

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

**Contribution à l'étude de l'interaction microbienne avec les
plantes légumineuses**

Présenté par :

MAHBOUB Amina

Devant le jury composé de :

Président(e) :	khanaka K	M.A.A	Université de Guelma
Examineur :	Bedioui S	M.A.A	Université de Guelma
Encadreur :	Torche E	M.C.B	Université de Guelma

Juin 2018

Remerciements

Tout d'abord je remercie « Dieu » le tout puissant qui m'a donné la volonté et la patience d'accomplir ce travail.

Mes remerciements aux membres de jury : Mme Khanaka K et Mme Bedioui S pour l'évaluation de ce travail.

Je tiens à adresser mes grands remerciements à mon encadreur Mme Torche Asma, j'ai eu l'honneur de travailler sous sa direction. Je la remercie pour tous ses efforts, son aide, sa patience, son soutien, ses conseils, sa totale disponibilité et surtout pour sa gentillesse en parlant et en traitement respectueux.

Je tiens aussi à remercier Mr Nadjah.R pour les aides qui m'a apportées.

Je ne peux pas oublier de remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers : Mme Hassiba, Mme Wafa, Mme Ghaniya, Mme Houria et Mme Asma pour leurs aides et leurs conseils.

Enfin je veux remercier toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.

Dédicace

Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail

A ma très chère mère Saliha,

, ma raison de vivre et raison de tout succès dans ma vie.

A mes chères sœurs Meryem et Houda,

Leur soutien m'a beaucoup aidé.

Avec mes sentiments d'amour, a mon grand amour mari,

*Symbole du courage, sa patience et son aide qui m'ont toujours
encouragée.*

A ma grand-mère Hakima,

Qui m'a toujours aidé moralement.

Et à tous les membres de ma famille.

Liste des abréviations

BTB: Bleu de Bromothymol

CaCl₂ : chlorure de calcium

CE : conductivité électrique

DO:densité optique

GPA: Glucose Peptone Agar

MA: mycorhizes à arbuscules

N₂:nitrogène

NaCl:Chlorure de sodium

Nod : nodulation

pH : potentiel hydrogène

RC: Rouge Congo

YMA: Yeast Mannitol Agar

YMB:Yeast Mannitol Broth

C° : Degré Celsius

% : Pourcentage

Liste des figures

Numéro	titre	Page
1	Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère	3
2	<i>Hedysarum pallidum</i> Desf	9
3	Structure des nodules de légumineuses	16
4	Formation d'un nodule produit par Rhizobium	21
5	Localisation géographique du site d'échantillonnage	22
6	Conservation des nodules sous CaCl ₂	25
7	Ensemencement par la technique des quatre cadrans	26
8	Poids initial et constant du sol de la <i>Hedysarum pallidum</i>	32
9	Aspect sur le milieu YMB	33
10	Croissance des souches sur le milieu YMA	34
11	Croissance des souches sur le milieu YMA-RC	34
12	Croissance sur GPA+BCP	35
13	Croissance des souches sur le milieu YMA+BTB	35
14	Examen microscopique par la coloration de Gram	36
15	Test du 3-cétolactose	37
16	Utilisation des sucres comme source de carbone	38
17	Utilisation des acides aminés comme source d'azote	39
18	Réduction des nitrates	40
19	test de l'urée	40
20	Tolérance au NaCl	42

21	Effet de pH sur les souches étudiées	43
22	Résistance aux antibiotiques	44

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
1	La taxonomie actuelle des rhizobium	11
2	Exemples d'associations entre rhizobia et légumineuses	14
3	Les principales différences entre les types de nodule indéterminé et déterminé	16
4	souches utilisées dans notre étude	27
5	Résultats des paramètres physico-chimiques du sol	32
6	résultats de test Mannitol-Mobilité	36
7	Résultats des tests biochimiques	41
8	résultats de tolérance au NaCl	41
9	température de croissance	42
10	résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques	45

Résumé

Ce travail de recherche est une étude des bactéries associées aux racines de la plante légumineuse *Hedysarum pallidum* située dans la région d' Ain M'lila.

L'étude est commencée par une analyse physico-chimique du sol, lieu de récolte de la plante légumineuse objet d'étude. L'étude du microsymbiote bactérien est réalisée par une étude morphologique et microscopique suivie d'une caractérisation phénotypique comportant une série de tests (nutritionnels, biochimiques, effet des facteurs abiotique et la détermination de la sensibilité et la résistance aux antibiotiques) en présence des souches de référence. Les résultats obtenus montrent que les souches isolées ont des caractères proches aux souches de référence. Mais pour confirmer le statut taxonomique des isolats, il est judicieux de compléter l'étude de la caractérisation phénotypique par une étude moléculaire.

Mots-clés : Association symbiotique, légumineuses, *Hédysarum pallidum*, *Rhizobium*.

Summary

This research is a study of the bacteria associated with the roots of the leguminous plant *Hedysarum pallidum* located in the region of Ain M'lila.

The study is initiated by a physico-chemical analysis of the soil, where the leguminous plant is studied. The study of bacterial microsymbiote is carried out by a morphological and microscopic study followed by a phenotypic characterization comprising a series of tests (nutritional, biochemical, effect of abiotic factors and the determination of sensitivity and antibiotic resistance) in the presence of the strains. reference. The results obtained show that the isolated strains have characteristics close to the reference strains. But to confirm the taxonomic status of the isolates, it is advisable to complete the study of phenotypic characterization by a molecular study.

Key words: Symbiotic association, legumes, *Hedysarum pallidum*, *Rhizobium*.

ملخص

هذا البحث هو عبارة عن دراسة للبكتيريا المرتبطة بجذور النبات البقولي *H.pallidum* المتواجد في ناحية عين مليلة. الدراسة بدأت بتحليل فيزيوكيميائي للتربة مكان اخذ النبات البقولي قيد الدراسة.

دراسة المتعايش البكتيري تم عن طريق دراسة مرفولوجية ومجهرية متنوعة بدراسة مظهرية تستعمل مجموعة من الاختبارات (تنموية ' بيوكيميائية ' تأثير العوامل اللاحيوية وكذلك تبيين الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية) بتواجد سلالات مرجعية.

النتائج المتحصل عليها بينت ان السلالات المعزولة لها خصائص قريبة من السلالات المرجعية ' لكن من اجل التأكد من الوضع التقسيمي للعزلات 'فان الدراسة المظهرية يجب ان تكمل بدراسة جزيئية.

الكلمات المفتاحية: جمعية تكافلية ' بقوليات ' *H.pallidum* ' *Rhizobium*

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique	
1. Interactions Sol-Plantes-Microorganismes	3
1.1. La rhizosphère	3
1.2. Les plantes	4
1.3. Les microorganismes	4
2. Interactions symbiotiques : plantes légumineuses –bactéries	5
2.1. La fixation biologique de l’azote	6
2.2. Les Molécules clés de la fixation biologique de l’azote	7
2.2.1. La nitrogénase	7
2.2.2. La légghémoglobine	7
2.3. Les partenaires symbiotiques de l’interaction plantes légumineuses-bactéries	7
2.3.1. Les légumineuses	7
2.3.2. La légumineuse <i>Hedysarum pallidum Desf</i>	8
2.3.3. Les bactéries : rhizobia	10
2.4. Spécificité de la symbiose	14
3. Nodulation	15
3.1.Types de nodules	15
3.1.1.Les nodules de type indéterminé	15
3.1.2. Les nodules de type déterminé	16
3.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie	17
3.2.1. Les gènes Nod	17
3.2.2. Les gènes nif	18
3.2.3. Les Gènes fix	18
3.3. Génétique de la nodulation chez la plante	18
3.4. Les différentes étapes de la nodulation	19
3.4.1. Pré-infection (échange de signal d’infection)	19
3.4.2. L’infection	19
3.4.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes	20

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude	22
2. Analyse physico-chimique du sol	23
2.1. L'humidité relative	23
2.2. Potentiel hydrogène (pH)...	23
2.3. La conductivité électrique (CE)	23
2.4. La salinité	23
2.5. Le potentiel d'oxydo-réduction (potentiel rédox)	24
2.6. Oxygène dissous	24
3. Etude du partenaire bactérien isolé à partir des nodules de la plante légumineuse	
<i>Hedysarum pallidum</i>	24
3.1. La collecte des nodules	24
3.2. La conservation des nodules	25
3.3. Isolement des bactéries à partir des nodules	25
3.3.1. Stérilisation des nodules	25
3.3.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés	26
3.4. Conservation des souches	26
3.5. Caractères cultureux	26
3.6. L'examen microscopique par coloration de Gram	27
3.7. Test Mannitol-Mobilité	28
3.8. Test du 3-cétolactose	28
3.9. Tests nutritionnels	29
3.9.1. Source de carbone	29
3.9.2. Source d'azote	29
3.10. Tests biochimiques	29
3.10.1. Réduction des nitrates	29
3.10.2. Hydrolyse de l'urée	30
3.11. Effet des facteurs abiotiques	30
3.11.1. Température de croissance	30
3.11.2. Croissance à différents pH	30
3.11.3. Tolérance au NaCl	30
3.12. Résistance aux antibiotiques	31

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Analyse physico-chimiques du sol	32
1.1. Détermination de l'humidité relative	32
1.2. Les autres paramètres mesurés du sol	32
2. Etude du partenaire bactérien isolé à partir des nodules de la plante légumineuse <i>Hedysarum pallidum</i>	33
2.1. Les caractères cultureux	33
2.2. Examen microscopique (la coloration de Gram)	35
2.3. Examen de la mobilité	36
2.4. Test du 3-cétolactose	36
2.5. Tests nutritionnels	37
2.5.1. Source de carbone	37
2.5.2. Source d'azote.	38
2.6. Tests biochimiques	39
2.6.1. Réduction des nitrates	39
2.6.2. Hydrolyse de l'urée	40
2.7. Effet des facteurs abiotiques	41
2.7.1. Tolérance au NaCl	41
2.7.2. Température de croissance	42
2.7.3. Effet de Ph	43
2.8. Résistance aux antibiotiques	44
Conclusion et perspective	46
Références bibliographiques	48
Annexes	

Introduction

L'atmosphère terrestre est très riche en azote (N₂). Mais cet azote diatomique est sous une forme très stable, inutilisable par la majorité des êtres vivants. Seuls les procaryotes diazotrophiques sont capables de vivre avec le N₂ comme source d'azote.

La fixation d'azote est un processus qui permet de produire des substances aminées à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère (78%). Cependant, ce processus est très complexe et nécessite la biosynthèse d'une vingtaine de protéines et la consommation de beaucoup d'énergie (16 molécules d'ATP par mole de N₂ fixé) (Riah, 2010). C'est pourquoi les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses associant des bactéries fixatrices à des organismes photosynthétiques capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique (Dénarié, 2000).

De nombreuses études sur les relations plantes-microorganismes ont démontré que les plantes ont des effets clairs sur la structure et les fonctions des communautés microbiennes. Au niveau de la rhizosphère, ces effets sont principalement dus aux composés exsudés par les racines (Legay, 2013).

Parmi les symbioses endoracinaires, on trouve notamment les symbioses fixatrices d'azote faisant des bactéries capables d'assimiler de l'azote atmosphérique améliorant ainsi la nutrition azotée des plantes hôtes. Parmi ces interactions, on peut trouver les exemples suivants : (bactéries/plantes) *Rhizobium*/Parasponia; Frankia/plantes actinorhiziennes, ainsi que *Rhizobium* /plantes légumineuses (ou Fabaceae) particulièrement bien décrite aujourd'hui. La plus détaillée et la mieux décryptée est celle qui associe les bactéries Rhizobia et les plantes de la famille des légumineuses (Balzergue, 2012).

L'association symbiotique des légumineuses avec les bactéries du sol, appelée communément les Rhizobium, mène à la formation de nodosités sur les racines et tiges des légumineuses, une structure organisée dans laquelle le microsymbiote est capable de fixer l'azote atmosphérique (Benhalima, 2006).

Dans le bassin méditerranéen, la symbiose légumineuse-rhizobia est une composante importante de cet agrosystème vu ses intérêts agronomiques, économiques et écologiques. En effet, cette symbiose pourrait, lorsqu'elle fonctionne bien, assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes et garantir une production convenable

permettant ainsi aux agriculteurs d'épargner le coût des fertilisants chimiques et soulager l'environnement de leur pollution (Faghire, 2012).

Les espèces du genre *Hedysarum*, constituent un patrimoine d'un grand intérêt agro-économique grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique. Elles peuvent être ainsi exploitées dans l'amélioration des sols dégradés, surtout dans les zones arides et semi- arides. Cependant, ces espèces restent insuffisamment étudiées et peu exploitées, particulièrement en Algérie (Benhizia, 2014).

L'objectif de notre travail consiste à isoler et identifier des bactéries associées aux nodules de la plante légumineuse *Hedysarum pallidum*.

Ce travail est divisé en trois chapitres principaux :

- ✓ Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui renferme les principales informations pour mieux comprendre l'association symbiotique de la légumineuse *Hedysarum pallidum* avec les bactéries symbiotiques.
- ✓ Le deuxième chapitre exprime le matériel et les méthodes utilisées dans cette étude.
- ✓ Le troisième chapitre regroupe les principaux résultats et ses interprétations avec leur discussion.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1. Interactions Sol-Plantes-Microorganismes

Les interactions plantes-bactéries-sols sont les déterminants de la fertilité du sol et de la santé des plantes. Le succès de l'utilisation des micro-organismes bénéfiques nécessite une excellente compréhension des interactions complexes entre les différents composants du complexe végétal-sol-microorganisme. Entourant la graine en germination, connue sous le nom de spermosphère est le premier habitat utilisé par les micro-organismes développés par l'inoculation de semences et soutient l'activité microbienne (Satyaprakash et *al.*, 2017).

1.1. La rhizosphère

On désigne sous le nom de rhizosphère les racines et la zone de sol entourant les racines et étant sous l'influence du métabolisme de la plante. La rhizosphère se décompose en trois zones: l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'ectorhizosphère (sol adhérent aux racines ou sol rhizosphérique) (Lepinay, 2013). (Figure 1).

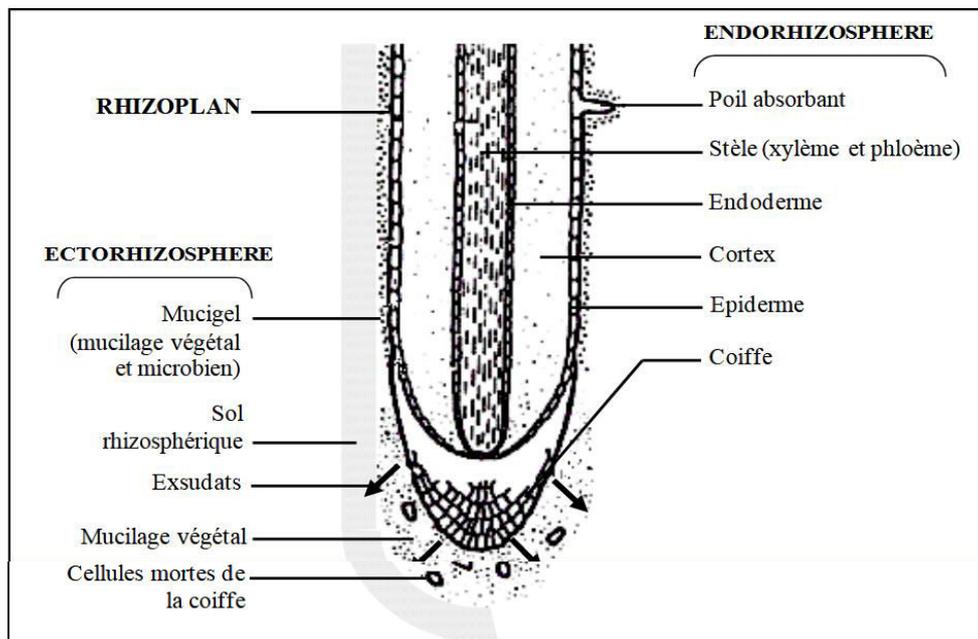


Figure 1 : Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (Lepinay, 2013).

Les interactions plante-communautés microbiennes de la rhizosphère sont bidirectionnelles. En effet, si les communautés microbiennes du sol sont capables de modifier la croissance de la plante, cette dernière a également un fort impact sur les communautés microbiennes du sol via la rhizodéposition (Zancarini, 2012).

1.2. Les plantes

Le premier processus qui intervient dans la rhizosphère est commandé par les racines des plantes qui opèrent des changements qualitatifs du sol qui les entoure, de façon physique par leur croissance et chimique par leur exsudation. Elles modifient les propriétés physicochimiques du sol tant au niveau de sa microporosité que de macroporosité (modification de pH, de potentiel redox, de température, d'aération, d'humidité, de salinité ...) qui conduisent à des modifications des propriétés biologiques et microbiologiques (Limam, 2015).

Les plantes libèrent au sein de la rhizosphère divers éléments carbonés, dont les photosynthétats, regroupés sous le terme de rhizodépôts. Ces derniers sont composés des exsudats racinaires (ou photosynthétats: sucres, acides aminés, acides organiques, hormones, vitamines), de sécrétions de mucilage (sucres polymérisés, enzymes) et de cellules sénescents (cellules de la coiffe racinaire, cellules corticales et épidermiques) puis de l'ensemble de la racine à la mort de la plante (Lepinay, 2013).

1.3. Les microorganismes

Les microorganismes de la rhizosphère interviennent dans la nutrition des plantes en influençant: la disponibilité des nutriments, la croissance et la morphologie racinaire, le processus de prélèvement des nutriments (Limam, 2015).

La biodiversité des micro-organismes dans la rhizosphère des plantes est réduite par rapport à ce qu'elle est réellement dans le sol. Le nombre d'individus par gramme de sol est en général plus élevé dans le sol rhizosphérique car les ressources trophiques et spatiales y sont plus élevées, mais la diversité des espèces présentes est moindre [6].

1. Interactions symbiotiques : plantes légumineuses – bactéries

Le terme de symbiose a été introduit en premier par Anton de Bary au milieu du 19^{ème} siècle comme la règle de vie commune de plusieurs espèces. L'association symbiotique est souvent construite autour d'un grand partenaire appelé hôte et de plus petits partenaires appelés symbiotes (Sansonetti, 2009).

Les interactions entre les plantes et les communautés microbiennes du sol reposent sur des bases de signalisation/communication mais surtout sur des relations trophiques. Les plantes dépendent des microorganismes pour leur nutrition et leur santé et les microorganismes dépendent des plantes pour leur fournir les nutriments nécessaires à leur croissance (Lepinay, 2013).

Le cas le plus étudié est celui des relations symbiotiques entre des bactéries et des plantes, (surtout les légumineuses), réalisant la fixation de l'azote atmosphérique.

La symbiose légumineuse-Rhizobium, décrite pour la première fois par Frank(1889), présente un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote. Elle constitue une association extrêmement importante du point de vue écologique et agronomique (Rajaonarimany, 2010). Les plantes de la famille des légumineuses forment une symbiose particulière avec les bactéries du rhizobium. Il en résulte la formation de nodules, qui sur les racines, fixent l'azote. Chaque variété de légumineuse a tendance à n'être compatible qu'avec un seul type de symbiote du rhizobium (Wakeford, 2004).

Cette symbiose est une association entre les plantes légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires (Fossou, 2011).

L'association bénéficie aux deux symbiotes : les bactéries obtiennent l'accès à une source d'énergie et les plantes récupèrent les composés azotés produits dans les nodules. Lorsque toutes les conditions sont réunies, les légumineuses peuvent couvrir l'intégralité de leurs besoins grâce à la fixation symbiotique. Les légumineuses ont ainsi accès à une source supplémentaire d'azote, et dépendent donc moins que les autres plantes de la disponibilité d'azote inorganique dans le sol [1].

2.1. La fixation biologique de l'azote

La fixation de l'azote est l'un des processus biologiques les plus importants sur terre, avec une estimation communément acceptée pour une fixation globale de N₂ de 175 millions de tonnes par an (Dilworth et *al.*, 2008). La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes. Elle est l'apanage du domaine des procaryotes parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé dinitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac. Les procaryotes qui fixent l'azote, nommés fixateurs d'azote, comprennent à la fois des organismes libres et des organismes, qui forment des associations symbiotiques avec d'autres organismes (Hopkins, 2003).

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

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azotes sont connues, elles englobent les associations bien connues entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses. Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte. La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine de la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules (Hopkins, 2003).

Chez les légumineuses, le symbionte est une bactérie appartenant à l'un des trois genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium*. L'ensemble de ces organismes est désigné sous le terme de rhizobiums (Hopkins, 2003).

La fixation symbiotique de l'azote, associant des rhizobia à des légumineuses, permet de diminuer les apports d'azote dans le sol via l'utilisation d'engrais chimiques tout en conservant un niveau de fertilité azoté adéquat pour assurer la productivité de l'agrosystème. En conséquence, la valorisation de la fixation symbiotique de l'azote est une composante fondamentale dans la conception d'une révolution doublement verte en offrant toute une gamme d'avantages contribuant à l'identification de pratiques culturales respectueuses de l'environnement (Mohamad, 2016).

2.2. Les Molécules clés de la fixation biologique de l'azote

2.2.1. 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 N₂ en ammonium et à une réduction associée de 2H⁺ en H₂ qui utilise 16 à 18 molécules d'ATP (White et *al.*, 2007).

2.2.2. La léghémoglobine

La léghémoglobine est une protéine pigmentée de couleur rose foncée. Elle ressemble beaucoup à l'hémoglobine des animaux, elle 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).

2.3. Les partenaires symbiotiques de l'interaction plantes légumineuses-bactéries

2.3.1. Les légumineuses

Les légumineuses constituent la troisième super - famille par ordre d'importance chez les angiospermes. Parmi les 17 à 19000 espèces de légumineuses décrites, seulement 2800 ont été examinées pour la nodulation racinaire. Cependant, la nodulation d'un nombre de plus en plus grand d'espèces est peu à peu découverte. Les légumineuses se répartissent en trois familles : les Caesalpinioideae, les Fabaceae et les Mimosoideae. Parmi les Caesalpinioideae, la nodulation est rare sauf dans la tribu des Caesalpinieae et le genre *Chamaecrista* (Cassiae). Toutes les tribus des Fabaceae sont nodulés sauf les Dipterygeae. La nodulation est générale chez les Mimosoideae, à l'exception de quatre groupes de la tribu des Mimoseae et de quelques espèces d'*Acacia* (Campa, 1998).

Les légumineuses sont inhabituelles parmi les plantes à fleurs dans leur capacité à former des associations mutuellement bénéfiques entre les microbes des racines et les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) et les genres de bactéries collectivement appelés rhizobiums (Marsh et *al.*, 2010).

La famille des légumineuses est subdivisée en trois sous familles d'importance inégale:

Les Mimosoideae

Ces plantes ont de très nombreuses petites fleurs en grappes serrées à nombreuses étamines saillantes en dehors des petits pétales ; les fleurs sont symétriques. Sont en majorité des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (Glycine, Acacia,...) (Sebihi, 2008).

Les 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 (Gramma, 2008).

Les Papilionoideae

Comprennent plus des deux tiers des espèces des trois sous-familles. Cette sous famille est très cosmopolite et compte près de 14000 espèces réparties en 476 genres de légumineuses tropicales et tempérées. Les plantes sont principalement des herbacées mais comprennent aussi des arbres et des arbustes, Parmi les espèces étudiées (21% du total), 97% sont nodulées par les rhizobiums (Riah, 2014).

Les légumineuses appartiennent à la famille des fabacées, comprenant des arbres, arbustes ou herbes qui ont en commun d'avoir des fruits en gousses. Les propriétés des légumineuses sont exceptionnelles car elles fixent l'azote dans des nodules situés sur leurs racines, ce qui les dispense d'apport d'engrais, et restituent cet azote dans le sol, venant ainsi l'enrichir [2].

2.3.2. La légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf

Hedysarum vient du mot grec Hedys, qui signifie fourrage doux à brouter. Les plantes appartenant à ce genre sont d'une manière générale constituées d'un appareil souterrain robuste portant de nombreuses nodosités fixatrices d'azote et d'un système aérien à rameaux dimorphes: tige principale orthotrope et ramifications latérales plagiotropes.

Ces espèces comme toutes les autres espèces légumineuses fourragères telles que la luzerne, participent à la fixation des sols et à leur enrichissement en azote (Benhizia, 2014).

H. pallidum Desf est une plante vivace, endémique en Tunisie et Algérie, se rencontre généralement dans l'Oranie, le Constantinois et les Aurès, dans les forêts et les broussailles. Elle se caractérise par un bon développement végétatif et par son aptitude à peupler des terrains arides et salés. Cette légumineuse pousse dans les oueds sous des pluviométries très réduites (150mm), préfère les sols moyennement calcaires à très calcaires et est plus fréquente sur les terrains plats et de faible pente (Torche, 2006).

Les espèces du genre *Hedysarum* représentent une ressource agro-économique importante en raison de leur qualité fourragère et de leur capacité à améliorer la fertilité du sol. Ils peuvent donc être utilisés pour assainir les sols endommagés, en particulier dans les zones arides ou semi-arides. Cependant, ces espèces n'ont pas été très étudiées ou exploitées, notamment en Algérie. (Benhizia et al., 2013).



Figure 2 : *Hedysarum pallidum* Desf [14].

2.3.3. Les bactéries : rhizobia

Les rhizobia furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote, c'est Franck 1889 le premier a proposé le nom de *Rhizobium* (Gharzouli, 2006).

Du grec rhiza (qui signifie racine) et bio (vie), rhizobium signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Ces bactéries présentent la capacité de former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. (Benahmed, 2010).

À la suite d'échanges de signaux moléculaires entre ces bactéries et leurs plantes hôtes, ces micro-organismes envahissent les racines et forment des nodules qui sont des structures fortement différenciées (Machrafi, 2001).

Caractères morphologiques du genre *Rhizobium*

Les rhizobia sont des cellules de taille moyenne en forme de bâtonnet, de 0,5-0,9 μm de largeur et de 1,2-3,0 μm de longueur. Ils ne forment pas d'endospores, sont Gram négatif et sont mobiles (Somasegaram et Hoben, 1994).

Caractères biochimiques

Les rhizobia à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose (Grama, 2008). Des granules de poly-b-hydroxybutyrate sont souvent retrouvés à l'intérieur des cellules (Drouin, 1996).

Caractères génétiques

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). La taille des génomes rhizobiens connus varie de 5,4 à 9,2 Mb et le nombre de plasmides varie entre 0 et 7 (Iaranjo et al., 2014).

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasme (P_{sym}) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti* (Gharzouli, 2006).

Croissance des rhizobia

Sur le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), les formes à croissance rapide produisent des colonies blanches de 1 à 5 mm après 3 à 4 jours à 25 -28 °C, alors que les colonies à croissance lente sont détectables après 5 jours et n'excèdent pas 1 mm (Benahmed, 2010).

Classification des rhizobia

La plupart de ces espèces bactériennes appartiennent à la famille des Rhizobiaceae dans les alpha-protéobactéries et appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* ou *Bradyrhizobium*. Cependant, des recherches récentes ont montré qu'ils existent de nombreuses autres espèces de *rhizobium* en plus de celles-ci. Dans certains cas, ces nouvelles espèces sont apparues par transfert latéral de gènes symbiotiques [2].

La progression de la taxonomie des rhizobiums est due à un nombre croissant de techniques efficaces disponibles dans la caractérisation bactérienne. La classification des rhizobiums a subi de grands changements au cours des dernières années en raison de nouvelles données phylogénétiques et polyphasiques qui ont mené à la description de nouveaux taxons (Zahran, 2006).

Tableau 1 : La taxonomie actuelle des rhizobium (Benselama, 2015).

Genres et espèces	Références
<i>Rhizobium</i>	Frank, 1889
<i>Rhizobium alamii</i>	New: Berge <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	New: Lu <i>et al.</i> , 2009b
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	García-Fraile <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhizobium daejeonense</i>	Quan <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhizobium etli</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993
<i>Rhizobium galegae</i>	Lindstrom, 1989
<i>Rhizobium gallicum</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizobium giardinii</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizobium hainanense</i>	Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizobium huautlense</i>	Wang <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizobium indigoferae</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Frank, 1879; Frank, 1889
<i>Rhizobium loessense</i>	Ancien nom " <i>Rhizobium huanglingense</i> " Weir <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizobium lusitanum</i>	Valverde, 2006
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium mongolense</i>	Vanberkum <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium oryzae</i>	

Tableau 1 : La taxonomie actuelle des rhizobium (suite).

<i>Rhizobium phaseoli</i>	Peng <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium pisi</i>	Confirmée comme une espèce. Ramirez-Bahena <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Ramirez-Bahena <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium sullae</i>	New: Hou <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhizobium tropici</i>	Ancien nom " <i>Rhizobium hedysari</i> " Squartin <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhizobium tubonense</i>	Martinez-romero <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhizobium undicola</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011 de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a; Young <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhizobium vignae</i>	
<i>Rhizobium yanglingense</i>	Ren <i>et al.</i> , 2011 Tan <i>et al.</i> , 2001
<i>Mesorhizobium</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1997
<i>Mesorhizobium albiziae</i>	
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
<i>Mesorhizobium australicum</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Nandasena <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	Guan <i>et al.</i> , 2008
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Velazquez <i>et al.</i> , 2001
<i>Mesorhizobium gobiense</i>	" <i>Rhizobium ciceri</i> " Nour <i>et al.</i> , 1994; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Han <i>et al.</i> , 2008b
<i>Mesorhizobium loti</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991; Jarvis <i>et al.</i> , 1997 Jarvis <i>et al.</i> , 1982; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	Vidal <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	Nandasena <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2010
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	Lu <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mesorhizobium tarimense</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	Han <i>et al.</i> , 2008b
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004 Chen <i>et al.</i> , 1995; Jarvis <i>et al.</i> , 1997
<i>Ensifer</i>	
<i>Ensifer abri</i>	Ancien nom <i>Sinorhizobium</i> Willems <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003
<i>Ensifer americanum</i>	Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
<i>Ensifer arboris</i>	Toledo <i>et al.</i> , 2003
<i>Ensifer fredii</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999 ; Young, 2003
<i>Ensifer garamanticus</i>	" <i>Rhizobium fredii</i> " Scholla <i>et al.</i> , 1984; Young, 2003
<i>Ensifer indiaense</i>	Merabet <i>et al.</i> , 2010
<i>Ensifer kostiense</i>	Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
<i>Ensifer kummerowiae</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999; Young, 2003
<i>Ensifer medicae</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003
<i>Ensifer meliloti</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996; Young, 2003
<i>Ensifer mexicanus</i>	" <i>Rhizobium meliloti</i> " Dangeard, 1926; Young, 2003
<i>Ensifer morelense</i>	Lloret <i>et al.</i> , 2007
	Cette espèce se distingue de <i>Ensifer adhaerens</i> mais pas encore nommé <i>Ensifer</i> . Voir Martens <i>et al.</i> , 2007 pour détails.

<i>Ensifer adhaerens</i>	" <i>Sinorhizobium morelense</i> " Wang <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003
<i>Ensifer numidicus</i>	Merabet <i>et al.</i> , 2010
<i>Ensifer saheli</i>	" <i>Sinorhizobium morelense</i> " Wang <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003
<i>Ensifer sojae</i>	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>Ensifer terangae</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003
<i>Ensifer xinjiangense</i>	Chen <i>et al.</i> , 1988; Young, 2003
<i>Bradyrhizobium</i>	Jordan, 1982
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005c
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1993
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	Islam <i>et al.</i> , 2008
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	" <i>Rhizobium japonicum</i> " Kirchner, 1896; Jordan, 1982
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	Yao <i>et al.</i> , 2002g
<i>Azorhizobium</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	" <i>Azorhizobium johannae</i> " de Souza, Moreira <i>et al.</i> , 2006
<i>Methylobacterium</i>	
<i>Methylobacterium nodulans</i>	Jourand <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia</i>	
<i>Burkholderia caribensis</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>Burkholderia cepacia</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>Burkholderia mimosarum</i>	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia nodosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Burkholderia phymatum</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>Burkholderia sabiae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Burkholderia tuberum</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>Cupriavidus</i>	Ancien nom " <i>Wautersia</i> " puis " <i>Ralstonia</i> "
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2001; Vandamme et Coenye, 2004
<i>Devosia</i>	
<i>Devosia neptuniae</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2003
<i>Herbaspirillum</i>	
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2003
<i>Ochrobactrum</i>	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	Zurdo-Piñeiro <i>et al.</i> , 2007
<i>Ochrobactrum lupini</i>	Trujillo <i>et al.</i> , 2005
<i>Phyllobacterium</i>	
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2003
<i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006
<i>Phyllobacterium leguminum</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006
<i>Shinella</i>	
<i>Shinella kummerowiae</i>	Lin <i>et al.</i> , 2008

2.4. Spécificité de la symbiose

L'une des caractéristiques majeures de la symbiose rhizobium-légumineuse est sa spécificité. En effet, un *Rhizobium* donné est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote seulement avec un nombre limité d'espèces végétales, défini comme son spectre d'hôte. Une espèce de légumineuses pourra établir une association symbiotique avec une ou plusieurs espèces de rhizobia, définissant ainsi le spectre d'hôte de la légumineuse. Ainsi les associations peuvent être très spécifiques (aussi appelées spécialistes) dans le cas où une seule espèce de rhizobia peut contracter une symbiose avec une légumineuse donnée ou généralistes, lorsque le spectre d'hôte de l'espèce de rhizobia considérée est large (Mohamad, 2016).

Par ailleurs la spécificité d'interaction dans la symbiose Rhizobium/légumineuse est dépendante de la reconnaissance des composés phénoliques inducteurs des gènes nod. De ce fait cela conduit à des différences d'effets des composés impliqués. Ainsi, certains flavonoïdes sont connus pour être des inhibiteurs ou des antagonistes d'activateurs de l'expression des gènes nod, empêchant ainsi la mise en place précoce de l'interaction. Par exemple, la fromonentine a un effet inhibiteur de l'expression des gènes nod chez *Rhizobium trifolii*, alors que ce même composé active l'expression des gènes nod de *Bradyrhizobium japonicum* (Walker, 2010).

Tableau 2: Exemples d'associations entre rhizobia et légumineuses (Sobti, 2013).

Rhizobia	Plantes hôtes
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Luzerne (<i>Medicago sp</i>)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>biovar viciae</i>	Pois (<i>Pisum</i>), Vesce (<i>Vicia</i>)
<i>biovar trifolii</i>	Trèfle (<i>Trifolium</i>)
<i>biovar phaseoli</i>	Haricot (<i>Phaseolus</i>)
<i>Mesorhizobium loti</i>	Lotier (<i>Lotus</i>)
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Soja (<i>Glycine</i>)
<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	Large spectre et <i>Parasponia</i> (non légumineuse)
<i>Rhizobium tropici</i>	Haricot (<i>Phaseolus</i>), Faux Mimosa (<i>Leucaena</i>)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja (<i>Glycine</i>)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

3. Nodulation

Les légumineuses forment une endosymbiose avec des bactéries fixatrices d'azote appelées rhizobia dans un processus de développement soigneusement orchestré appelé nodulation (Guan et *al.*, 2013). La grande majorité des études sur la symbiose légumineuses-rhizobium se sont concentrées sur le développement du nodule et l'initiation de la fixation de l'azote par les bactéroïdes (Fujishige et *al.*, 2006).

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de ces associations qui sont strictement contrôlées par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Dhane Fitouri, 2011 ; Khan et *al.* , 2010).

Lorsque la nodulation a lieu, le nombre de nodosités mis en place au sein du système racinaire de la légumineuse est proportionnel aux besoins en azote de la plante pour sa croissance (Voisin, 2015).

Le nodule de légumineuses est le résultat d'interactions fort complexes entre le partenaire bactérie (*Rhizobium*) et la racine à laquelle il s'est spécifiquement associé. Dans le nodule, le *Rhizobium* augmente de dimension, change de forme pour devenir un bactéroïde (Bounaama ,2014). Dans tous les cas, le nodule comporte en allant de l'extérieur vers l'intérieur l'épiderme et le cortex externe, le parenchyme nodulaire (appelé antérieurement cortex interne), qui renferme les tissus vasculaires et la zone centrale infectée, qui est le siège de la fixation de la N₂ (Bounaama ,2014).

3.1. Types de nodules

Suivant le type de légumineuse considéré, deux types de nodules peuvent être produits. Les deux types de nodules ont un processus de développement différent et ont par conséquent des caractéristiques différentes [4].

3.1.1. Les nodules de type indéterminé

Les nodules sont formés par les légumineuses issues de milieux tempérés comme la luzerne, le pois ou le trèfle. Ces nodules se développent à partir des cellules du cortex interne (Vernié, 2008). Il a un méristème apical persistant et adopte une forme cylindrique (Coba et *al.*, 2018).

3.1.2. Les nodules de type déterminé

Ces nodules sont formés par des légumineuses d'origine tropicale comme le soja ou le haricot. Ces nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe et sont caractérisés par la présence d'un méristème persistant (Vernié, 2008). Il a un méristème latéral qui reste actif pendant quelques jours. Après l'arrêt de l'activité méristématique, le nodule se développe par expansion cellulaire et adopte une forme sphérique (Coba et al., 2018).

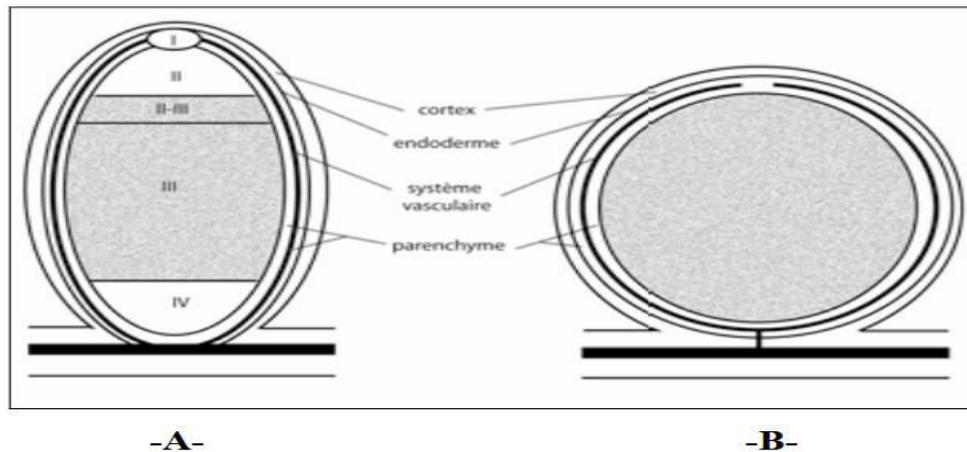


Figure 3 : Structure des nodules de légumineuses A: Nodule de Légumineuse de type indéterminé. B: Nodule de Légumineuse de type déterminé. I : zone méristématique ; II : zone d'infection; II-III : interzone II-III ; IV : zone de sénescence (Chabbi, 2010).

Tableau 3 : Les principales différences entre les types de nodule indéterminé et déterminé (Ramdane et Boukarana, 2016).

Type de nodosité	Indéterminée	Déterminée
Site de divisions cellulaires initiales	Cortex racinaire intérieur à côté du pôle de xylème	Externe ou au milieu, le cortex à côté du pôle xylème
Type de méristème	méristème Persistante	Aucun méristème persistant
Forme de nodule	Cylindrique / ramifié	Sphérique
Fil de l'infection	Large	Étroit
Les cellules infectées	hautement vacuolé	vacuolisation Minimal
Région géographique d'origine végétale	Les régions tempérées	Subtropicale et tropicale
Exemples	<i>Medicago</i> , <i>clovers</i> et <i>pea</i>	<i>Soybean</i> , <i>bean</i> , <i>Pongamiapinnata</i> , et <i>Lotus</i>

3.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie

Un certain nombre de gènes bactériens indiqués nod et nol est exigé pour la nodulation. Ces gènes sont localisés sur un grand plasmide appelé plasmide **Sym**, mais de tels gènes sont situés sur le chromosome de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (Torche, 2006).

3.2.1. Les gènes Nod

L'analyse génétique de diverses espèces de *Rhizobium* a permis d'identifier des gènes nod qui contrôlent la spécificité de l'hôte, l'infection et la formation des nodosités. Ces gènes nod sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les partenaires symbiotiques (Dénarié, 2000). Ces gènes sont activés par les flavonoïdes des exsudats racinaires émis par l'hôte et sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitoooligosaccharides (facteurs Nod) qui induisent la formation des nodules (Chabbi, 2010).

Les gènes Nod communs

Les gènes Nod A, B et C ont été les premiers gènes de nodulation identifiés. Ils sont appelés gènes Nod communs car ils sont présents chez toutes les espèces de *Rhizobium*, *Azorhizobium*, et de *Bradyrhizobium* (Morot-Gaudry, 1997). Souvent réunis en un même opéron (Davet, 1996).

Les gènes hsn (host-specific nod genes)

D'autres gènes nod, dits spécifiques. Ils sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet, 1996).

Les gènes nodD

Gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes nod sous l'action des flavonoïdes (Torche, 2006). Ils codent environ 25 protéines nécessaires à la synthèse bactérienne et à l'exportation du facteur Nod.

Facteur Nod

Est un signal lipooligosaccharide constitué d'un squelette de la chitine, de quatre à cinq unités de N-acétylglucosamine de longueur, avec un lipide attaché à la fin. Le facteur Nod initie de nombreux changements de développement dans la plante

hôte au début du processus de nodulation, y compris la déformation des poils, la dépolarisation membranaire, les oscillations intracellulaires du calcium et l'initiation de la division cellulaire du cortex racinaire qui établit un méristème et un nodule primordium (Gage, 2004).

3.2.2. Les gènes *nif*

La transcription des gènes de la fixation de l'azote (gènes *nif*) n'a lieu que dans des conditions physiologiques bien définies qui dépendent des propriétés des bactéries concernées (Saoudi, 2008). Différentes protéines codées par les gènes *nif* HDKENBQVSU sont impliquées dans la préparation de la nitrogénase (un complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote). Les gènes de fixation d'azote les plus étudiés sont ***nifH*** et ***nifD*** composants d'un opéron *nif* HDK (Pawlowski, 2009).

nif H codant pour deux sous-unités identiques de la dinitrogénase réductase. C'est le gène de fixation de l'azote le plus étudié (Pawlowski, 2009 ; Fossou, 2011).

Le codage ***nif D*** pour les sous-unités alpha dans la nitrogénase réductase (Pawlowski, 2009).

3.2.3. Les Gènes *fix*

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Hopkins, 2003 ; Torche, 2006 ; Fossou, 2011).

Les gènes *fix N, O, Q, P* codent pour le cytochrome oxydase, *fix G, H, I, S* codent pour la pompe cationique, *fix A, B, C, X* codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Grama, 2008). Ces gènes auraient ensuite été transférés horizontalement entre différents groupes de bactéries du sol, conférant à celles-ci l'aptitude à noduler les légumineuses. Ce transfert latéral des gènes de nodulation a contribué à l'évolution de la capacité symbiotique (Grama, 2008).

3.3. Génétique de la nodulation chez la plante

Les flavonoïdes constituent les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression du gène de régulation de la nodulation *nod D* et induisent le mécanisme du chimiotactisme des rhizobia (Fossou, 2011). L'hôte libère les flavonoïdes dans un processus de signalisation, qui sont perçus par ses symbiotes rhizobiens (Zaidi, 2017).

Les flavonoïdes sont des produits de type polyphénolique du métabolisme secondaire de la plante. Leur structure de base est un squelette à deux noyaux aromatiques A et B, séparés par un hétérocycle C (Claude et *al.*, 1996).

Les flavonoïdes servent de chimioattractants, influencent la croissance bactérienne et activent sélectivement l'expression des gènes de nodulation (nod) des rhizobiums symbiotiques (Pueppke et *al.*, 1998).

Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite la production par les cellules hôtes d'un certain nombre de protéines nommées nodulines en réponse des stimuli provenant des bactéries symbiotiques. Ces protéines sont codées par des gènes NOD localisés dans le génome des cellules hôtes (Hopkins, 2003).

3.4. Les différentes étapes de la nodulation

L'interaction entre les deux partenaires a lieu à toutes les étapes de la nodulation. Le développement du nodule est sous le contrôle génétique des deux partenaires. Aujourd'hui, plus de 40 gènes végétaux et 50 gènes bactériens ont été identifiés pour leur implication dans la nodulation et la fixation de l'azote (Machrafi, 2001).

3.4.1. Pré-infection (échange de signal d'infection)

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère (Peret, 2007) par un échange de signaux moléculaires spécifiques [3]. La plante permettant la croissance des bactéries de manière sélective. Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Peret, 2007 ; Patriarca et *al.*, 2004). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée. Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes nod bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod, des lipochitoooligosaccharides dont les décorations variables déterminent la spécificité d'hôte (Peret, 2007).

3.4.2. L'infection

L'infection consiste en la pénétration des Rhizobium en différents points du système racinaire (Maougal, 2004) en formant un cordon infectieux discontinu, qui a pour effet de recourber le poil absorbant. Ce cordon se ramifie pour entrer dans les cellules corticales de la racine. Cette phase comprend aussi l'activation de mitoses par

des nodulines. Ces mitoses aboutissent à la formation de petits méristèmes (tissus indifférenciés) qui permettront l'organogenèse des futures nodosités (Suty, 2015).

3.4.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Les *Rhizobium* sont ensuite libérés dans les cellules en position sub méristématique. La libération des *Rhizobium* dans le cytoplasme de la cellule hôte semble intervenir à un niveau du cordon infectieux où la gaine cellulosique fait localement défaut. Au terme de leur libération les bactéries se retrouvent dans le cytoplasme de l'hôte, séquestrées à l'intérieur d'une membrane qui les isole du cytoplasme végétal et qui dérive essentiellement du plasmalemma des cellules envahies (Ndoye, 1990).

Les bactéroïdes sont séparés du cytoplasme végétal par une membrane spéciale "péri bactéroïde" ou membrane de séquestration servant de plaque d'échange entre les bactéries et les cellules de la plante hôte. Dans cette membrane les bactéries différenciées forment les bactéroïdes de fixation de l'azote (Gharzouli, 2006).

Le nodule mature se compose de deux parties : les tissus internes, où l'on trouve les cellules infectées par les bactéries et où la fixation d'azote a lieu ; et les tissus externes qui assurent les échanges avec le reste de la plante et la protection des tissus internes (Selami, 2015).

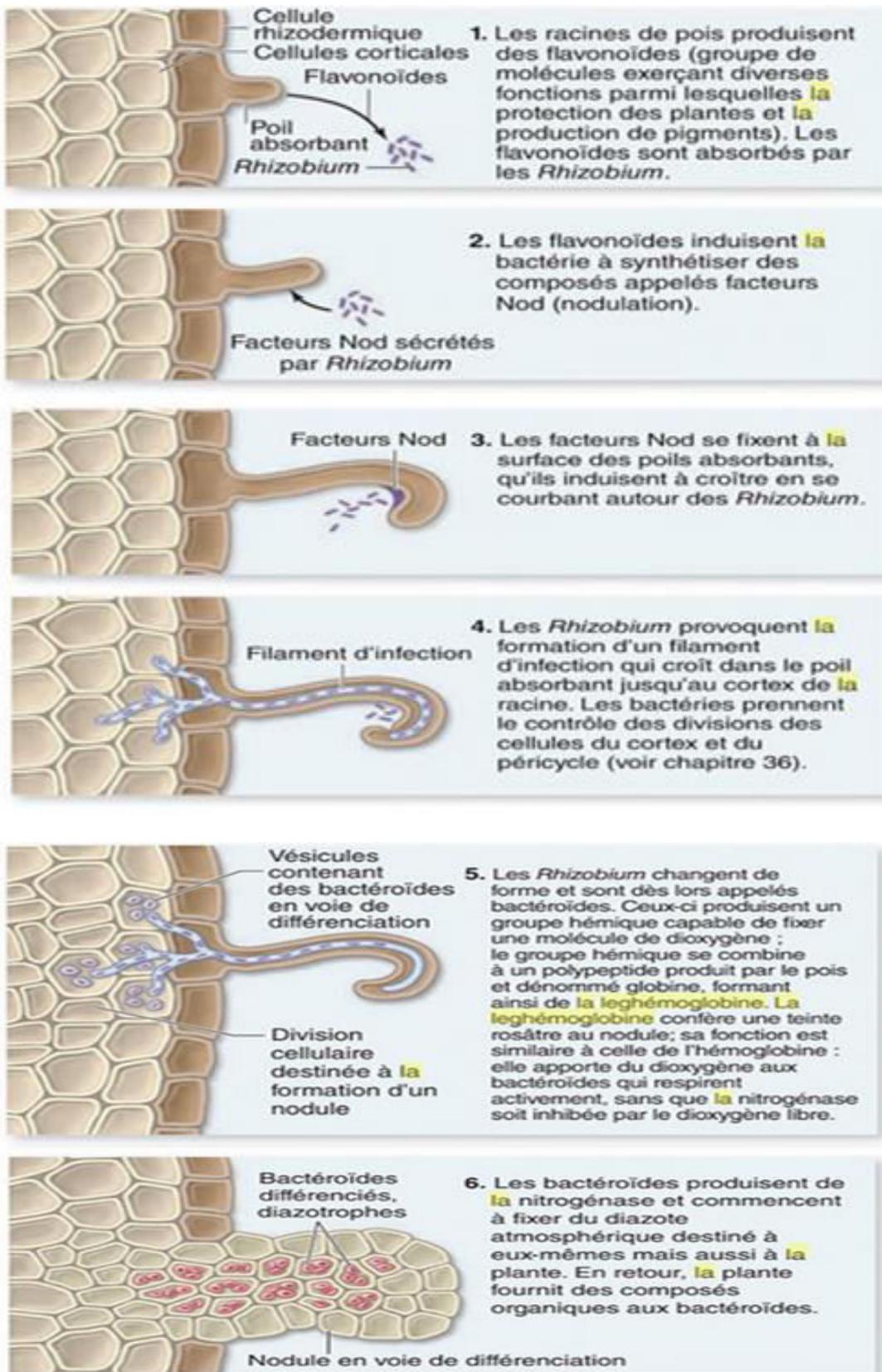


Figure 4 : Formation d'un nodule produit par Rhizobium (Raven et al., 2017)

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude

La plante utilisée dans cette étude est située dans la région d'Ain M'Lila wilaya d'Oum Elbouaghi.

Ain M'lila est une ville du nord-est algérien, grand centre commercial, au sein d'une plaine de terres fertiles, entourées de montagnes comme Djebel Guerrioun, (1729 m) à l'est et le Djebel Fortas (1477 m) au nord est, le Nif Ennser (1640 m) au sud ouest. Située à 43km au sud de Constantine, à 70km au Nord-Est de Batna et à 425km au sud-est de la capitale Alger [7]

Cordonnés géographiques : 36° 02' 00'' nord, 6° 35' 00'' est.

Altitude : 771m. [16].

La région d'Ain M'lila est caractérisée en général par un climat semi-aride; un hiver froid avec de faibles précipitations atteignant en moyenne 400mm/an, et un été sec et chaud. La température moyenne varie de 10° à 20° en hiver et de 30° à 40° en été (Boulmaiz, 2014).



Figure 5 : Localisation géographique du site d'échantillonnage [16].

2. Analyse physico-chimique du sol

2.1. L'humidité relative

L'humidité d'un sol est la quantité d'eau contenue dans un sol. Elle est mesurée par rapport à la quantité de terre sèche contenue dans ce sol et exprimée en pourcent (Limam, 2015). Il existe différentes techniques de mesure de l'humidité d'un sol, mais la démarche appliquée dans cette étude est la **démarche gravimétrique**.

Cette méthode consiste à sécher (passer dans un four à 105 °C) un échantillon de sol jusqu'au point constant. La différence du poids initial (avant séchage) et final (après séchage) correspond la quantité d'eau [11]. L'humidité relative du sol est calculée selon la formule suivante :

$$W \% \text{ humidité du sol} : [(Ph - Ps) : Ps] \times 100 \text{ [13].}$$

ph : le poids humide ; **Ps**: le poids sec ; **W %** : Teneur en eau

2.2. Potentiel hydrogène (pH)

Le pH est l'abréviation du potentiel hydrogène. Il sert à mesurer l'activité des ions hydrogènes nommés aussi protons. Le pH peut ainsi mesurer l'acidité ou la basicité d'une solution aqueuse [8].

2.3. La conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique traduit la capacité d'une solution aqueuse à conduire le courant électrique. Cette notion est inversement proportionnelle à celle de résistivité électrique. L'unité de mesure utilisée est le Siemens par mètre (S/m). La conductivité d'une solution dépend de la nature des ions présents et de leurs concentrations. Plus la concentration en ions dans la solution sera importante, plus la conductivité sera élevée [9].

2.4. La salinité

La salinisation est un terme générique caractérisant une augmentation progressive de la concentration des sels dans les sols (Marlet et Job, 2006).

2.5. Le potentiel d'oxydo-réduction (potentiel rédox)

Le potentiel d'oxydo-réduction indique le degré auquel une substance peut oxyder ou réduire une autre substance.

Une mesure de potentiel rédox positive indique qu'une substance est un agent oxydant et une mesure négative indique qu'une substance est un agent réducteur [10].

2.6. Oxygène dissous

C'est la quantité d'oxygène qui est en solution dans l'eau, sa solubilité est limitée à une valeur seuil, appelée concentration standard ou teneur à saturation. L'oxygène dissous est exprimé soit en concentration (C en mg/L), soit en pourcentage de saturation. Plus la température est élevée, plus la solubilité de l'oxygène dans l'eau est faible [15].

Pour tous les paramètres cités précédemment, nous avons préparé des solutions d'extrait de sol 1/5 (poids/volume). Les mesures sont faites à l'aide d'un multiparamètre HI9829.

3. Etude du partenaire bactérien isolé à partir des nodules de la plante légumineuse *Hedysarum pallidum*

3.1. La collecte des nodules

La collecte des nodules est effectuée en printemps dans les débuts du mois d'Avril selon les techniques préconisées par Vincent, J.M. (1970) et Somasegaran, P. et J. Hoben (1994). Selon les étapes suivantes :

Creuser environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm de profondeur.

Soulever lentement le bloc de sol et des racines.

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 toute la plante dans un sachet en plastique.

Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante et laver délicatement les racines sous l'eau courante. Pour des raisons de stockage et d'isolement, les racines doivent être coupées 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.

A la fin, sécher les nodules avec du papier filtre avant le stockage.

Cette étape est réalisée par Dr Torche.

3.2. La conservation des nodules

Les nodules prélevés sont mis au réfrigérateur à 4°C Jusqu'à 48 heures pour un usage immédiat. Mais pour une durée de conservation (de 6 à 12 mois), il est nécessaire d'utiliser un dessiccateur (déshydratant) tel que le chlorure de calcium (CaCl_2). La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre dont chaque flacon est rempli par un volume du CaCl_2 , une couche de coton sur laquelle sont déposés les nodules (nodosités). Le volume occupé par ces nodosités ne doit pas dépasser $\frac{1}{4}$ du volume global du tube.

Le flacon est identifié par :

Le nom de la plante,

La date et lieu de collecte,

La date de conservation.

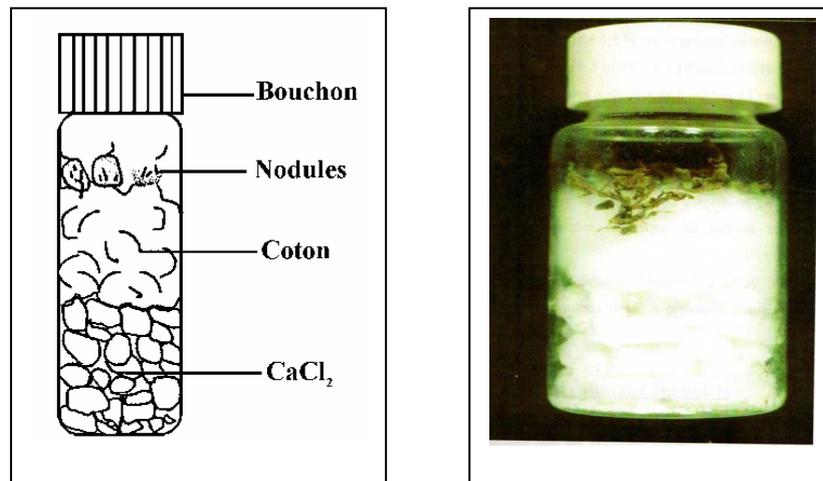


Figure 6 : Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

3.3. Isolement des bactéries à partir des nodules

3.3.1. Stérilisation des nodules

Les nodules conservés sont mis dans l'eau distillée stérile au réfrigérateur pendant une nuit et à température ambiante pendant une heure. En présence des

conditions d'asepsie, les nodules sont immergés dans l'éthanol 95% de 5 à 10 secondes puis dans une solution de chlorure de mercure acidifié 0,1% (1g HgCl₂ +5ml HCL +1l d'eau distillée) pendant 3min, après sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile, enfin on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant une heure après le dernier rinçage.

3.3.2. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Devant le bec bunsen, dans une boîte de pétri stérile, chaque nodule stérilisé est écrasé à l'aide d'une pince stérile par l'éthanol et le flambage dans une goutte d'eau distillée stérile. Le jus nodulaire obtenu est étalé par une anse de platine à la surface des différents milieux spécifiques suivant

Le milieu Yeast-Mannitol-Agar additionné de rouge Congo (YMA-RC).

Le milieu Glucose peptone agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA-BCP) (Annexe 01).

L'ensemencement est réalisé selon la méthode des quatre cadrans et les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

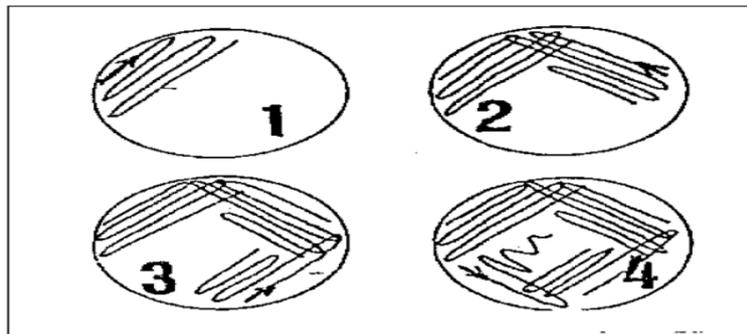


Figure 7: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

3.4. Conservation des souches

Cette opération se fait sur le milieu YMA + CaCO₃, en ajoutant 3g/l de CaCO₃ au milieu YMA. L'ensemencement se fait à partir d'une culture bactérienne par stries sur la surface d'une gélose inclinée. Les tubes sont incubés à 30°C pendant trois jours. Les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. La durée de cette conservation est de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

3.5. Caractères cultureux

Pour faire l'identification, les souches sont ensemencées sur Les milieux solides : YMA (Yeast Mannitol Agar), YMA+RC (Yeast Mannitol Agar +Rouge Congo), YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar+Bleu de Bromothymol) et le milieu

GPA+BCP (Glucose Peptone Agar+Bromocrésol Pourpre). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48h (Annexe 1). Et sur le milieu liquides YMB (Yeast Mannitol Broth). Les tubes qui contiennent 9 ml du milieu sont incubés à 30°C pendant 24 à 48h (Annexe 1).

3.6. L'examen microscopique par coloration de Gram

Après préparation du frottis, les étapes de coloration sont les suivants:

Recouvrir le frottis par le violet de gentiane, laisser agir une minute.

Verser le lugol et laisser agir 30 secondes.

Ajouter goutte à goutte l'alcool.

Rincer avec de l'eau distillée.

Recolorer la lame avec de la fuschine, laisser une minute.

Rincer avec de l'eau distillée et sécher la lame avec du papier absorbant.

Observer à immersion en utilisant le microscope optique.

Tableau 4 : souches utilisées dans notre étude

Souches	Nom	Plante- hôte	Origine géographique	Source
S1	Isolat	<i>Hedysarum pallidum</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S2	Isolat	<i>Hedysarum pallidum</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S3	Isolat	<i>Hedysarum pallidum</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S4	Isolat	<i>Hedysarum pallidum</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S5	Isolat	<i>Hedysarum pallidum</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
S6	Isolat	<i>Hedysarum pallidum</i>	Oum Elbouaghi, Algérie	Notre étude
SAM	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	S.dakkiche, Constantine
R6	<i>R. sulae</i> F	<i>Hedysarum coronarium</i>	Pise, Italie	S. Casella-Pise
R4	<i>Rhizobium sulae</i> sp. nov. A6	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar-Constantine

3.7. Test Mannitol-Mobilité

Le caractère recherché est la mobilité des bactéries. L'ensemencement se fait par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur sur le milieu Mannitol-mobilité.

Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24h.

3.8. Test du 3-cétolactose

Ce test permet de distinguer le genre *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* dont seul ce dernier produit l'enzyme 3cétoglucosidase. Il se base sur l'oxydation du C₃ du glycosyl des saccharides (Bernaerts et De Ley, 1963).

Les souches sont ensemencées sur le milieu contenant :

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Incuber à 28°C pendant trois jours

Une anse de ce milieu est transférée sur un autre milieu solide contenant :

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Incuber à 28°C pendant deux jours.

La révélation est mise en évidence par l'inondation des boites avec le réactif de Benedict à température ambiante :

Réactif de Benedict

Citrate de sodium	173g
Carbonate de sodium anhydre	100g
CuSO ₄ 5H ₂ O	17.3g
Eau distillée	1000ml

Après environ une heure, l'observation d'un halo jaune de Cu₂O de 2 à 3cm de diamètre autour des colonies sur le fond bleu du réactif indique la présence de l'enzyme.

3.9. Tests nutritionnels**3.9.1. Source de carbone**

Chaque souche est cultivée sur le milieu YMB en remplaçant le mannitol par l'un des sucres suivants : D-Fructose, D-Galactose, D-Sucrose, D-Xylose, D-Glucose, Lactose et Sorbitol. Après l'ensemencement, les tubes sont incubés à 28°C avec agitation pendant 24h.

La croissance bactérienne des souches est mesurée par la densité optique à 600nm.

3.9.2. Source d'azote

Le milieu défini 8 est le milieu utilisé pour ce test. A chaque fois, le glutamate de sodium est remplacé par l'un des acides aminés suivants : Leucine, Valine, Alanine, Proline, Lysine, Tyrosine. Après l'ensemencement, les tubes sont incubés à 28°C avec agitation pendant 24h (Annexe 1).

Mesurer la densité optique à 600nm.

3.10. Tests biochimiques**3.10.1. Réduction des nitrates**

Ce test permet de déterminer la présence de nitrate réductase, il est réalisé sur le bouillon nitrate. Après l'ensemencement, les tubes sont incubés à 30°C pendant 4 jours.

Après incubation, ajouter:

Réactif Nitrate 1 : l'acide sulfanilique.

Réactif Nitrate 2 : alpha-naphtylamine.

La formation de la couleur est le résultat de la présence de cette enzyme, s'il ya virage de couleur vers le rouge, la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase.

3.10.2. Hydrolyse de l'urée

Cette réaction enzymatique est réalisée par l'ensemencement sur le milieu Urée-indole. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24-48 heures. Le virage de couleur du milieu vers le rose indique la présence d'uréase.

3.11. Effet des facteurs abiotiques

3.11.1. Température de croissance

Pour évaluer les températures optimales de croissance des souches, ces dernières sont ensemencées sur la surface du milieu YMA à différentes valeurs de températures : 4°C, 22°C, 30°C, 37°C et 44°C. La lecture des boîtes est effectuée après 24 à 48h. La lecture des boîtes à 4°C peut aller jusqu'à 10 jours.

3.11.2. Croissance à différents pH

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu YMB où les souches sont ensemencées à différents pH : 4, 5, 6, 7, 8 et 9. Tous les tubes sont incubés à 28°C avec agitation pendant 24h.

Mesurer la densité optique à 600nm.

3.11.3. Tolérance au NaCl

Toutes les souches sont ensemencées sur le milieu solide YMA à trois concentrations : 1%, 3% et 5%.

Incuber à 28°C pendant 24h.

3.12. Résistance aux antibiotiques

A partir d'une suspension bactérienne réalisée sur le milieu YMB, on fait un ensemencement sur toute la surface des boîtes contenant de la gélose Muler-Hinton.

Déposer les disques antibiotiques à la surface de la gélose.

Incuber les boîtes à 28°C pendant 24 à 48h.

Les antibiotiques utilisés : Amikacine, Penicillin-G, Amoxicilline et Erythromycine.

1. Analyse physico-chimiques du sol

1.1. Détermination de l'humidité relative

Après 13 fois de séchage du sol (Annexe 3), et selon l'équation :

$$\% \text{ d'humidité relative du sol} = (\text{masse humide} - \text{masse sèche}) / \text{masse sèche} * 100$$

On a trouvé une faible teneur en eau représentée par une valeur d'humidité relative égale à **1.55%**. La faible teneur en eau dans ce sol est liée à la variabilité des précipitations et la capacité de rétention en eau de ce sol est faible (Escorihuela, 2006 ; Limam, 2015) (figure 8).

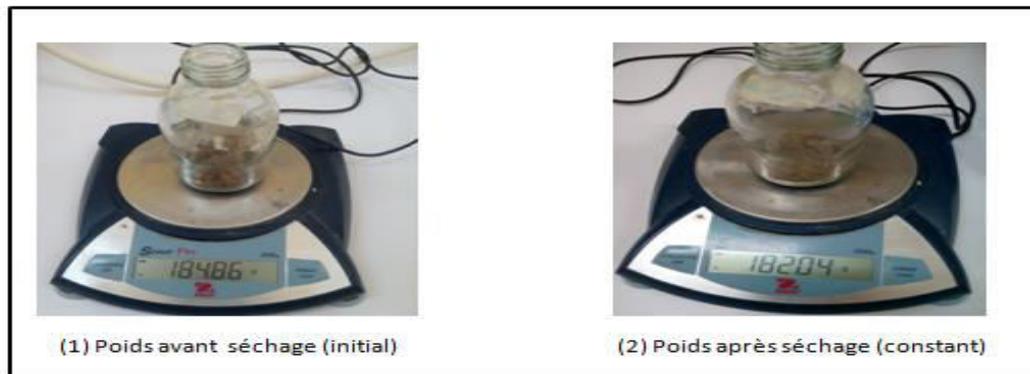


Figure 8 : Poids initial et constant du sol de la *Hedysarum pallidum*

1.2. Les autres paramètres mesurés du sol

Tous les paramètres mesurés pour l'analyse physico-chimiques du sol sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5: Résultats des paramètres physico-chimiques du sol

Paramètres	Résultats
Potentiel oxydo-réduction (ORP)	99.5 ORP
Oxygène dissous par mg/l	2.73 ppmDO
pH	7.32
Conductivité $\mu\text{S}/\text{cm}$	86 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Salinité PSU	0.04 PSU

Nous avons enregistré une valeur de pH égale à 7.32. (pH neutre). La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficiente dans le sol (Benselama, 2015).

La conductivité électrique de la solution du sol de la plante *Hedysarum pallidum* est de 86 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Cette valeur permet de confirmer que le sol de la plante est un sol peu salé d'après l'échelle de la salinité d'Aubert (Fadlia et Khemissi, 2017).

2. Etude du partenaire bactérien isolé à partir des nodules de la plante légumineuse *Hedysarum pallidum*

2.1. Les caractères culturaux

La croissance sur le milieu liquide YMB pendant 24 à 48h, se traduit par l'apparition d'un trouble pour les isolats et les souches de références (figure 9).



Figure 9 :Aspect sur le milieu YMB

Sur le milieu solide YMA, les différentes souches ont bien poussées au bout de 48 heures d'incubation sauf la souche isolée S3 qui n'a pas bien poussée sur ce milieu. Les colonies apparaissent avec une couleur blanche ou crème, lisses et elles ont une texture translucide. Ce qui est décrit par Vincent (1970) et Jordan (1984) pour les rhizobia (figure 10).

Les souches isolées S1 et S2 sont plus visqueuses par rapport aux autres souches.

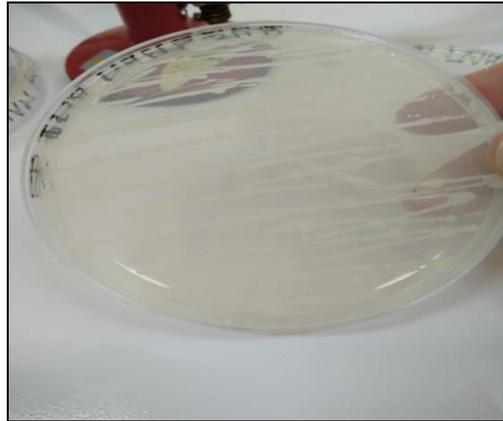


Figure 10 : Croissance des souches sur le milieu YMA

Après 72 heures d'incubation sur le milieu YMA-RC, les souches isolées absorbent très peu le colorant Rouge Congo, on observe que les colonies apparaissent visqueuses avec une couleur rose. Ceci est observé chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent ; 1970). De même Howieson et Dilworth (2016) ont mentionné que certaines bactéries nodulaires telles que *Sinorhizobium* absorbent le Rouge Congo. Aussi les souches de *R.meliloti* et *R.trifoli* cultivées sur YMA-RC sont colorées blanches, roses, oranges ou rouges (Kneen et La Rue, 1983) (figure 11).

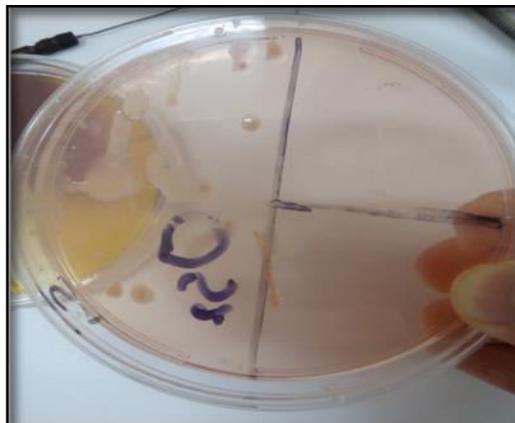


Figure 11 : Croissance des souches sur le milieu YMA-RC

Sur le milieu GPA contenant le pourpre de bromocrésol, la croissance de nos souches provoque une modification du pH et change la couleur du milieu du violet vers le jaune. Par contre, la croissance des souches isolées par Benahmed (2010) sur le milieu GPA+BCP ne modifie pas le pH du milieu c'est-à-dire ya pas une acidification du milieu. Ainsi que les résultats de Torche(2006) (figure 12).

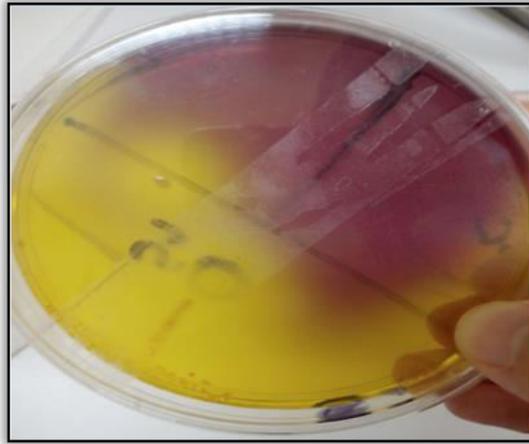


Figure 12 : Croissance sur GPA+BCP

Pour les cultures sur le milieu YMA-BTB, la plupart d'entre elles ont une bonne croissance avec un virage de couleur du milieu du vert vers le jaune avec acidification du milieu. Le changement de couleur est une caractéristique des bactéries à croissance rapide (Jordan, 1984). A l'exception des deux souches isolées S1 et S2. Le même résultat est démontré par Torche (2006) qui peut s'expliquer par la présence chez les deux bactéries un mécanisme neutralisant de l'acidité (figure 13).

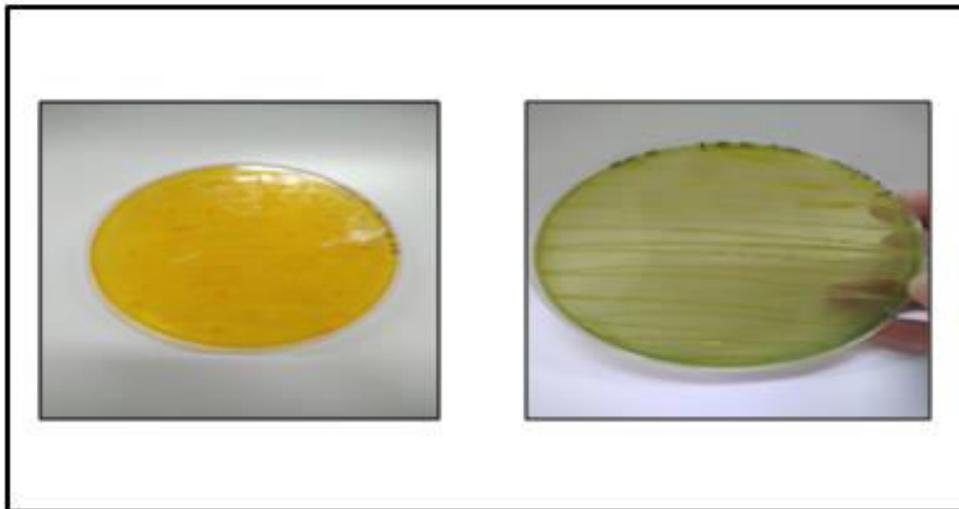


Figure 13 : Croissance des souches sur le milieu YMA+BTB

2.2. Examen microscopique (la coloration de Gram)

La coloration de Gram ou l'examen microscopique donne des bâtonnets Gram négatif, de couleur rose (figure 14).

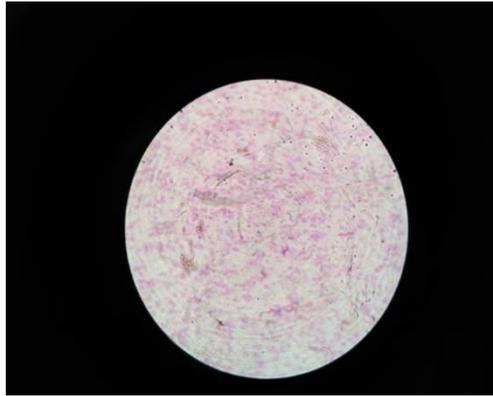


Figure 14: Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif *100)

2.3. Examen de la mobilité

Après 48h d'incubation de nos souches, nous avons observé un envahissement de gélose au niveau de la pique centrale ce qui signifie que les bactéries sont mobiles, il y a aussi un virage de couleur vers le jaune donc ces bactéries fermentent le mannitol. A l'exception de la souche S4 qui a donné un résultat négatif pour la mobilité et la fermentation, et la souche S5 qui n'a pas acidifiée le milieu (tableau 6).

Tableau 6 : résultats de test Mannitol-Mobilité

Souches		S1	S2	S3	S4	S5	S6	R4	SAM	R6
Temps D'incubation										
Mobilité	24h	++	+++	+	-	+	+	+	++	+
	48h	++	+++	+	-	+	+	++	+++	+++
Fermentation	24h	++	++	-	-	-	-	+++	++	-
	48h	++	++	++	-	-	+	+++	++	+

+ : faible mobilité avec un virage de couleur ; ++ : mobilité avec un virage de couleur ; +++ : bonne mobilité avec un bon virage de couleur ; - : absence de mobilité et absence de virage de couleur.

2.4. Test du 3-cétolactose

Après l'inondation des boîtes par le réactif de Benedict, aucun halo n'est formé autour des colonies ce qui indique que les souches ne produisent pas l'enzyme de 3-cetoglucosidase donc, il n'y a pas une oxydation du C3 du glycosyl des saccharides. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Chabbi (2010), Saoudi (2008). A l'exception des souches S4 et S6 qui montrent un résultat positif après l'ajout du réactif. Ce test est parmi les tests qui font distinguer le genre *Rhizobium* du

genre *Agrobacterium*. Les rhizobia présentent un résultat négatif par rapport à ce test. Le genre *Agrobacterium* produit la 3 –cétoglucosidase (Maougal, 2004) (figure 15).

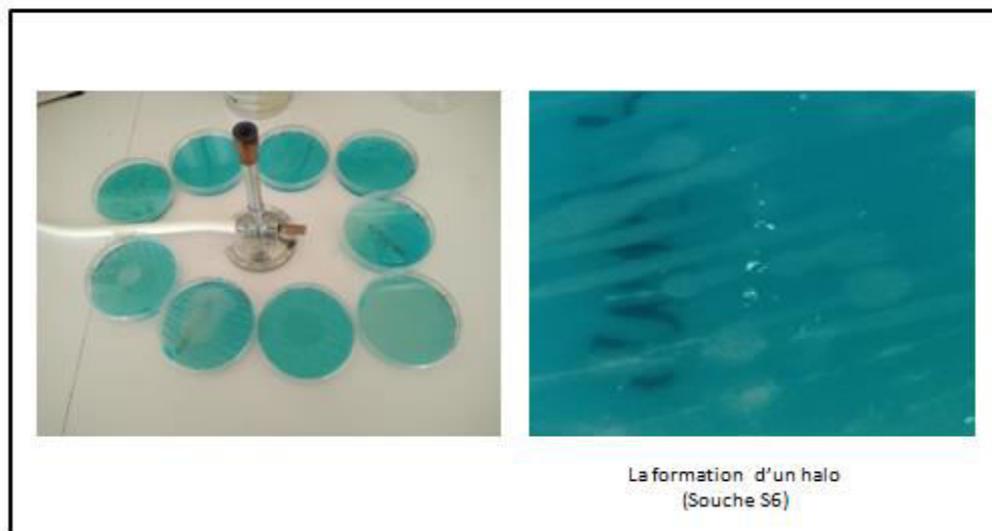


Figure 15 : Test du 3-cétolactose

2.5. Tests nutritionnels

2.5.1. Source de carbone

Les valeurs de la Densité optique montrent une croissance importante de la plupart des souches en présence du mannitol, saccharose, lactose, fructose et galactose. Le mannitol présente une bonne source de carbone pour nos isolats alors que le glucose est le moins utilisé. Le galactose, le glucose, le sorbitol et le mannitol donnent un bon développement pour les souches de référence. On peut dire que les isolats peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates comme une source de carbone. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Somasegaran et Hoben (1994) et Benahmed (2010). Le genre *Rhizobium* se caractérise par la capacité de la majorité des souches à utiliser le mannitol, le glucose, l'arabinose, le fructose et le saccharose comme source de carbone. (Vincent, 1970) (figure 16).

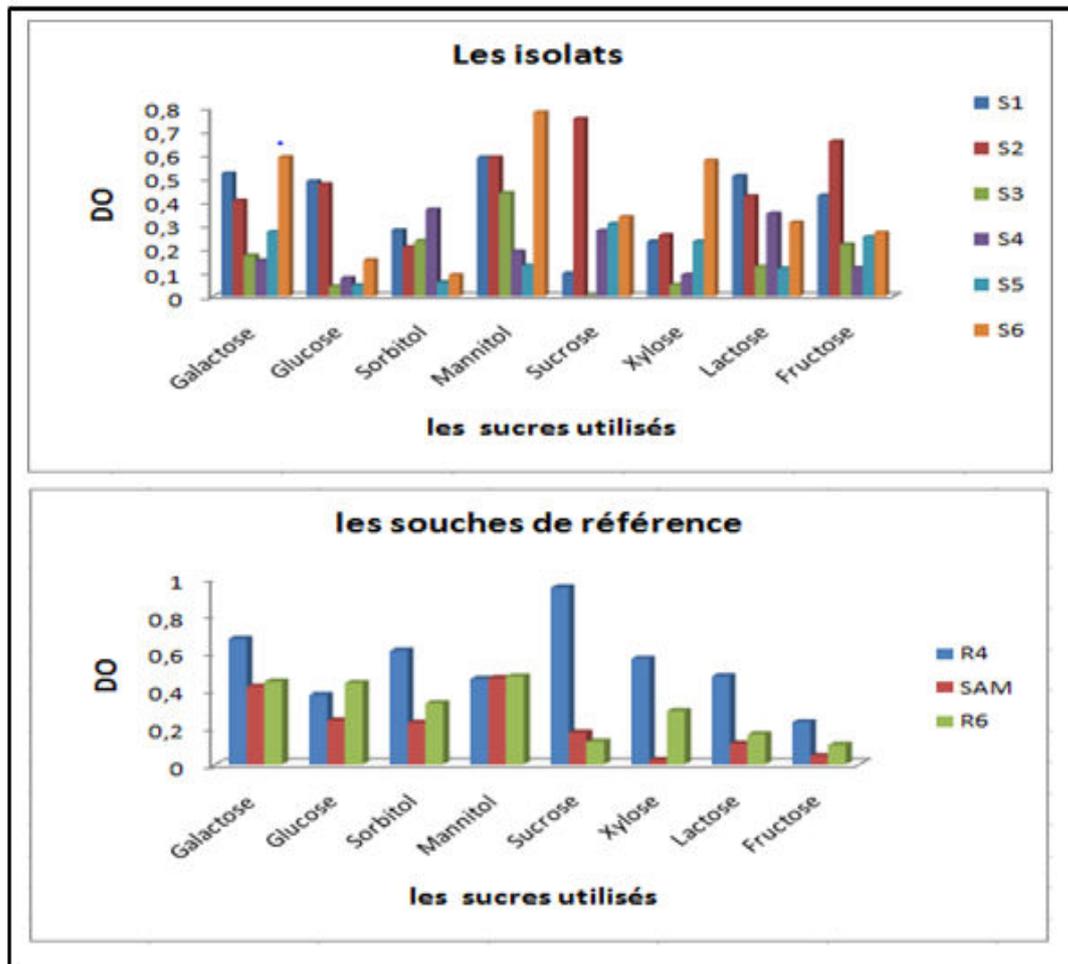


Figure 16 : Utilisation des sucres comme source de carbone.

2.5.2. Source d'azote

Les résultats obtenus indiquent l'utilisation de tous les acides aminés comme source d'azote par les souches isolées ainsi que les souches de référence mais avec une variabilité de croissance. D'après les valeurs de la densité optique, on remarque que l'alanine, proline, valine, leucine et lysine sont les acides aminés les plus utilisés par nos souches. Pour S1, S2, S4, S5 et S6, on peut dire que ces souches ont un faible taux de croissance pour la lysine et la tyrosine. Et en présence de proline, lysine et leucine, les souches de référence donnent une bonne croissance avec ces acides aminés. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Jordan (1984) et Gharzouli (2006) qui ont indiqué la capacité des souches à utiliser divers acides aminés comme source d'azote sur le milieu défini 8 (figure 17).

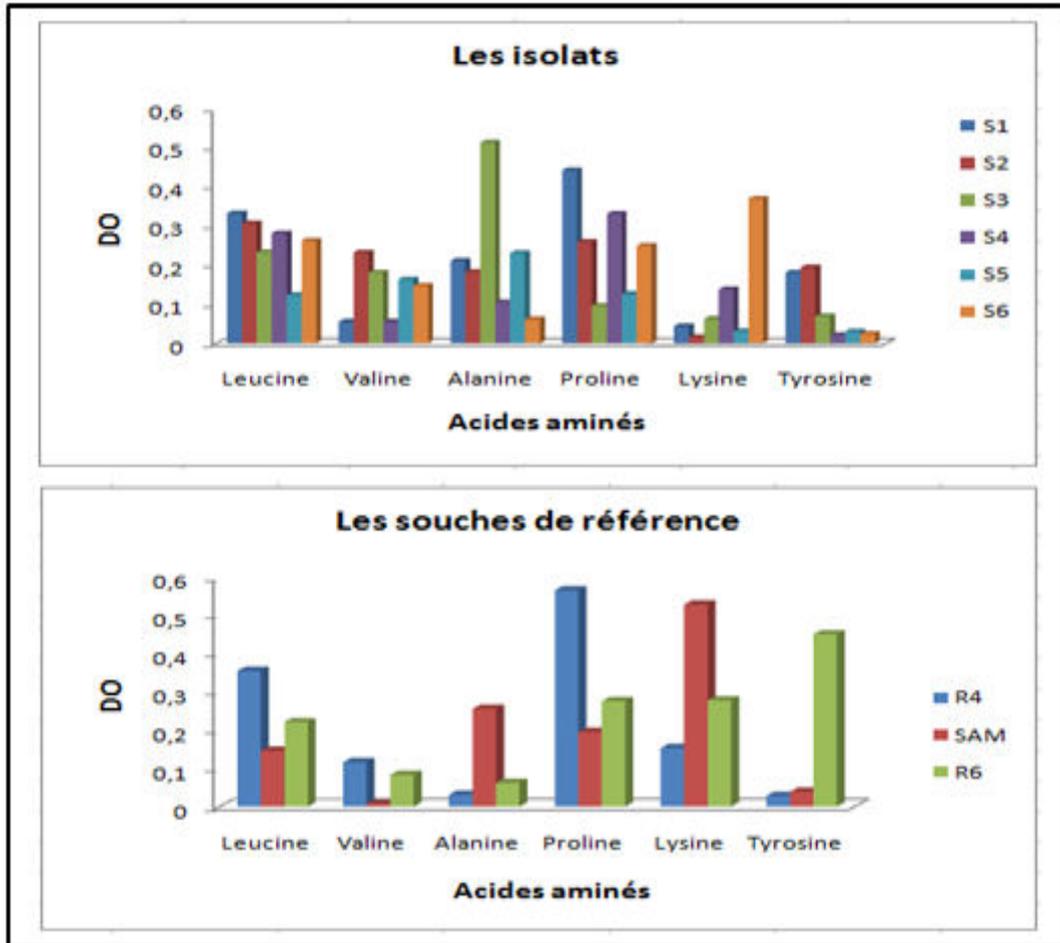


Figure 17: Utilisation des acides aminés comme source d'azote.

2.6. Tests biochimiques

2.6.1. Réduction des nitrates

Après l'addition des réactifs I et II de la nitrate réductase, toutes les souches réduisent les nitrates en observant une couleur rouge sauf les deux souches isolées S3 et S6 qui ont donné une réaction négative.

La coloration rouge ou rose traduit la décomposition des nitrates en nitrites. La réaction peut être rendue négative par la réduction des nitrites formés; il faut donc contrôler, dans le cas de l'absence de coloration, s'il reste des nitrates en ajoutant au milieu un peu de poudre de zinc qui les réduit et entraîne une coloration (Torche, 2006) mais on a pas pu faire ce test par manque produit (figure 18).

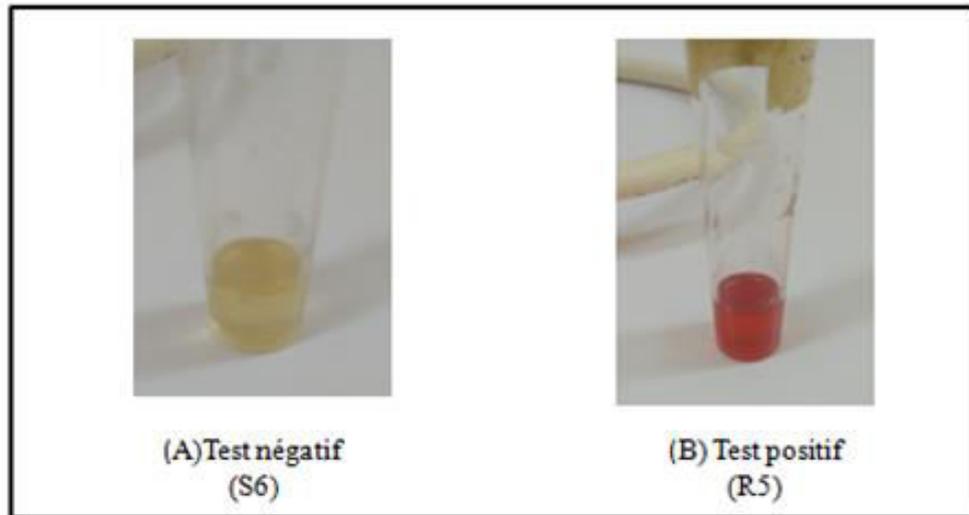


Figure 18 : Réduction des nitrates

2.6.2. Hydrolyse de l'urée

Après 24h d'incubation, on observe que chez les souches isolées S4, S5 et la souche de référence R6 ont une activité uréasique qui se traduit par un virage de couleur du milieu vers le rose ce qui signifie la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998) (figure 19).

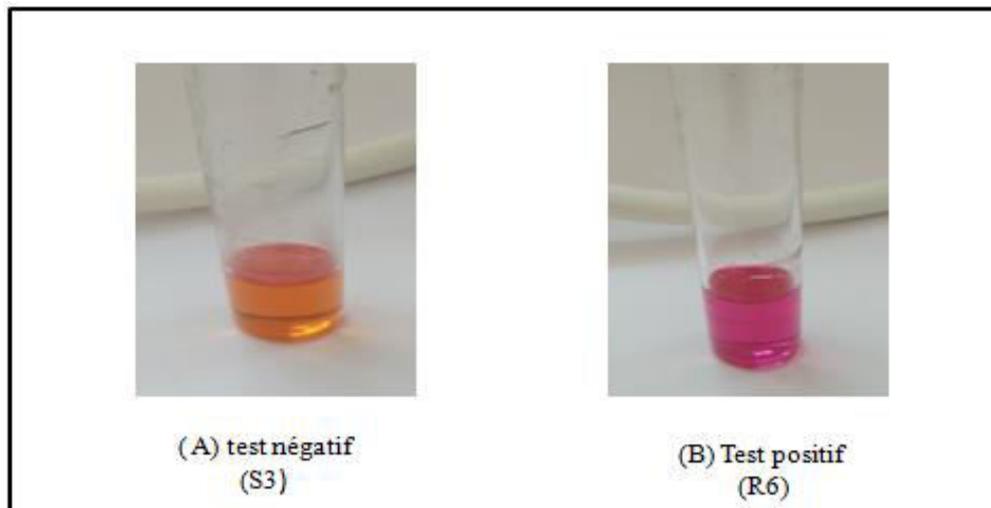


Figure 19: test de l'urée

Tableau 7 : Résultats des tests biochimiques

Souches \ Test	S1	S2	S3	S4	S5	S6	R4	SAM	R6
Nitrate réductase	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Urée	-	-	-	+	+	+	-	-	+

+ : activité enzymatique positive ; - : activité enzymatique négative

2.7. Effet des facteurs abiotiques

2.7.1. Tolérance au NaCl

D’après les résultats obtenus, on remarque que toutes les souches testées tolèrent une concentration de 1% et 3% sauf la souche R5 qui ne tolère pas la concentration de 3%. Pour la concentration de 5%, la majorité des souches tolèrent cette concentration à l’exception de la souche isolée S4 et la souche de référence R6.

La plante hôte de nos isolats est récoltée du région salée ce qui explique la résistance des souches au stress salin. La capacité bactérienne de s'adapter à la salinité est importante pour la fonction de fixation d'azote bactéroïde à l'intérieur des nodules des légumineuses. En outre, l'activité du nitrogénase, le nombre de nodule et l'accumulation de matière sèche dans le soja et la luzerne ont été affectées par le stress salin (Boukhellout, 2009). Et selon Zahran (1990). Le stress salin inhibe les étapes initiales des symbioses *Rhizobium*-légumineuses et la formation des nodules sur les racines des plantes légumineuses qui sont plus sensibles au sel (tableau 8).

Tableau 8 : résultats de tolérance au NaCl

Souches \ Con- centration	S1	S2	S3	S4	S5	S6	R4	R5	R6
1%	+++	+++	++	++	+	++	++	+	++
3%	+++	+++	+	+	+	++	++	-	++
5%	++	++	+	-	+	+	+	-	-

+ : faible croissance ; ++ : moyenne croissance ; +++ :bonne croissance ; - :pas de croissance.

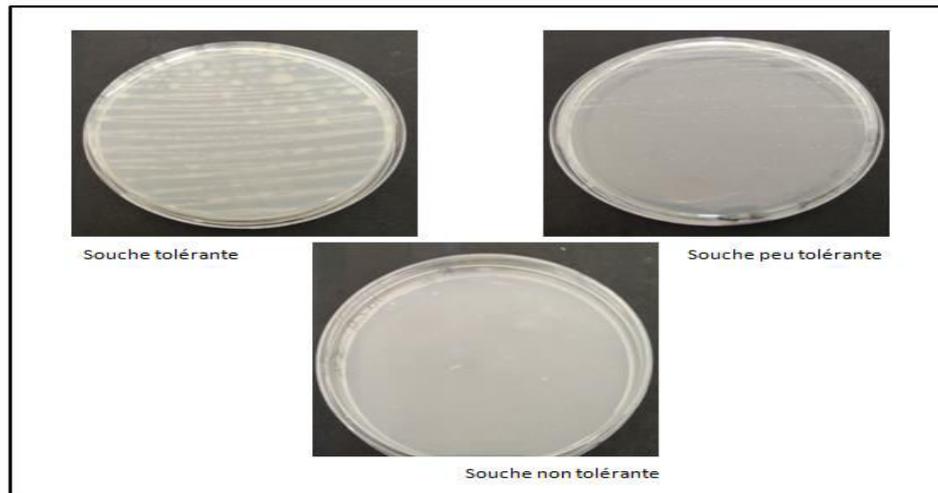


Figure 20 : Tolérance au NaCl

2.7.2. Température de croissance

Généralement, la plupart des souches sont capables de croître à une température varie de 4°C à 37°C avec une bonne croissance dans l'intervalle de 20°C à 30°C. Concernant la température 44°C, nos isolats sont incapables de pousser à cette température contrairement aux souches S1, S3 et R5 qui sont thermotolérantes. Pour la température 4°C, les isolats S1, S3 et S5 n'ont pas pu pousser. Les souches isolées par Benselama(2015) montrent une croissance optimale entre 20 et 37°C et celle isolées par Hatimi et al (2000) a croissance lente sont relativement tolérantes aux températures élevées jusqu'à 42°C. Les températures élevées inhibent généralement la croissance des micro-organismes. Ainsi chez les rhizobia les hautes températures peuvent empêcher la nodulation et inhiber la fixation d'azote (Cacciari et al., 2003) (tableau 9).

Tableau 9 : température de croissance

Souches \ T(C°)	4°C	22°C		30°C		37°C		44°C	
	10j	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
S1	-	++	+++	++	+++	+	+	-	+
S2	+ (8j)	++	+++	++	+++	-	-	-	-
S3	-	+	++	+	++	+	++	-	+
S4	+ (3j)	++	+++	++	+++	-	-	-	-
S5	-	+	++	+	++	-	+	-	-
S6	+ (2j)	+	++	++	+++	++	+++	-	-
R4	+ (3j)	++	+++	++	+++	+++	+++	-	-
R5	+ (7j)	+	+++	++	+++	+	+	++	+++
R6	+ (6j)	++	+++	++	++	+	+	-	-

+ : faible croissance ; ++ : moyenne croissance ; +++ : bonne croissance.

2.7.3. Effet de pH

Les souches testées ont la capacité de croître dans l'intervalle de pH 4 à pH 9. D'après les résultats, l'optimum de croissance de toutes les souches étudiées est observé à pH 7. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Torche (2006) qui ont montré que la majorité de ses souches ont la capacité de pousser dans l'intervalle de pH 4 à 10. Les résultats de Hatimi et *al* (2001) ont montré montrent que toutes les souches testées sont capables de croître des pH supérieurs à 4,5. Cependant, seules les souches à croissance lente tolèrent le pH 4 (figure 21).

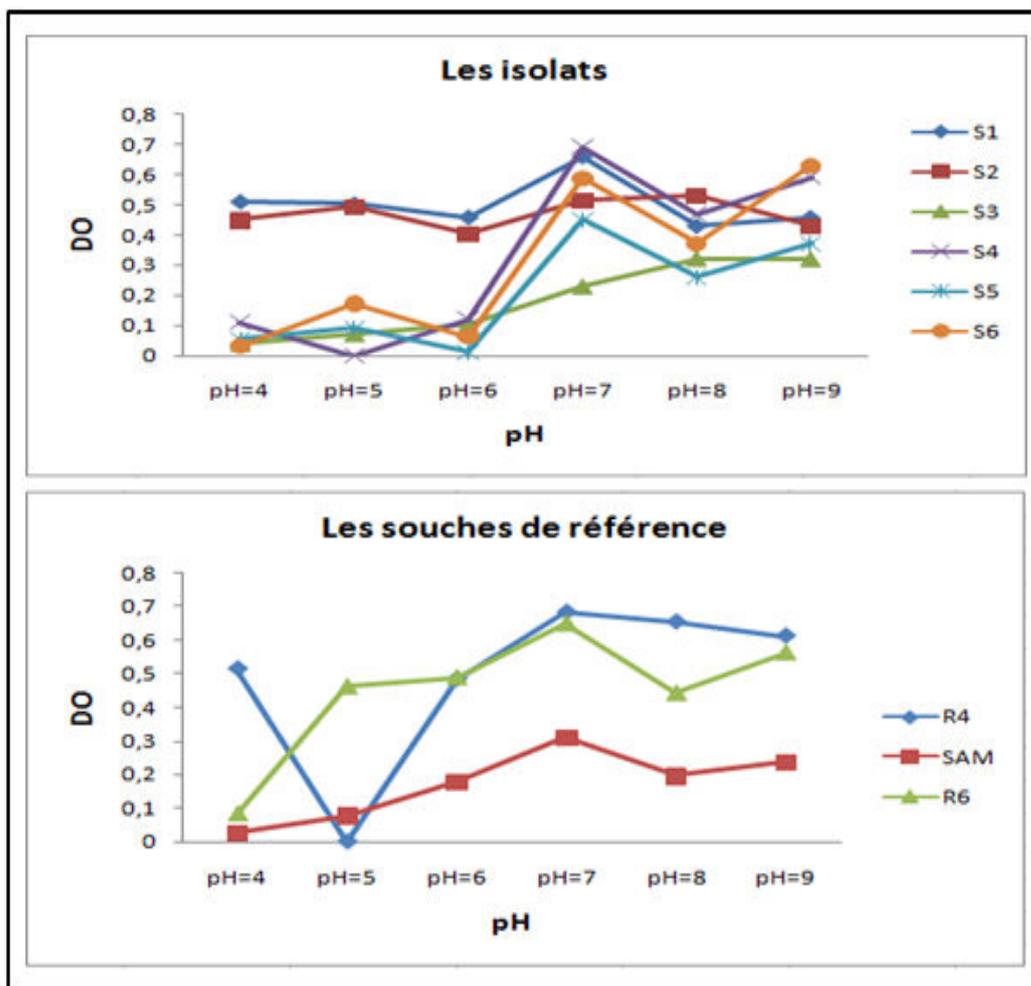


Figure 21: Effet de pH sur les souches étudiées

2.8. Résistance aux antibiotiques

Les résultats obtenus montrent une résistance des souches isolées et de référence en présence de pénicilline-G et d'amoxicilline sauf la souche SAM qu'elle est sensible au pénicilline-G. Par contre en présence de l'amikacine et de l'érythromycine, les autres souches présentent une sensibilité pour ces antibiotiques ce qui traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour des disques des deux antibiotiques avec des diamètres différents. Les souches R4 et R6 sont résistantes à l'érythromycine (tableau 10).

L'évaluation de la résistance intrinsèque à neuf antibiotiques des souches de *R. monosperma* isolées par Hannane et al (2016) a montré que toutes les souches étaient résistantes à la spectinomycine (10 µg / ml-1), à l'érythromycine (15 µg / ml-1) de rifampicine (30 µg / ml-1) et sensibles à la gentamycine (500 ug / ml - 1).

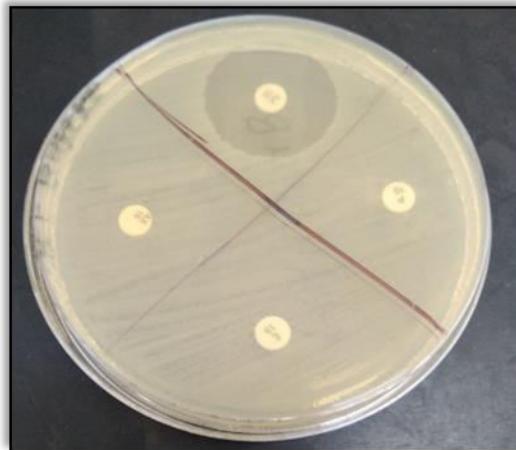


Figure 22 : Résistance aux antibiotiques

Tableau 10 : résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques

souches		S1	S2	S3	S4	S5	S6	R4	SAM	R6
Amikacine	24h	2.8cm	3.4cm	2.8cm	3.1 cm	R	2.9cm	2cm	2.8cm	2.6c m
	48h	2.8cm	3.4cm	2.8cm	3.1 cm	5cm	2.9cm	2cm	2.8cm	2.6c m
Penicilline -G	24h	R	R	R	R	R	R	R	1cm	R
	48h	R	R	R	R	R	R	R	1cm	R
Amoxicilline	24h	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	48h	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Erythromycine	24h	1.8cm	1.8cm	2.3cm	2.4 cm	R	4.2cm	R	3.1cm	R
	48h	1.8cm	1.8cm	2.3cm	2.4 cm	5.9c m	4.2cm	R	3.1cm	R

R : souche résistante ; S : souche sensible.

Conclusion

Dans ce travail nous avons essayé d'étudier et de caractériser des souches bactériennes isolées à partir des nodules présents au niveau des racines de la plante légumineuse *Hedysarum pallidum* situées dans la région d'Ain M'lila.

L'étude du partenaire bactérien est commencée par une morphologie en utilisant plusieurs milieux de culture spécifique et un examen microscopique par coloration de Gram. Ainsi qu'une caractérisation phénotypique en comparant avec trois souches de référence de Rhizobia. Cette caractérisation est réalisée par des tests nutritionnels (source de carbone et source d'azote), des tests biochimiques pour la recherche des enzymes spécifiques, effets des facteurs abiotique et enfin la détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.

L'aspect morphologique des isolats sur le milieu YMA-RC montre qu'ils absorbent un peu le rouge Congo et certaines souches modifient le pH sur GPA-Bcp. La croissance sur YMA+BTB provoque une acidification du milieu en 24 heures et démontre que nos isolats ont une croissance rapide.

L'examen microscopique des isolats par la coloration de Gram montre des bâtonnets à Gram négatif.

Les souches ont la capacité d'utiliser une large gamme de sucres comme source de carbone et plusieurs acides aminés comme source d'azote. Les résultats des tests biochimiques montrent la présence du nitrate réductase et l'uréase chez la plupart des souches.

Les tests physiologiques montrent que les souches tolèrent les différentes concentrations de NaCl (1%,3% et 5%) à l'exception de la souche de référence R5 qui ne tolère pas la concentration de 3% ainsi que la souche isolée S4 et la souche de référence R6 qui ne sont pas tolérantes à 5%. Les souches présentent une bonne croissance dans l'intervalle de 20 à 30C°. Mais à une température élevée jusqu'à 44C°, la plupart des souches sont incapables de pousser. Les résultats de l'effet du pH présentent la croissance des souches entre pH 4 et pH 9 avec un optimum de croissance à pH 7.

La majorité des souches résistent la pénicilline et l'amoxicilline et sont sensible à l'amikacine et l'érythromycine.

D'une manière générale, les résultats obtenus montrent que les isolats se ressemblent aux souches de référence de rhizobia dans des tests et se diffèrent par rapport à ces souches dans d'autre cas.

A partir des ces résultats, on ne peut pas confirmer que nos isolats font partie du même groupe taxonomique que les rhizobia, mais elles peuvent être dans un taxon proche du même phylum. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par (Benhizia et *al.*, 2004)

Il est préférable d'améliorer ce travail par :

- Une étude plus approfondie et complète des isolats concernant leur croissance sous différents facteurs biotiques ou abiotiques.
- L'étude de la résistance des isolats aux métaux lourds ainsi leur sensibilité aux phages.
- Une caractérisation moléculaire des isolats pour confirmer leur statut taxonomique.
- Elargir l'étude sur d'autres souches associées aux légumineuses on exploitées

B

Balzergue, Coline.2012.Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate.Th.doct. Université Paul Sabatier. ToulouseIII. France.345p.

Benahmed, Amira., 2010. Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarumcoronarium*.Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine.Algérie. 128p.

Benhalima-Chenini, Mounira., 2006.Essai de caractérisation de quelques isolats de Rhizobium nodulant le pois chichi (*Cicer arietinum L.*).Mémoire de Magister en Science Agronomiques. Institut National Agronomique. El Harrach. 111p.

Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A., 2004.Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus Hedysarum.System.Appl.Microbial .27 : 462-468.

Benhizia, H.G.,2014.Caractérisation cytogénétique classique et moléculaire de trois espèces endémiques du genre *HedysarumL* .Th.doct.Université Constantine 1.Algérie. p99.

Benhizia,H.,Benhizia,Y.,Ghernoub,L.,Yakovlev,S.S.,Khalfallah,N.,2013.Meiotic behaviour and karyotype features of endangered endemic fodder species *Hedysarumperrauderianum* (Fabaceae) in some populations from Algeria.Caryologia:International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. 66(3): 195-204.

Benselama, Amel.2015.Réhabilitation de la culture *dulablabpurpureuxL*.ExSweet et études de son partenaire symbiotique. Th. Doct 3ème cycle LMD en Biotechnologie. Université ES-SENIA. Oran. Algérie.p.133.

Bernaerts J. E., De Ley J., 1963. –A biochemical test for crown gall bacteria. Nature. 199: 406-407.

Boukhellout,Salah.2009.Influence de la salinité sur le métabolisme azoté de l’haricot (*Phaseolusvulgaris L.*).Mémoire de Magister. Université ES-SENIA. Oran.112p.

Boulmaiz, Billel., 2014. Les dolomies des monts d'Ain M'lila. cas du Dj. Teioualt :exploitation, utilisation industrielle et impact sur l'environnement. Mémoire de Magister en Géologie. Université Constantine1.Algérie. p.189.

Bounaama, Samira.2014. Evaluation de l'amélioration de la fertilité des sols emblavés par une légumineuse fourragère en relation avec la symbiose rhizobium dans la région d'El Goléa.Mémoire d'Ingénieur. Dépôt institutionnel de l'université KasdiMerbah. Ouargla. 78p.

C

Cacciari, I.,Mattia,E. Di.,Quatrini,P.,Moscatelli,M. C.,Grego,S.,Lippi,D.,De paolis,M. R, 2003. Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress.Unarbre au désert *Acacia raddiana*. Edition IRD.Marseille. p183-200.

Campa, C., 1998. L'Acacia au Sénégal. Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération. Edition Orstom, Paris.

Chabbi, R.2010.Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella*L (légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Mémoire de Magister. Université Mentouri .Constantine. Algérie.p.126.

Cleyet-Marel,J.C.,Rome,S., Salducci,X., Wery,J.,1996.Importance des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes : exemple des relations *Rhizobium*/légumineuses. Acta bot. Gallica.143 (6) : 521-529.

Coba De Le Pena, T., Fedorova, E., Pueyo, J.J., Lucas, M.M., 2018.Frontiers in Plant Science.

D

Davet, P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale.Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris.

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

DhaneFitouri, Sana., 2011. Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Th. doct. Institut National Agronomique de Tunisie.

Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I., Newton, W.E., 2008. Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Edition Springer Science Business+ Media B.V, Netherlands.

Drouin, Pascal., 1996. Caractérisation phénotypique et génotypique et étude des mécanismes d'adaptation aux basses températures de souches de *Rhizobium* isolées de *Lathyrus japonicus* et *Lathyrus pratensis*. Thèse de doctorat en Philosophie. Université Laval. Québec. Canada. p.195.

E

Escorihuela, Maria. J., 2006. Estimation de l'humidité du sol à partir de données radiométriques en bande-L: préparation de la mission SMOS. Th. doct. Institut National Polytechnique. Toulouse. 147p.

F

Fadlia, A., Khemissi, L., 2017. Contribution à l'étude des partenaires symbiotiques des espèces légumineuses du genre *Scorpiurus* et *Hedysarum*. Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945. Guelma. Algérie.

Faghire, Mustapha., 2012. Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad. Marrakech. p.111.

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 et Productions Végétales. Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) de l'institut national polytechnique Félix Houphouët Biogny de Yamoussoukro. Centre de la cote d'Ivoire.

Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff, P.L., Hirsch, A.M., 2006. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. FEMS Microbiology Ecology 56(2): 195-206.

G

Gage, D.J., 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2):280-300.

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 Magister en Génétique Moléculaire. Université Mentouri. Constantine. Algérie. p128.

Grama, Borhane.S., 2008. Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses. Mémoire de Magister en Génétique et Amélioration des plantes. Université Mentouri. Constantine. Algérie. p93.

Guan.D., Stacey,N., Liu,C., Wen,J., Mysore,K.S., Jerez,I.T., Vernié,T., Tadege,M., Zhou, C., Wang,Z., Udvardi,M.K., Oldroyd,G.E.D., Murray,J.D., 2013. Rhizobial Infection Is Associated with the Development of Peripheral Vasculature in Nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology.* 162(1): 107–115.

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.

H

Hannane, F.Z., Kacem, M., Kaid-Harche, M., 2016. Preliminary characterization of slow growing rhizobial strains isolated from *Retama monosperma*(L.) Boiss. root nodules from Northwest coast of Algeria. *African Journal of Biotechnology.* 15(20):854-867.

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 Bot. Gallica.* 148 (3) :191-199.

Hopkins W.G., 2003. -Physiologie végétale. université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck.

Howieson, J.G., Dilworth, M.J., 2016. Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

I

Jordan, DC.1984.Rhizobiaceae.In:N.R.Krieg and J.G.Holteditors.Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1.The Williams & Wilkins Co., Baltimore.p:234-245.

K

Khan,Mohammad Saghir.,Zaidi,Almas.,Musarrat,Javed., 2010.Microbes for Legume Improvement. Springer Wien New York.p. 535.

Kneen, B.E., LA Rue, T.A., 1983.Congo Red Absorption by *Rhizobium leguminosarum*. Applied and Environmental Microbiology.45(1): 340–342.

L

Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S., 2014.Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. MicrobiologicalResearch. 169 (1): 2-17.

Legay, Nicolas., 2013.Une approche fonctionnelle des relations plantes-microorganismes dans le cadre du cycle de l'azote. Cas des prairies de montagnes. Th.doct. Université de Grenoble. France. p.357.

Lepinay, Clémentine., 2013.Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes, au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.Dijon. p257.

Limam, Fouad., 2015. Isolement et pré-identification des mycorhizes à arbuscules provenant de quelques palmeraies de Ouargla. Mémoire de Master académique. Université KasdiMarbah, Ouargla. Algérie. p73.

M

Machrafi, Younes., 2001.inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuses par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire de maître ès sciencesUniversité Laval. Canada. p.199.

Maougal, R.T., 2004. Techniques de production d'inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum*. L) : Inoculation et nodulation. Mémoire de Magister en Biotéchnologie Végétale .Université Mentouri. Constantine. Algérie. p.163.

Marlet, S., et J.O. Job, 2006. Processus et gestion de la salinité des sols. In : Tiercelin, J.R. Traité d'irrigation, seconde édition. Tec & Doc Lavoisier. ISBN-13: 978-2743009106.

Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schulze, M., Ratet, P., Oldroyd, G.E.D., 2007. *Medicago truncatula* NIN Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Plant Physiology*. 144(1): 324–335.

Mohamad, Roba., 2016. Adaptation des bactéries symbiotiques de légumineuses métallophiles : effets des métaux lourds et de la plante hôte sur la composition des populations de rhizobies symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria* et de *Lotus corniculatus*. Th. doct. Université de Montpellier. France. p.321.

N

Ndoye, Ibrahima., 1990. contribution a l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*. Th. Doct. Université des Sciences et Techniques de Lille. p.188.

P

Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M., 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* Vol 234, pp. 201-262.

Pawlowski, Katharina. 2009. Prokaryotic Symbionts in Plants. Springer Verlag Berlin Heidelberg. p.306. ISSN: 1862-5576.

Peret, Benjamin., 2007. Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de doctorat. Université Montpellier II. France. p.78.

Philippe, Sansonett., 2009. Histoires de symbioses, Paris, France.

Pueppke, S.G., Vasquez, M.C.B., Werner, D., Ferte, M.P.B., Promé, J.C., Krishnan, H.B., 1998. Release of Flavonoids by the Soybean Cultivars McCall and Peking and Their Perception as Signals by the Nitrogen-Fixing Symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiology*. 117(2).

R

Rajaonarimany, Elinarindra., 2010. Influence de la diversité mycorhizienne sur la symbiose *Dalbergia trichocarpa*–Rhizobia et sur structure de la microflore tellurique. Mémoire de diplôme d'étude approfondie en sciences de la vie Université d'Antananarivo. p99.

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., Mason, K.A., Johnson, G.B., Losos, J.B., Singer, S.R., 2017. Nutrition des plantes et sol. In : Biologie. Edition de boeck. Paris. France.

Riah, Nassira., 2014. Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Th.doct en Sciences. Université Constantine 1. Algérie. p153.

Riahi, Nesrine., 2010. Étude de la régulation de la nitrogénase chez *Rhodobacter capsulatus* à la noirceur. Mémoire de maîtrise en microbiologie et immunologie. Université de Montréal. Canada. p.83.

S

Saoudi, Mouna., 2008. Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie. p.99.

Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E.U.B., Sadhana, B., SatyaVani., S., 2017. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(4): 2133-2144

Sebihi, F.Z., 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. Constantine. Algérie. 166p.

Selami, Nawel., 2015. Etude des associations symbiotiques de *Retamamonosperma*: approches morphologique, anatomique et ultra structurale, caractérisation moléculaire des isolats. Thèse de doctorat en Sciences. Université Mohamed Boudiaf. Oran. Algérie. p.150.

Sobti, Sarah. 2013. Isolement des bactéries telluriques résistantes aux effets de salinité. Mémoire de Master Académique. Université KasdiMerbah. Ouargla. Algérie. 60p.

Somasegaram, P., Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc p.450.

Suty, Lydie., 2015. Les végétaux: Des symbioses pour mieux vivre. Editions Quae, Paris. 56 p.

T

Torche, Asma., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulantes des légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie. 166p.

V

Vernié, Tatiana, 2008. Analyse fonctionnelle d'EFD, Un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Th. doct. Université de Paul Sabatier. Toulouse III.

Vincent, J.M. 1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom

W

Wakford, Tom. 2004. Aux origines de la vie: Quand l'homme et le microbe s'approprient. Editions de Boeck Université. Bruxelles. ISSN : 1378-4080.

Walker, M. Vincent. 2010. Impact de l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zeamays*L. Th. doct. Université de Claude Bernald Lyon 1. France. p.208.

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

Z

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

Zahran, H.H., 2006. Wild-Legumes Rhizobia: Biodiversity and Potential As Biofertilizer. In: Rai, M.K. Handbook of Microbial Biofertilizers. New York. London. Oxford: The Haworth Press. Inc p.203-214.

Zaidi, A., Khan, M.A., Musarrat, J., 2017. Microbes for Legume Improvement. Springer International Publishing AG, Cham.

Zancarini, Anouk., 2012. Etude de l'interaction plante-communautés microbiennes de la rhizosphère chez l'espèce modèle *Medicago truncatula* par une approche multidisciplinaire : contribution à la réflexion sur le pilotage des interactions par la plante. Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la terre. Université de Bourgogne. Dijon. 167p.

Web graphie

- [1] http://www.supagro.fr/ress-pepites/AC/co/SymbiosesRhizobiennes_1.html. Consulté le 15/03/2018.
- [2] <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Consulté le 25/03/2018.
- [3] <https://jardinage.lemonde.fr/glossaire-legumineuse.html>. Consulté le 28/03/2018.
- [4] <https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-Bacterie-Rhizobium-Symbiose.html>. Consulté le 06/04/2018.
- [5] <https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-Bacterie-Rhizobium-Symbiose.html>. Consulté le 12/04/2018.
- [6] <https://www.cultivar.fr/technique/des-communautes-favorables-la-production>. Consulté le 15/04/2018.
- [7] https://jeanyvesthorrignac.fr/wa_files/info_386_20M_27Lila.pdf. Consulté le 25/04/2018.
- [8] <https://sante-medecine.journaldesfemmes.fr/faq/27980-ph-definition>. Consulté le 27/04/2018.
- [9] <http://www.ipgp.fr/~losno/Manips/pH/appareilsdemesure.html>. Consulté le 29/04/2018.
- [10] <http://www.produitsaquasante.com/le-ph-et-le-potentiel-doxydo-r%C3%A9duction>. Consulté le 30/04/2018.
- [11] <http://www.sdec-france.com/mesure-humidite-volumique-des-sols-theorie.html>. Consulté le 30/04/2018.
- [12] <https://www.universalis.fr/encyclopedie/oxydoreductions-biologie/2-le-potentiel-d-oxydoreduction/pote>. Consulté le 30/04/2018.
- [13] <http://www.wikitp.fr/essais-de-sol/teneur-en-eau-dun-sol>. Consulté le 30/04/2018.
- [14] <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=fr&id=146619>. Consulté le 02/05/2018.

[15] <https://www.vetofish.com/definition/oxygene-dissous>. Consulté le 04/05/2018.

[16] https://fr.wikipedia.org/wiki/A%C3%AFn_M%27lila. Consulté le 06/06/2018

Annexe 1 :**Milieux de culture et solutions utilisées****Composition du milieu YMB (Yeast Mannitol Agar) en g/l.
(Vincent, 1970)**

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

**Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l.
(Vincent, 1970)**

YMB	1000ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

Composition du milieu YMA+Rouge Congo en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° 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 du milieu YMA+bleu de bromothymol en g /l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	15ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

Après l'ajustement de Ph on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol, puis on ajoute l'agar.

Composition du milieu GPA (Glucose Peptone Agar) +pourpre de bromocrésol g/L (Vincent, 1970)

Glucose	10
Pentone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000 ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120C° pendant 20 minutes.

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

Composition du milieu Défini 8 en g/l (vincent, 1970).

KH ₂ PO ₄	0.3
Na ₂ HPO ₄	0.3
MgSO ₄	0.21
CaCl ₂	0.21
Glutamate-Na	1
Mannitol	1
Solution stock vitamines	1ml
Oligoéléments	1ml
pH	6.9

Autoclavage à 120C° pendant 20 minutes.

Solution stock vitamines :(mg/l)

Acide nicotinique	100
thiamine	100
panthotenate-Ca	100
Dissoudre dans un tampon Na ₂ HPO ₄	0.05 M
pH	7

La stérilisation de la solution stock vitamines par filtration (0.22µm).

Solution oligoéléments (mg/l)

H ₃ BO ₃	50
FeSO ₄ 7H ₂ O	35
CuSO ₄ 5H ₂ O	8
MnSO ₄ 4H ₂ O	40
ZnSO ₄ 7H ₂ O	16

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage.

Annexe 2 :

Les résultats de la mesure de la densité optique des différents tests

1. Source de carbone :

Souches Sucres	S1	S2	S3	S4	S5	S6	R4	SAM	R6
Galactose	0.522	0.406	0.173	0.152	0.274	0.591	0.676	0.419	0.446
Glucose	0.489	0.477	0.043	0.078	0.048	0.153	0.374	0.236	0.438
Sorbitol	0.281	0.209	0.235	0.369	0.060	0.090	0.612	0.223	0.330
Mannitol	0.590	0.589	0.438	0.190	0.131	0.782	0.461	0.464	0.474
Sucrose	0.097	0.754	0.427	0.278	0.308	0.337	0.953	0.171	0.122
Xylose	0.233	0.260	0.049	0.092	0.233	0.577	0.569	0.023	0.287
Lactose	0.511	0.425	0.126	0.351	0.118	0.313	0.475	0.111	0.162
Fructose	0.429	0.658	0.220	0.121	0.252	0.271	0.227	0.045	0.105

2. Source d'azote :

Souches Acides aminés	S1	S2	S3	S4	S5	S6	R4	SAM	R6
Leucine	0.334	0.308	0.234	0.282	0.124	0.264	0.355	0.146	0.221
Valine	0.056	0.233	0.182	0.056	0.164	0.148	0.116	0.007	0.083
Alanine	0.212	0.184	0.515	0.106	0.232	0.062	0.031	0.256	0.062
Proline	0.444	0.261	0.097	0.333	0.127	0.251	0.566	0.195	0.276
Lysine	0.044	0.016	0.063	0.139	0.032	0.371	0.153	0.529	0.278
Tyrosine	0.182	0.195	0.070	0.022	0.031	0.025	0.028	0.039	0.451

3. Effet du pH :

Souches pH	S1	S2	S3	S4	S5	S6	R4	SAM	R6
pH=4	0.510	0.448	0.038	0.111	0.054	0.031	0.516	0.026	0.083
pH=5	0.502	0.494	0.071	0.124	0.093	0.171	0.495	0.077	0.462
pH=6	0.459	0.403	0.103	0.121	0.013	0.061	0.486	0.178	0.489
pH=7	0.659	0.515	0.228	0.691	0.450	0.588	0.685	0.309	0.650
pH=8	0.430	0.530	0.320	0.467	0.260	0.372	0.656	0.195	0.443
pH=9	0.457	0.429	0.318	0.590	0.370	0.630	0.614	0.339	0.564

Annexe 3 :

Les paramètres physico-chimiques du sol

1. Les résultats de l'humidité relative

N° de fois	Poids du sol (<i>Hedysarum pallidum</i>)
1	184.86
2	184.62
3	183.80
4	183.09
5	182.64
6	182.33
7	182.18
8	182.13
9	182.09
10	182.08
11	182.07
12	182.04
13	182.04

2. La salinité en fonction de la conductivité électrique de l'extrait 1/5

CE (ds/m) à 25C°	Degré de salinité
≤ 0.6	Sol non salé
$0.6 < CE \leq 2$	Sol peu salé
$2 < CE \leq 2.4$	Sol salé
$2.4 < CE \leq 6$	Sol très salé
$CE > 6$	Sol extrêmement salé