



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de  
la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**Hana SAKHRAOUI**  
**Soundes CHELLOUAI**

Le : mercredi 29 juin 2022

### **Caractérisation phénotypique des bactéries nodulant la légumineuse *Genista saharae*(BNL)**

---

#### **Jury :**

Titre	Mr Bachir BENKADDOUR	Grade	Université de Biskra	Président
Titre	Mme Manel DJOUAMAA	Grade	Université de Biskra	Rapporteur
Titre	Mr Toufik AMAIRI	Grade	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes qui nous voudront témoigner toute notre gratitude

Nos sincère remerciements à Mme DJOUAMAA Manel de nous avoir encadré, diriger et aider.

à toute l'équipe pédagogique de l'université Mohamad Khider , les professeurs et les intervenants professionnels par leurs orientations ,leurs écrits ,leurs conseils et toute critiques instructives.

# Sommaire

Liste des Tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction générale .....	01

## Première partie : partie bibliographique

### Chapitre 01 : Synthèse bibliographique

1. La symbiose plantes-microorganismes.....	03
2. Partenaire végétal : les légumineuses ( <i>Genista saharae</i> ) .....	03
2.1. Les plantes légumineuses .....	03
2.2. La famille légumineuse (fabaceae ou leguminosae) .....	03
2.3. Morphologie des plantes légumineuses.....	04
2.4. Taxonomie des légumineuses.....	05
2.5. Espèce <i>Genista saharae</i> .....	05
2.6. Morphologie de la plante <i>Genista saharae</i> .....	05
2.7. Classification de l'espèce <i>Genista saharae</i> .....	06
3. Partenaire microbien : le rhizobia.....	07
3.1. Généralité.....	07
3.2. Caractérisation morphologique .....	07
3.3. Caractérisation symbiotique .....	07
3.4. La taxonomie de rhizobia .....	08
4. Etablissement de la symbiose .....	09
4.1. Formation des nodules racinaires .....	09
4.2. La fixation symbiotique d'azote .....	11

## Deuxième partie: partie expérimentale

### Chapitre 02 Matériels et méthodes

1. Prospection des sites d'échantillonnage .....	13
1.2. Méthodes d'analyse des sols.....	13
1.3. Piégeage et isolement des bactéries .....	13
1.3.1. La collecte des nodules .....	14
1.3.2. Conservation des nodules .....	14
1.3.3. Stérilisation des nodules .....	14
1.3.4. Isolement des bactéries à partir des nodules .....	15
1.3.5. Observation des colonies et conservation des isolats.....	15

2. Caractérisation morphologique .....	15
2.1. Vitesse de croissance .....	15
3. Caractérisation symbiotique (test de nodulation).....	16
4. Caractérisation phénotypique .....	17
4.1. Paramètre physiologique (T/ PH / NaCl).....	17
4.1.1. Résistance aux températures et tolérance au sel .....	17
4.1.2. Croissance à différents pH .....	18
4.2. Paramètres nutritionnels.....	18
4.2.1. Assimilation des sucres comme source du carbone .....	18
4.2.2. Assimilation des acides aminés comme source d'azote .....	18
5. Résistance aux antibiotiques .....	18
<b>Chapitre 03 :Résultats et discussions</b>	
1. Localisation des échantillons .....	19
1.1. Caractéristiques climatiques et pédologiques.....	19
1.2. Mise en évidence de la présence des BNL .....	20
1.2.1. Collecte des nodules .....	20
2. Caractéristiques morphologique .....	21
2.1. Caractérisation macroscopique .....	21
2.2. Caractérisation microscopique .....	22
2.3. Vitesse de croissance.....	22
3. Caractérisation symbiotique.....	23
4. Caractérisation phénotypique.....	26
4.1. Effet des facteurs abiotiques.....	26
4.1.1. Résistance à la température et à la tolérance à la salinité .....	26
4.1.2. Croissance à différents pH.....	27
4.2. Paramètres nutritionnels.....	28
4.2.1. Assimilation des sucres et des acides aminés.....	28
4.3. Sensibilité et résistances aux antibiotiques.....	29
Conclusion.....	30
Références bibliographique.....	32
Annexe	

---

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> La plante <i>Genista saharae</i> dans le milieu naturel.....	<b>5</b>
<b>Figure 02 :</b> Les organes structuraux de <i>Genista saharae</i> .....	<b>6</b>
<b>Figure 03 :</b> Signalisation de la symbiose et immunité de plantes impliquée dans la spécificité de la reconnaissance dans l'interaction légumineuse-rhizobienne	<b>11</b>
<b>Figure 04 :</b> Production de l'ammoniac à partir d'azote atmosphérique.....	<b>12</b>
<b>Figure 05 :</b> Aspect des colonies sur milieu YMA.....	<b>21</b>
<b>Figure 06 :</b> Observation microscopique des bacilles a gram négatif.....	<b>22</b>
<b>Figure 07 :</b> Aspect des colonies sur milieu YMA +BBT (acidification).....	<b>23</b>
<b>Figure 08 :</b> les bactéries nodulants <i>Genista saharae</i> .....	<b>24</b>
<b>Figure 09 :</b> les bactéries nodulants <i>Genista saharae</i> .....	<b>24</b>

---

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> La plante <i>Genista saharae</i> dans le milieu naturel.....	<b>5</b>
<b>Figure 02 :</b> Les organes structuraux de <i>Genista saharae</i> .....	<b>6</b>
<b>Figure 03 :</b> Signalisation de la symbiose et immunité de plantes impliquée dans la spécificité de la reconnaissance dans l'interaction légumineuse-rhizobienne	<b>11</b>
<b>Figure 04 :</b> Production de l'ammoniac à partir d'azote atmosphérique.....	<b>12</b>
<b>Figure 05 :</b> Aspect des colonies sur milieu YMA.....	<b>21</b>
<b>Figure 06 :</b> Observation microscopique des bacilles a gram négatif.....	<b>22</b>
<b>Figure 07 :</b> Aspect des colonies sur milieu YMA +BBT (acidification).....	<b>23</b>
<b>Figure 08 :</b> les bactéries nodulants <i>Genista saharae</i> .....	<b>24</b>
<b>Figure 09 :</b> les bactéries nodulants <i>Genista saharae</i> .....	<b>24</b>

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	:Acide DésoxyriboNucléique
<b>ARN</b>	:Acide RiboNucléique
<b>ARN<sub>r</sub></b>	:Acide RiboNucléique ribosomal
<b>ATP</b>	:Adinine triphosphate
<b>atp D</b>	:ATP synthase beta subunit gene
<b>BNL</b>	:Bactéries nodulant les légumineuses
<b>DO</b>	:Densité Optique
<b>EC</b>	:Electrical Conductivity (Conductivité électrique)
<b><i>G.saharae</i></b>	: <i>Genista saharae</i>
<b>Mg</b>	:Magnesium
<b>N<sub>2</sub></b>	:diazote
<b>Na</b>	:Sodium
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammonic
<b>NaCl</b>	:Chlorure de sodium
<b>ND</b>	:Non Détecté
<b>Nod</b>	:Gène de nodulation
<b>P</b>	:Phosphore
<b>pH</b>	:potentiel d'Hdrogène
<b>rpm</b>	:rotation par minute
<b>recA</b>	:Recombinase A gene
<b>YEM</b>	:Yeast extract mannitol
<b>YMA</b>	:Yeast Mannitol Agar
<b>YMB</b>	:Yeast Mannitol Broth
<b>BTB</b>	:Brmothymol bleu
<b>Mo-Fe</b>	:Protein de molybdène-fer

# **Introduction Générale**

# Introduction

L'Afrique du Nord représente une zone de biodiversité élevée mais l'expansion de l'agriculture industrielle, et le stress climatique ont engendré un débat global qui préconise de réhabiliter les ressources naturelles qui sont limitées et fragilisées du fait de l'aridité du climat d'une part et des activités humaines d'autre part. De même, l'utilisation des pesticides et des engrais chimiques pour augmenter la production végétale, engendre une menace pour l'état sanitaire des végétaux, des animaux et présente une source d'altération de la qualité des produits. De cela coule une volonté vers l'agriculture biologique et la fertilisation du sol pour améliorer le rendement de la terre.

L'Algérie, de par sa situation géographique et climatique, possède une flore particulièrement riche et diversifiée depuis longtemps. En revanche, le Sahara Algérien est l'une des régions les plus sèches et les plus chaudes du monde, zone bioclimatique hyperaride couvrant 89.5% de la surface globale, et 4.78% sont des zones arides ainsi que 4.12 % semi-arides (Nedjraoui, 2001). En effet, les propriétés du sol sont un facteur limitant pour la croissance des plantes car ils sont généralement sableux, salins et pauvres en éléments nutritifs.

Malgré les conditions édaphiques et climatiques sévères, ces régions présentent une richesse floristique de plantes très adaptées (Le Houérou 1990, 1997 ; Quezel 1978). Parmi celles-ci, les plantes de la famille des fabaceae qui jouent un rôle clé dans la durabilité de cet écosystème naturel. (Brockwell et al., 1995). Les espèces arbustives *Genistasaharae*, sont parmi les plantes endémiques de Sahara Algérienne parfaitement adaptées aux conditions édaphiques et climatiques sahariennes. Contribuant efficacement à la fixation des dunes et à l'alimentation des dromadaires, sans oublier la fixation biologique de l'azote.

La fixation biologique constitue la voie principale pour l'introduction de l'azote dans les régions désertiques. Les symbioses rhizobium-légumineuses représentent le processus majeur de la fixation biologique de l'azote atmosphérique et confère aux plantes des potentialités d'adaptation à mieux se développer sur des sols pauvres des zones arides.

Comme toutes les plantes légumineuses, *GenistaSaharae* est bénéficiée de l'azote atmosphérique à l'aide des microorganismes libres existants dans la rhizosphère racinaire de la plante, par le biais des nodules racinaires. Elle s'associe avec les bactéries rhizobiennes

du sol pour établir une symbiose fixatrice de l'azote. Au cours de ces interactions spécifiques, les rhizobiums induisent la formation des nodules sur les racines

Ces microorganismes ou bien les BNL bactéries nodulant les légumineuses sont des bactéries qui infectent les racines des légumineuses et donnent naissance à des excroissances quand les appelle « nodosités ». la nodulation est le résultat de l'association symbiotique entre ces deux partenaires et qui est strictement contrôlé par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte.

De cela coule la volonté de réparer le sol dégradé par le biais des BNL ainsi de les intégrer dans des plantes hôtes (*Genista saharae*) et tester sa capacité de fixer l'azote atmosphérique avec le test de nodulation et si elles montrent une grande capacité de fixer l'azote nous pouvons isoler cette BNL et cultiver une grande quantité pour les utiliser comme engrais biologique et réparer le sol dégradé.

Cette étude analytique focalisé sur la caractérisation des rhizobianodulant la plante *G.saharae* et projeté sur les travaux de Chaich et *al.*, (2016) et Mahdhi et *al.*,(2007) vise en premier lieu à mettre en évidence la capacité des isolats à noduler la plante hôte *G. saharae*, et estimer la diversité de BNL en étudiant le lien entre les isolats d'étude et les souches de référence. Ensuite, caractériser phénotypiquement les isolats en utilisant des tests physiologiques et nutritionnels, et au final, estimer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques.

**Première Partie :**  
**Partie bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Synthèse bibliographique**

## 1. La symbiose plantes-microorganismes

La symbiose est une association réciproquement bénéfique entre deux organismes, qui souvent s'établit entre un partenaire autotrophe et un partenaire hétérotrophe. Les symbioses fixatrices d'azote les plus connues font intervenir la famille des légumineuses avec ses symbiontes bactériens, les Rhizobia. Dans ce cas, la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation d'un nouvel organe au niveau des racines qu'on l'appelle ; le nodule fixateur d'azote. Dans les nodules les bactéries protégées et nourries par la plante, lui fournissent en échange l'azote fixé. En revanche, certaines plantes peuvent s'associer en symbiose avec des microorganismes diazotrophes qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique.

## 2. Partenaire végétal : les légumineuses (*Genista saharae*)

### 2.1. Les plantes légumineuses

Les légumineuses sont des plantes qui représentent le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme qu'elles soient alimentaires, fourragères, industrielles, médicinales tinctoriales ou horticoles. Elles fournissent pour l'alimentation humaine et animale des aliments riches en protéines, avec des taux pouvant atteindre 36% pour *Lupin* et 44% pour *Soja*. Certaines légumineuses cultivées ont une importance économique considérable, c'est le cas en particulier du *Soja*, du *Haricot*, et de l'*Arachide*, qui sont les légumineuses les plus largement cultivées.

En Algérie, cette famille est représentée par près de 500 espèces majoritairement herbacées. Les légumineuses alimentaires les plus cultivées sont par ordre d'importance ; le pois chiche la fève, le haricot, le petit pois et la lentille, d'autres telles le niébé (*Vigna unguiculata*) et l'arachide sont cultivées à petite échelle.

Le bersim (*Trifolium alexandrinum*) et la luzerne (*Medicago sativa*) sont également cultivées comme plantes fourragères (Djouadi et Benbida., 2005)

### 2.2. La famille légumineuse (fabaceae ou leguminosae)

Les légumineuses (fabaceae ou leguminosae) représentent l'une des familles de plantes dicotylédones de l'ordre des Fabales, c'est l'une des plus importantes familles des angiospermes (plantes à fleurs), la troisième après les Orchidaceae et les Asteraceae. Elle est constituée de 727 genres et 19325 espèces (Chaïch., 2018).

Les Fabaceae sont divisées en trois sous-familles en se basant, principalement sur les différences morphologiques de leurs fleurs.

- La sous famille des Césalpiniciées contient environ 150 genres (*Cassia*, *Gledista*, *Cassalpinia* ... ), rassemble principalement des arbres ou des arbustes retrouvés en région tropicale et subtropicale, presque dépourvue d'espèces fixatrices d'azote à cause d'un facteur intrinsèque inhibiteur de la nodulation.
- La sous famille des mimosacées possède plus d'une soixantaine de genres (*Acacia leucaena*, *Prosopis* ...), rassemble surtout des arbres ou des arbustes retrouvés en région tropicale et subtropicale.
- La sous famille des papilionacées représente le groupe le plus diverse avec environ 430 genres (*Médicago*, *Trifolium*, *Sesbania* ...). Les plantes de cette sous famille sont principalement des herbes, mais comprenant aussi des arbres et des arbustes présent dans des régions tempérée et tropicale où la nodulation est très fréquente 85% des espèces sont nodulées.

Dans ces 3 sous familles le pourcentage de nodulation est variable d'une espèce à une autre. Chez les césalpiniciées la nodulation est la plus moins fréquente que chez les mimosacées et les papilionacées.

### 2.3. Morphologie des plantes légumineuses

La caractéristique la mieux partagée par les représentants de cette famille est la structure du fruit qui est une gousse, c'est-à-dire un fruit s'ouvrant par deux fentes opposées dont, l'une correspond à la structure dorsale et l'autre à la ligne médiane du carpelle unique. Les autres caractères comme la feuille et la fleur sont très variables.

La feuille peut être simple, trifoliolée, composée complexe. La fleur qui est le critère de délimitation des 3 sous famille des légumineuses peut être régulière ou légèrement zygomorphe (césalpiniciées), actinomorphe (mimosacées) ou à zygomorphe prononcée (papilionacées). Dans ce dernier cas, l'agencement des pièces florales en un étendard, une carène et des ailes rappelle, la forme d'un papillon d'où le nom attribué à cette sous famille (Quezel et Santa., 1962).

## 2.4. Taxonomie des légumineuses

- ✓ **Règne :** *plantae*
- ✓ **Sousrègne :** *trachéobionta*
- ✓ **Division :** *magnoliophyta*
- ✓ **Classe :** *magnoliopsidia*
- ✓ **Sousclasse :** *rosidae*
- ✓ **Ordre :** *fabales*
- ✓ **Famille :** *fabaceae*
- ✓ **Sousfamille :** *papilionoideae ; mimosoideae ; caesalpinioideae.* (Chaich.,2018)

## 2.5. Espèce *Genista saharae*

Cette espèce appartient à la famille des légumineuses (fabales), sous famille des papilionacées (fabacées) et à la tribu des Genisteaes. Selon Quezel et Santa en 1963 ce genre compte 16 espèces en Algérie dont 11 endémiques (Boumaza., 2006). *Genista* joue un rôle écologique important pour la préservation et fertilité des sols pauvres et érodés (Mahdhi et *al.*, 2007)

## 2.6. Morphologie de la plante *Genista saharae*

Arbuste de 1 à 2 mètres de haut, à long rameaux ; feuilles unifoliées, étroites, très caduques ; fleurs jaunes espacées le long des rameaux ; gousses longues pendantes, à paroi parcheminées. (Ozenda.,1991)**Habitat :** terrains sableux, dans des dépressions et lits d'oued.



**Figure 1 :** La plante *Genista saharae* dans le milieu naturel.

Cet arbuste à calice à 5 segments formant deux lèvres bien dressées, la supérieure à 2 lobes libres ou soudés, l'inférieure formant une lèvre à 3 dents etard peu élargie. La carène obtuse, droite à peine courbée, étamine monadelphes style ascendant, stegmate oblique ; gousse saillant, allongée, à graines ordinairement non caronculées.

La corolle est jaune, caduque à étendard pubescent-soyeux sur le dos ovale triangulaire et de 10 mm de long, atténué-obtus au sommet, arrondi ou sub-cordé à la base. Les ailles sont de 8,5-9 mm de long.



**Figure 2** : Les organes structuraux de *Genista saharae*

### 2.7. Classification de l'espèce *Genista saharae*

- ✓ **Règne** : *Plantae*
- ✓ **Division** : *Magnoliophyta Cronquist*
- ✓ **Classe** : *Rosopsida Btsch*
- ✓ **Ordre** : *Fabales Bromhead*
- ✓ **Famille** : *Fabacées Lindl*
- ✓ **Tribu** : *Genisteeae*
- ✓ **Genre** : *Genista*
- ✓ **Espèce** : *Genista Saharaea* (Lograda, et al., 2010)

### **3. Partenaire microbien : le rhizobia**

#### **3.1. Généralité**

Le Rhizobium est le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote, est une bactérie communément appelée « rhizobium » (du grec rhiza : racine et bios : vie). Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, Rhizobium décrit au XIX<sup>ème</sup> siècle comme des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel à noduler des légumineuses (Frank., 1889).

Pendant le processus symbiotique, les rhizobiums sont capable de réduire l'azote atmosphérique à une forme assimilable (ammonium) directement par les plantes (Berrada et Fikri ; Benbrahim, 2014). Le système enzymatique des bactéries fournit une source constante d'azote réduit à la plante hôte et la plante fournit les nutriments et l'énergie nécessaires aux activités bactériennes (Black et *al.*, 2012).

Les rhizobiums sont généralement spécifiques à l'hôte qu'ils infectent, bien qu'une même légumineuse puisse être inoculée par plusieurs souches bactériennes différentes. Ces microorganismes sont sensibles à certains facteurs du milieu tels que la température, la salinité et l'acidité du sol ainsi que sa teneur en matière organique qui favorise la vie bactérienne (Beunard P., 1994).

#### **3.2. Caractérisation morphologique**

Les rhizobiums sont Gram négatives, aérobies et présentes soit à l'état libre et en général dans le sol soit en association avec des légumineuses, possédants une forme bâtonnets de 0.6 à 0.9 µm de largeur et de 1.2 à 3 µm de longueur et non sporulant (Jordan., 1984). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner., 1992).

#### **3.3. Caractérisation symbiotique**

Ces bactéries présentent la capacité de former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses (Benahmed., 2010). A l'état libre, les rhizobia vivent dans le sol et dans la rhizosphère. Avec quelques exceptions (dont Azorhizobium), les rhizobia n'ont pas la possibilité de fixer l'azote atmosphérique, lorsqu'ils sont à l'état libre (Emile et Michel, 2004).

A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en masse (Perry et *al.*, 2004).

Donc on distingue deux formes :

- **Une forme végétative (non bactéroïdes) :** ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes (Torche, 2006).
- **Une forme bactéroïdes :** à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les Rhizobiasse transforment en bactérioides de forme branchée, sphérique ou en masse. Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative. (Somasegaran et Hoben, 1994).

### 3.4. La taxonomie de rhizobia

Les premières classifications ont été basées sur des tests d'inoculation croisée entre Rhizobia et leurs plantes hôtes. La plante hôte n'était pas le seul critère pris en compte pour la classification des Rhizobia. Pour lesquelles les espèces ont été séparées en deux groupes :

Les souches à croissance rapide (le genre rhizobium) et les souches à croissance lente (le genre Bradyrhizobium), en fonction de leurs temps de génération et de leur taux de croissance sur milieu de culture. Cependant, des observations discordantes entre la notion de vitesse de croissance bactérienne et celle de la gamme d'hôtes ont laissé beaucoup de doutes sur la validité de cette classification. Cela fait place à des méthodes comparatives telles que: le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN/ADN ou ADN/ADN, l'analyse du gène de l'ARNr 16S, l'analyse de plasmides, etc.

Cette période a marqué le début d'une nouvelle étude taxonomique basé sur les résultats de différentes analyses phénotypiques et biochimiques pour l'identification des bactéries symbiotiques. Depuis lors, l'isolement des Rhizobia d'un nombre croissant d'espèces végétales dans le monde et leur caractérisation par la taxonomie polyphasique moderne a conduit à la description d'autres nouveaux genre et espèces (Berrada et Fikri –Benbrahim ,2014).

L'isolement et la caractérisation de nouvelles bactéries nodulant les légumineuses, souvent inhabituelles, sur des plantes hôtes diversifiées ont conduit à la désignation de nombreuses nouvelles espèces rhizobiennes. Sur la base de la séquence d'ADNr 16S, les symbiotes de légumineuses actuellement décrits appartiennent à deux sous – classes phylogénétiques distinctes : les Proteobacteries  $\alpha$ ,  $\beta$ . 238 espèces ont été regroupées en 18 genres. Ces espèces se répartissent également en sept familles (Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae, Brucellaceae et Burkholderiaceae) et deux ordres, à savoir les Rhizobiales et Burkholderiales. L'ordre des Rhizobiales renferme les six premières familles. Par conséquent, il apparaît clairement que la taxonomie actuelle des rhizobianodulants progresse rapidement en raison des dernières avancées en matière de technologie omique basé sur la biologie moléculaire, par exemple, génomique, protéomique, transcriptomique et métabolique (annex1) (Rao et al., 2018). La combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques a permis de modifier considérablement la taxonomie des Rhizobia ces dernières années.

#### **4. Etablissement de la symbiose**

La symbiose Rhizobia-légumineuses se traduit par la formation d'une structure spécialisée, siège des interactions symbiotiques entre la bactérie et la plante. Cette structure désignée, par nodule ou nodosité n'est pas une simple excroissance ou une tumeur. Il s'agit d'un véritable organe bien intégré à la plante. L'induction de l'organogénèse de cet organe est un processus complexe et spécifique qui fait suite à un véritable dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante. (Barek S., 2018)

##### **4.1. Formation des nodules racinaires**

Pour obtenir un nodule fixateur, quatre mécanismes sont mis en place sous le contrôle de la plante :

- **Attraction et amplification des Rhizobia via les exsudats racinaires des légumineuses**

L'infection du système racinaire débute par une attraction chimiotactique et la multiplication des Rhizobia dans la spermophile et la rhizosphère de la légumineuse via l'exsudation par la graine et la plantule de substrats énergétiques (Denarié et al., 1996 ; Oldryod., 2001)

- **Reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes**

La symbiose Rhizobium-légumineuses commence par un échange de signal entre la plante hôte et son microsymbiote (Wrang et *al.*, 2018). Les racines des légumineuses secrètent des composés phénoliques, principalement (iso) flavonoïdes (Montiel et *al.*, 2018). Ces flavonoïdes synthétisés et secrétés par la suite, agissent comme des molécules de signalisation qui attirent les Rhizobia vers leur plantes hôtes et induisent l'expression des gènes Nod qui déclenchent les premières étapes du développement des nodules (Menendez et *al.*, 2017). Ces gènes sont responsable de la synthèse des facteurs Nod de nature lipo-chito-oligosaccharidique (LCO) spécifiques à chaque espèce de Rhizobia (Lerouge et *al.*, 1990 ; Dénarié et *al.*, 1996 ; Gresshoff., 2003).

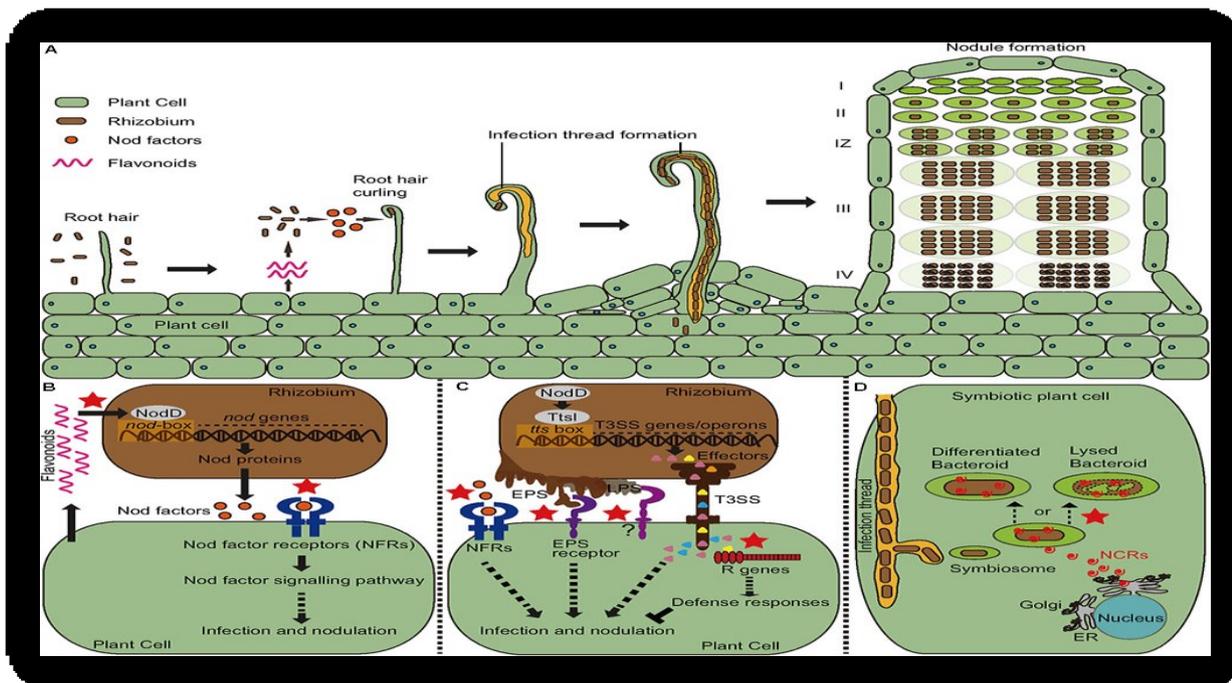
- **Infection du système racinaire**

L'infection débute par l'adhésion bactérienne à l'extrémité des racines dans les couches de cellules épidermiques (**Gage, 2014**). Les rhizobia ont deux voies principales pour pénétrer dans la racine de la plante ; par les poils radiculaires ou par des fissures dans le tissu épidermique des racines. L'infection des poils est la plus courante (**Kondorosi et *al.*, 2013**).

La pointe des poils radiculaires émergents est la principale cible d'infection par Rhizobium. La fixation des Rhizobia aux poils absorbants stimule la déformation de ces poils et favorise également la division des cellules corticales. Les bactéries progressent le long du poil absorbant grâce au cordon d'infection jusqu'au cortex racinaire où les bactéries sont libérées à l'intérieur des cellules corticales (Brewin, 1991;Franssen et *al.*, 1992; Mateos et *al.*, 2001).

- **Nodulation proprement dite**

Les cellules de la plante se différencient en un méristème nodulaire (Geurts et *al.*, 1996) en donnant naissance au primordium nodulaire (Wood et *al.*, 1989). Le cordon d'infection va l'atteindre et libère les bactéries qui infectent les cellules végétales (Losick et *al.*, 1997; Gage., 2004). Chaque bactérie est séquestrée dans une vacuole formée par une membrane péribactéroïdale et l'ensemble constitue le symbiosome (Parniske., 2000;Gualtieri et *al.*, 2000). A l'intérieur du symbiosome, les bactéries se différencient en bactéroïdes (Gage., 2004). A ce stade, les Rhizobia synthétisent la nitrogénase (Oke et *al.*, 1999; Gage., 2004), enzyme qui permet la réduction de l'azote moléculaire

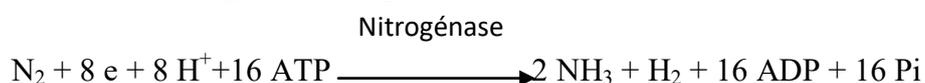


**Figure 3** :Signalisation de la symbiose et immunité de plantes impliquée dans la spécificité de la reconnaissance dans l'interaction légumineuse-rhizobienne.(Wang et al .,2018)

#### 4.2. La fixation symbiotique d'azote

La nitrogenase est un complexe enzymatique qui réduit l'azote atmosphérique en ammonium dans l'environnement microaérofile de nodule.

L'activité dans une nitrogenase est limitée par la présence de molécule d'ATP, source d'électrons et les ions de magnésium ( $Mg^{++}$ ).



Bien qu'il existe plusieurs types de nitrogenase, les Rhizobia ne possèdent que le type contenant du molybdène .les nitrogenases de Mo sont formées de deux composants métalliques, la dinitrogénase [protéine de molybdène -fer (MoFe)] et la dinitrogénase réductase ( protéine de Fe). ( Menendez et al.,2017).

L'obtention des molécules d'ATP chez les Rhizobia est faite à partir de l'oxydation des produits carboniques par le cycle de Krebs (Denarie et Truchet., 1979). Selon Brill (1980), la protéine ferredoxine ou la protéine flavodoxine, sont eux donnent les électrons à l'enzyme nitrogenase.

Les molécules d'ATP se réagissent avec les ions de magnésium (Mg) et donnent un complexe qui se lie typiquement avec le complexe (Fe-Mo) qui a comme résultat le changement de son activité réductrice. Donc il y' aura un changement dans sa structure moléculaire (Stryer.,1985), ce changement de l'activité réductrice de complexe (Fe-Mo) permet de transmettre les électrons au complexe ( Mo-Fe-Fe) . Ou ce dernier va prendre une forme qui permet de réduire l'azote moléculaire.

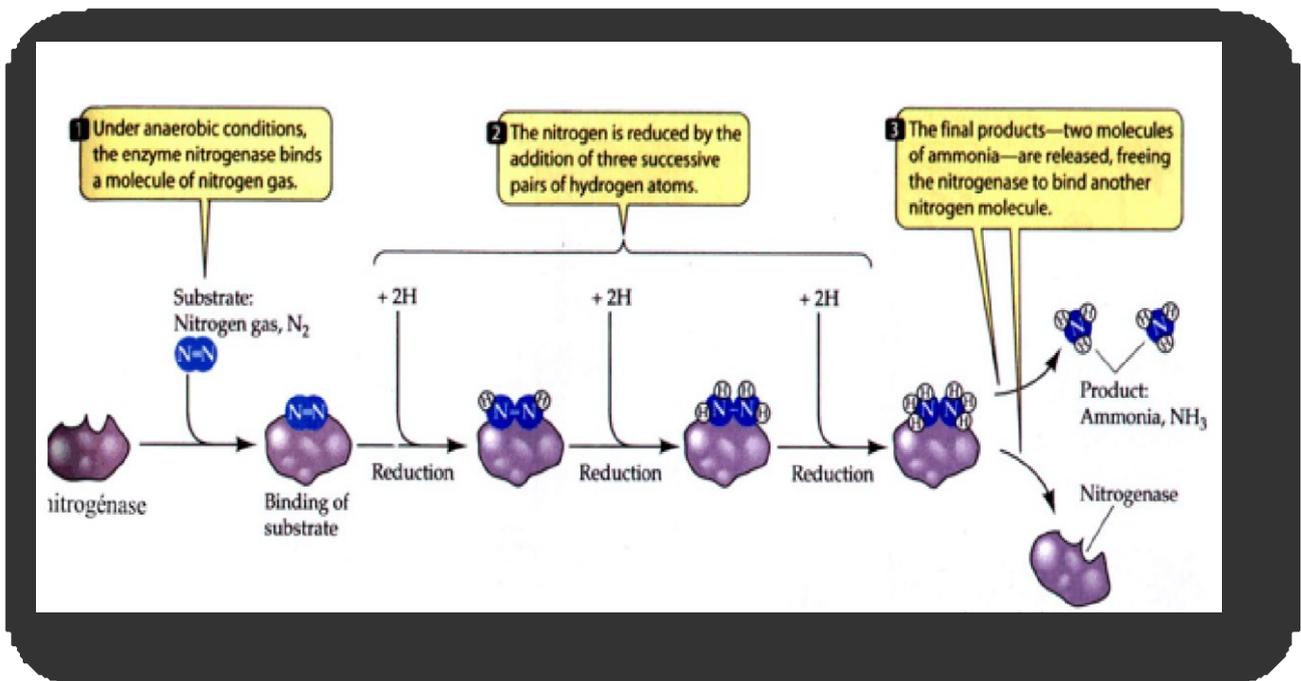


Figure 4 : Production de l'ammoniac à partir d'azote atmosphérique.

**Deuxième Partie :**  
**Partie expérimentale**

# **Chapitre 2 :**

## **Matériels et méthodes**

## **1. Prospection des sites d'échantillonnage**

L'échantillonnage correspond principalement à la présence d'une espèce de fabacée verdâtre significatif d'une bonne nutrition azotée de la plante.

### **1.1. Echantillonnage et prélèvement des sols**

Des échantillons de sol ont été collectés sur quatre sites dans le nord-est du Sahara Algérien au cours des années 2010 et 2012. Ces quatre sites sont bien localisés dans CHEBKAS du Mزاب ; wilaya de Ghardaïa daïra de Metlili (Chaab Sbaa) et ERG ORIENTAL ; wilaya de Ouargla daïra de Taïbet (El morr, Khbina et Belghit).

D'après Chaïch l'élément principal définissant son choix des stations est la présence de Fabacées spontanées -dans notre étude est celui de *Genista Saharae*- bien verte signifiant une bonne nutrition azotée dans ces différents espaces géomorphologiques.

A l'intérieur des sites, l'échantillonnage adopté est de type subjectif traduit par le prélèvement de 1kg de sols, à une profondeur de 10 à 20 cm près de la racine de *G.Saharae*.

### **1.2. Méthodes d'analyse des sols**

Les échantillons de sol prélevés ont été analysés physico-chimiquement selon les méthodes d'analyses usuelles (w/v) pour le pH, la conductivité électrique, le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium, le sodium, le sulfate, le dosage de l'azote et du carbone organique.

### **1.3. Piégeage et isolement des bactéries**

Selon Chaïch et *al.* (2016), sur les mêmes sites sahariens où les sols ont été échantillonnés, les semences de *G.saharae* utilisées pour les tests de piégeage et de nodulation ont été collectées en vrac.

Ils ont été stérilisées en surface avec de l'hypochlorite de calcium (3%) pendant 5 min, puis rincées à l'eau distillée (5 fois) et scarifiées mécaniquement à l'aide d'un fer à souder.

Par la suite, les semences stériles ont été transférées sur des boîtes de pétri stériles contenant de l'eau gélosée (10% d'agar-agar) et laissées 48 heures à 4°C, puis 48 heures à 21°C pour la germination.

Les semis ont ensuite été transférés dans des tubes contenant de l'attapulгите calcinée stérile (Oil Dri US Special, Damolin, Danemark ; (<http://www.damolin.dk>), pour obtenir une meilleure porosité au niveau des tubes.

Après être additionnés de 40 ml de solution minérale nutritive sans azote (Bertrand *et al.*, 2000), sans oublier de stériliser les tubes à 120° C pendant 20 minutes afin de travailler dans des conditions stériles.

Une quantité de 2 à 3 centimètres de sol échantillonné placés ensuite au-dessus des granules d'attapulгите des tubes stérilisées par la chaleur humide.

Les plantules ont été cultivées sous une lumière continue (20 W/m<sup>2</sup>) à 28°C. Après 7 semaines d'incubation à 21°C, les plantules ont été récoltées et examinées au niveau des racines pour enlever les nodules

### **1.3.1. La collecte des nodules**

La collecte des nodules dans l'étude de Mahdhi, *et al.* (2007) est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran, et Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.

Manuellement, il enlève la terre des racines sans toutefois endommager les nodules. Puis, il lave doucement ces nodules avec l'eau de robinet pour se débarrasser des résidus de sol.

### **1.3.2. Conservation des nodules**

Les nodules séchés au papier filtre peuvent être conservés au réfrigérateur à +4°C pendant 24 heures jusqu'à 48 heures pour un usage immédiat sans oublier de réunir les nodules d'une même plante dans le même tube. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial ; le chlorure de Calcium (Ca Cl<sub>2</sub>) (Vincent, 1970). Sur chaque flacon sont mentionnées le nom de la plante, date et lieu de collecte, et la date de conservation.

### **1.3.3. Stérilisation des nodules**

les nodules précédemment récupérés doivent être rincer à l'eau pour éliminer l'excès de saleté, puis les émerger dans un bain d'éthanol à 95% pendant 60 secondes, puis les tremper dans un bain d'eau de Javel (5°) pendant 5 minutes.

### 1.3.4. Isolement des bactéries à partir des nodules

Les nodosités prélevées à partir des racines de l'espèce *G.saharae* sont par la suite, soit directement utilisées pour l'isolement ou conservées secs dans des tubes contenant du gel de silice ou du Chlorure de Calcium  $\text{CaCl}_2$  (Vincent, 1970), surmonté de coton cardé. Elles sont réhydratées dans de l'eau distillée stérile (pendant une demi-heure) dans des tubes Eppendorf. Après élimination de l'eau, elles sont désinfectées en surface dans une solution d'Hypochlorite de Calcium (3%) pendant 3 min. Après 5 rinçages de 1 min dans de l'eau distillée stérile, chaque nodosité est broyée stérilement à l'aide d'un pilon dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant 50  $\mu\text{l}$  d'eau distillée stérile.

L'isolement des souches a été réalisé dans des conditions d'asepsie totale suivant la méthode de Vincent (1970). Une boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, Yeast-Mannitol-Agar (YMA) additionné de rouge Congo, étéensemencée de chaque broyat de nodosité avec le pilon utilisé pour le broyage. Les boîtes de Pétriensemencées sont placées à 28°C sous conditions d'aérobiose.

### 1.3.5. Observation des colonies et conservation des isolats

Après apparition des colonies sur les boîtes de pétri, chaque colonie bactérienne représentant un phénotype particulier est repiquée en partant à chaque fois d'une colonie isolée afin d'obtenir une culture pure. Chaque isolat a subi au moins 2 cycles de purification sur boîte de Pétri avant d'être cultivé en milieu liquide (15 ml d'YEM). Toutes les souches isolés ont été conservées et additionnées 50% de glycérol (v/v) à -80°C.

## 2. Caractérisation morphologique

La morphologie des colonies des isolats a été examinée sur (YMA). Après une incubation de 3 à 7 jours à 28°C, les colonies individuelles ont été caractérisées en fonction de leur taille, la couleur, la forme, la mucosité, la transparence, les bords, pour déterminer par la suite la morphologie cellulaire au microscope optique, le taux de croissance dans les milieux de croissance, et la réaction à la coloration de Gram (Vincent, 1970).

### 2.1. Vitesse de croissance

Afin de différencier les rhizobia des contaminants, les isolats étudiés sontensemencées par spot sur le milieu YMA avec 0,0025% de rouge Congo (YMA-RC) incubés à 28°C pendant 24h à 48h. Les colonies typique aux rhizobia n'absorbent pas le rouge Congo ou l'absorbent faiblement par rapport aux contaminants (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **Test au bleu de Bromothymol**

Ce test permet de mettre en évidence la vitesse de croissance des Rhizobia, il est réalisé sur le milieu YMA additionné de l'indicateur coloré Bleu de Bromothymol (BTB) à une concentration de 0.0025% incubé à 28°C pendant 6 jours (Somasegaran et Hoben, 1994). Ce colorant étant un indicateur de pH, il met en évidence l'acidification du milieu par un virage de couleur au jaune qui permet de distinguer les souches à croissance rapide (notamment les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, et *Neorhizobium*) en 24h d'incubation, des autres souches à croissance lente (notamment *Bradyrhizobium*) dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours). (Pagano, 2008).

### **3. Caractérisation symbiotique (test de nodulation)**

La possibilité des microorganismes à noduler leur plante hôte et à fixer l'azote atmosphérique, est un caractère important pratiquées par les Rhizobia ou les B.N.L. (bactéries nodulant les légumineuses). Ce phénomène doit être analysé en détail (Graham et coll,1991). Les tests de nodulation doivent être effectués dans des jarres traditionnelles de Leonard (Vincent, 1970) ou dans des tubes appropriés (Beck et coll,1993)

Chaïch a étudié l'efficacité les capacités symbiotiques des nouveaux isolats et la souche de référence ORS1400T d'*Ensifer garamanticus*, qui ont été testés pour la nodulation sur leur plante hôte *G. saharae*.

En premier lieu, Chaich (2016) a placé les semences (graines) précédemment scarifiées et stérilisées, sur des boîtes de pétri contenant 10% d'agar. Les boîtes scellées au parafilm ont été conservées à 4°C pendant 48 h, avant d'être transférées dans une chambre de croissance (dans l'obscurité, température de 22°C le jour et 15°C la nuit).

Une semaine après le semis, ou bien les plants ont été transplantés dans des tubes en verre remplis d'attapulгите calcinée stérile (Oil Dri US Special, Damolin, Danemark) complétés par 40 ml de solution nutritive minérale sans aucune source d'azote (Bertrand et al., 2000).

Par la suite, chaque tube a été inoculé avec 01 ml de suspension rhizobienne (environ  $10^9$  cellules / ml) en phase exponentielle de croissance provenant d'une plante à stade précoce (d'une culture en début de phase stationnaire). Les plants non inoculés ont été inclus pour servir de témoins.

Dix répétitions de plantes ont été préparées pour chaque traitement. Toutes les plantes ont été cultivées dans une chambre de croissance sous un cycle de 14 h jour/10 h nuit. La température était de 22°C (jour) et 15°C (nuit).

Les plantes ont été récoltées 42 jours après l'inoculation. Au bout de 6 semaines après inoculation, la nodulation (nombre de nodosité/plant, poids de matière sèche nodulaire), le poids de la matière sèche ainsi que la hauteur des plants ont été évaluée.

#### **4. Caractérisation phénotypique**

##### **4.1. Paramètre physiologique (T/ PH / NaCl)**

Chaïch (2016) a examiné la capacité de croissance des souches associées à l'espèce *G.saharae* à différentes conditions de salinité (NaCl) et aux hautes températures sur des microplaques de 96 puits. Il a inclus la souche de référence d'*E.gramaticus* ORS1400<sup>T</sup> ainsi que les souches témoins *E.meliloti* ORS665<sup>T</sup> et *R. etli* CFN42<sup>T</sup> dans l'expérimentation. Les expériences ont été répétées au moins deux fois, y compris trois répétitions.

##### **4.1.1. Résistance aux températures et tolérance au sel**

Dans l'étude de Chaïch(2016), les souches nouvellement isolées ont été examinées pour leur croissance dans une gamme de températures (28, 40, 42, et 45°C) et de concentration de NaCl (0, 1, 2, 3 et 4 %). Ainsi que Mahdhi qui a utilisé une gamme de température varie entre (15, 28, 35, 40,45) et de concentrations de NaCl (1,2, 3, 4 et 5%)

Pour la tolérance à la salinité, 150 µl de milieu de YEM contenant les différentes concentrations de NaCl à tester (0, 1, 2, 3, et 4%) ont été répartir dans les puits de la microplaque Des pré-cultures des souches testées ont été cultivées et conservées pendant 16 jours maximum avant l'utilisation.

Un volume de la pré-culture a été ajusté à une densité optique (DO) de 600nm égale à 0,5 ensuite 10 µL ont été utilisés pour inoculer 150 µL de YEM liquide placés dans des microplaques 96 puits. Les microplaques ont ensuite été incubées à 28, 40, 42, et 45°C dans un agitateur orbital (150rpm). La croissance bactérienne a été suivie en enregistrant la DO (600nm) à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN Infinite M200).

Les souches de référence *E.gramaticus* ORS 1400T, *E.meliloti* ORS 665T et *R.etli* CFN42T ont été incluses. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque test.

### **4.1.2. Croissance à différents pH**

L'effet du pH sur la croissance des souches bactériennes a été étudié sur le milieu YMB à différents pH (4, 6,7, 9, 12) une fois inoculées, les cultures sont incubées à 28 °C pendant 10 jours.

## **4.2. Paramètres nutritionnels**

### **4.2.1. Assimilation des sucres comme source du carbone**

Dans cette expérience l'utilisation des sucre comme source du carbone a été testé sur le milieu YMB dont l'extrait de levure a été remplacé par du NH<sub>4</sub>Cl à 0,1%, et le mannitol par la source de carbone à tester (glucose, galactose, fructose, saccharose) à une concentration de 0,1% (Somasegaran et Hoben, 1994). Les tubes inoculés sont incubés à une température de 28°C pendant dix jours.

### **4.2.2. Assimilation des acides aminés comme source d'azote**

Comme l'expérience précédente l'utilisation des acides aminés comme source d'azote a été toujours testé sur le milieu YMB tout en remplaçant l'extrait de levure par un des acides aminés à tester (L-arginine, L-proline, L-lusine, L-therosine) à une concentration de 0,1 % (Bourebaba, 2016).

## **5. Résistance aux antibiotiques**

Sur des boîtes de pétri contenant le milieu YMA les antibiotiques à tester sur les souches récupérées ont été additionnées. Les solutions mères ont été préparées et stockées suivant le protocole de Sambrook et Russell (2001). Les solutions d'antibiotiques utilisées ont été stérilisées par filtration puis ajoutées au milieu YMA. Les boîtes de pétri inoculées sont incubées à une température de 28°C pendant dix jours. Ce test a été réalisé pour déterminer la sensibilité ou bien la résistance des souches testées aux antibiotiques suivants : ampicilline, kanamycine, streptomycine et l'acide nalidixique.



# **Chapitre 3 :**

## **Résultats et discussions**

Dans ce chapitre nous résumerons les principaux résultats obtenus par les travaux de Chaïch (2016) et Mahdhi (2007) concernant les deux partenaires de l'association symbiotique Rhizobium-fabacée plus précisément l'espèce *G.saharae* tout en mettant l'accent sur la caractérisation phénotypique.

## 1. Localisation des échantillons

### 1.1. Caractéristiques climatiques et pédologiques

Les propriétés physiques et chimiques du sol à une profondeur de 10-20 cm et près des racines de *G.saharae* ont été enregistrées sur le tableau suivant :

**Tableau 1** : propriétés physico-chimiques des sols au niveau des quatre sites du Sahara Algérien

Lieu dit caractéristiques	Chaab sbaa site 1	El Morr Site 2	Khbina Site3	Belghit Site4
Sable grossier (%)	95,8	55,9	57,2	76,9
Sable fin(%)	2,9	41,9	40,4	21,9
Argile(%)	0,05	0,15	0,02	0,11
Limon(%)	0,06	0,06	0,23	0,03
pH	8,78	8,85	8,98	8,92
E.C. <sub>el/5</sub> (25°C, Ms/cm)*	0,09	0,09	0,08	0,08
Taux de calcaire(%)	0,7	4,2	3,1	6,7
Matière organique (%)	0,2	0,2	1	0,9
Azote total (ppm)	6,9	6	5	7
Rapport C/N	N.S	N.S.	12	7,1
Phosphore P (ppm)	3,02	1,6	0,8	0,8
Potassium K (ppm)	56,9	0,1	0,1	0,1
Magnésium Mg (ppm)	42,7	17,4	14,8	14,2
Sodium Na (ppm)	8,4	6,7	7,2	6,1
Calcium Ca (ppm)	65,9	169,5	128,9	159,4
Sulfate SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	20,8	18,1	20,3	27,4
Chlorures Cl (ppm)	25,9	14,2	8,7	8,4

\*Conductivité électrique 1/5 volume mesurée à (25°C en Ms/cm)

D'après les résultats de Chaïch (2016), on distingue que la plage de température moyenne de l'air était identique sur les quatre sites d'échantillonnage (3-45 °C).

Les textures du sol étaient sableuses (entre 55,9 et 95,8 %) de sable grossier avec un très faible pourcentage d'argile (0,02 à 0,15 %) et de limon (0,06 à 0,23 %).

Les pH des sols étaient légèrement alcalins et variaient de 8,7 à 8,9. Selon Callot et *al.* (1982) cette gamme de pH favorise la solubilité de l'azote, du potassium, du calcium, du sodium, du chlore et du magnésium.

En outre, les teneurs en éléments nutritifs du sol étudié étaient très faibles notamment en macroéléments, dont le P représente (3,02 ppm) et l'azote total (5 à 7 ppm) ce qui exprime la pauvreté de ces sols.

La teneur en matière organique était aussi très faible dans tous les échantillons de sol analysés (0,2 à 1%), signifiant une faible production de biomasse.

## **1.2. Mise en évidence de la présence des BNL**

### **1.2.1. Collecte des nodules**

Dans l'étude de Chaïch (2016), les nodules ont été collectés après le piégeage des plantes de *G.saharae* diversifiées dans le Sahara Algérien, des échantillons de sol provenant de site géographiquement éloignés dans la zone hyperaride de l'Algérie.

Sous conditions contrôlées et après sept (07) semaines de culture, un total de 99 nodosités sont observées sur les racines primaires et secondaires des jeunes plants testés, dont 98 sont obtenue dans 03 sites de la même région (Erg oriental) et 01 une seule nodosité est obtenue dans la rive du lit d'oued.

Trois à quatre nodules ont été obtenus par plante, ces dernières étaient associés aux racines primaires et secondaires et leur couleur rouge-brun suggéraient que les isolats étaient efficaces pour la fixation de N<sub>2</sub>. Les nodosités obtenues (sont de formes ovoïdes (50%), parfois allongées (% 25) ou multilobées (25 %) avec des surfaces lisses.

Dans l'étude de Mahdhi trois à six nodules par plante ont formé après 3 semaines. (Mahdhi, et *al.*, 2007).

**Tableau 2** : Nodulations issues de piégeages des BNL.

Espèce	Lieu dit	Site	Nb de nodules	Observations
<i>G. saharae</i>	Chaab sbaa	01	01	Rive lit oued
	El morr	05	36	Erg
	Khbina	06	38	Erg
	Belghit	07	24	Erg

## 2. Caractérisation morphologique

### 2.1. Caractérisation macroscopique

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

Selon Chaïch et *al* (2016) et après purification sur milieu YMA, différents isolats (57 isolats) ont été obtenus. Leur forme est ronde avec une surface blanche et lisse. Après 2 à 3 jours de culture, le diamètre des colonies isolées cultivées sur gélose YMA est de 1 à 3 mm, à l'exception de l'isolat Gs663, qui croît très lentement (15 jours). Cinq isolats sont du mucus, ce qui conduit à une croissance de fusion, tandis que les autres ne le sont pas.

**Figure 5** : Aspect des colonies sur milieu YMA

## 2.2. Caractérisation microscopique

L'examen microscopique des isolats après la coloration de Gram montre que les bactéries sont des bâtonnets roses (Gram négatif), aérobies, sporulés cet aspect correspond au genre de *Rhizobium*. Ces caractéristiques sont en accord avec celles décrites par Gauri et al. (2011) ; Kaberi et al. (2015) ; Roychowdhury et al. (2015)



**Figure 6 :** Observation microscopique des bacilles a gram négatif.

## 2.3. Vitesse de croissance

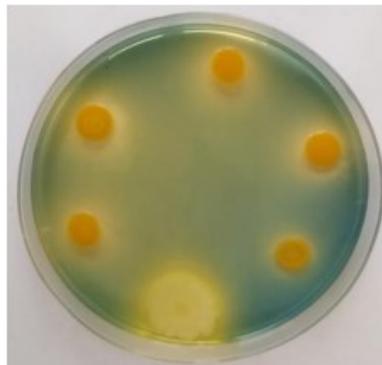
Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobiums, présentent deux types de croissance : bactéries à croissance rapide (*Rhizobium*, *MesoRhizobium*, *Sinorhizobium*...) dont les colonies apparaissent après 48-72 h de culture, et bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*) pour lesquelles les colonies n'apparaissent qu'au bout de 7 jours de culture (Sy et al., 2001).

Dans l'étude de Chaïch et al., (2016) les colonies isolées développant sur le milieu gélosé YEM avaient un diamètre de 1 à 3 mm après 2 à 3 jours d'incubation, à l'exception de l'isolat Gs663 qui s'est développé très lentement (15 jours). Cinq isolats étaient muqueux, ce qui entraînait une croissance confluyente, alors que les autres ne l'étaient pas. Alors que l'étude de Mahdhi et al., (2007) a montré toutes les souches présentaient une croissance rapide.

La vitesse de croissance des isolats est en accord avec celle démontré par Ndiaye (2002) en étudiant les souches de *Rhizobium* nodulant l'espèce *Acacia raddiana*. (Dekak, 2018) et celles discutée par Wadhwa Z comprenait les rhizobia de référence à croissance rapide et modérée du genre *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*.

Les réactions enregistrées par les isolats sur ces différents milieux est semblables à celles avancées par Jordan (1984) et Beck et al. (1993). Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles

devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture.



**Figure 7 :** Aspect des colonies sur milieu YMA +BBT (acidification) .

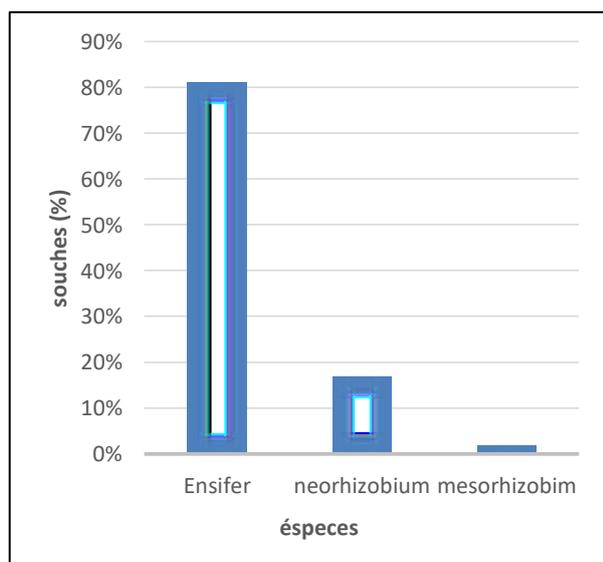
### 3. Caractérisation symbiotique (test de nodulation)

Dans l'étude de Mahdhi, et *al.* (2007) 28 isolats associés à *G.saharae* ont été apparue et analysées par une approche polyphasique incluant l'analyse phénotypique, génotype et phylogénétique. Parmi les 28 isolats, seuls quatre isolats, classés comme *Phyllobacterium* par des analyses de séquence génomique de l'ARNr 16S, n'ont pas réussi à noduler leur plante hôte d'origine. Les autres isolats formaient trois à six nodules par plante après 3 semaines. (Mahdhi et *al.*, 2007).

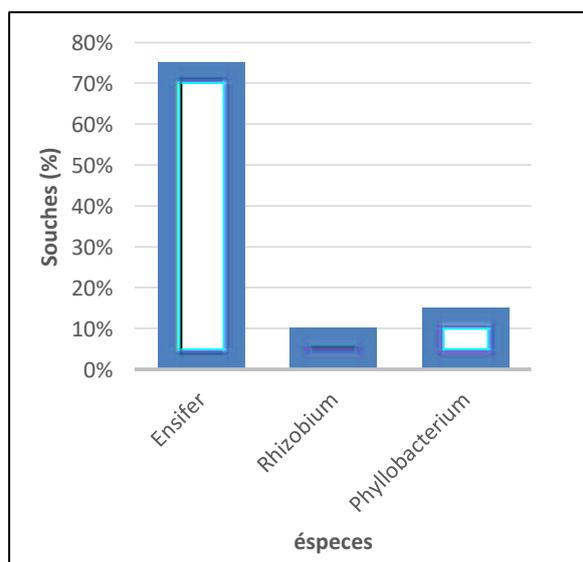
Chaïch et *al.* (2016) découvrait 57 souches rhizobiennes nodulant la plante *G.saharae* dans plusieurs sites de la région hyperaride de Metlili et Taibet. Elles nodulent toutes les espèces de *G.saharae* mais elles différaient par leur efficacité symbiotique.

**Tableau 3** : les différentes espèces nodulant la légumineuse *Genista saharae*.

Plante hôte	Genre et espèce bactérienne	Région d'étude	Source
<i>G.saharae</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b><i>Sinorhizobium</i> (81%) :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Ensifer meliloti</i></li> </ul> </li> <li>2. <b><i>Neorhizobium</i> (17%) :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Neorhizobium galegae</i></li> <li>➤ <i>Neorhizobium huautlense</i></li> <li>➤ <i>Neorhizobium alkalisoli</i></li> </ul> </li> <li>3. <b><i>Mesorhizobium</i> (1,75%) :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Mesorhizobium camelthorni</i></li> </ul> </li> </ol>	Région hyperaride en Algérie	Chaich et al. 20016
<i>G.saharae</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b><i>Ensifer</i> (75%) :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Ensifer meliloti</i></li> <li>➤ <i>Ensifer sp</i></li> </ul> </li> <li>2. <b><i>Rhizobium</i> (10%) :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Rhizobium sp</i></li> </ul> </li> <li>3. <b><i>Phyllobacterium</i> (15%) :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Phyllobacterium leguminum</i></li> </ul> </li> </ol>	Région infra-aride en Tunisie	Mahdhi et al. 2007



**Figure 8** : les bactéries nodulants *Genista saharae* (Chaiche, 2016)



**Figure 9** : les bactéries nodulants *Genista saharae* (Mahdhi,2016)

Selon les recherches de Chaïch et al. (2016), collectant des nodules de *G. saharae* dans des zones géographiquement éloignées de la région hyperaride d'Algérie. Chaque plante obtient trois à quatre nodules. Les nodules sont liés aux racines primaires et secondaires, et leur couleur rouge-brun indique que les isolats sont efficaces pour la liaison N<sub>2</sub>. Ils sont de forme sphérique, parfois allongés ou feuillus, et ont une surface lisse.

À partir de ces nodules de *G. saharae*, un total de 57 isolats de Rhizobium ont été obtenus. 5 isolats étaient du mucus, conduisant à une croissance par fusion, tandis que d'autres isolats ne l'étaient pas. Phénotypiquement, les nodules racinaires formés par tous les isolats de *G. saharae*, étaient morphologiquement similaires mais ils différaient par leur efficacité symbiotique. Les souches montrent également une diversité phénotypique dans les attributs symbiotiques. Selon les études de Chaïch et al. (2016), la caractérisation phylogénétique des isolats de *G. saharae* indique que ces nouvelles souches appartiennent au trois genre dont le premier (81%) appartenant au genre *Ensifer* (précédemment *Sinorhizobium*), représenté par l'espèce *Ensifer.meliloti*. Le second genre le plus diversifié *Neorhizobium* (17 %) avec 03 différents espèces : *N.alkalisoli*, *N.galegae* et *N.huautlense*. Le troisième genre est *Mesorhizobium* (1.75 %) représenté par l'espèce *M. camelthorni*.

Selon les recherches de Mahdhi et al. (2007), les rhizobia associés au *Genista saharae* poussaient dans la zone infra aride de la Tunisie (Nafta) appartient aux différents genres, dont l'*Ensifer* représente 75%, venais par la suite les *Rhizobium* qui représente 10% et les *Phyllobacterium* 15%. Les *Ensifer* et les *Rhizobium* ont pu noduler la plante *G. saharae* à l'inverse des *phyllobacterium* qui n'ont pas la capacité de former des nodules.

De nombreuses études ont montré la prédominance des symbiotes *Ensifer* dans les sols alcalins et /où aux conditions arides (Li et al., 2011 ; Tian et al., 2012 ; Bontemps et al., 2016).

d'après Stepkowski et al. (2018), les genres *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* (précédemment *Sinorhizbium*), et *Bradyrhizobium* ont un large spectre d'hôte en raison de leur capacité à noduler une large gamme de *Fabaceae spp.*

*Genista saharae* est infecté exclusivement par des genres de rhizobia à croissance rapide, en particulier les *Ensifer*. La prédominance des *Ensifer* en tant que symbiote peut être causée par des exigences spécifiques favorisant ce genre de rhizobium. Cela peut être lié à la haute teneur en sel et à l'habitat aride des légumineuses, ce qui peut favoriser les *Ensifer* par apport à d'autre genre de rhizobia.

Le non nodulation in vitro de *Genista saharae* par des souches de *phyllobacterium* isolées à l'origine de cet hôte peut indiquer que cette légumineuse n'est pas l'hôte naturelle de ces souches. Par ailleurs, ces souches peuvent également être considérées comme des bactéries commensales qui n'ont pas la capacité d'induire le développement de nodule sur n'importe quelle légumineuse.

Aucune souche de *Bradyrhizobium* n'a été retrouvée, ce qui est signalé par Mahdhi et Mars (2006) avec la bactérie nodulant la légumineuse *Retama* qui appartient à la tribu de *Geniteae* en Tunisie, ce résultat est en concordance avec les résultats de Zakhia et al. (2004) qui ont montré que les légumineuses appartiennent à attribut des *Genisteeae* qui poussent dans la zone infra-aride de la Tunisie peuvent être nodulé par les *Rhizobium* et les *Sinorhizobium*.

Cette biodiversité des rhizobia nodulant la plante *G.saharae* est peut être en relation avec les conditions climaterique et édaphiques des régions hyperarides et infra-arides (Algérie, tunisie). L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobia-legumineuse est leur spécificité d'hôte .en effet, une espèce de Rhizobia n'est capable, en générale, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux .De même, une espèce de légumineuse ne peut être nodulé que par un certain nombre d'espèces bactériennes. ( Tilak et al.,2005)

#### **4. caractérisation phénotypique**

##### **4.1. Effet des facteurs abiotiques**

###### **4.1.1. Résistance à la température et tolérance à la salinité**

Chaïch (2016) a testé la croissance des différents isolats rhizobiens associés à *Genista saharae* à différentes températures et concentrations de NaCl.

**Tableau 4:** conditions de croissance (température et salinité) des espèces isolées à partir de *G. saharae* et des souches de référence (Chaich et *al.*, 2016)

Isolats	40°C	42°C	45°C	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl	4%NaCl
Gs111	-	-	-	+	+	+	+
Gs663	+	+	-	+	+	+	+
Gs666	+	-	-	+	+	+	+
Gs668	+	+	-	+	+	+	+
Gs675	+	+	-	+	-	-	-
Gs6514							
Gs6515	+	+	ND	+	+	+	-
Gs6521	+	+	+	+	+	+	-
Gs6522	+	+	+	+	+	+	+
Gs6721	+	-	-	-	-	-	-
<i>E.gramaticus</i> ORS1400 <sup>T</sup>	+	+	-	+	+	+	-
<i>E.meliloti</i> LMG6133 <sup>T</sup>	+	+	ND	+	-	-	-
<i>Rhizobium elti</i> CFN42 <sup>T</sup>	-	-	-	+	-	-	-

+ : positive ; - : negative ; ND not determined

D'après Chaich (2016) les souches testées ont montré une certaine résistance, elles continuent à pousser jusqu'à 40°C, certaines jusqu'à 42°C et même jusqu'à 45°C, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Torche et *al.* (2010) ; Simon et *al.* (2014). La plupart des isolats ainsi que la souche *R. etli* CFN42<sup>T</sup> étaient sensibles à une température élevée 45°C.

Toutes les souches tolèrent 1% de NaCl pour leur croissance, sauf pour l'isolat *Ensifer sp* Gs6721. L'isolat Gs675 de *Neorhizobium sp* ne s'est pas développé à 2% de NaCl, alors que les autres souches étaient tolérantes jusqu'à 4% de NaCl sauf les deux souches d'*Ensifer* (Gs6515 et Gs6521). Les souches types *Ensifer meliloti* et *Rhizobium elti* ont montré une tolérance au sel inférieure à celle de la plupart des isolats. Tandis que Yanci a trouvé que les *Ensifers* et plus particulièrement celles appartenant à l'espèce *meliloti* sont les plus tolérants à la salinité que l'on trouve souvent chez les bactéries halophile

Ces résultats ont été en accord avec Graham et Pearker (1964) ainsi que Thami-Alami et *al.* (2010) qui ont montré que les rhizobia à croissance rapide tolèrent la salinité plus que les rhizobia à croissance lente.

D'après Mahdhi et *al.* (2007) la majorité des isolats sont capables à pousser à une température comprise entre 28°C et 40°C mais pas à 45°C, quatre isolats ont été capables

à croître à une température de 15°C (Graham, 1992). La plupart des isolats testés ont été tolérante à des concentrations de NaCl de 1 à 3%, et une seule souche a été capable de se développer à une concentration de 4% de NaCl.

Les résultats de Chaich (2016) et Mahdhi (2007) sont en accord avec ceux de Zahran (1999) qui a rapporté que la température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce.

Probablement cette adaptation spécifique aux températures élevées et à la salinité est une caractérisation des espèces des régions arides. (Karanja et Wood, 1988), ce qui est prouvé par Miller et Wood (1996) qui ont rapporté que les rhizobiums sont des bactéries sensibles à la salinité pendant le processus de la symbiose mais, elles peuvent tolérer des concentrations élevées en raison de leur mécanisme d'adaptation qui leur rendent capables de surmonter ces contraintes. Cette adaptation à la température et cette tolérance au sel a été documentée et confirmée par de nombreuses études réalisées dans des régions similaires (Amrani *et al.*, 2010 ; Barrada *et al.*, 2012 ; Karanja et Wood, 1988 ; Rejili *et al.*, 2012 ; Sharma *et al.*, 2013 et Zahran, 1999).

#### **4.1.2. Croissance à différents pH**

Les résultats de Mahdhi *et al.* (2007) ont montré que la majorité des souches ont été capable à pousser à des pH compris entre 6 et 12, aucune n'a été développer à Ph égale à 4. Ce qui est discuté par Graham (1992), montrant que les rhizobia à croissance rapide semblent plus sensibles à l'acidité que les rhizobia à croissance lente.

D'après Bessadouk *et al.* (2021), la tolérance au pH élevé était importante pour la survie des rhizobia des régions arides, ce qui est en faveur par les travaux d'El-Hilali (2006), qui affirme que l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums et la majorité des souches peuvent tolérer jusqu'au pH 9 et ce qui est en concordance avec les résultats de Mahdhi *et al.* (2007) où les rhizobia peuvent tolérer jusqu'au pH 12.

### **4.2. Paramètres nutritionnels**

#### **4.2.1. Assimilation des sucres et des acides aminés**

Selon Mahdhi *et al.* (2007), tous les isolats ont été capables d'utiliser une large gamme de source de carbone (glucose, galactose, fructose, et saccharose). Howieson et Mclenne (2001) ont signalé que la plupart des légumineuses de la région méditerranéenne semblent être nodulées par des bactéries à croissance rapide ces résultats sont en accord avec Castro et

*al.*,2000 ; Safronova VI et *al.*,2004), les rhizobia à croissance rapides étaient considéré comme des bactéries acidifiantes, alors que les rhizobia à croissance lentes étaient plus limitées dans leur capacité à utiliser divers sources de carbone.

La diversité des hydrates de carbone que les rhizobiums peuvent utiliser s'explique par le fait que ces microorganismes se développent principalement dans des sols arides et semi-arides, nécessitant la capacité d'utiliser efficacement une large gamme de glucides pour répondre à leurs besoins nutritionnels (Le Quéré et *al.*, 2017).

Selon Mahdhi et *al.* (2007), tous les isolats ont été capables d'utiliser une large gamme de source d'azotes (L-arginine, L-proline, L-lusine, L-therosine)

Les résultats de test nutritionnel sont les mêmes résultats qui ont été rapportés par Malek et Sajnaga (1999) pour les bactéries appartenant aux *Rhizobium*, *Sinorhisobium*, et *Mesorhizobium*.

#### **4.3. Sensibilité et résistance aux antibiotiques**

La sensibilité ou la résistance des rhizobia aux différents antibiotiques est utilisé comme moyen d'identification et de comparaison entre les différentes souches identifiées. La plupart des isolats sont résistant à 100 µl/ml d'ampicilline et streptomycine mais pas à la kanamycine à exception de 07 isolats. Ce qui est prouvé par les travaux de Batzli et *al.*(1992) qui présentent des souches avec une faible tolérance à la kanamycine. Contrairement aux résultats obtenus par Maatallah et *al.*((2002) qui ont montré que les souches de rhizobia sont résistantes à la kanamycine. La majorité des isolats 21 étaient résistant à 100mg/ml d'acide nalidixique.

Cette différence de résistance vis à vis des antibiotiques probablement dues à la plus grande aptitude des souches à survivre, principalement dans les sites arides ou la sécheresse et le pH alcalin favorisent la croissance de bactéries productrices d'antibiotiques.(Cacciari et *al.*, 2003). Contrairement aux études de Mahdi et *al.* (2007) ; Jordan (1984) et Madrzak et *al.*(1995) ont rapporté que les souches à croissance rapide sont plus sensibles aux antibiotiques que les rhizobiums à croissance lente cela peut indiquer que la tolérance aux antibiotiques est moins corrélée à leur taux de croissance qu'aux espèces bactériennes (Rejili et *al.*, 2012).

# Conclusion

---

## Conclusion

La symbiose rhizobium-légumineuse est une source importante d'azote fixé sous forme d'ammoniac dans la biosphère. Elle est par conséquent un mécanisme alternatif utilisé pour réduire l'application d'engrais azoté chimique coûteux en production agricole. Les rhizobium ayant la capacité à noduler la légumineuse, peut être utilisée en toute sécurité dans les pratiques agricoles pour augmenter la productivité des plantes.

Il est bien connu que les facteurs environnementaux tels que la salinité, la sécheresse, l'acidité, l'alcalinité compromettent la survie, la croissance et la capacité à fixer l'azote des Rhizobia (Zahran et al., 1994). *Genista* est un genre cosmopolite représenté par diverses espèces adaptées aux conditions environnementales extrêmes (Chaïch et al., 2016) et ces études ont montré que les rhizobia qui lui sont associés sont généralement plus résistants aux facteurs environnementaux que ceux associés à d'autres légumineuses.

Cette étude basée sur les travaux de Mahdhi et al.(2007) ; Chaïch et al. (2016), à pour but de caractériser et identifier les bactéries nodulant la légumineuse *G. saharae*. Ces bactéries symbiotiques de *G.saharae* poussant dans une zone aride de Tunisie ont été décrites Zakhia et al.,2004 ; Mahdhi et al.2007 et hyperaride d'Algérie Chaïch et al.( 2016).

L'étude morphochimique montrait que les isolats sont des rhizobia gram négative, asporulées de forme de bâtonnet à croissance rapide appartient aux genres *Rhizobium*, *Ensifer* (anciennement appelé *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Neorhizobium* et *Phyllobacterium* (Zakhia et al., 2004 ; Mahdhi et al.,2007 ; Chaïch et al., 2016).

Les *Phyllobacterium* signalait dans l'étude de Mahdhi et al.( 2007) ont été considéré comme des bactéries commensales qui n'avait pas la capacité de former des nodules *in vitro*.

Comme les souches isolées appartient aux régions semi-aride en Tunisie et hyperaride en Algérie cela, leurs permettre de s'adapter et de se développer dans des températures élevées et à des différentes concentrations de NaCl, de même de se développer à un pH alcalin compris entre 6 et 12.

En ce qui concerne les paramètres nutritionnels, les résultats de Mahdhi et al. (2007) montraient que les souches isolées utilisaient une large gamme des sucres comme source de carbone et des acides aminés comme source d'azote.

De tout ce qui précède ; il est intéressant de poursuivre cette étude par l'étude moléculaire de génomes entier ou des gènes particulier .notamment ceux responsable de la nodulation ,serait sans doute utiles dans la compréhension de l'établissement de la symbiose rhizobiennes avec précision des espèces et leurs capacité de se développer dans les conditions abiotique extrêmes , qui caractérisent les régions arides et semi arides dans le but de produire des biofertilisants efficaces et fournir les meilleurs inoculant pour améliorer la croissance et la fixation d'azote.

# **Références Bibliographique**

## A

❖ Amrani S, Noureddine NE, Bhatnagar T, Argandoña M, Nieto JJ, Vargas C (2010) Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Syst Appl Microbiol* 33:44–51. doi:10.1016/j.syapm.2009.09.003

## B

- ❖ Berek S.2021. Etude phytochimique et biologique d'extraits de deux plantes médicinales *Genista sahara* et *Glycyrrhiza glabra*. These de doctorat, Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen .
- ❖ Batzly J.M., Graves W.R., Vanberkum P., Diversity among Rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L, *Appl environ microbial*, 58 (7) (1992) 2137-2143.
- ❖ Benahmed Amira., 2010. -Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium*.Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine.Algérie. 128p
- ❖ Berrada H et Fikri – Benbrahim K., 2014 :Taxonomy of the Rhizobia : Current Perspectives . *British Microbiology Research Journal*, u (6): 616 – 639
- ❖ Berrada H., Nouioui I., Iraqui houssaini M, El Ghachtouli N., Gtari M., Fikri Benbrahim K.(2012).Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(25), pp. 5314-5324.
- ❖ Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, Cleyet- Marel JC (2000) Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can J Microbiol* 46:229–236. doi:10.1139/ cjm-46-3-229
- ❖ Boukhatem Z.F.,Diversité taxonomique et symbiotique des rhizobia associé associés aux *Acacia* sp. d'Algérie. Theses de doctorat en microbiologie, université d'Oran.
- ❖ Brewin N.J, 1991 - Development of the legume root nodule. *Annual. Rev. Cell. Biol.* 7:191-226.

## C

- ❖ Chaïch K., Bekki A., Bouras N., Holtz M.D., Soussou S., Mauré L., Brunel B., de Lajudie P., Cleyet-Marel, Jean-Claude (2017). Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis*, 71(2), 111–120. doi:10.1007/s13199-016-0414-y
- ❖ Chaïch K., et Maure L. (2020). Trapping and isolation of Rhizobia from the Rhizosphere of several spontaneous Fabaceae species in the Algerian Northern Saharae.95-96p
- ❖ Chehma A (2006). Catalogue des plantes spontanées de Sahara septentrional algérien. Dar Elhouda Ain M'lila, 84 p.
- ❖ Chen, W.-M.; Zhu, W.-F.; Bontemps, C.; Young, J. P. W.; Wei, G.-H. (2011). *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 61(3), 574–579. doi:10.1099/ijs.0.022947-0

## D

- ❖ Dekak Ahmed, 2018. Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces spontanées de la tribu de Ginesteae (fabaceae). Thèse de Doctorat en Science. Biotechnologies végétale. Université des frères Mentouri Constantine1.
- ❖ Dénarié J, Debellé F., Promé J.C, 1996 - Rhizobium lipochitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Ann Rev Biochem. 65: 503-535.

## E

- ❖ Emile Duhoux., Michel Nicole., 2004. -Biologie végétale : association et interactions chez les plantes. Atlas.p4-6.

## F

- ❖ Frank,b.1889.Ueber die Pilzsymbiose der leguminosen . Birechte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 7: 332-346
- ❖ Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C. et Bisseling T, 1992 - Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Molec. Biol. 19:89-107.

## 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
- ❖ Gauri, Singh A.K., Bhatt R.P., Pant S., Bedi M.K., Naglot A.2011. Characterization of Rhizobium isolated from root nodules of Trifolium alexandrium.int.j.a.t.7(6) : 1705-1723.
- ❖ Graham P.H. and Vance C.P. (2003).Legumes : importance and constraints to greater use. PlantPhysiol (131) 872-877.
- ❖ Gresshoff P.M, 2003 - Post-genomic insights into plant nodulation symbioses. Genome boil 4 (1):201.
- ❖ Geurts R. et Franssen H, 1996 - Signal transduction in Rhizobium induced nodule formation. Plant Physiol. 112:447-453.
- ❖ Gualtieri G. et Bisseling T, 2000 - The evolution of nodulation. Plant Molecular Biology. 42:181-194.

## J

- ❖ Jordan,D.C.,1982.Transfer of Rhizobium japonicum Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium gen.nov.*, a Genus of Slow Growing ,Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants .international Journal of Systematic Bacteriology 136-139

## K

- ❖ Kalita M, Małek W (2004). Phenotypic and Genomic Characteristics of Rhizobia Isolated From Genista tinctoria Root Nodules. ,Syst Appl Microbiol 27(6), 707–715. doi:10.1078/0723202042369965

## L

- ❖ Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C. et Denarié J, 1990 - Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 344: 781-784.
- ❖ Lograda, Takia, et al. Chemical Composition and antimicrobial Activity of Essential Oils of *Genista ulicina* and *G. vepres*. *Natural Product Communications*, 2010 : 04 (835-838)
- ❖ Losick et Kaiser, 1997 - Why and how bacteria communicate. *Sci. Am.* 276: 68-73.

## M

- ❖ Maatallah J., Berraho E.B., Munoz S., Sanjuan J. Liuch C., phenotypic characterisation of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L) groxwingin Moroccan soils, *Agronomie*, 22 (2002) 321-329 .
- ❖ Mahdhi M, Nzoué A, Gueye F, Merabet C, de Lajudie P, Mars M (2007) Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae* microsymbionts from the infra-arid region of Tunisia. *Lett Appl Microbiol* 45:604–609. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02233.x
- ❖ Mateos P.F., Baker D.L., Petersen N., Velezquez E., Jimenez-Zurdo J.I., Martinez-Malina E., Squartini A., Orgambide G., Hubbell D.H. et Dazzo F.B, 2001 - Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharides degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can.J. Microbiol.* 47: 475-487
- ❖ Menendez E,P Martinez Hidalgo,L R Silva ,E Velazquez,P F Mateos et A Peix (2017).Recent Advances in the active biomolecules involved in *Rhizobia* –legum symbiosis .pp: 45-74.
- ❖ Meriane D. 2018. Etude biologique et phytochimique de *Calobota saharae* (Coss.& Dur.) Boatwr. & B.E. van Wyk, these de doctorat en science, université Ferhat Abbas Sétif 1
- ❖ Montiel J,C Foneca-Garcia et C Quinto (2018) .Phylogeny and expression of NADPH oxidas during symbiotis nodul formation .*Agricultur* ,8: 179

## N

- ❖ Nedjraoui D (2001). Country Pasture/Forage Ressource Profiles : Algeria

## O

- ❖ Oldroyd G, 2001 - Dissecting symbiosis: Developments in Nod Factor signal transduction. *Ann Bot.* 87:709-718.
- ❖ Oke V. et Long S.R, 1999 – Bacteroid formation in the *Rhizobium*legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 641-651.
- ❖ Ozenda P. (1991). *Flore et Végétation du Sahara*. 3ème édition mise à jour et augmentée, Ed C.N.R.S., Paris, 282,288 p.

## P

- ❖ Parniske M, 2000 - Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease. *Curr.Opin. Plant. Biol.* 3: 320-328
- ❖ Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004. -Microbiologie. Edition Dunod, Paris.

## Q

- ❖ Quezel P. et Santa S., (1962). Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1 vol.462-463 p.

## R

- ❖ Rao,D.L.N.,S..R.Mohanty,C.Acharya et N.Atolya (2018).Rhizobial Taxonomy –Current Statut .IUNFC Newsletter,3: 1-4
- ❖ Roychowdhury, D., Paul, M. and Banerjee, S.K. 2015. Isolation identification and characterization of bacteria (Rhizobium) from chick pea (*Cicer arietinum*) and production of biofertilizer. *Eur JBiotech Biosci.*3(12), 26-29.

## S

- ❖ Simon Z., Mtei K., Gessesse A., Ndakidem P.A.2014.Isolation and characterization of Nitrgen Fixing Rhizbia from cultivated and Uncultivated Soils of Northern Tanzania. *American Journal of Plant Sciences.*5 : 4050-4067.
- ❖ Somasegaran P. et Hoben H. J. 1994. Handbook for Rhizobia : Methods in legume-Rhizobia technology, Springer, New York.

## T

- ❖ Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli R., Benhizia H., Khelifi D., Squartini A., 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *hedysarum* : *H. pallidum* desf. *H.spinosissimum* subsp. *Capitatum*, *H. carnosum* desf. Et *H. naudinianum* coss. *Sciences & Technologie.* 32:43-50.

## V

- ❖ Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBPhandbook no. 15. Blakwell Scientific publications Ltd. Oxford, United Kingdom.164p.

## W

- ❖ Werner D., 1992 : Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.
- ❖ Wrang,Q,J Liu , H Tan et L Zhu. 2018.Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legum –Rhizobium Interaction .*Front .Plant Sci.*,9(313): 1-8
- ❖ Wood S.M. et Newcomb W, 1989 - Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Botany.* 67: 3108-3122.

## Z

- ❖ Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M et al (2004) Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* 27: 380–395. doi:10.1078/0723-2020-00273
- ❖ Zeenat Wadhwa<sup>1</sup>, Vivek Srivastava<sup>2</sup>, Raj Rani<sup>1</sup>, Tanvi<sup>1</sup>, Kanchan Makkar<sup>1</sup> and Sumit Jangra<sup>3</sup> Isolation and Characterization of Rhizobium from Chickpea (*Cicer arietinum*) DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.340>(<http://www.damolin.dk>),

# **Annexes**

## Annexe1

Tableau :Taxonomie des Rhizobia (Rao et al, 2018)

Souche de rhizobium	plante hôte
<b>Classe <math>\alpha</math> Proteobacteria</b>	
<b>I-Ordre Rhizobiales</b>	
<b>II. Famille Rhizobiaceae</b>	
Genre Rhizobium (98)	<i>Lotus, Phaseolus, Astragalus, Sesbania, Medicago, Mimosa, Indigofera, Hedysarum, Populus, Vicia, Lespedeza, Oryza, Albizzia, Kummerowia, Dalbergia, Caragana, Trigonella, Spharophysa, Oxytropis, Mung, Bean, Vigna, Rosa, Leucaena, Dalea, Clitoria, Siratro, Cowpea, Lemna, Calliandra, Pongamia, Arachis, Pueraria</i>
Genre Ensifer (anciennent sinorhizobium) (18)	<i>Glycin, Sesbania, Acasia, Medicago, Prosopis, Kummerowia, Leucaena, Abrus, lotus, Argyrolobium, Psoralea.</i>
Genre Allorhizobium (1)	<i>Neptunia</i>
Genre Shinella (1)	<i>Kummerowia</i>
Genre Pararhizobium (1)	<i>Tumeur des fruits (non symbiotique)</i>
<b>II. Famille Phylobacteriaceae</b>	
Genre Mezorhizobium (40)	<i>Lotus, Astragalus, Leucaena, Sesbania, Amprpha, Prosopis, Albizzia, Biserul, Caragana, Anthyllis, Robinia, Alhagi, Anagyris, Acacia, Sophora.</i>
Genre Phylobacterium (8)	<i>Lathyrus, Argyrolobium, Astragalus, Brassica, Phaseolus, Lotus, Sophora</i>
Genre Aminobacter (1)	<i>Anthyllis</i>
<b>II. Famille Bradyrhizobiaceae</b>	
Genre Bradyrhizobium (36)	<i>Glycine, Vigna, Lespedeza, Beta, Entada, Bachyrhizus, Lablab, Arachis, Cytisus, Retama, Aeshynomene, Acacia, Inga, Lupin, Phaseolus, Cowpea, Centrolobium, Erythrophleum, Neonotonia, Desmodium, Lupinus.</i>
Genre Blastobacter (1)	<i>Aeschynomene</i>

Genre photorhizobium (1)	<i>Aeschynomene</i>
<b>IV. Famille Hyphomicrobiaceae</b>	
Genre Devocia (1)	<i>Neptunia</i>
Genre Azorhizobium (3)	<i>Sesbania</i>
<b>V. Famille Methylobacteriaceae</b>	
Genre Methylobacterium (3)	<i>Crotalaria, Trifokium Phyllosphere</i>
Genre Microvirga (4)	<i>Lupinus, Listia, Cowpea</i>
<b>V-Famille Brucellaceae</b>	
Genre Ochrobacterium (2)	<i>Lupinus, Cytisi</i>
<b>II-Ordre Burkholderiales</b>	
<b>Famille Burkholderiales</b>	
Genre Burkholderia (17)	<i>Dalbergia, Machaerium, Mimosa, Lebeckia, Aspal athus, Papilionoid legumes</i>
Genre Cupriavidus (ancien Ralstonia) (2)	<i>Mimosa, Phaselous, Leucaena</i>





**Annexe 3****Composition du milieu YMB ( Vincent, 1970)**

Mannitol.....	10mg
Extrait de levure.....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
Na Cl.....	0,1g
Eau distillée.....	1000ml
pH ajusté à 6,8	

**Composition du milieu YMA (Vincent, 1970)**

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
Na Cl.....	0,1g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....6,8	

**Composition de milieu YMA + Rouge Congo (Vincent, 1970)**

YMA.....	1000 ml
Solution stock de rouge Congo.....	10 ml
pH.....6,8	
Autoclavage.....120°C pendant 20 min	

**Composition de milieu YEM agar (Vincent, 1970)**

Yeast extract .....	0 4 g/l
Solution minérale de Bergensen 10M.....	100ml
Mannitol.....	10g
Agar agar.....	15g
Ajuster à 1L, Ph : 6,8	

**Solution minérale de Bergensen (concentrée 10 fois)**

KCl.....	1g
FeCl (liquide).....	0,2ml
Ca Cl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O.....	0,53g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O.....	4,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	1g

**Composition de la solution nutritive en g/l (Fähreus, 1957)**

Ca Cl <sub>2</sub> .....	0,10
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O.....	0,15
Citrate de fer.....	0.005
Micro éléments.....	1 ml

**Solution micro éléments g/l :**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,86
MnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O.....	2,03
ZnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O.....	0,22
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O.....	0,08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O.....	0.14
pH.....	6,8
Autoclavage.....	120°C pendant 20 min

# Résumés

## المخلص:

ركزت معظم الدراسات على التعرف و تحديد البكتيريا التي تعمل على تشكيل عقد على مستوى جذور البقوليات بغرض تحسين مردوريتها ، في حين أجريت القليل من الدراسات على هاته البكتيريا المثبتة لنتروجين الغلاف الجوي و المتعلقة بنبتة *Génista saharae* خاصة المتواجدة بشمال أفريقيا.

هذه الدراسة تهدف الى تحديد الخصائص المظهرية للبكتيريا الموجودة بالعقد الجذرية و المتعايشة مع نبتة *Génista Saharae* المتواجدة في المناطق الجافة لكل من الجزائر و تونس من خلال الاختبارات الفيزيولوجية ( درجة الحموضة ، تركيز ملح NaCl ، الحرارة ) ، تجارب غذائية متمثلة في مدى استعمال البكتيريا للسكريات و الأحماض الامينية و كذا تحديد المظهر البيوكيميائي من خلال دراسة مدى مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية.

## Abstract

Most studies of rhizobia have focused on identification and systematics of symbionts nodulating crop legumes because of their interest in improving yield. However, few studies investigated the endosymbiotic nitrogen-fixing bacteria nodulating, in particular in North Africa.

This study aims to characterize phenotypically the endosymbiotic bacteria isolated from root-nodules of spontaneous shrub legume *Génista saharae* growing in arid and infra-arid regions of Algeria and Tunisia ,respectively. Phenotypic characterization was performed using physiological tests (different pH levels, NaCl concentrations, and tolerance to temperature), nutritional experiments (assimilation of different carbohydrates and amino acids) and biochemical profiling (antibiotic resistance).

## Resumé

La plupart des études sur les rhizobiums se sont concentrées sur l'identification et la systématique des symbiotes qui nodulent les légumineuses des cultures en raison de leur intérêt à améliorer le rendement. Cependant, peu d'études ont étudié les bactéries fixatrices d'azote atmosphériques qui nodulent l'espèce de légumineuse spontanée *Genista saharae*, en particulier en Afrique du Nord.

Cette étude vise à caractériser phénotypiquement les bactéries symbiotiques isolées des nodosités des racines des légumineuses spontanées *Genista saharae* qui pousse dans les régions hyper-arides et infra-arides du sud-est de l'Algérie ainsi que la Tunisie. La caractérisation phénotypique a été réalisée à l'aide de tests physiologiques (pH, différentes concentrations de NaCl et tolérance à la température), d'expériences nutritionnelles (assimilation de différents glucides et acides aminés) et de profil biochimique (résistance aux antibiotiques),