

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Environnement et Santé Publique



Réf :.....

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

**MASTER**

*Thème*

**Caractérisation physiologique des bactéries  
endosymbiotiques à intérêt  
environnemental**

Présenté par :

**IDJER Salima et LAIDI Fatiha**

Soutenu le : **12 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mr HAMLAT Mourad	MAA	President
Mme BOULILA Farida	MCA	Encadreur
Mme BENHAMICHE Samira	MCB	Examinatrice

**Année universitaire : 2015 / 2016**

# Remerciements



*Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.*

*Même si parfois les mots semblent fades à côté de la profondeur des sentiments, il faut pourtant les concrétiser en remerciement, pour honorer tous ceux qui nous ont aidés à franchir ce pas, vers l'avenir.*

*Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice **M<sup>me</sup> BOULILA .F**, pour son aide précieuse, ses orientations et le temps qu'il nous a accordé pour notre encadrement.*

*Nous tenons à exprimer notre vive gratitude à tous le personnel du laboratoire d'écologie microbienne surtout **M<sup>elle</sup> SALMLA**, **M<sup>me</sup> AHNIA.H** et **Mr BELHADI .D**, Pour toute l'aide qu'ils nous ont fournis pendant notre travail.*

*Nos remerciements les plus sincères à tous les membres de jury qui ont accepté de lire et juger notre travail.*

*Enfin, nous remercions particulièrement nos parents, pour leurs Soutiens inconditionnels tout au long de ces années d'études.*

*A vous tous, un grand merci*





*J'ai le plaisir et l'honneur de dédier ce modeste travail*

*Aux êtres qui me sont les plus chers.*

*A mes très chers parents*

*Pour leurs sacrifice et qui m'ont donné le meilleur d'eux même, leurs patience et leurs précieux conseils pour me guider vers la vois de la réussite, je n'oublierais jamais ce que vous faites pour moi.*

*Ames très chers frères ; Karim et Nabil et leurs épouses ; Soria et Lamia*

*A mes très chères sœurs ; Samira, Akila, Rahima, Razika, Nadia, Nawel,*

*Minouche et leurs époux Elhouas, Aziz, Bachir, Brahim, Lyes*

*A mes très chères adorables nièces : Aya, Ikram, Serine, Nour elhouda*

*A mes très chers adorables neveux : Anis, Wassim, wail, Anwar, seif eddine*

*A ma binôme et sa famille*

*A mes ami(e)s qui me connaissent, en particulier :*

*Katia, Kenza, Hafsa, Kaçou, Malia, Louiza, Sara, Dalila, Zineb, Wafa, Lamia, Samra,*

*et à toi A/Rahim.*

*En fin, à tous ceux que j'aime, et qui m'aiment.*

**FATIHA**



*J'ai le plaisir et l'honneur de dédier ce modeste travail*

*Aux êtres qui me sont les plus chers.*

*A mes très chers parents et mon mari*

*Pour leurs sacrifice et qui m'ont donné le meilleur d'eux même, leurs patience et leurs précieux conseils pour me guider vers la vois de la réussite, je n'oublierais jamais ce que vous faites pour moi.*

*Ames très chers frères ; Massinissa Et Arab*

*A ma très chère sœurs ; kahina*

*A ma très chère adorables nièces : Anaelle*

*A mes très chers adorables neveux : amine et aymene*

*A ma binôme et sa famille*

*A mes ami(e)s qui me connaissent, en particulier :*

*Sarah, Fedha, katia, meriem, aadouda, fouzia ,wafa*

*En fin, à tous ceux que j'aime, et qui m'aiment.*

**SALIMA**

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction**..... 1

## **Chapitre I : Synthèses bibliographique**

1. Fixation d'azote.....	3
A. Fixation industrielle.....	3
B. Fixation biologique .....	3
2. Rhizobia .....	6
2.1 Taxonomie des rhizobia .....	6
3. Légumineuse .....	9
3.1. Taxonomie des légumineuses.....	9
3.2. Genre <i>Cytisus</i> .....	10
3.3. Intérêt des légumineuses .....	11
4. Symbiose rhizobia-légumineuses.....	12
4.1. Intérêt de la symbiose rhizobium légumineuses.....	13
4.2. Processus de la nodulation .....	13
4.3. Substances responsables de la nodulation.....	15
4.4. Facteurs influencent la symbiose rhizobia légumineuse .....	16

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

1. Présentation du matériel biologique .....	18
2. Méthodes .....	18
2.1. Revivification des souches étudiées y compris les souches références .....	18
2.2. Caractères morphologiques et culturaux .....	18
2.3. Préparation des prés cultures.....	19
2.4. Préparation des cultures .....	19
3. Caractérisation physiologique .....	19
3.1. Effet du pH sur la croissance.....	19

3.2. Effet de la température sur la croissance.....	19
3.3. Effet du NaCl sur la croissance .....	19
4. Analyse numérique des données de la caractérisation physiologique et morphologique ....	20

### **Chapitre III : *Résultats et discussions***

1. Description morphologique.....	21
1.1. Caractérisation morphologique des colonies.....	21
1.2. Caractérisation cellulaire des isolats .....	21
2. Caractérisation physiologique .....	22
2.1. Effet du pH sur la croissance des souches .....	22
2.2. Effet de la température sur la croissance des souches.....	23
2.3. Effet du NaCl sur la croissance de souches .....	25
3. Analyse numérique des données de la caractérisation morphologique et physiologique ..	26
<b>Conclusion et perspective.....</b>	<b>28</b>

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

## Liste des abréviations

**B, Can:** *Bradyrhizobium canariense*.

**B, Cyt:** *Bradyrhizobium cytisi*.

**B, Elk:** *Bradyrhizobium elkanii*.

**B, Jap:** *Bradyrhizobium japonicum*.

**BNL:** Bactéries Nodulant les légumineuses.

**CO<sub>2</sub>:** Dioxyde de carbone.

**EPS:** Exopolysaccharides.

**Kg :** kilogramme.

**m :** Mètre.

**mm :** Millimètre.

**mM :** Milli molaire.

**N<sub>2</sub> :** Diazote.

**NaNO<sub>3</sub> :** Nitrate de sodium.

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information.

**NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>:** Nitrate ammonium.

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** Ammonium.

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup> :** Nitrite.

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup> :** Nitrate.

**Nod:** Gène de nodulation.

**Y.M.A:** Yeast Mannitol Agar.

**µm :** Micro mètre.

**°C :** Degrée Celsius.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Cycle d'azote .....	4
<b>Figure 2</b> : Arbre phylogénétique NJ.....	8
<b>Figure 3</b> : Plante de l'espèce <i>C. villosus</i> .....	11
<b>Figure 4</b> : Formation d'un nodule .....	15
<b>Figure 5</b> : Aspect des colonies sur YMB .....	21
<b>Figure 6</b> : La coloration de Gram.....	22
<b>Figure 7</b> : Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique × 40.....	22
<b>Figure 8</b> : Effet du pH sur la croissance des souches testées .....	22
<b>Figure 9</b> : Effet de la température sur la croissance des souches testées .....	23
<b>Figure 10</b> : Effet du NaCl sur la croissance des souches testées.....	25
<b>Figure 11</b> : Dendrogramme de la CAH.....	27

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Souches utilisées dans l'étude .....	18
<b>Tableau II</b> : coefficient de similitude inter- souches étudiées .....	26

### Introduction

L'Algérie présente un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humide, subhumide et semi-aride. Elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées (FAO, 2006).

Dans un contexte de sol pauvre en azote, les légumineuses sont intéressantes car elles ont la capacité de réaliser une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec les bactéries rhizobiums du sol (Corre-Hellou et *al.*, 2006).

Les légumineuses développent des nodules sur leurs racines, dans lesquelles les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac disponible pour la nutrition azotée de la plante. Cette symbiose présente des intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés.

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, facilitant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse. Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Vincent, 2002).

Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) comprenant plusieurs espèces notamment le genre *Bradyrhizobium* qui sont des bactéries du sol à Gram négatif. Ces bactéries endosymbiotiques ont une signification scientifique et agronomique profonde due à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, relation d'importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Somasegaran et Hoben, 1994).

Toutefois, la symbiose rhizobia-légumineuses semble être très sensible aux facteurs de l'environnement à savoir le pH, la sécheresse, la salinité. Ces facteurs peuvent être liés aux conditions de culture, à la plante hôte ou à la bactérie elle-même (Zahran, 1999).

Les bactéries du genre *Bradyrhizobium* nodulant *Cytisus villosus* d'Algérie et qui présentent un intérêt environnemental, ont fait l'objet d'une caractérisation génotypique et phylogénétique. A travers cette étude, nous envisageons d'étudier l'effet du pH, de la température et de la salinité sur la croissance de ses bactéries, afin de sélectionner d'éventuelles souches adaptées à la salinité et à des températures élevées.

Cette étude rentre dans le cadre de projet de recherche de laboratoire d'écologie microbienne qui étudié la possibilité d'utilisation des espèces rhizobiums nodulant les Genisteae dans la restauration des sols pauvres et dégradés.

## 1. Fixation d'azote

La plus grande partie de l'atmosphère, 78% en volume, est constituée d'azote ( $N_2$  ou diazote) un gaz incolore et inodore (Hopkins, 2003). Cet élément est essentiel pour toutes formes de vie. Dans le sol, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles ainsi cet élément constitue souvent avec le manque d'eau et de phosphate un principal facteur limitant la croissance des végétaux (Cleland et Harpole, 2010).

L'azote est l'élément constitutif de la plante le plus important après le carbone. Il peut représenter jusqu'à 7% de la matière sèche et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif (Tourte *et al.*, 2005). L'azote favorise chez les végétaux l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Babo, 2002).

Les micro-organismes qui fixent l'azote atmosphérique sont tous des micro-organismes diazotrophes tels que *Azotobacter*, *Klebsila*, cyanobacteries, et quelques mycètes lévuriformes (Tourte *et al.*, 2005).

L'azote atmosphérique est fixé par voie chimique, artificielle et industrielle ou par voie naturelle et biologique.

### A. Fixation industrielle

L'industrie utilise le procédé Haber-Bosch pour briser le lien dans le diazote et le convertir en ammoniac, ce qui nécessite environ 500 et 450 bar et il faut l'équivalent de 2 à 3 tonnes de pétrole pour produire une tonne d'engrais azoté par ce processus.

Environ 10 à 40 millions de tonnes d'ammoniac sont fabriquées chaque année par ce procédé. L'ammoniac produit peut être utilisé directement ou converti en nitrates tels que nitrate de sodium ( $NaNO_3$ ) ou nitrate d'ammonium ( $NH_4NO_3$ ).

La moitié de l'engrais azoté utilisée en agriculture est absorbée par les plantes cultivées. Le reste est absorbé par d'autres plantes ou lessivé (Peret, 2007).

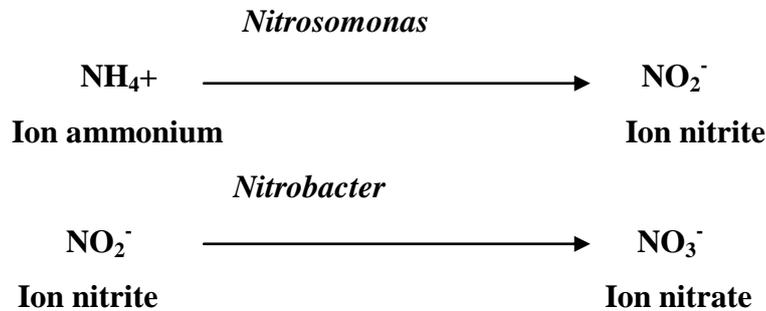
### B. Fixation biologique

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 (Roger, 1996).

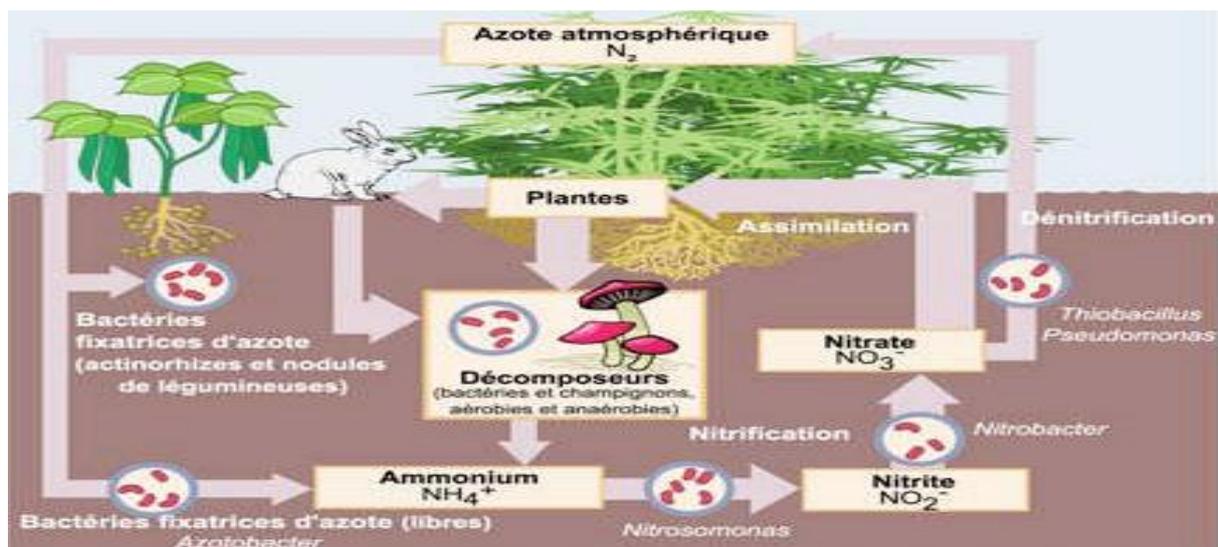
La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes, simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Hopkin, 2003).

Dans le cycle de l'azote certains micro-organismes transforment l'azote atmosphérique en ammoniac (fig. 1).

L'apport de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) dans les sols, source principale d'azote pour les plantes, est réalisé par oxydation de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) puis en nitrate par des bactéries chimolithotrophes (*Nitrosomonas* et *Nitrobacter*) selon un processus nommé nitrification favorisé par un sol bien aéré processus aérobie (Hopkin, 2003), les deux étapes sont illustrées par les réactions suivantes :



La dénitrification qui appauvrit les sols en nitrate est rendu possible par certaine bactéries du genre (*Pseudomonas*, *Thiobacillus*) en condition anaérobie, ces bactéries réduisent les nitrites en oxyde nitreux et en azote moléculaire, qui s'échappent vers l'atmosphère extérieure (Pujic, 2009).



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

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

➤ *fixateurs libres*

On trouve des bactéries de ce type surtout dans les prairies ; elles sont en forte concentration dans la rhizosphère (Tortora et *al.*, 2003). Ce groupe appartient à des bactéries aérobies et anaérobies, ainsi que des représentants des bactéries phototrophes (*Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Chlorobium* et *Rhodomicrobium*) et des cyanobactéries, en particulier celles qui forment des hétérocystes (*Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Colothrix*, *Rivularia*) (Richter, 1993). Certains fixateurs libres dont *Azospirillum*, *Azotobacter* ont été décrits comme formant de véritables associations avec les racines de plantes (Elmerich, 1993).

Les associations vont de la plus simple multiplication bactérienne à la surface de la racine à la colonisation des espaces intracellulaires (Dobereiner et *al.*, 1995).

➤ *fixateurs symbiotiques*

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

D'un point de vue environnemental et agronomique la symbiose la plus importante est l'association des rhizobiums aux légumineuses (Dénarié, 2000).

La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte de structures multicellulaires hypertrophiées nommées nodules (Hopkins, 2003).

Dans les nodules des non légumineux, le symbionte est une bactérie filamenteuse (*Frankia*) qui fait partie du groupe des actinomycètes. Un petit nombre d'associations symbiotiques qui ne provoquent pas de formations de nodules ont été étudiées, comme l'association de la plante *Azolla* avec la cyanobactérie *Anabaena* (Hopkins, 2003).

## 2. Rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries, à gram négatif, aérobies, non sporulantes. Elles se présentent sous la forme de bâtonnets de 0.5-0.9µm de largeur sur 1.2-3µm de longueur. Ils sont généralement mobiles grâce à un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches. Les rhizobia forment des colonies incolores, blanches ou de couleur crème, sur le milieu de cultures classique (YMA) contenant de l'extrait de levure, du mannitol et des sels minéraux (Duhoux et Nicole, 2004).

D'après (Somasegaran et Hoben, 1994), on distingue trois groupes de rhizobia, le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours. Le deuxième est le groupe de rhizobia à croissance moyenne les *Mesorhizobium* qui produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-4 jours. Le troisième est le groupe de rhizobia à croissance lente les *Bradyrhizobium* qui produisent un trouble dans le milieu liquide dans 4-5 jours.

### 2.1. Taxonomie des rhizobia

« Rhizobia » est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui rentrent en symbiose principalement avec des plantes de la famille des légumineuses (O'Hara et al., 2002). En formant des nodosités sur les racines dont lesquelles ils réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac. La formation de nodule est contrôlée par des molécules de signal bactériens, appelées des facteurs Nod, qui sont reconnus par la plante hôte. (Lerouge et al., 1990 ; Schultze et Kondorosi, 1998).

L'introduction de la taxonomie numérique et de la technique moléculaire ont permis de décrire de nouveaux genres et de nouvelles espèces de bactérie capables de noduler les légumineuses (Zakhia et de Lajudie, 2001).

Les rhizobia appartiennent au Domaine *Bacteria*, au phylum *Protobacteria*. Ils se répartissent en 13 genres comportant 98 espèces validées par ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. Ces espèces phylogénétiquement intercalés parmi de nombreux autres genres et espèces bactériennes à l'intérieur des  $\alpha$ - et des  $\beta$ -Protéobactéries.

#### Ces genres sont :

- *Rhizobium* qui contient 49 espèces.
- *Mesorhizobium* qui contient 21 espèces.
- *Ensifer* autrefois *Sinorhizobium* contient 17 espèces.
- *Bradyrhizobium* contient 9 espèces.
- *Burkholderia* contient 7 espèces.
- *Azorhizobium* contient 2 espèces.

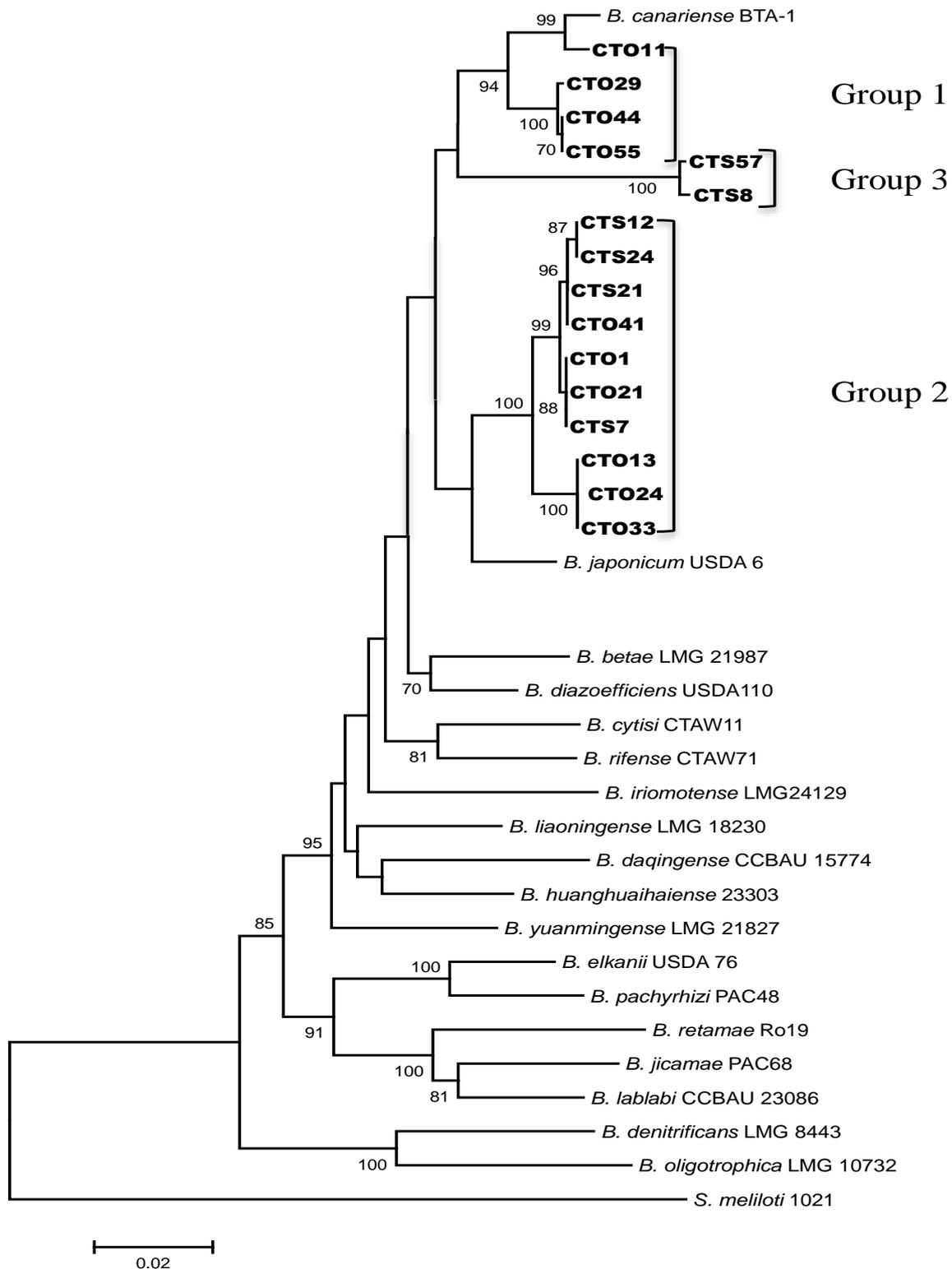
- *Microvirga* contient 3 espèces.
- *Phyllobacterium* contient 3 espèces.
- *Ochrobactrum* contient 2 espèces.
- *Methylobacterium* contient 1 espèce.
- *Cupriavidus* contient 1 espèce.
- *Devosia* qui contient 1 espèce.
- *Shinella* qui contient 1 espèce.

Cette classification est loin d'être définitive d'après (Weir, 2016). Il est important de noter que cette dernière a été compilée à partir des résultats présentés à la 14<sup>ème</sup> conférence de la fixation de l'azote australienne, et la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) et le site web LPSN (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>).

En Algérie, les travaux de (Boulila et al., 2009) et (Ahnia et al., 2014), ont montré que les bactéries endosymbiotiques nodulant *Retama sp* et *Cytisus villosus* de l'Algérie appartiennent au genre *Bradyrhizobium*.

L'arbre phylogénétique basé sur les gènes de ménages montre 3 groupes *Bradyrhizobium* sp nodulant *Cytisus villosus* d'Algérie. Le premier groupe proche de *Bradyrhizobium japonicum*, le deuxième groupe proche de *Bradyrhizobium canariense* et le dernier groupe complètement différent de toutes les espèces décrits dans le genre *Bradyrhizobium*.

Ces trois groupes sont complètement différents de *Bradyrhizobium* isolés de *Cytisus villosus* du Maroc (Chahboune et al., 2012).



**Figure 2** : Arbre phylogénétique NJ basé sur l’alignement de 1300 pb de séquences nucléotidiques des gènes *glnII*, *recA* and *atpD*. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont  $\geq 65\%$ . Les isolats de *Cytisus* sont indiqués en gras (Ahnia et al., 2014).

### 3. Légumineuses

De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales et de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle), bois (palissandre), aliments (soja, haricot, arachides) (Saoudi, 2008). Elles constituent une famille cosmopolite des zones froides aux zones tropicales (Graham et Vance, 2003). On y trouve des arbres, la plupart exotiques, voire des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles (Guignard et *al.*, 2005). Souvent volubiles et grimpantes, soit par enroulement soit grâce à des vrilles. La famille des légumineuses comprend plus de 700 genres et près de 20 000 espèces (Lewis et *al.*, 2005). La plus grande partie des légumineuses, 88% des espèces étudiées, interagissent avec des rhizobias pour former des nodules fixateurs d'azote (de Faria et *al.*, 1989 ; Hirsch et *al.*, 2001). De ce fait, les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Patriarca et *al.*, 2004 ; Stacey et *al.*, 2006).

#### 3.1. Taxonomie des légumineuses

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

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

En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième est paraphylétique (*Caesalpinioideae*) (Guignard et Dupont, 2005).

##### a. *Caesalpinioideae*

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement tel que l'arbre de Judée (Judd et *al.*, 2001).

**b. Mimosoideae**

Cette sous famille est constituée de 62 genre et environ 2500 espèces qui sont présentent principalement dans les forêts tropicales et subtropicales (young et *al.*, 2003). Les plantes de *Mimosoideae* sont caractérisées par leurs petites fleurs régulières (actinomorphe) entassées, généralement en épis ou de têtes qui ressemblent à une pom-pom tel que *Mimosa* et *Acacia* (white, 2010).

**c. Papilionoideae**

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de "papillon" (Guignard et Dupont, 2005). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composés de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd et *al.*, 2001). C'est une sous famille qui renferment plus de deux tiers des espèces et inclus presque toute les légumineuse économiquement importante (spret, 1995). Elles renferment les espèces cosmopolites et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus (Dhane fitouri, 2011). Parmi cette sous famille, on compte la tribu de *Genisteeae* qui présente une grande signification écologique dans les pays méditerranéens car elles colonisent les forêts dégradé et caractérisent les paysages des régions en déforestation (Lograda et *al.*, 2009). Il existe plusieurs genres appartenant à cette tribu : genre *Retama*, genre *Genista*, genre *Lupinus*, genre *Spartium* et le genre *Cytisus* qui a fait l'objet de notre travail.

**3.2. Genre Cytisus**

Ce sont des arbustes ou arbrisseaux épineux ou non, à floraison abondante, en générale à feuilles trifoliolées de couleur jaune. On reconnait à ce genre six espèces : *C. purgans*, *C. linofolius*, *C. fontanesii*, *C. villosus*, *C. monspessulanus*, *C. arboreus* (Quezel et santa 1962).

*Cytisus villosus* est un arbrisseau de 1 à 1,5 m dressé, robuste à rameaux allongés. Les jeunes rameaux sont couvert de poils ; feuilles pétiolées, à folioles obovales, couvertes sur les deux faces de poils appliqués, ne noircissant pas par dessiccation ; fleurs latérales , en grappes feuillées sur les rameaux anciens ;pédicelles égalant à peu près le calice ; calice à poils étalés-dressés, allongés, tubuleux, à lèvres divariquées, la supérieure à dents obtuses, peu courbées en dehors, fleures jaune (fig. 3), gousse de 25-30mm ; sur 5-6, à valves convexes, noir, très velue-soyeuse (Quezel et Santa,1962).



**Figure 3 :** Plante de *C. villosus* (Ahnia, 2014).

### 3.3. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin *et al.*, 2001).

#### ➤ Intérêt environnemental

De nombreux travaux ont démontré le pouvoir des légumineuses dans la restauration, la revégétalisation des milieux dégradés et la fertilisation des sols pauvres (Lograda *et al.*, 2009). Ce pouvoir est rendu possible grâce à l'association symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses (Zahran, 2009). qui constituent d'excellentes lignes de brise-vent et ralentissent la progression des dunes de sable (Ferry *et al.*, 1990).

Ces légumineuses contribuent à la réduction de l'émission de gaz à effet de serre à travers la diminution de l'utilisation des engrais azotés, qui contribuent à la fois aux émissions de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>O (Rispaïl *et al.*, 2010).

Les légumineuses ligneuses, telles que *Acacia*, *Leucaena*, *Mimosas* pouvant fixer des quantités énormes de N<sub>2</sub> (jusqu'à 600 kg /hectare/an) sont utilisées en agroforesterie (Sprent et Parsons, 2000). D'autres comme le lupin, la glycine, les *Cytisus* ou *Genista* peuvent être utilisées comme plantes ornementales (Franche *et al.*, 2009).

*Retama spherocarpa* joue un rôle majeur dans la revégétalisation et la fertilisation des sols des zones arides et semi-arides grâce aux associations symbiotiques avec les rhizobia (Boulila *et al.*, 2009 ).

#### ➤ Intérêt alimentaire

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des Légumineuses. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine

et animale (Journet et *al.*, 2001). Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18% à 30% de la graine sèche) (Baudoin et *al.*, 2001).

#### ➤ Intérêt économique

Les légumineuses sont utilisées comme aliments, gommés, teintures, résines, huiles et nombreux bois de construction (Wathman, 1967). La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants (Pinochet et *al.*, 2006).

#### ➤ Intérêt médical

La famille des légumineuses fournit de très nombreuses drogues, recherchées pour divers principes. Ces drogues existent surtout chez les espèces appartenant à la flore des zones arides ou semi-aride (Chopra et *al.*, 1960). Selon une récente enquête ethnobotanique dans la région Nord-Est de la Lybie, *Retama* est utilisée pour le traitement de l'hypertension (Ishurda et *al.*, 2004). Et des troubles gastro-intestinaux. Elle était couramment utilisée pour le traitement traditionnel de certaines maladies rénales et comme plantes guérisseuses pour le contrôle du diabète et de la phytothérapie (Magherani et *al.*, 2005).

En Algérie *Retama* a été utilisée contre le rhumatisme, les piqûres de scorpion et blessures, sous forme d'infusion, tisanes, poudres ou compresses (Ould el hadj et *al.*, 2003).

## 4. Symbiose rhizobia-légumineuses

La symbiose rhizobia-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire. Par conséquent, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé appelé nodule, à l'intérieur duquel cette bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant via le complexe nitrogénase, en ammonium (Perret et *al.*, 2000 ; Gibson et *al.*, 2008). Certaines légumineuses sont également capables de former des nodules sur les tiges, appelés nodules caulinaires (Giraud et Fleischman, 2004).

La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses est facilitée par l'interférence moléculaire qui a lieu dans la rhizosphère (Terefework, 2002). L'interaction plante – rhizobia est hautement spécifique. Une espèce bactérienne n'affecte et nodule qu'un nombre défini d'espèce végétale, néanmoins le degré de spécificité est variable selon la souche bactérienne et la plante

hôte (Debellé et *al.*, 2001). En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries et le processus est appelé nodulation (Brewin et *al.*, 1992).

#### **4.1. Intérêt de la symbiose rhizobium légumineuses**

Afin de répondre aux exigences des enjeux économiques actuels et celle d'une agriculture non polluante, un grand intérêt est porté sur l'étude des micro-organismes fixateurs d'azote associés aux légumineuses justifié par le faible cout de la production des « inoculum » souches pures et performantes de rhizobia et les caractéristiques adaptatives et agronomiques des symbioses qu'elles réalisent avec les légumineuses (Morot-Gaudry, 1997).

La symbiose rhizobia-légumineuse avec sa capacité remarquable élevée de fixer l'azote atmosphérique, représente la solution pour l'accroissement de la production alimentaire dans les diverses régions de monde. Ainsi elle fournit la plus grande quantité en azote biologique qui est toujours > 100kg d'azote / hectare / an dans les systèmes d'exploitation agricole (O'Hara, 2002).

Donc, la symbiose rhizobia-légumineuse peut contribuer considérablement à l'accroissement de la productivité agricole, à l'économie d'engrais coûteux en devise et en énergie (Neyra, 1997). Elle permet également d'améliorer la structure et la fertilité du sol (Janati, 1990).

Elle contribue aussi à la maintenance et la restauration de la fertilité des sols, à la réhabilitation de terre dégradées et à la limitation de la pollution des nappes phréatiques par les nitrates (Neyra, 1997). Ainsi, qu'à la dépollution des sites contaminés par des déchets toxiques organiques et non organiques (métaux lourds) (Cindy et *al.*, 2006).

#### **4.2. Processus de la nodulation**

Le processus d'infection et de formation des nodules (fig. 4) se fait en plusieurs étapes ; la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Sanchez et *al.*, 1991).

##### **➤ Pré infection**

L'étape préliminaire de l'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la plante permettant la croissance des bactéries de manière sélective (Savka et *al.*, 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape et *al.*, 1991).

##### **➤ Infection**

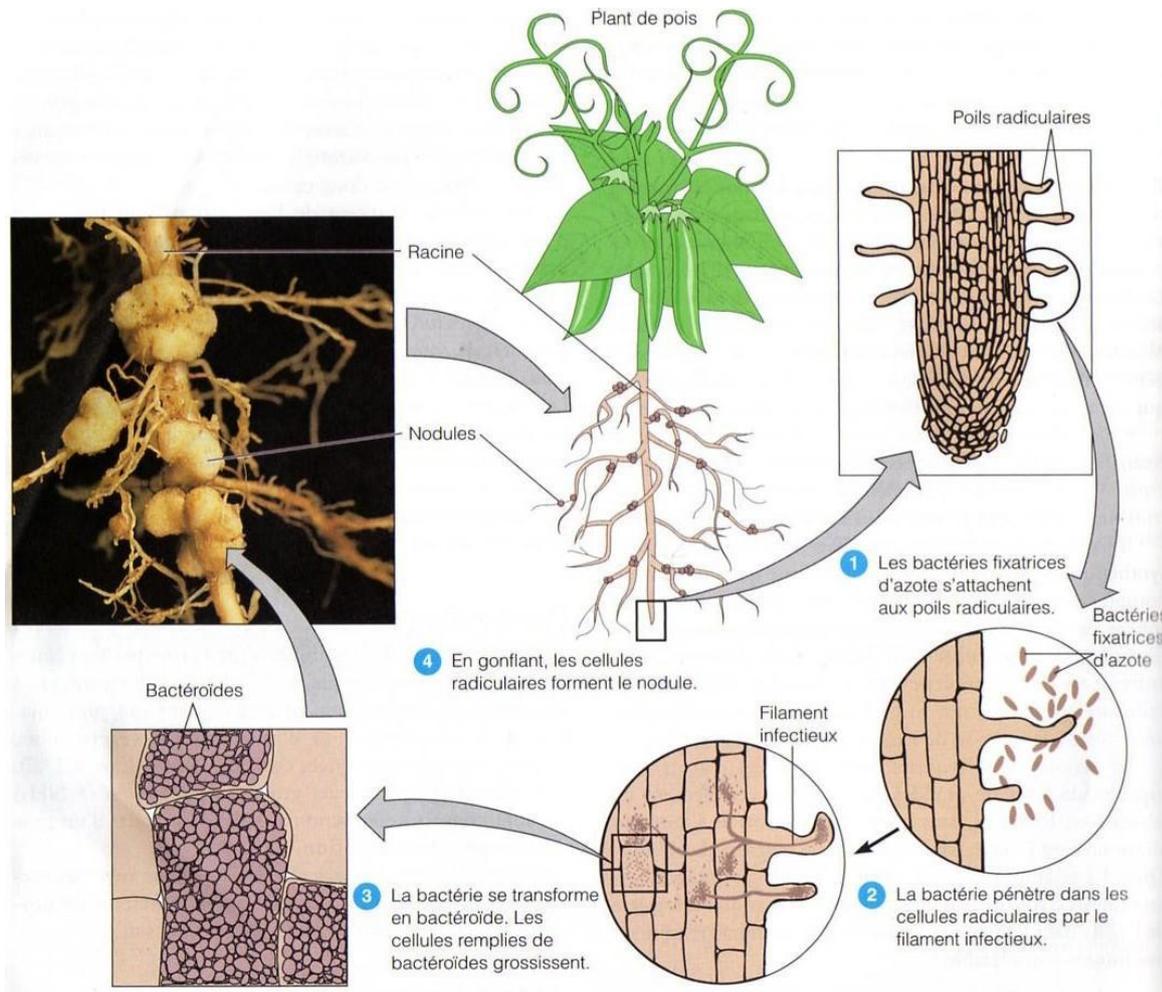
L'infection consiste en la pénétration des rhizobiums en différents points du système racinaire (Hopkins, 2003). On distingue deux types d'infection : la voie intracellulaire et la voie intercellulaire.

Au cours de l'infection intracellulaire, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire qui crée une zone confinée dans laquelle la bactérie est entourée par la paroi végétale. Un cordon d'infection est initié à partir de ce point par hydrolyse de la paroi (Mateos et *al.*, 2001). Invagination de la membrane végétale et production de matériel pariétal par la plante (Gage et Margolin, 2000; Gage, 2004).

Le cordon d'infection est une structure tubulaire qui croît à l'intérieur de la cellule et dans laquelle la bactérie prolifère (Van Brussel et *al.*, 1992).

➤ **Formation et développement du nodule**

Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée (Timmers et *al.*, 1999). Toutes les cellules du cortex ne se divisent pas, ce qui semble indiquer que la susceptibilité de ces cellules pourrait être liée à un statut particulier, notamment une modification de la concentration en hormones (Mathesius et *al.*, 2000). De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de pré infection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (Van Brussel et *al.*, 1992). Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation.



**Figure 4 :** Formation d'un nodule (Tortora et *al.*, 2003).

### 4.3. Substances responsables de la nodulation

#### ➤ Flavonoïdes

L'interaction symbiotique déclenchée sous la responsabilité des flavonoïdes qui sont libérés par les racines des légumineuses et réorganisé par les facteurs Nod des rhizobia (Boukli, 2006). Différents composés phénoliques sont inducteurs des gènes *nod*. Ils jouent un rôle majeur dans le processus infectieux. Ils stimulent chez les rhizobiums la synthèse de facteurs Nod spécifiques qui activent les processus symbiotiques de l'hôte nécessaire à l'infection des poils radiculaires et au développement du nodule (Harley et *al.*, 2010).

#### ➤ Facteurs Nod

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia, est une étape essentielle dans la nodulation. Les signaux Nod, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod sont des molécules lipochitoooligosaccharidiques (Terefework,

2002). Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial. La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nod* ABCD qui codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs Nod, et les gènes *hsn* qui codent pour les diverses substitutions des facteurs Nod (Debellé et al., 2001). La longueur et la saturation des composants de substitués d'acides gras du noyau lipooligosaccharide, le type et la position des divers substitués sur les facteurs Nod, jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

#### **4.4. Facteurs influencent la symbiose rhizobiums-Légumineuse**

La survie des rhizobiums dans le sol, la formation des nodosités et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action directe d'un certain nombre de facteurs de l'environnement. En effet, plusieurs facteurs tels que la composition physico-chimique du sol peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité de fixation de l'azote après symbiose (Collavino et al., 2005 ; Kinkema et al., 2006). Cependant, en Algérie ce processus naturel est affecté par plusieurs contraintes abiotiques parmi lesquels le stress hydrique, le stress salin et les variations de température (Merabet et al., 2006 ; Boulila, 2009 ; Amrani et al., 2010 ; Boukhatem et al., 2012).

##### **a. Stress thermique**

La température a un effet sur la symbiose et intervient dans le processus d'infection des poils racinaires, la différenciation de la bactérie au sein du nodule, la structure et le fonctionnement nodulaire. Elle peut également avoir un impact sur la persistance des rhizobia dans l'inoculum durant son stockage, leur survie dans le sol ainsi que sur la nodulation et la fixation d'azote (Graham, 1992).

La plupart des rhizobia se développe entre 28° et 31°C et sont généralement incapables de se multiplier à 37°C et en dessous de 10°C. Des souches de rhizobia isolées de *Lupinus luteus* capables de s'adapter à des fortes températures pouvant atteindre 45°C ont été décrites (El hillali, 2006). Une température élevée des sols pourrait donc contribuer à la présence de souches non efficaces dans les sols (Segovia et al., 1991). Ainsi induire un retard de la nodulation ou limiter celle-ci à la partie profonde du sol, où les températures sont moindres (Domergue, 2006).

**b. Stress salin**

Dans les zones arides et semis arides, les contraintes salines s'associent souvent au déficit hydrique, pour limiter la production des espèces végétales chez les légumineuses, cet effet est d'autant plus perceptible que la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique est très sensible à la contrainte saline. La salinité affecte la multiplication et la survie du rhizobia dans le sol et la rhizosphère, inhibe le processus d'établissement de l'infection rhizobienne entraînant une diminution du nombre des nodules, réduit leur contenu en légghémoglobine, diminue l'activité de la nitrogénase, altère la diffusion intra nodulaire de l'oxygène et modifie le statut ionique (Ben Khaled *et al.*, 1999).

**c. Effet du pH**

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent un pH neutre ou légèrement acide pour établir une symbiose efficace dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994).

L'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobiums et engendre par conséquent une diminution de la nodulation. Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (Dhane Fitouri, 2011).

## 1. Présentation du matériel biologique

Cette étude porte sur la caractérisation physiologique de 4 souches appartenant à la collection du Laboratoire d' Ecologie Microbienne. Ces souches sont représentatives d'une collection obtenue des nodules racinaires de *Cytisus villosus* de la région côtière de Bejaia (Ahnia et al., 2014). Elle sont identifiées comme appartenant au genre *Bradyrhizobium* .

Les souches choisies pour cette étude sont consignées dans le (tableau I) qui comporte également des souches références, utilisées dans cette étude.

**Tableau I:** Souches utilisées dans cette étude.

Souches	Plante –hôte	Source
CTO1	<i>Cytisus villosus</i> d'Algérie	Ahnia et al., 2014
CTO55		
CTS8		
CTS57		
<i>B. cytisi</i> CTAW11	<i>Cytisus villosus</i> du Maroc	Chahboune et al., 2012
<i>B. japonicum</i> USDA6	<i>Glycine max</i>	Jordan, 1982
<i>B.canariense</i> BTA-1	<i>Chamaecytisus proliferus</i>	Vinuesa et al., 2005
<i>B. elkanii</i> USDA76	<i>Glycine max</i>	Kuykendall et al., 1992

## 2. Méthodes

### 2.1. Revivification des souches étudiées y compris les souches références.

Les différentes souches ont été repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Y.M.A (annexe 01). L'incubation est réalisée à 28°C pendant 6 à 8 jours.

### 2.2. Caractères morphologiques et cultureux

Dans le but de déterminer les caractères cultureux des souches étudiées, nous les avons ensemencés sur des boîtes Pétri contenant le milieu YMA. Les colonies obtenues après 6 à 8 jours d'incubations à 28°C ont été étudiées selon la forme, l'aspect, la couleur, l'opacité, l'élévation, la taille et la présence d'exopolysaccharides (EPS).

La forme, la mobilité, et la présence des poly B-hydroxybutyrates (PHB) des bactéries ont été déterminées par observation au microscope photonique (grossissement 100) à l'état

frais d'un frottis bactérien préparé à partir d'une colonie âgée de 6 jours. Le test Gram est pratiqué selon la méthode classique de microbiologie.

### **2.3. Préparation des pré cultures**

Des pré cultures des souches étudiées y compris les souches de références ont été préparés à partir des cultures obtenues sur milieu YMA par mise en suspension de colonies dans des tubes contenant 5 ml d'YMB (annexe 01). Les tubes sont ensuite incubés à 28°C pendant 6 jours.

### **2.4. Préparation des cultures**

Des cultures ont été préparées dans des flacons contenant 100 ml d'YMB à partir des pré cultures. Ensuite ces cultures ont été incubées à 28°C pendant 6 jours.

## **3. Caractérisation physiologique**

Les souches ont subi une série de tests physiologiques impliquant plusieurs facteurs abiotiques afin d'évaluer l'effet du pH, la température et de la salinité sur leur croissances. Pour tous les tests, les milieux sont inoculés par  $10^8$  cellules bactériennes dénombrées sur cellule Malassez. L'évaluation de la croissance est estimée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda = 620$  nm.

### **3.1. Effet du pH sur la croissance**

L'étude de l'effet du pH sur la croissance des souches bactériennes a été réalisée sur milieu YMB ajusté à des pH allant de 4 à 12. L'incubation se fait à 28°C pendant 6 jours. Trois répétitions sont réalisées pour chaque pH.

### **3.2. Effet de la température sur la croissance**

L'effet de la température sur la croissance des souches a été étudié sur milieu YMB dont le pH a été ajusté à 6,8. Après inoculation, les tubes sont incubés pendant 6 jours à des températures allant de 24°C, 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C, 36°C et 38°C. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque température.

### **3.3. Effet du NaCl sur la croissance**

L'effet de la salinité sur la croissance des souches a été déterminé sur milieu YMB dont le pH a été ajusté à pH 6,8. Des quantités croissantes de NaCl sont additionnées : 0, 100, 200, 300, 400, et 500 mM. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 6 jours. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration.

#### 4. Analyse numérique des données de la caractérisation physiologique et morphologique

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

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

Cs : coefficient de similitude entre deux souches.

A : nombre de tests positifs communs aux deux souches.

B : nombre de tests différents entre deux souches.

C : nombre de tests négatifs commun aux deux souches.

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

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

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

## 1. Description morphologique

Cette description concerne les caractères morphologiques des colonies, et les caractères cellulaires des souches étudiées y compris les souches de références.

### 1.1. Caractérisation morphologique des colonies

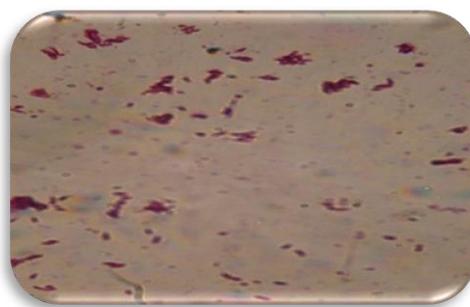
Les isolats cultivés sur milieu YMA à 28°C forment des colonies au bout de 6 jours. Certaines souches produisent des exopolysaccharides telles que CTO1, CTO55, les autres non. Le diamètre des colonies varie de 0.5 à 3mm, ces colonies sont opaques, circulaires, bombées, de couleur allant du beige au blanc (fig. 5). Cette description concorde avec celle donnée par Jordan (1982,1984), et confirme celle donnée par (Ahnia, 2015) sur le genre *Bradyrhizobium*.



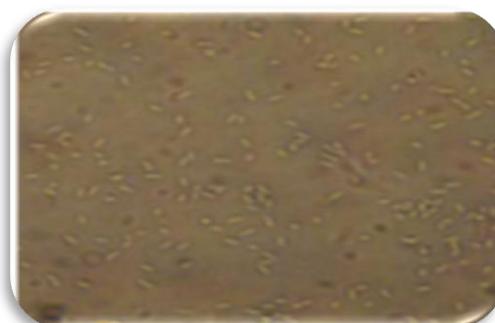
**Figure 5 :** Aspect des colonies sur milieu YMB.

### 1.2. Caractérisation cellulaire des isolats

L'observation microscopique d'une suspension bactérienne, montre des bâtonnets aux extrémités arrondis (fig. 7). La coloration de Gram a confirmé leur appartenance aux bactéries Gram négatif (fig.6). Ces résultats sont en accord avec la description donnée pour les *bradyrhizobium* isolés par (Vinuesa et al., 2005).



**Figure 6 :** La coloration de Gram

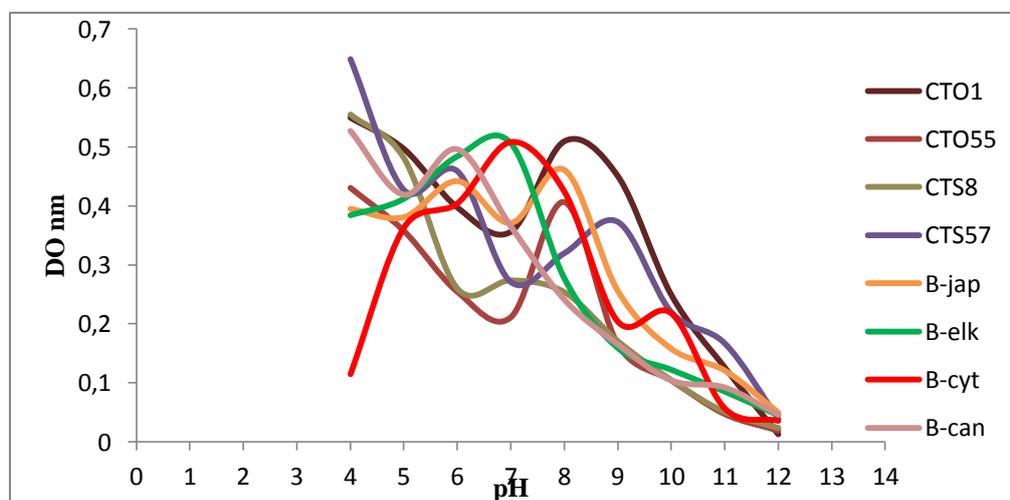


**Figure 7 :** Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique  $\times 40$ .

## 2. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudiée l'effet de quelques paramètres tels que ; le pH, la température et le NaCl sur la croissance des rhizobia isolées de nodules racinaire de *Cytisus villosus*.

### 2.1. Effet du pH sur la croissance des souches testées



**Figure 8 :** Effet du pH sur la croissance des souches testées.

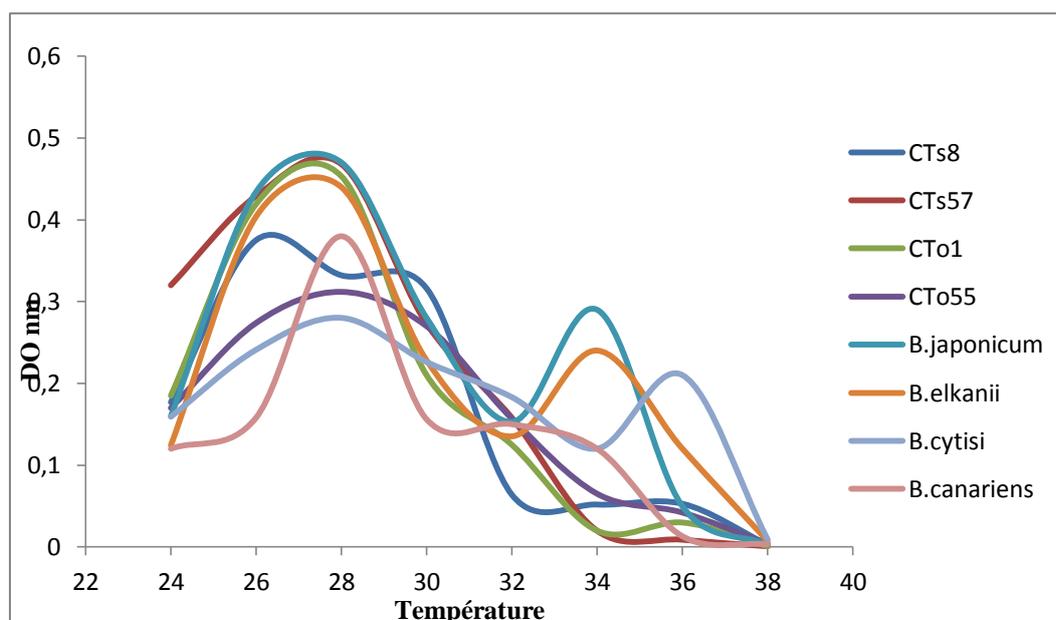
Les résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches sont présentés sur la (fig. 8). Ces résultats montrent que les souches sont plus sensibles à l'alcalinité qu'à l'acidité.

En effet, toutes les souches ont une bonne croissance à pH 4. Les souches de *Bradyrhizobium* sp nodulant *Cytisus* d'Algérie sont différentes de *Bradyrhizobium Cytisus* du Maroc qui ont un optimum de croissance à pH 7. Aucune croissance n'a été observée à partir de pH12.

Les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par Sanchez-Canizares et *al.* (2011). En effet, ces derniers ont isolé des souches de *Bradyrhizobium* nodulant *Lupinus mariae-josephie*, qui ont une bonne croissance situé entre pH 4 et pH 8. Il a été rapporté que la majorité des rhizobiums peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9 (Jordan, 1984 ; Zerhari et *al.*, 2000 ; Mâatallahet *al.*, 2002). Il a été rapporté par Raza et *al.* (2001) que les souches de rhizobia ont une très bonne croissance dans une large gamme (pH 4 à pH 10).

D'après, Correa et Barneix (1997), la résistance aux pH acide ou alcalin n'est pas corrélée avec le temps de croissance des souches et la capacité de produire des substances alcalinisantes ou acidifiantes du milieu.

## 2.2. Effet de la température sur la croissance des souches testées



**Figure 9 :** Effet de la température sur la croissance des souches testées .

Les résultats obtenus (fig. 9) montrent une variabilité du comportement des isolats de *Cytisus villosus* vis-à-vis de la température. En effet la majorité des souches montre une

croissance entre 24°C à 30°C avec un optimum de croissance entre 26°C et 28°C pour toutes les souches. Certaines d'entre elles résistent au delà de cette limite et leur croissance persiste même à 36°C, tel que *Bradyrhizobium* isolé par Chahboune et *al.* (2012), et qui nodule *Cytisus villosus* du Maroc.

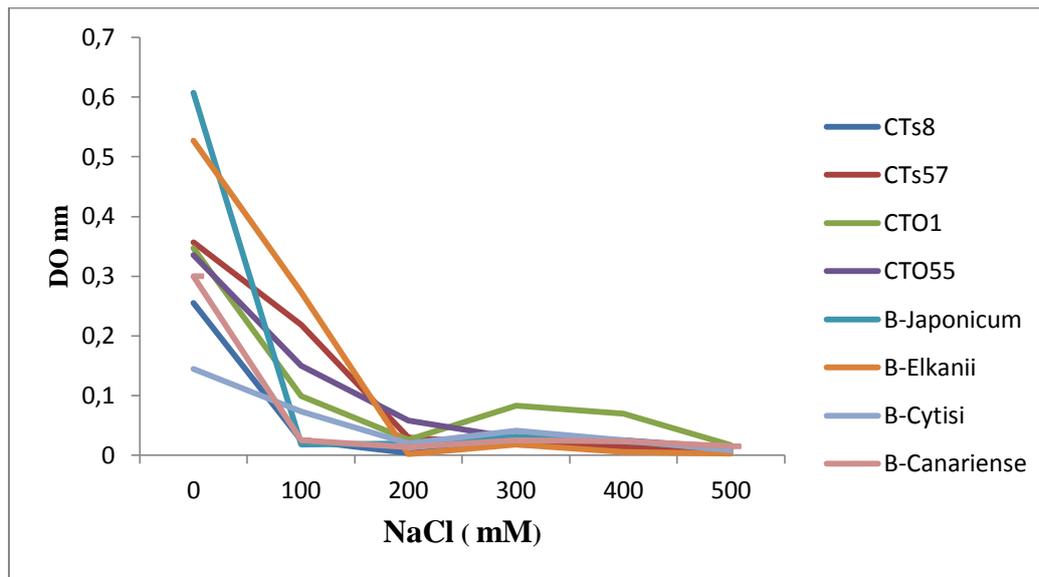
Ces résultats sont également en accord avec ceux de Graham (1992) et Zahran (1999), qui ont rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles pouvant se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance à environ de 28°C.

Les souches isolées de *Cytisus* d'Algérie sont plus sensibles à partir de la température 34°C comparées aux souches de référence particulièrement celles isolées de *Cytisus villosus* du Maroc. Il a été rapporté que les températures élevées engendrent la déshydratation et la dénaturation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation par fois irrévversible des enzymes (Cloutier et *al.*, 1992). Les travaux de Cloutier et *al.* (1992), ont montré la capacité des rhizobia à l'adaptation au choc thermique ce qui pourrait être expliqué par l'induction de l'expression des protéines de stress thermique HSP (Heat Shock Proteins).

Maatallah et *al.* (2002), ont signalé que la tolérance des rhizobia à la température n'est pas corrélée avec la température du site de prélèvement. Cependant, la température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat de cette espèce (El Hilali, 2006).

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

## 2.3. Effet du NaCl sur la croissance de souches testées



**Figure 10 :** Effet du NaCl sur la croissance des souches testées.

L'étude de l'effet du NaCl sur la croissance des souches (fig. 10), montre que toutes les souches présentent le même comportement vis-à-vis du NaCl. En effet à 0 mM toutes les souches ont une bonne croissance. A partir de 100 mM la croissance des souches diminue pour s'annuler à 200 mM pour la plus part des souches, alors que, CTO1 semble avoir un comportement différent des autres souches. En effet sa croissance reprend entre 300 et 400 mM, ceci pourrait être expliqué par une adaptation à la salinité. Le caractère halophile de CTO1 pourrait être intéressant pour la restauration des sols salins.

Ces résultats confirment ceux trouvés par (Jordan. 1982, Vinuesa et al., 2005, Chang et al., 2011, Chahboune et al., 2011, 2012, Wang et al., 2012, Guerroug et al., 2013). En effet, la croissance de la plupart des rhizobia particulièrement les *bradyrhizobiums* tels que *B. cytisi*, *B. refens*, *B. japonicum*, *B. canariense*, *B. arachidis*, *B. lablabi*, *B. retama* est affectée dans un milieu de culture contenant 100mM de NaCl.

Cependant d'autres travaux indiquent que certaines espèces de *Bradyrhizobium* telles que *B. daqingense*, *B. betae*, *B. huanghuaihaiens*, présentent une bonne croissance à 1% de NaCl (Zhang et al., 2011, Wang et al., 2012), tandis que certaines souches de *Sinorhizobium meliloti* peuvent proliférer entre 300 et 700 mM voire à 800 mM de NaCl. Ce caractère halophile a été également signalé chez les isolats d'*Acacia*, de *Prosopis* et de *Leucaena* qui tolèrent une concentration de NaCl entre 500 et 800 mM (Tilak et al., 2005). Il a été rapporté

que chez les rhizobia, le stress salin est une contrainte qui provoque la synthèse des exopolysaccharides, qui sont utiles pour l'adaptation (Hung et *al.*, 2005).

En outre, d'autres rhizobia s'adaptent aux stress salin par l'accumulation intracellulaires des corps organiques de faible poids moléculaires appelés les osmolytes ou osmoprotecteurs (Zahran, 1999).

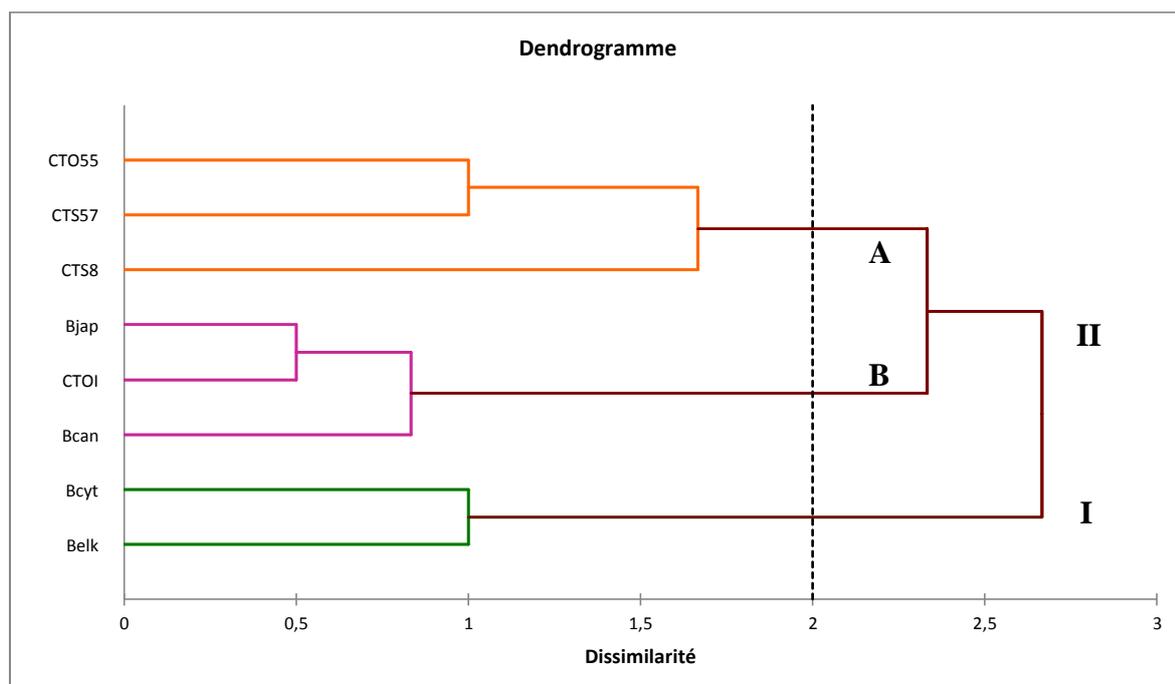
### 3. Analyse numérique des données de la caractérisation morphologique et physiologique.

L'analyse numérique a été établie à partir 28 caractères. Le calcul de coefficient de similitude a permis de classer les souches en fonctions de leurs ressemblances (tableau II).

**Tableau II** : coefficient de similitude inter-souches étudiées.

CTS8	100								
CTS57	79,5	100							
CTOI	79,5	83,6	100						
CTO55	79,5	83,6	83,6	100					
Bjap	73,5	75	91,9	75	100				
Belk	66,7	66,2	66,2	83,9	73	100			
Bcyt	79,5	67,3	67,3	67,3	75	83,9	100		
Bcan	79,5	67,3	83,6	83,6	91,9	83,9	83,6	100	
	CTS8	CTS57	CTOI	CTO55	B.jap	B.elk	B.cyt	B.can	100

Les résultats montrent que les souches de *Bradyrhizobium* isolées de *Cytisus villosus* d'Algérie sont différentes des autres souches de : *B. cytisi*, *B. elkanii*, *B. japonicum*, et *B. canariense*. Il est à noter que, CTO1 est la plus proche de *B. japonicum* (91,9), comme l'a montré l'étude phylogénétique et génotypique de Ahnia et *al.* (2014).



**Figure 11 :** Dendrogramme de la CAH de 4 souches de rhizobia isolées de *Cytisus villosus* de la région côtière Ouest de Bejaia, et de 4 souches référence, *B. cytisi*, *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. canariense*.

Les tests physiologiques et morphologiques sont convertis en une matrice (Annexe 3) qui a permis d'établir une classification ascendante hiérarchique CAH. Les résultats obtenus de cette analyse montre que les 4 souches testées y compris les souches références sont groupées en deux branches ; La branche **I**, regroupe *B. cytisi* et *B. elkanii* , la branche **II**, elle-même se divise en deux cluster **A** et **B**. Le cluster **A** est composée de CTO55, CTS57, CTS8, et le cluster **B** se compose de *B. japonicum*, *B. canariense* et la CTO1.

Ces résultats confirment ceux obtenus par l'analyse phylogénétique de Ahnia et *al.* (2014). En effet *B. japonicum* et CTO1 sont similaires et ont presque le même comportement vis -à -vis les caractères étudiés. CTS8, CTS57, et CTO55 sont différents des autres espèces étudiés.

### Conclusion et perspective

Dans ce travail nous avons réalisé une caractérisation des isolats bactériennes nodulant *Cytisus villosus* à travers plusieurs caractères cellulaires, morphologiques et physiologiques.

Les caractères morphologiques et cellulaires répondent aux critères des rhizobia connus dans la littérature.

Les caractères physiologiques ont révélé une diversité de réponse vis-à-vis des facteurs abiotiques testés à savoir le pH, la température et la salinité. La plupart des souches y compris les souches de référence présentent une bonne croissance entre pH 4 et pH 8, et pour certaines allant jusqu'à pH 9. Ces souches présentent également une bonne croissance entre 24°C et 30°C avec un optimum à 28°C pour certaines souches. Pour la salinité, la croissance des souches est diminuée à partir de 100 mM. CTO1 est la seule souche qui présente une croissance entre 300 et 400 mM. Ceci pourrait être exploité dans la restauration des sols salins.

En perspective, il serait intéressant d'élargir cette caractérisation sur d'autres rhizobia isolées de *Cytisus* et autres *Genisteae* des régions arides et semi-arides.

### Références bibliographiques

#### -A-

- **Ahnia H. (2015).** caractérisation phénotypique des endosymbiontes de *Cytisus* sp. Thèse de magister. Département des Sciences Biologique de l'Environnement. Université de Bejaia. Algerie .p76.
- **Ahnia H., Boulila F., Boulila AG., Bouchaffa K., Duran D., Bourbaba Y., Salmi A., Imperial J., Ruiz-Argueso T., Rey L. (2014).** *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie van leeuwenhoek* **105**:1121-1129.
- **Amrani S., Noureddine N.E., Bhatnagar T., Argandoña M., Nieto J.J., Vargas C. (2010).** Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. In nurseries from Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*. **33**: 44-51.

#### -B-

- **Baudoin J.P. (2001).** Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001 **5** (4) pp 221-230.
- **Babo B.V. (2002).** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor. Université Laval, Québec. P167.
- **Ben Khaled L., Asunéin M.G., Honrubia A.O. (2003).** Effet de stress salin en milieu hydroponique sur le tréfle inoculé par le rhizobium .*Agronomie* .**23**.pp.553-560.
- **Bordileau L.M et D. Prevost. (1994).** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments plant *Soil*.**161**.pp.115-124.
- **Boukhatem Z.F., Domergue O., Bekki A., Merabet C., Sekkour S., Bouazza F., Duponnois R., de Lajudie P., Galiana A. (2012).** Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. *FEMS Microbiology Ecology*. **80**: 534–557.
- **Boukli N.M., Sunderasan E., Bartsev A., Hochstrasser D., Perret X., Bjourson A.J., Krause A., Brouhton W.J. ( 2006).** Early legume responses to inoculation with *Rhizobium* sp. NGR234. *Journal of plant physiology*. pp 1-13.

## Références bibliographiques

---

- **Boulila F., Depert G., Boulila A., Belhadi D., Benallaoua S. et Laguerre G. (2009).** *Retama* species growing in defferant ecological-climatic areas of northastern Algeria have a narrow range of rhizobia than form a novel phylogenic clade with in the *Bradyrhizobium* genus. *Systimatic and Applies Microbiology*. 32, 245,255.
- **Brewin N.J., Downie J.A., Young J.P.W. (1992).** Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology*. M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York 3 pp 239-248.

-C-

- **Chahboune R., Carro L., Peix A., Ramírez-Bahena M.H., Barrijal S., Velázquez E., Bedmar E.J. (2012).** *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. Isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**,302-305.
- **Chang Y.L., Wang J.Y., Wang E.T., Liu H.C., Sui X.H. et Chen W.X. (2011).** *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *arachis hypogaea* grown in Southern China. *International journal of systematic and Evolutionary Microbiology*. Epub ahead of print. doi : 10. 10099/ijs. 0.027110-0.
- **Chopra C., Abrol B.K. et Handa K.L. (1960).** Les plantes médicinales des régions arides considérée surtout de point de vue botanique. UNESCO, Paris .p 75.
- **Cindy H., Thomas W., Wood K., Ashok M., Wilfred C. (2006).** Engineering plants Microbe symbioses for rhizoremediatoin of heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*. **72** (2), pp. 1129-1134.
- **Cleland E.E., Harpole W.S. (2010).** *Nitrogen enrichment and plant communities*. Academy of Sciences, New York. 1195. pp. 46-61.
- **Cloutier J., Prévost D., Nadeau P. et Antoun H. (1992).** Heat and temperate strains of rhizobia. *Applied and environnemental mocrobiology*. **58**(9), 2846 - 2853
- **Correa O.S. et Barneix A.J. (1997).** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 153-157.
- **Corre-Hellou G., Fustec J., Crozat Y. (2006).** Interspecific competition for soil N and its interactions with N<sub>2</sub> fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. *Plant and Soil*, **282**, 195-208.

### **-D-**

- **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Ed. INRA, Paris.
- **Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C. (2001).** *nod* Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica*. Minireview. Vol. 48 No. 2. p. 359–365.
- **de Faria S.M., Lewis G.P., Sprent J.I. et Sutherland J.M. (1989).** Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607-619.
- **Denarie J. (2000).** Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- **Dhane Fitouri S. (2011).** Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du *sulla* du nord (*Hedysarum conorarium L*) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut nationale agronomique de Tunisie. 149p.
- **Dobereiner J., Baldani V.L.D. et Reis V.M. (1995).** Enophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: *Azopsirillum VI* and related microorganisms. Ed. I.Fendrik, M.del gallo, J.Vanderleyden and M.de Zamarocy. Springer verlag, Berlin, Germany.p. 3-14.
- **Duhoux E. et Nicole M. (2004).** Biologie végétale : association et interaction chez les plantes .Edition : Dunod. Paris .166p.

### **-E-**

- **EL-hilali I. (2006).** *la symbiose Rhizobium-Lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi infection nodulaire chez Lupinus luteus*. Thèse de doctorat en microbiologie et biologie moléculaire. University de Mohamed V – Agdal, Rabat. 231p.
- **Elmerich C. (1993).** Fixation de l'azote et interactions bactéries-plantes. [www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr)

### **-F-**

- **Ferry M. (1990).** Concurrence et complémentarité des espèces végétales dans les oasis CIHEAM – Option Méditerranéennes. Institut National de la recherche Agronomique, France.1, 261-270.

## Références bibliographiques

---

- **Franche C., Lindstrom K., Elmerich C. (2009).** « Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. » *Plant and Soil* 321(1-2): 35-59.

### -G-

- **Gage D.J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* **68**: 280-300.
- **Gage D. et Margolin W. (2000).** Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current. Op. Microbiol*, **3**(6): 613–7.
- **Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C. (2008).** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics.* **42**: 413–441.
- **Giraud E. et Fleischman D. (2004).** Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Research.* **82**: 115–130.
- **Graham P. et C. Vance (2003).** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant. physiol.* **131**, 872- 877.
- **Graham P. H., Sadowsky M.J., Kersters H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W and Young J.P.W. (1991).** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 582-58.
- **Guerrouj K., Ruíz-Díez B., Chahboune R., Ramírez-Bahenad M.E., Abdelmoumen H., Quiñones M. A., Missbah El Idrissif M., Velázquez E., Fernández-Pascualb M., Bedmarh E.J., Peix A. (2013).** Definition of a novel symbiovar (*sv. retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp.nov. nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst. Appl. Microbio.*
- **Guignard J.L., Dupont F., (2005).** Botanique. 13<sup>ème</sup> Edition Masson.

### -H-

- **Harley pp.J., Klein D.A., Laansing M.P., Willey J.M., Woolverton C.J. (2010).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires. 3<sup>ème</sup> édition 2008 original. French edition 2010. pp.376-379.
- **Hirsch A.M., Lum M.R. et Downie J.A. (2001).** What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant. Physiol.* **127**, 1484-1492.

## Références bibliographiques

---

- **Hopkins W.G. (2003)** - Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Ed. de boeck.
- **Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P. et Young C.C. (2005).** Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia*. **49(6)**, 577-584.

### -J-

- **Ishurda O., Kermagie A., Zgheel F., Flefla M., Elmabruk M., Yalin W., Kennedy J.F. et P.Yuanjiang. (2004).** Structural aspects of water-soluble galactomannans isolated from the seeds of *Retama raetam*. *Carbohydrate polymers*. **58**, 41-44.

### -J-

- **Janati A. (1990).** Les cultures fourragères dans les oasis. Centre régional du Haouz-présahara, Marrakech (Maroc). Les systèmes agricoles oasiens. INRA. Paris. 11 pp. 163-169.
- **Jordan D.C. (1984).** Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In : N.R. Kreig and J.H. Holt (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.1. The Williams & Wikins Co. Baltimore.
- **Journet E.P., van Tuinen D., Gouzy J., Crespeau H., Carreau V., Farmer M.J., Niebel A., Schiex T., Jaillon O., Chatagnier O., Godiard L., Micheli F., Kahn D., Gianinazzi-Pearson V. et Gamas, P. (2002).** Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Res* **30**, 5579-5592.
- **Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A., Stevens P. (2001).** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

### -K-

- **Kape R., Parniske M., Werner D. (1991).** Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol*. 57 pp 316-319.
- **Kinkima M., Scott P.T. et Gresshoff M. (2006).** Legum nodulation; successful symbiosis through short and long distance signaling. *func .plant BIOL* .33.PP.707-721.

### -L-

- **Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C., Denarie J. (1990).** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. **344**, 781-784.
- **Lévêque C., Mounoulou J.C. (2001).** Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod, Paris.
- **Lewis G., Schrire B., MacKinder B., Lock M. (2005).** Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
- **Lograda T., Chaker A.N., Chalard P., Ramdani M., Chalchat J.C., Silini H. et G.Figueredou. (2009).** Chemical composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Genista numidica* Spach. and *G. saharae* Coss et DUR. *Asian Journal of plant Sciences* 8(7):495-499, 2009.

### -M-

- **Maâtallah J., Berraho E. B., Munoz S., Sanjuan J., et Lluch C. (2002).** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. **22**, 321-329.
- **Magherani M., Zeegwagh N.A., Haloui M. et Eddouks M. (2005).** Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**, 31-35.
- **Marote-Gaudry J.F. (1997).** Assimilation de l'azote chez les plantes, aspect physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris. 422p.
- **Mathesius U., Charon C., Rolfe B.G., Kondorosi A et Crespi M. (2000).** Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions. Australian National University, Canberra.
- **Merabet C., Bekki A., Benrabah N., Bey M.B.H., Bouchentouf L., Ameziane H., Rezki M.A., Domergue O., Cleyet Marel J.C., Avarre J.C., Béna G., Bailly X., Lajudie de P.h. (2006).** Distribution of *Medicago* species and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and Management*. **20**: 219–231.
- **Michels J., Verreth C. et Vanderleyden J. (1994).** effects of temperature stress on bean nodulating rhizobium strains. *Applied and environmental microbiology*. **60**(4), 1206 - 1212

## Références bibliographiques

---

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

### -N-

- **Neyra M. (1997).** Des microbes aux services des écosystemes.*Microbiologie.Cahier ORSTOM.Dakar*.11.pp.201-205.

### -O-

- **O'Hara G.W., Howieson J.G., Graham P.H. (2002).** Nitrogen fixation and Agricultural Practice.Ed.Elsevier.pp.391-420.

### -P-

- **Patriarca E.J., Tatè R., Ferraioli S. et Iaccarino M. (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* **234**,201-262.
- **Peret B. (2007)** - Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II. France.
- **Perret X., Staehelin C., Broughton WJ. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **64**: 180–201
- **Piha M.I. et Munns D.N. (1987).** sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbiosis to highsoil temperature. *Plant soil.* **98(2)**, 183 – 194.
- **Pinochet X., Salon C., Jeuffroy M. H., Touraine B. et Cleyet-Marel J. C. (2006).** Amélioration de la gestion de l'azote par les bactéries favorables à la croissance des plantes. Académie d'Agriculture. 25 octobre 2006.
- **Pujic P., Normand P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantesactinorhiziennes. *Biofature* 298 pp 26-29.

### -R-

- **Raza S., Jørnsgard B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L. (2001).** Tolerance of Bradyrhizobium sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* **32 (6)**:379-383.
- **Richter G. (1993).** Métabolisme des végétaux. *Physiologie et biochimie.* Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp 341-352.

## Références bibliographiques

---

- **Rispail N., Kalo P., Kiss J.B., Noel Ellis T.H., Gallardo K., Thompson R.D., Prats E., Larrainainzar E., Ladrera R., Gonzalez E.M., Arese-Igor C., Ferguson B.J., Gresshoff P. M., Rubiales D. (2010).** Model legumes contribute to faba bean breeding. *Fiel. Crop. Resea.* **115**, 253-269.
- **Roger P. (1996).** La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement ? Conference debats de l'ORSTOM. Paris Xe France. *Academy of Sciences.* **1195**: 46–61.

-S-

- **Sanchez-Canizaresa C., Rey L., Duran D., Temprano F., Sanchez-Jiméneza P., Navarroc A., Polajnard M., Imperiala J, Ruiz-Argüeso T. (2011).** Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi*, from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst and App Microbiol.* **34**, 207–215.
- **Sanchez F., Padilla J.E., Hector P. and Lara M. (1991).** Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annu .Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 507-528.
- **Santa S., Quezel P. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des région désertiques méridionales. CNRS, Paris. France. pp : 15-475
- **Saoudi M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Département de Biologie Végétale. Université Mentouri de Constantine. Algérie. p99.
- **Savka M.A., Dessaux Y., Oger P., Rossbach S. (2002).** Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Mol Plant Microbe Interact.* **15**: 866-874.
- **Segovia L., Pinero D., Palacios R. et Martinez Romero E. (1991).** Genetic structure of a soil population of non symbiotique *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**. pp.426-433.
- **Schultze M., Kondorosi A. (1998).** Regulation of symbiotic root nodule development. *Ann. Rev. Genet.* **32**, 33-57.
- **Somasegaran P. et Hoben H.J. (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc p.450.

## Références bibliographiques

---

- **Sprent J. I. and R. Parsons (2000).** « Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. » *Field Crops Research* 65(2-3): 183-196.
- **Sprent J.I. (1995).** Legume stress and shrubs in the tropics ; N<sub>2</sub> fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 27(4/5) ;401-407.
- **Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J. et May G.D. (2006).** Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 9: 110-121.

-T-

- **Terefework Z. (2002).** Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Academic dissertation in microbiology. University of Helsinki. ISSN 1239-9469.
- **Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Mittal S., Tripathi A.K et Johri B.N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150.
- **Timmers A.C., Soupene E., Auriac M.C., Billy F., Vasse J., Boistard P. et Truchet, G. (2007).** Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 13, 1204-1213.
- **Tourte Y., Bordonean M., Henry M. (2005).** Le monde des végétales organisations, physiologie et génomique. Ed. DUNOD. Paris. France.
- **Tortora G.j., Funk B.R., Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc, Renouveau Pédagogique Inc. Montréal.p.968.

-V-

- **Van Brussel A.A., Bakhuizen R., van Spronsen P.C., Spain, H.P., Tak T., Lugtenberg B.J. et Kijne J.W. (1992).** Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Scien.* 257, 70-72.
- **Vinuesa P., Leon-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Perez-Galdona R., Werner D. et Martinez-Romero E. (2005).** *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 569-575.

### -W-

- **Wang J.Y., Zhang Y.H., Wang R., Liu H.C., Wang E.T., Sui X.H et Chen W.X** .(2012). *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from sobean nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 616-624
- **Wathman F. (1967)**. Fleurs du bassin méditerranéen. Ed. Paris VI.
- **Weir B.S. (2016)**.The current taxonomy of rhizobia.NZ rhizobia. (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>).
- **White R. (2010)**. International Legume Database and Information Service. New York. (<http://www.ildis.org>).

### -Z-

- **Zahran M.A. et Willis A.J. (2009)**. The végétation of Egypt. Springer Science + Business Media. Edition 2.pp:3-221.
- **Zahran H.H. (1999)**. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate .*Microbiology and molecular biology Reviews*. **63** (4) .pp.968-989.
- **Zakhia F.et P.de lajudie (2001)**. Taxonomy of rhizobia. Mini reviw *Agronomie*. **21**, T96-T76.
- **Zerhari K., Aurag J., Khbaya B., Kharchaf D. et Filali-Maltouf A. (2000)**. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 351-357.
- **Zhang X., Karsisto M. et Lindström K. (1992)**. Assessment of the competitiveness of fast-growing rhizobia infecting *Acacia Senegal* using antibiotic-resistance and melanin production as identification markers. *W. J. Microbiol. Biotech.* **8**, 199-205.

---

## Annexe 1

### I-Milieus de culture utilisés pour la culture des rhizobiums

#### 1. Composition du milieu YMA (Vincent, 1970)

Mannitol.....	10g
Extrait de levure .....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
NaCl.....	0,1g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Ajusté à un pH =6,8

Stérilisé à 120°C pendant 20 min

#### 2. Composition du milieu YMB (Vincent, 1970)

Mannitol .....	10g
Extrait de levure .....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
Eau distillée.....	1000ml

Ajusté à un ph =6,8

Stérilisé à 120°C pendant 20 min

## Annexe 2

### Moyenne des Do des différents tests effectués

#### 1. la moyenne des Do obtenue aux différentes températures

Température (°C)	24°C	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	36°C	38°C
<b>CTS8</b>	0,177	0,375	0,332	0,316	0,064	0,052	0,053	0,003
<b>CTS57</b>	0,32	0,429	0,468	0,273	0,158	0,002	0,001	0
<b>CTO1</b>	0,185	0,419	0,453	0,210	0,125	0,020	0,003	0,001
<b>CTO55</b>	0,170	0,274	0,312	0,270	0,157	0,065	0,042	0,004
<i>B-japonicum</i>	0,160	0,434	0,470	0,280	0,153	0,29	0,005	0,003
<i>B-elkanii</i>	0,174	0,404	0,440	0,228	0,135	0,24	0,12	0,007
<i>B-cytisi</i>	0,159	0,241	0,280	0,226	0,133	0,120	0,21	0,009
<i>B-canariense</i>	0,120	0,158	0,380	0,156	0,150	0,12	0,013	0,005

#### 2. La moyenne des Do obtenue aux différents pH

pH	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>CTS8</b>	0,555	0,481	0,260	0,274	0,254	0,171	0,105	0,051	0,024
<b>CTS57</b>	0,649	0,427	0,459	0,271	0,320	0,373	0,220	0,167	0,039
<b>CTO1</b>	0,549	0,496	0,397	0,356	0,509	0,450	0,249	0,126	0,013
<b>CTO55</b>	0,430	0,357	0,254	0,211	0,406	0,165	0,104	0,0470	0,019
<i>B-japonicum</i>	0,495	0,381	0,442	0,371	0,461	0,256	0,158	0,121	0,005
<i>B-elkanii</i>	0,384	0,412	0,484	0,506	0,277	0,159	0,122	0,085	0,045
<i>B-cytisi</i>	0,115	0,363	0,404	0,508	0,424	0,204	0,218	0,057	0,036
<i>B-canariense</i>	0,527	0,419	0,496	0,365	0,241	0,165	0,104	0,092	0,046

**3. La moyenne des Do obtenue aux différentes concentrations de NaCl**

<b>NaCl(Mm)</b>	<b>0mM</b>	<b>100mM</b>	<b>200mM</b>	<b>300mM</b>	<b>400mM</b>	<b>500mM</b>
<b>CTS8</b>	0,255	0,025	0,054	0,020	0,016	0,009
<b>CTS57</b>	0,355	0,219	0,030	0,018	0,014	0,010
<b>CTO1</b>	0,347	0,099	0,026	0,083	0,070	0,017
<b>CTO55</b>	0,335	0,150	0,058	0,029	0,025	0,013
<b>B-japonicum</b>	0,607	0,018	0,020	0,031	0,023	0,011
<b>B-elkanii</b>	0,527	0,273	0,023	0,018	0,006	0,003
<b>B-cytisi</b>	0,145	0,073	0,020	0,041	0,025	0,008,
<b>B-canariense</b>	0,300	0,025	0,014	0,025	0,023	0,015



## Résumé

Notre travail est porté sur la caractérisation physiologique des bactéries endosymbiotiques à intérêt environnemental. En effet, dans cette étude, un total de 4 souches représentatives d'une collection de *Bradyrhizobium* isolées à partir des nodules racinaires de *Cytisus villosus*, ont subi une caractérisation physiologique à savoir l'effet du pH, de la température et de la salinité sur leur croissance. Les résultats montrent que ces souches sont capables de pousser sur une large gamme de pH et de température. Cependant le NaCl affecte cette croissance.

**Mots clés :** caractérisation, symbiose, *Bradyrhizobium*, *Cytisus villosus*.

## Abstract

Our work is focused on the physiological characterization of endosymbiotic bacteria in environmental benefits.

Indeed, in this study, a total of 4 representative strains from a collection of *Bradyrhizobium* isolated from root nodules of *Cytisus villosus* have a physiological characterization namely the effect of pH, temperature and salinity on their growth.

The results show these strains are able to grow over a wide range of pH and temperature. However NaCl affects growth.

**Key words:** characterization, symbiosis, *Bradyrhizobium*, *Cytisus villosus*.

## ملخص

يتركز عملنا على التوصيف الفيزيولوجي للبكتيريا *endosymbiotiques* في مصلحة البيئة. في الواقع، في هذه الدراسة، تم عزل مجموع 4 سلالات تمثيلية من مجموعة *bradyrhizobium* من العقد الجذرية *Cytisus villosus*، و خضعت لتوصيف فيزيولوجي لمعرفة تأثير الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والملوحة على نموها.

أظهرت نتائج هذه السلالات أنها قادرة على النمو أكثر في مجموعة واسعة من درجة الحموضة ودرجة الحرارة، و أن كلوريد الصوديوم يؤثر على النمو.

**الكلمات المفتاحية :** توصيف, تعايش, *Bradyrhizobium*, *Cytisus villosus*