

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité/Option : Microbiologie Appliquée

Département : Ecologie et Génie d'environnement

Thème

L'adaptation des (BNL) aux conditions extrêmes

Présenté par :

- Boulekhiout Marwa
- Soudani Khaoula

Devant le jury composé de :

Présidente : Dr. Hadidi.I (M.C.B)

Université de Guelma

Examinatrice: Dr. Bouthelja.M (M.C.B)

Université de Guelma

Encadrante : Dr. Torche E (M.C.A)

Université de Guelma

JUIN 2025

Remerciements

*Avant tout, nous exprimons notre gratitude envers **ALLAH**, le Tout-puissant, Pour nous avoir accordé la chance, la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener à bien Ce modeste travail.*

*Dans un premier temps, nous voudrions exprimer toute nos sincères remerciements aux membres du jury : **Mme Hadidi .I** et **Mme Bouthelja .M** d'avoir accepté d'examiner et de juger notre travail.*

*Nous voudrions adresser toute notre gratitude à notre promotrice, **M^{me} Torche asma**. pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils et ses encouragements.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers **Mme Hayet**, l'ingénieur du laboratoire de microbiologie, pour son précieux soutien et ses précieux conseils techniques qui ont considérablement simplifié notre recherche.*

Nous tenons à formuler notre gratitude et nos profondes reconnaissances à l'égard de nos parents pour leurs indéfectibles soutiens durant tout notre cursus.

Merci a toute l'équipe de l'université de 08mai 1945.

Merci bien



Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes très chers parents qui sont ma .source d'amour, de volanté et de courage, et m'ont permis d'être ce qui je suis actuellement .Merci pour leur soutien et affection inconditionnels, tous les sacrifices et que dieu vous garde

À ma Très chère mère

La Lumière de ma vie et la flamme de mon cœur.Ton soutien et tes prières fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.Je t'aime et je te souhaite longue vie dans la bonne santé et le bonheur.

À mon Chér père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Mon Père : je t'aime et j'implore le tout puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie heureuse.

À Tous les membres de la Famille Sans exception

Sans oublier **Mon binôme :** Marwa pour son soutien moral et ça compréhension tout au long de ce projet

Mes amies : Rym, marwa

En fin je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail .



KHAOULA



Dédicace

Je remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Je dédie cet événement marquant de ma vie à :

A ma très chère mère

Votre patience, votre bienveillance, votre dévouement et votre courage sont admirables.

Vous étiez toujours présente pour nous écouter, nous reconforter et nous montrer le droit chemin

Vous être une mère formidable. Je t'aime et je te souhaite longue vie dans la bonne santé et le bonheur

A mon très cher père

Ce modeste travail est le fruit de tous sacrifices déployés pour notre éducation.

Vous avez toujours souhaité le meilleur pour nous.

Vous méritez sans conteste qu'on vous décerne les prix " Père Exemplaire".

Mon Père: je t'aime et j'implore le tout puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie heureuse.

À mes Frères : Fathi,imade , Housseem, yassine

À mon **Binôme** Khawla pour son soutien moral et ça compréhension tout au long de ce projet

À mes amies : Khawla,rym,soumeiya ,salma

En fin je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.



MARWA

Table des matières :

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des

abréviations

Résumé

Abstract

تلخيص

Introduction **1**

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Interactions symbiotiques plantes légumineuses - bactéries	2
1.1. Généralités sur le microsymbionte rhizobia	3
1.2. Généralités sur le macrosymbiote plantes légumineuses	4
1.2.1. La légumineuse <i>Phaseolus</i>	5
1.2.2. La légumineuse <i>Melilotus</i> sp	6
1.3. Fixation biologique de l'azote	6
1.3.1. Les molécules clés de la fixation de l'azote	7
1.4. La nodulation	7
1.4.1. Préinfection	8
1.4.2. Infection	8

1.4.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes	8
2. Mécanisme d'adaptation des rhizobia aux conditions extrêmes du milieu	9
2.1. Adaptation à la température	18
2.2. Adaptation au pH	10
2.3. Adaptation à la salinité	10
2.4. Tolérance aux métaux lourds	11
2.5. Résistance aux antibiotiques	12

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude	14
2. Collecte des nodules	14
3. Conservation des nodules	16
4. Isolement des bactéries à partir des nodules	16
4.1. Stérilisation des nodules	16
4.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés	16
5. Caractères cultureux et morphologiques	17
6. Examen microscopique par la coloration de Gram	17
7. Conservation des isolats	18
8. Effet des conditions de croissance sur les souches bactériennes	18
8.1. Effet de la température	18
8.2. Effet du pH	19
8.3. Effet du NaCl	19
8.4. Effet des antibiotiques	19
8.5. Effet des métaux lourds	19

Chapitre 3: Résultats et discussion

1. Étude morphologie des isolats	21
1.1. Caractères cultureux et morphologiques	21

1.1.1. Sur milieu YMA	21
1.1.2. Sur milieu YMB	21
1.1.3. Sur YMA-RC	
1.1.3. Sur GPA-BCP	22
1.1.4. Sur YMA-BTB	23
1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram	24
2. Effet des conditions de croissance sur les souches bactériennes	24
2.1. Effet de la température	24
2.2. Effet de pH	26
2.3. Effet du NaCl	28
2.4. Résistance aux antibiotiques	31
2.5. Tolérance aux métaux lourds	31
Conclusion et perspective	35
Références bibliographiques	37
Annexes	

Liste des figures :

Figure	Titre	Page
Figure 01	Etablissement des symbioses rhizobiennes .	3
Figure 02	<i>Phaseolus vulgaris</i> et leur graines	5
Figure 03	Plante légumineuse <i>Melilotus</i> .	6
Figure 04	Représentation du complexe nitrogénase.	7
Figure 05	Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-legumineuses	9
Figure 06	Mécanismes de résistance au zinc chez les bactéries .	12
Figure 07	Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques	13
Figure 08	Localisation géographique de la zone de prélèvement.	14
Figure 09	plante légumineuses <i>Melilotus</i> .	15
Figure 10	plante légumineuses <i>Phaseolus</i>	15
Figure 11	Conservation des nodules sous CaCl_2 .	16
Figure 12	Ensemencement par la technique des cadrans	17
Figure 13	Conservation des souches dans CaCO_3	18
Figure 14	Mesure de pH= 5 sur milieu YMB	19
Figure 15	Mesure de pH=4 sur milieu YMB.	20
Figure 16	Croissance sur milieu YMA.	21
Figure 17	Croissance sur milieu YMB.	22
Figure 18	Croissance sur milieu YMA+RC.	22
Figure 19	Croissance sur le milieu GPA-BCP.	23

Figure 20	Croissance sur milieux YMA-BTB.	24
Figure 21	Examen microscopique par coloration de Gram.	24
Figure 22	Croissance des souches 20°C .	26
Figure 23	Croissance de la souche M6 à 40°C .	26
Figure 24	Croissance des souches M à 30°C.	26
Figure 25	Effet du PH sur la croissance des souches de <i>Phaseolus</i> .	27
Figure 26	Effet du PH sur la croissance des souches de <i>Melilotus</i> .	27
Figure 27	Croissance des souches P à la concentration 0.1% de NaCl.	29
Figure 28	Croissance des souches M à la concentration 3% de NaCl .	30
Figure 29	Croissance de souches P3, P6 à la concentration 10% de NaCl	30
Figure 30	Croissance des souches P à 1% de NaCl	30
Figure 31	Croissance des souches P à 2% de NaCl.	30
Figure 32	Résultats de l'Antibiogramme.	31
Figure 32	Effet des métaux lourds sur la croissance des souches.	33

Liste des tableaux :

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Souches Utilisées dans cette étude.	18
Tableau 2	Effet de température sur la croissance des isolats de <i>Phaselous vulgaris</i> .	25
Tableau 3	Effet de température sur la croissance des isolats de <i>Melilotus.sp</i>	25
Tableau 4	Croissance des souches de (<i>Phaselous vulgaris</i>) à différentes concentrations du NaCl	28
Tableau 5	Croissance des souches de (<i>Mellilotus sp</i>) sur différentes concentrations du NaCl.	29
Tableau 6	Effet des métaux lourds sur la croissance des isolats	32

Liste des abréviations

ADN:Acide Désoxyribonucléique

BCP : Bromocrésol Pourpre

BNL:bactéries nodulant les légumineuses

BTB:Bleu de Bromothymol

C : Degré Celsius

CaCl₂: chlorure de calcium

DO : densité optique

EPS :Exopolysaccharide

Fix :Phénotype dans lequel les symbiosome fixent l'azote

g/l : gramme par litre

GPA :Glucose Peptone Agar

LPS : lipopolysaccharides

ml :milli-litre

mM : milli-Molaire

N : azote

NaCl: Chlorure de sodium

NH₃⁺ : Ammonium

NH₄⁺ : Nitrate

Nif:Nitrogène de fixation

nm: nanomètre

NO₂⁻ : Nitrite

Nod: Gène de nodulation

pH: potentiel hydrogène

Pourcentage :%:

Psym : Plasmide symbiotique

RC : Rouge Congo

T: Température

TYA : Tryptone Yeast Agar

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB: Yeast Mannitol Broth

Résumé :

Ce travail de recherche a pour but d'étudier l'effet des facteurs du milieu sur les bactéries nodulant les légumineuses et sur la relation symbiotique avec les plantes légumineuses. Pour réaliser cette étude nous avons isolé des bactéries à partir des nodules des plantes légumineuses *Melilotus* sp et *Phaseolus vulgaricus* situées dans la région de Guelma. Les isolats ont subi une identification préliminaire par des tests morphologiques, culturels et microscopique. Pour voir l'effet des conditions du milieu sur la croissance des bactéries, nous les avons cultivés sur des milieux de culture avec des modifications dans les valeurs de température, les degrés de pH et des concentrations de NaCl. Nous avons également réalisé des tests de résistance aux antibiotiques et de tolérance aux métaux lourds. Les résultats obtenus démontrent une variation de la tolérance des rhizobia à ces facteurs et la majorité des isolats ont été adaptés aux variations de stress, ce qui les aide à croître et aide les plantes légumineuses à tolérer les conditions difficiles de milieu.

Mots clés : rhizobia ; plantes légumineuse, conditions du milieu, adaptation

Abstract:

This research aims to study the effect of environmental factors on legume nodulating bacteria and the symbiotic relationship with leguminous plants. To carry out this study, we isolated bacteria from the nodules of leguminous plants *Melilotus* sp and *Phaseolus vulgaricus* located in the Guelma region. The isolates underwent preliminary identification by morphological, cultural and microscopic tests. To see the effect of environmental conditions on the growth of bacteria, we cultivated them on culture media with changes in temperature values, pH levels and NaCl concentrations. We also carried out antibiotic resistance and heavy metal tolerance tests. The results obtained demonstrate a variation in the tolerance of rhizobia to these factors and the majority of isolates were adapted to stress variations, which helps them grow and helps leguminous plants tolerate difficult environmental conditions.

Keywords : rhizobia ; leguminous plants, environmental conditions, adaptation

ملخص:

هدف هذا البحث إلى دراسة تأثير العوامل البيئية على بكتيريا العقد البقولية وعلاقتها التكافلية مع النباتات البقولية *Melilotus* sp.

Phaseolus vulgaris

لإجراء هذه الدراسة، قمنا بعزل البكتيريا من عقد النباتات البقولية الموجودة في منطقة قالمه خضعت العزلات للتعريف الأولي من خلال الاختبارات المورفولوجية والتنمائية والمجهريّة.

لمعرفة تأثير الظروف البيئية على نمو البكتيريا، قمنا بزراعتها في أوساط غذائية مع تغييرات في قيم درجات الحرارة ومستويات الأس الهيدروجيني وتركيزات كلوريد الصوديوم. كما أجرينا اختبارات مقاومة المضادات الحيوية وتحمل المعادن الثقيلة. توضح النتائج التي تم الحصول عليها تبايناً في تحمل بكتيريا الريزوبيا لهذه العوامل، وقد تكيفت غالبية العزلات مع تغييرات الإجهاد، مما يساعدها على النمو ويساعد النباتات البقولية على تحمل الظروف البيئية الصعبة.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيا، البقوليات، ظروف الوسط، التكيف

Introduction

Introduction

La symbiose *Rhizobium* – Légumineuses est un processus bénéfique et réciproque permet pour les légumineuses (macrosymbiontes) de fixer l'azote atmosphérique par l'intermédiaire des bactéries appelées *Rhizobium* (microsymbiontes). Les légumineuses sécrètent des composés phénoliques qui attirent ces bactéries. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie. C'est donc une véritable symbiose avec un échange bénéfique pour les deux partenaires (**Gibson et al., 2008**).

La croissance, la survie des rhizobia et l'établissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses peuvent être influencés par plusieurs conditions environnementales comme le pH du sol, la salinité, le stress osmotique et la température (**Graham et Vance, 2000**). Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose (**Hirsch, 1996**).

Les divers stress biotiques et abiotiques peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des rhizobia à l'état saprophytique (en absence de la plante hôte). En ce qui concerne la symbiose légumineuses-bactéries du genre *Rhizobium*, Les différentes souches de *Rhizobium* montrent des variations significatives dans leur efficacité symbiotique et leur tolérance au stress.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet des conditions extrêmes sur la croissance des rhizobia et comprendre les mécanismes d'adaptation de ces bactéries face au stress.

Outre une introduction générale et une conclusion générale, le mémoire est structuré en trois chapitres :

Le chapitre 1 comprend une synthèse bibliographique, ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique, qui présente des généralités sur les BNL, leurs interactions et les mécanismes d'adaptation aux conditions extrêmes du milieu.

Le chapitre 2 présente le matériel et les méthodes des travaux pratiques réalisés.

Le chapitre 3 interprète les principaux résultats obtenus et leur discussion.

Chapitre 1 :

Revue bibliographique

1. Interactions symbiotiques plantes légumineuses - bactéries

La symbiose plantes légumineuses bactéries est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries de type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilable par les plantes. À bénéfices réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines ou plus rarement sur les tiges, c'est au sein de cet organe que l'azote atmosphérique est fixée par les bactéries (**Foussou, 2001**).

Bien que la symbiose légumineuses -*Rhizobium* soit une interaction hautement adaptée et régulée, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente. En effet, les deux parties peuvent vivre indépendamment et de manière autonome (**Kneip et al., 2007**).

Lorsque cette symbiose a lieu, elles présentent de nombreux intérêts aussi bien pour les deux partenaires que pour la pratique agricole (**Foussou, 2001**). En effet, elle permet d'avoir une bonne croissance des plante sur des sols carencés en azote (**Foussou, 2001**). De ce fait, cette symbiose est indubitablement le facteur major à l'origine du grand succès de la famille des légumineuses parmi les végétaux (**Noel, 2009**). A l'opposé, la plante subvient aux besoins énergétiques de la bactérie au cours de cette symbiose en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse. Elle lui offre également un microenvironnement très particulier et nécessaire à la fixation de l'azote. Par ailleurs, outre l'augmentation au niveau du sol de la population des rhizobia spécifiques à la légumineuses hôtes après culture, la symbiose fournirait un cadre de production bénéfiques qui favoriserait l'évolution des espèces bactériennes (**Noel, 2009**).

Les bienfaits apportés par les *Rhizobium* sur les plantes et leur environnement laissent entrevoir un apport positif pour l'agronomie car cette symbiose produit assez d'azote assimilable ce qui permet de diminuer la pollution. En effet, cet azote nécessaire pour la croissance et le développement de la plante et contribue à l'amélioration du bilan azoté des sols (**Farissi et al., 2014**).

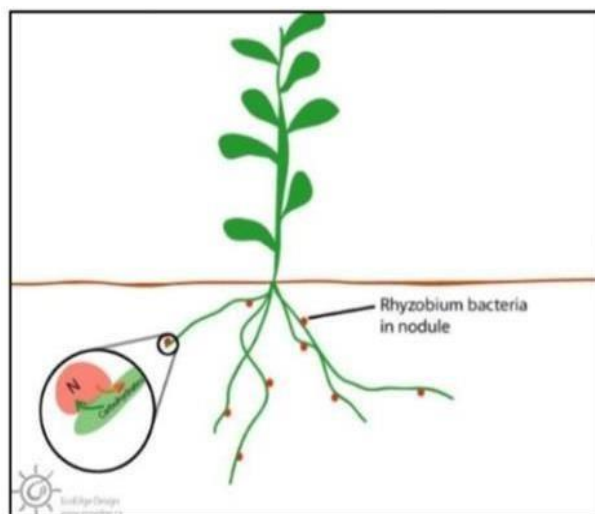


Figure 1 : Etablissement des symbioses rhizobiennes (Sobti, 2013).

1.1. Généralités sur le microsymbionte rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries capables de former des nodules et établir une symbiose avec les racines ou les tiges des plantes légumineuses. Pendant le processus symbiotique, les rhizobria réduit l'azote atmosphérique à une forme assimilable directement par les plantes (Barrada et Fikri Benbrahim, 2014).

Les Rhizobia sont des bactéries du sol, en forme de bâtonnet à Gram négatif, strictement aérobies non sporulantes, et généralement mobile grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles (Jordan, 1984 et Werner, 1992). Ces bactéries peuvent exister sous deux formes : la forme végétative que l'on trouve dans le sol et la forme bactériode que l'on rencontre à l'intérieur des cellules de cortex racinaire (Werner, 1992).

La température optimale de croissance est de 28°C et le pH optimale est de 6 à 7 plus précisément 6,8 mais certaines souches tolèrent les environnements acide (pH= 4) tel que *Rhizobium japonicum* (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les Rhizobia à croissance rapide produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2 à 3 jours. Les *Bradhyrhizobiums* à croissance lente, produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours. Les rhizobia cultivées nécessitent un milieu de culture qui contient une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux (Somasegaran et Hoben, 1994). Elles sont des bactéries hétérotrophes, utilisent des carbohydrates simples tels que le glucose, le saccharose, le mannitol et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le Yeast mannitol agar (YMA) est un milieu solide favorable pour la culture de *Rhizobium*, sur lequel, la colonie apparaît ronde, blanche ou rugueuse. Les colonies jaunes sont pâles, en particulier dans les cultures plus anciennes (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970).

La génétique du *Rhizobium* n'est pas chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Gharzouli, 2006). Le génome des bactéries est constitué en plus de l'ADN chromosomique, d'ADN plasmidique qui peut constituer jusqu'à 50 % du génome entier (Squartini et al., 2002). La taille des génomes rhizobiens connus varie de 5,4 à 9,2 Mb (Laranjo et al., 2014). La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasme (Psym) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti* (Gharzouli, 2006).

1.2. Généralités sur le macrosymbiote plantes légumineuses

La famille des légumineuses ou Fabacées est la troisième des plus grandes familles de plantes à fleurs (après les orchidées et les astéracées), avec environ 650 genres et près de 20000 espèces (Gepts et al., 2005). Ces espèces sont réparties en trois sous-familles : Mimosoideae, Cesalpinioideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow, 2003). 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).

- **Les Cesalpinioideae** : 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).
- **Les 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).
- **Les Papilionoideae** : Dans cette sous-famille dont le genre *Phaseolus* fait partie, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées. 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).

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,) ou l'alimentation animale (soja, luzerne) grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène).

1.2.1. La légumineuse *Phaseolus*

Le genre *Phaseolus* se classe dans la sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, famille des *Fabaceae* sous-famille *Papilionoideae* et ordre des *Fabales*. Au sein des *Phaseolinae* (à stylet barbu sous le stigmate), les deux genres *Phaseolus* et *Vigna* sont les plus importants et contiennent à eux seuls le plus grand nombre d'espèces cultivées comme légumineuses vivrières. La section *Phaseolus* du genre *Phaseolus* est la plus importante et regroupe notamment les cinq espèces cultivées : *P. acutifolius* A. gray., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L., *P. polyanthus* greenm. et *P. vulgaris* L. Comme pour la plupart des espèces du genre, le génome du *phaseolus* comprend 11 paires de chromosomes ($2n=22$) (Maréchal et al., 1978 ; Baudoin et al., 2002 ; Freytag et Debouck, 2002 ; Gepts et al., 2008). L'origine de cette légumineuse est de l'Amérique latine et centrale, le haricot comme sous le nom scientifique de *Phaseolus vulgaris* parmi les légumineuses qui ont été domestiquées depuis plus de 8000 ans (Gepts et Debouck, 1991) et occupe une place importante dans le système agricole de presque tous les pays tropicaux (Kplan, 1981 ; Gepts, 1990). L'haricote était cultivé par les tribus indiennes du Mexique ainsi qu'au Pérou.

Phaseolus vulgaris est une plante herbacée avec un port qui peut changer d'une variété à une autre. Deux grands groupes sont distingués les variétés à tige volubile qui peut atteindre 3m de hauteur, ces variétés ont besoin de support pour soutenir la tige, et les variétés naines à tige ramifiée de 40 à 60 cm de hauteur (Guignard, 1998). L'espèce *P.vulgaris* est une plante annuelle à végétation rapide son cycle est de 9 à 20 jours (Peron, 2006). Le système racinaire est profond et peut descendre jusqu' à 1.20 m. Après 15 à 20 jours des semis, des nodules peuvent se former sur ces racinelles (Adams et al., 1985).



Figure 2 : *Phaseolus vulgaris* et leur graines (Anonyme, 2009).

1.2.2. La légumineuse *Melilotus* sp

Melilotus est un genre des légumineuses qui appartient à la famille des Fabaceae, sous famille des Papilionoideae, il inclut 25 espèces, caractérisées par des rendements importants en graines, une tolérance aux températures extrêmes et un taux de fixation d'azote supérieur aux autres légumineuses. Le Mélilot jaune est une plante d'origine méditerranéenne, annuelle rarement vivace, éphémère à feuilles trifoliolées dentées foliole médiane pétiolée, les latérales subsessiles. Deux stipules adnées au pétiole. Les fleurs sont petites en grappes axillaires, les gousses ont généralement une ou deux graines (**Baba Abri, 2016**).



Figure 3 : Plante légumineuse *Melilotus* [1].

1.3. Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains microorganismes transforment l'azote de l'air (N_2 ou diazote) en ammoniac (**Huheevet et al., 1996 ; Rose et Mueller, 2006**).

Les fixateurs libres d'azote sont représentés essentiellement par des *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Rhodospirillum* (**Mouafek, 2010**). Les fixateurs symbiotiques sont présentés par les *Rhizobia*, l'un des principaux groupes et le plus anciennement connu, s'associent aux légumineuses et les *Frankia*, bactéries filamenteuses sporulantes (actinomycètes) associées à des arbres et des arbustes comme les *Casuarina*, les *Myrica* et les *Alnus* (**Rabah, 2009**).

Le processus symbiotique aboutit au développement sur le système racinaire, de nodosités plus communément appelées nodules actinorhiziens ou actinorhize, qui abritent le

microorganisme. Au sein de ces structures, la plante hôte fournit des substrats carbonés à *Frankia* qui, en retour, transforme l'azote atmosphérique en ammoniac nécessaire à la croissance du partenaire végétal. Moins étudiée que la symbiose Rhizobium- Légumineuses, la symbiose actinorhiziennes permet une fixation d'azote comparable et joue un rôle important au niveau écologique (Benabdoun et al., 2012).

1.3.1. Les molécules clés de la fixation de l'azote

- **La nitrogénase**

C'est une enzyme bactérienne, responsable de la fixation de l'azote et de sa transformation en ammonium directement assimilable par la plante qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines solubles des bactéroïdes (Ramdane et Boukarana, 2016). La nitrogénase bactériostatique catalyse la réduction à six électrons de N_2 en ammonium et à une réduction associée de $2H^+$ en H_2O_2 qui utilise 16 à 18 molécules d'ATP (White et al., 2007).

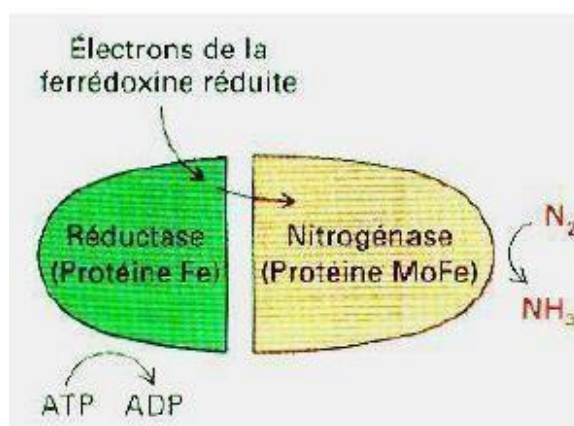


Figure 4 : Représentation du complexe nitrogénase.

- **La légghémoglobine**

C'est une protéine pigmentée de couleur rose foncée. Elle rassemble beaucoup à l'hémoglobine des animaux, elle fixe l'oxygène gazeux rejeté par la photosynthèse et qui inhiberait la nitrogénase de la bactérie. Elle laisse suffisamment d'oxygène pour la respiration des bactéries (Suty, 2015).

1.4. La nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interaction contrôlée par des signaux moléculaire entre la plante et son hôte bactérien. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan et al., 2007).

1.4.1. Préinfection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en ions d'ammonium (NH_4^+), les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (**Patriarcat et al., 2004**).

1.4.2. Infection

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobia* en différents points du système racinaire (**Hopkins, 2003**). Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de rhizobia, la rhicadhésine est une protéine qui lie le calcium. Des lectines sont également impliqués dans l'adhésion mais elles participent à un degré moins que la rhicadhésine (**Perry et al., 2004**). La bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemma (**Hopkins, 2003**).

1.4.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

À l'intérieur du cordon, les bactéries se multiplient et se libèrent dans le cytoplasme des cellules corticales, par le biais du cordon, ce qui entraîne la formation du méristème, dont l'activité est responsable de la formation du nodule, où les bacilles se divisent irréversiblement en bactéroïdes ou endosymbioses. Ces derniers, de forme irrégulière, ont un volume supérieur à des formes libres. Leur division et la production de protéines Nod sont arrêtées, tandis que les bactéroïdes se concentrent sur la production de nitrogénase nécessaire à la fixation de l'azote atmosphérique (**Dupuy et Nougier, 2005**).

Le nodule se forme lorsque les cellules du cortex se multiplient. Il est responsable de la production de pigments tels que la légghémoglobine, qui sont fabriqués à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (**Fitouri, 2011**). La légghémoglobine a pour fonction de maintenir une concentration élevée d'oxygène dans l'environnement de l'enzyme, ce qui est compatible avec le processus de fixation de l'azote pendant la transition vers l'état symbiotique. Les gènes responsables du métabolisme basal des bactéries sont fortement réprimés et ceux responsables de la fixation et de l'assimilation de l'azote sont surexprimés (**Becker et al., 2004**). Il y a quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire dans les nodules. La survie et la multiplication de ces cellules dans le sol après la mort de la plante hôte sont possibles. Elles ont la capacité de contaminer les racines des plantes introduites dans le même milieu (**Perry et al., 2004**).

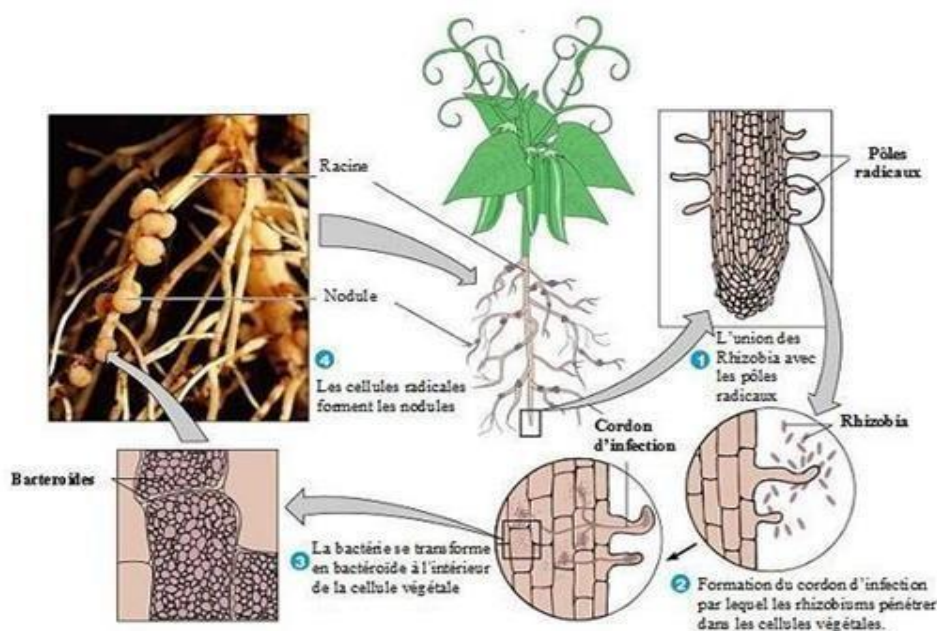


Figure 5 : Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-legumineuses

(Rodriguez-Navarro et al., 2007).

2. Mécanisme d'adaptation des rhizobia aux conditions extrêmes du milieu

2.1. Adaptation à la température

La température joue un rôle important sur les équilibres microbiens du sol. Chez les rhizobia, les hautes températures peuvent empêcher la nodulation et inhiber la fixation de l'azote atmosphérique. Les températures élevées engendrent également la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des rhizobia induisant chez ces derniers, des modifications physiologiques, génétiques et biochimiques (Zahran, 1999 ; Nandal et al., 2005).

Les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes. Zhang et al. (1996) ont rapporté que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes nod empêchant ainsi, l'infection et la nodulation.

Le stress thermique est un facteur environnemental majeur pouvant nuire à la croissance et à la survie des rhizobia (Hungria et Vargas, 2000), bien que la tolérance à la chaleur puisse varier considérablement (Rodrigues et al., 2006). En général, les rhizobia prospèrent entre 25 et 31 °C, les limites supérieures se situant entre 32°et 47 °C. Cependant, certaines souches peuvent s'adapter à des températures supérieures à 47°C. La tolérance à la chaleur varie considérablement selon les espèces ; par exemple, des souches *Rhizobium* isolée de nodules de

Sesbania aculeata ont été cultivée à 50 et 65 °C, mais pendant de courtes périodes 4 et 2 heures respectivement, à pH 7 (**Kullkarni et al., 2000**). Ils sont face au stress thermique en utilisant plusieurs mécanisme qu'il sont développés, tel que l'expression de protéines de choc thermique (HSP), qui sont impliqués dans le repliement, la stabilisation et la dégradation des protéines (**Münchbach et al., 1999**).

2.2. Adaptation au pH

Le pH du sol joue un rôle prépondérant aussi bien dans la survie et la prolifération des rhizobactéries que dans la croissance de leur plante hôte. Les pH extrêmes affectent considérablement tous les stades de la symbiose légumineuse-rhizobia. Ils occasionnent une perte d'environ 25% de la production agricole mondiale observée dans les terres cultivables. Les rhizobia adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditions acides du sol (**Zahran, 1999**). Ces mécanismes incluent entre autres l'exclusion des protons H⁺ (**Chen et al., 1993**), la forte teneur en potassium et en glutamate du cytoplasme des cellules stressés (**Aarons et Graham, 1991**), le changement de la composition du LPS (**Chen et al., 1993**) et l'accumulation de polyamines (**Fujihara et Yoneyama, 1993**). Chez plusieurs bactéries comme *R. leguminosarum biovar trifolii*, ces mécanismes ont été décrits comme une réponse adaptative au pH du milieu. Donc la sélection des souches de *Rhizobium* plus tolérantes au faible pH permet d'améliorer la tolérance des légumineuses à l'acidité (**Correa et Barneix, 1997**).

L'alcalinité est moins néfaste pour la survie des rhizobia. **Jordan (1984)** a montré que la majorité des bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9.

2.3. Adaptation à la salinité

Le stress salin affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiales dans le sol. Toutefois, la croissance des rhizobia sous des conditions salines varie d'une espèce à l'autre et d'un type de sel à l'autre (**El Sheikh & Wood, 1990**). Il peut aussi affecter certains processus physiologiques de la symbiose légumineuse-rhizobia et le développement des nodules. En général, les premières étapes de la nodulation sont plus sensibles au stress salin que plus tard. En effet, le sel inhibe l'activité de la nitrogénase et la respiration nodulaire entraînant ainsi, une diminution des teneurs en azote total dans la plante (**Salehi et al. 2008; Arrese-Igor et al., 2011; Faghire et al., 2011**). La réduction de l'activité fixatrice de N₂ pour le stress salin est généralement due à la réduction de la respiration nodulaire (**Aydi et al., 2008**). Cette réduction est liée à une limitation de l'oxygène,

de l'azote atmosphérique ou d'une diminution de la production de la légghemoglobine par les nodules (**López et al., 2008**).

De nombreuses espèces bactériennes s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des molécules organiques appelées les osmolytes. Les rhizobia utilisent ces mécanismes d'adaptation osmotique. Plusieurs molécules ont été identifiées comme osmolytes. Par conséquent, au moins deux classes distincts d'osmoprotecteurs existent : ceux tel que la glycine bêtaïne ou le glutamate qui agissent comme osmolytes authentiques, et ceux tel que l'ectoïne qui agissent comme médiateurs chimiques. Le changement morphologique des cellules bactériennes a été décrit comme autre mécanisme d'adaptation au stress salin. La structure des cellules rhizobiales a paru comme spirale ou filamenteuses, l'ultrastructure a été affectée sévèrement, l'enveloppe cellulaire a été déformée et le cytoplasme a été interrompu (**Preifer et al., 2011**).

2.4. Tolérance aux métaux lourds

Certaines données de la littérature, rapportent que la présence de métaux lourds semble avoir un effet sur la fixation de l'azote atmosphérique, sur la biomasse et leur diversité ainsi que la taille de la plante. Selon des essais faits sur des sols contaminés par le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le plomb (Pb), ont rapporté uniquement une perte mineure de l'activité de la nitrogénase, de la taille des plantes et de la nodulation. En effet, la capacité fixatrice d'azote est maintenue. De même, un retard de nodulation a été démontré par **Maynaud, (2012)**.

Peirera et al. (2006) ont montré que *R. leguminosarum* bv. *Viciae* était capable de résister à de fortes concentrations en Cd grâce à la synthèse intracellulaire de biomolécules (polysaccharides, thiols et acides organiques) capables de séquestrer le Cd et ainsi de limiter sa toxicité et les dommages éventuels. De plus, les autres souches ont aussi mis en évidence la production extracellulaire de lipopolysaccharides de surface (LPS) pour immobiliser le Cd sur la paroi cellulaire et limiter alors son entrée dans la cellule (**Blencowe et Morby, 2003 ; Choudhury et Srivastava, 2001**).

Le système d'efflux est un mécanisme important impliqué dans la résistance au Zn. Il réalise le transport actif des ions métalliques via plusieurs protéines. Les protéines de transport qui sont responsables du transport du zinc à travers la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram négatif sont les « Cation Diffusion Facilitator » (CDF), les « Resistance Nodulation cell Division » (RND) ainsi que les P-types ATPases (**Choudhury et Srivastava, 2001 ; Silver et Phung, 2005**).

Les microorganismes possèdent en général une combinaison de mécanismes d'adaptation (Pavel *et al.*, 2013).

- L'exclusion des métaux lourds à travers les barrières perméables.
- La séquestration inta/extracellulaire.
- La présence des pompes d'efflux actifs
- La réduction enzymatique

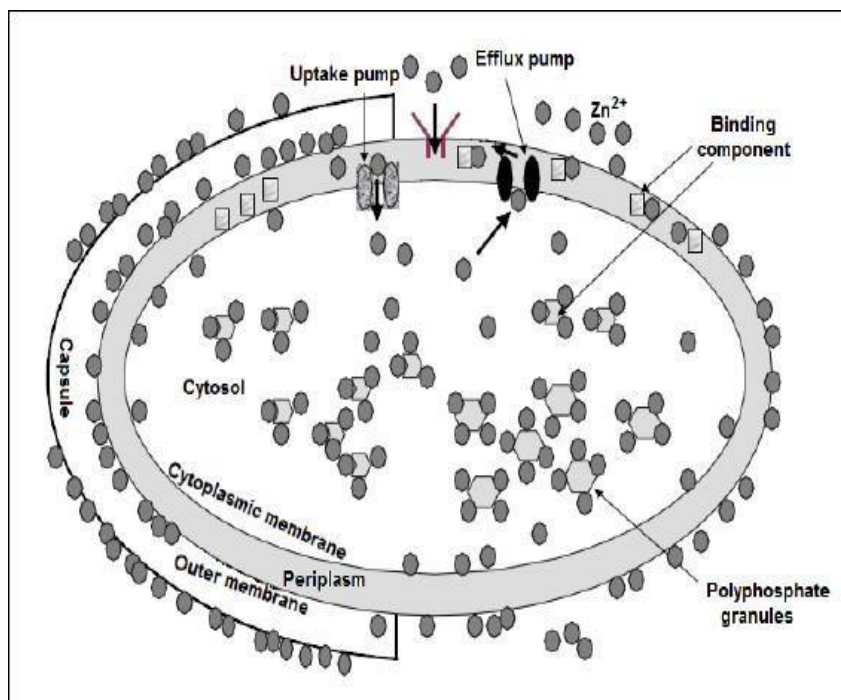


Figure 6 : Mécanismes de résistance au zinc chez les bactéries (Choudhury et Srivastava, 2001) .

2.5. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques chez les rhizobia implique différents mécanismes :

- **Modification du site cibles des antibiotiques**

Les rhizobia ont la capacité de modifier ou d'altérer les sites cibles des antibiotiques par mutation, par exemple, la mutation des éléments de liaison clés tel que l'ARN ribosomique (Wright, 2005).

- **Modification enzymatique**

La bactérie produit des enzymes modificatives qui ciblent spécifiquement et neutralisent l'efficacité des antibiotiques (Wright, 2005). En effet, elle peut acquérir des gènes de résistance qui codent des enzymes comme les B-lactamines qui sont capables de détruire l'agent

antibactérien sous une forme non toxique pour Les cellules bactériennes avant qu'ils n'atteignent son cible (**Hastings, et al., 2004 ; Tenover,2006**).

- **Développement des pompes à Efflux**

Les bactéries peuvent développer des pompes d'efflux qui éjectent l'agent antibactérien hors de la cellule avant qu'il puisse atteindre son site d'action et exercer son effet (**Tenover, 2006**). Ce processus nécessite l'énergie sous forme d'ATP. L'agent antibiotique est expulsé du système bactérien sans être altéré ou dégradé. Ce mécanisme peut engendrer la résistance à plusieurs antibiotiques, car une seule pompe à efflux peut éliminer plusieurs antibiotiques (**Naamala et al., 2016**).

- **Altération et modifications de la perméabilité de la paroi cellulaire**

Les bactéries rhizobiales peuvent développer des mutations qui restreignent l'accès des agents antimicrobiens au site cibles à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, les bactéries ont la capacité d'acquérir divers gènes impliqués dans une voie métabolique conduisant à la production de paroi cellulaire bactérienne altérées, dépourvues de sites de liaison pour l'agent antibiotique. De ce fait, l'antibiotique est expulsé de la cellule (**Tenover, 2006**).

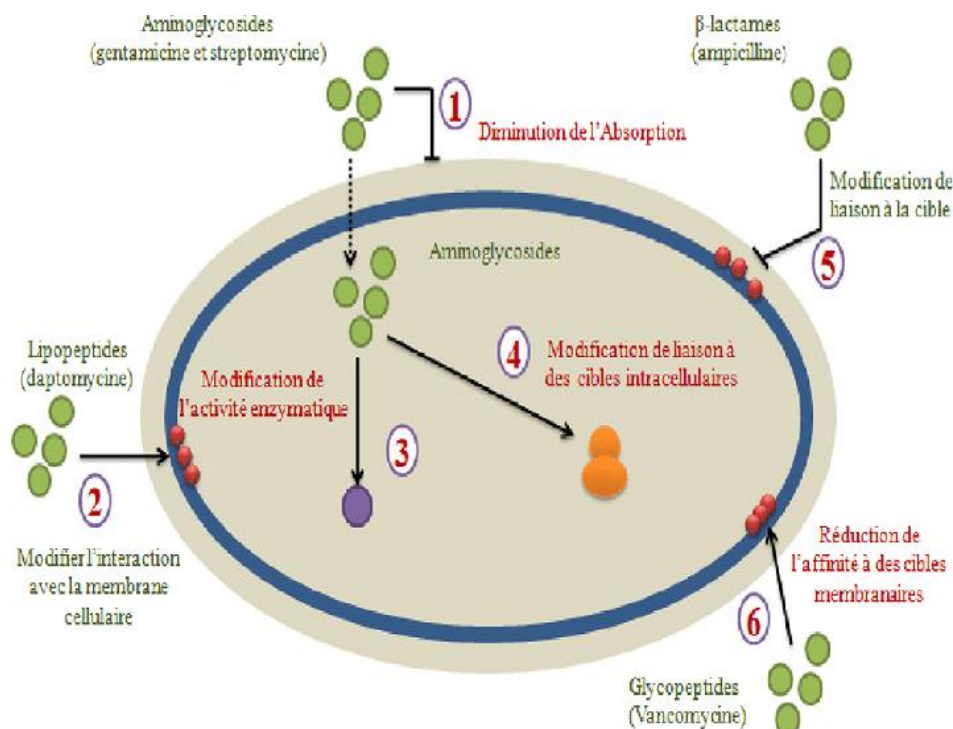


Figure 7 : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques

(**Bouyahya, et al.,2017**).

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude

Les deux plantes "*Melilotus* sp et *Phaseolus vulgaricus* utilisée dans cette étude ont été prélevées de la région de Guelma.

La région de Guelma est située à 116 km à l'Est de Constantine, à 65 km au Sud-Ouest d'Annaba, à 77 km à l'Ouest de Souk Ahras et à 537 km à l'Est d'Alger. Elle culmine à la côte de 290 m et recouvre une superficie de 4 101 km **(A.B.H, 2005)**. Guelma située au cœur d'une grande région agricole à 290 m d'altitude, entourée de montagnes (Maouna, Debagh, Houara) ce qui lui donne le nom de ville assiette, sa région bénéficie d'une grande fertilité grâce notamment à la Seybouse et d'un grand barrage qui assure un vaste périmètre d'irrigation. La région septentrionale de la wilaya est dominée par un climat subhumide, alors que sa partie méridionale est caractérisée par un climat semi-aride. Les températures moyennes varient entre 4 °C en hiver et 41° C en été. Les précipitations annuelles varient entre 654 et 1000 mm **(Haddad et al., 2015)**.



Figure 8: Localisation géographique de la zone de prélèvement.

2. Collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir de la plante légumineuse "*Mellilotus*" et "*Phaseolus vulgaris*" située dans la région de Guelma (l'Est de l'Algérie). La récolte est réalisée suivant la méthode de **Vincent (1970) et Somasegaran (1994)** qui consiste à :

Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire, puis enlever soigneusement le sol et casser les blocs de sol avec précaution pour éviter d'endommager les racines et les racines secondaires ou beaucoup de nodules sont souvent trouvés. Placer délicatement la plante dans un sac de plastique.

Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante, ensuite, on rince les racines avec précaution sous un courant d'eau afin d'éliminer les résidus de terre, puis on les sèche avec du papier filtre. Pour des raisons de stockage et d'isolement, les racines doivent être coupées à l'aide d'un couteau de 1 à 2 mm de site d'attache de nodules, ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables et propres de bactéries.



Figure 9 : plante légumineuses *Melilotus*.



Figure 10 : plante légumineuses *Phaseolus*.

3. Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4°C pour un usage immédiat.

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par **Vincent (1970)** et **Somasegaran et Hoben (1994)**. La conservation et la dessiccation des nodules sont réalisées dans des flacons en verre contenant le chlorure de calcium CaCl_2 et une couche de coton sur laquelle on dépose les nodules.

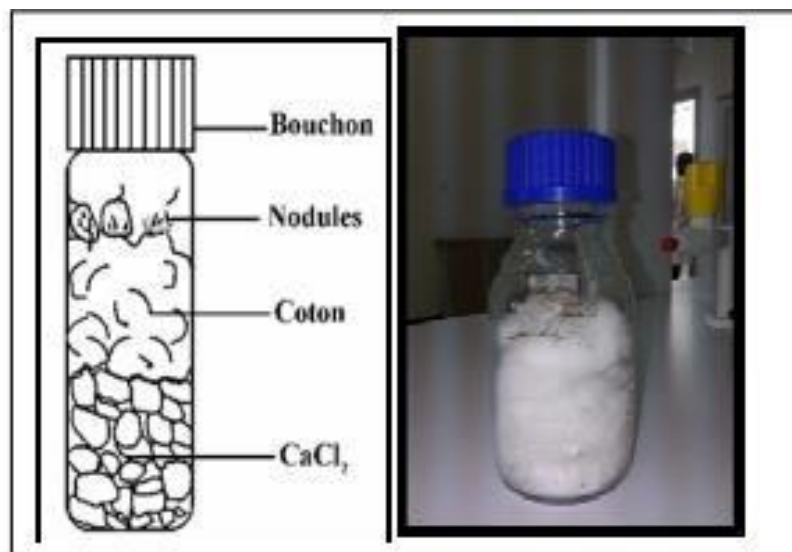


Figure 11 : Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

4. Isolement des bactéries à partir des nodules

Les nodules qui sont déjà conservés précédemment dans CaCl_2 sont placés dans un tube qui contient l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C, puis 1 heure à une température ambiante.

4.1. Stérilisation des nodules

Dans un tube à essais stérile, les nodules sont immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifiée pendant 3min, ensuite rincés dans l'eau distillé stérile 10 fois, puis on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant 1 heure après le dernier rinçage.

4.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Dans une boîte de pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile. Dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile. Les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen.

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble et à l'aide d'une anse de platine stérilisée prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des trois cadrans Sur la surface des milieux YMA+ Rouge Congo, GPA+ Bromocrésol pourpre (Annexe 1), puis incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures (Vincent ,1970).

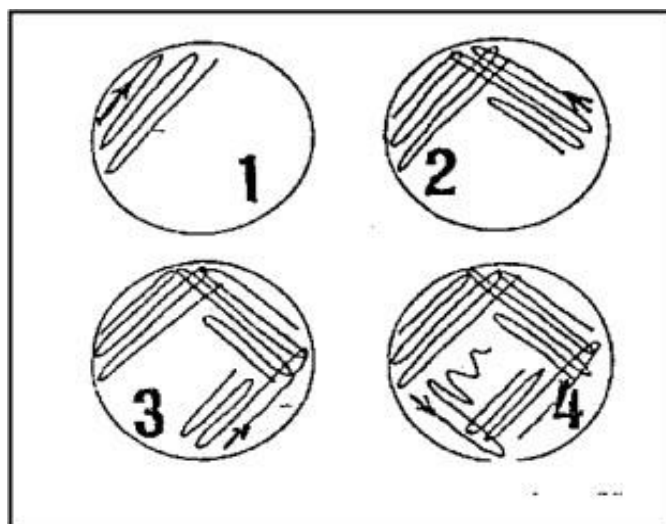


Figure 12 : Ensemencement par la technique des cadrans (Vincent ,1970).

5. Caractères culturels et morphologiques

Les isolats des deux plantes sont ensemencés sur les milieux solides : YMA (Yeast Mannitol Agar), YMA + RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge de congo), YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue) et GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre) et sur le milieu liquide YMB (Yeast Mannitol Broth) afin de déterminer leurs caractères culturels et morphologiques. Les boîtes des différents milieux et les tubes YMB sont incubés à 30°C et la lecture est faite après 24 et 48 heures.

6. Examen microscopique par la coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier.

Après préparation de frottis, le protocole expérimental consiste à :

- Recouvrir le frottis par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- Ajoutée la solution lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone.
- Laver à l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 minute.
- Laver à l'eau distillée.

- Observer au microscope.

7. Conservation des isolats

La conservation des souches se fait sur l'YMA additionné de CaCO_3 (3g/l) comme agent neutralisant de l'acidité.

Le milieu est coulé sous forme de gélose inclinée. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, on effectue des stries régulières sur la surface de la gélose. Après incubation à 30 °C pendant 3 à 4 jours, les tubes sont conservés à 4 °C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois.

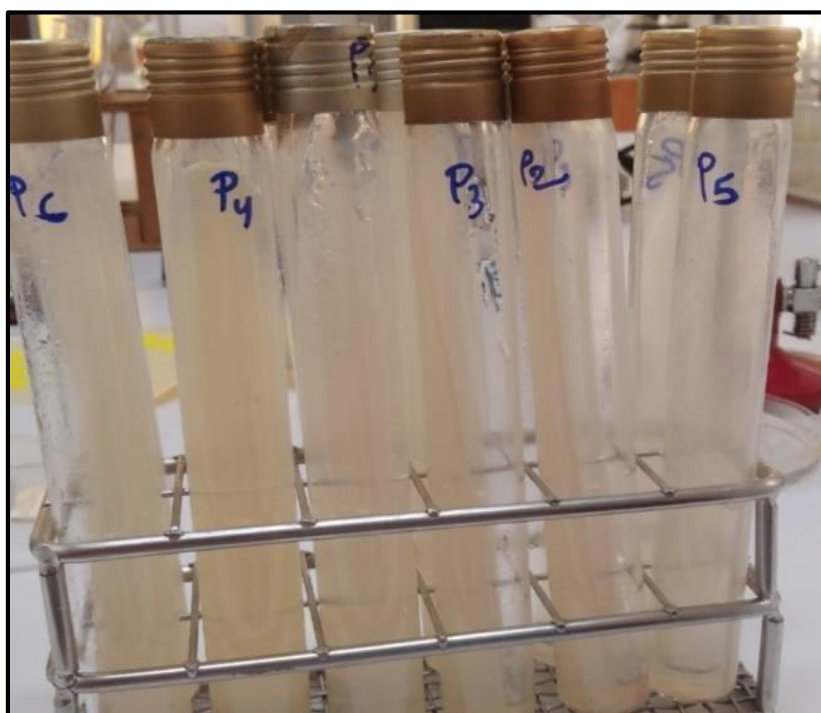


Figure 13 : Conservation des souches dans CaCO_3 .

Tableau 1: souches utilisées dans cette étude.

Isolats de plante 1	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Isolats de plante 2	M1	M2	M3	M4	M5	M6

8. Effet des conditions de croissance sur les souches bactériennes

8.1. Effet de la température

Afin d'évaluer l'effet de la température sur la croissance, les souches des deux plantes sont ensemencées sur le milieu YMA et incubées à différentes valeurs de température allant de 4°C jusqu'à 50°C. La lecture est réalisée après 24 et 48 heures. Pour la température 4°C les boîtes sont observés quotidiennement jusqu'à 10 jours.

8.2. Effet du pH

Le test est réalisé dans le milieu YMB avec différentes valeurs du pH : 4 ; 5 ; 6 ; 6,8 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10. Incuber les tubes à une température de 30°C pendant 24 heures. La mesure de croissance est évaluée par la lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 620 nm.



Figure 14 : Mesure de pH= 5 sur milieu YMB. **Figure15 :** Mesure de pH=4 sur milieu YMB.

8.3. Effet du NaCl

Pour ce test on a utilisé le milieu YMA avec différentes concentrations du NaCl : 0,1%, 1%, 2%, 3%, 5% et 10%.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 et 48 heures.

8.4. Effet des antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé sur milieu Mueller-Hinton. L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par écouvillonnage de telle façon à avoir après incubation des colonies distinctes mais jointives. L'inoculum est préparé en prélevant 1 à 10 colonies pour faire une suspension équivalente à un bouillon de 18 heures dans de l'eau physiologique.

Déposer les disques d'antibiotiques à la surface de la gélose en les appliquant délicatement à une pince stérile. Etuver 24 heures à 30°C.

Les antibiotiques utilisés sont : Rifampicine, Vancomycine, Cefoxitine, Gentamicine.

Après incubation, une lecture est effectuée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition pour chaque antibiotique.

8.5. Effet des métaux lourds

Pour évaluer l'effet des métaux lourds sur la croissance des isolats, nous avons utilisé le milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) incorporé avec différentes concentrations de métaux lourds.

Les métaux lourds testés sont le chlorure de mercure (HgCl_2) avec les concentrations de 500 $\mu\text{g/ml}$ et 1000 $\mu\text{g/ml}$ et le chlorure de zinc (ZnCl_2) aux concentrations de 1000 $\mu\text{g/ml}$ et 2000 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats sont observés après 7 jours incubation à 30°C.

Chapitre 3 :

Résultats et Discussion

1. Étude morphologique des isolats

1.1. Caractères cultureux et morphologiques

1.1.1. Sur milieu YMA

L'étude des caractères cultureux des isolats au bout de 24 à 48 heures montre qu'ils ont bien poussé sur milieu solide YMA. Les colonies sont généralement visibles en 48 heures donc elles ont une croissance rapide. Elles présentent une surface lisse d'une couleur blanche ou beige. Elles sont circulaire, convexes et une consistance crémeuse et visqueuse avec une texture homogène et translucide, semi translucide ou opaques, et mucilagineuse. La viscosité des colonies est due à la production massive d'exopolysaccharides qui peuvent avoir un rôle dans la tolérance des souches à la salinité.

Les colonies apparaissent sur milieu YMA au bout de 24 heures et se distingue par une production de poly B-hydroxybutyrate (PHB). Elles ont une couleur blanche ou crème, forme homogène et un aspect lisse brillant avec une texture translucide (**Jordan., 1984**).

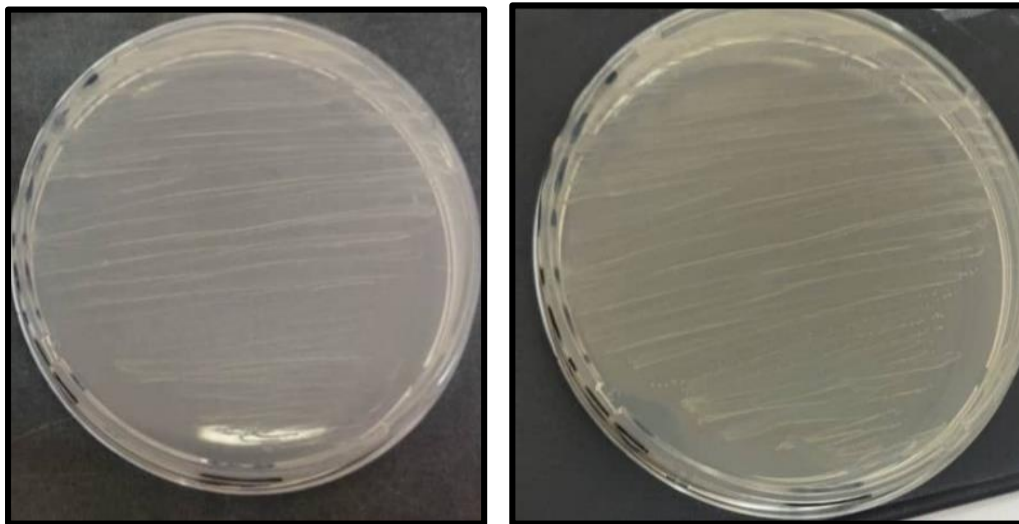


Figure 16 : croissance sur milieu YMA.

1.1.2. Sur milieu YMB

La croissance sur milieu YMB après 24 à 48 h, se traduit par l'apparition d'un trouble pour toutes les souches.

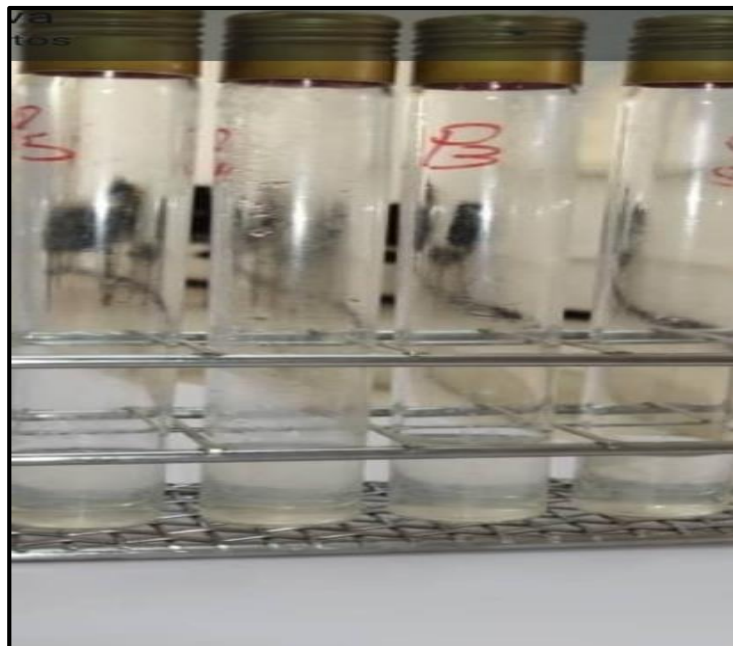


Figure 17 : : croissance Sur milieu YMB.

1.1.3. Sur YMA-RC

Les résultats montrent que la souche P3 absorbe bien le rouge Congo par contre les souches P1, P2, P4, P5, P6 l'absorbent légèrement. Pour les isolats de *Melilotus*, à l'exception des souches M1, M6 qui n'absorbent pas le rouge Congo le reste des isolats l'absorbent bien.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Howieson et Dilworth (2016)** qui démontrent qu'un des isolats n'absorbent pas le rouge Congo contrairement à la souche de *Sinorhizobium*.

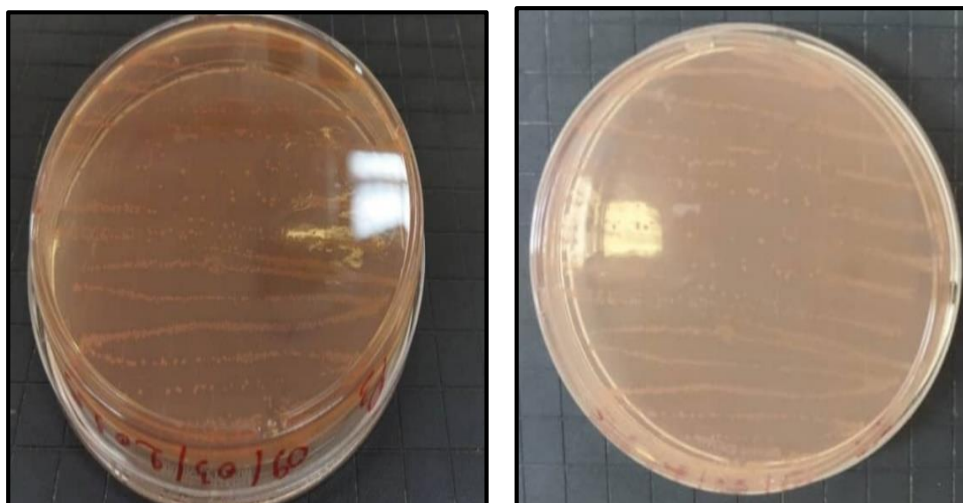


Figure 18 : croissance sur milieu YMA+RC.

1.1.4. Sur GPA-BCP

Pour le milieu GPA-BCP, la plupart des souches M1, M2, M3, M4, M5 provoquent une modification de pH et changent la couleur violette du milieu vers le jaune. Pour la souche M6 il y a une légère modification du couleur du milieu pour les isolats de *Phaseolus*. On a trouvé

que la souche P4 acidifie le milieu et le reste des isolats font un virage partiel du milieu.

Les souches isolées par **Benhmed (2010)** et ceux de **Torche (2006)** sur le milieu GPA-BCP ne modifient pas le pH du milieu et il n'y a pas une acidification du milieu.

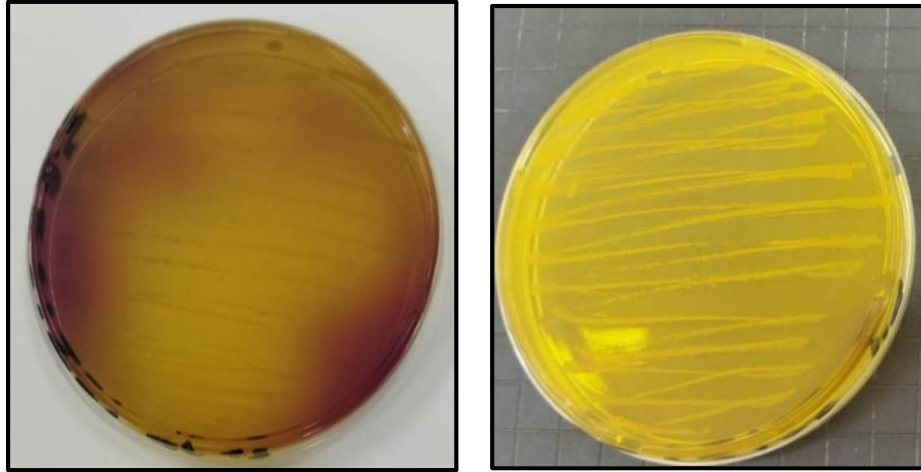


Figure 19 : croissance sur le milieu GPA-BCP.

1.1.5. Sur YMA-BTB

A l'exception de la souche M6, les isolats de *Melilotus* sur YMA-BTB acidifient le milieu et provoquent un virage de couleur de vert vers le jaune. Les résultats des souches P4, P6 et P3 montrent une bonne croissance et un changement de couleur vers le jaune, tandis que les autres souches P2, P1 et P5 provoquent une absence de changement de la couleur du milieu.

Le virage permet de distinguer les souches à croissance rapide (notamment les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, etc) qui poussent au bout de 24 heures d'incubation et virent le milieu vers le jaune des autres souches à croissance lente (notamment *Bradyrhizobium*). Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme bactéries acidifiantes contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérés comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (**Jordan, 1984 et al., Beck 1993; Pagano, 2008**).

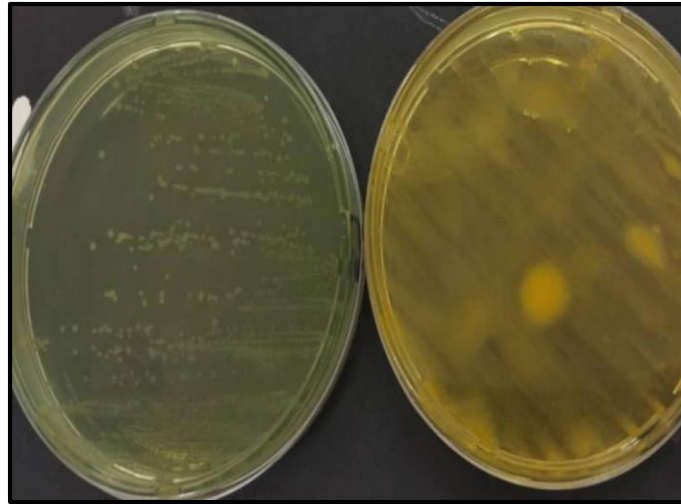


Figure 20 : croissance sur milieux YMA-BTB.

1.2. Examen microscopique par la coloration de Gram

Après coloration de Gram et observation microscopique nous avons observé des bâtonnets roses, à Gram négatif, compatible avec l'aspect des rhizobia.

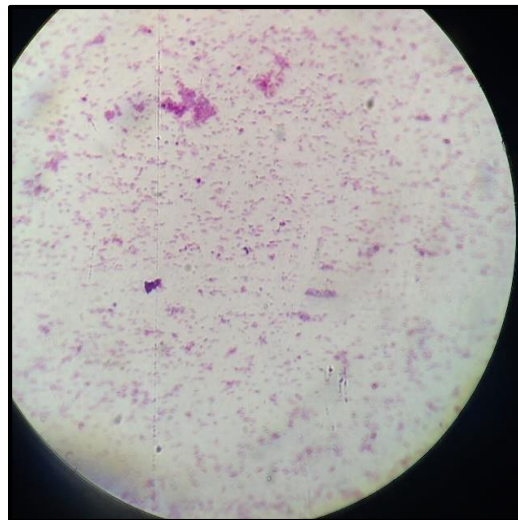


Figure 21 : Examen microscopique par coloration de Gram.

2. Effet des conditions de croissance sur les souches bactériennes

2.1. Effet de la température

Après croissance sur le milieu YMA et incubation à différentes valeurs de température, on observe que nos isolats sont capables de croître à une température de 20°C jusqu'à 40 °C avec une croissance optimale dans l'intervalle de 20 °C à 37°C. Ce qui signifie que nos souches sont mésophiles. Aucune croissance n'est observée à la valeur 50°C et 4°C.

Le caractère mésophile chez les rhizobia est signalé par **Graham (1992) et Zahran (1999)** indiquant la gamme de température optimale pour la croissance des rhizobia qui se situe entre 28° à 31°C, et beaucoup ne peuvent pas se développer au de-là de 37°C.

Tableau 2 : Effet de température sur la croissance des isolats de *Phaselous vulgaris*.

T° Souches	4°C	20°C		30°C		40°C		50°C	
Heures	10 jours	24	48	24	48	24	48	24	48
P1	—	+++	+++	+	++	+	++	—	
P2	—	+	++	++	++	++	++	—	
P3	—	+	++	+	+	+	+	—	
P4	—	+++	+++	+++	+++	++	++	—	
P5	—	++	+++	+	+	+	+	—	
P6	—	+	++	++	++	+++	+++	—	

- + : Faible croissance ++: croissance moyenne +++: forte croissance

Tableau 3 : Effet de température sur la croissance des isolats de *Melilotus.sp.*

T° Souches	4°C	20°C		30°C		40°C		50°C	
Heures	10 Jours	24	48	24.	48	24	48	24	48
M1	—	+	+++	++	+++	+++.	+++	—	
M2	—	+	+	+++	+++	+++	+++	—	
M3	—	—	—	+	+	+	+	—	
M4	—	+	+	++	+++	+	++	—	
M5	—	—	—	+	+	+	+	—	
M6	—	++	+++	+	+++	++	+++	—	

-
+ : Faible croissance ; ++ : croissance moyenne ; +++ : forte croissance

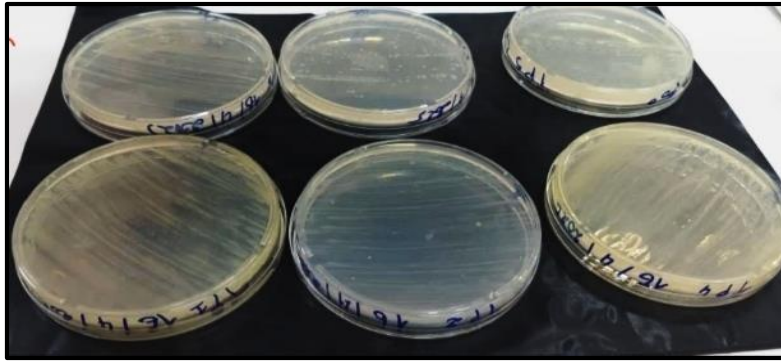


Figure 22 : Croissance des souches 20°C .

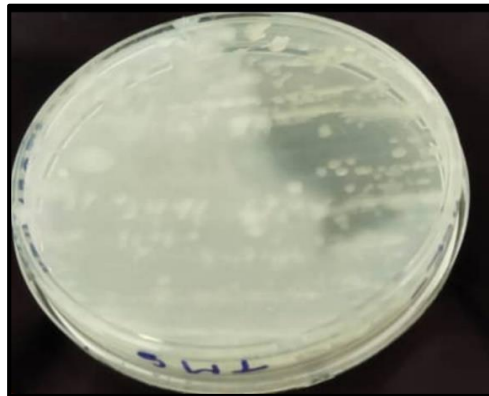


Figure 23 : Croissance de la souche M6 à 40°C .

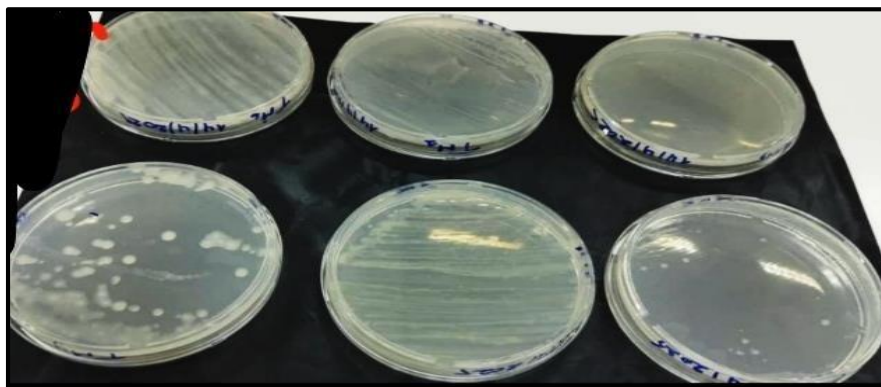


Figure 24 : Croissance des souches M à 30°C.

2.2. Effet de pH

En analysant le tableau des densités optiques à différentes valeurs du pH pour les souches P1 à P6 et M1 à M6, plusieurs observations peuvent être faites. Tout d'abord on remarque que les densités optiques varient selon le pH, ce qui suggère une réponse différentielle des souches bactériennes aux variations de pH. Les souches testées ont la capacité de croître dans l'intervalle de pH 4 à pH 10. D'après les résultats après 24 heures, l'optimum de croissance de la plupart des souches étudiées est observé à pH 6.8 et pH 9 et autre souche à pH 5. Ces résultats sont en

concordance avec les travaux de **Torche (2006)** qui a montré que la majorité de ses souches ont la capacité de pousser à l'intervalle de pH 4 à 10. On observe que les souches P1, P4, P6 et M2 présentent une capacité de croissance à pH=10, indiquant une certaine tolérance aux conditions alcaline, ce qui concorde avec les résultats de **(Zhang et al., 2006)**. Les résultats de **Hatimi et al., 2001** ont montré que toutes les souches testées sont capables de croître à un pH supérieur à 4.5. Cependant, seules les souches à croissance lente tolèrent le pH 4.

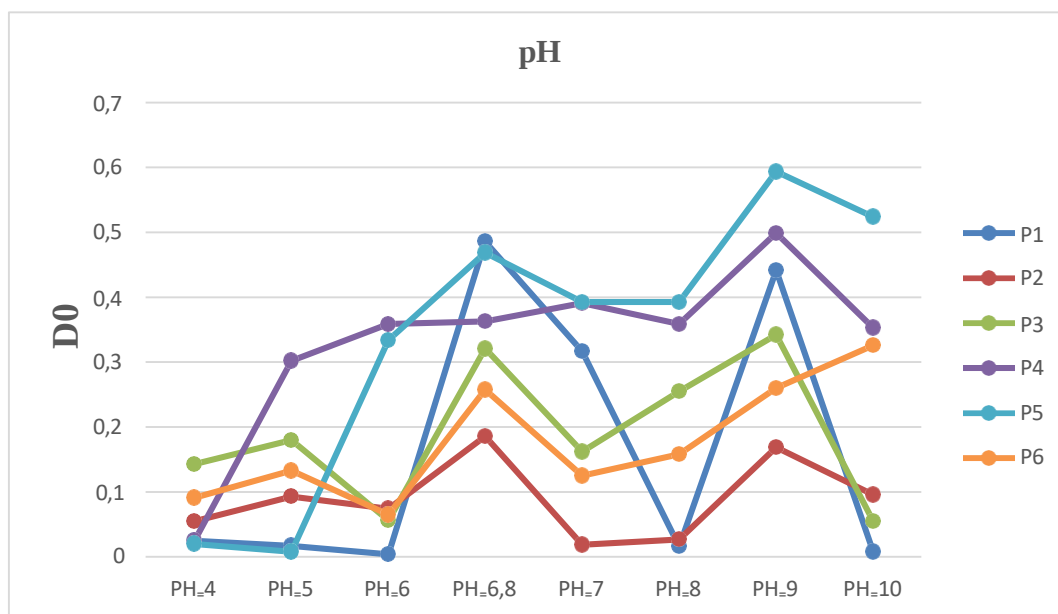


Figure 25 : Effet du PH sur la croissance des souches de *Phaseolus*.

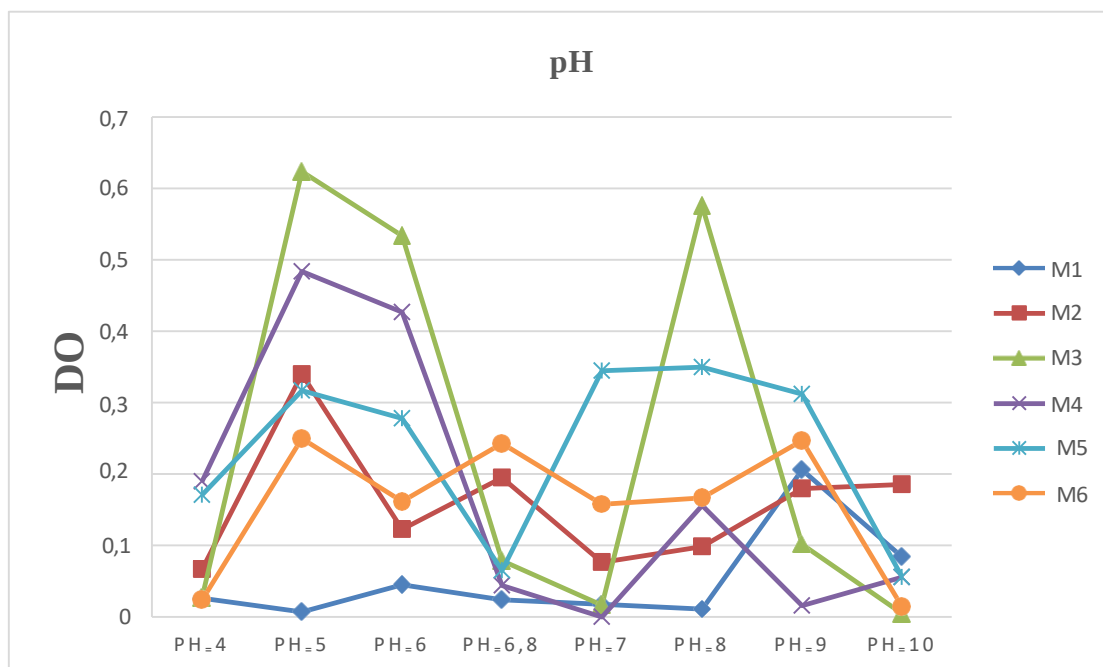


Figure 26 : Effet du PH sur la croissance des souches de *Melilotus*.

2.3. Effet du NaCl

Les souches isolées montrent une sensibilité variante aux différentes concentrations de NaCl. Toutes les souches P1 jusqu'à P6 peuvent croître dans un milieu salin jusqu'à 5% de NaCl. Aucune croissance n'est observée à la concentration 10% sauf pour les souches P3, P6 qui ont présenté une croissance faible.

En revanche les isolats M1 à la souche M6 peuvent croître de façon plus faible par rapport aux souches P. Pour la concentration 5% seulement les M6 et M2 qui tolèrent cette concentration. Aucune croissance n'est enregistrée à une croissance de 10%.

Miller et Wood (1996) ont rapporté que les rhizobia sont des bactéries sensibles à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais elles peuvent tolérer des concentrations élevées cette tolérance est en rapport avec des mécanismes d'adaptation qui permettent de surmonter l'effet du stress salin.

Les rhizobia peuvent présenter des limites de tolérance à la salinité qui peuvent être très différentes entre les espèces (**Elsheikh et Wood, 1989 ; Rai et al., 2012**) et même entre les souches de la même espèce (**Kassem et al., 1985**).

Mpepreki et al (1996), ont rapporté que l'existence des isolats dans des conditions affectées par le sel peut être une indication de leur adaptation au stress osmotique en réponse à l'augmentation de la concentration en ions et à la différence d'humidité du sol pendant les saisons sèches.

Tableau 4 : Croissance des souches de (*Phaselous vulgaris*) à différentes concentrations du NaCl.

NaCl Souches	0.1%		1%		2%		3%		5%		10%
Heures	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	—
P1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	-
P2	++	++	++	++	+	++	+	+	-	+	-
P3	+	++	-	++	+	+	-	+	+	+	++
P4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	-

P5	+++	+++	++	+++	+	++	+	++	—	+	—
P6	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	+	+++	+

+: Faible croissance; ++: croissance moyenne; +++: forte croissance

Tableau 5: Croissance des souches de (*Mellilotus* sp) sur différentes concentrations du NaCl.

NaCl \ Souches	0.1%		1%		2%		3%		5%		10%
Heurs	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	—
M1	+	++	-	++		-	+	+	—	—	—
M2	+	+	+++	+++	++		+	++	+	++	—
M3	-	+	-	+	++		-	+	—	—	—
M4	-	+	—	—		-	—	+	—	—	—
M5	—	+	—	—	+		—	+	—	—	—
M6	++	++	—	+	+		+	+	+	++	—

+ : Faible croissance ; ++ : croissance moyenne; +++: forte croissance

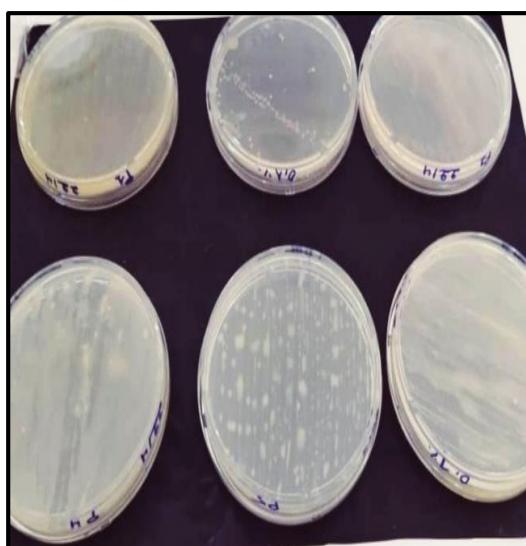


Figure 27 : croissance des souches P à la concentration 0.1% de NaCl.

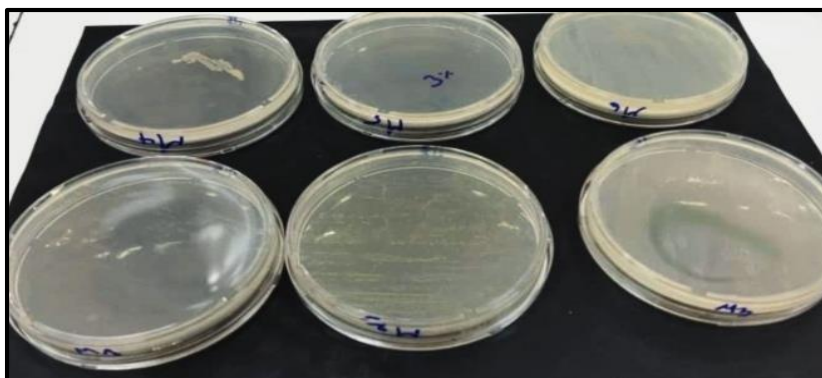


Figure 28 : Croissance des souches M à la concentration 3% de NaCl .

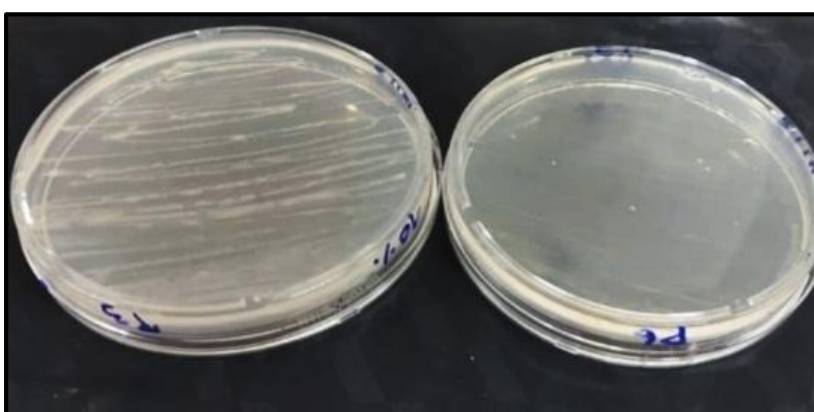


Figure 29 : croissance de souches P3, P6 à la concentration 10% de NaCl.

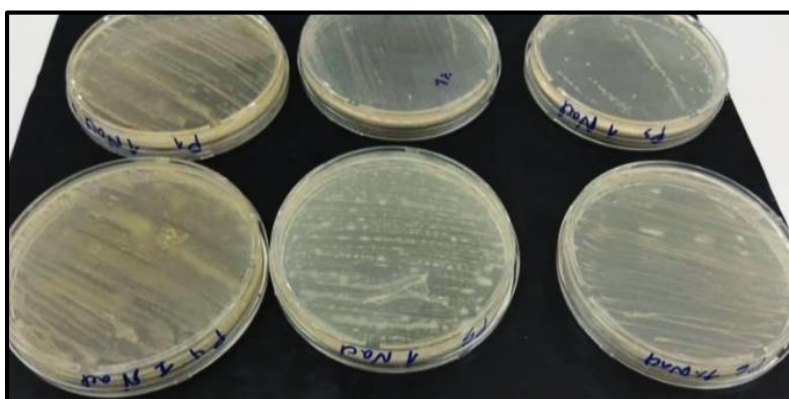


Figure 30 : Croissance des souches P à 1% de NaCl

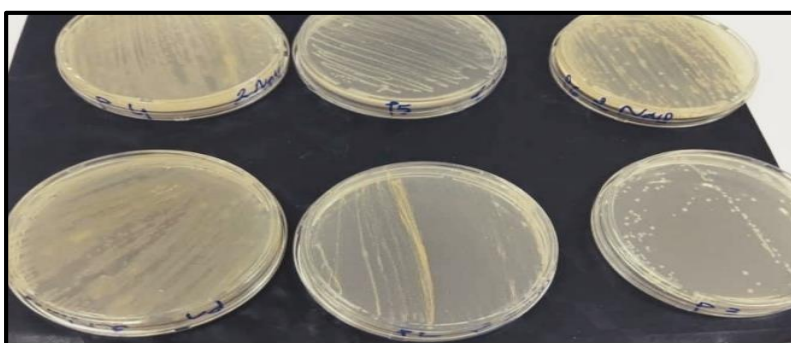


Figure 31 : croissance des souches P à 2% de NaCl.

2.4. Résistance aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme démontrent que la souche M1 est résistante à tous les antibiotiques testés et la souche P1 est résistante à la Vancomycine.

On a observé la formation des zones d'inhibition autour des disques avec des diamètres différents pour les souches isolées P6, P3, M6, M3 en présence de Gentamicine, Vancomycine, Cefoxitine, Rifampicine, ce qui traduit une sensibilité à ces antibiotiques.

La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée dans les études rhizobiales. C'est un moyen d'identification des souches et est considérée comme un bon trait pour comparer les différentes souches (**Beck et al., 1993**).

La sélection de souches présentant une résistance multiple aux différents antibiotiques est très intéressante du fait que cette résistance peut être utilisée comme un important marqueur pour l'identification des souches et l'étude de leurs diversité (**Josey et al., 1979 ; Shishido et Peppers, 1990 ; sawada et al., 1990**).

Graham et al., (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.

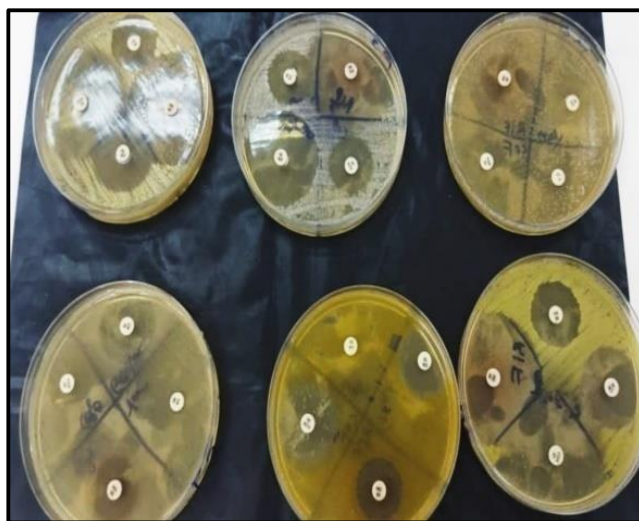


Figure 32 : Résultats de l'Antibiogramme.

2.5. Tolérance aux métaux lourds

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches ne tolèrent pas les concentrations choisies du mercure par contre pour le zinc il y a une variabilité dans la tolérance à ce métal.

Les bactéries à Gram négatif sont tolérantes à des concentrations élevées de métaux lourds, alors que les bactéries à Gram positif ne le sont pas (**Barkey et al., 1985**).

La nature du sol et son pH peuvent influencer la précipitation ou la solubilité des minéraux. Sous forme ionique, un métal devient plus mobile et donc plus toxiques. L'effet combinée du pH et des métaux lourds sur une population de *Rhizobium leguminosarum* et sur son potentiel fixateur d'azote s'est révélé plus néfaste sous les conditions d'acidité (Ibekweb et al., 1997). Certaines associations *Rhizobium* - légumineuses sont capables de se maintenir sur des sols à haut contenu en métaux lourds. En effet, l'inoculation des graines de trèfles cultivée sous stress métallique par des souches *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* efficaces et résistantes aux métaux lourds a pu augmenter le taux de la fixation d'azote (Giller et al., 1989). La sélection de souche résistante aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Plusieurs chercheurs se penchent actuellement sur l'utilisation de la symbiose entre des rhizobia et des légumineuses résistantes comme un moyen efficace de "bio-remédiation" contre la contamination des sols par les métaux lourds. En outre, l'utilisation du *Rhizobium* comme un agent de prévention dans les sols contaminés a été récemment rapportée par Abbas et Kamel (2012).

Tableau 6 : effet des métaux lourds sur la croissance des isolats.

Métaux	Concentration ug/mL de milieu TYA	P1	P2	P4	P6	M1	M2	M3	M6
Mercure	500	Absence de croissance							
	1000								
Zinc	1000	+	++	+++	++	+	++	+	+
	2000	+	++	+++	—	+	+	+	+

+ Faible croissance _ Absence de croissance ++ Bonne croissance. +++ Très Bonne croissance

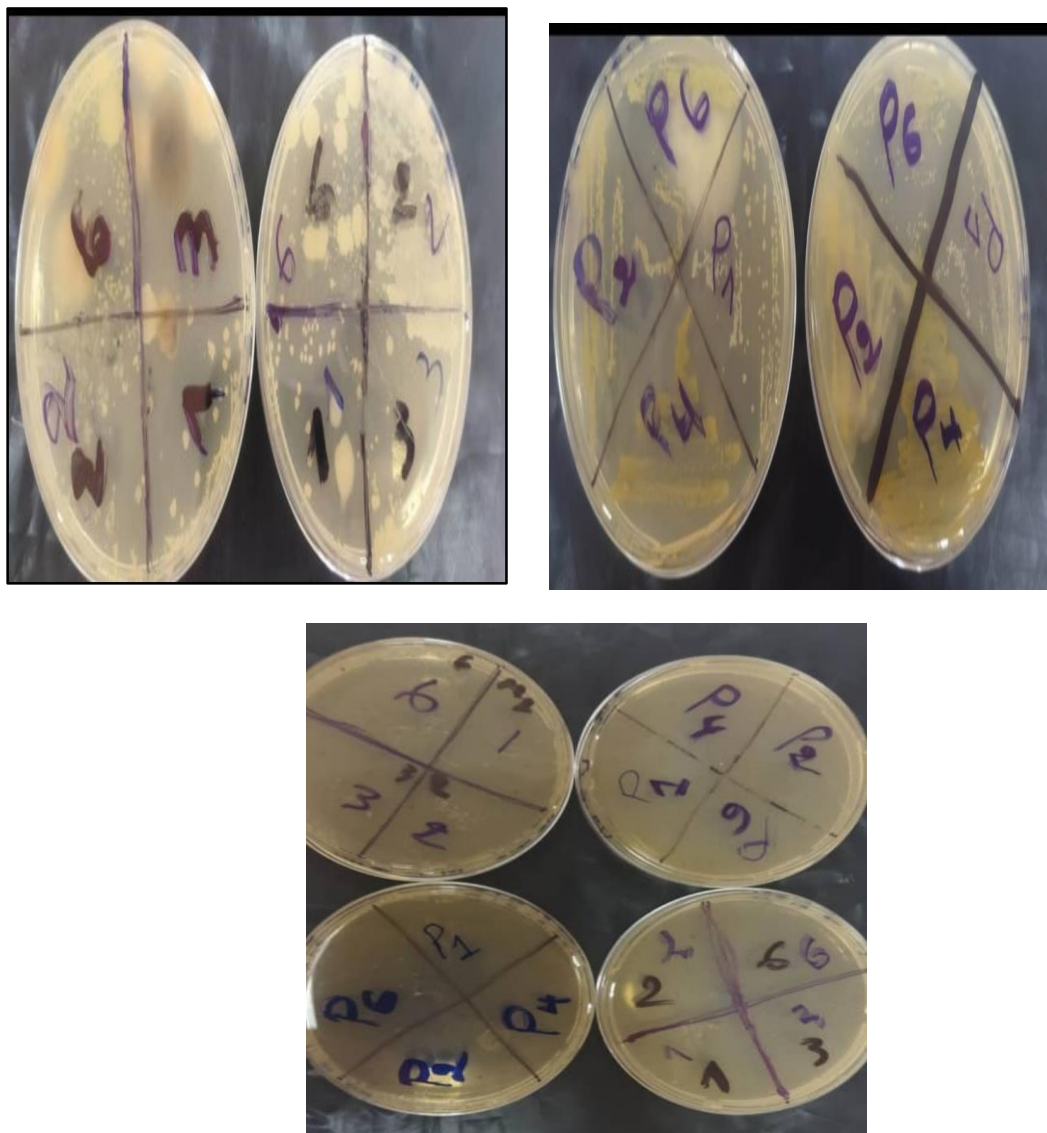


Figure 33: Effet des métaux lourds sur la croissance des souches.

Conclusion
et
Perspective

Conclusion

Dans ce travail de recherche nous avons essayé d'étudier l'adaptation des bactéries nodulant les légumineuses aux conditions extrêmes du milieu.

Pour réaliser cette étude, nous avons commencé par la collecte des nodules des deux plantes légumineuse *Phaseolus vulgaris* et *Melilotus* sp située dans la région de Guelma. Puis des bactéries ont été isolées selon la méthode des nodules écrasés.

Les isolats ont subi une caractérisation morphologique et culturale sur des milieux spécifiques solides et liquides et un examen microscopique par coloration de Gram.

La réponse des isolats aux variations de différentes conditions du milieu est réalisée en cultivant les souches sur milieux de culture avec différentes concentrations de NaCl et avec différentes valeurs du pH et incubation à différentes degrés de températures. Pour voir l'effet des inhibiteurs nous avons réalisé un antibiogramme avec plusieurs antibiotiques. La tolérance aux métaux lourds est évaluée sur milieux TYA avec des concentrations différentes de métaux lourds.

Les résultats de la caractérisation morphologique, culturale et microscopique démontrent que nos isolats ont l'aspect des rhizobia. L'étude de l'adaptation aux conditions du milieu montre que les isolats présentent une variabilité de tolérance aux différents facteurs. Les souches sont mésophiles avec celle qui peut croître à 40°C. Pour le PH, les isolats peuvent tolérer les variations des valeurs du PH allant de PH 4 à PH 10. Les isolats tolèrent également des concentrations élevées de NaCl. Il y a des souches qui peuvent croître à une concentration de 10% de NaCl. Les résultats de l'antibiogramme démontrent qu'il y a des souches résistantes à tous les antibiotiques et certaines souches sont sensibles à un antibiotique et résistantes à un autre. Tous les isolats tolèrent la présence du zinc pour les concentrations choisis et sont tous sensibles au mercure.

Ces résultats suggèrent que nos isolats peuvent développer des mécanismes d'adaptation à ces facteurs externes pour survivre dans des conditions extrêmes du milieu.

Les bactéries nodulant les légumineuses développent une variété de mécanismes pour s'adapter aux conditions extrêmes, ce qui leur permet de maintenir leur rôle crucial dans la fixation de l'azote et la fertilité des sols, même dans des environnements difficiles.

Cette recherche peut être complétée par plusieurs points :

- Etudier la diversité adaptative chez les rhizobia
- Etudier les mécanismes d'adaptation chez les rhizobia à l'échelle biochimique, physiologique et génétique.
- Sélectionner des souches rhizobiales capables de tolérer des conditions extrêmes pour améliorer la fixation de l'azote et aider les plantes légumineuses à résister les conditions de l'environnement via la symbiose.

Références bibliographiques

Bibliographie:

- A.B.H., (2005).** Les cahiers de l'agence. Les eaux souterraines dans le bassin de la Seybouse, Rapport interne 1- 46. »
- Aarons S.R. et Graham P.H., 1991.** Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. *Plant Soil*. 134 : 145-151.
- Abbas S.M. et Kamel E.A., 2004.** *Rhizobium* as a Biological Agent for Preventing heavy Metal Stress. *Asian J. Plant Sc.* 3, 416-424.
- Adams M.W., D. P. Coyne., J. H.C. Davis., P. H. Graham and C. A. Francis. (1985).** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), p. 433-476. In R. J. Summerfield and E. H. Roberts (eds.), *Grain Legume Crops*, Collins London.
- Arrese-Igor C., Esther M.G., Daniel M., Ruben L., Estibaliz L. & Erena G.Q. (2011).** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*, 5 : 24-31. Faghire M., Bargaz A., Farissi M., Palma F., Mandri B., Lluch C., Tejera G.N.A., Herrera Cervera J.A., Oufdou K. & Ghoulam C. (2011). Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55 : 69-75.
- Aydi S., Sassi S. & Abdelly C. (2008).** Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. *Plant and Soil*, 312 : 59-67.
- Baba Arbi, S. (2015/2016).** Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Rhede* et *Melilotus indicus*(L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla) [Thèse de Doctorat en Microbiologie. Annaba. Algérie].
- Barkey T., Tripp S.C. et Olson B.T., 1985.** Effect of metal rich sewage sludge application on bacterial communities of grass land soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 : 333-337.
- Baudoin J.P., Vanderborght T., Kimani P.M., Mwang'Ombe A.W. (2001).** Grain legumes: Common bean. In: Ramaeker R.H. (ed.), *Crop Production in Tropical Africa*. Brussels, Belgium: DGCI (Directorate General for International Cooperation), 317-334.

- Beck D.P., Materon L.A. et Afandi F., 1993.** Pratical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA. Syria
- Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F.J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Kuster, H., Liebe, C., Puhler, A., Weidner, S., & Batut, J. (2004).** Global changes in geneexpression in Sinorhizobium meliloti 1021 under microoxic and symbiotic conditions. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17(3), 292-303.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.3.292>.
- Benabdoun M., H. gherbi A. djekoun1, D. bogusz, C. franche, N. ykhlef .2012.** Fixation biologique de l'azote : la symbiose actinorhizienne casuarina-frankia 16 pp.15-19.
- Benahmed, Amira., 2010.** Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse Hedysarumcoronarium.Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine.Algérie. 128p.
- Berrada H et Fikri – BenbrahimK., 2014:** Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. British Microbiology Research Journal, u (6): 616 – 639.
- Blencowe, D.K., Morby, A.P., 2003.** Zn(II) metabolism in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 27 : 291-311.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... et Dakka,**
- Brondani. (2008).** Genomics of Phaseolus Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), Genomics of Tropical Crop Plant. Springe, pp. 113143.
- Chen H., Richardson A.E. et Rolfe B.G., 1993.** Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in Rhizobium leguminosarum biovar trifolii. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1798-1804.
- Choudhury, R., Srivastava, S., 2001.** Zinc resistance mechanisms in bacteria. Current Science 81 : 768-775.

- Correa O.S. et Barneix A.J., 1997.** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13 pp 153-157.
- Doyle J.J. et Luckow M.A. (2003).** The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900-910.
- Dupuy Y., Nougier P., 2005.** Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses. Paris.
- E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S., and Nuti M. P., 2002.** *Rhizobium sulla* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*): The root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- El Sheikh E.A.E. & Wood M. (1990).** Rhizobia and Bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. *Letters in Applied Microbiology*, 10 : 127- 129.
- El-sheikh, E., & Wood, M. (1989).** Réponse des rhizobia de pois chiches et de soja au sel : effets osmotiques et spécifiques des ions des sels. *Biologie et biochimie du sol*, Vol 21, 889-895 pp.
- Faghire M., Bargaz A., Farissi M., Palma F., Mandri B., Lluch C., Tejera G.N.A., Herrera Cervera J.A., Oufdou K. & Ghoulam C. (2011).** Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55 : 69-75.
- Farissi , Mohamed., Faissal, Aziz., Abdelaziz, Bouizgaren., and Cherki, Ghoulam. 2014.** La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. pp. 96-104. ISSN : 2351-80.
- Fitouri, S. (2011).** Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du *Sulla* du nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Thèse de Doctorat. Tunisie : Institut national agronomique. 109p

- Fossou, Kouakou Romain. 2001.** Diversité génétique des rhizobia associés à un champ de pois d'angle (*Cajanus cajan* L.). Diplôme d'Agronomie Approfondie (DAA) en Agronomie Production Végétales. Ecole Supérieure d'agronomie de l'institut national polytechnique Félix Houphouët Biogny de Yamoussoukro. Centre de la Côte d'Ivoire.
- Freytag G.F. et Debouck D.G. (2002).** Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. Sida Bot Misc 23. Botanical Research Institute of Texas.
- Fujihara S. et Yoneyama T., 1993.** Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1104-1109.
- Gepts P. (1990).** Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) bean, Economic Botany 44:28-38.
- Gepts P., Debouck D. (1991).** Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 7-53. In A. van Schoonhoven and O. Voysest (ed.) Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Intl, Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia.
- Gepts P., Francisco JL., Aragão Everaldo de Barros., Matthew W. Blair., Rosana Brondani.,(2008).** Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics, In: P.H. Moore, R. Ming (eds.), Genomics of Tropical Crop Plant. Springer, pp. 113-143.
- Gharzouli, Razika., 2006.** Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. Mémoire de Master en Génétique Moléculaire. Université Mentouri. Constantine. Algérie. p128.
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008.** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. Annual Review of Genetics. 42: 413–441.
- Giller K.E., McGrath S.P. et Hirsch P.R., 1989.** Absence of nitrogen fixation in clover grown

- on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* 21, 841-848.
- Graham P.H., 1992.** Stress tolerance *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. microbial.* 38 : 475-484.
- Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., Deley D.J., Jarvis B.D.W., RoslyCcky E.B., Strijdom B.W. et Young J.P.W., 1991.** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stemnodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 582-587.
- Graham PH, Vance CP. 2000.** Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research.* 65: 93–106.
- Guiraud J.P. (1998):** Microbiologie alimentaire.DUNOD. Paris.
- Haddad, S., Hanane, S., Houhamdi,M. (2015).** La reproduction de l'hirondelle rustique (*Hirundo Rustica*) dans un milieu urbain nord-africain : quel impact des conditions climatiques et de l'application des insecticides?. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)*, 70(3), p. xxx-xxx.
- Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. et Slack, A. (2004).** Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*, 12(9), 401-404.
- Hatimi, A., Bani-Aameur, F., & Oihabi, A. (2001).** Caractérisation de souches de *Rhizobiums* autochtones des dunes: effet sur la croissance et la nutrition azotée d'*Acacia cyanophylla* Lindl. *Acta botanica gallica* , 148 (3), 191-199.
- Hirsch P. R., 1996** – Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.*, 133 : 159-171.
- Hopkins. W.G. 2003.** Physiologie végétale. Edition de boeck. Université de Lille. France.
- Howieson, J.G., Dilworth, M.J., 2016.** Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

- Huhevet J., Keiter E.A., Keiter R. (1996).** Chimie inorganique. Ed. De Boeck université. 1072.
- Hungria, M., Vargas, M.A.T., 2000.** Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res.* 65, 151–164.
- Ibekwe A.M., Angle J.S., Chaney R.L. and Vonberkum P., 1997.** Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric. Ecosyst. Environ.* 61, 103-111.
- Jordan D.C., 1984.** Family III. Rhizobiaceae. In Kreig N.R. and Holt J.H. (Eds.). *Bergey's*
- Jordan D.C., 1984:** Rhizobiaceae. In N. R.Krieg and J.G.Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1 the Williams & Wilkins, Co., Baltimore: 234-245
- Jordan D.C.,(1984).**family 3 .Rhizobiaceae Conn 1938.p.234-254.In N.R.Krieg and J.G.Holt (ed) .bergey's manual of systematic bacteriology .vol.1.the Wlikins co.Baltimore.234-256p.
- Jordan, D.C. (1984)** Rhizobiaceae. Dans N. R. Holt (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* : Vol. 1 (pp. 234-244). Baltimore : Williams et Wilkins.
- Jordan DC. 1984.** Family III. Rhizobiaceae. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. P: 234–242.
- Josey D.P., Beynon J.A., Jonston W.B. et Beringer J.E., 1979.** Strain identification of *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 46, 343-350
- Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A et Stevens P. (2001).** Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.
- Kaplan L. (1981).** What is the origin of the common bean? *Eton. Botany* 19:358-368.
- Kassem, M., Cappelano, A., &Gounot, A.M. (1985).** Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *Journal Mircen.* Vol 1, 63-75 pp.

- Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C. & Maier, U.G. 2007.** Nitrogen fixation in eukaryotes - new models for symbiosis. *BMC EvolBiol*, 7, 55. Université de conservation de la nature et de développement, 96, Disponible sur : http://www.memoireonline.com/08/10/3782/m_Notes_decologie-generale23.html.
- Kulkarni, S., Surange, S., Nautiyal, C.S., 2000.** Crossing the limits of Rhizobium existence in extreme conditions. *Curr. Microbiol.* 41, 402–409.
- Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S., 2014.** Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. *MicrobiologicalResearch*. 169 (1): 2-17.
- Lopez M., Herrera-Cervera J.A., Iribarne C., Tejera N.A. & Lluch C. (2008).** Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress : Nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 165 : 641-650.
- Madigan M., et Martinko., 2007.** *Biologie des micro-organismes*. Ed. Pearson. Paris
- Maréchal R., Mascherpa JM., Stainier F. (1978).** Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'analyse informatique. *Boisiera* 28: 273
- Maynaud G .2012. Adaptation** aux métaux lourds de population de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers. Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers, Thèse pour l'obtention du grade de docteur, Microbiologie, parasitologie, Université Montpellier II école doctorale, Page 44.
- Miler K.J., Wood J.M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann.Rev.Microbiol*-50-pp 101-136.
- Mouafek A. (2010).** La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra. Mémoire de magister, Sciences Agronomiques, Université de Mohamed khider Biskra, p 6 et 37.
- Mpepereki, S., Wollum, A. G., & Makonese, F. (1996).** Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soils. *Plant and soil*, 186, 167-171.

- Münchbach, M., Nocker, A., Narberhaus, F., 1999.** Multiple small heat shock proteins in rhizobia. *J. Bacteriol.* 181, 83–90.
- N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), 173-183.
- Naamala, J., Jaiswal, S. K. et Dakora, F. D. (2016).** Antibiotics resistance in Rhizobium: type, process, mechanism and benefit for agriculture. *Currentmicrobiology*, 72, 804- 816
- Nandal K., Sehrawat A.R., Yadav A.S., Vashishat R.K. & Boora K.S. (2005).** High temperature induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat resistant mutants of Rhizobium sp. (Cajanus). *Microbiological Research*, 160 : 367-373.
- Noel. 2009.** Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'angle (caganuscajan I) à Yamoussoukrou. Centre de la Cote d'Ivoire.
- Pagano, M.C. (2008).** Rhizobia associé à l'arbre néotropical *Centrolobium tomentosum* utilisé dans la restauration riveraine. *Végétal, sol et environnement*, 54(11), 498-508
- Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004:** Organo genesis of legume root nodules. *Int RevCytol*: 62- 201.
- Pavel, V., Sobariu, D., Fertu, I., Stătescu, F., and Gavrilesu, M. (2013)** Symbiosis in the environment biomanagement of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Science and Theology* 9. 4: 211-224.
- Pereira, S.I., Lima, A.I., and Figueira, E.M. (2006)** Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from contaminated Portuguese soils. *Microbial Ecology* 52. 2: 176-186.
- Peron. (2006).** Productions légumières, 2 ème édition lavoisier, 389P
- Perry J.J., Staley J.T., Lory S. 2004.** Microbiologie. Edition Dunod, Paris. PP. 633-635.

- Priefer U B, Aurag J, Boesten B, Bouhmouch I, Defezy R, Filali-Mltouf A, Miklis M, Moawad H, Mouhsin B, Prell J, Schlüter A, Senatore B (2001)** Characterization of Phaseolus symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. J Biotechnol 91: 223-236.
- Rabah CH.2009.**Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre Trigonella L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est Algérie. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister (École Doctorale), Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie, p 6.
- Rai, R., Dash, P.K., Mohapatra, T., & Singh, A. (2012).** Caractérisation phénotypique et moléculaire de rhizobia indigènes nodulant le pois chiche en Inde. Journal indien de biologie expérimentale, 50, 340-350.
- Ramdane, Iman. Boukarana, Iman.K. 2016.** Sélection des souches rhizobiennes efficaces, autochtones de la région de Ghardaïa, nodulant la luzerne (Medicago sativa L.). Mémoire Master Académique. Université KasdiMerbah. Ouargla. p.95.
- Raven P.H., Evert R.F et Eichlorn S.E. (2000).** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.
- Rodrigues, C.S., Laranjo, M., Oliveira, S., 2006.** Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. Curr. Microbiol. 53, 1–7
- Rodriguez-Navarro DN, Dardanelli MS et Ruiz-Sainz JE, (2007).** Attachment of bacteria to the roots of higher plants. FEMS Microbiol Lett. 272:127-136
- Rose M.R. et Mueller L.D. (2006).** Evolution and ecology of the organism. Ed. Pearson. 693.
- Salehi M., Salehi F., Poustini K. & Heidari-Sharifabad H. (2008).** The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of Medicago sativa L. in the seedling emergence stage. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4 : 413-415.
- Sawada Y. Miyashita K. et Yokoyama T., 1990.** Diversity within serogroups of Japanese isolates of Bradyrhizobium as indicated by intrinsic antibiotic resistance. Soil Sci. Plant Nutr. 30, 501-504

- Shishido M. et Pepper I.L., 1990.** Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 22, 11-16.
- Silver, S., Phung, T., 2005.** A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32 : 587-605.
- Sobti, Sarah. 2013.** Isolement des bactéries telluriques résistantes aux effets de salinité.thèse master. Université kasdi merbah, ouargla. Algérie
- Somasegaran P et Hoben H.J., 1994.** Handbook for rhizobia: methods in legumes-RhizobiumTechnology. Springer verlag. ISBN:0-387-94134-7.
- Somasegaran P, Hoben HJ. 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag. Berlin.
- Spaink HP. 2000.** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology.* 54: 257–288.
- Squartini A., Struffi P., Do-ring H., Seleska-Pobell S., Tola E., Giacomini A.,Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S., and Nuti M. P., 2002.** *Rhizobium sulla esp. nov.* (formerly *Rhizobium hedysari*): The root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol.*
- Suty, L. (2015).** Les végétaux : Des symbioses pour mieux vivre. France : Quæ
- Tenover, F. C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10.doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011.
- Todar, K. (2004).** Todar's online textbook of bacteriology.
- Torche, Asma., 2006.** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie.166p.
- Vincent, J. M. 1970.** The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

Gepts P., Beavis W.D., Brummer E.C., Shoemaker R.C., Stalker H.T., Weeden N.F.,

Werner D., 1992: Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.

White, J., Prell, J., James, E.K., Poole, P., 2007. Nutrient sharing between symbionts. Plant Physiology. 144(2): 604–614

Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Advanced drug delivery reviews, 57(10), 1451-1470

Young N.D. (2005) Legumes as a model plant family: genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. Plant Physiol 137: 1228- 1235.

Zahran H.H. (1999). Rhizobium-legumes symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63 : 968-989.

Zhang S.D., Kassis J., Olde B., Mellerick D.M. & Odenwald W.F. (1996). Pollux, a novel Drosophila adhesion molecule, belongs to a family of proteins expressed in plants, yeast, nematodes and man. Genes and Development, 10 (9) : 1108-1119.

Site web:

[1]. Herbari virtual del mediterrani occidental. (2020). *Melilotus officinalis* (L.) Pall.

Disponible sur : <http://herbarivirtual.uib.es/en/general/1217/especie/melilotus-officinalis-l-pall> (Consulté le : 03/05/2023).

Annexes

Annexe 01:**Milieux de culture et solutions utilisés****Composition de milieu YMB (Yeast mannitol broth) en g/l (Vincent, 1970).**

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	4 0.50 Mg
SO ₄ H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA (Yeast mannitol agar) en g/l (Vincent, 1970).

YMB	1000 ml
Agar	15
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA+ rouge Congo en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml
Agar	15
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge congo (0.25g rouge congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu YMA+ bleu de bromothymol en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5 ml
Agar	15
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.
Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0. 5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.	

Composition de milieu GPA (Glucose peptone agar) + pourpre de bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	15
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.
Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100 ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement de milieu.	

Composition du milieu YMA+CaCO₃

YMB	500ml
Agar	7,5g
CaCo ₃	1,5g
PH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20 min

Composition de milieu TYA (Tryptone yeast agar) en g/l (Beringer, 1974).

Tryptone	5
Extrait de levure	3

CaCl ₂ H ₂ O	0.87
Eaudistilé	100ml
Agar	12
PH	6.8
Autoclavage	120°Cpendant20minutes.

Annexe 02 :**Tableau 01 : effet de pH (mesure de la densité Optique)**

PH souches	4	5	6	6,8	7	8	9	10
	24H	24H	24H	24H	24H	24H	24H	24H
p1	0.025	0,339	0,577	0,913	0.377	0,016	0,442	0,008
p2	0.055	0,314	0,467	0,808	0,187	0,027	0,169	0.096
p3	0.143	0,304	0,410	0,897	0,162	0,255	0,324	0.055
p4	0.247	0,457	0,631	0,958	0,391	0,359	0,499	0.353
p5	0,020	0,540	0,870	0,571	0.393	0,393	0,594	0.524
p6	0,091	0,494	1,075	0,941	0,215	0,185	0,260	0.326

Tableau 01 : effet de pH (mesure de la densité Optique)

Ph Souches	4	5	6	6,8	7	8	9	10
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
M1	0,026	0,259	0,007	0,366	0 ,045	0,086	0,024	0,045
M2	0,067	0,345	0,340	0,600	0,123	0,286	0,195	0,135
M3	0,027	0,113	0,624	0,122	0,534	0,054	0,079	0,027
M4	0,190	0,208	0,484	0,176	0,427	0,119	0,044	0,060
M5	0,171	0,102	0,317	0,084	0,287	0,047	0,065	0,001
M6	0,024	0,681	0,250	0,301	0,162	0,098	0 ,243	0,326