

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

Mémoire de fin de cycle

En vue d'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat
Option Génie Biologique

Thème

Isolement et caractérisation de bactéries
nodulant les légumineuses *Calycotome*
spinosa

Présenté par :

M^{elle} ISKOUNEN Tiziri

Membres de jury :

Président

:M. BENSAID K.

Promoteur :M. BELHADI D.

Examinatrice : M^{lle} SAIDANI K.

2011/2012



Remerciements

En premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements à Monsieur BELHADI Djellali, mon promoteur, enseignant à l'université de Béjaia, pour m'avoir si bien encadré, si généreusement, si efficacement conseillé et pour sa permanente disponibilité.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont l'amabilité de bien vouloir évaluer ce modeste travail.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux personnes qui m'ont épaulé et aidé dans la réalisation de mon travail au laboratoire et en dehors du laboratoire, je vous porte une éternelle reconnaissance.





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, prunelles de mes yeux, j'espère leur inspirer joie et fierté.

A mon très cher petit frère Mohand, que Dieu me le garde.

A mes cousins et cousines qui sont nombreux à citer.

A tous mes amis (es), qui se reconnaîtront, ou que vous seriez je ne vous oublierai jamais, votre place est dans mon cœur.

Glossaire

- **Cadufolié** : Qualifie les arbres dont les feuilles sont caduques, tombant à la mauvaise saison ; et par extension, une forêt de ces arbres.
- **Divariqué** : (botanique), divaricatus, écarté. Les rameaux d'une plante sont divariqués lorsqu'ils s'écartent beaucoup dès leur origine et se portent brusquement en différents sens; ainsi la chicorée sauvage, le cucubale baccifère, etc. Les panicules, les pédoncules sont quelquefois divariqués.
- **Glabre** : feuille lisse, sans poils.
- **Obovoïde** : La partie la plus large étant la plus éloignée du point d'attache.
- **Subsessile** : feuille (ou fleur) sans pétiole (respectivement, sans pédoncule).
- **Ubiquité** : ou l'**omniprésence** est la capacité d'être présent en plusieurs lieux simultanément.
- **Nanophanérophytes** : les tiges des ligneuses ne dépassent pas 0,5 m de hauteur.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma général de la symbiose	13
Figure 2 : Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé	19
Figure 3 : Photo de <i>Calycotome spinosa</i>	23
Figure 4 : Photo de la fleur de <i>Calycotomespinosa</i>	23
Figure 5 : Photos des différents types de nodules	28
Figure 6 : Aspect des colonies de souches appartenant aux deux groupes	30
Figure 7 : Effet du pH sur la croissance des souches étudiées	34
Figure 8 : Effet du NaCl sur la croissance des souches étudiée	35
Figure 9 : Photos des résultats du test acidification ou alcalinisation	37

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des bactéries nodulant les légumineuses et fixatrices d'azote.....	8
Tableau II : Concentrations en sels métalliques et volumes nécessaires.....	26
Tableau III : Répartition des souches par origine de prélèvement.....	28
Tableau IV : Caractères culturaux et cellulaires des souches étudiées.....	29
Tableau V : Résultats du test de nodulation.....	30
Tableau VI : Résultats de la résistance au cadmium	annexes
Tableau VII : Résultats de la résistance au zinc	annexes
Tableau VIII : Résultats de la résistance au plomb.....	annexes
Tableau IX : Les CMI des souches <i>vis-à-vis</i> des différents métaux lourds.....	34
Tableau X : Pouvoir d'acidification et d'alcalinisation	37
Tableau XI : Utilisation des substrats carbonés comme seule source de carbone.....	39

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

Etude bibliographique

I-Légumineuses	3
I-1 Généralités	3
I-2 Classification des légumineuses	4
I-2-1 Caesalpinoideae.....	4
I-2-2 <i>Mimosaideae</i>	4
I-2-3 Papilionideae	4
I-3 Intérêts des légumineuses	5
I-4 <i>Calycotome spinosa</i>	6
I-4-1 Caractères biologiques	6
I-4-2 Caractères diagnostiques	6
I-4-3 Données autécologiques	6
I-4-4 Usages et propriétés.....	7
II- <i>Rhizobium</i>	7
II-1 Généralités.....	7
II-2 Biodiversité des <i>Rhizobia</i>	8
III- Symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses.....	11
III-1 Fixation biologique de l'azote atmosphérique	13
III-1-1 Fixateurs libres	14
III-1-2 Fixateurs symbiotiques	14
III-2 Nodulation.....	15
III-2-1 Substances responsables de la nodulation	15
III-2-1-1 Flavonoïdes	15
III-2-1-2 Facteur Nod	15
III-2-1-3 Autres substances	16
III-2-2 Processus de nodulation.....	16
III-2-2-1 Pré échange de signal	16
III-2-2-2 Infection.....	16
III-2-2-3 Développement du nodule et maturation du bactéroïde.....	17

IV- Facteurs influençant la symbiose <i>Rhizobium</i> - légumineuses.....	20
IV-1 Stress thermique.....	20
IV-2 Stress salin	20
IV-3 Stress hydrique.....	21
IV-4 Acidité et l'alcalinité.....	21
IV-5 Effet du pH	22
IV- Autres facteurs	22

Matériel et méthodes

I- Récolte	23
II-Collecte des nodules.....	23
III-Extraction des <i>rhizobia</i> à partir des nodules	24
IV- Test de nodulation.....	24
IV-1 Préparation et germination des graines	24
IV-2 Préparation des plantules et inoculation	25
V-Caractérisation physiologique et biochimique	25
V-1 Distinction entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> (Test du 3-cétolactose).....	25
V-2 Résistance aux métaux lourds	25
V-3 Effet du NaCl	26
V-4 Effet du pH.....	26
V-5 Recherche de pouvoir acidifiant ou alcalinisant	26
V-6 Utilisation de différents substrats carbonés comme seule source de carbone.....	27

Résultats et discussions

I-Collecte des nodules	28
II-Isolement et purification.....	28
III-Caractérisation phénotypique des souches.....	29
III-1 Caractérisation culturelle et cellulaire	29
IV- Authentification des isolats.....	30
V-Distinction entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	31
VI-Résistance aux métaux lourds.....	31
V1-1Détermination des concentrations minimales inhibitrices	34
VII-Effet du pH	35
VIII-Effet du NaCl	36
IX-Pouvoir alcalinisant et acidifiant.....	37
IX-Utilisation de différents substrats carbonés comme seule source de carbone	38

Conclusion..... 40

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Introduction

A l'échelle de la biosphère, la quantité d'azote disponible est l'un des facteurs limitant majeurs de la croissance des plantes. Néanmoins, bien que l'atmosphère soit composée de 78% de di-azote, les plantes ne peuvent pas l'utiliser pour subvenir à leurs besoins. L'utilisation de cette source d'azote est limitée à certains procaryotes appelés diazotrophes (Guerroudj, 2009).

La nutrition azotée des légumineuses est d'autant plus difficile à étudier qu'elle résulte de la combinaison de deux voies très différentes, la fixation de l'azote atmosphérique et l'assimilation de l'azote minéral. La contribution de chacune de ces deux voies à l'alimentation en azote de la plante varie beaucoup selon les espèces et les conditions de la culture. L'amélioration de la production des légumineuses et leur utilisation en tant que précédent cultural nécessitent donc de mieux connaître les relations entre l'assimilation et la fixation de l'azote, d'une part, et l'influence des facteurs du milieu et des techniques culturales sur ces deux voies, d'autre part (L'Taief, 2009).

La symbiose *Rhizobium*-Légumineuse fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, et joue donc un rôle écologique et économique considérable (Sebihi, 2008).

Dans l'interaction plante – *Rhizobium*, on note un haut degré de spécificité. Une légumineuse entre en symbiose avec un nombre limité d'espèces de *Rhizobium*. En revanche, certains microsymbiotes s'associent avec plusieurs partenaires alors que d'autres ont une gamme d'hôtes étroite. Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques (El hillali, 2006).

La survie des *Rhizobia* dans le sol, la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action d'un certain nombre de facteurs du milieu tels que le déficit hydrique, les températures extrêmes, l'acidité et le stress salin (Wery, 1985).

L'utilisation des légumineuses est préconisée pour la restauration des sols dégradés, en jouant le rôle de plantes pionnières facilitant l'implantation d'autres espèces végétales. Pour cela, il est particulièrement recommandé de rechercher des couples symbiotiques "légumineuses-*Rhizobium*" les plus adaptés et les plus efficaces, pour les introduire en vue de coloniser ces sites pauvres.

En Algérie, la diversité des bactéries nodulant les légumineuses reste peu étudiée, c'est dans ce contexte que s'intègre notre travail, où nous avons entrepris pour la première fois une caractérisation des microsymbiotes de *Calycotome* poussant dans les différentes régions du nord de l'Algérie.

Ce travail est réalisé selon le plan suivant :

- Isolement des bactéries à partir des nodules.
- Etude des caractères cultureux.
- Test de nodulation.
- Etude comparative entre les isolats par une caractérisation phénotypique qui

comporte une série de tests :

- Test distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*.
- Recherche du pouvoir acidifiant ou alcalinisant.
- Test nutritionnel (source de carbone).
- Effet des facteurs abiotiques (pH, NaCl).
- Recherche des concentrations inhibitrices par certains métaux lourds.

Synthèse bibliographique

I- Légumineuses

I-1 Généralités

Les légumineuses constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun ayant un ovaire libre, constitué par un seul carpelle qui donne un fruit appelé gousse ou légume (Come et *al.*, 2006). Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*, avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.*, 2006).

Cette famille comprend plus de plantes herbacées annuelles que de plantes ligneuses ; elle colonise aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques. Cette famille présente une importance économique majeure ; de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo) (Saoudi, 2008).

La nodulation des légumineuses par les *Rhizobia* est un phénomène très fréquent. En effet, parmi les 20% de légumineuses étudiées, 97% des espèces de la sous-famille des Papilionacés (Faboideae) (pois, haricot, fève, lentille, ...etc), 90% de la sous-famille des Mimosoideae (robinier, glycine, acacia, ...etc) et 30% de la sous-famille des Caesalpinioideae (flamboyant, barbade, séné d'Alexandrie,...etc) sont nodulées (de Faria et *al.*, 1989).

L'ensemble du pourtour méditerranéen comprend une flore très riche en légumineuses adaptées aux diverses conditions pédoclimatiques de ces régions. Certaines ont développé des mécanismes d'adaptation particuliers, avec des systèmes racinaires puissants ou des cycles végétatifs incluant une période de dormance estivale. Système autonome où la bactérie fournit les composés azotés à la plante en échange des substrats carbonés, les associations symbiotiques fixatrices d'azote " *Rhizobium*-légumineuse " sont parfaitement adaptées à la revégétalisation de sites dégradés soumis à de fortes contraintes hydriques et pauvres en azote. Celles-ci constituent une première séquence de végétation contribuant à faire entrer l'azote atmosphérique dans l'écosystème sol-plante et à activer la formation d'un sol, véritable support d'une végétation pérenne et d'une réhabilitation durable (Domergue, 2006).

Les légumineuses entretiennent une relation très privilégiée avec la rhizosphère qui entoure leurs racines. L'effet rhizosphérique des légumineuses est 20 à 30 fois supérieur à

celui d'une betterave ou d'un colza. On entend par effet rhizosphérique, le ratio entre la microflore rhizosphérique, à l'interface racine/sol et la microflore du sol située à distance des racines (Waligora *et al.*, 2008).

I-2 Classification des légumineuses

En se basant sur la forme florale, la famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae* et *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinoideae*) (Guignard et Dupont, 2005). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000).

I-2-1 Caesalpinoideae

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

I-2-2 Mimosoideae

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.*, 2001).

I-2-3 Papilionoideae

Ils renferment plus de deux tiers des espèces et incluent presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995). Ils renferment les espèces cosmopolites et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus (Dhane Fitouri, 2011). Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd *et al.*, 2001).

I-3 Intérêts des légumineuses

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotée utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001). Au total un champ de trèfle fixe entre 50 et 100 Kg d'azote par hectare et par an. Le Soja et le Lupin, connus pour leur richesse en protéines, apportent au sol entre 300 et 500 kg d'azote par hectare et par an (Frontier et *al.*, 2004).

Cette fixation leur permet de produire en abondance des protéines végétales ce qui constitue une source très importante dans l'alimentation humaine et animale (Baudoin, 2001). En effet, la capacité des légumineuses à fixer l'azote rend inutile l'utilisation d'engrais azoté dont la synthèse, le transport et l'épandage contribuent à l'effet de serre (Dénarié, 2000). Leur utilisation joue également un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles. Dans les systèmes de culture utilisant les rotations, l'azote fixé par les légumineuses peut être utilisé d'abord par elles-mêmes, puis par les cultures suivantes qui peuvent bénéficier indirectement par l'entremise des résidus qu'elles laissent (Baudoin, 2001).

Les légumineuses servent également de cultures de fourrages, d'engrais verts et produisent un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures, des parfums et de substances antimicrobiennes (Grama, 2008).

L'introduction de légumineuses associées à leurs auxiliaires microbiens fixateurs d'azote ou améliorant la biodisponibilité d'éléments nutritifs, dans des sites dégradés fortement appauvris en éléments nutritifs, est une condition primordiale pour réussir l'installation de plants en milieu particulièrement contraignant, comme le sont les sites de carrière de calcaire après exploitation sous climat méditerranéen. Une stratégie de végétalisation basée sur l'ingénierie microbiologique de plants adaptés aux conditions locales, a été élaborée puis testée sur le terrain en grandeur nature dans le cas particulier de carrières de granulats calcaires (Brunel et *al.*, 2007).

Enfin, on peut noter aussi leur usage comme insecticide : la roténone, insecticide naturel obtenu à partir de plantes du genre *Derris*, est le seul utilisable en agriculture biologique (Sebihi, 2008).

I-4 *Calycotome spinosa*

Le genre *Calycotome* comprend trois espèces : *Calycotome Spinosa*, *Calycotome villosa* et *Calycotome intermedia*, se développent dans une ambiance bioclimatique subhumide inférieur à semi - aride supérieur. Leur présence renseigne sur la manifestation d'une certaine dégradation du sol. Il est réparti sur tous le bassin méditerranéen ; Espagne, sud de la France, Italie, Algérie, Tunisie, Maroc (Rameau et *al.*, 2008).

I-4-1 Caractères biologiques

Arbrisseau de 1 à 2 m, nanophanérophyte, caducifoliées hermaphrodite floraison d'avril à juin, pollinisée par les insectes (Rameau et *al.*, 2008).

I-4-2 Caractères diagnostiques (Rameau et *al.*, 2008).

Plante : dressée à rameaux épineux divariqués, striés, glabres.

Feuilles : trifoliolées, rapidement caduques, courtement pétiolées, noircissant à la dessiccation, folioles sessiles obovales, obtuses, souvent plus ou moins pliées en longueur, glabres dessus, pubescentes soyeuses en dessous, stipules très petites.

Fleurs : solitaires ou réunies par 2 à 4, naissant latéralement sur les rameaux, surtout vers le sommet au milieu d'un bouquet de feuilles.

Pédicelles : 1-2 fois plus long que le calice pourvu d'une bractée bitrifide au sommet.

Calice : velu soyeux, tronqué (par perte de la partie supérieure à l'épanouissement), corolle jaune, étendard glabre égalant la carène courbée légèrement pubescente intérieurement.

Gousses : longue de 3-4cm, large de 6-8mm, glabres, luisantes et noirs à maturité, suture supérieure seule, un peu aillé.

Fruit : contenant 4-8 graines brun jaunâtre.

I-4-3 Données autécologiques

Calycotome spinosa : espèce recherchant des stations chaudes et à comportement héliophile (aime la lumière), poussant sur des humus très variables, sols plus ou moins désaturés, pH proche de la neutralité à acide, sur des sols à réserves en eau limitées, souvent sur altérités,

siliceux, mais rarement sur matériaux marno calcaires, calcaire, serpentine (Rameau et *al.*, 2008).

I-4-4 Usages et propriétés

Calycotome est une plante mellifère, elle permet aux abeilles de produire du miel. Possède des feuilles et des fruits astringents, dont le pouvoir est de resserrer et d'assécher les tissus, ce qui permet de faciliter leur cicatrisation, mais, à part son pouvoir antimicrobien, c'est une plante ornementale. Ubiquiste elle contribue à la revégétalisation des sites désertiques et à l'amélioration de la fertilisation des sols, grâce à l'établissement d'une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (Rameau et *al.*, 2008).

II- *Rhizobium*

II-1 Généralités

Le premier critère pour l'existence du genre *Rhizobium* est leur capacité d'envahir les racines des plantes légumineuses et de stimuler la production des nodules. Le prestige de ces bactéries dans l'agriculture est expliqué par leur aptitude d'entrer dans un rapport symbiotique avec la plante hôte appropriée pour la fixation de l'azote atmosphérique (Torche, 2006).

Les *Rhizobia* sont des bactéries du sol, de forme bâtonnets, à Gram négatif. Phénotypiquement, ce sont les fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges des plantes légumineuses où ils se différencient en bactéroïdes (Graham, 1991 ; Haukka *et al.*, 1998 ; Gage, 2004).

Les *Rhizobia* forment un groupe paraphylétique où l'on trouve aussi bien des α -Proteobactéries appartenant aux genres *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Rhizobium* (Wang et Martinez-Romero, 2000) et des β -Protéobactéries appartenant entre autres aux genres *Burkholderia* (Moulin et *al.*, 2001), *Ralstonia* (Chen et *al.*, 2001) et *Methylotrypus* (Sy et *al.*, 2001).

II-2 Biodiversité des *Rhizobia*

Les *Rhizobia* sont connus comme des bactéries fixatrices d'azote ayant la faculté d'établir des relations symbiotiques avec plusieurs espèces de la famille des fabacées. Toutefois, une large population de *Rhizobia* non symbiotiques peut exister dans le sol ou dans la rhizosphère des plantes légumineuses (Segovia et *al.*, 1991 ; Sullivan et *al.*, 1996). Ils

peuvent également exister comme des cellules viables dans l'eau où ils sont capables d'infecter et de noduler des légumineuses aquatiques telles qu'*Aschynomene spp.*, et *Sesbania spp.* (Chaintreuil et *al.*, 2000 ; Wang et Martinez-Romero, 2000).

Pour qu'une légumineuse soit capable de fixer abondamment l'azote, elle doit être bien nodulée par des *Rhizobia* spécifiques et efficaces. L'abondance de ceux-ci dans un sol dépend de leurs caractéristiques physicochimiques (Gough, 2009). En effet, ces microorganismes élaborent différents mécanismes qui permettent leur adaptation aux changements rapides de l'environnement (Rolfe et *al.*, 2003).

La classification des rhizobiums, à l'image de la taxonomie bactérienne, est basée sur une approche polyphasique qui ne retient plus les propriétés symbiotiques comme critère taxonomique. En effet, une même légumineuse peut être nodulée par différentes espèces de rhizobiums (le soja est nodulé par *S. fredii* et *B. japonicum*) tandis qu'une même espèce peut regrouper des bactéries de spécificités d'hôte différentes (*R. leguminosarum* est divisé en trois biovars *bv. viciae*, *bv. trifolii* et *bv. phaseoli*) (Tableau I) (Boivin et *al.*, 1998) Les méthodes d'énumération des *Rhizobia* et la mesure de la diversité n'ont pas donné une description exacte ; le nombre peut être sous-estimé et la diversité pourrait aussi être masquée grâce aux divergences causées par le choix de la plante hôte et les facteurs du sol (Terefework, 2002).

Tableau I : Classification des bactéries nodulant les légumineuses et fixatrices d'azote, (Sebihi, 2008).

Espèce	Plante - hôte
Classe : Alphaproteobacteria	
Ordre : Rhizobiales	
Famille : Rhizobiaceae	
Genre: <i>Rhizobium</i>	
<i>R.leguminosarum</i>	
<i>biovar vicia</i>	<i>Pisum sativum, Vicia</i>
<i>biovar trifolii</i>	<i>Lathyrus, Lens</i>
<i>biovar phaseoli</i>	<i>Trifoliumpratense</i>
<i>R.tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris L</i>
TypeII A	<i>P.vulgaris L.,Leucaena</i>
Type II B	<i>P.vulgaris L.,Leucaea</i>
<i>R. etli</i>	

<i>biovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> ,
<i>biovar mimosae</i>	<i>Leuceana</i>
<i>R.hainanense</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>R.gallicum</i>	<i>Desmodium sinuatum et</i> <i>autres plantes de région arides</i>
<i>biovar gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>
<i>biovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>
<i>R mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>
<i>biovar orientalis</i>	<i>Galega officinalis</i>
<i>biovar officinalis</i>	
<i>R. giardinii</i>	
<i>biovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris L</i>
<i>biovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R.indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>
<i>R sullae</i>	<i>Hedysaum coronarium</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla, Amphicarpaea, Gueldenstaedtia Bioreactor</i>
<i>R. daejeonense</i>	<i>Nod+ on Medicago sativa</i>
<i>R. cellulolyticum</i>	
Genre : <i>Sinorhizobium</i>	
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>biovar meliloti</i>	
<i>biovar acaciae</i>	
<i>biovar medicaginis</i>	<i>M. Lasciniata, M. Sauvagei</i>
<i>S.fredii</i>	
<i>chemovar fredii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>chemovar siensis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Sinorhizobium xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>S. sahelense</i>	<i>Sesbania spp</i>
<i>biovar acaciae</i>	<i>Acacia spp</i>
<i>biovar sesbaniae</i>	<i>Sesbania spp</i>
<i>S. terangae</i>	
<i>biovar acaciae</i>	<i>Acacia spp</i>
<i>biovar sesbaniae</i>	<i>Sesbania spp</i>
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago spp</i>
<i>S. Kostense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
<i>S. americanum</i>	
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia</i>
<i>S. Kummerowiae</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>S. adhaerens</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i> <i>Sesbania, Medicago</i>

<p>Genre : <i>Allorhisobium</i></p> <p><i>A. undicola</i></p> <p>Famille : Phyllobacteriaceae</p> <p>Genre : <i>Mesorhizobium</i></p> <p><i>M. loti</i></p> <p><i>M. huakuii</i></p> <p style="padding-left: 40px;"><i>biovar loti</i></p> <p><i>M. ciceri</i></p> <p><i>M. tianshanense</i></p> <p><i>M. mediterraneum</i></p> <p><i>M. plurifarum</i></p> <p><i>M. amorphae</i></p> <p><i>M. chacoense</i></p> <p><i>M. temperatum</i></p> <p><i>M. septentrionale</i></p> <p><i>M. thioganicum</i></p> <p><i>M. albiziae</i></p> <p>Genre : Phyllobacterium</p> <p><i>P. trifolii</i></p> <p>Famille : Methylobacteriaceae</p> <p>Genre : <i>Methylobacterium</i></p> <p><i>M. nodulans</i></p> <p>Famille : Brucellaceae</p> <p>Genre : <i>Ochrobactrum sp.</i></p> <p><i>Ochrobactrum sp.</i></p> <p><i>Ochrobactrum lupini</i></p> <p>Famille : Hyphomicrobiaceae</p> <p>Genre : <i>Azorhizobium</i></p> <p><i>A. caulinodans</i></p> <p><i>A. johannense</i></p> <p><i>Azorhizobium sp</i></p> <p>Genre : <i>Devosia</i></p> <p><i>Devosia neptuniae</i></p> <p>Famille : Bradyrhizobiaceae</p> <p>Genre : <i>Bradyrhizobium</i></p> <p><i>B. japonicum</i></p> <p style="padding-left: 40px;"><i>biovar genistearum</i></p> <p style="padding-left: 40px;"><i>biovar glycinearum</i></p> <p><i>B. elkanii</i></p>	<p><i>Neptunia natans</i></p> <p><i>Lotus corniculatus</i></p> <p><i>Astragalus sinicus, Acacia spp</i></p> <p><i>Cicer arietinum</i></p> <p><i>Glycyrrhiza pallidiflora et autres plantes tropicales</i></p> <p><i>Cicer arietinum</i></p> <p><i>Acacia, Prosopis</i></p> <p><i>Amorpha fruticosa</i></p> <p><i>Prosopis alba</i></p> <p><i>Astragalus adsurgens</i></p> <p><i>Astragalus adsurgens soil (India, Clitoria ternatea)</i></p> <p><i>Albizia kalkora</i></p> <p><i>Trifolium pratense</i></p> <p><i>Crotalaria spp</i></p> <p><i>Acacia mangium</i></p> <p><i>Lupinus albus</i></p> <p><i>Sesbania rostrata</i></p> <p><i>Sesbania rostrata</i></p> <p><i>Sesbania virgata</i></p> <p><i>Sesbania rostrata</i></p> <p><i>Neptunia natans</i></p> <p><i>Glycine max. Glycine soja</i></p> <p><i>Glycine max</i></p> <p><i>Glycine max, Glycine</i></p>
---	---

<i>B. liaoningense</i> <i>biovar glycinearum</i>	
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza spp</i>
<i>B. betae</i>	<i>Bata vulgaris</i>
<i>B. canariense</i> <i>biovar genistearum</i> <i>biovar glycinearum</i>	<i>Genisteae et Loteae</i>
<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Vigna, Lupinus, Mimosa,</i> <i>Acacia, Aeschynomene</i>
Genre : <i>Blastobacter</i>	
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
Classe : Beta Proceobacteria	
Ordre : Burkholderiales	
Famille: Burkholderiaceae	
Genre : <i>Burkholderia</i>	
<i>Burkholderia sp</i>	<i>Machaerium lunatum,</i>
<i>B. caribensis</i>	<i>Aspalatus</i>
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B.tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Aspalatus carnosa</i>
Genre : <i>Wautersia (Ralstonia)</i>	
<i>W. taiwanensis</i>	<i>Mimosa spp</i>
Genre : <i>Herbaspirillum</i>	
<i>H. lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulagris</i>
Classe : Gamma-Proteobacteria	
Ordre : Enterobacteriales	
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Hedysarum carnosum,</i>
<i>Enterobacter Kobei</i>	<i>H. Spinosissimum,</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>H. Pallidum,</i>
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	
<i>Escherichia vulneris</i>	
Ordre : Pseudomonadales	<i>Hedysarum carnosum,</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>H. spinosissimum,</i> <i>H. pallidum</i>

III-Symbiose *Rhizobium*- légumineuses

La symbiose légumineuse- *Rhizobium* est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. Après les mécanismes complexes de reconnaissance entre les

deux organismes, la bactérie induit chez la plante la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires (Campa, 1998).

En effet, une espèce de *Rhizobium* n'infecte généralement qu'un nombre limité d'espèces de légumineuses et inversement. Par exemple, *Sinorhizobium meliloti* ne peut infecter efficacement que les plantes des genres *Medicago*, *Trigonella* et *Melilotus*. Cependant, le degré de spécificité varie largement (Denarié et al., 1992) allant de la quasi-exclusivité, comme dans le cas de l'association entre *Azorhizobium caulinodans*/ *Sesbania rostrata*, à un spectre d'hôte beaucoup plus large, comme c'est le cas pour la souche de *Sinorhizobium* NGR234 qui est capable de noduler plus de 112 espèces de légumineuses tropicales ainsi que la non-légumineuse *Parapsonia andersonii* (Teillet, 2008).

La symbiose légumineuse - *Rhizobium*) (figure 1) est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi au rhizobium pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven et al., 2000). Grâce à cette symbiose, les légumineuses sont capables de pousser dans des sols pauvres en azote minéral ou organique (Gough, 2009).

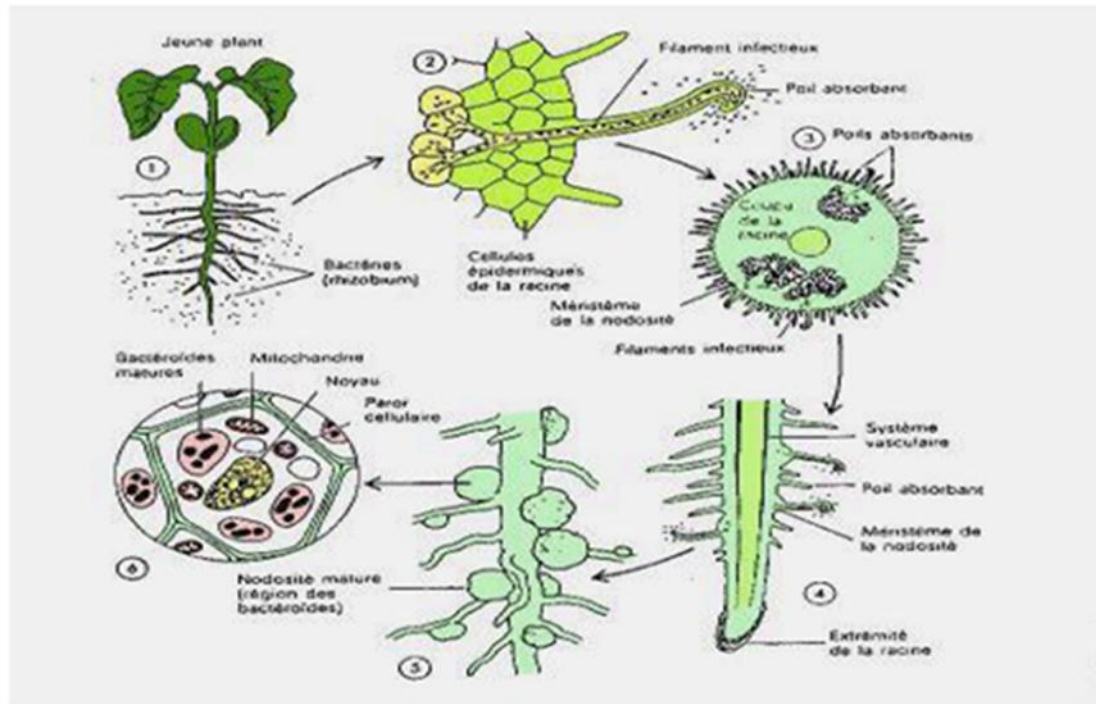


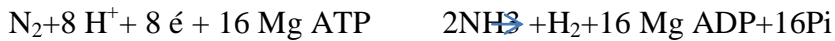
Figure 1 : Schéma général de la symbiose (Sebihi, 2008).

III-1 La fixation biologique de l'azote atmosphérique

L'assimilation du gaz carbonique par les organismes photosynthétiques et la fixation biologique de l'azote, par les bactéries diazotrophes, représentent les deux principaux phénomènes biologiques à la base du développement du monde vivant.

A l'échelle de la biosphère, la quantité d'azote est un facteur limitant majeur de la croissance des plantes. Néanmoins, bien que l'atmosphère soit composée de 78% de diazote, les plantes ne peuvent pas l'utiliser pour subvenir à leurs besoins. L'utilisation de cette source d'azote est limitée à certains procaryotes (cyanobactéries, actinomycètes, bactéries), appelées diazotrophes. Ces procaryotes arrivent à fixer l'azote directement de l'atmosphère grâce à leur capacité de synthétiser un complexe enzymatique dénommé nitrogénase en conditions de carence azotée. La fixation de l'azote atmosphérique peut être le fait de bactéries libres comme *Azotobacter* et *Azospirillum*, ou certaines cyanobactéries. Cependant, la fixation symbiotique de l'azote représente la plus grande part des apports d'azote au sol (Guerroudj, 2009).

Cette dernière est catalysée par le complexe nitrogénase. Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez des procaryotes (Eubactéries et Archaea). La réaction catalysée est la suivante :



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

Le complexe nitrogénase est sensible au dioxygène qui l'inactive de manière irréversible. Des mécanismes biologiques existent pour protéger l'enzyme de l'oxygène. La fixation de l'azote est un processus très coûteux en énergie ce qui impose une régulation. La transcription des gènes *nif* réprimée par l'ammonium, et aussi par le dioxygène, qui rend la fixation impossible en inactivant la nitrogénase (Svistenoff, 2003).

Certains diazotrophes régulent également la fixation au niveau post-traductionnel en inactivant le complexe enzymatique dès que des quantités suffisantes d'ammonium sont présentes ou quand la quantité d'ATP disponible devient insuffisante (Halbleib et Ludden, 2000).

Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres et ne requièrent pas d'hôte pour effectuer le processus. En revanche, d'autres fixateurs d'azote sont symbiotique et fixe l'azote seulement en association avec certaines plantes (Madigan et *al.*, 2007).

III-1-1 Fixateurs libres

Les bactéries de ce type se trouvent surtout dans les prairies ; elles sont en forte concentration dans la rhizosphère (Tortora et *al.*, 2003). A ce groupe appartiennent 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).

La majorité des bactéries libres fixatrices d'azote sont capables de fixer de grandes quantités de cet élément en laboratoire. Toutefois, dans le sol, la réduction de l'azote en ammoniac est limitée par la quantité de glucides disponible. Le rôle de ces bactéries dans la fixation biologique de l'azote dans les prairies, les forêts et la toundra arctique est néanmoins considérable (Tortora et *al.*, 2003).

III-1-2 Fixateurs symbiotiques

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

Les espèces fixatrices d'azote réellement, symbiotique sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les *Rhizobia*, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (Pelmont, 1995).

Les bactéries du genre *Rhizobia* jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes agricoles (Tortora et *al.*, 2003). C'est la symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique (Dénarié, 2000).

III-2-Nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien (Grama, 2008).

III-2-1 Substances responsables de la nodulation

De progrès dans la connaissance des mécanismes aboutissant à l'infection et à la formation d'un nodule ont montré qu'un dialogue moléculaire était à l'origine de la reconnaissance entre le symbionte bactérien et sa plante-hôte (Boivin et *al.*, 1998).

III-2-1-1 Flavonoïdes

Les flavonoïdes, sont des composés phénoliques exsudés dans la rhizosphère par les racines de la plante (Macheix et *al.*, 2005), incluent des isoflavones, des chalcones des flavonols, des flavones, des anthocyanidines et autres composés relatifs (Terefework, 2002).

Ils jouent un rôle majeur dans le processus infectieux. Ils stimulent chez les *Rhizobia* 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).

En plus à l'induction des gènes *nod*, les flavonoïdes semblent avoir des rôles multiples pendant plusieurs étapes du développement du nodule et de la plante (Terefework, 2002), et leur production est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle la plupart des nodules se développent plus tard (Broughton et *al.*, 2000).

III-2-1-2 Facteur Nod

En présence d'inducteurs végétaux (flavonoïdes, bêtaïnes), les protéines régulatrices NodD sont activées et induisent l'expression des gènes de structure. L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires ou facteurs Nod, qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules (Boivin et *al.*, 1998).

Tous les facteurs Nod décrits sont des molécules lipochitoooligosaccharidiques 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 (Boivin et *al.*, 1998).

La nature de l'acide gras et des autres décorations dépend de la souche ou de l'espèce de rhizobium (Boivin et *al.*, 1998). Ils jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Debellé et *al.*, 2001).

III-2-1-3 Autres substances

D'autres produits semblent être nécessaires pour le développement continu du filament d'infection et de l'organogenèse du nodule, et ceux-ci représentent un troisième ensemble de signaux. Parmi ce dernier, les polysaccharides extracellulaires, les lipopolysaccharides, les K-antigènes, les glucanes cycliques, les lectines et les protéines exportés par le système de sécrétion de type trois (Broughton et *al.*, 2000 ; Terefework, 2002).

III-2-2 Processus de nodulation

III-2-2-1 Pré échange de signal

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En présence des racines de l'hôte, la multiplication des bactéries et la colonisation de la rhizosphère sont accrues. L'attraction des bactéries par les racines des plantes hôtes semble d'abord impliquer un chimiotactisme positif (Hopkins, 2003). Dans des conditions limitantes en azote, les exsudats racinaires de la plante contiennent plusieurs substances, principalement des flavonoïdes qui sont capables d'activer la transcription des gènes *Nod* chez les *Rhizobia* (Waligora et al., 2008).

Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitinoooligosaccharides) (Dénarié, 2000). Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca et al., 2004). Les rhizobiums différents dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un premier niveau de contrôle de la spécificité de l'hôte (Moschetti et al., 2005).

III-2-2-2 Infection

Le processus infectieux dans la racine correspond à l'ensemble des événements qui sont associés à la pénétration des bactéries dans les cellules de la racine et leur progression vers le nodule en formation. Deux types d'infection peuvent être distingués : soit, elle débute entre les jonctions inter-cellulaires crack-entry comme dans le cas des nodules formés à la base des racines latérales chez *Sesbania rostrata*, soit elle débute dans les poils absorbants de la racine comme dans le cas des légumineuses tempérées telles que *M. truncatula* et *L. japonicus*. (Brewin, 2004 ; Gage, 2004 ; Patriarca et al., 2004).

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Perry et al., 2004). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005).

Le rhizobium s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (Bélanger, 1998).

Cette interaction induit une déformation du poil absorbant à 360° appelée « crosse de berger ». Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (Machrafi, 2001). En réponse, le poil absorbant sécrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi ; la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (Dupuy et Nougier, 2005). Les *Rhizobia* envahissent la racine en digérant la paroi des cellules du poil absorbant et forment un filament infectieux qui croît comme intrusion dans les cellules hôtes (Brewin et al., 1992).

III-2-2-3 Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Au niveau du cortex, outre la déformation de cordons d'infections chez certaines plantes, la division cellulaire entraîne la formation d'un primordium nodulaire (Cullimore et al., 2001). Les cordons d'infection traversent les couches cellulaires pour atteindre le primordium nodulaire, à l'intérieur duquel sont relarguées les bactéries (Gage et Margolin, 2000). Le primordium se développe ensuite en nodule, alors que les *Rhizobia* se différencient en bactéroïdes, séparés du cytoplasme des cellules végétales par une membrane pér bacté rienn e. L'unité fixatrice d'azote formée par le bactéroïde, l'espace et la membrane pér bacté roïdiens, appelé symbiosome (Cermola et al., 2000).

Deux types de nodules (allongés ou ronds) sont définis en fonction de la localisation du système vasculaire (racine ou tige) et du niveau de persistance d'une zone méristématique ; La forme allongée (nodule indéterminé) (figure 2) étant liée au maintien d'un méristème apical et la ronde (nodule déterminé) en une absence de méristème apical (Domergue, 2006). Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).

Au sein des nodosités, une protéine spécifique appelée leghémoglobine est formée par synthèse de globine par la plante et d'hème par le *Rhizobium*. La fonction de la leghémoglobine est de maintenir une pression en oxygène à un niveau assez bas dans l'environnement de la nitrogénase compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote (Domergue, 2006).

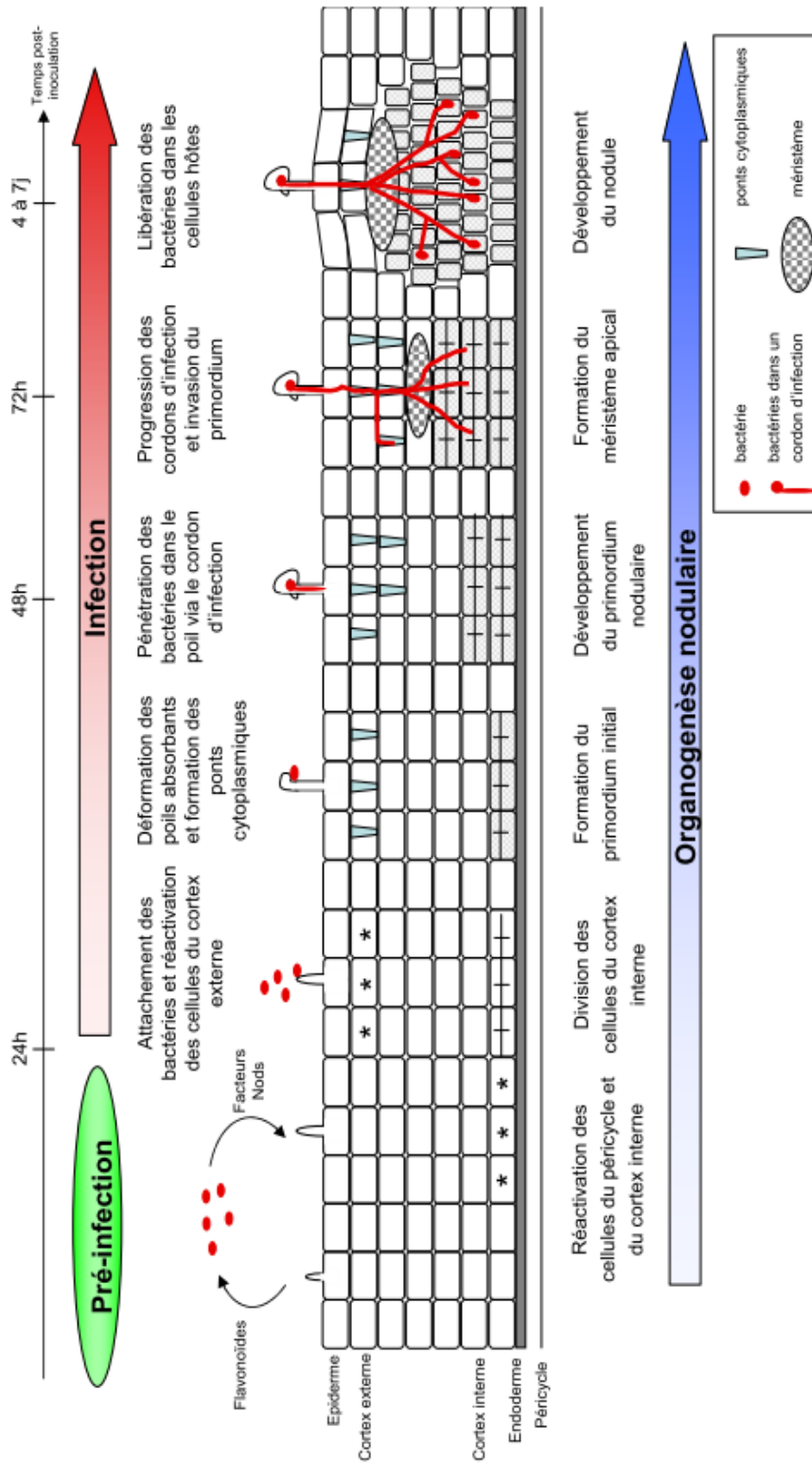


FIGURE 2 : DIFFERENTES ETAPES CONDUISANT A LA FORMATION D'UN NODULE INDETERMINE (TEILLET, 2008)

IV-Facteurs influençant la symbiose *Rhizobium*-légumineuses

La survie des *Rhizobia* 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 (Guy, 1987). 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 fixatrice de l'azote après symbiose (Collavino et al., 2005 ; Kinkema et al., 2006).

IV-1- 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 développent 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* capables de s'adapter à de fortes températures pouvant atteindre 45°C ont été décrites, ces souches sont devenues non infectives par perte de leurs plasmides symbiotiques (El hillali, 2006).

Une température élevée des sols pourrait donc contribuer à la présence de souches non infectives 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).

IV-2 Stress salin

La tolérance des *Rhizobia* à la salinité est plus ou moins importante ; certaines souches sont inhibées en culture pure à des concentrations en sel de 100 mM alors que d'autres tolèrent des concentrations supérieures à 400 mM (Domergue, 2006). Mais généralement il est admis que la salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote, au moins en partie, en limitant le fonctionnement des nodosités par une baisse de leur conductance à la diffusion de l'oxygène. En plus, dans les régions arides et semi-arides, la salinité est un facteur majeur de la détérioration du sol et le rend impropre pour l'agriculture (Saadallah et al., 2001).

Le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont très perturbés par le stress osmotique qui affecte à la fois les populations rhizobiennes, la plante hôte et la relation symbiotique. L'initiation nodulaire est extrêmement sensible à la contrainte osmotique en raison de la réduction des sites d'infection de la racine, du nombre de poils racinaires et de la proportion de ceux qui portent les cordons d'infection. Toujours en réponse à cette contrainte, un épaissement important des cortex nodulaires externe et interne est observé chez la luzerne. Parallèlement, les cellules non infectées contiennent de très nombreux amyloplast, alors que les nodules développés en présence de en sont totalement dépourvus (L'Taief, 2009).

IV-3 Stress hydrique

La sécheresse exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixé, car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige (Dommergues et *al.*, 1998).

En effet, le déficit hydrique modifie la structure et le fonctionnement des nodosités qui résulte de la modification des barrières à la diffusion d'oxygène, toutes fois, l'excès d'eau entraîne une baisse de diffusion d'oxygène vers les nodosités (Guy, 1987). Ainsi, il influe sur la photosynthèse en réprimant le saccharose synthase et en diminuant la quantité de substrat carboné nécessaire pour la respiration (Torche, 2006).

IV-4 Acidité et alcalinité

L'acidité du sol est un problème significatif se posant à la production agricole dans beaucoup de secteurs du monde et limite la productivité des légumineuses. La plupart des légumineuses exigent un sol neutre ou un sol légèrement acide pour leur croissance, particulièrement quand elles dépendent de la fixation d'azote symbiotique (Guy, 1987).

L'acidité du sol affecte tous les aspects de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote (Dhane Fitouri, 2011).

Caetano-Anolles et *al.* (1989), ont montré que l'acidité perturbait plus particulièrement l'adhésion des bactéries à la surface des poils racinaires, lors de la phase d'infection.

IV-5 Effet du pH

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides 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 *Rhizobia* 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).

IV-6 Autres facteurs

D'autres facteurs du sol (édaphiques) jouent aussi un rôle important :

Le manque du phosphore limite sévèrement la formation des nodules et la fixation de l'azote. Tandis que des concentrations basses de malate et du succinate stimulent la fixation de N_2 et des concentrations modestes de ces acides dicarboxyliques sont inhibitrices (Prell et Poole, 2006).

Il existe un rapport négatif entre l'azote minéral contenu dans le sol et le taux de fixation. La richesse du sol en azote devient alors un facteur inhibiteur de la fixation biologique ; la synthèse de la nitrogénase est inhibée par la présence d'ions ammoniums ou nitrates, à un certain degré, dans le sol (Pietsch et al., 2007). C'est ainsi que s'expliquent les effets répressifs des engrais azotés sur la fixation de l'azote de l'air. La nature du sol et la disponibilité des éléments nutritifs influencent l'activité des *Rhizobia* et de la plante et l'efficacité de l'activité symbiotique (Bado et al., 2002).

Matériel et méthodes

I- Récolte

Des plantes appartenant à *Calycotome spinosa* sont récoltées de trois zones géographiques de la région de Béjaia à savoir Ait amer ouzeguen (Chellata), Azouna (Thirourdha) et Thawrirth (Semaoun).

Les différentes parties de la plante sont représentées sur les photos 3 et 4.



Figure 3 : Photo de *Calycotome spinosa*



Figure 4 : Photo de la fleur de *Calycotomespinosa*

II-Collecte des nodules

La collecte est réalisée selon la méthode décrite par Beck et *al.* (1993), elle est faite séparément à partir des racines de chaque plante.

Après avoir séparé la partie racinaire du reste de la plante, celle-ci est lavée abondamment à l'eau pour la débarrasser du sol adhérent. Les racines sont ensuite coupées à 1 à 2 mm du site d'attache des nodules.

III-Extraction des *Rhizobia* à partir des nodules

Les nodules récupérés auparavant sont rincés avec de l'eau pour enlever l'excès de terre, puis plongés dans un bain d'éthanol à 95% pendant 60 secondes, suivi d'un bain d'eau de Javel (5°) pendant 3 à 5 minutes. Les nodules sont ensuite rincés 4 fois avec de l'eau distillée stérile, pour les débarrasser de l'effet toxique de l'excès d'eau de Javel.

Les nodules ainsi stériles, sont transférés aseptiquement dans des tubes eppendorf, contenant 100µl d'eau physiologique stérile, ils sont ensuite broyés à l'aide d'un pilon stérile.

A partir du broyat nodulaire obtenu, des boites contenant le milieu YMA sont ensemencées par stries d'épuisement puis incubées à 28°C pendant 24h à plusieurs jours. Les colonies présentant une couleur, un aspect, un contour, une taille et l'élévation différents sont purifiées par repiquages successifs.

Les souches ainsi obtenues sont conservées à 4°C dans des tubes contenant le milieu YMA incliné et additionné de CaCO₃.

IV- Test de nodulation

Ce test est une première approche pour identifier les souches, il permet d'évaluer leur aptitude à former des nodules sur la plante hôte.

IV-1 Préparation et germination des graines

Après sélection des graines mures et saines, celles-ci sont mises dans un bain d'acide sulfurique pendant 24h sous agitation. Ce traitement permet de ramollir et de réduire l'épaisseur du tégument. Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer l'effet toxique de l'acide sulfurique.

Les graines ainsi stérilisées sont mises à germer dans des boites de Pétri contenant une eau gélosée stérile, puis elles sont mises à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à germination.

IV-2 Préparation des plantules et inoculation

Les graines ayant germé ont été transférées aseptiquement dans des tubes contenant 15ml du milieu Jensen stérile, à raison d'une plantule par tube. Ce dernier est recouvert avec du papier aluminium pour assurer l'obscurité à la partie racinaire.

Après transfert des plantules, elles sont ensuite inoculées par des suspensions bactériennes des souches à tester à raison de 1ml/tube.

V- Caractérisation physiologique et biochimique

V-1 Distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Test du 3-cétolactose)

Ce test permet de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium* (Jordan, 1984). Il se base sur l'oxydation de C3 du glycosyl des saccharides.

Les différentes souches sontensemencées sur milieu M1 (Annexe) puis incubées à 28°C pendant 72h. Un ose de culture obtenue sur ce milieu est ensuiteensemencé sur milieu solide M2 (annexe), puis incubées pendant 48h à 28°C. Après inondation du milieu par le réactif de Benedict (annexe) et incubation à température ambiante, la présence du 3-cétolactose se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu₂O autour des colonies après 1 heure. Le diamètre du halo est de 2 à 3cm, jaune comparativement avec le fond bleu du réactif de Benedict. Seules les souches d'*Agrobacterium sp*, produisent l'enzyme 3-cétoglucosidase.

V-2 Résistance aux métaux lourds

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister au plomb, cadmium et zinc. Des concentrations variables Tableau II de chaque sel métallique sont testées sur milieu YMA. L'ensemencement est réalisé en spot avec un volume de 10µl d'une préculture de 48h pour chaque souche et pour chaque concentration. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 24h. Trois répétitions sont prévues pour chaque concentration.

Tableau II : Concentrations en sels métalliques et volumes nécessaires

Cadmium µg/ml	V (µl)	Zinc µg/ml	V (µl)	Plomb µg/ml	V (µl)
12.5	23	200	140	400	590
25	46	400	280	800	1180
50	91	800	560	1600	2360
100	185	1600	1120	2400	3540
200	368	2400	1680	3200	4720
400	731	/	/	4000	5900
/	/	/	/	4800	7080

V-3 Effet du NaCl

L'effet du NaCl sur la croissance des souches retenues a été testé sur milieu YMB additionné de concentrations variables à savoir : 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 et 800mM. Un témoin contenant 0,1 g/l de NaCl (YMB) est prévu.

Cette étude a été réalisée dans des tubes contenant 5 ml du milieu YMB, inoculés avec 50µl d'une préculture de 48h dont la Densité optique est ajustée à 0,1, à raison de trois répétitions par souche et par concentration. Les cultures sont incubées à une température de 28°C. Après 72 h d'incubation, la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à 630nm.

V-4 Effet du pH

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance au pH sur milieu YMB, ajusté à des pH allant de 4 à 10. Le milieu, inoculé avec 50µl d'une préculture de 48h (DO=0,1), trois répétitions sont réalisées pour chaque souche et pour chaque pH. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 72h et la croissance bactérienne est évaluée par la mesure de l'absorbance à 630nm.

V-5 Recherche de pouvoir acidifiant ou alcalinisant

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YMA a été évaluée par l'addition du bleu de bromothymol à une concentration de 0,0025 % (w/v). L'ensemencement est réalisé par stries chargées. Les boîtes inoculées sont incubées à 28C° pendant 48 heures. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration du milieu. Une coloration

jaune indique un pouvoir acidifiant et une coloration bleu foncé indique un pouvoir alcalinisant.

V-6 Utilisation de différents substrats carbonés comme seule source de carbone

L'assimilation de différents composés comme seule source de carbone est testée en utilisant le milieu YMA exempt de toute source de carbone et en remplaçant l'extrait de levure par NH_4Cl comme source d'azote. Les composés suivants ont fait l'objet de ce test : Lactose, Rhamnose, Xylose, sorbose, salicine, Adonitol, Mannose, Sorbitol, Dulcitol, Cellobiose, Methyl D mannoside, Levulose, Saccharose et Tween 80.

Après répartition du milieu, l'ensemencement est réalisé sous forme de spots. L'assimilation est révélée par l'apparition de colonies sur le milieu, après incubation à 28 pendant 72 h.

Résultats et discussions

I-Collecte des nodules

L'observation des nodules obtenus sur les différentes plantes nous a permis de constater la présence de formes variables (figure 5). Certains sont isolés et de formes allongés, d'autres sont bilobés ou en amas. Cette variation serait due à la différence entre les espèces rhizobiennes ayant nodulé ces légumineuses et à l'origine des sols de provenance des plantes.



Figure 5 : Photos des différents types de nodules sous la loupe grossissement 80*10

II-Isolement et purification

A partir des nodules collectés des différentes plantes, 10 souches sont isolées. La répartition de ces souches par origine de prélèvement est représentée dans le tableau suivant :

Tableau III : Répartition des souches par origine de prélèvement

Souche	Nodule	Plante	Station
T1	Indéterminé	Plante 1	Azouna
T2			
S1	Bilobé		
S2			
S3 1			
S3 2			
S4			
S5			
D	Indéterminé	Plante 2	Aït amer ouzeguen
B	Indéterminé	Plante 1	

Le tableau montre que la plupart des souches sont isolées de la plante 1, provenant de Azouna et particulièrement à partir des nodules bilobés (6 souches). On constate que les nodules indéterminés renferment moins d'espèces.

<

III- Caractérisation phénotypique des souches

1- Caractérisation culturelle et cellulaire

L'ensemble des isolats obtenus présente une forme ronde, un contour régulier et un diamètre allant de 0,5 à 5mm. La plupart présentent un aspect gluant et sont translucides tableau IV.

Tableau IV : Caractères cultureux et cellulaires des souches étudiées

Caractères Souches	Diamètre des colonies (mm)	Couleur et aspect des colonies	Temps d'apparition (jour)	Contour des colonies	
S1	1	Transparente	4	Arrondie à contour régulier	
S2	2,5	Opaque crème muqueuse	3		
S31	5	Translucide au centre opaque, crème gluante	3		
S32	4,5	Translucide au centre opaque, crème gluante	3		
S4	3,5	Translucide au centre opaque crème gluante	3		
S5	<1	Translucide crème muqueuse	6		
T1	<0,5	Translucide crème sèche	6		
T2	<0,5	Translucide crème sèche	6		
D	1	Translucide crème muqueuse	6		
B	<1	Translucide crème sèche	6		
P	/	Pas de croissance	/		/
F	/	Pas de croissance	/		/

En prenant pour critère la durée d'apparition des colonies, on constate que certaines apparaissent après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C (S2, S31, S32 et S4), tandis que d'autres apparaissent après 4 à 6 jours (S1, S5, T1, T2, B, D) (figure 6).

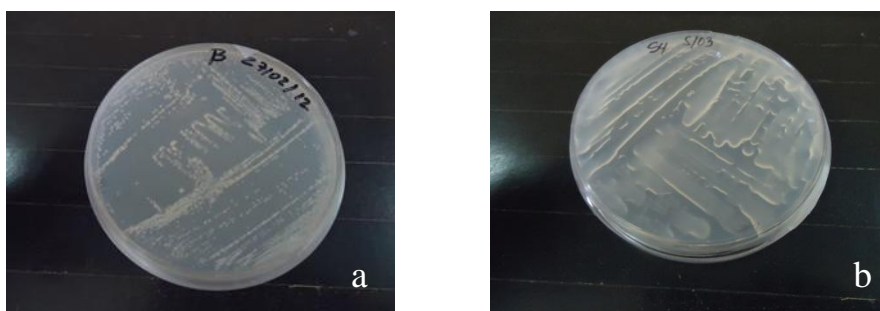


Figure 6 : Aspect des colonies de souches appartenant aux deux groupes

a : souche à croissance lente, b : souche à croissance rapide

D'après El hillali (2006), les souches à croissance rapide du genre *Rhizobium* forment des colonies circulaires convexes, généralement translucides avec un diamètre de 2 à 4 mm, après 3 à 5 jours, sous des conditions optimales d'incubation. En revanche, les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* forment des colonies circulaires convexes et rarement translucides avec un diamètre de 1 à 2 mm après 5 à 7 jours d'incubation. Des souches qui présentent un temps d'apparition intermédiaire ont été rapportées par Jarvis et *al.* (1997), ces souches ont été assignées au nouveau genre *Mesorhizobium*.

IV- Authentification des isolats

Après isolement et purification, 10 isolats ont été obtenus à partir des nodules de *Calycotome spinosa*.

La réinoculation de ces isolats à leur légumineuse d'origine nous permet de vérifier leur appartenance aux bactéries nodulant les légumineuses, en effet, des nodules sont obtenus sur les racines de la légumineuse hôte d'origine.

Les résultats du test d'authentification montrent que seuls 05 isolats ont induit la formation des nodules sur leur plante hôte, confirmant leur appartenance au groupe des bactéries nodulant les légumineuses, tableau V.

Tableau V : Résultats du test de nodulation

Souche	Nodulation	Souche	nodulation
T1	+	S32	-
T2	-	S4	-
S1	+	S5	+
S2	-	B	-
S31	+	D	+

- : Absence de nodules, + : présence de nodule

L'apparition des nodules sur les racines des plantules varie dans le temps.

D'après Belhadi (2003), l'incapacité des autres isolats à développer des nodules sur les racines de leurs plantes hôtes serait due soit :

- A une incompatibilité entre les deux symbiotes
- A la perte du pouvoir infectieux
- Aux conditions expérimentales non contrôlées.

V-Distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Après addition du réactif de Benedict, aucun halo n'est formé autour des colonies et ces dernières restent toujours blanchâtres, ceci signifie que toutes les souches ne produisent pas la 3-cétoglucosidase et donc n'oxydent pas le C3 du glycosyl des saccharides. Par conséquent, on peut conclure qu'aucune des souches isolées ne correspond à *Agrobacterium*.

VI-Résistance aux métaux lourds

Les résultats inscrits au tableau VI (annexe), montrent que les souches étudiées présentent une grande variabilité dans leur résistance aux différents métaux lourds et leurs concentrations Tableau VI.

Les résultats indiqués dans le tableau VI, montrent que la plupart des souches se développent à la concentration de 25 µg/ml de Cadmium. Seules les souches B et T2 manifestent une croissance à une concentration de 100 µg/ml de Cadmium, synonyme d'une bonne tolérance à ce métal. On constate que dans le cas des souches R et D même en présence de faibles concentrations, il n'y a aucun développement.

Le cadmium est reconnu comme étant néfaste aussi bien pour les microorganismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (Tiller et *al.*, 1994 ; Purchase et *al.*, 1997 ; Gusmao-lima et *al.*, 2005).

Les métaux lourds présents dans le sol peuvent entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire des rhizobia (Gusmao-lima et *al.*, 2005). Et l'effet du Zinc sur le développement des souches est évalué dans le tableau VII (annexe).

D'après le tableau VII, on constate que la plupart des souches (R, D, S3.1, S4, S2, S3.2), n'ont pas poussé sur le milieu additionné du Zinc, même aux concentrations les plus

faibles. Par contre, les souches B, S5, T1 et T2, présentent un bon développement aux concentrations allant jusqu'à 400 µg/l.

(Giller et *al.*, 1998) ont rapporté que le zinc affecte négativement la croissance des *Rhizobia*. Un excès de zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des *Rhizobia*, mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques.

Les résultats concernant la tolérance au plomb tableau VIII (annexe), montrent que la souche S31 est la plus résistante avec une croissance observée à 1600 µg/ml. Les autres souches présentent une croissance allant jusqu'à 800 µg/ml. La souche D quant à elle ne présente aucune croissance sur les différentes concentrations.

Les résultats tableau VIII montrent que la souche S3.1 est la plus résistante avec une croissance à une concentration de 1600 µg/l, mais pour les autres souches, elles présentent une croissance uniquement à une concentration de 800 µg/l, à l'exception de la souche D qui ne présente aucune croissance sur les différentes concentrations.

Les rhizobiums réagissent variablement aux différents types de métaux lourds et ceci en fonction des concentrations appliquées (Kinkel et *al.*, 1987).

VII-Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Le tableau IX résume les résultats de tolérance des souches aux trois métaux lourds (Cadmium, Zinc et plomb).

Tableau IX : CMI des souches *vis-à-vis* des différents métaux lourds.

Métaux lourds Souches	Cd	Zn	Pb
R	<12.5	<200	1600
D	<12.5	<200	<400
S3.1	50	<200	2400
S4	50	<200	1600
B	200	800	1600
S5	50	800	1600
T1	50	800	1600
S2	25	<200	1600
S3.2	50	<200	1600
S1	25	400	1600
T2	200	800	1600

Les souches les plus résistantes aux trois métaux (Cadmium, Zinc et Plomb) sont B et T2, leur CMI vis-à-vis de ces métaux sont respectivement de 200 µg/l, 800 µg/l et 1600 µg/l, ces deux souches sont de croissance lente et présentent une grande tolérance aux trois métaux. La souche S31 présente la plus grande tolérance au plomb, avec une CMI de 2400 µg/ml.

Selon Tong et Sadowsky (1994) les souches à croissance lente sont plus résistantes aux métaux lourds que les souches à croissance rapide, ce qui concorde avec nos résultats. Angle et *al.*, (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1994) ont rapporté que les souches de *Bradyrhizobium* sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'ils ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement. Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Kinkle et *al.*, 1987).

L'identification et la sélection des couples symbiotiques Rhizobium- légumineuses résistants aux métaux lourds peuvent constituer un moyen très efficace pour pallier l'écotoxicologie des sols contaminés (Wetzel et Werner, 1995).

VII-Effet du pH

Les résultats obtenus sur milieu YMB montrent une variabilité de tolérance des souches à différents pH allant de 4 à 10 (figure 7).

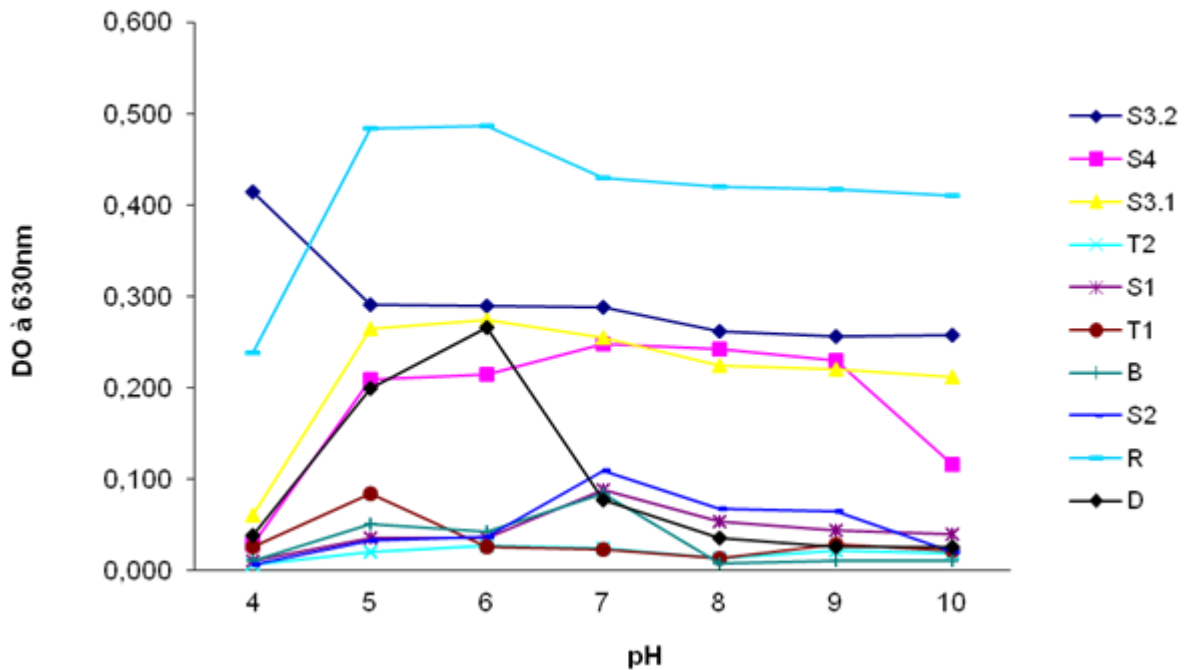


Figure 7 : Effet du pH sur la croissance des souches étudiées

La souche S31 présente le même profil que la souche de référence R et tolère les pH basiques aux pH acides. Les souches T2, S31 et D ainsi que la souche de référence R présentent un optimum de croissance à pH=6 tandis que, les souches S1, S2, S4 et B présentent une croissance optimale à pH=7.

La souche T1 atteint son optimum de croissance à pH =5 alors que, la souche S32 montre une croissance qui est proportionnellement inverse à l'augmentation du pH. Toutefois, elle présente une forte croissance à pH acide (4).

On remarque que quelle que soit leur croissance, rapide ou lente, certaines souches présentent un optimum de croissance voisin de la neutralité. Cependant, d'autres souches à croissance lente (T1, T2, D) tolèrent une large gamme de pH, mais ont une préférence pour les pH acides, contrairement aux souches à croissance rapide qui ont une préférence au pH neutre. La préférence de ces souches au pH acides serait due à l'acidité du milieu.

Les résultats indiquent que les souches étudiées sont tolérantes aux pH extrêmes, et montrent une croissance sur une gamme de pH allant de 4 à 10 et cela concorde avec les résultats rapportés par Raza et *al.* (2001) sur les souches *Bradyrhizobiumsp.* (lupini).

VIII-Effet du NaCl

Les résultats de l'étude de l'effet du NaCl sur la croissance des souches isolées de *Calycotome spinosa* (figure 8), montrent une grande variabilité dans leur tolérance.

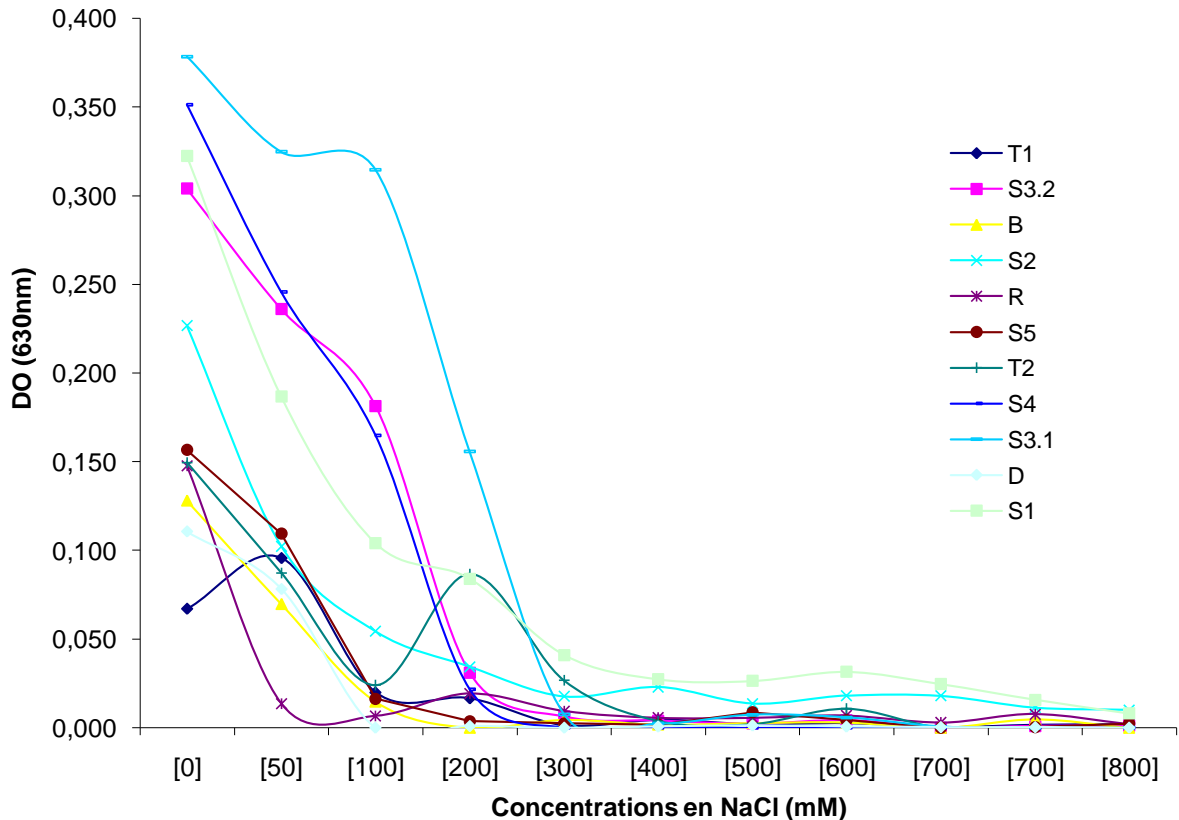


Figure 8 : Effet du NaCl sur la croissance des souches étudiées

On remarque, que la plupart des souches montrent une croissance proportionnellement inverse à l'augmentation des concentrations en NaCl. En effet, ces souches tolèrent des concentrations allant jusqu'à 300mM. Cependant, leur croissance est inhibée en présence de concentrations supérieures à 400mM en NaCl.

La souche T1 présente contrairement aux autres souches, un optimum de croissance à une concentration de 50mM de NaCl, puis diminue pour enfin s'annuler à une concentration de 300 mM.

La souche S1 et S2 semblent être les moins affectées par l'augmentation des concentrations en NaCl, en présentant une croissance à des concentrations supérieures à 400

mM. Mpepereké et *al.* (1997) ont rapporté que l'existence de souches tolérantes à la salinité peut être une indication d'une adaptation au stress osmotique qui est dû à l'augmentation de la concentration d'ions et à la variation de l'humidité du sol.

Zerhari (2000) et Sang et *al.* (2003) ont rapporté que les *Rhizobia* à croissance rapide sont plus tolérants à la salinité que les *Rhizobia* à croissance lente.

La plupart de ces souches sont comparables aux *Rhizobia* isolés par Rasanen (2002) d'Acacia et de Prosopis qui sont modérément tolérants à la salinité et sont capables de croître à des concentrations de 200 à 400 mM.

De nombreuses études ont rapporté que la plupart des endophytes symbiotiques sont sensibles à des concentrations de sel supérieures à 1.5% (Graham et Parker, 1964; Batzli et *al.*, 1992). Toutefois, les *Rhizobia* isolées des plantes ligneuses (Acacia, Prosopis, etc.) peuvent tolérer une concentration en NaCl de 3 à 5% (Mohammed et *al.*, 2000; Tilak et *al.*, 2005).

IX-Pouvoir alcalinisant et acidifiant

Les résultats du test d'acidification / alcalinisation pour les différentes souches sont regroupés dans le tableau X.

Tableau X : pouvoir d'acidification et d'alcalinisation

Souche \ Test	Acidification	Alcalinisation
R	+	-
T1	-	+
B	-	+
D	-	+
S3.1	+	-
S1	-	+
S3.2	+	-
T2	-	+
S2	Neutre	Neutre
S5	-	+
S4	+	-
Témoin	Neutre	Neutre

Le tableau X montre que les souches (R, S31, S32, S4) acidifient le milieu YMA additionné du bleu de bromothymol et cela est révélé par le virage de la couleur du milieu du

vert au jaune. Les souches ont manifesté, une alcalinisation du milieu, qui est révélée par le virage de la couleur du milieu, du bleu au vert, cependant, pour la souche S2 aucun virage n'est constaté (figure 9).

Les souches à croissance rapide sont généralement considérées comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du bleu de bromothymol vers le jaune, contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984 ; Beck et *al.*, 1993 ; Pagano, 2008).

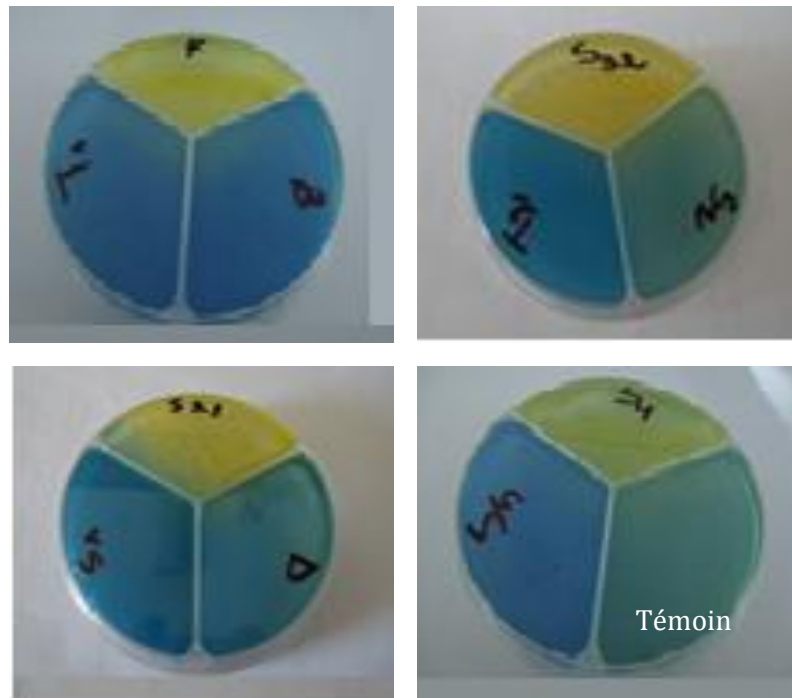


Figure 9 : Photos des résultats du test acidification ou alcalinisation

IX-Utilisation de différents substrats carbonés comme seule source de carbone

L'étude de l'assimilation des différents substrats carbonés montre que les différentes souches présentent une croissance plus ou moins variable tableau XI.

Tableau XI : Utilisation des substrats carbonés comme seule source de carbone

Sucres Souches	Mdm	Xyl	Mel	Rham	Sal	lev	Sob	Dul	Man	Sor	Lac	Tw	Adon	sac	Ara	Cel
R	+	++	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+	++	++	++
B	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S1	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	++	+	+	+
T1	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
S31	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
T2	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
S2	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
S4	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
S5	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
S32	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

+ ; croissance. - ; pas de croissance. **Mdm** :Methyl D mannoside, **Xyl** : Xylose, **Mel** : Melibiose, **Rham** : Rhamnose, **Sal** : Salicine, **Lev** : Levulose, **Sob** : Sorbitol, **Dul** : Dulcitol, **Man** : Mannose, **Sor** : Sorbose, **Lac** : Lactose, **Tw** : Tween 80, **Adon** : Adonitol, **Sac** : Saccharose , **Ara** : Arabinose, **Cel** : Cellobiose.

Les résultats présentés dans le tableau XI montrent que le methyl D mannoside est le seul sucre qui est assimilé par toutes les souches. Le xylose, le rhamnose, la salicine, le sorbitol, le mannose et le lactose sont assimilés par la plupart des souches tandis que le lévulose est le substrat le moins assimilé.

Les souches R, S1 et S2 assimilent tous les composés carbonés testés, tandis que la souche S5 présente le métabolisme le plus restreint en assimilant que quatre substrats à raison le methyl D mannoside, xylose, salicine et sorbitol.

En projetant ces résultats au temps d'apparition des colonies, on constate que les souches à croissance lente (T1, T2, S5) assimilent moins de substrats carbonés.

En comparant les profils d'assimilation des différents substrats, on constate que les souches S1 et S2 présentent le même profil que la souche de référence R, tandis que les autres souches semblent toutes différentes les unes des autres.

Selon Graham (1964), les bactéries à croissance rapide présentent un spectre d'assimilation très large *vis-à-vis* des substrats carbonés par rapport aux bactéries à croissance lente. De même, Somasegaran et *al.*, (1994) et Maatallah et *al.*, (2002) ont constaté que les Rhizobia à croissance rapide sont capable de se développer sur une grande variété de substrats carbonés alors que les Rhizobia à croissance lente sont limités dans leur capacité à assimiler les différentes sources de carbone.

Conclusion

Conclusion

Cette étude s'est portée sur la caractérisation phénotypique (paramètres culturaux, cellulaires, biochimiques et physiologiques) de dix souches bactériennes, isolées à partir des nodules racinaires de *Calycotome spinosa*, récolté de plusieurs sites de la wilaya de Béjaïa (Ait amer ouzeguen, Azouna, Semaoun). Ainsi nous avons pu enrichir la collection du laboratoire Interactions plantes- bactéries avec 10 souches pour des analyses ultérieures.

En se basant sur la durée d'apparition des colonies, on peut scinder ces souches en deux groupes distincts. Le premier groupe comportant les souches S2, S31, S32 et S4 présentent une vitesse de croissance moyenne de 72h tandis que, S1, S5, T1, T2, B et D du deuxième groupe sont plus lente et apparaissent après 6 jours. La plupart des colonies observées présentent aspect translucide et elles sont gluantes.

L'étude de l'effet du pH sur ces isolats montre que les souches à croissance lente aussi bien que les souches à croissance rapides se développent mieux au pH neutre à légèrement acide (5 à 7).

La réponse des différentes souches est inversement proportionnelle inverse à l'augmentation des concentrations en NaCl, leur tolérance se limite pour la plupart des souches 300 mM. Au-delà de cette concentration, leur croissance est inhibée. Seules les souches S1 et S2 semblent tolérer les concentrations supérieures à 300mM.

Les différentes souches montrent une variabilité dans l'assimilation des sources de carbone. S1 et S5 de même que la souche de référence assimilent tous les substrats carbonés utilisés par contre, les souches T1, T2 et S5 sont les souches qui les assimilent le moins.

L'évaluation du pouvoir acidifiant ou alcalinisant a confirmé que les souches dont la croissance est lente (T1, T2, B, D, S1 et S5) alcalinisent le milieu additionné de bleu de bromotymol contrairement aux souches dont la croissance est rapide (S31, S32, S4) ou le milieu est acidifié. Ceci présume l'appartenance des souches du premier groupe aux *Bradyrhizobium* et celles du deuxième groupe aux autres genres.

Le test de distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* permis de conclure qu'aucune des souches isolées ne correspond au genre *Agrobacterium*.

La résistance des différentes souches aux métaux lourds révèle que la souche B et T2 sont plus tolérantes aux trois métaux étudiés.

Le test d'authentification révèle que cinq souches (T1, S1, S31, S5 et D) ont induit la nodulation sur leur plante hôte.

L'ensemble des tests effectués ne nous permet pas d'établir une identification complète des souches isolées, toutefois ils nous permettent de distinguer deux groupes dont l'un est affilié au genre *Bradyrhizobium* et l'autre aux autres genres de *Rhizobia* nodulants les légumineuses.

En perspective, il serait souhaitable de compléter ce travail par d'autres tests biochimiques et phénotypiques d'une part et d'autre part de procéder à une analyse moléculaire et génotypique par les techniques de SDS PAGE des protéines cytosoliques, la recherche des gènes de nodulation, l'hybridation ADN/ADN, le séquençage de l'ARN pour mieux évaluer la diversité des *Rhizobia* et leur statut taxonomique

Références bibliographiques

References bibliographiques

- Angel J S, Mc Grath S P, Chaudri A M, Chaney R L., and Giller K L. (1993).** Inoculation effect on legumes grown in soil previously contaminated with sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* **25**.pp.575-580.
- Bado B V. (2002).** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Thèse Doctorat. Université Laval, Québec.167p.
- Belhadi D. (2003).** Evaluation de la diversité des rhizobia de *Medicago truncatula* des régions salées de Béjaia. Etude de l'effet osmoprotecteur d'*Ulva lactuca* contre le stress salin. Thèse de Magister en Microbiologie. Université de Béjaia. 74p.
- Batzli J M C, Graves W R and Berkum P V. (1992).**Diversity among rhizobia effective with *Robiniapseudoacacia* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**.pp:2137-2143.
- Baudoin J P. (2001).** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ***5**(4).pp: 221-230.
- Beck D P, Materon LA, Afandi F. (1993).**Practical Rhizobium- Legume Technology Manual. ICARDA.Syria.
- Bélanger E. (1998).** Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium* sp. (*Oxytropis Arctobla*) souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.155p.
- Boivin C, Lortet G, Larquin J, BA S, Méar N, Ferro M, de Lajudie P, Promé JC et Dreyfus B. (1998) :** Utilisation des facteurs Nod pour la caractérisation symbiotique des rhizobiums : application aux souches d'Acacia et de Sesbania du Sénégal. In Acacia au Sénégal. Edition : Orstom. France. pp. 378-386.
- Bordeleau L M et D. Prevost. (1994).** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*.**161**. pp. 115-124.
- Brewin N J. (2004).** Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis.*Critical Reviews in Plant Sciences*.**23**. pp. 293-316.
- Brewin N J, Downie J A et Young J P W. (1992).** Nodule formation legumes.encyclopedia of microbiology, M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New york.3:239-248.
- Broughton W J, Jabbouri S et Perret X. (2000).** Keys to Symbiotic Harmony.*JournalofBacteriology*.**182**. 20. pp. 5641-5652.
- Brunel B, Domergue O, Maure L, Brahic P, Galiana A, Josa R, De lajudie P, Attalah T, Risk H, El- Hajj S et Cleyet- Marel JC. (2007).** Potentialité des associations symbiotiques plantes- micro-organismes pour réhabiliter des sites fortement dégradés en milieu méditerranéen. In : *Cahiers Agricultures***16**. 4. pp. 324-329.

Caetano-Anolles G, Lagares A et Favelukes G. (1989). Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots : dependence of divalent cations and pH. *Plant Soil*. 117. pp. 67-74.

Campa C, Grignon C, Gueye M et Hamou S. (1998) : L'Acacia au Sénégal. Edition : Orstom. 476p.

Cermola M, Fedorova E, Tate R, Riccio A, Favre R et Patriarca EJ (2000). Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium meliloti*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **13**.pp. 733-41.

Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, de Lajudie P, Ba A, Gillis M, and Dreyfus B. (2000). Photosynthetic Bradyrhizobia are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryzabreviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (12).pp. 5437-5447.

Chen W M, Laevens S, Lee T M, Coenye T, de Vos P, Mergeay M et Vandamme P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *P. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**.pp.1729-35.

Collavino M, Riccillo P M, Grasso D H , Crespi M et Aguilar OM. (2005). GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but is dispensable for the *Sinorhizobium meliloti* - Alfalfa symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**.pp.742-750.

Come D et Françoise C. (2006). Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes, Ed : Tec et Doc. Lavoisier.

Cronk Q, Ojeda I et Pennington R T. (2006). Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* **9**.pp. 99-103.

Cullimore, J V, Ranjeva R et Bono J J. (2001). Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* **6**.pp.24- 30.

de Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins M D, Kersters K, Dreyfus B, Gillis M, (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **48**.pp. 1277–1290.

de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI et Sutherland JM (1989). Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist*. **111**.pp.607-619.

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

Dénarié J. (2000). Texte de la 8^{ème} conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier.

Denarié, J, Debellé, F, et Rosenberg C. (1992). Signaling and Host Range Variation in Nodulation. *Annual Review of Microbiology*. **46**.pp. 497-531.

Dhane Fitouri S. (2011). Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hedysarum coronarium L*) et sélection des souches rhizobiales efficaces. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques. Institut national agronomique de Tunisie. 149p.

Domergue O. (2006). Diversité des Rhizobia associés à *Ononis repens* : une légumineuse adaptée aux milieux méditerranéens. Diplôme de l'école pratique des hautes études. p78.

Duhoux E et Nicole M. (2004). Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition DUNOD. Paris. France. pp .1-20

Dupuy Y et Nougier P. (2005). Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses. Paris.

El-hillali I. (2006). La symbiose Rhizobium-Lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie moléculaire. Université de Mohammed V-Agdal, Rabat. 231p.

Frontier S, Piched-Viale D, Leprêtre A, Davoult D et Luczak C. (2004). Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution. Edition Dunod, Paris.

Gage D J and Margolin W. (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology* 3. 6. pp. 613-7.

Gage D J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol.* 68 (2).pp. 280-300.

Giller EK, Witter E, and Mc Grath S P. (1998) : Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30.pp. 1389-1414.

Gough C. (2009). *Medicago truncatula* un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. *Biofutur.* 298. pp. 30-33.

Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Kersters, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41.pp. 582-587.

Graham P H and Parker CA. (1964). Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil.* 20.pp.383-396.

Graham PH. (1992). Stress tolerance in Rhizobium and bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology.* 38.pp. 475-484.

Gramma B S. (2008). Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Constantine. , faculté des sciences de la nature et de la vie.93p.

Guerrouj K, Benata H, Ourarhi M, Hanaa AM, Roger P, El Idrissi MM. (2009). Diversité des Rhizobia qui nodulent quelques légumineuses de la région orientale du Maroc. *Symposium international, Agriculture durable en région méditerranéenne. Rabat, Maroc.* pp.376-379.

Guignard J.L and Dupont F. (2005). Botanique. 13^{ème} Edition Masson. Spret : pp. 164-179.

Gusmão-Lima A I, Figueira E, de Almeida M P, and Pereira S I A. (2005) : Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* : glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* **51**. pp. 7-14.

Halbleib, C. M. et Ludden P W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* **130**. pp. 1081-1084.

Haukka K, Lindström K et Young PW. (1998). Three Phylogenetic Groups of nodA and Nif H Genes in Sinorhizobium and Mesorhizobium Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol.* **64** (2). pp. 419-426.

Hopkins WG. (2003). Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. pp. 99-119.

Harley PP J, Klein DA, Lansing MP, Willey JM, Woolverton CJ (2010). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires. 3^{ème} édition 2008 original. French edition 2010. pp. 376-379.

Jarvis B D, van Berkum P, Chen W X, Nour S, Fernandez M P, Cleyet-Marrel J C, and M. Gillis. (1997). Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**. pp. 895-898.

Jordan D C. (1984): Rhizobiaceae. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. pp. 234-245.

Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A. et Stevens P. (2001). Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Ed : de boeck. pp.415-418.

Kinkle B K, Angle J S and Keyser H H. (1987) : Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**. pp. 315-319.

Kinkema M, Scott P T et Gresshoff M. (2006). Legume nodulation: successful symbiosis through short and long distance signaling. *Func. Plant Biol.* **33**. pp.707-721.

Labat J N. (1996). Biogéographie, endémisme et origine des légumineuses papilionacées de Madagascar. *Biogéographie de Madagascar.* pp. 95-108.

Lévêque C, Mounoulou J.C. (2001). Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod, Paris.

L'Taief B., Bouaziz S., Manasara Z.A., Hajji M. et Lachaal M. (2009). Effet de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *Rhizobium sp.* et du régime des pluies sur la production et la teneur en azote du pois chiche. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13** (4).pp. 537- 544.

Maatallah J, Berraho E, Sanjuan J et Lluch C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie***22**.pp. 321–329.

Macheix JJ, Fleuriet A et Jay- Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires. Edition : Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.185p.

Machrafi Y. (2001). Inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.

Madigan M et Martink J. (2007). Brock Biologie des microorganismes. Edition: Person Education France. pp .599-601.

Mohammed SH, Smouni A, Neyra M, Kharchef D, Filali-Maltouf A. (2000). Phenotypic characterization of root nodulating bacteria isolated from Acacia spp. grown in Lybya. *Plant Soil*.**224**.pp.171- 183.

Moschetii G, Peluso A L, Protopapa A, Anastasio M, Pepe O et Defez R. (2005). Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarium biovar viciae*. *Systematic and applied Microbiology*.**28**.pp. 619-631.

Moulin LA, Munive A, Dreyfus B et Boivin C- Masson. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*.**411**.pp.948-50.

Mpepereki S, Makonese F et Wollum A G. (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*. **22**.pp. 275-292.

Patriarca E J, Tate R, Ferraioli S et Iaccarino M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Cyto.l***234**.pp.201-62.

Pagano MC. (2008). Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration *Plant Soil Environ*, 54, (11) .pp 498–508.

Pelmont J. (2005). Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.

Perry J J, staley JT et Lory S, (2004). Microliologie. Edition Dunod, Paris.

Pietsch G, Friedel J.K et Freyer B. (2007). Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research*.**102**.pp.104-118.

Prell J et Poole P. (2006).Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*.**14** .4.

Purchase D, Miles R J and Young T W K. (1997). Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**.pp. 85-93.

Rameau JC, Mansion D, Dumé G, Gauberville C. (2008).Flore forsière française. Tome 3. Région méditerranéenne. Edition. Agro Paris tech ENGREF. 2777p.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE, (2000): Biologie végétale. 2^e édition. Edition. de boeck. Paris France.pp.653-660.

Raza S, Jornsgard B, Abou-Taleb H and Christiansen J L. (2001) : Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.***32**.pp. 379-383.

Räzänen LA. (2002). Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*.Thèse de doctorat de l'université de Helsinki.Finland. 99p.

Rees, D C. et Howard J B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem.Biol.* **4**.pp. 559-566.

Richter G. (1993). Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp. 341-352.

Saadallah K, Drevon J J et Abdelly C. (2001). Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie*.**21**.pp. 627-634.

Saoudi M. (2008). Les bactéries nodulantes des légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine. 99p.

Sebihi FZ. (2008). Les Bactéries Nodulantes des Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri de Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie. 121p.

Segovia L, Pinero D, Palacios R et Martinez Romero E. (1991). Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*.*Appl. Environ. Microbiol.***57**.pp. 426-433.

Sprent J I. (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem.* **27**.pp. 401-407.

Sugawara M, Okazaki S, Nukui N, Ezura H, Mitsui H et Minamisawa K.(2006). Rhizobiotoxine modulates plant-microbe interactions by ethylene inhibition. *Biotechnology advances* .**24**.pp. 382-388.

Sullivan J T, Eardly B D, van Berkum P, and Roson C W. (1996). Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**.pp. 2818-2625.

Svistoonoff S. (2003). Implication d'une subtilase dans les étapes précises des symbioses actinorhiziennes. Thèse de doctorat en physiologie végétale. Université Montpellier II.67p.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C et Dreyfus B. (2001). Methylophilic *Methylobacterium bacteria* nodulate and fix nitrogen in symbioses with legumes.*J. Bacteriol.* **183**.pp. 214-220.

Teillet A. (2008). Caractérisation de deux déterminants moléculaires impliqués dans le processus d'infection lors de l'interaction symbiotique entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat de Biosciences végétales. Université Toulouse III. 172p.

Terefework Z. (2002). Diversity and phylogeny of *Rhizobiumgalegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis.Academic Dessertation in Microbiology.University of Helsinki.ISSN.pp 1239-9469.

Tiller K, Merry R, and Mc Laughlin M. (1994). Cadmium: a modern day problem. *Rural Research*.**162**.pp. 32-35.

Tilak K V B R, Ranganayaki N, Pal K K, Saxena A K, Nautiyal C S, Mittal S, Tripathi A K and Johri B N. (2005). Divesity of plant growth and soil health supporting bacteria.*Curr Sci.* **89**.pp.136- 150.

Torche A. (2006).Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse Magister en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri, Constantine, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, 166p.

Tortora G.J, Funk B R , Case C L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique. *Inc.* pp. 826-830.

Waligora C. et Tetu T. (2008). Les légumineuses : il est temps de les réhabiliter. In : *techniques culturales simplifiée.* **48.** pp.12-22.

Wang ET and Martinez-Romero E. (2000).*Sesbania* herbacea-Rhizobium huautlense nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. *Microb Ecol.* **40**.pp.25-32.

Wilson D O and Reisenauer H M. (1970) : Effect of Manganese and Zinc Ions on the Growth of Rhizobium. *J Bacteriol.* **102**.pp. 729–732.

Wery J. (1985). Relation entre la nutrition azote et la production chez les légumineuses. In : *nutrition azotée des légumineuses.* Ed INRA, Paris. 213p.

Wetzel A et Werner D. (1995).Ecotoxicological evaluation of contaminated soil using the legume root nodule symbiosis as effect parameter. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **10**.pp. 127-134.

Zerhari K. (2000). Diversité phénotypique et génotypique des rhizobia isolées des régions arides et sahariennes du Maroc nodulant quatre espèces d'Acacia : *A. cyanophylla*, *A. gummifera*, *A. horrida* et *A. tortilis* sub-espèce *raddiana*. Thèse de Doctorat. Université V Agdal. Rabat Maroc. 125p.

Annexes

Annexes

Composition pour 1l des milieux de cultures et réactifs utilisés

Milieu YMA

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0,5g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Agar	15g
Eau distillée	100ml

Le pH est ajusté à 6,8.

Stérilisé à 120°C pendant 20 min.

Le milieu Jensen

CaHPO ₄ , 2H ₂ O	1g
K ₂ HPO ₄	0,2g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2g
NaCl.....	0,2g
Solution stock	1ml
FeCl ₃ , 6H ₂ O.....	0,1g
Agar	5g/l
Eau distillée.....	1000ml

Le pH est ajusté à 6,8

Stérilisé à 120°C pendant 20min.

Milieu M1

Extrait de levure.....	10g
Glucose	20g
Carbonate de Calcium.....	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml

Le pH est ajusté à 6,8.

Stérilisé à 120°C pendant 20min.

Milieu M2

Lactos..... 10g

Extrait de levure..... 1g

Agar 18g

Eau distillée 1000ml

Le pH est ajusté à 6,8

Stérilisé à 120°C pendant 20min.

Composition du réactif Benedict

Citrate de sodium..... 173g

Carbonate de sodium anhydre 100g

CuSO₄, 5H₂O..... 17,3g

Eau distillée 1000ml

Tableau VI : Résultats de la résistance au cadmium

[Cd] µg/ml Souches	12.5	25	50	100	200	400
R	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-
S3.1	+	+	-	-	-	-
S4	+	+	-	-	-	-
B	+	+	+	+	-	-
S5	+	+	-	-	-	-
T1	+	+	-	-	-	-
S2	+	-	-	-	-	-
S3.2	+	+	-	-	-	-
S1	+	-	-	-	-	-
T2	+	+	+	+	-	-

Tableau VII : Résultats de la résistance au zinc

[Zn] µg/ml Souches	200	400	800	1600	2400
R	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-
S3.1	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-
S5	+	+	-	-	-
T1	+	+	-	-	-
S2	-	-	-	-	-
S3.2	-	-	-	-	-
S1	+	-	-	-	-
T2	+	+	-	-	-

Tableau VIII : Résultats de la résistance au plomb

[Pb] µg/ml Souche	400	800	1600	2400	3200	4000	4800
R	+	+	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-
S3.1	+	+	+	-	-	-	-
S4	+	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-	-
S5	+	+	-	-	-	-	-
T1	+	+	-	-	-	-	-
S2	+	+	-	-	-	-	-
S3.2	+	+	-	-	-	-	-
S1	+	+	-	-	-	-	-
T2	+	+	-	-	-	-	-

Résumé

Ce travail a été réalisé afin de caractériser et d'évaluer la diversité des symbiotes isolés à partir des nodosités de *Calycotomespinosa* provenant de différentes régions de Béjaïa. La croissance des souches, l'assimilation des substrats carbonés ainsi que la résistance aux métaux lourds, révèlent des profils bien distincts, comparables à ceux des *Rhizobium* et des *Bradyrhizobium* et le test 3- cétolase écarte l'hypothèse de leurs appartenances au genre *Agrobacterium*. Une large variabilité de tolérance au NaCl et au pH a été notée pour l'ensemble des souches isolées. Le test révélateur du pouvoir alcalinisant et acidifiant, confirme l'appartenance des deux groupes aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Le test de nodulation montre que la moitié des souches sont infectives *vis- à vis* de *Calycotome spinosa*.

Mots clés: *Calycotome spinosa*, nodulation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*.

Abstarct

This work was carried out in order to characterize and to evaluate the diversity of the symbiont isolated from nodosities of *Calycotomespinosa* coming from various areas from Béjaïa. The growth of the strains, the assimilation of the carbonaceous substrates as well as resistance to heavy metals reveal profiles quite distinct in comparison with those of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. The 3-cétolase test dismisses the assumption of their memberships of the genera of *Agrobacterium*. A broad variability of tolerance to NaCl and with pH was noted for the unit of the isolated trains. The revealing test of the alkalizing and acidifying capacity confirms the membership of the two groups to the genera of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. The nodulation test shows that half of the strains have a capacity to infect *Calycotomespinosa*.

Key words: *Calycotomespinosa*, nodulation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*.