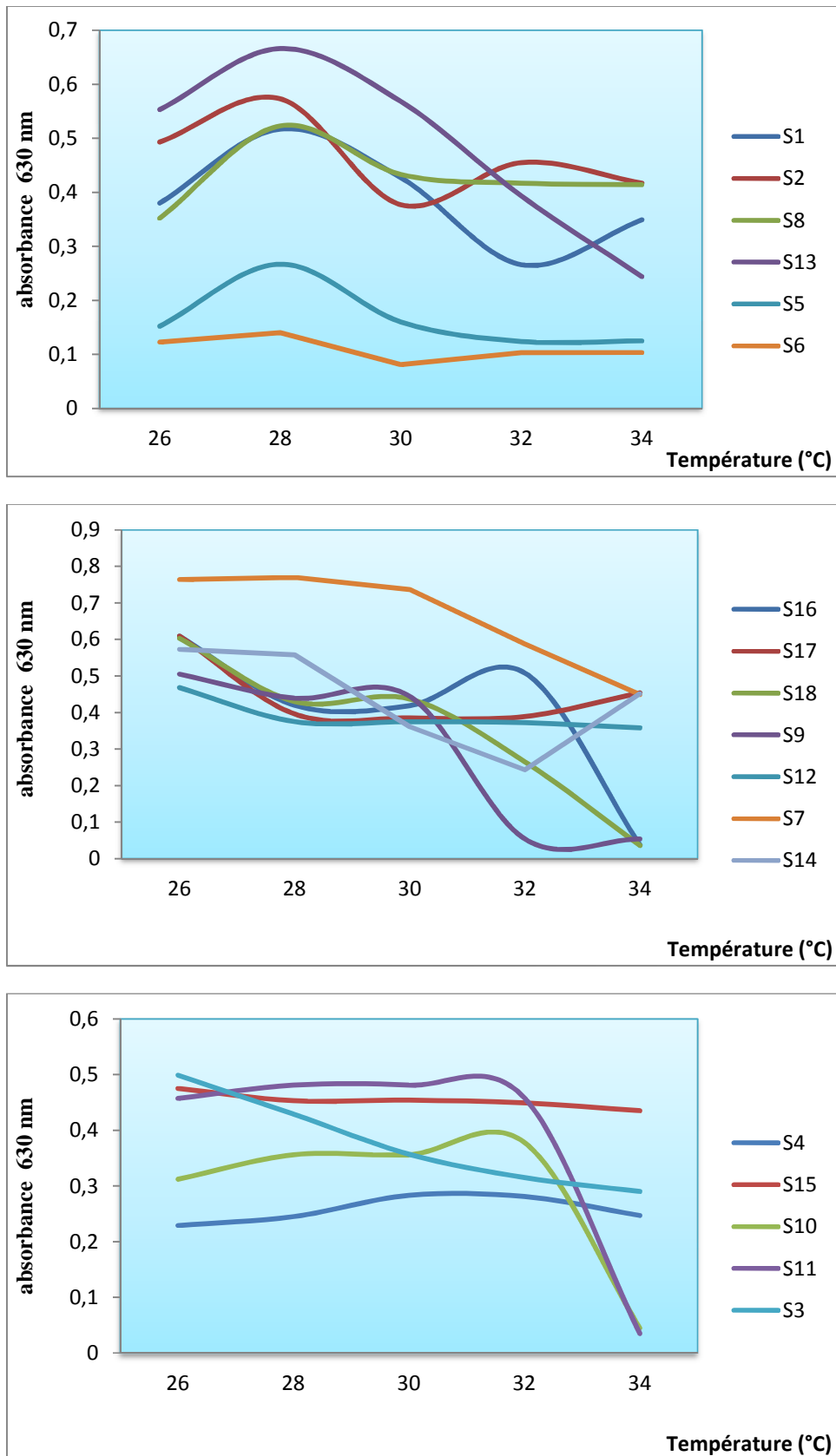
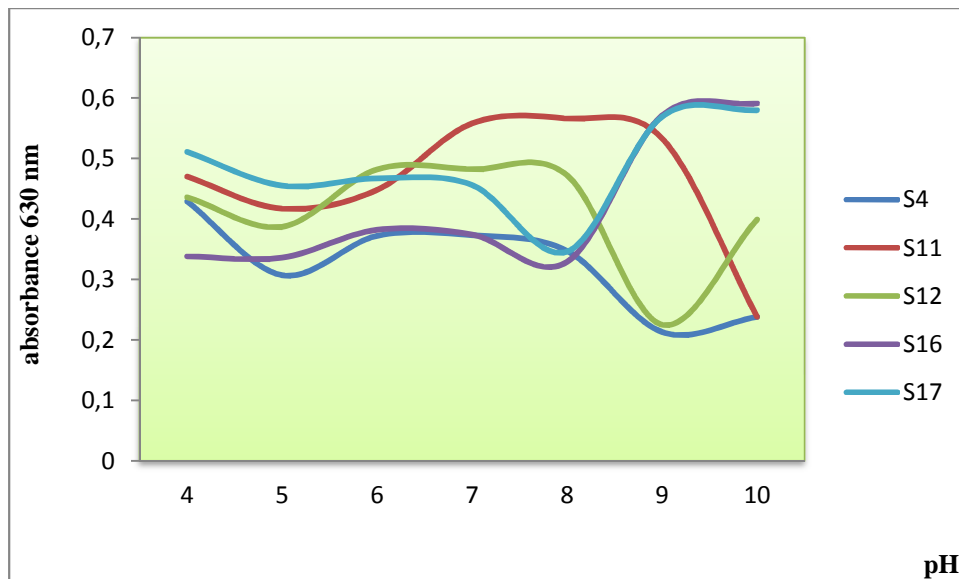


Figure 10: Effet de la température sur la croissance des 18 souches testées .

3-3-2. Effet du pH

Les souches S4, S11 et S12 (fig.11) présentent une bonne croissance entre le pH 6 et 9, mais globalement la plupart des souches préfèrent des pH plutôt alcalin allant même jusqu'à pH 10. La souche S8 éprouve des difficultés à croître au pH acide. Les souches S3, S6, S9 et S18 sont remarquables du fait que leurs croissances est plus ou moins stables entre le pH 4 et pH 10. La S18 sort du lot dans la mesure où elle est l'une de celle qui présente la meilleure croissance mais aussi celle dont la croissance est similaire à tous les pH choisis. Encore une fois, la souche S6 éprouve des difficultés à croître aux différents pH.

Il a été rapporté par Raza *et al.*, (2001), que les souches de rhizobia isolées de deux espèces *Lupinus luteus* et *Lupinus angustifolius* ont une très bonne croissance à des pH entre 4 à 10. D'autres ont montré que l'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du rhizobia et sa persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation (Appunu et Dhar, 2006). En outre, l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums, la majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9. Cependant, l'effet négatif que présente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité des minéraux tels que, le fer et le manganèse, indispensables autant pour les rhizobia que pour la plante hôte (El-Hilali, 2006).



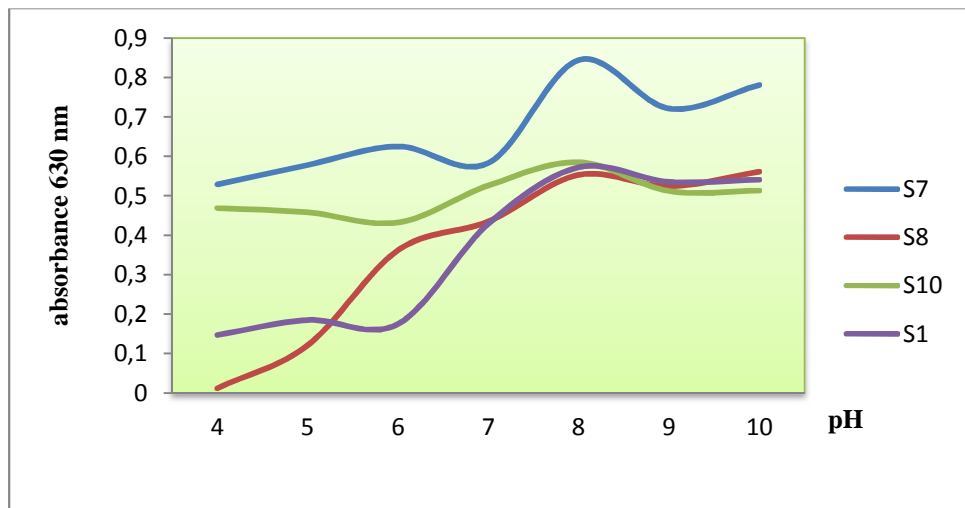
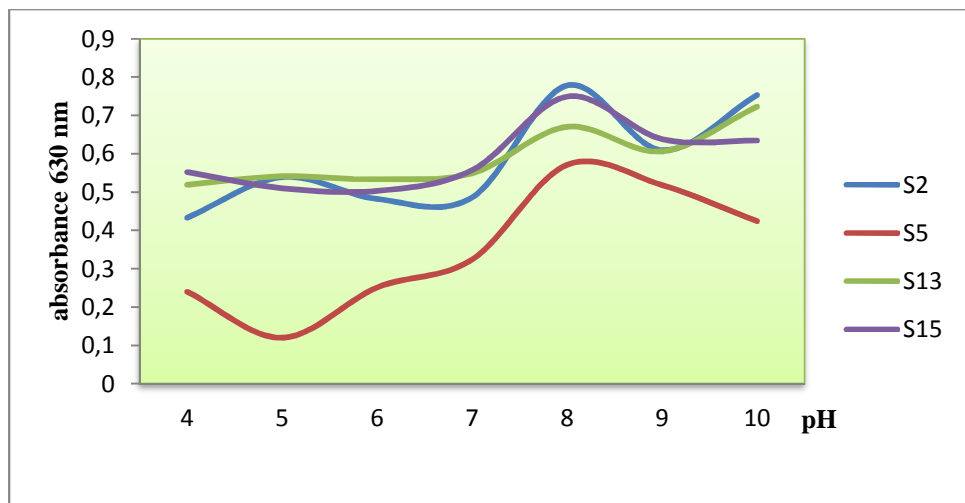
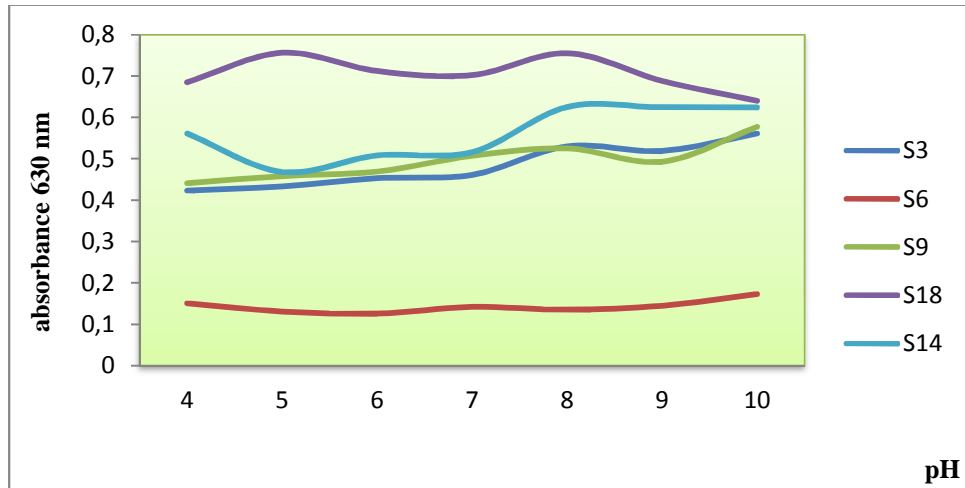


Figure 11: Effet du pH sur la croissance des 18 souches testées .

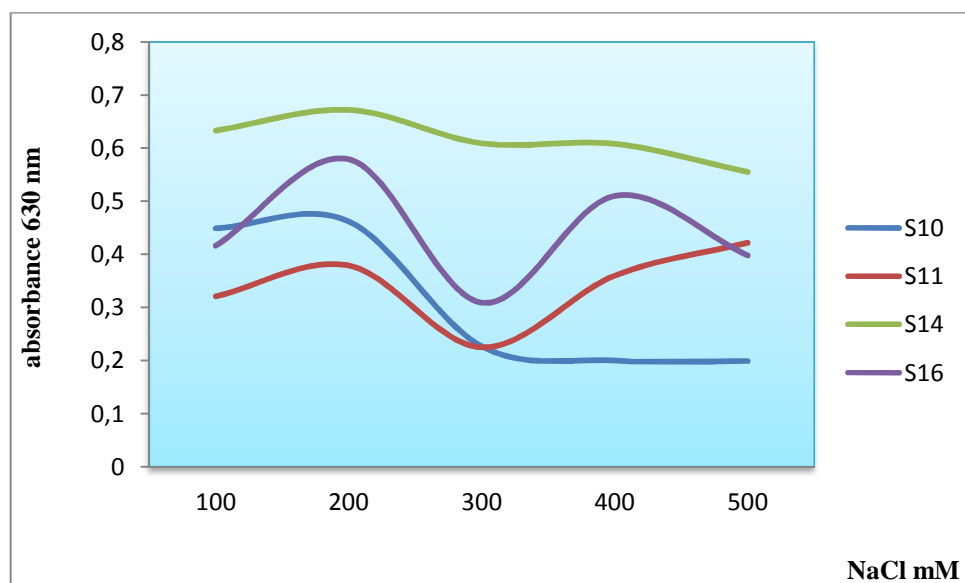
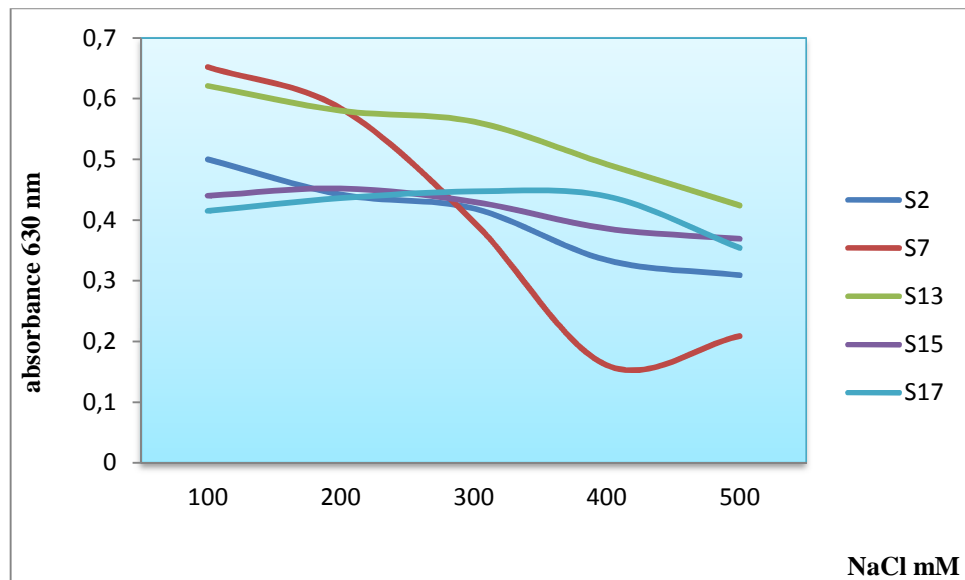
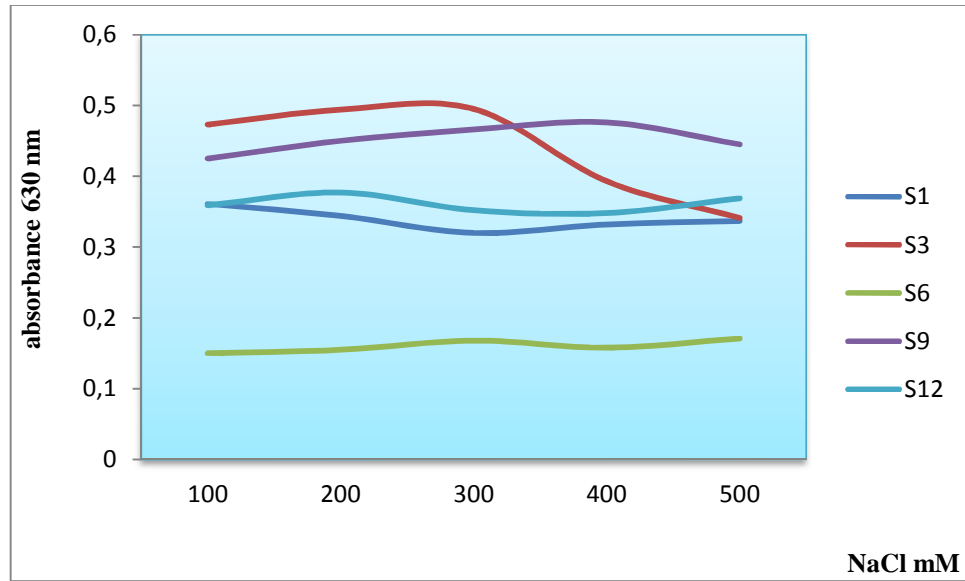
3-3-3. Effet du NaCl

L'étude de l'effet du NaCl sur la croissance des souches montre des résultats diversifiés. Néanmoins, les souches S1, S6, S9 et S12 (Fig.12) sont remarquables bien que leurs croissances ne soient pas très importantes, elles demeurent stables aux différentes molarités de NaCl. Quant aux souches S5 et S11 leur croissance semble s'emballer à la concentration de 500 mM de NaCl.

Toutefois, la souche S14 est celle qui présente non seulement la meilleure croissance mais aussi la même densité des populations aux différentes concentrations de NaCl. Il convient là aussi de constater que la croissance de la souche S6 est encore faible.

Kedjar (2001) et Boulila (2002), qui ont isolé des souches de *Medicago sativa* et de *Medicago minima* de la région de Bejaïa, ont signalé la sensibilité de ces souches au chlorure de sodium dont la croissance diminue proportionnellement à la concentration du milieu YMB. La littérature indique aussi que la croissance de la plupart des rhizobia est affectée dès que la molarité du milieu atteint 100mM de NaCl tandis que certaines souches de *Sinorhizobium meliloti* peuvent proliférer entre 300 et 700 mM voire à 800Mm de NaCl.

Ce caractère halophile a été également signalé chez les isolats d'*Acacia*, de *Prosopis* et de *Leucaena* qui tolèrent 500 à 850mM de NaCl (Tilak *et al.*, 2005). Le stress salin est une contrainte qui provoque la synthèse des exopolysaccharides des rhizobia qui sont utiles dans l'adaptation (Hung *et al.*, 2005). En outre, d'autres rhizobia s'adaptent aux stress salin par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes ou osmoprotecteurs (Zahran, 1999).



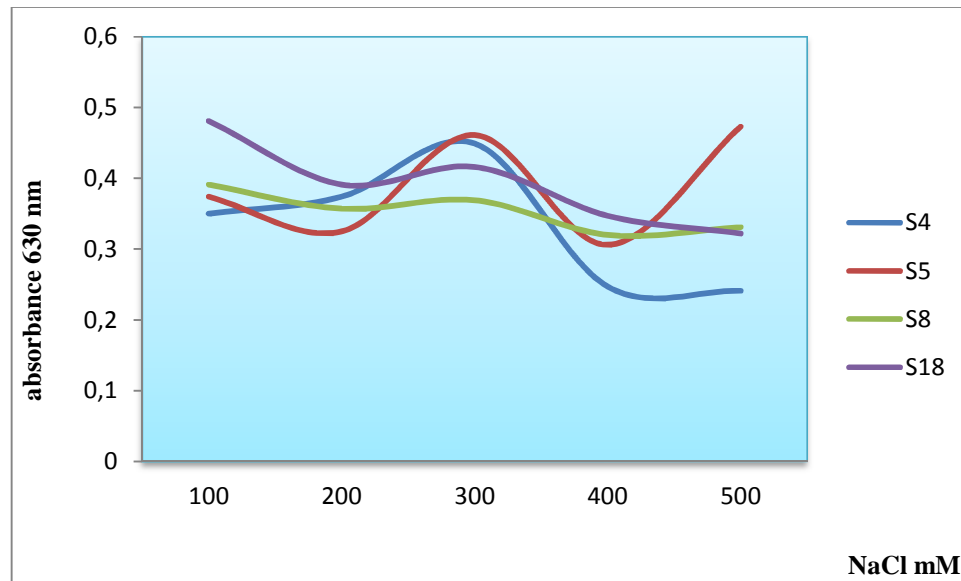


Figure 12: Effet du NaCl sur la croissance des 18 souches testées .

3-4. Caractérisation nutritionnelle

3-4-1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone

Les résultats obtenus (fig.13) montrent une croissance importante de la plupart des souches en présence de la dextrine. Ce résultat est confirmé par ceux de Boulila (2002), en effet cet auteur a montré que les souches bactériennes isolées de *Medicago minima* de la région de Bejaïa préfèrent la dextrine comme source de carbone. Néanmoins, la souche S5 semble avoir une faible croissance par rapport aux autres souches avec tous les sucres testés.

L'étude de l'assimilation de divers sucres comme source de carbone par les différentes souches a indiqué que les bactéries du genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les monosaccharides et les disaccharides, et d'une manière restreinte les trisaccharides et les polyalcools. A l'opposé, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (Stowers, 1985). L'utilisation des sucres peut fournir les caractères différentiels pour l'identification des espèces (Allen et Allen, 1950).

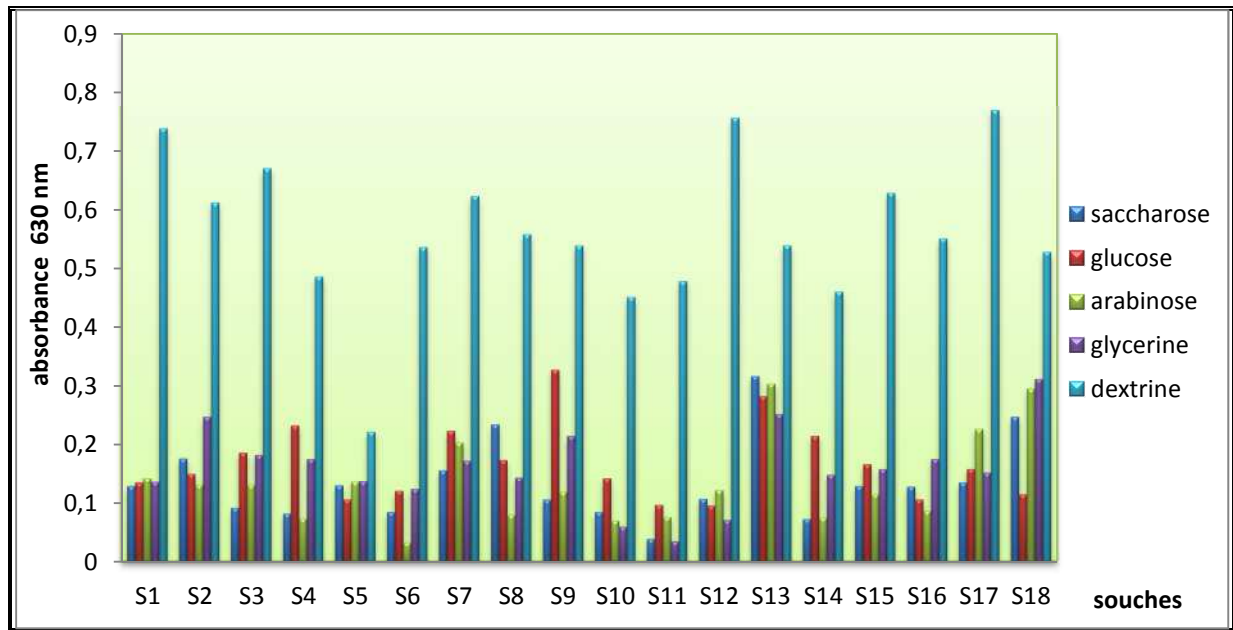


Figure 13: Assimilation des sucres par les rhizobia isolées de *Cytisus triflorus*.

3-4-2. Assimilation des acides aminés comme source d'azote

Les résultats illustrés dans le graphique (fig.14) montrent que la plupart des souches présentent un optimum de croissance en présence de l'histidine. Toutefois les souches S1, S5, S8 et S12 montrent une croissance faible comparant aux autres avec tous les acides aminés testés. Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Jordan, 1984; Struffi *et al.*, 1998).

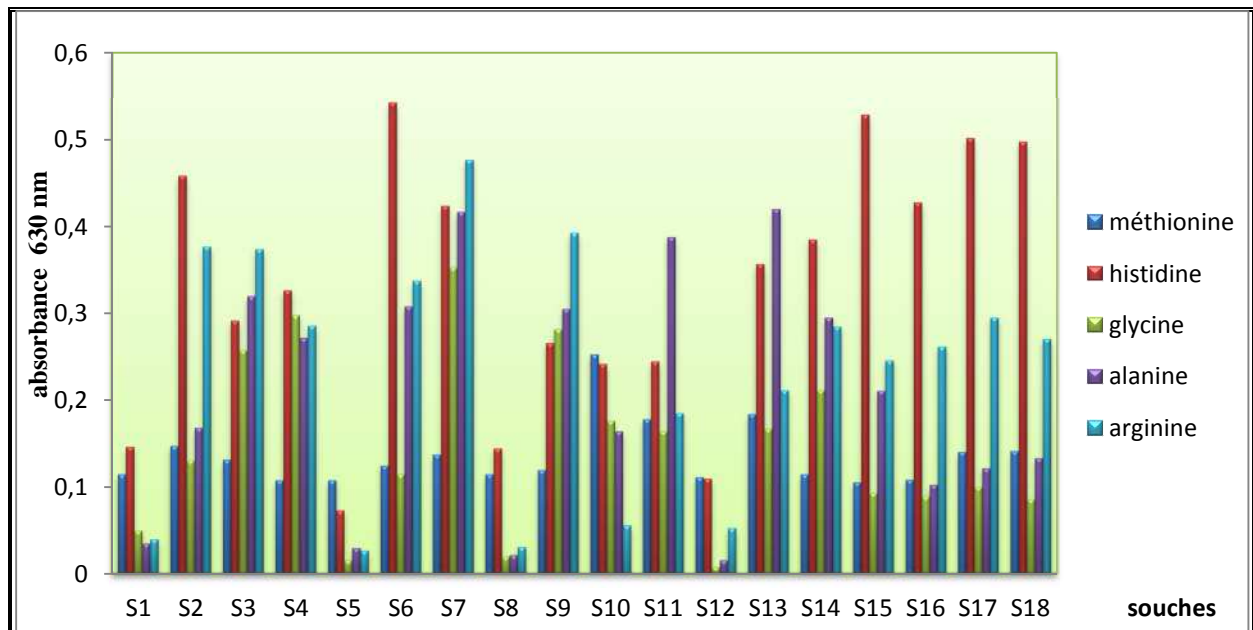


Figure 14: Assimilation des acides aminés comme source d'azote par les isolats de *Cytisus triflorus*.

3-4-3. Assimilation des acides aminés comme source d'azote et de carbone

Le graphique (fig.15) montre que la plupart des souches ont une faible croissance en présence d'un seul acide aminé utilisé comme source de carbone et d'azote. Cependant, les souches S2, S3, S7, S9 et S10 présentent une très bonne croissance avec la plupart des acides aminés testés.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Boulila (2002) qui a montré que toutes les souches bactériennes isolées de *Medicago minima* étudiées poussent très mal en présence d'un seul acide aminé comme source de carbone et d'azote à l'exception de l'asparagine qui semble être bien assimilé.

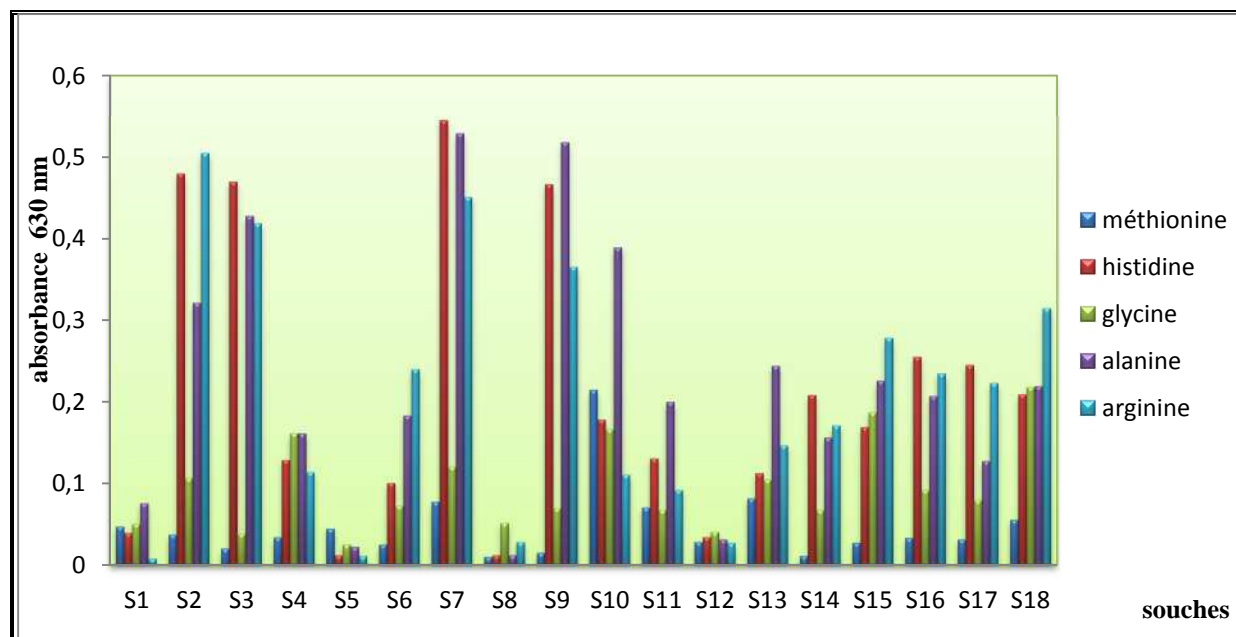


Figure 15 : Assimilation des acides aminés comme source de carbone et d'azote par les rhizobia isolées de *Cytisus triflorus*.

3-5. Caractérisation biochimique

Les 18 souches bactériennes isolées de *Cytisus triflorus* ont subi 13 tests biochimiques (tableau IV). Les résultats montrent que toutes les souches sont aérobies avec une catalase, ne dégradent pas le tryptophane en indole, ne produisent pas d'acide (RM-) mais plutôt d'acétoïne (VP+), n'utilisent pas le citrate à l'exception des souches S10 et S15.

La souche S14 se distingue des autres par le fait qu'elle possède la nitrate réductase. Ces tests biochimiques des rhizobia ont été largement étudiés montrant une diversité de caractères témoignant d'une variabilité importante de l'équipement enzymatique des souches de rhizobia étudiées (Kedjar, 2001, Boulila, 2002 et Bensaid, 2002).

Tableau IV: Caractéristiques biochimiques des souches de rhizobia.

Souches	Nitrate réductase	Nitrite réductase	Indole	VP	RM	Citrate perméase	Catalase	Lactose	Saccharose	Glucose	H ₂ S	Gaz	Type respiratoire
S1	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	Aérobie
S2	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	Aérobie
S3	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	Aérobie
S4	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	Aérobie
S5	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	Aérobie
S6	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	Aérobie
S7	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Aérobie
S8	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	Aérobie
S9	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	Aérobie
S10	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	Aérobie
S11	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	Aérobie
S12	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	Aérobie
S13	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	Aérobie
S14	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Aérobie
S15	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	Aérobie
S16	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	Aérobie
S17	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Aérobie
S18	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	Aérobie

3-6. Etude de la sensibilité des rhizobia aux antibiotiques

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

Tableau V : Phénotype de résistance des souches testées.

	Doxycycline	Pénicilline	Érythromycine	Amoxicilline
S1	R	R	R	R
S2	R	R	R	R
S3	R	R	R	R
S4	I	R	R	R
S5	R	R	R	R
S6	S	R	R	R
S7	R	R	R	R
S8	S	S	S	S
S9	R	R	R	R
S10	S	S	R	S
S11	R	R	R	R
S12	S	S	R	R
S13	S	R	R	R
S14	R	R	R	R
S15	R	R	R	R
S16	R	R	R	R
S17	R	R	I	R
S18	R	R	R	R

S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant.

La lecture des tests est faite selon les critères définis par le comité Français de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010).

Ces résultats montrent une diversité de réponse vis-à-vis des antibiotiques. Cependant, ils indiquent que toutes les souches sont résistantes à la plupart des antibiotiques étudiés à l'exception de S8 qui reste sensible aux différents antibiotiques testés.

4. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique

L'analyse numérique a porté sur 64 caractères. Le calcul du coefficient de similitude a permis de classer les souches en fonction de leur ressemblance. En effet, les 18 souches étudiées partagent plus de 74% de ressemblance. Les souches S1, S5, S8 et S12 partagent plus de 93% de ressemblance, les souches S2, S6, S7, S9, S13, S15, S16, S17 et S18 partagent au moins 91% de ressemblance et les souches S4, S7, S9 et S13 partagent également plus de 91%.

Tableau VI : Coefficient de similitude inter- souches.

S1	100																		
S2	79.66	100																	
S3	86.44	89.83	100																
S4	83.05	89.83	93.22	100															
S5	96.61	79.66	83.05	83.05	100														
S6	76.27	93.22	89.83	89.83	76.27	100													
S7	81.35	98.30	88.13	91.52	81.35	91.52	100												
S8	93.22	79.66	79.66	83.05	93.22	79.66	81.35	100											
S9	84.74	91.52	91.52	91.52	84.74	88.13	93.22	83.05	100										
S10	79.66	79.66	86.44	89.83	77.96	79.66	81.35	76.27	84.74	100									
S11	83.05	79.66	89.83	89.83	77.66	83.05	81.35	79.66	88.13	89.83	100								
S12	94.91	77.96	81.35	81.35	94.91	74.57	79.66	91.52	83.05	77.96	84.74	100							
S13	84.74	94.91	94.91	94.91	84.74	88.13	93.22	81.35	93.22	84.74	84.74	83.05	100						
S14	76.27	89.83	86.44	89.83	76.27	93.22	91.52	79.66	88.13	79.66	83.05	74.57	84.74	100					
S15	81.35	91.52	84.74	88.13	81.35	84.74	93.22	81.35	86.44	81.35	77.96	79.66	89.83	84.74	100				
S16	77.96	91.52	84.74	84.74	77.96	91.52	89.83	81.35	89.83	77.96	81.35	76.27	86.44	88.13	89.83	100			
S17	83.05	93.22	86.44	86.44	83.05	89.83	94.91	83.05	91.52	76.27	79.66	81.35	88.13	89.83	94.91	94.91	100		
S18	79.66	93.22	86.44	83.05	76.27	86.44	91.52	76.27	88.13	79.66	79.66	74.57	88.13	83.05	91.52	94.91	93.22	100	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	

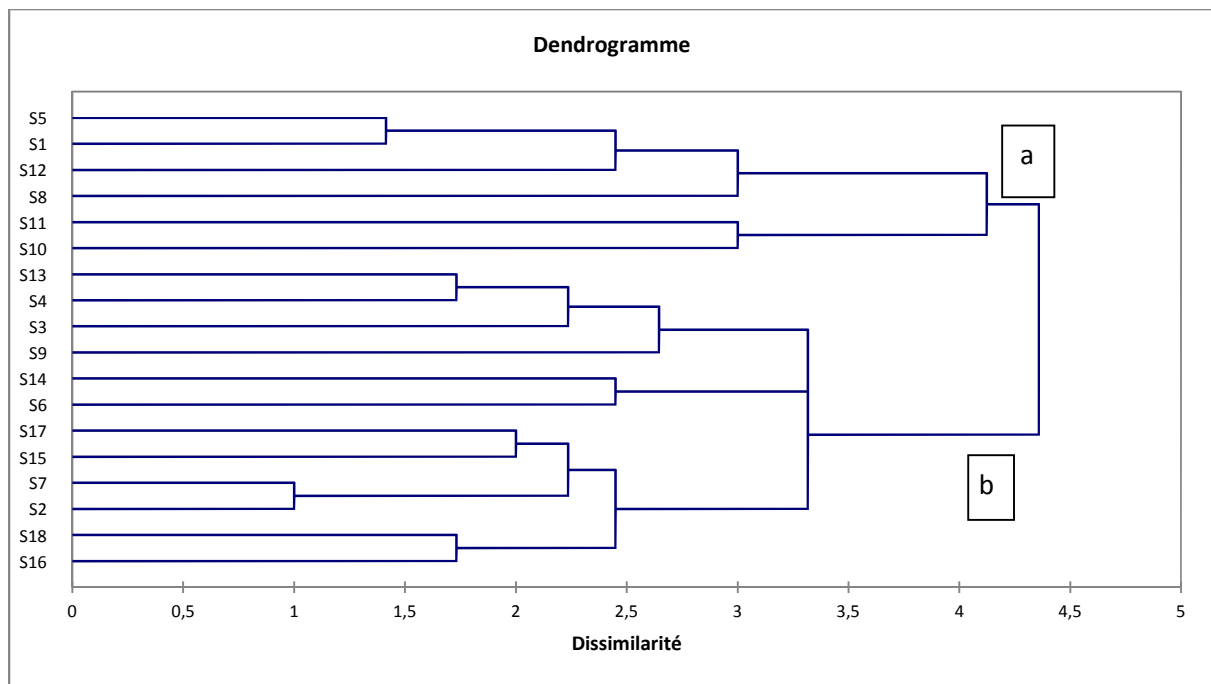


Figure 23 : Dendrogramme de la CAH de 18 souches de rhizobia isolées de *Cytisus triflorus* sur la base de 64 caractères phénotypiques.

La lecture de ce dendrogramme montre que les 18 isolats bactériens sont groupés en deux clusters A et B. Le cluster A est composé de S1, S5, S8, S10, S11 et S12. Le cluster B est constitué de S2, S3, S4, S6, S7, S9, S13, S14, S15, S16, S17 et S18.

Cette classification pourrait être justifiée par les résultats des tests négatifs et positifs des différentes souches.

Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons réalisé une caractérisation des isolats bactériens nodulant *Cytisus triflorus* à travers plusieurs caractères cellulaires, culturaux, physiologiques, nutritionnels et biochimiques.

Tous les isolats ont été authentifiés pour leur aptitude à la nodulation dans des conditions contrôlées avec leur plante hôte *Cytisus triflorus* et *Vigna unguiculata*.

La mesure du temps de génération a permis de déterminer la présence de deux groupes ; l'un deux à croissance rapide et l'autre à croissance lente. Les caractéristiques morphologiques et cellulaires répondent aux critères des rhizobia connus dans la littérature.

Les caractères physiologiques ont révélé une diversité de réponse vis-à-vis des facteurs testés à savoir la température, le pH et la salinité.

Les souches étudiées présentent une grande aptitude à assimiler les sucres comme source de carbone et les acides aminés comme source de carbone et d'azote avec une variabilité d'assimilation plus ou moins importante.

Pour les tests biochimiques, nous révélons une variabilité vis-à-vis des tests effectués.

Le dendrogramme a permis de classer deux groupes en fonction des 64 tests étudiés. Cette diversité phénotypique parmi les 18 souches n'est que le reflet d'une diversité génétique au sein des populations locales de rhizobium nodulant *Cytisus triflorus*.

Ces micro-organismes symbiotique de *Cytisus triflorus* pourraient jouer un rôle fondamental dans la restauration et le maintien de la fertilité des sols, dans la protection contre certains pathogènes telluriques et dans la nutrition minérale des plantes.

En perspective, il est nécessaire que certaines analyses soient poursuivies et approfondies, à savoir :

- Procéder à la collecte et à l'isolement de souches provenant d'autres espèces du genre *Cytisus* ;
- Pousser les tests effectués en utilisant d'autres gammes de pH, salinité, température, assimilation d'autres sucres et acides aminés ;
- Détermination du statut taxonomique des souches de *Cytisus* étudiées par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'ADNr 16S, l'hybridation ADN/ADN pour préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi tout autre genre de protéobactéries.

Références bibliographiques

A

- **Allen E.K. & Allen O.N. (1950).** Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. *Bacteriology Reviews*. **14** (4), 273-330.
- **Appunu C. & Dhar B. (2006).** Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. *African Journal of Biotechnology*. **5** (10), 842-845.

B

- **Bensaid K. (2002).** Caractérisation phénotypique des rhizobia isolés de *Medicago polymorpha* de la région de Bejaïa et étude de l'effet de NaCl sur leur symbiose. Thèse de Magister en biologie. Université Abderrahmane Mira. Bejaïa. 67p.
- **Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C. & Talini L. (2006).** Détection et typage du gène *nod C* à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes colloque-Bureau des Ressources Génétiques*. **6**, 97-110.
- **Boulila F. (2002).** Contribution de la diversité des rhizobia isolés de *Medicago minima* de la région de Bejaïa. Thèse de Magister. Université Abderrahmane Mira. Bejaïa. 85p.
- **Brewin N.J., Downie J.A. & Young J.P.W. (1992).** Nodule formation legumes. Encyclopedia of microbiology, Joshua M.R Lederberg. *Rockefeller University New York*. **3**, 239-248.
- **Brhada F., Poggi M.C. & Le Rudulier D. (1997).** Choline and Glycine betaine uptake in various strains of Rhizobia isolated from nodules of *Vicia faba* var. *major* and *Cicer arietinum* L. : Modulation by salt, choline and glycine betaine. *Current Microbiology*. **34** (3), 167-172.

C

- **Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J., De Lajudie P., Ba A., Gillis M. & Dreyfus B. (2000).** Photosynthetic Bradyrhizobia are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** (12), 5437-5447.
- **Chen W.X., Li G.S., Qi Y.L., Wang E.T., Yuan H.L. & Li J.L. (1991).** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **41** (2), 275-280.
- **Cloutier J., Prévost D., Nadeau P. & Antoun H. (1992).** Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*. **58** (9), 2846-2853.
- **Cordovilla M.P., Ligerio F. & Lluch C. (1994).** The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *The Journal of Experimental Botany*. **45** (10), 1483-1488.
- **Crossman L.C. (2005).** Plasmid replicons of *Rhizobium*. *Biochemical Society Transactions*. **33** (1), 157-158.

D

- **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Paris. 384p.
- **Duhoux É. & Nicole M. (2004).** Biologie Végétale : association et interaction chez les plantes, Edition : Dunod. Paris. 166p.
- **Dupuy Y. & Nougier P. (2005).** Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition : Ellipses. Paris. 256p.

E

- **El-Hilali I. (2006).** La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V – Agdal. Faculté des sciences Maroc. 205p.

- **Esseling J.J., Lhuissier F.G.P & Emons A.M.C. (2003).** Nod factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology*. **132**, 1982-1988.

G

- **Gage D.J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68** (2), 280-300.
- **Ganry F. & Dommergues Y. (1995).** Arbres fixateurs d'azote, champ ouvert pour la recherche. *Agriculture et développement*. **7**, 38-55
- **Garcia de los Santos A., Brom S. & Romero D. (1996).** Rhizobium plasmids in bacteria-legume interactions. *World Journal of Microbiological Biotechnology*. **12**, 119-125.
- **Gaudry M.J.F. (1997).** Assimilation de l'azote chez les plantes, aspect physique, biochimique et moléculaires. Institut Nationale de Recherche Agronomique (INRA). Paris. 139-140.
- **Gouffi K., Pica N., Pichereau V. & Blanco C. (1999).** Disaccharides as a new class of Nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** (4), 1491-1500.
- **Graham P. H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. **38** (6), 475-484.

H

- **Halbleib C.M. & Ludden P.W. (2000).** Regulation of biological nitrogen fixation. *Journal of Nutrition*. **130** (5), 1081-1084.
- **Hernandez-Lucas I., Segovia L., Martinez-Romero E. & Pueppke S.G. (1995).** Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium spp.* that nodulate *Phaseolus vulgaris L.* *Applied and Environmental Microbiology*. **61** (7), 2775-2779.
- **Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. 1^{er} édition. Edition de Boeck. Paris. 514p.

- **Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P. & Young C.C. (2005).** Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia*. **49** (6), 577-584.

J

- **Jordan, D.C. (1982).** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium gen. nov.*, a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **32**, 136-139.
- **Jordan D.C. (1984).** Family III. *Rhizobiaceae*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Krieg N.R. & Holt J.G. 8^{ème} edition. *The Williams & Wilkins*, Baltimore. **1**, 235-242.

K

- **Kape R., Parniske M. & Werner D. (1991).** Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Applied and Environmental Microbiology*. **57** (1), 316-319.
- **Kedjar F. (2001).** Caractérisation phénotypique et analyse des protéines en SDS/PAGE de souches de *Rhizobium meliloti* isolées de la région de Bejaïa. Thèse de Magister. Université Adbeerahma Mira. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Bejaïa. 82p.
- **Kellman A. W. (2008).** Rhizobium inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). Thèse de doctorat. Université New Zealand. 278p.
- **Krishnan H.B. & Pueppke S.G. (1991).** Sequence and analysis of the nodABC region of *Rhizobium fredii* USDA257. A nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **4** (5), 512-520.

M

- **Madigan M. & Martinko J. (2007).** Brock Biologie des microorganismes. 11^{eme} Edition. Edition: Pearson. France. 599-601, 676-681.
- **Marchal N., Bourdon J.L. & Richard C.L. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edition : Doin Editeurs. Paris. 447p.
- **Martinez-Romero E., Romero D. & Palacio R. (1990).** The Rhizobium genome. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **9** (1), 59-93.
- **Michiels J., Verreth C. & Vanderleyden J. (1994).** Effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **60** (4), 1206-1212.

P

- **Pedrosa F.O. (1988).** Physiology, biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root associated nitrogen-fixing bacteria. *C.R.P. science*. **6**, 345-384.
- **Pelmont J. (1995).** Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. *Office des Publications Universitaires*. **2**, 541-572.
- **Peret B. (2007).** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat en Physiologie végétale. Université Montpellier II. France. 70p.
- **Perret X., Staehelin C., & Broughton W.J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64** (1), 180-201.
- **Piha M.I. & Munnus D.N. (1987).** Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil*. **98** (2), 183-194.
- **Prévost D., Antoun H. & Bordeleau L.M. (1987).** Effects of low temperature on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. *FEMS Microbiology Ecology*. **45** (4), 205-210.
- **Pueppke S.G. & Broughton W.J. (1999).** *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. **12** (4), 293-318.
- **Pujic P. & Normand P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*. **28** (298), 26-29.

Q

- **Quezel P. & Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. *Centre National de la Recherche Scientifique*. Paris. 15-474.

R

- **Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn S.E. (2000).** Biologie végétale. Edition : de boeck université. 6^{ème} Edition. Paris-France. 968p.
- **Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn S.E. (2007).** Biologie végétale. Edition : de boeck université. 2^{ème} édition. Paris-France. 653-660.
- **Raza S., Jornsgard B., Abou-Taleb H., & Christiansen J. L. (2001).** Tolerance of *Bradyrhizobium sp. (Lupini)* strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in applied microbiology*. **32** (6), 379-383.
- **Rees D.C & Howard J.B. (2000).** Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*. **4** (5), 559-566.

S

- **Saoudi M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Université Mentouri de Constantine. Constantine-Algérie. 99p.
- **Sazzad K. (2007).** Exploring plant tolerance to biotic and abiotic stress. Thèse de Doctorat. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 66p.
- **Sneath H.A. & Collins V.G. (1974).** A study in test reproductibility between laboratories: working party: *Anatomy Van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology Serology*. **40**, 481-527.
- **Soltis D.E., Soltis P.S., Morgan D.R., Swensen S.M., Mullin B.C., Dowd J.M. & Martin P.G. (1995).** Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92** (7), 2647-2651.
- **Sprent J.I. (1995).** Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biology & Biochemistry*. **27** (4-5), 401-407.

- **Sprent J.I. (1999).** Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. *Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. **2**(2), 149-162.
- **Stowers M.D. (1985).** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annual Review of Microbiology*. **39**, 89-108.
- **Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S. & Nuti M.P. (1998).** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology*. **84** (1), 81-89.
- **Sullivan J.I., Eardly B.D., Van Berkum P. & Roson C.W. (1996).** Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **62** (8), 2818-2625.

T

- **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. Helsinki. 58p.
- **Tighe S.W., De Lajudie P., Dipietro K., Lindström K., Nick G. & Jarvis B.D. (2000).** Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*. **50** (2), 787-801.
- **Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Shilpi Mittal, Tripathi A. K. & Johri B. N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. **89** (1), 136-150.
- **Tortora G.j., Funk B.R. & Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Montréal. 968 p.

U

- **Ueda T., Suga Y., Yahiro N. & Matsuguchi T. (1995).** Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment. *Journal of Bacteriology*. **177** (2), 468-472.

V

- **Vincent J.M. (1970).** The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication. Oxford. United Kingdom.

W

- **Waligora C. & Tetu T. (2008).** Légumineuses il est urgent de les réhabiliter. Edition : Techniques culturales simplifiées. 48p.
- **Weir B.S. (2012).** The current taxonomy of rhizobia. *International journals of systematic and Evolutionary Microbiology*. (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>)

X

- **Xi C., Schoeters E., Vanderleyden J. & Michiels J. (2000).** Symbiosis-specific expression of *Rhizobium etli* casA encoding a secreted calmodulin-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97** (20), 11114-11119.

Y

- **Young N.D., Mudge J. & Ellis T.H. (2003).** Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**, 199-204.

Z

- **Zahran H.H. (1999).** *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63** (4), 968-989.

- **Zhang F., Charles T.C., Pan B., & Smith D.L. (1996).** Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum* nod genes at low temperatures. *Soil Biology & Biochemistry*. **28** (12), 1579-1583.
- **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (CFA-SFM).** Communiqué **2010**.

Références Electroniques

- <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>.
- <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDNFF/4.02/nn/21080>.

Annexe 1

Composition des Milieux de Cultures

a- Milieux de culture utilisés pour la croissance des rhizobia

Milieu YMA (Vincent, 1970)

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2 g
NaCl	0,1 g
Agar	15 g
Eau distillée, qsp	1000 ml

pH ajusté à 6,8

Milieu YMB (Vincent, 1970)

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH ajusté à 6,8

b- Milieux de culture utilisés pour les plantes

Milieu Jensen (Vincent, 1970)

Solution stocke dix fois concentrée	100 ml
Oligo-éléments	1 ml
FeCl ₂	300 µl
Eau distillée qsq	900ml

pH ajusté à 7

c- Milieux utilisés pour la caractérisation biochimiques

(Pour 1L d'eau distillée)

Citrate de Simmons

Sulfate de magnésium	0,2 g
Phosphate mono-ammonique	1 g
Phosphate bipotassique	1 g
Citrate de sodium	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Bleu de bromothymol	0,08 g
Agar	15 g

pH ajusté à 6,8

Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar	17 g

pH ajusté à 7,4

Gélose TSI

Extrait de viande de bœuf.....	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone tryptique	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate ferrique	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0,05 g
Agar	12 g

pH ajusté à 7,4

Gélose viande de foie

Base viande- foie	30 g
Glucose.....	2 g
Agar	6 g

pH ajusté à (7,4 – 7,6)

Bouillon nitraté

Macération de viande	1000 ml
Peptone trypsique	15 g
NaCl ou KCl.....	5 g
Nitrite de Sodium (Na NO ₂).....	1 ml

Bouillon Clark-Lubs

Peptone trypsique de viande.....	5 g
Phosphate bipotassique	5 g
Glucose	6 g

pH ajusté à 7

Eau Peptonée Exempte d'Indole

Peptone trypsique	15 g
NaCl	5 g

Eau physiologique

Eau distillée	1000 ml
NaCl	8,5 g

Ajuster le pH à 7

Annexe 2

Composition des réactifs

Réactif de Griess I (NRI)

Acide parasulfanilique.....8 g

Acide acétique 5N1 l

Réactif de Griess II (NRII)

α -naphtylamine.....6 g

Acide acétique 5N1 l

Réactif de Kovacs

Alcool amylique5 g

Paradiméthylamino-benzaldéhyde 75 ml

HCl Pur..... 25 ml

Réactif de VPI

α -naphthol6 g

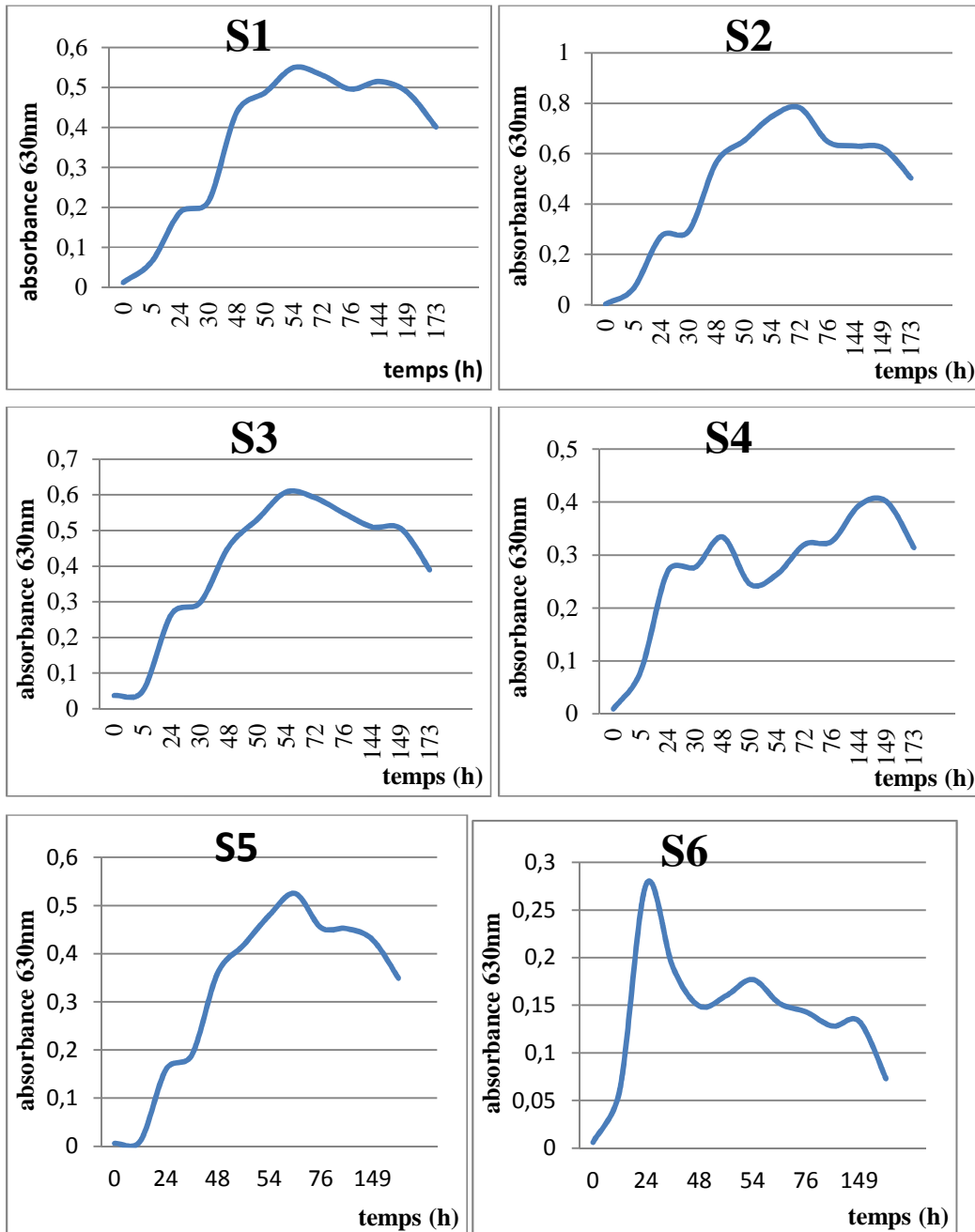
Alcool à 90° (qsp) 100 ml

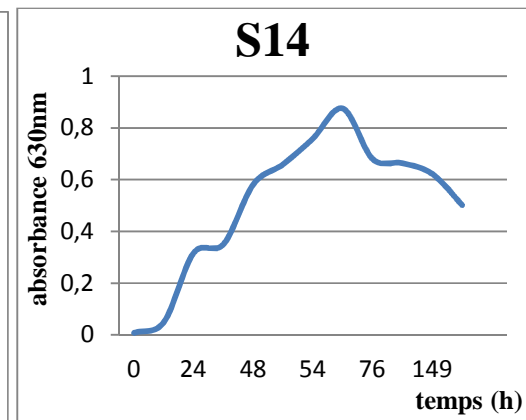
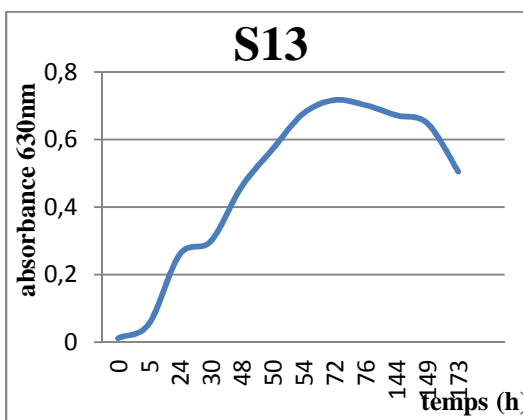
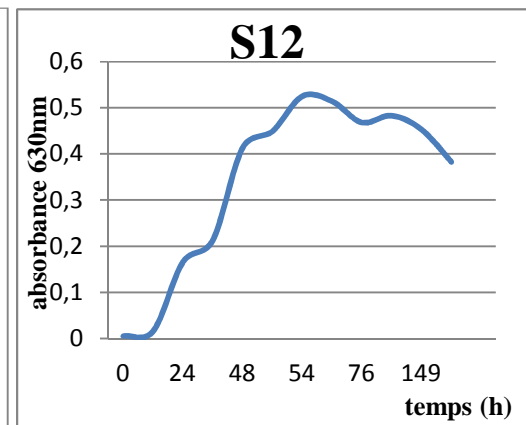
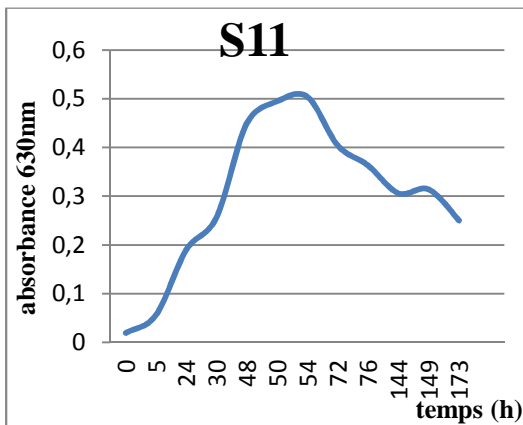
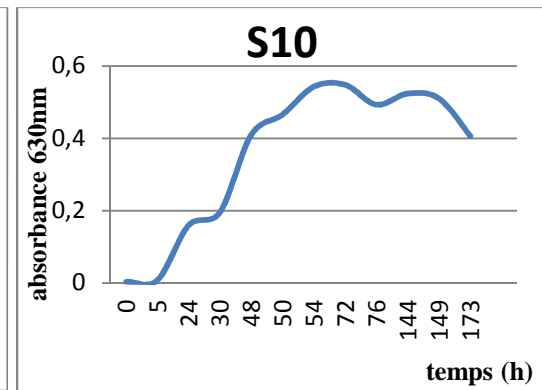
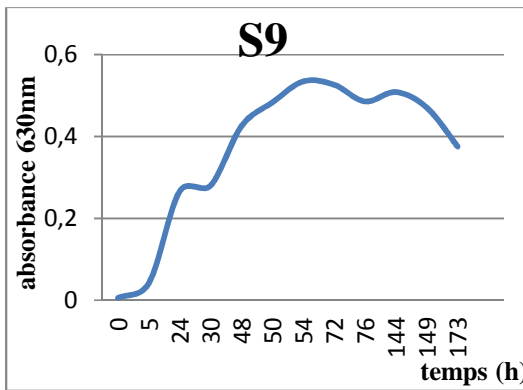
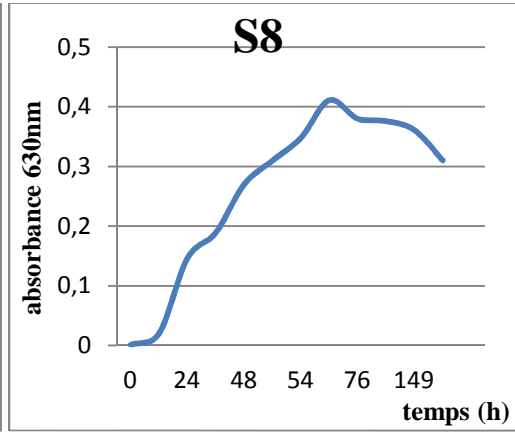
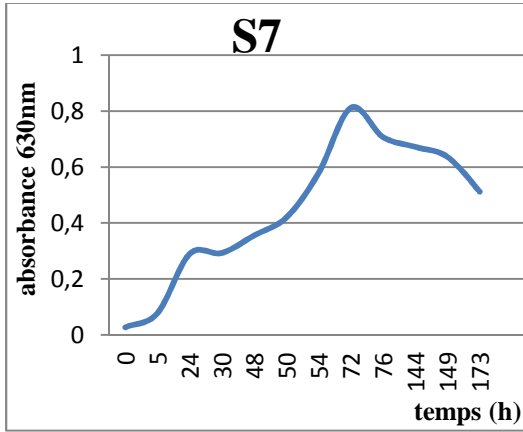
Réactif VP II

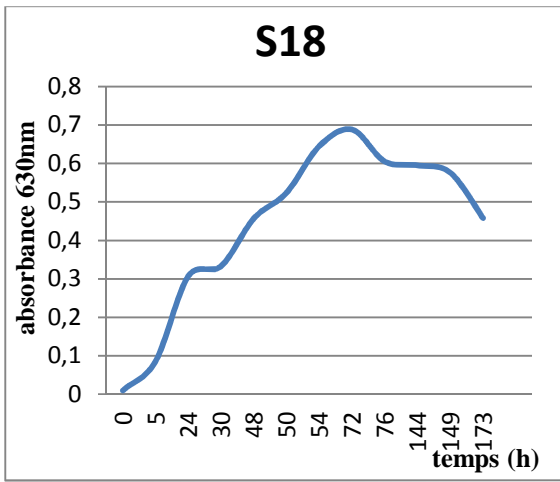
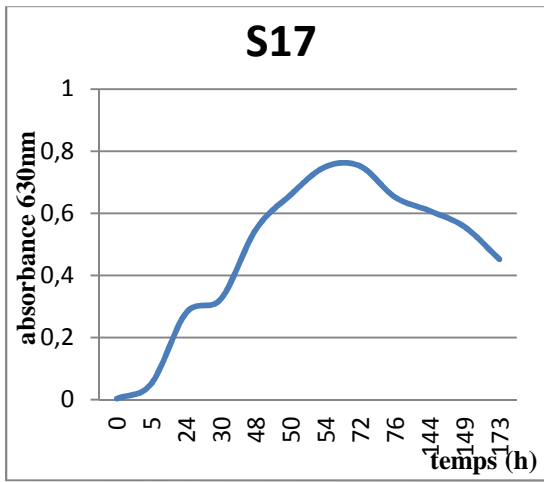
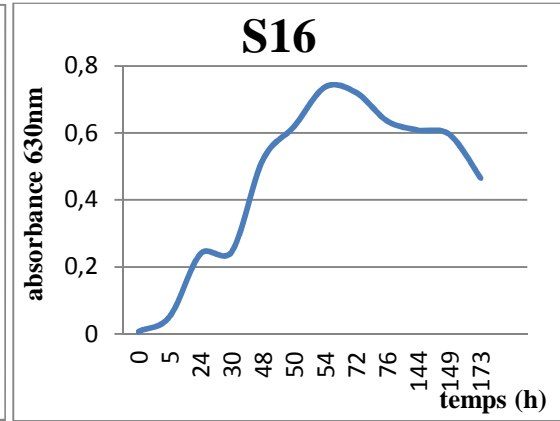
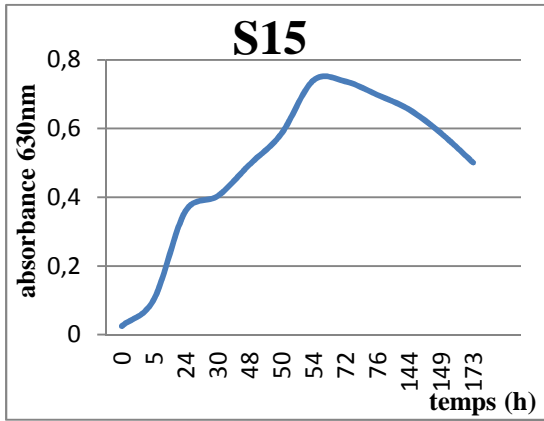
NaOH 4N

Annexe 3

Courbe de croissance des différentes souches étudiées







Annexe 4
La moyenne des différents tests effectués

a- La moyenne des Do obtenue aux différentes températures

T°C Souches	26 °C	28°C	30°C	32°C	34°C
S1	0,38	0,517	0,427	0,266	0,349
S2	0,493	0,573	0,377	0,455	0,417
S3	0,499	0,429	0,357	0,315	0,29
S4	0,229	0,245	0,283	0,281	0,247
S5	0,152	0,267	0,16	0,124	0,125
S6	0,123	0,14	0,081	0,103	0,103
S7	0,764	0,77	0,736	0,587	0,449
S8	0,352	0,523	0,433	0,417	0,414
S9	0,505	0,349	0,439	0,444	0,054
S10	0,312	0,11	0,356	0,378	0,045
S11	0,457	0,327	0,481	0,458	0,035
S12	0,468	0,223	0,375	0,372	0,358
S13	0,553	0,666	0,568	0,393	0,244
S14	0,573	0,558	0,361	0,243	0,451
S15	0,475	0,453	0,454	0,449	0,435
S16	0,609	0,42	0,419	0,508	0,037
S17	0,609	0,396	0,385	0,389	0,454
S18	0,603	0,43	0,437	0,265	0,036

b- La moyenne des Do obtenue aux différents pH

pH \ Souches	4	5	6	7	8	9	10
S1	0,147	0,185	0,175	0,429	0,572	0,535	0,541
S2	0,433	0,539	0,482	0,486	0,778	0,609	0,753
S3	0,423	0,433	0,453	0,461	0,53	0,519	0,561
S4	0,429	0,307	0,372	0,373	0,347	0,213	0,238
S5	0,24	0,12	0,251	0,324	0,571	0,518	0,424
S6	0,151	0,131	0,126	0,142	0,135	0,145	0,173
S7	0,529	0,578	0,625	0,583	0,844	0,721	0,781
S8	0,012	0,121	0,362	0,435	0,553	0,524	0,561
S9	0,441	0,458	0,469	0,507	0,525	0,493	0,577
S10	0,469	0,458	0,432	0,526	0,585	0,512	0,513
S11	0,47	0,417	0,448	0,558	0,566	0,533	0,238
S12	0,436	0,387	0,482	0,482	0,472	0,225	0,399
S13	0,519	0,541	0,533	0,549	0,67	0,606	0,723
S14	0,561	0,468	0,508	0,516	0,625	0,624	0,624
S15	0,552	0,51	0,503	0,557	0,749	0,638	0,634
S16	0,338	0,336	0,382	0,374	0,329	0,571	0,591
S17	0,511	0,455	0,467	0,456	0,346	0,569	0,58
S18	0,685	0,756	0,712	0,702	0,755	0,688	0,64

c- La moyenne des Do obtenue aux différentes concentrations de NaCl

[NaCl] \ Souches	100	200	300	400	500
S1	0,361	0,344	0,32	0,332	0,337
S2	0,5	0,442	0,419	0,334	0,309
S3	0,473	0,494	0,495	0,393	0,341
S4	0,35	0,374	0,449	0,247	0,241
S5	0,374	0,325	0,461	0,306	0,473
S6	0,15	0,155	0,168	0,158	0,171
S7	0,652	0,584	0,397	0,161	0,209
S8	0,391	0,357	0,369	0,32	0,331
S9	0,425	0,45	0,466	0,476	0,445
S10	0,449	0,462	0,227	0,2	0,199
S11	0,321	0,379	0,225	0,36	0,422
S12	0,359	0,377	0,352	0,348	0,369
S13	0,621	0,58	0,562	0,492	0,424
S14	0,633	0,672	0,609	0,608	0,555
S15	0,44	0,452	0,43	0,386	0,369
S16	0,416	0,579	0,309	0,51	0,398
S17	0,415	0,436	0,447	0,439	0,354
S18	0,481	0,391	0,416	0,347	0,322

d- La moyenne des Do obtenue aux différents sucres utilisés

Souches \ [NaCl]	Saccharose	Glucose	Arabinose	Glycerine	Dextrine
S1	0,128	0,134	0,141	0,135	0,738
S2	0,175	0,149	0,13	0,246	0,612
S3	0,091	0,185	0,13	0,181	0,67
S4	0,081	0,231	0,073	0,174	0,486
S5	0,129	0,105	0,135	0,136	0,22
S6	0,084	0,12	0,032	0,123	0,536
S7	0,155	0,222	0,202	0,171	0,623
S8	0,233	0,172	0,079	0,142	0,558
S9	0,105	0,326	0,118	0,213	0,539
S10	0,084	0,141	0,069	0,059	0,451
S11	0,038	0,096	0,075	0,034	0,478
S12	0,106	0,095	0,121	0,07	0,756
S13	0,315	0,281	0,302	0,25	0,539
S14	0,072	0,213	0,074	0,147	0,46
S15	0,128	0,165	0,114	0,157	0,628
S16	0,127	0,105	0,086	0,174	0,551
S17	0,134	0,157	0,225	0,151	0,769
S18	0,246	0,114	0,294	0,31	0,528

e- La moyenne des Do obtenue aux différents acides aminés utilisés comme source d'azote

Souches \ Acide aminé	Méthionine	Histidine	Glycine	Alanine	Arginine
S1	0,114	0,146	0,049	0,034	0,039
S2	0,147	0,459	0,13	0,168	0,377
S3	0,131	0,292	0,258	0,32	0,374
S4	0,107	0,327	0,298	0,272	0,286
S5	0,107	0,072	0,015	0,029	0,026
S6	0,124	0,543	0,114	0,308	0,338
S7	0,137	0,424	0,353	0,417	0,477
S8	0,114	0,144	0,019	0,021	0,03
S9	0,119	0,266	0,282	0,305	0,393
S10	0,253	0,242	0,176	0,164	0,055
S11	0,178	0,245	0,164	0,388	0,185
S12	0,111	0,109	0,007	0,015	0,052
S13	0,184	0,357	0,167	0,42	0,212
S14	0,114	0,385	0,212	0,295	0,285
S15	0,105	0,529	0,092	0,211	0,246
S16	0,108	0,428	0,088	0,102	0,262
S17	0,14	0,502	0,099	0,121	0,295
S18	0,141	0,498	0,085	0,133	0,271

f- La moyenne des Do obtenue aux différents acides aminés utilisés comme source d'azote et de carbone

Acide aminé Souches	Méthionine	Histidine	Glycine	Alanine	Arginine
S1	0,047	0,039	0,05	0,075	0,008
S2	0,037	0,48	0,106	0,321	0,505
S3	0,02	0,47	0,038	0,428	0,419
S4	0,034	0,128	0,161	0,161	0,113
S5	0,044	0,012	0,025	0,022	0,011
S6	0,025	0,1	0,072	0,183	0,24
S7	0,077	0,545	0,12	0,529	0,451
S8	0,01	0,012	0,051	0,012	0,028
S9	0,015	0,467	0,069	0,518	0,365
S10	0,215	0,178	0,166	0,389	0,11
S11	0,07	0,13	0,067	0,2	0,091
S12	0,028	0,034	0,04	0,031	0,027
S13	0,081	0,112	0,104	0,244	0,146
S14	0,011	0,208	0,067	0,156	0,171
S15	0,027	0,169	0,187	0,226	0,278
S16	0,033	0,255	0,091	0,207	0,235
S17	0,031	0,245	0,079	0,127	0,223
S18	0,055	0,209	0,218	0,219	0,314

Résumé

Cytisus triflorus, légumineuse provenant de la région d'Oued Dass à environ 40 km à l'ouest de Bejaïa, Dix huit isolats de nodules racinaires de *C.triflorus* ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à savoir, les caractères culturels, cellulaires, nutritionnels, physiologiques et quelques caractères biochimiques.

D'après la caractérisation cellulaire et culturelle de ces isolats et les données de la littérature, on a déduit qu'ils répondent aux critères fondamentaux des Bactéries Nodulantes des légumineuses (BNL). Les résultats de la caractérisation physiologique montrent que toutes les bactéries symbiotiques obtenues présentent une bonne croissance entre le pH 6 et le pH 9. En outre toutes les bactéries supportent mieux l'alcalinité comparée à l'acidité. Pour l'effet de la température la plupart des souches montrent une bonne croissance entre 26 et 32°C. L'étude de l'effet du NaCl montre des résultats diversifiés. Néanmoins les souches S1, S6, S9 et S12 sont remarquables et demeurent stables aux différentes molarités de NaCl, à l'exception de la souche S5, qui reprend sa croissance à 500 mM. Quand aux résultats de l'assimilation des sucres et des acides aminés, ils montrent que la plupart des souches préfèrent la dextrine comme seule source de carbone et l'histidine comme seule source d'azote. L'ensemble des données a fait l'objet d'une analyse numérique. Le dendrogramme montre que tous les isolats se séparent en deux groupes, eux-mêmes se subdivisent à leur tour en sous-groupes, ce qui permet de suggérer une certaine diversité bactérienne.

Les 18 isolats de *Cytisus triflorus* ont révélé une grande diversité de réponse vis-à-vis des différents tests effectués. Ces derniers pourraient jouer un rôle dans la restauration et le maintien de la fertilité des sols.

Mots clés : *Cytisus triflorus*, caractérisation, rhizobia, fixation symbiotique.

Abstract

Cytisus triflorus, legume plant grown in Oued Dass area, located in West with 40 km fare from Bejaïa town. Eighteen isolates from roots nodules of *C. triflorus* have been investigated for their phenotypic characterization: cultural, cellular, nutritional, physiological and some other characters biochemical.

According to the characterization and cellular cultivation of these isolates and the literature data, it was deduced that they confirm the basic criteria of Bacteria Nodulating Legumes (BNL). The results of physiological characterization showed that all symbiotic bacteria obtained have good growth between pH 6 and pH 9. In addition, all bacteria are more tolerant of alkalinity compared to acidity. For the effect of temperature most of the strains showed good growth between 26 and 32 °C. The study of the effect of NaCl shows different results However strains S1, S6, S9 and S12 are outstanding and remain stable at different concentrations of NaCl, with the exception of strain S5, able to grow only in concentration of 500 mM. About the results of the assimilation of sugars and amino acids, they show that most strains prefer dextrin as only carbon source and histidine as own nitrogen source. The data set has been numerical analysis. The dendrogram shows that all isolates are separated into two groups; in each group we found different subgroups, thereby suggesting some bacterial diversity.

The 18 isolates of *Cytisus triflorus* revealed a wide range of response vis-à-vis the various tests. These could play a role in restoring and maintaining soil fertility.

Keywords: *Cytisus triflorus*, characterization, rhizobia, symbiotic nitrogen fixation.

