

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Béjaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de MASTER
en Environnement et Sécurité Alimentaire

Thème

Contribution à la Caractérisation des Bactéries
Nodulant Hedysarum coronarium L.

Membres de jury :

Présidente : M^{me} BOULILA. F

Promoteur : M^r RAMDANI. N

Examineurs : M^{me} BELHADJ-KEBBI. M

M^r HAMLAT. M

Présenté par :

M^{elle} : AMIROUCHE Souad

M^{elle} : KHETTAL Sakina

Promotion 2011 / 2012

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Ce mémoire n'aurait pas vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de notre promoteur, Monsieur RAMDANI Nacer, Maître assistant chargé de cours à l'université de Béjaïa, que nous voulons particulièrement remercier. Nous voudrions aussi le remercier pour le temps et la patience qu'il nous a accordés tout au long de ce travail, d'avoir cru en nos capacités et de nous avoir fourni d'excellentes conditions de travail au sein de son Laboratoire. De plus, les conseils qu'il nous a procurés tout au long de la rédaction, ont toujours été clairs et enrichissants, nous facilitant grandement la tâche et nous permettant la finalisation de ce travail.

Nos remerciements s'adressent aux membres de jury, la présidente M^{me} BOULILA, les examinateurs M^{me} BELHADJ-KEBBI et M^r HAMLAT, qui nous ont fait l'honneur de juger ce modeste travail.

Nous remercions particulièrement M^r BELHADI, Dj. qui nous a toujours donné un peu de son temps pour nous aider et nous conseiller.

Nous tenons à remercier M^r MOHDEB M. et le personnel de l'INRA de Oued-Ghir pour leurs collaborations et leur aides.

Nous remercions également M^{me} RAMDANI, M^{me} ZIANE et M^{me} BELHADI pour leurs gentillesse et leurs sympathies.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents

Mes deux chers frères

Mes sœurs et leurs enfants

Mes amis (es)

SOUAD

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents

Mes deux chers frères

Mes amis (es)

SAKINA

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation du complexe nitrogénase (Yann, 2006).

Figure 2 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice d'azote (Lazrek-Ben Friha, 2008).

Figure 3: Photo d'*Hedysarum coronarium* L.

Figure 4: Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre rhizobium et une plante (Perry et al., 2004).

Figure 5: Structure chimique des facteurs Nod (Cullimore et al, 2001).

Figure 6 : Localisation géographique des différentes stations de prélèvement des échantillons de sol

Figure 7 : Photo des gousses et des graines d'*Hedysarum coronarium* L. utilisées.

Figure 8 : Culture en pots d'*Hedysarum coronarium* L. sur les sols de Béjaia, Tizi-Ouzou et Sétif.

Figure 9: nodules des racines d'*Hedysarum coronarium* L. ayant servi à l'extraction des rhizobia.

Figure 10: Germination des graines d'*Hedysarum coronarium* L. utilisées pour le test d'authentification

Figure 11 : Dispositifs de germination utilisés pour le test d'authentification des isolats.

Figure 12 : Photo montrant l'aspect muccoïdal des colonies sur milieu MSY solide sans rouge Congo.

Figure 13 : Photos indiquant l'aspect muccoïdal des colonies de rhizobia cultivées sur milieu Y.E.M.A + rouge Congo.

Figure 14: Exemple d'acidification et d'utilisation de sucres chez certaines bactéries

Figure 15 : Effet du NaCl sur la croissance des rhizobia

Figure 16 : Effet du pH sur la croissance des rhizobia.

Figure 17 : Dendrogramme des caractères phénotypiques des rhizobia isolées d'*Hedysarum coronarium* L.

Liste des Tableaux

Tableau I : les micro-organismes fixateurs d'azote, libres et symbiotiques (Roger et *al.*, 1996).

Tableau II : Classification des Bactéries Nodulant les Légumineuses et fixatrices d'azote, d'après « ICSP Subcommittee on the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* »

Tableau III : Données climatiques des stations

Tableau IV : Résultats des analyses physico-chimiques des sols étudiés

Tableau V : Résultats du test d'authentification

Tableau VI : Résultats des caractéristiques morphologiques des colonies

Tableau VII : Résultats des paramètres de croissance des rhizobia

Tableau VIII : Résultats des caractéristiques biochimiques des rhizobia

Tableau IX : Résultats de l'utilisation des substrats carbonés comme seule source de carbone

Tableau X : Résultats de l'antibiogramme des souches de rhizobia

Tableau XI : Matrice des caractères phénotypiques utilisés pour l'analyse numérique

Tableau XII : pourcentages de désaccord entre les souches de rhizobia

Liste des abréviations

ADH : Arginine Déshydrogénase.

AM: Ampicilline

ATB: Antibiogramme

BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses.

BTM : Bleu de Bromothymol.

C.A.H. : Classification Ascendante Hiérarchique

CE : Cefalexine.

CN : Gentamycine.

FeMO-co : Cofacteur Fer molybdène.

fix : gène de fixation d'azote.

INRAA : Institut Nationale de Recherche Agronomique Algérie.

ITS : Internal Transcribed System

K: Kanamycine.

LDC : Lysine Décarboxylase.

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.

nif : gène de fixation d'azote.

nod : gène de nodulation

nol : gène de nodulation.

Nod : Facteurs de nodulation.

ODC : Ornithine Décarboxylase.

ONPG: Ortho-Nitro-Phényl- β -D-Galactopyranoside.

OX: Oxacilline

P: Pénicilline.

PCR: Polymerase chain reaction.

PHB: Poly- β -Hydroxy-Butyrate.

PSym: Plasmide symbiotique.

RM: Rouge de Méthyle.

S: Streptomycine.

TE : Tétracycline.

VP : Voges Proskauer.

Dédicaces

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Pages

INTRODUCTION 1

Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 1

1- FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE 3

1-1- Généralités..... 3

1-1-1- Fixateurs libres4

1-1-2- Fixateurs symbiotiques4

1-2- Mécanismes moléculaires de la fixation biologique de N₂..... 5

1-2-1- La nitrogénase5

1-2-2- Fonctionnement de la nitrogénase 6

1-2-3- La leghémoglobine6

2- LA SYMBIOSE LEGUMINEUSE-RHIZOBIA7

2-1- Le partenaire végétale8

2-1-1- Intérêts des légumineuses9

2-1-2- Importance des légumineuses dans les systèmes de culture9

2-1-3- Description du genre *Hedysarum* 10

○ Origine de la plante 10

○ Morphologie de la plante11

2-2- Le partenaire bactérien12

2-2-1- Rhizobia12

2-2-2- Taxonomie des rhizobia12

3- LA NODULATION	19
3-1- Les mécanismes moléculaires de la symbiose et de la nodulation	21
3-1-1- Les flavonoïdes	21
3-1-2- Les facteurs Nod	21
Chapitre II : MATERIEL ET METHODES	24
ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES NODULANT	
<i>Hedysarum coronarium L.</i>	
1- MATERIEL	24
1-1- Les sols	24
1-2- Le matériel végétal	25
1-3- Les milieux de cultures	25
2- METHODES	26
2-1- ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES SOLS	26
- Analyse granulométrique.....	26
- Mesure du Ph.....	27
- Dosage du carbone organique.....	27
- Dosage de l'azote total.....	27
- Dosage du calcaire total.....	28
- Dosage du calcaire actif.....	28
2-2- PIEFEAGE ET ISOLEMENT DES BACTERIES DES NODULES	28
<i>D'Hedysarum coronarium L.</i>	
2-2-1- Culture d'<i>Hedysarum coronarium</i> en pot	28
2-2-2- Collecte et stérilisation de nodules	29
- Stérilisation des nodules.....	29
- Extraction et purification des isolats bactériens.....	29
- Conservation des souches.....	30
2-3- AUTHENTIFICATION DES ISOLATS	30
2-3-1- Préparation des plantes axéniques	30
- Stérilisation des graines.....	30
- Germination des graines et obtention des plantes axéniques.....	30
2-3-2- Inoculation des plantes	31

2-4- CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET CULTURALE DES ISOLATS	
2-4-1- Examens macroscopiques	31
2-4-2- Examen microscopiques	31
2-5- CARACTERISATION BIOCHIMIQUE	32
2-5-1- Tests biochimiques et recherche de certains enzymes	32
- Détermination du type du métabolisme.....	32
- Activité catalasique.....	32
- Activité oxydasique.....	33
- Recherche de la β -Galactosidase.....	33
- Réduction des nitrates.....	33
- Utilisation du citrate comme seule source de carbone.....	33
- Recherche de l'acétoïne et production d'acide.....	33
- Mise en évidence des décarboxylases et des déshydrogénases (ODC, LDC, ADH)	
- Utilisation des sucres comme seule source de carbone.....	34
2-5-2- Etude de la croissance des isolats	34
2-6- CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE	35
2-6-1- Tolérance au NaCl	35
2-6-2- Effet de pH	35
2-6-3- Résistance aux antibiotiques	35
2-7- ANALYSE NUMERIQUE	36

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Caractéristiques physico-chimiques des sols	37
2. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant <i>H.coronarium</i> L	38
3. Caractéristiques phénotypiques des rhizobia	39
3.1 Caractéristiques morphologiques et cellulaires	39
3.1.1 Morphologie cellulaire.....	39
3.1.2 Caractères cultureux.....	39

3.2	Caractéristiques biochimiques	42
3.2.1	Paramètres de croissance bactérienne.....	42
3.2.2	Mise en évidence de quelques enzymes.....	42
3.2.3	Mise en évidence du type de métabolisme.....	43
3.2.4	Tests biochimiques.....	43
3.2.5	Utilisation des sucres.....	44
3.3	Caractéristiques physiologiques	45
3.3.1	Résistance aux antibiotiques.....	45
3.3.2	Effet du NaCl sur la croissance des rhizobia.....	46
3.3.3	Effet du pH sur la croissance des rhizobia.....	47
4-	Analyse numérique des caractères phénotypiques	49
	CONCLUSION	51
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	53
	ANNEXES	

Il y a un peu plus d'une centaine d'années, l'agriculture a commencé à utiliser des ressources externes : engrais, pesticides et carburants fossiles et en est aujourd'hui lourdement dépendante. Le contexte socio-économique a beaucoup changé dans la deuxième moitié du 20^e siècle en raison, notamment, de l'augmentation de la population de la terre, des prélèvements des ressources naturelles de plus en plus importants, de la dégradation progressive de l'environnement et des instabilités sociales. Cela fait que l'on attend de l'agriculture, non seulement qu'elle fournisse des produits les moins coûteux en préservant les propriétés des sols ; mais en limitant, voire en supprimant totalement les possibles effets néfastes sur l'environnement et, enfin en préservant les paysages. Cette attente ne peut cependant pas être séparée de la question relative à la couverture des besoins alimentaires de l'humanité qui d'autant préoccupante que la population mondiale va encore s'accroître notablement dans les prochaines années (Calvet, 2003).

L'heure est à la Révolution Verte Durable. Ce qui permettrait d'accroître la productivité agricole grâce à des pratiques culturales durables préservant l'environnement et renforçant la fertilité naturelle des sols.

Les préoccupations environnementales croissantes, les réflexions actuelles en terme d'agriculture durable surtout au Nord de la Méditerranée, induisent des utilisations de légumineuses qui ne sont pas exclusivement fourragères, mais liées à leur rôle de couverture du sol, de maintien et d'accroissement de la fertilité par l'établissement des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobia.

Les symbioses entre les rhizobia et les Légumineuses sont les mieux étudiées aboutit à la formation d'un organe nouveau au niveau des racines, le nodule fixateur d'azote.

La région de Nord-est algérienne 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 *Hedysarum* telle que *Hedysarum coronarium* L. (Sulla ou sainfoin d'Espagne) , une légumineuse fourragère qui présente de nombreux avantages qui rend son utilisation justifiée dans l'amélioration des parcours et des productions fourragères et pastorales, et dans d'autres domaines comme, la protection des sols contre l'érosion, la mise en valeur des terres (Abdelguerfi-Berrekia et *al.*, 1991).

L'exploitation effective de la fixation symbiotique de l'azote pour l'amélioration de la production agricole exige non seulement la sélection du meilleur cultivar hôte mais exige également que la population des rhizobia natifs soit correctement et suffisamment caractérisée (El-Hilali, 2006).

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail qui a pour objectif essentiel l'étude de la diversité des bactéries nodulantes *Hedysarum coronarium* L., cultivée dans des sols provenant des régions humides et semi-arides du Nord-Est d'Algérie.

Notre travail repose sur deux principaux points :

- 1- Constitution d'une collection de Bactéries Nodulantes *Hedysarum coronarium* L.
- 2- Les souches isolées seront caractérisées d'un point de vue phénotypique par une série de tests et les données obtenues seront traitées par une analyse numérique, basée sur la Classification Ascendante Hiérarchique, afin de bien distinguer le regroupement de nos souches.

Ce mémoire comprend trois chapitres : le premier correspond à une synthèse bibliographique ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique et le second présente le matériel et méthodes utilisés pour ce travail et enfin, le dernier regroupe les résultats et leur discussion.

1- FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE

1-1- Généralités

L'azote est l'élément constitutif des végétaux le plus important après l'eau. Il est très fréquemment le facteur clé de la production agricole car la concentration des formes d'azote assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance des plantes. L'azote moléculaire (N_2), constituant majeur de l'atmosphère mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par certains micro-organismes procaryotes appelés fixateurs de N_2 , qui sont soit libres, soit symbiotiques, c'est à dire associés à d'autres organismes (Roger et *al.*, 1996).

La fixation biologique de N_2 est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. Dans les écosystèmes cultivés, la fixation de N_2 et les apports d'engrais azotés constituent les apports pouvant compenser les exportations par les récoltes et les pertes dues à des activités microbiennes (volatilisation et dénitrification). En absence de fertilisation, la fixation de N_2 est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (Roger et *al.*, 1996).

Cette fixation biologique de l'azote s'opère par certains micro-organismes qui possèdent un complexe enzymatique appelé nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N_2 en ammoniac NH_3 (Zakhia et de Lajudie, 2006). Seules les cellules procaryotes sont capables de fixer l'azote. La nitrogénase a été purifiée chez pratiquement tous les procaryotes fixateurs d'azote connus (Hopkins, 2003).

La découverte de la fixation de l'azote par les bactéries libres est due à Beijerinck, en 1901. Depuis, de nombreux genres bactériens ont été reconnus comme fixateurs. Ces genres représentent pratiquement tous les types de comportements en ce qui concerne les relations plante-microorganisme, les relations avec l'oxygène et les modes trophiques. (Roger et *al.*, 1996).

Ces organismes procaryotes fixateurs d'azote jouent un rôle écologique essentiel dans la biosphère de la planète, en équilibrant l'activité des organismes dénitrifiants qui libèrent dans l'atmosphère le N₂ produit à partir des nitrates et nitrites du sol.

Les bactéries fixatrices d'azote sont de deux types, symbiotiques et non symbiotiques (Tableau I) (Munive Hernandez, 2002).

1-1-1- Fixateurs libres

Les bactéries libres fixatrices d'azote sont très répandues. Elles habitent 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).

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*) (Sebihi, 2008).

1-1-2- 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 provoque la formation sur la racine, ou parfois sur la tige, de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophies nommées nodules (Hopkins, 2003).

L'association symbiotique entre une plante et la bactérie à bénéfice réciproque donne lieu à une fixation d'azote. La plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qui intégrera les protéines végétales (Tortora et al., 2003).

Chapitre I : Revue bibliographique

Tableau I : les micro-organismes fixateurs d'azote, libres et symbiotiques (Roger et al., 1996).

Micro-organismes libres

- Aérobie
 - Hétérotrophes *Azotobacter spp. ; Klebsiell pneumoniae , Beijerinckia indica ; Azospirillum lipoferum*
 - Phototrophes : cyanobactéries
 - Hétérocystées *Nostoc ; Anabaena ; Calothrix ; Tolypothrix*
 - Homocystées *Trichodesmium ; Oscillatoria*
 - Unicellulaires *Gloeotheca ; Gloeocapsa*
- Anaérobies
 - Hétérotrophes *Clostridium pasteurianum ; desulfovibrio vulgaris ; Desulfotomaculum spp ; Methanobacterium spp ; Rhodospirillum rubrum ; Rhodobacter capsulata ; Chromatium vinosum*
 - Phototrophes

Micro-organismes symbiotiques

- Légumineuses
 - à nodules racinaires *Rhizobium meliloti ; Rhizobium leguminosarum Bradyrhizobium japonicum ; Sinorhizobium ferdi*
 - à nodules caulinaires *Azorhizobium caulinodans*
- Symbioses actinorhiziennes *Frankia*
- Symbioses à cyanobactéries
 - Azolla *Anabaena azollae*
 - Cycas *Anabaena cycadeae*
 - Lichens *Nostoc*
 - Mousses et hépatiques *Nostoc*

1-2- Mécanismes moléculaires de la fixation biologique de N₂

1-2-1- La nitrogénase

L'enzyme-clé de la fixation de N₂ chez les procaryotes est la *nitrogénase*. Sa structure est très complexe et elle est semblable chez tous les organismes où elle a été isolée (Luttge et al., 2002).

La nitrogénase contient du molybdène, du fer et sulfure dans ces groupements prosthétiques, ces éléments sont donc indispensables à la fixation de l'azote. La nitrogénase utilise également de grandes quantités d'ATP comme source d'énergie, ce qui fait de la fixation de l'azote un processus métabolique onéreux (Raven et al., 2007).

C'est une enzyme qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines solubles du bactéroïde et qui possède une grande homologie de structure et de fonctionnement chez les différentes diazotrophes. Elle est constituée de deux métalloprotéines de poids moléculaire très différents (Figure 1) :

- La protéine à fer, encore appelée composant II ou dinitrogénase, est un dimère d'environ 60 KDa constitué de deux sous-unités identiques ayant chacune un site de fixation pour une molécule de Mg⁺⁺-ATP. La réduction de la protéine nécessite la présence d'un donneur d'électrons à bas potentiel : Ferrédoxine ou Flavodoxine *in vivo* ou hydrosulfite *in vitro* ;
- La protéine à Molybdène-fer, encore appelée composant I ou dinitrogénase, est un tétramère d'environ 220 KDa formé de deux sous-unités α et de deux sous-unités β de poids moléculaires voisins. Les deux atomes de Mo sont insérés dans deux cofacteurs polypeptidiques riches en fer dénommés FeMo-co et impliqués dans le processus de réduction (Morot-Gaudry, 1997).

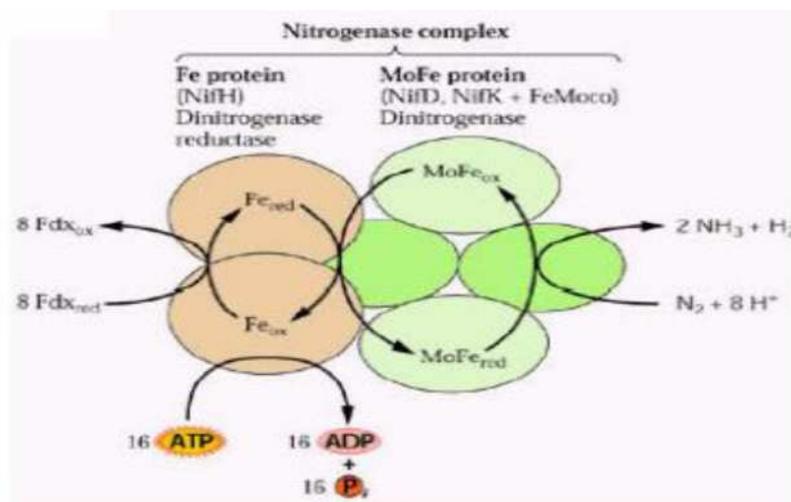


Figure 1 : Représentation du complexe nitrogénase (Yann, 2006)

Une des caractéristiques importante de la nitrogénase est sa sensibilité à l'oxygène. Elle n'est active qu'en anaérobiose et est irréversiblement inactivée par l'oxygène. Cette propriété est sans conséquence pour les bactéries anaérobies, mais limite fortement la fixation de N₂ par les bactéries libres dans les sols bien aérés.

1-2-2- Fonctionnement de la nitrogénase

En absence de dioxygène, en présence d'un donneur d'électron à bas potentiel redox (ferrodoxine), en présence d'ATP et d'ions Mg, la nitrogénase réduit l'azote moléculaire en ammoniac. Le bilan global de la réaction est le suivant :



Grâce à l'ammoniac, les micro-organismes diazotrophes peuvent ensuite synthétiser des acides aminés et leurs propres protéines. Cependant, on constate que la nitrogénase ne leur est pas indispensable, ils peuvent très bien utiliser directement l'ammoniac ou les nitrates du sol et d'ailleurs l'enzyme est inhibée par ces formes combinées d'azote. Par ailleurs, la synthèse de protéines est impossible sans une source de carbone. Pour former les acides carboxyliques sur lequel sont transférés les acides aminés indispensables (Dupuy et Nougier, 2005).

1-2-3- La leghémoglobine

Le contrôle d'O₂ est assuré pour une bonne part par la présence d'une protéine hème qui fixe l'oxygène, la leghémoglobine ; la concentration de cette substance est relativement élevée dans le cytosol des cellules infectées. Cette protéine, responsable de la couleur rose de la région centrale du nodule, est produite en partie par le bactéroïde (l'hème) et en partie par la plante (la globine) (Raven et *al.*, 2007).

Le complexe nitrogénase est extrêmement sensible à l'inactivation par O₂. La leghémoglobine abaisse considérablement la concentration d'O₂ libre dans les nodules de plante en le fixant ; l'oxygène fixé par la leghémoglobine n'est plus libre dans les nodules et ne peut donc plus interagir avec la nitrogénase pour l'inhiber (Sebihi, 2008).

Néanmoins, les bactéroïdes ont également besoin, comme la plante hôte, d'un ravitaillement régulier en oxygène pour leur métabolisme. La plante hôte, répond à ces exigences en synthétisant de grande quantités de leghémoglobine qui vont porter l'oxygène libre à un niveau suffisamment faible pour ne pas endommager la nitrogénase (Sebihi, 2008).

2- LA SYMBIOSE LEGUMINEUSE-RHIZOBIA

En 1838, l'agronome français J.B. Boussingault montra que les légumineuses peuvent assimiler l'azote de l'air. En 1887, Hellriegel et Wilfarth ont montré que la fixation de l'azote est associée avec la nodulation des racines des légumineuses. Cette fixation est liée à la présence de nodosités ou nodules sur leurs racines, qui n'apparaissent qu'après infestation par des bactéries isolées par le Hollandais Beijerinck en 1888, les Rhizobiums (Heller et *al.*, 1989).

Les plantes de la famille des légumineuses ou fabales sont capables d'utiliser indirectement l'azote atmosphérique quand elles présentent des nodosités sur leurs racines infectées par des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*. Ces dernières ne fixent pas l'azote quand elles vivent librement dans le sol mais elles acquièrent cette propriété en devenant l'hôte des cellules végétales.

Dans les cellules de ces nodosités, les bactéries se différencient en bactéroïdes, capables de réduire l'azote atmosphérique N₂ en une forme assimilable par la plante hôte. En contrepartie, la plante fournit aux bactéries une niche dans laquelle elles peuvent se multiplier abondamment et des composés carbonés issus de la photosynthèse. Cette interaction constitue donc une « symbiose », puisque les deux partenaires vivent en contact étroit, et un « mutualisme », puisqu'il s'agit d'une association à bénéfice réciproque, c'est la plus importante de la biosphère. Grâce à cette symbiose, les légumineuses sont capables de pousser dans des sols pauvres en azote minéral ou organique (Dupuy et Nougier, 2005 ; Gough, 2009).

L'interaction est spécifique : une souche bactérienne n'infecte pas n'importe quelle plante, et inversement la plante ne se laisse pas envahir par n'importe quelle souche. L'invasion et la formation des nodules est le résultat d'un échange de signaux chimiques selon un programme qui doit décider si la symbiose doit être menée à son terme ou non (Figure 2) (Pelmont, 1993).

Une symbiose efficace entre les rhizobiums et les plantes légumineuses exige plusieurs gènes bactériens de nodulation (*nod*, *nol* et *noe*) et des gènes de fixation d'azote (*nif* et *fix*). Les gènes de nodulation sont essentiels pour les premières étapes de l'infection et de la formation de nodule dans la symbiose rhizobia-légumineuses (Dersler-Nurmi et *al.*, 2007).

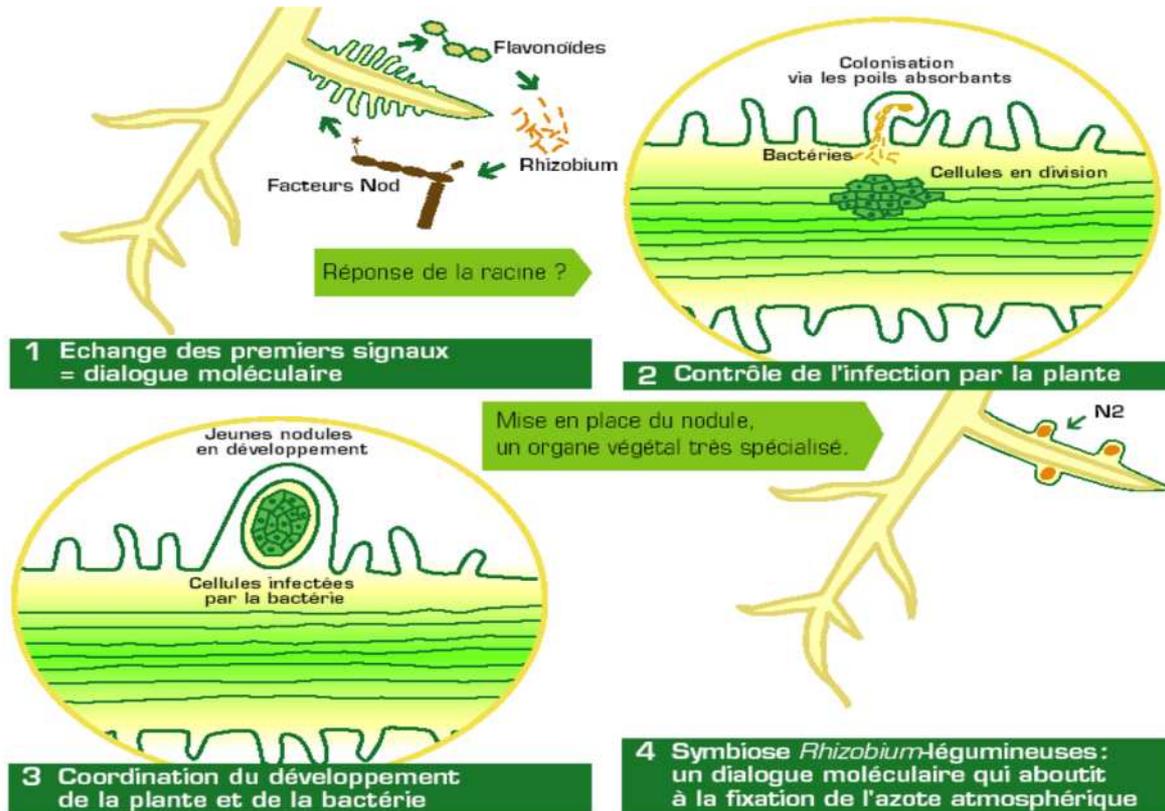


Figure 2 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice d'azote (Lazrek-Ben Friha, 2008).

2-1- Le partenaire végétale

Les Légumineuses ou *Fabaceae* représentent une famille importante et variée des angiospermes. En effet, il s'agit de la troisième plus grande famille chez les plantes supérieures avec plus de 720 genres et 20000 espèces (Vernie, 2008).

Ce sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à métabolisme azoté élevé. Trois-sous groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des *Fabaceae* : les *Caesalpinaceae*, les *Mimosaceae* et les *Faboideae* ou *Papilionoiceae* (Judd et al., 2002).

- Les *Caesalpinaceae*, avec environ 1900 espèces, sont principalement ligneuses et la plupart tropicales (Munive Hernandez, 2002).
- Les *Mimosaceae*, avec 2713 espèces dont la plupart sont ligneuses et d'origine subtropicale (Munive Hernandez, 2002).
- Les *Papilionoiceae* représentent la sous-famille la plus diverse avec 429 genres et environ 12000 espèces. Deux groupes majeurs de plantes cultivées sont présents au sein de cette sous-famille : les légumineuses tropicales (ou Phaseolides) et les légumineuses tempérées (ou Galegoïdes) (Vernie, 2008).

2-1-1- Intérêts des légumineuses

Seconde famille derrière les graminées, les légumineuses ont une grande importance au niveau de l'agriculture. Elles sont cultivées pour leurs graines (riches en protéines) ou pour leurs propriétés fourragères et représentent 12 à 15% des terres cultivables dans le monde et 27% de la production mondiale des cultures (Vernie, 2008).

Les légumineuses à graines contribuent pour 33% aux besoins azotés de l'alimentation humaine, avec par ordre d'importance : le haricot, le pois, le pois chiche, la fève, le pois d'Angole, le pois à vache et la lentille. Enfin, plus de 35% des huiles végétales proviennent de légumineuses avec en tête le soja et l'arachide. Elles entrent donc dans l'alimentation humaine mais sont aussi indispensables à la production animale en termes de nourriture animale et de fourrages (Vernie, 2008).

Les légumineuses jouent un rôle capital dans la préservation de l'environnement. L'azote est en effet l'élément nutritif le plus limitant de la production des plantes dans la plupart des écosystèmes naturels. Les légumineuses, via leurs capacités symbiotiques, peuvent contribuer à la colonisation des écosystèmes peu fertiles (Djebali, 2008).

2-1-2- Importance des légumineuses dans les systèmes de culture

La fixation de l'azote atmosphérique par la symbiose rhizobia-légumineuse a une importance capitale en agronomie puisqu'elle permet d'augmenter considérablement la teneur d'un sol en azote assimilable par les plantes, dans la mesure où les sols pauvres et nus sont souvent déficients en azote. Seules les légumineuses se développent dans ce type de sol là où les autres plantes ne le peuvent pas (Madigan et Martinko, 2007).

Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique. Les résidus des légumineuses sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. D'autres effets bénéfiques des légumineuses semblent intervenir dans l'accroissement des rendements et certains auteurs préfèrent le terme 'effet rotation' pour désigner cet effet positif des légumineuses sur la culture suivante (Lazrek-BenFriha, 2008).

Les espèces de légumineuses employées en agriculture pour une utilisation directe et effective de l'azote grâce aux nodules fixateurs d'azote sont peu nombreuses. Certaines légumineuses qui ne sont pas directement des plantes cultivées utiles, peuvent être intégrées dans une

succession culturale pour être enfouies au cours du labour comme engrais verts (Luttge et al., 2002).

2-1-3- Description du genre *Hedysarum*

○ *Origine de la plante*

Le genre *Hedysarum* présente 70-100 espèces qui sont bien distribuées en Europe tempérée, l'Afrique du nord méditerranéenne, Asie mineure, Sibérie et l'Amérique du nord (d'Arizona vers le Canada), aussi bien que dans les régions arctiques. Environ 10 espèces existantes dans les secteurs de pâturages occidentaux des Etats-Unis. En Afrique du nord, la Tunisie et le Maroc présentent six espèces, alors que neuf espèces existent en Algérie, trois d'entre elles sont endémiques (Issolah et al., 2006).

La plante *Hedysarum coronarium* L., appelée également Sulla ou Sainfoin d'Espagne, est une plante herbacée, annuelle ou pérenne, droite ou rampante peut atteindre jusqu'à 0,3 à 1,5 m (Gharzouli, 2006).

Sulla (*Hedysarum coronarium*) à une durée de vie courte, une légumineuse fourragère d'origine méditerranéenne où elle est largement utilisée pour le foin, l'ensilage et le pâturage. Il est indiqué que cette espèce de la tribu *Hedysareae* est distribuée en Espagne, en Algérie et en Italie méridional. En Algérie, *H. coronarium* est très rencontrée dans le Tell constantinois et très peu rencontrée dans les autres régions (El-Kantara, Alger, Oran). Dans beaucoup d'endroits de l'est du nord de l'Algérie, cette espèce est rencontrée ensemble avec d'autres espèces fourragères comme les genres *Trifolium*, *Medicago*, *Astragalus*, *Phalaris*, *Scorpiurus*, *Avena*, *Lolium*, *Picris*, *Carthamus*, *Sonchus*, *Dactylis*, *Festuca*, *Hordeum*, *Leontodon*, *Lepturus*, *Lotus*, *Onobrychis* (Issolah et al., 2001).

Hedysarum coronarium se trouve sur des sols de texture fine à moyenne, à conductivité très faible à moyenne, généralement pauvre en potassium et en calcaire total (Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991). D'où il y a lieu d'encourager la culture de cette plante qui serait d'un grand secours pour l'élevage algérien en raison de son rendement et de sa résistance à la sécheresse et à la chaleur.

Les espèces méditerranéennes de *Hedysarea* constituent des ressources phytogénétiques importantes capables de favoriser la production de fourrage et de valoriser des prairies actuellement endommagées par une érosion génétique (Chennaoui-Kourda et al., 2012).

Elles jouent un rôle important dans les systèmes agricoles à base de céréales dans les régions méditerranéennes semi-arides, en particulier dans l'agriculture organique et l'orientation agricole des saisons à faible rendement (Ruisi et *al.*, 2011).

○ *Morphologie de la plante*

C'est une plante vigoureuse, à tiges dressées à érigées, peu velue, feuilles pennées impaires, 5-11 folioles, 15-35 mm de long largement ovoïdes, poils appliqués sur face inférieure, stipules libres, triangulaires pointues, 4-6 mm de long 1-2 mm de large, fleurs 12-15 mm de long, carmin à pourpre par 10-35, érigées à écartées, en grappe serrée à long pédoncule ovoïde à allongé, à l'aisselle, calice 7-8 mm à poils clairsemés à denses, 5 dents plus au moins aussi longues que tube calice. Gousse plate, étranglée, à 2-4 segments en forme de disque, généralement à piquants. La graine est réniforme ou discoïde avec un tégument lisse et luisant et uniformément coloré en jaune clair parfois noir; il brunit en vieillissant (Bayer et *al.*, 2005 ; Ben Jeddi, 2005) (Figure 3).



Figure 3: photo d'*Hedysarum coronarium* L.

2-2- Le partenaire bactérien

2-2-1- *Rhizobia*

Le terme « rhizobia » dans le sens strict a été utilisé pour désigner toutes bactéries capables de noduler et de fixer l'azote en association avec les légumineuses (Willems, 2006).

Vers la fin du 19^{ème} siècle, il a été réalisé que l'azote atmosphérique est assimilé dans les nodules racinaires des plantes légumineuses. En 1888, Beijerinck a rapporté l'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires et a établi qu'elles étaient responsables de ce processus de fixation de l'azote, il l'a appelé au début *Bacillus radicicola*. Plus tard, en 1889 Frank a changé le nom au *Rhizobium* pour une seule espèce qui l'a nommé *Rhizobium leguminosarum* (Willems, 2006).

Les rhizobia sont des bacilles mobiles à Gram négatif faisant partie des α *Proteobacteria* qui vivent aussi bien à l'état libre dans le sol ou bien qui peuvent infecter les légumineuses et établir une association symbiotique. L'infection des racines d'une légumineuse donnée par une espèce appropriée de *Rhizobiaceae* aboutit à la formation de nodosités racinaires ou caulinaires qui sont le siège de la fixation de l'azote moléculaire (Madigan et Martinko, 2007).

Bien que les rhizobia soient étudiés depuis plus de 100 ans, des symbiontes ont été identifiés pour moins de 10% des 720 genres de légumineuses (Vernie, 2008).

Rhizobium est généralement impliquée dans la formation des nodules dans les plantes des régions tempérées, il se développe plus rapidement (avec de temps de génération de 4 heures) et produit des colonies de 2 à 4mm de diamètre en 3 à 5 jours sur un milieu « levure-mannitol-sels minéraux ». Au sein du genre bactérien *Rhizobium*, chaque espèce nodule spécifiquement une espèce de légumineuse (Perry et al., 2004).

2-2-2 Taxonomie des rhizobia

Dans la taxonomie bactérienne, l'identification d'une bactérie à une espèce donnée reste un des aspects les plus délicats mais aussi des plus importants. En effet, si les animaux et les plantes sont riches en détails morphologiques qui constituent la base de leur classification, les bactéries de leur côté possèdent des caractéristiques morphologiques simples qui ne peuvent pas être utilisées pour les classer (Woese, 1987).

Depuis plus d'une vingtaine d'années, les taxonomistes bactériens reconnaissent la nécessité de ne plus baser le système de classification des bactéries sur des similarités de fonction

(diazotrophes, phototrophes, nodulation) et d'adopter une approche nécessitant la convergence du maximum de données (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) pour déterminer les groupes taxonomiques ou taxons bactériens (Zakhia et de Lajudie, 2006).

Les bactéries nodulants des légumineuses (BNL) sont des bactéries du sol, à Gram négatif, fixant l'azote à l'intérieur des nodules racinaires des légumineuses. Ces dernières années, une grande diversité des bactéries nodulants des légumineuses a été mise en évidence, causant un changement considérable dans leur taxonomie. La taxonomie courante de ces bactéries indique une large diversité du genre, de l'espèce et des sous espèces. La plupart de ces espèces appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae*, à la classe des α -Proteobactéries :

Rhizobium, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Ochrobactrum* et *Phyllobacterium*. En plus, environ huit espèces rhizobiales, appartenant à deux genres de la classe β -Proteobactéries ont été rapportées (*Burkholderia* et *Ralstonia*). D'autre part, des souches d'*Agrobacterium* ont été isolées dans des nodules de beaucoup d'espèces de légumineuse mais aucune explication définitive de la présence de ces bactéries à l'intérieur des nodules ne pourrait être démontrée. En plus, des bactéries de la classe γ -Proteobactéries ont été également rapportées (Benhizia et al. 2004 ; Mahdhi et al., 2011).

La classification des BNL, comme celle des autres espèces bactériennes, est constamment remise en question (Vandamme et al., 1996 ; Stackebrandt et al., 2002). Les nouvelles taxonomies sont basées sur des données polyphasiques qui prennent en considération tous les facteurs discriminatoires déterminés par les différentes méthodes (Taxonomie numérique, profils protéique, hybridation ADN-ADN, ADN-ARN, PCR des ARNr 16S et 23S, PCR de l'ITS...) (Sebihi, 2008).

Le Tableau II donne la classification des Bactéries Nodulant les Légumineuses et fixatrices d'azote, d'après « ICSP Subcommittee on the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* ».

Chapitre I : Revue bibliographique

Tableau II : Classification des Bactéries Nodulant les Légumineuses et fixatrices d'azote, d'après « ICSP Subcommittee on the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* » (10 avril, 2012). <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.

Espèces	Plante hôte	Références
Classe : Alphaproteobacteria		
Ordre : Rhizobiales		
Famille : Rhizobiaceae		
Genre : Rhizobium		Frank., 1879
<i>Rhizobium alamii</i>	Racines de tournesol, <i>Medicago ruthenica</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	Berge et al., 2009
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu et al., 2009
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	Sciure de <i>Populus alba</i>	García et al., 2007
<i>Rhizobium daejeonense</i>		Zhe-Xue Quan et al., 2005
<i>Rhizobium endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	López-López et al., 2011
<i>Rhizobium etli</i>		Segovia et al., 1993
<i>Rhizobium galegae</i>		
<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>Rhizobium giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>Rhizobium hainanense</i>		Chen et al., 1997
<i>Rhizobium herbae</i>		Ren et al., 2011
<i>Rhizobium huautlense</i>		
<i>Rhizobium indigoferae</i>		Wang et al., 1998
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		Wei et al., 2002
<i>Rhizobium loessense</i>		
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	<i>Albizia</i> , <i>Kummerowia</i> et <i>Dalbergia</i>	Lin et al., 2009
<i>Rhizobium lusitanum</i>		
<i>Rhizobium miluonense</i>	Nodules racinaires de <i>Lespedeza chinensis</i>	Gu et al., 2008
<i>Rhizobium mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum et al., 1998
<i>Rhizobium multihospitium</i>		Han et al., 2008
<i>Rhizobium oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	Peng et al., 2008
<i>Rhizobium phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dangeard et al., 1926
<i>Rhizobium pisi</i>		Ramírez-Bahena et al., 2008
<i>Rhizobium tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	Hou et al., 2009
<i>Rhizobium sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini et al., 2002

Chapitre I : Revue bibliographique

<i>Rhizobium tropici</i>	<i>leucaenae</i> sp. Nov	Martínez et al., 1991
<i>Rhizobium tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	Zhang et al., 2011
<i>Rhizobium undicola</i>		Young et al., 2001
<i>Rhizobium vignae</i>		Ren et al., 2011
<i>Rhizobium yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea trisperma, Coronilla varia, Gueldenstaedtia multiflora</i>	Zhi Yuan Tan et al., 2001
Genre : <i>Mesorhizobium</i>		
<i>Mesorhizobium albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Wang et al., 200
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al., 2010
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al., 1999
<i>Mesorhizobium australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i> L.	Nandasena et al., 2009
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al., 2011
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	<i>Caragana</i> sp.	Wang et al., 2007
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velazquez et al., 2001
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Biserrula pelecinus</i> L.	Nandasena et al., 2007
<i>Mesorhizobium gobiense</i>	<i>Astragalus filicaulis, Lotus frondosus, Lotus tenuis, Oxytropis glabra et Robinia pseudoacacia</i>	Han et al., 2008
<i>Mesorhizobium huakuui</i>	<i>Astragalus sinicus.</i>	Chen et al., 1991
<i>Mesorhizobium loti</i>		Jarvis et al., 1982
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>		Nour et al., 1995
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal et al., 2009
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i> L.	Nandasena et al., 2009
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>		de Lajudie et al., 1998
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou et al., 2010
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu et al., 2009
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., 2004
<i>Mesorhizobium tarimense</i>		Han et al., 2008
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., 2004
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>		Chen et al., 1995

Genre : Ensifer (<i>Sinorhizobium</i>)		
<i>Ensifer arboris</i>		Nick et al., 1999
<i>Ensifer fredii</i>		Scholla et Elkan, 1984
<i>Ensifer garamanticus</i>	<i>Lotus arabicus, Lotus creticus, Argyrolobium uniflorum, Medicago sativa</i>	Merabet et al., 2010
<i>Ensifer kostiensis</i>		Nick et al., 1999
<i>Ensifer kummerowiae</i>		Wei et al., 2002
<i>Ensifer medicae</i>		Rome et al., 1996
<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Dangeard et al., 1926
<i>Ensifer mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret et al., 2007
<i>Ensifer numidicus</i>	<i>Lotus arabicus, Lotus creticus, Argyrolobium uniflorum, Medicago sativa</i>	Merabet et al., 2010
<i>Ensifer sojae</i>	<i>Glycine max</i>	Li et al., 2011
Genre : Bradyrhizobium		Jordan, 1982
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	<i>Entada koshunensis</i>	Vinuesa et al., 2005
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>		Hirsch et Müller, 1986
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		Kuykendall et al., 1993
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>	Islam et al., 2008
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Pachyrhizus erosus, Racines de soybeans</i>	Kirchner, 1896
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez et al., 2009
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	Genre <i>Lespedeza</i>	Xu et al., 1995
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>		Ramírez et al., 2009
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	<i>vertisol microaggregates</i>	Yao et al., 2002,

Chapitre I : Revue bibliographique

<p>Genre: Burkholderia</p> <p><i>Burkholderia caribensis</i></p> <p><i>Burkholderia cepacia</i></p> <p><i>Burkholderia mimosarum</i></p> <p><i>Burkholderia nodosa</i></p> <p><i>Burkholderia phymatum</i></p> <p><i>Burkholderia sabiae</i></p> <p><i>Burkholderia tuberum</i></p>	<p><i>Mimosa</i> sp.</p> <p>woody Brazilian legumes</p> <p><i>Mimosa bimucronata</i> and <i>Mimosa scabrella</i></p> <p><i>Mimosa caesalpinifolia</i></p> <p><i>Mimosa caesalpinifolia</i></p>	<p>Chen et al., 2006</p> <p>Chen et al., 2007</p> <p>Chen et al., 2007</p> <p>Chen et al., 2008</p>
<p>Genre: Phyllobacterium</p> <p><i>Phyllobacterium trifolii</i></p> <p><i>Phyllobacterium ifriqiyense</i></p> <p><i>Phyllobacterium leguminum</i></p>	<p><i>Trifolium pratense</i></p>	<p>Valverde et al., 2005</p> <p>Mantelin et al., 2006</p> <p>Mantelin et al., 2006</p>
<p>Genre: Microvirga</p> <p><i>Microvirga lupini</i></p> <p><i>Microvirga lotononidis</i></p> <p><i>Microvirga zambiensis</i></p>		<p>Ardley et al., 2011 (sous presse)</p> <p>Ardley et al., 2011 (sous presse)</p> <p>Ardley et al., 2011 (sous presse)</p>
<p>Genre : Azorhizobium</p> <p><i>Azorhizobium caulinodans</i></p> <p><i>Azorhizobium doebereinae</i></p>	<p><i>Cytisus scopari</i></p> <p><i>Sesbania virgata</i></p>	<p>Zurdo et al., 2007</p> <p>Moreira et al., 2006</p>
<p>Genre : Ochrobactrum</p> <p><i>Ochrobactrum cytisi</i></p> <p><i>Ochrobactrum lupini</i></p>	<p><i>Cytisus scoparius</i></p> <p><i>Cytisus scoparius</i></p>	<p>Zurdo et al., 2007</p> <p>Zurdo et al., 2007</p>

Chapitre I : Revue bibliographique

<p>Genre: <i>Methylobacterium</i></p> <p><i>Methylobacterium nodulans</i></p>	<p><i>Crotalaria glaucoides, Crotalaria perrottetii et Crotalaria podocarpa</i></p>	<p>Jourand et <i>al.</i>, 2004</p>
<p>Genre : <i>Cupriavidus</i></p> <p><i>Cupriavidus taiwanensis</i></p>		<p>Vandamme et Coenye, 2004</p>
<p>Genre : <i>Devosia</i></p> <p><i>Devosia neptuniae</i></p>	<p><i>Neptunia natans</i></p>	<p>Vanparys et <i>al.</i>, 2005</p>
<p>Genre : <i>Shinella</i></p> <p><i>Shinella kummerowiae</i></p>	<p><i>Kummerowia stipulacea</i></p>	<p>Lin et <i>al.</i>, 2008</p>

3- LA NODULATION

Le nodule, ou nodosité, est un organe engendré par l'interaction entre une bactérie symbiotique fixatrice d'azote et une racine vascularisée. Cet organe abrite les symbiotes bactériens, leur assure les conditions nécessaires à l'activité fixatrice d'azote et favorise les échanges nutritifs entre les partenaires (Gobat et *al.*, 2003).

L'établissement de l'association symbiotique entre rhizobium et la plante légumineuse passe par une série d'étapes complexes. La bactérie et la plante mettent en place un système de « dialogue » basé sur un échange de molécules chimiques. Dans un premier temps, les racines excrètent des flavonoïdes qui attirent le rhizobium dans le voisinage de la racine et activent les gènes *nod* bactériens, qui codent pour les facteurs de nodulation Nod (Perry et *al.*, 2004). La formation des nodules est initiée par l'infection du tissu méristématique par ces bactéries d'origine environnementale. Cet organe se compose en son centre de cellules hébergeant les symbiotes qui forment la zone infectée, puis d'une couche cellulaire périphérique très dense de petites cellules qu'on appelle la couche limite. Cette couche étant très peu perméable à l'oxygène, les concentrations en O₂ dans la zone infectée sont très faibles (<1µM) (Halary, 2009).

L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui bien connue. Les étapes sont (Figure 4) :

- Reconnaissance de part et d'autre du bon partenaire (compatible), puis attachement de la bactérie au niveau des poils absorbants ;
- Excrétion de facteur Nod par la bactérie ;
- Invasion des poils absorbants par les bactéries ;
- Formation d'un cordant d'infection et transfert vers le cortex racinaire ;
- Transformation des cellules bactériennes en bactéroïdes à l'intérieur des cellules végétales et développement de l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique ;
- Prolifération des bactéroïdes qui s'accompagne d'une division mitotique des cellules corticales intense chez la plante et conduisant à la formation de nodosités racinaires fonctionnelles (Madigan et Martinko, 2007).

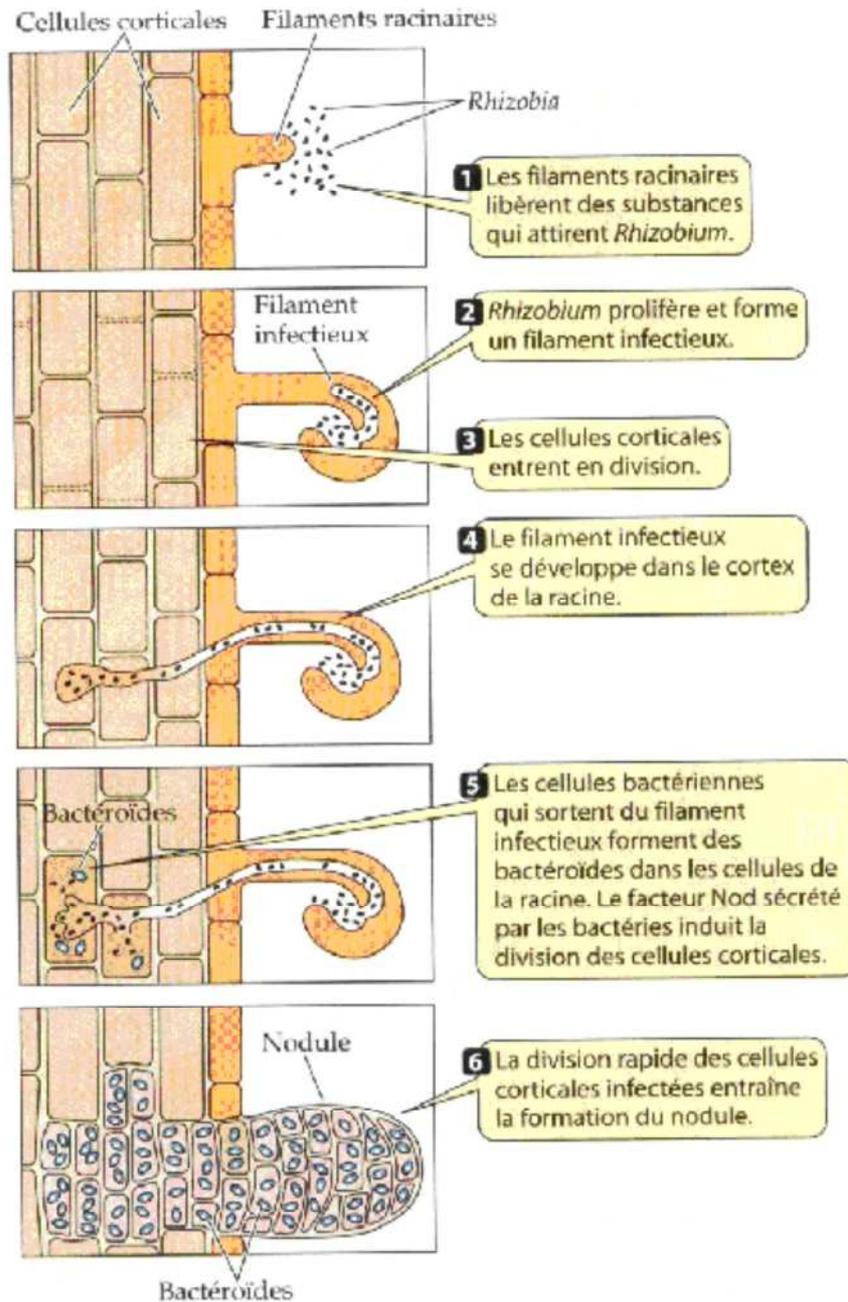


Figure 4: Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre rhizobium et une plante (Perry et al., 2004).

Le processus de nodulation est contrôlé par les gènes de la bactérie et de la plante-hôte. Divers mécanismes permettent l'expression des gènes : par exemple certains gènes ne sont activés qu'en présence de flavonoïdes synthétisés par la plante. La leghémoglobine (*leg* pour légumineuse) est codée à la fois par la plante (la protéine liée à l'hème) et le rhizobium (l'hème proprement dite) (Guignard, 2000).

3-1- Les mécanismes moléculaires de la symbiose et de la nodulation

L'initiation du développement nodulaire implique une reconnaissance moléculaire des deux partenaires symbiotiques. Ainsi, des flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression de gènes bactériens, dits gènes *nod*, à l'origine de la synthèse et de l'exportation de composés lipochito-oligosaccharidique : les facteurs Nod (Vernie, 2008).

Les facteurs Nod déterminent la spécificité d'hôte de la symbiose. En effet ces molécules induisent la formation des nodosités sur les racines de la plante-hôte (Zakhia et de Lajudie, 2006).

3-1-1- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux : on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guignard, 2000).

La spécificité des interactions plantes-rhizobium est en partie liée à la diversité des flavonoïdes produits. Les flavonoïdes exsudés sont en effet un mélange d'inducteurs, faibles et forts, ainsi que d'inhibiteurs des gènes *nod*, et de composés inactifs. L'induction de la symbiose dépend de l'effet global de ce mélange (Heller et *al.*, 2000).

3-1-2- Les facteurs Nod

Les facteurs Nod, produits par les rhizobiums en réponse à la présence d'une plante hôte, sont des molécules diffusibles synthétisées et secrétées spécifiquement au cours de l'établissement de la symbiose (Godfroy, 2008).

Tous les facteurs Nod décrits sont constitués d'un squelette de 3 à 6 résidus N-acétyl-D-glucosamine, substitué par une chaîne d'acyl au niveau de l'extrémité non réductrice et portant divers motifs structuraux aux deux extrémités de la chaîne oligosaccharidique (Figure 5).

La nature de l'acide gras et des autres décorations dépend de la souche ou de l'espèce de rhizobia (Denarié et *al.*, 1996).

Devant la multitude de gènes *nod* décrits chez les différents genres de rhizobia, la nomenclature s'est élargie aux terminologies *nol* et *noe* (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Les gènes *nod* peuvent être classés en trois catégories ; les gènes *nod* régulateurs, les gènes *nod* communs, et les gènes *nod* spécifiques (Munive Hernandez, 2002).

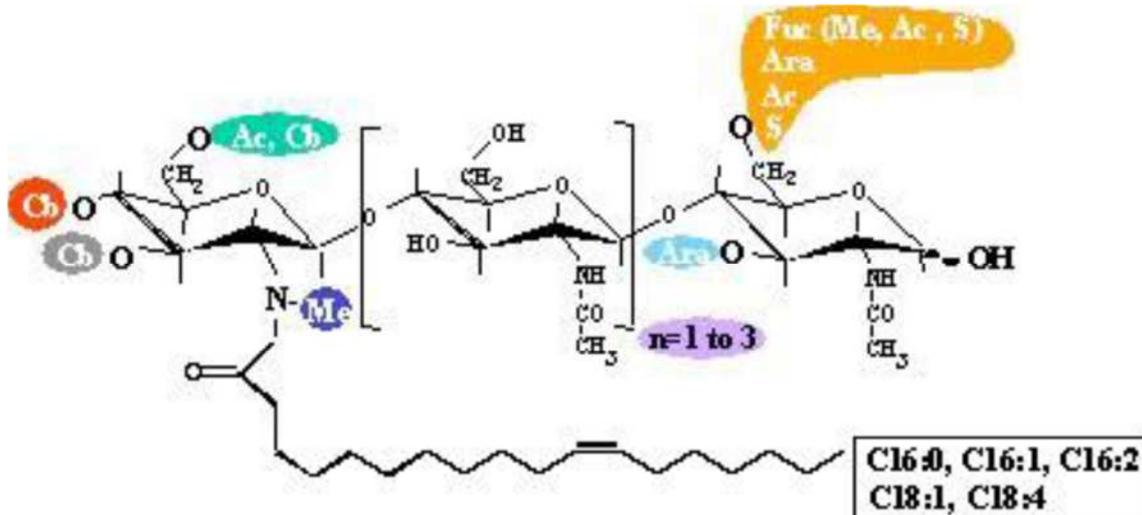


Figure 5: Structure chimique des facteurs Nod (Cullimore et al., 2001).

Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques substitutions observées chez les différentes espèces de rhizobia indiquées en couleur. Les variations les plus courantes de la chaîne d'acides gras sont également représentées. **Ac**, acétyl ; **Ara**, arabinosyl ; **Cb**, carbonyl ; **Fuc**, fucosyl ; **Me**, méthyl ; **S**, sulfuryl

Les gènes *nod* sont très conservés dans les espèces de rhizobium. Ces gènes sont localisés sur les grands plasmides *Sym*. Ces plasmides portent les gènes de spécificité définissant le spectre d'hôte restreint d'une souche de rhizobium. Cette spécificité peut être transmise d'une souche d'un groupe d'infection croisée à une autre par le plasmide *Sym*. (Perry et al., 2004).

Les gènes *nodABC* sont des gènes appelés « *nod communs* » car ils sont présents dans l'ensemble des rhizobia. Ces gènes, structurellement et fonctionnellement équivalents chez les différentes espèces de rhizobia, sont responsables de la synthèse de la structure de base des facteurs Nod (Munive Hernandez, 2002).

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES NODULANT

Hedysarum coronarium L.

1- MATERIEL

1-1- Les sols

Les sols utilisés pour piéger les bactéries nodulant le genre *Hedysarum* proviennent de 03 régions situées dans le Nord-Est d'Algérie (Figure 6).



Figure 6 : Localisation géographique des différentes stations de prélèvement des échantillons de sol

Les principales caractéristiques géomorphologiques et climatiques de ces régions sont consignées dans le Tableau III.

Tableau III: données climatiques des stations

Codes	Coordonnées des Stations	Altitude (m)	Pluviométrie (mm/an)	Climat
S11	• Béjaia (Targa Ouzemmour) 36°45'N, 5°02'E	09	783 à 900	Sub-humide, hivers frais
S18	• Tizi-Ouzou ville 36°43'N, 4°03'E	208	500-800	Chaud et sec en été; Humide et assez froid en hiver
S40	• Sétif (Bougaâ) 36°19'N, 5°05'E	1054	700	Semi-aride, chaud en été et froid en hiver

1-2- Le matériel végétal

Pour l'étude de la symbiose Rhizobia-légumineuse, nous avons utilisé les graines d'*Hedysarum coronarium* L. Ces graines, extraites à partir de leurs gousses, nous ont été fournies par l'INRA de Oued Ghir de Béjaïa.

Les semences de cette légumineuse se caractérisent par leur morphologie réniforme ou discoïde avec un tégument lisse et luisant, de couleur jaune claire et parfois noire, de longueur d'environ 3 à 4 mm (Figure 7).



Figure 7 : photos des gousses et des graines d'*Hedysarum coronarium* utilisées

1-3- Les milieux de culture

- Milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) : ce milieu est utilisé pour l'isolement et la culture des souches isolées à partir des nodules d'*Hedysarum coronarium*. Sa composition est la suivante : Mannitol : 10g ; Extrait de levure : 0,4g ; K_2HPO_4 : 0,5g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 0,2g ; NaCl ; 0,1g ; Agar ; 15g et eau distillée : 1000ml. Le pH est ajusté à 6,8. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 mn (Vincent, 1970).

Pour faciliter les procédures d'isolement des souches de rhizobia, le milieu YEMA est additionné de 10 ml d'une solution aqueuse de rouge Congo à 0.25%.

- Milieu Fahraëus : ce milieu est utilisé pour la culture des graines d'*Hedysarum coronarium* afin de préparer les plantes axéniques. Sa composition est la suivante :

Macroéléments : KH_2PO_4 : 0,1g ; NaH_2PO_4 : 0,15g ; CaCl_2 : 0,1g ; $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})$: 0,12g ; $\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})$: 5mg ; 1 ml d'oligoéléments qui contient en g/l d'eau distillée (H_3BO_3 : 2,86 ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 2,08 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,22 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,08 ; Na_2MoO_4 : 0,11), Eau distillée : 1000ml. Le pH est ajusté à 6,8. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 mn.

- Milieu MSY (Mannitol Salt Yeast) : ce milieu est utilisé pour la purification des isolats et pour d'autres tests, sa composition par litre d'eau distillée est la suivante : Mannitol: 1g ; Extrait de levure: 1g ; KH_2PO_4 : 300mM ; Na_2HPO_4 : 300mM ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 100mM ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 50mM ; H_3BO_3 : 10mM ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1mM ; FeCl_3 : 1mM ; MnCl_2 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.5mM ; Biotine: 0.2mM ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.1mm. Le pH du milieu est ajusté à 6.8, puis stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 mn (O'Gara et Shanmugam, 1976).
- Milieus prêts à l'emploi: commercialisés par l'Institut Pasteur d'Alger, ces milieux sont utilisés pour l'identification biochimique des bactéries. Il s'agit de : Clark et Lubs, Citrate de Simmons, Bouillon nitraté, Moller, MEVAG

2- METHODES

2-1- ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES SOLS

Les prélèvements des sols ont été effectués pendant le mois de novembre de l'année 2011. Les caractéristiques physico-chimiques des 03 sols retenus pour piéger les bactéries nodulant *Hedysarum coronarium* ont été déterminées par le laboratoire de biologie des sols de l'université de Béjaïa et par le laboratoire de pédologie de l'INRAA de Oued Ghir de Béjaïa. Les échantillons de sols destinés à l'analyse physico-chimique sont soumis à différents traitements:

- séchage à l'air libre;
 - réduction des mottes de telle sorte à ne pas détruire les agrégats du sol ;
 - tamisage sur tamis à mailles carrées de 2mm ;
 - mise en sachet plastique (terre fine).
-
- *Analyse granulométrique*

Chapitre II : Matériel et Méthodes

La texture des sols a été déterminée par la méthode internationale à la pipette de ROBINSON, dont le protocole se résume en trois étapes suivantes :

- Destruction de la matière organique par l'eau oxygénée (H_2O_2) à 20 volumes.
- Dispersion des agrégats par le pyrophosphate de sodium à 40%.
- Remise en suspension, prélèvement après un temps de sédimentation des particules fines (argiles et limons), et récupération des fractions grossières de diamètre $>50\mu m$ (Sables grossiers, Sables fins, Limons grossiers) par tamisage après élimination des fractions fines (Argiles + Limons fins) par une série de siphonage.

La détermination de la texture se fait par la projection des pourcentages des différentes fractions sur le triangle des textures (U.S.D.A).

- *Mesure du pH*

L'acidité de sol a été déterminée à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre préalablement étalonnée. La réaction de sol est déterminée sur une suspension aqueuse, dans lequel le rapport pondéro-volumétrique sol/eau est de 1/2.5. Deux types de mesures ont été effectués:

- dans l'eau : pH_{H_2O}
- dans une solution de KCl 1 mol/L : pH_{KCl}

- *Dosage du carbone organique*

Les teneurs en carbone organique des sols sont déterminées par la méthode ANNE modifiée. Après oxydation à chaud du carbone de la matière organique en CO_2 par un mélange de bichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$ (8%) et l'acide sulfurique concentré H_2SO_4 , en présence de NaF et de diphénylamine. Le bichromate en excès est titré à froid par une solution réductrice de sels ferreux (Sel de Mohr à 0.2N).

Le taux de la matière organique des sols est déduit en multipliant le pourcentage du carbone organique par un facteur de 1,72. **$\%MO = \%C \times 1,72$.**

- *Dosage de l'azote total*

Le dosage de l'azote total des sols est effectué selon la méthode Kjeldahl, dans lequel l'azote des composés organiques est transformé en azote ammoniacal sous l'action de l'acide sulfurique concentré à ébullition, en présence d'un catalyseur renfermant du sélénium.

Lorsque la matière organique est entièrement oxydée, la solution de sulfate d'ammonium obtenue est récupérée et on procède ensuite au dosage. L'ammoniac est déplacé de la combinaison par la soude, distillé et récupéré dans une solution d'acide borique. Il est titré avec une solution d'acide sulfurique de normalité connue.

- *Dosage du calcaire total*

Pour le dosage du calcaire total on a appliqué la méthode gazométrique, à l'aide d'un appareil appelé calcimètre de Bernard. Le carbonate de calcium se décompose sous l'action de l'acide chlorhydrique (HCl dilué au 1/2). Le gaz carbonique (CO₂) dégagé est recueilli dans un tube gradué et son volume ainsi facilement mesuré.

- *Dosage du calcaire actif*

Nous avons utilisé la méthode Drouineau-Galet pour les teneurs en CaCO₃ actif supérieures à 13 %. La détermination du calcaire actif concerne la fraction fine du calcium des carbonates qui est précipitée par une solution d'oxalate d'ammonium. Dosage de l'oxalate d'ammonium résiduel par du permanganate de potassium en milieu sulfurique.

2-2- **PIEGEAGE ET ISOLEMENT DES BACTERIES DES NODULES D'*Hedysarum coronarium* L.**

2-2-1- *Culture d'*Hedysarum coronarium* en pot*

Afin de piéger les bactéries nodulant *Hedysarum coronarium* L., des graines de cette légumineuse ont été semées dans des pots en plastique (H= 25cm ; Ø= 15cm) contenant 2 kg de sol. Chaque sol a été semé à raison de 10 semences par pot (Figure 8).

La culture des plantes a été effectuée durant 3 mois (du 06 décembre 2011 au 04 mars 2012), dans des conditions de température et de luminosité du laboratoire.

Les plantes ont reçu un arrosage régulier pendant 3 mois.



Figure 8: culture en pots d'*Hedysarum coronarium* L. sur les sols de Béjaia, Tizi-Ouzou et Sétif.

2-2-2- Collecte et stérilisation de nodules

Après trois mois de culture, les plantes d'*Hedysarum coronarium* L., sont déterrées soigneusement où leurs racines sont lavées avec l'eau de robinet et épongées sur du papier absorbant. Les nodules ne montrant pas une altération structurale sont séparés à 2 mm du site d'attache (Figure 9).

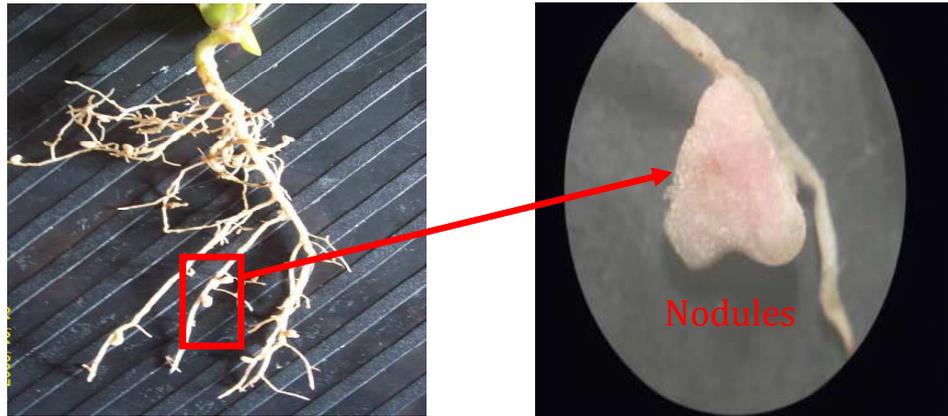


Figure 9: nodules des racines d'*Hedysarum coronarium* L. ayant servi à l'extraction des rhizobia.

- Stérilisation des nodules

Les nodules sont successivement trempés dans de l'éthanol à 95% durant 30 secondes, puis dans de l'eau de javel 5° pendant 3 minutes, suivi par une série de rinçage à l'eau distillée stérile pour éliminer toutes traces de l'eau de javel.

- Extraction et purification des isolats bactériens

Les bactéroïdes sont alors extraits en conditions d'asepsie par écrasement de 1 à 2 nodules à l'aide d'une tige en verre stérile dans des tubes Ependorff contenant 0,5 ml d'eau physiologique stérile. A partir du broyat ainsi obtenu, des boîtes de pétri contenant le milieu YEMA additionné de rouge Congo sont ensemencées. Après 24 heures à quelques jours d'incubation à 28°C, les colonies ayant absorbées peu ou pas le rouge Congo et d'aspect muccoïdal, sont purifiées par des repiquages successifs sur des boîtes de pétri contenant le même milieu sans rouge Congo jusqu'à obtention des isolats purs.

- Conservation des souches

Les souches ainsi purifiées sont conservées à + 4°C sur tube de gélose incliné contenant le milieu YEMA additionné de 3g/l de CaCO₃ pour la suite de l'étude.

2-3- AUTHENTIFICATION DES ISOLATS

Le seul critère fiable et reconnu, établissant l'appartenance d'un isolat à la famille des *Rhizobiaceae*, est sa capacité à noduler sa plante-hôte. Ainsi, tous les isolats obtenus ont été testés en les inoculant à leur plante-hôte d'origine cultivée sur le milieu Fahraëus

2-3-1- Préparation des plantes axéniques

- Stérilisation des graines

Les graines d'*Hedysarum coronarium* ont été scarifiées à l'aide du papier verre pour perforer le tégument, puis stérilisées par passage successifs dans les solutions suivantes :

- Ethanol à 95%, durant 30 secondes;
- Solution d'hypochlorite de sodium (5°) pendant 3 minutes ;
- Rinçage abondant à l'eau distillée stérile.

Les graines ainsi traitées sont mises à germer, à l'obscurité et à une température optimale de 20°C, dans des boîtes de pétri contenant de la gélose molle stérile à 0,8% (Figure 10).



Figure 10: Germination des graines d'*Hedysarum coronarium* L. utilisées pour le test d'authentification

- Germination des graines et obtention des plantes axéniques

Après germination des graines, les germinations non contaminées sont transférées aseptiquement dans des tubes Gibbons contenant le milieu Fahraëus semi solide stérile, à raison d'une plantule par tube. Les tubes sont bouchés avec du coton cardé et la partie

racinaire est recouverte avec du papier aluminium afin de leur assurer l'obscurité nécessaire (Figure 11).

2-3-2- Inoculation des plantes

Après 3 à 4 jours de germination dans les conditions ambiantes de température et de luminosité du laboratoire, les plantules en tubes sont inoculées avec 2 ml d'une suspension bactérienne de chacun des isolats bactériens testés. On prévoit un tube témoin non-inoculé (T0) et un tube témoin non azoté (TN). Les tubes inoculés et témoins sont maintenus dans les conditions ambiantes du laboratoire durant tout le déroulement des tests de nodulation. Après une semaine de culture en tubes, les plantes inoculées sont régulièrement contrôlées pour détecter la formation des nodules.



Figure 11 : Dispositifs de germination utilisés pour le test d'authentification des isolats.

2-4- CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET CULTURALE DES ISOLATS

2-4-1- Examens macroscopiques

La forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect de la surface, l'élévation ainsi que la mucoïdité des colonies, ont été déterminées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YEMA ou le milieu MSY solide après 48 heures d'incubation à 28°C pendant.

2-4-2- Examens microscopiques

La forme, la mobilité et la présence des poly- β -hydroxybutyrate (PHB) des cellules bactériennes ont été déterminées par observation au microscope optique, à l'état frais d'une suspension bactérienne âgée de 48 heures.

Les souches isolées ont été examinées afin de déterminer le Gram. A cet effet, nous avons utilisé la technique classique qui consiste à :

- préparer un frottis sur une lame
- recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- verser sur la lame la solution iodée et laisser agir pendant 30 secondes.
- décolorer la lame en laissant tomber goutte à goutte l'alcool-acétone.
- laver à l'eau distillée.
- recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 minute.
- laver à l'eau distillée.
- observer au microscope (G x100).

2-5- CARACTERISATION BIOCHIMIQUE

2-5-1- Tests biochimiques et recherche de certains enzymes

Détermination du type du métabolisme

La mise en évidence du type de métabolisme de nos bactéries est effectuée sur milieu MEVAG contenant du glucose comme seule source de carbone et d'énergie. Les tubes sontensemencés par piqure centrale chargée d'une culture âgée de 48 heures, prélevée à partir du milieu MSY solide. Une série de tubes ainsi inoculés ont été recouverts avec 1 ml de vaseline stérile (fermé) et l'autre série de tubes ont été restés ouverts (sans vaseline). L'ensemble des tubes sont incubés à 28°C pendant 48 h à 72 heures. Pour chaque sérieensemencée, on prévoit un tube témoin qui n'est pasensemencé. Les résultats se traduits comme suit:

- Bactéries fermentatives : acidification rapide dans les deux milieux qui deviennent jaune.
- Bactéries oxydatives : pas d'acidification dans le tube fermé et une acidification modérée et assez lente dans le tube ouvert.

Activité catalasique

La recherche de la catalase est effectuée par une technique simple qui consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et à dissocier directement un peu de la culture à étudier, prélevée sur milieu MSY solide. La présence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat de bulles gazeuses.

- *Activité oxydasique*

La recherche de l'oxydase est effectuée en ajoutant un disque d'oxydase à une suspension épaisse de bactéries en eau physiologique. Le résultat positif se traduit par l'apparition d'une couleur rose en 1 mn environ.

- *Recherche de la β -Galactosidase*

La recherche de la β -Galactosidase est effectuée selon le test des disques ONPG. Dans 0,5 ml d'eau physiologique contenant une suspension bactérienne dense, on ajoute un disque d'ONPG. Après 30mn d'incubation à 28°C, une réaction ONPG⁺ lorsque la suspension se colore en jaune citrin et une réaction ONPG⁻ lorsque la suspension ne se colore pas.

- *Réduction des nitrates*

Des tubes de bouillon nitraté sont ensemencés par des précultures de bactéries de 48 heures. Après incubation à 28°C et sous agitation, 5 gouttes de réactif NR1 et 5 gouttes de réactif NR2 ont été ajoutées au milieu. La présence des nitrates se manifeste par le virage du milieu au rose ou au rouge. Le milieu reste incolore est additionné d'un peu de poudre de zinc.

- Si le milieu devient alors rose ou rouge : nitrate-réductase négative (NR-)
- Si le milieu reste incolore : nitrate et nitrite réductase positive (NR++).

- *Utilisation du citrate comme seule source de carbone*

La mise en évidence de l'utilisation du citrate est effectuée sur milieu citrate de Simmons incliné. La pente du milieu est ensemencée par stries longitudinales à partir d'une culture de 48 heures prélevée sur milieu MSY. Après incubation à 28°C pendant 48 heures, l'utilisation du citrate se manifeste par l'alcalinisation du milieu (coloration bleue du milieu).

- *Recherche de l'acétoïne et production d'acide*

Afin de déterminer la capacité de nos souches à acidifier ou à alcaliniser le milieu, nous avons procédé à la recherche de l'acétoïne et la mise en évidence de la production d'acide. Ces caractères ont été étudiés en milieu Clark et Lubs. Les tubes contenant le milieu ont été inoculés avec des cultures de 48 heures prélevées sur milieu MSY. Après incubation à 28°C sous agitation pendant 48 heures, on prélève successivement dans deux tubes à hémolyse, 1 ml de culture puis on ajoute 0,5 ml du réactif VP1 et 0,5 ml du réactif VP2 dans le premier

tube, et dans le deuxième tube 2 ml de culture dans lequel on ajoute quelques gouttes de la solution de rouge de méthyle. Les résultats se traduisent par :

- VP+ : coloration rouge cerise
- VP- : coloration jaune citrin ou rose pâle
- RM+ : teinte rouge
- RM- : teinte jaune

- *Mise en évidence des décarboxylases et des déshydrogénases (ODC, LDC, ADH)*

La recherche des décarboxylases et des déshydrogénases est effectuée en milieu Möller (LDC, ODC, ADH) renfermant un seul acide aminé. Ces milieux sont répartis à raison de 1ml/ tube à hémolyse stérile, puisensemencés par une suspension bactérienne âgée de 48 heures, ces tubes sont incubés à 28°C pendant 48 heures. Le résultat positif se traduit par le virage du milieu au violet et le résultat négatif se manifeste par le virage du milieu au jaune.

- *Utilisation des sucres comme seule source de carbone*

L'utilisation des sucres comme seule source de carbone et d'énergie a été étudiée sur boîte de pétri contenant le milieu MSY solide additionné de bleu de bromothymol (BTM), où l'extrait de levure est remplacé par le NH_4Cl (1g/l) et le mannitol par le sucre à étudier. Les sucres testés sont ajoutés au milieu à une concentration finale de 1%, il s'agit de : Mannose, Lévuose, Cellobiose, Rhamnose, Xylose, Galactose, Inositol, Lactose, Adonitol, Tréhalose, Glycérol, Maltose, Sorbose, Saccharose, Sorbitol, Arabinose, Amidon, Glucose, Raffinose et Salicine. Les souches ont été ensemencées par spots et incubées à 28°C pour 48 heures. L'utilisation des sucres comme seule source de carbone est estimée par l'apparition des colonies bactériennes et le virage du milieu du vert vers le jaune indiquant l'acidification du milieu.

2-5-2- Etude de la croissance des isolats

La croissance des souches a été évaluée dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu MSY liquide. Les tubes ont été ensemencés par des précultures préparées dans le même milieu de chacune des souches. L'ensemencement a été réalisé de manière à obtenir une DO initiale dans les tubes de 0,01. Les tubes ont été incubés à 28°C sous agitation pendant 72 heures. La croissance est estimée par mesure de la densité optique à 570nm à des intervalles de temps différents.

Le temps de génération (**G**) des souches a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\mathbf{G} = 0,693/\mathbf{K} \quad , \quad \mathbf{K} = \frac{\mathbf{Ln DO}_f - \mathbf{Ln DO}_i}{\mathbf{t}_f - \mathbf{t}_i}$$

Avec : **DO_f** : Densité optique finale ; **DO_i** : Densité optique initiale ; **t_f-t_i** : Intervalle de temps

2-6- CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE

2-6-1- Tolérance au NaCl

L'effet de la salinité sur la croissance des bactéries a été étudié dans des tubes à essai contenant 10 ml du milieu MSY liquide (pH 6,8), additionné de quantités croissantes en NaCl : 0, 250, 500, 750 et 1000 mM. Les cultures ont été incubées à 28°C sous agitation pendant 72 heures et la croissance est estimée par mesure de la densité optique à 570nm.

2-6-2- Effet de pH

L'étude de l'effet du pH sur la croissance des bactéries a été réalisée sur milieu MSY liquide, ajusté à des pH allant de 4 à 10 par des solutions HCl (0,1 N) et de NaOH (0,1 N). Les tubes contenant 10ml du milieu sont inoculés par une suspension bactérienne et incubés à 28°C sous agitation pendant 72 heures. La croissance des bactéries a été évaluée par mesure de la densité optique à 570nm.

2-6-3- Résistance aux antibiotiques

Ce test est réalisé sur milieu MSY solide coulé dans des boîtes Pétri. Pour chaque souche testée, 2 boîtes de Pétri sontensemencées par inondation avec une préculture de 48 heures. Après élimination de l'excès du milieu, chaque boîte de Pétri est subdivisée en 4 secteurs au niveau desquels les différents antibiotiques sont déposés. La présence ou l'absence des zones d'inhibition sont observées après 48 heures d'incubation à 28°C. Les antibiotiques testés sont : Tétracycline (30UI), Oxacilline (54µg), Streptomycine (10UI), Gentamycine (10µg), Pénicilline (10UI), Kanamycine (30UI), Cefalexine (30µg) et Ampicilline (10µg).

La sensibilité et la résistance de nos souches aux antibiotiques sont déterminées selon les recommandations établies par la Société Française de Microbiologie (2010).

2-7- ANALYSE NUMERIQUE

Afin de situer le degré de rapprochement et de regroupement de nos souches, les données des résultats de l'ensemble des tests phénotypiques étudiés ont été soumises à une analyse numérique. Ainsi, les caractères étudiés ont été subdivisés en 03 classes : le caractère indiqué par 0 pour tout résultat négatif (-), par 1 pour tout résultat intermédiaire (\pm) et par 2 pour tout résultat positif (+). La comparaison entre les souches prises deux à deux a été réalisée par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Average). Sur la base de cette méthode, un dendrogramme a été construit à l'aide du logiciel STATISTICA (V.6).

1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les principales caractéristiques physico-chimiques des sols utilisés pour piéger les bactéries nodulant *Hedysarum coronarium* L. sont représentées dans le Tableau (IV).

Tableau IV: Résultats des analyses physico-chimiques des sols étudiés

Paramètres	Bejaïa (S11)	Tizi-Ouzou (S18)	Sétif (S40)
% A	11,28	14,22	4,2
% LF	33,86	28,44	0
% LG	4,28	13,65	7,56
% SF	12,64	19,61	33,19
% SG	37,92	24,03	55,04
Texture	Limono-sableuse	limoneuse	Sablo-limoneuse
% C	1,2	1,5	0,84
% MO	2,06	2,58	1,44
% N	0,11	0,08	0,08
%CaCO ₃ total	20,8	0,7	10,4
pH eau	7,25	7,0	6,95
pH KCl	7,1	7,0	6,9

%A : Argiles ; %LF : Limons fins ; %LG : Limons grossiers ; %SF : Sables fins ; %SG : Sables grossiers ; %C : Carbone ; %MO : Matière organique ; %N : Azote ; %CaCO₃ : Carbonates de calcium.

D'après le triangle des textures USDA, les résultats de l'analyse granulométrique montrent que la texture du sol de Béjaïa est limono-sableuse, avec des teneurs élevées en limons fins (33,86%) et en sables grossiers (37,92%). Ce type de sol est caractérisé par l'effet de battance et une capacité de rétention en eau relativement élevée. Le sol de Tizi-Ouzou a une texture limoneuse avec des teneurs élevées en limons fins (28,44%) ; ce sol est caractérisé par l'effet de battance, ce qui diminue son aération et sa perméabilité en eau. Enfin, le sol de Sétif a une texture sablo-limoneuse avec des proportions élevées en sables (88,23%), ce type de sol est caractérisé par une très faible capacité de rétention en eau.

Le taux de carbone organique varie d'un sol à l'autre, il est de 1.2% pour le sol de Béjaïa, de 1.5% pour celui de Tizi-Ouzou et de 0,84% pour le sol de Sétif. Le sol de Sétif est

relativement faible en taux de matière organique avec 1,44%, alors que celui de Béjaia et Tizi-Ouzou possèdent des proportions élevées en matière organique avec 2,06% pour Béjaia et de 2,58% pour Tizi-Ouzou.

Tous les sols étudiés présentent un taux relativement faible en azote total (%N<1%), ils sont donc pauvres. Le calcaire est présent en proportions relativement importantes dans le sol de Béjaia avec 20,8%, il est relativement faible dans le sol de Sétif avec 10,4%, alors que celui de Tizi-Ouzou est très pauvre avec une proportion de 0,7%.

Les valeurs de pH mesurées sont situées entre 6,9 et 7,1, ce qui signifie que le sol de Béjaia neutre à légèrement alcalin, alors que ceux de Tizi-Ouzou et de Sétif sont neutres (Soltner, 1988).

2. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant *Hedysarum coronarium* L.

Les nodules racinaires de la plante d'*Hedysarum coronarium*L., obtenus par piégeage à partir des sols prélevés de 03 stations de Centre-Est d'Algérie, nous ont permis, après purification par des repiquages successifs sur milieu YMA + Rouge Congo, d'isoler 19 souches bactériennes. Cette collection d'isolats bactériens est constituée de 10 souches isolées de *H.coronarium* du sol de Béjaia, 03 souches isolées de *H.coronarium* du sol de Tizi-Ouzou, et 06 souches isolées de *H.coronarium* du sol de Sétif (Tableau V).

Tableau V : Résultats du test d'authentification

Stations	Plante hôte	Nombre d'isolats	Nombre d'isolats Nod ⁺	Code d'isolatsNod ⁺
Bejaia (S11)	<i>Hedysarum coronarium</i>	10	08	BB1, BB2, BB3, BB4, BB5, BM1, BM3, BM4
Tizi-Ouzou (S18)	<i>Hedysarum coronarium</i>	03	03	TM, TB1, TB2
Sétif (S40)	<i>Hedysarum coronarium</i>	06	05	SB1, SB2, SB3, SB4, SM2

Afin d'établir l'appartenance de ces isolats à la famille des *Rhizobia*, des tests de nodulation ont été effectués sur leurs plantes-hôtes d'origine. Seules 16 souches ont été capables d'induire la formation des nodules chez leur plante-hôte, indiquant leur appartenance aux bactéries du genre *Rhizobium*.

3. Caractéristiques phénotypiques des rhizobia

Les 16 souches retenues pour la suite de notre travail ont subi une série de tests morphologiques, physiologiques et biochimiques afin d'évaluer leur diversité.

3.1 Caractéristiques morphologiques et cellulaires

3.1.1 Morphologie cellulaire

L'observation microscopique à l'état frais des différentes suspensions bactériennes a montré que toutes les souches ont une forme bâtonnet relativement courts et arrondis à leur extrémité, mobiles et présentent un aspect réfringent qui résulte de la production de granules de poly β -hydroxybutyrate (PHB). Elles sont toutes Gram négatif et aucune d'entre elles ne referme d'endospore ; résultats déjà confirmés par Vincent (1970) et Jordan (1984).

3.1.2 Caractères cultureux

Les colonies des souches étudiées apparaissent sur le milieu YEMA après 24 heures d'incubation à 28°C; cependant, dans le cas des souches BB2 et TB1, elles n'apparaissent qu'à partir de 48 heures.

L'observation macroscopique des cultures sur milieu MSY solide sans rouge Congo (Figure 12), montre que les colonies des souches étudiées sont circulaires ou punctiformes à bord régulier, de taille variable (0,5 à 3 mm de diamètre), d'aspect lisse plus ou moins bombées. Elles sont opaques ou translucides et de couleur blanche claire (Tableau VI).

En milieu YEMA additionné de rouge Congo, les colonies prennent une coloration blanche à rose claire (Figure 13).

Il y a lieu de remarquer une production très abondante à abondante d'exopolysaccharides chez toutes les souches à l'exception de la souche BM4.



Figure 12 : photo montrant l'aspect mucocœdal des colonies sur milieu MSY solide sans rouge Congo

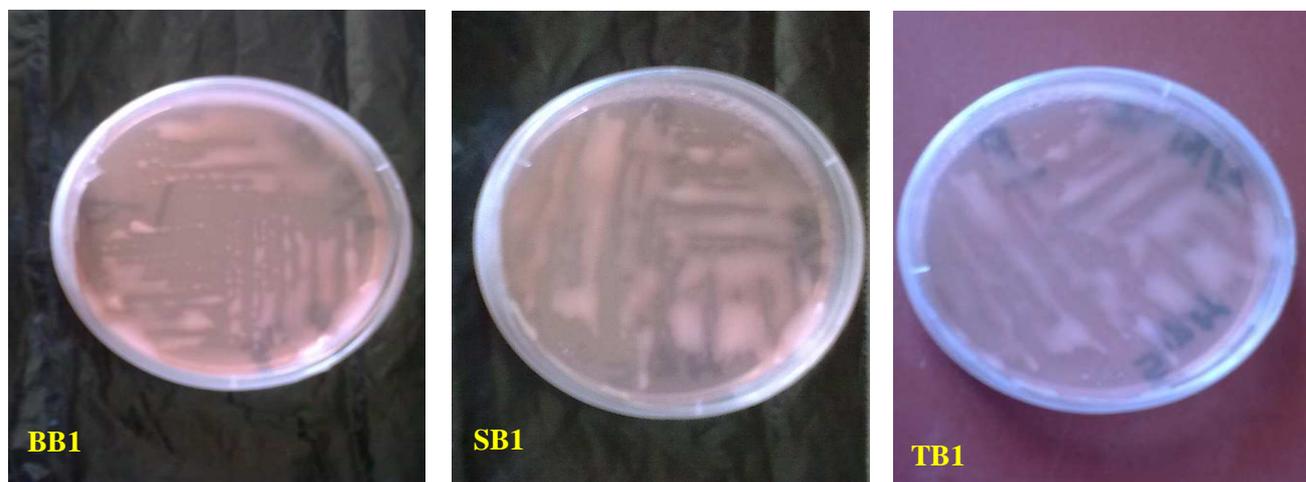


Figure 13 : photo montrant l'aspect mucocœdal des colonies sur milieu YEMA + rouge Congo

Chapitre III : Résultats et Discussion

Tableau VI : Résultats des caractéristiques morphologiques des colonies

Souches	Taille	Forme	Couleur	Mucoïdité	Aspect	Elévation	Contour	Transparence
BB1	0,5 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Opaque
BB2	1 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Opaque
BB3	1,5 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Opaque
BB4	2 à 3	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Opaque
BB5	0,5 à 1	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Opaque
BM1	1 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Peu bombée	Régulier	Translucide
BM3	1 à 2	Circulaire	Blanche Claire	+	Lisse	Peu Bombée	Régulier	Translucide
BM4	0,5	Punctiforme	Beige claire	-	Lisse	Peu Bombée	Régulier	Opaque
TM	1 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Translucide
TB1	1 à 1,5	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Translucide
TB2	1 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Peu Bombée	Régulier	Opaque
SB1	1,5 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Bombée	Régulier	Translucide
SB2	1,5 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Peu Bombée	Régulier	Translucide
SM2	0,5 à 2	Punctiforme	Blanche Claire	+	Lisse	Peu bombée	Régulier	Translucide
SB3	1,5 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Peu Bombée	Régulier	Opaque
SB4	1 à 2	Circulaire	Blanche Claire	++	Lisse	Peu Bombée	Régulier	Opaque

(++) : Très abondante, (+) : Abondante, (-) : Absence

3.2 Caractéristiques biochimiques

3.2.1 Paramètres de croissance bactérienne

Les résultats du tableau (VII) montrent que toutes les souches possèdent un temps de génération long situé entre 3 et 25 heures. Ces résultats montrent que nos souches sont à croissance lente à l'exception de deux souches TM et SM2 avec un temps génération le plus court (2 heures).

Tableau VII: Résultats des paramètres de croissance des rhizobia.

Souches	Temps de génération	Observations
BB1	13 h 4 mn	Croissance lente
BB2	12 h 9 mn	//
BB3	5 h 3 mn	//
BB4	11 h 3 mn	//
BB5	25 h 3 mn	//
BM1	8 h 07 mn	//
BM3	5 h 7 mn	//
BM4	4 h 8 mn	//
TM	2 h 9 mn	Croissance rapide
TB1	7 h 9 mn	Croissance lente
TB2	3 h 4 mn	//
SB1	13 h 5 mn	//
SB2	6 h 09 mn	//
SM2	2 h 6 mn	Croissance rapide
SB3	4 h 5 mn	Croissance lente
SB4	6 h 5 mn	//

C.L : Croissance lente, C.R : Croissance rapide.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Kishinevsky et *al.*, (2003) qui ont montré que certains rhizobia isolés de *H. spinosissimum* ont un temps de génération limité entre 6,5 et 8 heures et les rhizobia isolés de *H. coronarium* ont un temps de génération situé entre 2 et 4 heures.

3.2.2 Mise en évidence de quelques enzymes

Les souches isolées d'*Hedysarum coronarium* L. présentent toutes une activité catalasique. Par contre, seules les souches (BB1, BB2, BB3, BB5, BM3, TM, TB1, TB2, SB1, SB2 et SB3) ont une activité oxydasique positive. A l'exception des souches (BM3 et BM4), les autres souches montrent une activité réductrice des nitrates, tandis que la souche (SM2) est capable également de réduire les nitrites, elle est donc dénitrifiante. Enfin, toutes les souches possèdent une β -galactosidase à l'exception des souches BM4 et SM2.

3.2.3 Mise en évidence du type de métabolisme

La culture des souches sur milieu MEVAG, contenant du glucose comme seule source de carbone et d'énergie, a permis de déterminer le type de métabolisme de différentes souches. Ainsi, les souches (BB1, BB3, BM1, TB1, SB1, SM2, SB3 et SB4) sont des bactéries oxydatives pures, alors que les souches (BB5, BM3, BM4, TM, TB2 et SB2) sont des bactéries fermentatives et les souches (BB2 et BB4) sont des bactéries aéro-anaérobies

3.2.4 Tests biochimiques

Les résultats du tableau (VIII), indiquent que toutes les souches testées sont incapables de produire le H₂S. A l'exception des souches (BB2, BM4 et SB2), les autres souches sont incapables de produire le gaz. Le citrate n'est utilisé que par deux souches (BB3 et SM2). Enfin, seule la souche (BB1) acidifie le milieu RM⁺.

Toutes les souches isolées possèdent une LDC, elles possèdent également une ODC exceptée la souche (TB1). Enfin, les souches (TB2, SB1, SB2 et SB3) ne possèdent pas d'ADH.

Tableau VIII : Résultats des caractéristiques biochimiques des rhizobia

souches caractères	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5	BM1	BM3	BM4	TM	TB1	TB2	SB1	SB2	SM2	SB3	SB4
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	++	+	+
Nitrite réductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β gal	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
RM	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Oxydase	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-

3-2-5 Utilisation des sucres

L'utilisation des sucres comme seule source de carbone et d'énergie par les différentes souches de rhizobia isolées des nodules d'*Hedysarum coronarium* L. est représentée dans le Tableau (IX).

Tableau IX : Résultats de l'utilisation des substrats carbonés comme seule source de carbone

Souches Sucres	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5	BM1	BM3	BM4	TM	TB1	TB2	SB1	SB2	SM2	SB3	SB4
Mannose	-	-	-	++	-	-	++	-	++	++	++	++	++	-	++	++
Levulose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Cellobiose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Rhamnose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Xylose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+	++	++
Galactose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+	++	++
Inositol	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Lactose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Adonitol	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++	+	-	-
Tréhalose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++
Glycérol	++	++	++	++	++	++	+	-	++	+	++	++	++	++	++	++
Maltose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+	++	++
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Saccharose	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++
Sorbitol	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	-	++	++
Arabinose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	+	++	++	++	-	++	++
Amidon	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Glucose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+	++	++
Raffinose	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	+	++	++
Salicine	-	+	++	++	++	++	+	-	+	-	-	+	-	++	++	++

(++) : Forte croissance, (+) : faible croissance, (-) : absence de croissance.

Toutes les souches montrent une croissance importante avec la plupart des sucres testés, sauf le Sorbose qui n'est assimilé que par la souche (SM2) avec une faible croissance. Il faut noter également que la souche (BM4) présente une faible croissance et n'assimile pas la majorité des sucres. Nos résultats corroborent ceux obtenus par (Struffi et *al.*, 1997), qui ont montré que les rhizobiums sont capables d'utiliser un large spectre de substrats carbonés notamment les monosaccharides, les disaccharides, les polysaccharides et les polyalcools.

Chapitre III : Résultats et Discussion

En accord avec les résultats de Mahdhi et *al.*,(2011), la majorité de nos isolats acidifient le milieu MSY solide + BTM qui s'est traduit par le virage du milieu du vert au jaune après 72 heures à 28°C (Figure 14).



Figure 14: Exemple d'acidification et d'utilisation de sucres chez certaines bactéries

3.3 Caractéristiques physiologiques

3.3.1 Résistance aux antibiotiques

Les résultats présentés dans le tableau (X), indiquent que toutes les souches présentent une résistance à la Gentamycine. Aussi, les souches (BB5, TB2 et SB1) résistent à tous les antibiotiques testés. Pour les autres antibiotiques, certaines souches sont sensibles ou présentent une sensibilité intermédiaire.

Tableau X : Résultats de l'antibiogramme des souches de rhizobia.

Souches \ ATB	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5	BM1	BM3	BM4	TM	TB1	TB2	SB1	SB2	SM2	SB3	SB4
CE	S	SI	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	SI
CN	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TE	S	SI	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	SI	S	SI	R
P	SI	R	R	R	R	SI	R	R	SI	R	R	R	R	R	R	R
K	S	SI	R	R	R	S	S	SI	SI	SI	R	R	R	SI	SI	R
S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	SI	R	R	SI	S	S	SI
OX	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R
AM	SI	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S : sensible, R : résistant, SI : sensible intermédiaire

Nos résultats montrent que la plupart des souches ont une tendance générale à la résistance aux antibiotiques, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Mohammed et *al.*,(2000) ; Maâtallah et *al.*, (2002) qui ont montré que des espèces bactériennes appartenant au rhizobium, étaient capables de manifester une résistance multiple à différents types d'antibiotiques.

3.3.2 Effet du NaCl sur la croissance des rhizobia

Les résultats obtenus (Figure 15) montrent que les souches étudiées présentent une certaine variabilité dans la tolérance aux différentes concentrations de NaCl testées. En effet, la majorité des souches (BB1, BB5, BM4, BM3, TM, SB1, SB4, SB2, SB3 et TB1) ont un optimum de croissance à 250 mM. Cependant, leur croissance diminue progressivement en présence dans le milieu des concentrations élevées en NaCl (supérieures à 250 mM). Certaines souches (BB2, BB3, BB4, SM2, BM1) sont tolérantes au sel et peuvent se multiplier en présence de 500mM de NaCl. Néanmoins, à des concentrations supérieures à 750 mM la croissance de toutes les souches diminue d'une façon drastique. Il y a lieu de remarquer que la croissance des souches (BB1, BB2, BM1 et BM3) est faible par rapport aux autres souches quelque soit l'osmolarité du milieu.

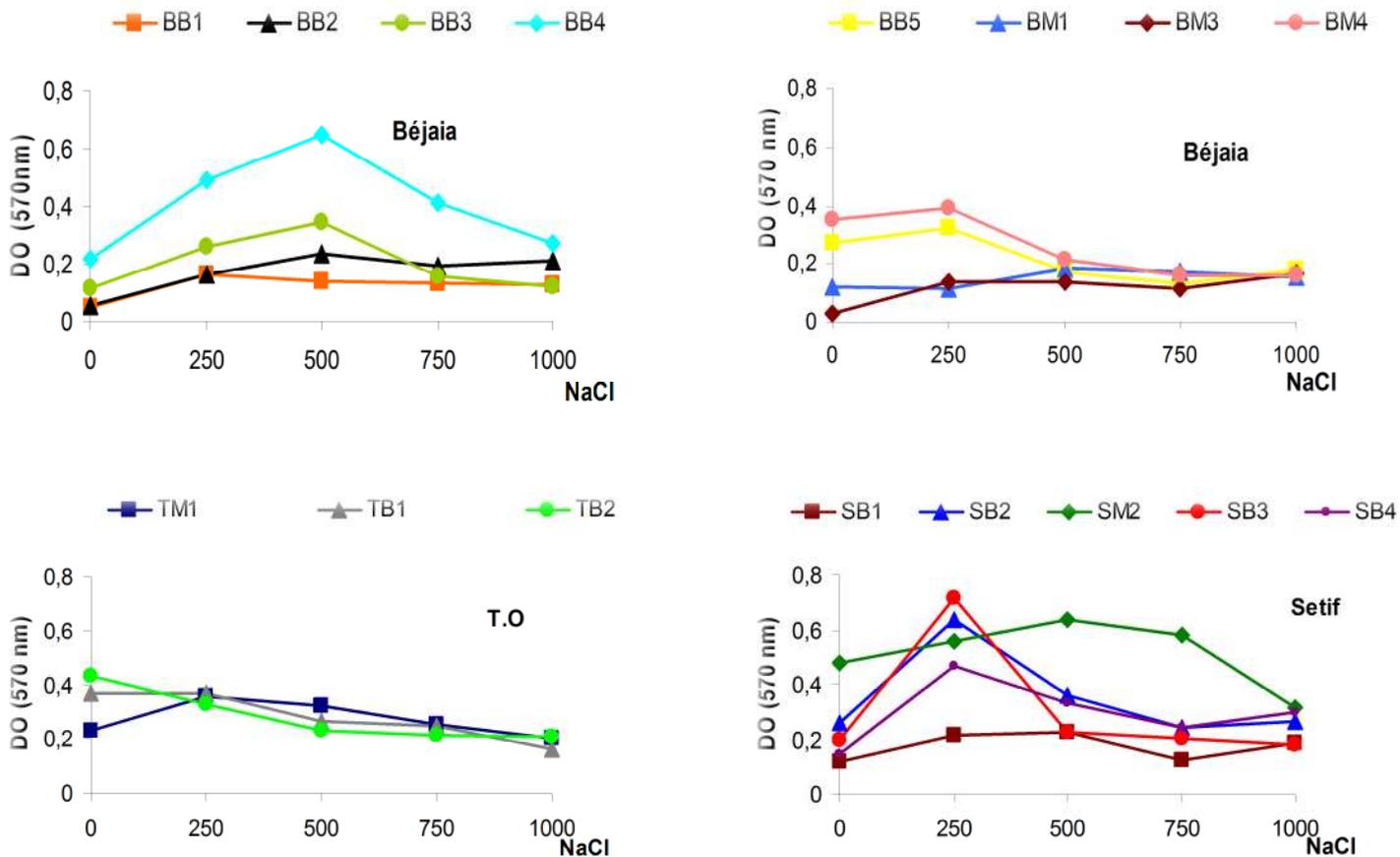


Figure 15 : Effet du NaCl sur la croissance des rhizobia

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Fitouri *et al.*, (2011) qui indiquent que des souches isolées d'*Hedysarum coronarium* L. ont une tolérance limitée entre 150 et 700mM. Cependant, d'autres travaux ont montré que les rhizobia isolés des nodules des légumineuses telles que *Hedysarum*, *Acacia*, *Prosopis*, *Leucaena* semble tolérer des concentrations en NaCl situées entre 500-800 mM. (Mohammed *et al.*, 2000 ; Tilak *et al.*, 2005).

De nombreuses études ont montré que la tolérance des rhizobia à la salinité est plus au moins importante. L'augmentation de l'osmolarité du milieu aux fortes concentrations de NaCl a pour effet un enchainement d'événements qui se traduit par une différence de pression osmotique entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule et une sortie d'eau du milieu le moins concentré vers le plus concentré. En effet, des réponses physiologiques ont été identifiées chez certains rhizobia, parmi elles l'accumulation de la glycine-bétaïne qui joue le rôle d'osmorégulateur (Sauvage *et al.*, 1983, Bernard *et al.*, 1986).

3.3.3 Effet du pH sur la croissance des rhizobia

Les résultats de la Figure 16 montrent une variabilité de sensibilité des isolats aux différents pH. La majorité des souches étudiées tolèrent beaucoup plus les pH basiques que les pH acides. En effet, les souches (BB1, BB2, BB4 et TB1) ont un optimum de croissance à pH 7, les souches (BB3, SB2, SB3 et SB4) ont un optimum de croissance à pH 8 ; alors que la souche (BM4) a un optimum de croissance à pH 9, cette dernière semble mieux tolérer l'alcalinisation du milieu. Certaines souches sont plus au moins sensibles aux pH acides ; en effet, les souches (BM1, TB2 et SB1) ont un optimum de croissance à pH 5, alors que les souches (BB5, BM3, TM et SM2) ont un optimum de croissance à pH 6.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Graham, 1964) qui a montré que les rhizobia ont une croissance optimale compris entre pH6,5 et pH7,5. Toutefois, Jordan (1984) a montré que les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* peuvent tolérer des pH allant de 4,5 à 9.

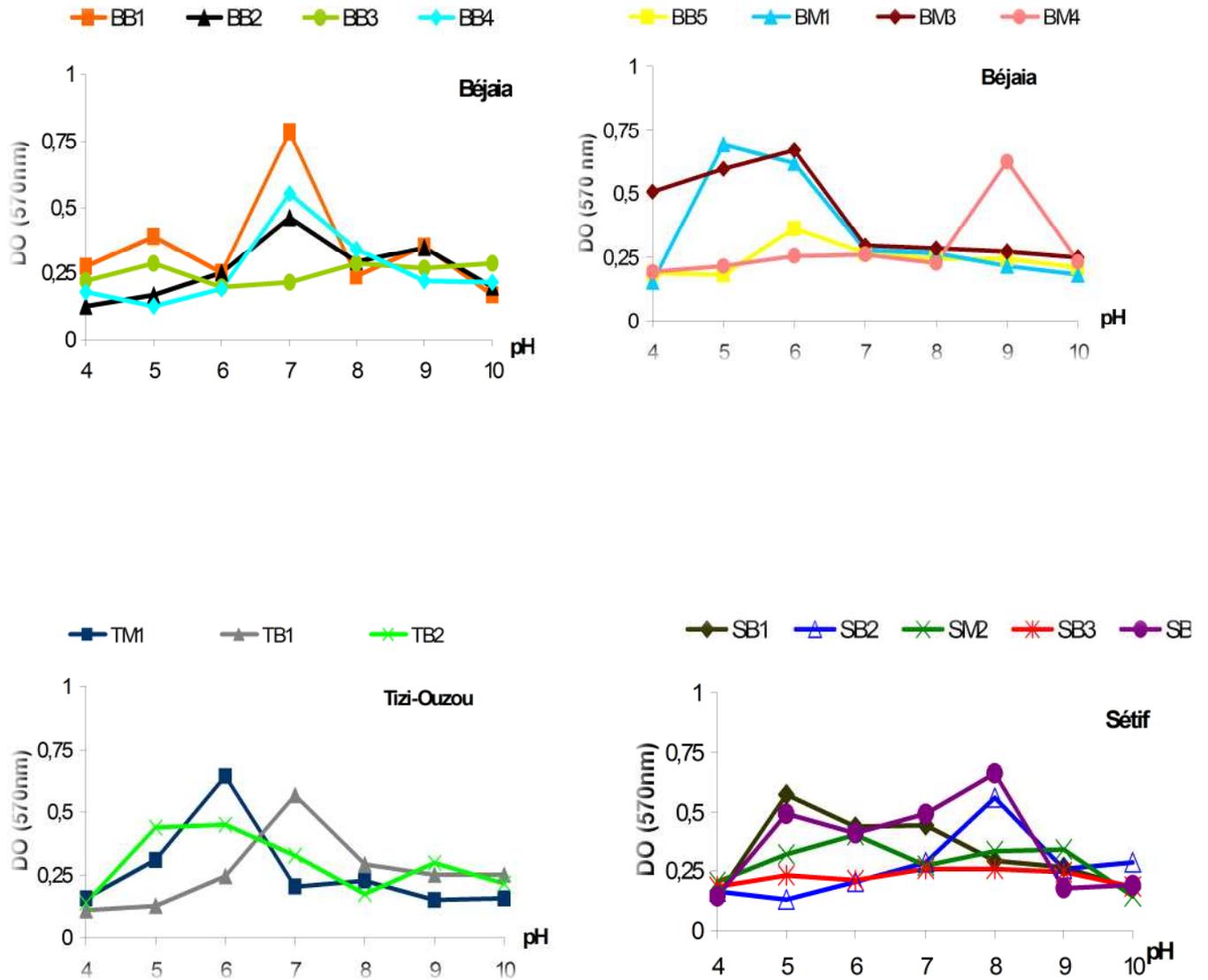


Figure 16: Effet du pH sur la croissance des rhizobia

4- Analyse numérique des caractères phénotypiques

Le dendrogramme obtenu à partir de l'analyse numérique de 63 caractères étudiés montre que la majorité des souches sont très proches car leurs distances euclidiennes sont réduites. Cependant, les 16 souches de rhizobia se répartissent en deux principaux clusters (Figure 17) :

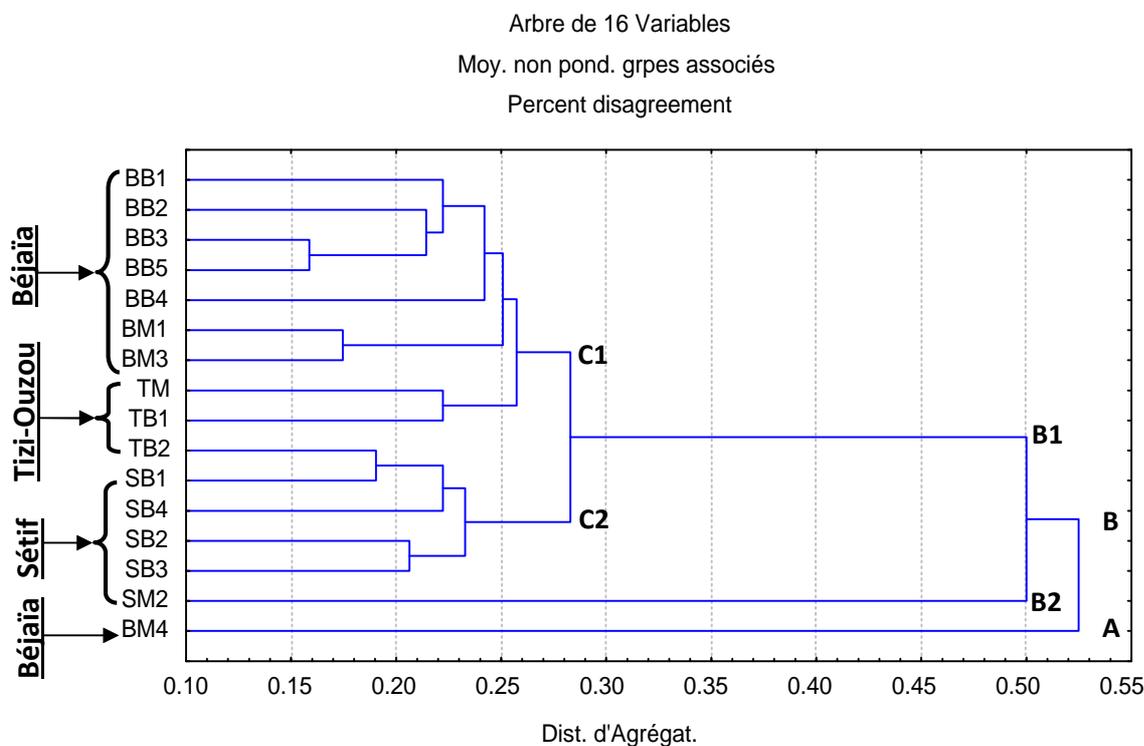


Figure 17 : Dendrogramme des caractères phénotypiques des rhizobia isolées d'*Hedysarum coronarium* L.

Le cluster A, constitué uniquement d'une seule souche BM4 isolée des nodules racinaires d'*Hedysarum coronarium* cultivé sur le sol de Béjaïa. Cette souche se distingue des autres par le fait qu'elle ne secrète pas d'exopolysaccharides et elle n'utilise pas la majorité des sucres comme source de carbone, mise à part 03 sucres l'inositol avec une très faible croissance, le tréhalose et le mannitol avec une bonne croissance. Aussi, elle semble mieux tolérer l'alcalinisation du milieu.

Le cluster B, représenté par les souches (BB1, BB2, BB3, BB5, BB4, BM1, BM3, TM, TB1, TB2, SB1, SB4, SB2 et SB3), lui-même est subdivisé en deux sous clusters B1 et B2.

À une distance d'agrégation de 0.28, le sous cluster B1 se subdivise en deux groupes principaux C1 et C2. Le groupe C1 renferme les souches de Béjaïa (BB1, BB2, BB3, BB4,

Chapitre III : Résultats et Discussion

BB5, BM1, BM3) et deux souches de Tizi-Ouzou (TM et TB1). Notons que les souches BB3 et BB5 sont très proches et ne diffèrent que par 6 caractères, à savoir : Cefalexine, Tétracycline, Streptomycine, Oxacilline, Citrate de Simmons et type de métabolisme. En effet, ces souches sont définies à plus de 84% de similitude.

Le groupe C2 renferme les souches de Sétif (SB1, SB4, SB2 et SB3) et une souche de Tizi-Ouzou (TB2).

Le sous cluster B2 renferme seulement la souche SM2, isolée des nodosités d'*Hedysarum coronarium* cultivée sur le sol de Sétif ; c'est la seule souche qui dégrade le Sorbose comme source de carbone et possède une nitrate et nitrite réductases actives.

Cette analyse montre bien que, à l'exception de la souche BM4, toutes les souches isolées des nodules d'*Hedysarum coronarium* L. restent groupées dans un seul cluster. Ceci reflète un fort indice de similitude.

Aussi, il y'a lieu de signaler le regroupement des souches par leur lieu d'isolement d'origine, ceci serait dû aux conditions pédo-climatiques différentes de ces régions.

L'ensemble des caractères phénotypiques étudiés permettent, sous réserve d'une approche génotypique et phylogénétique, de rattacher la plupart de nos isolats au genre *Rhizobium*, du fait qu'elles induisent la formation de nodules chez leur légumineuse d'origine.

Le présent travail est une contribution à l'étude de la diversité des bactéries nodulant *Hedysarum coronarium* L, cultivée sur des sols provenant de différentes régions du Nord-Est d'Algérie.

Malgré leurs différences pédo-climatiques, les sols utilisés (Béjaïa ; Tizi-Ouzou et Sétif) ont permis une bonne croissance des plantes d'*Hedysarum coronarium* L. et un bon développement des nodules sur leurs racines.

A partir de nodosités de cette légumineuse, nous avons isolé 19 souches bactériennes. Cependant, la ré-inoculation de ces souches à leur légumineuse d'origine, nous a permis d'établir l'appartenance de 16 souches à la famille des *Rhizobiaceae*, du fait qu'elles étaient capables d'induire à nouveau la formation de nodules visibles sur les racines de leur plante-hôte d'origine

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

- Toutes les souches se présentent sous forme de bâtonnet à extrémités arrondies, mobiles et Gram négatif. Elles ont la particularité d'excréter des exopolysaccharides qui confèrent à leurs colonies un aspect muccoïdal.
- A l'exception de deux souches (TM et SM2), toutes les autres souches ont une croissance lente. Elles utilisent une large gamme de sucres sauf le Sorbose qui n'est assimilé que par la souche (SM2).
- Toutes les souches présentent une résistance à la Gentamycine. Cependant, seules les souches (BB5, TB2 et SB1) sont résistantes à tous les antibiotiques testés.
- A l'exception des souches (BB2, BB3, BB4, SM2 et BM1) qui tolèrent des concentrations jusqu'à 500 mM, la croissance des autres souches est largement affectée en présence dans le milieu des concentrations en NaCl supérieures à 250 mM, elles seraient donc non tolérantes.
- Enfin, la majorité des souches étudiées tolèrent les pH basiques que les pH acides ; elles ont un optimum de croissance situé entre pH 7 et pH 9, par contre certaines souches semblent tolérer des pH acides avec un optimum de croissance situé entre pH 5 et pH 6.

L'analyse numérique de l'ensemble des caractères phénotypiques par une C.A.H. effectuée sur nos souches, montre l'existence de deux principaux clusters. La souche BM4 se distingue des autres souches par plusieurs caractères, particulièrement son incapacité à utiliser la

majorité des sucres testés et sa faiblesse à produire les exopolysaccharides et surtout elle possède un optimum de croissance situé à pH9. Elle constitue donc à elle seule un groupe à part ; alors que les autres souches se regroupent dans un seul cluster ce qui indique leur forte similitude

Pour les perspectives, il serait souhaitable de poursuivre ce travail par l'étude d'un maximum de caractères phénotypiques et l'utilisation des techniques de biologie moléculaire combinées à des analyses polyphasiques, afin de déterminer avec précision le statut taxonomique de nos souches.

- Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N. et Guittonneau G.G. 1991.** Répartition des espèces spontanées du genre *Hedysarum* selon certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages* **126** : 187-207.
- Bayer E., Buttler K.P., Finkenzeller X. et Guar J. 2005.** Guide de la flore méditerranéenne: caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. *Edition Delachaux et Niestlé, S.A, Paris.*
- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. et Squartini A. 2004.** Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. *System. Appl. Microbiol.* **27**: 462-468
- Ben jeddi F. 2005.** *Hedysarum coronarium* L. : variation génétique, création variétale et utilisation dans des rotations tunisiennes. *Thèse de doctorat.* Université Gent. Belgique.186p.
- Bernard T., Pocard J.A., Perroud B. et le Rudulier D. 1986.** Variations in the response of salt stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.* **143** : 359-364.
- Calvet R. 2003.** Le sol : propriétés et fonctions. *Edition France Agricole.* P 44-45.
- Chennaoui-Kourda H., Marghali S., Zitouna N., et Trifi-Farah N. 2012.** Phylogenetic relationships of Mediterranean *Hedysarum* species assessed by AFLP markers. *Plant Syst Evol* **298** :51–58
- Cullimore J.V., Ranjeva R., et Bono J.J. (2001).** Perception of lipo-chitooligosaccharide Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* **6**: 24-30.
- Dersler-Nurmi A., Fewer David P., Räsänen leena A. et Lindström K. 2009.** The diversity and evolution of Rhizobia. *Microbiol Monogr.* **8** : 3–41.
- Dénarié J., Debell E.F. et Prome. J. C.1996.** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**: 503-535.
- Djebali N. 2008.** Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. *Thèse de doctorat.* Université Toulouse III-Paul Sabatier. France. 184p.
- Dupuy Y. et Nougier P. 2005.** Les micro-organismes du gène à la biosphère. *Edition Ellipses édition marketing S.A, Paris.* P 196-219.
- 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, Rabat, Maroc.206p.
- Fitouri S.D., Trabelsi D., Saïdi S., Zribi K., Ben Jeddi F. et Mhamdi R. 2011.** Diversity of rhizobia nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. *Ann Microbiol* (8p).
- Jordan D.C. 1984.** Genus I, Rhizobium. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. ed. Holt, J. G. & Kreig, N. R. pp. 235- 242. London; Williams & Wilkins Co.

- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. et Stevens P.F. 2002.** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. *Edition De Boeck*. P 283.
- Halary S. 2009.** Etude des symbioses de mytilidés des écosystèmes marins profonds à base chimiosynthétique par des techniques de FISH, de microscopie et de traitement d'image. *Thèse de Doctorat*. Université Pierre et Marie CURIE. France. 203p.
- Heller R. 1989.** Physiologie végétal. 1. Nutrition. *Edition ABREGES MASSON*.
- Heller R., Esnault R. et Lance C. 2000.** Physiologie Végétale. 2. développement. *Edition DUNOD*. P331.
- Hopkins W. G. 2003.** Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. *Edition De Boeck*. P 99-120.
- Issolah R. et Abdelguerfi A. 2001.** Variabilité' chez 17 populations spontanées de l'espèce *Trifolium glomeratum* L. en Algérie. *Recherche Agronomique, INRAA 9*: 55–64.
- Issolah R., Benhizia H. et Khalfallah N. 2006.** Karyotype variation within some natural populations of Sulla (*Hedysarum coronarium* L., Fabaceae) in Algeria. *Genetic Resources and Crop Evolution 53*:1653–1664.
- Gharzouli R. 2006.** Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violets, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. *Mémoire de Magister*. Université Mentouri de Constantine. Algérie. 100p.
- Guignard J.L. 2000.** Biochimie végétale, *Edition DUNOD. Paris*. P 63-171.
- Gobat J.M., Aragno M. et Matthey W. 2003.** Le sol vivant, bases de pédologie, biologie des sols. *Edition Presses polytechniques et universitaires Romande*. Lausanne. P498.
- Godfroy O. 2008.** Etude génétique et moléculaire de deux gènes de *Medicago truncatula*, DMI3 et RPG, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires. *Thèse de doctorat*, université Toulouse III- Paul Sabatier, France. 142p.
- Graham P. H. 1964.** The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* **35**: 511- 517.
- Kishinevsky B.D., Nandasena K.G., Yates R.J., Nemas C. et Howieson J.G. 2003.** Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species : *H. spinosissium*, *H. coronarium* and *H. flexuosum*. *Plant and Soil.* **251**: 143-153.
- Lazrek-Ben friha F. 2008.** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. *Thèse de Doctorat*. Université Toulouse III- Paul Sabatier, France. 254p.
- Luttge U., Klige M. et Bauer. G. 2002.** Botanique. *Edition Lavoisier*. P 452-453.
- Maâtallah J., Berraho E. B., Sanjuan J. et Lluch C. 2002.** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soil. *Agronomie.* **29**: 321- 329.

Références Bibliographiques

- Madigan M., Martinko J. 2007.** Biologie des micro-organismes. *Edition Pearson Education France*. P676.
- Mahdhi M., Fterich A., Rejili M., Rodriguez-Llorente I.R. et Mars M. 2011.** Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. *Ann Microbiol* (8p).
- Mathieu C. et Pielain F. 1998.** Analyse physique des sols : méthodes choisies. *Edition Lavoisier Tec & Doc*. P 107.
- Mohammed S. H., Smouni A., Neyra M., Kharchef D. et Filali-Maltouf A. 2000.** Phenotypic characterization of root nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Lybya. *Plant Soil*. **224**: 171- 183.
- Morot-Gaudry J.F. 1997.** Assimilation symbiotique chez les plantes : aspect physiologique, biochimique et moléculaire. *Edition. INRA*. P 136.
- Munive Hernandez J.A. 2002.** Diversité génétique de souches de Bradyrhizobium d'arbres de forêts tropicales humides en Guyane, en Guinée et à Madagascar. *Thèse de Doctorat. Université Claude BERNARD- Lyon1. France*.148p.
- O'Gaca F. et Shanmugan K. 1976.** Regulation of nitrogen fixation by rhizobia ; export of fixed N₂ as NH₄. *Biochem. Biophys Acta*. **437** : 313-321.
- Pelmont J.1993.** Bactéries et Environnement, adaptations physiologiques, *Edition EDP sciences*. P 543.
- Perry J.J., Staley J.T., et Lory S. 2004.** Microbiologie: cours et questions de révision. *Edition DUNOD, paris*. P 435-436,634.
- Raven P.H., Evert R.F, et Eichhorn S.E. 2007.** Biologie végétale. *Edition de Boeck*. P 656-658.
- Roger P., Dommergues Y., Balandreau J., Dreyfus B. et Sougoufara B. 1996.** La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement, *Conférence-débat de l'ORSTOM, Paris, France*. 34p.
- Ruisi P., Siragusa M., Di Giorgio G., Graziano D., Amato G., Carimi F. et Giambalvo D. 2011.** Pheno-morphological, agronomic and genetic diversity among natural populations of Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) collected in Sicily, Italy. *Genet Resour Crop Evol*. **58** :245-257.
- Sauvage D., Hamelin J, et Larher F. 1983.** Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium melliloti*. *Plant Sci. Lett*. **31** : 219-302.
- Sebihi F.Z. 2008.** Les bactéries nodulants les légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. *Mémoire de Magister, Université Mentouri de Constantine, Algérie*. 110p.
- Soltner, D., 1988.** Les bases de la production végétale : le sol, le climat , la plante. *Collection sciences et techniques agricoles*, P5-453.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P., Kampfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C,**

Références Bibliographiques

- et Withman W.B. 2002. Report of the Ad Hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **52** : 1043-1047.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S, et Nuti P.M. 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Jour. Appl. Microbiol.* **84**: 81-89
- Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K de R., Saxena A. K., Nautiyal C. S., Mittal S., Tripathi A. K. et Johri B. N. 2005. Divesity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* **89**: 136- 150.
- Tortora G.j., Funk B.R .et Case C.L. 2003. Introduction à la microbiologie. *Edition Renouveau Pédagogique Inc.*
- Torche A .2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. *Mémoire de Magister*, Université Mentouri de Constantine. 118p.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., Devos P., Kersters K. et Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60** : 407-438.
- Van Rhijn P.et Vanderleyden J. 1995. The *Rhizobium* plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124–142.
- Vernie T. 2008. Analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. *Thèse de doctorat*. Université Toulouse III, France. 264p.
- Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *IBP handbook* N° 15. Oxford: Blackwell scientific publications.
- Willems A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil.* **287**:3–14
- Woese C.R. 1987. bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51** : 221-271.
- Yann P. 2006. Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium* légumineuses. *Master Recherche*. Microorganisme du génome aux interactions avec l'hôte. Université de Paul Sabatier. Toulouse III. France.
- Zakhia F ., et de Lajudie P.2006. La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.* **52**: 169–181.

Annexe I :

Tableau XI : Matrice des caractères phénotypiques utilisés pour l'analyse numérique.

souches caractères	BB 1	BB 2	BB 3	BB 4	BB 5	BM 1	BM 3	BM 4	TM	TB 1	TB 2	SB1	SB2	SM 2	SB3	SB4
Mobilité	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IPHB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mucoïdité	2	2	2	2	2	2	1	0	2	2	2	2	2	1	2	2
Aspect	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Élévation	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1
Conteur	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Opacité	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
CEF	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	1
GEN	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
TET	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	1	0	1	2
PEN	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
KAN	0	1	2	2	2	0	0	1	1	1	2	2	2	1	1	2
STR	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	2	2	1	0	0	1
OXA	2	2	0	2	2	0	2	0	0	0	2	2	2	2	0	2
AMP	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NR	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	2	1	1
NIR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ODC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
LDC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ADH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
CAT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
β-GAL	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
H ₂ S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GAZ	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
RM	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OXY	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
MAN	0	0	0	2	0	0	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2
LEV	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2
CEL	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2
RHA	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2
XYL	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2
GAL	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2
INO	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
LAC	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2
ADO	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	0	1	0	0

Annexes

TRE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
GLY	2	2	2	2	2	2	1	0	2	1	2	2	2	2	2	2
MAL	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2
SOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
SAC	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2
SOB	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2
ARA	2	2	2	2	2	2	2	0	2	1	2	2	2	0	2	2
AMD	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2
GLU	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	2	2
RAF	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	1	1
SAL	0	1	2	2	2	1	2	0	1	0	0	1	0	2	2	2
Mannitol	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
PH4	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PH5	0	1	1	0	0	2	2	1	1	0	2	2	0	1	1	2
PH6	1	1	1	0	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2
PH7	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2
PH8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	2	1	1	2
PH9	1	1	1	2	1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	0
PH10	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
00mM	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	2	0	1	2	0	0
250mM	0	0	1	2	1	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
500mM	0	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	1	1
750mM	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	1	0	1	2	1	1
1000mM	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	1
CIT	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TG	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
TM	1	2	1	2	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1

Annexe II

Tableau XII : pourcentages de désaccord entre les souches de rhizobia.

		Percent disagreement														
	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5	BM1	BM3	BM4	TM	TB1	TB2	SB1	SB2	SM2	SB3	SB4
BB1	0.00	0.22	0.21	0.29	0.24	0.19	0.27	0.59	0.30	0.29	0.38	0.29	0.38	0.54	0.32	0.37
BB2	0.22	0.00	0.21	0.24	0.22	0.24	0.30	0.51	0.25	0.29	0.30	0.22	0.29	0.52	0.22	0.27
BB3	0.21	0.21	0.00	0.24	0.16	0.21	0.24	0.46	0.22	0.22	0.29	0.24	0.32	0.44	0.21	0.32
BB4	0.29	0.24	0.24	0.00	0.21	0.29	0.29	0.52	0.25	0.25	0.29	0.29	0.29	0.48	0.29	0.24
BB5	0.24	0.22	0.16	0.21	0.00	0.25	0.24	0.49	0.25	0.24	0.19	0.19	0.22	0.54	0.29	0.30
BM1	0.19	0.24	0.21	0.29	0.25	0.00	0.17	0.51	0.19	0.29	0.32	0.22	0.35	0.44	0.25	0.29
BM3	0.27	0.30	0.24	0.29	0.24	0.17	0.00	0.51	0.27	0.29	0.29	0.27	0.32	0.46	0.30	0.33
BM4	0.59	0.51	0.46	0.52	0.49	0.51	0.51	0.00	0.49	0.49	0.57	0.59	0.52	0.54	0.49	0.59
TM	0.30	0.25	0.22	0.25	0.25	0.19	0.27	0.49	0.00	0.22	0.27	0.24	0.32	0.46	0.25	0.33
TB1	0.29	0.29	0.22	0.25	0.24	0.29	0.29	0.49	0.22	0.00	0.30	0.25	0.25	0.56	0.27	0.33
TB2	0.38	0.30	0.29	0.29	0.19	0.32	0.29	0.57	0.27	0.30	0.00	0.19	0.19	0.54	0.27	0.24
SB1	0.29	0.22	0.24	0.29	0.19	0.22	0.27	0.59	0.24	0.25	0.19	0.00	0.24	0.54	0.24	0.21
SB2	0.38	0.29	0.32	0.29	0.22	0.35	0.32	0.52	0.32	0.25	0.19	0.24	0.00	0.56	0.21	0.25
SM2	0.54	0.52	0.44	0.48	0.54	0.44	0.46	0.54	0.46	0.56	0.54	0.54	0.56	0.00	0.43	0.49
SB3	0.32	0.22	0.21	0.29	0.29	0.25	0.30	0.49	0.25	0.27	0.27	0.24	0.21	0.43	0.00	0.21
SB4	0.37	0.27	0.32	0.24	0.30	0.29	0.33	0.59	0.33	0.33	0.24	0.21	0.25	0.49	0.21	0.00

Résumé

Seize souches de rhizobia ont été isolées, par piégeage à partir des nodosités développées sur les racines d'*Hedysarum coronarium* L., en utilisant des sols recueillies de trois régions du Nord-Est d'Algérie. Le test de nodulation a confirmé la capacité de nos souches à induire la formation de nodules sur leur plante-hôte d'origine. Les isolats authentifiés ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à travers l'analyse des caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques, appuyée par une analyse numérique. Les résultats indiquent que les souches sont étroitement liées entre elles. Elles seraient rattachées au genre *Rhizobium*, du fait qu'elles induisent la formation de nodules sur les racines de leur légumineuse d'origine.

Mots-clés : rhizobia, *Hedysarum coronarium* L., caractérisation phénotypique, Algérie.

Abstract

Sixteen strains of rhizobia were isolated by trapping from nodules developed on the roots of *Hedysarum coronarium* L., using soils collected from three regions of North-East of Algeria. The nodulation test confirmed the capacity of strains to form nodules on their plant host. The authenticated isolates were the object of a phenotypic characterization through the analysis of the morphological, biochemical, physiological characters, supported by a numerical analysis. The results indicate that strains are strictly connected between them. They would be connected with the genus *Rhizobium*, because they lead the training of nodules on the roots of their origin legume.

Keys- words: rhizobia, *Hedysarum coronarium* L., phenotypic characterization, Algeria.