



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 : Biochimie applicable

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**AGGOUN Sara BENSEHEL Ghania**

Le : 19 juin 2022

## Thème

***Bradyrhizobium algerienses* sp.nov, une nouvelle espèce isolée à partir des nodules d'une légumineuse *Retama sphaerocarpa* (étude de cas le nord d'Algérie)**

---

### Jury :

Mr. BOUGUENOUN Wided	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. DJOUAMA Manel	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. BOUSIF Asma	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



## Remerciements

Avant tout nous remercions DIEU(Allah) tout puissant de nous avoir donné le courage,  
la volonté et la patience pour terminer ce travail.

Ensuite nous adressons remercier à notre enseignante Mme. DOUAMAA Manel d'avoir  
bien voulu diriger ce travail et pour tout ses conseils fructueux et ses encouragements.

Nous remercions également à l'ensemble des membres de jury.

Au terme de ce travail, nous avons agréablement remercié toutes les personnes qui ont  
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## **Dédicaces**

Avec tout respect et amour je dédie ce modeste travail.

À mes chers parents.

Qui m'ont soutenue et encouragée durant ces années d'étude et pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance.

À mes chers frères Adel et Nasro et ma très chère sœur samsouma pour tout leur soutien moral et leur amour et affection.

À ma chère cousine Dr. Sihem Aggoun.

J'aimerais simplement dire qu'elle m'a beaucoup donné, bien loin au-delà de ce que je pouvais attendre.

Qu'elle en soit infiniment remerciée !

À mes chères enseignantes Bouhitem Saida, Rahmani Rachida et Djedou Khadidja pour l'encouragement permanent et le support technique donné de la force pour persévérer et continuer toujours vers l'avant.

À Ztaitou Fatima Zahra et Negrichi Mabrouka qui m'a soutenue et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus, je t'aime beaucoup mes chères.

À tous mes proches de la famille Aggoun et Barkat.

À ma chère binôme ben Sehel Ghania et à toute sa famille.

À mon amie Salah Adjroud Je vous remercie pour m'avoir aidé et sans ces guidé tout au long de ce travail avec rigueur et optimisme.

À Imen, Chahinez, Fatima Zahra, Rima, Malek pour tout leur soutien moral et leur amour et affection, et particulièrement Fahima pour me motiver à avoir autant de succès et de réussite.

À mes amies Ahlem, Missou, Nesrine, Maroua, Basma, Amani, Lilya, Sara, Faten, Manar, Chahinez, Lamisse, Mounira.

À ma proche amie Majed et Akrem.

Aggoun Sara

## Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents qui ont fait beaucoup de sacrifices et continuent d'en faire pour me voir réussir, qui ont veillé à mon instruction et qui m'ont soutenu durant toutes ces années.

Mes très chers frères.

Ma tendre sœur : Roukia.

Mes belles sœurs : Insaf graine.

A mes collègues de Biochimie Appliquée promotion 2022.

A mon binôme : Agoun sara.

Et mon meilleur ami : Bouteraa sara.

Ghania.Benshel

## Table des matières

Remerciements .....	
Dédicaces .....	
Liste des tableaux .....	
Liste des figures .....	
Liste des abréviations.....	
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>

### Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1.L'azote : .....	3
1.1.Le cycle de l'azote : .....	3
1.1.2.La fixation biologique de l'azote : .....	4
2-La symbiose <i>rhizobiums</i> -légumineuses : .....	6
2-1-Le macrosymbiote : légumineuses .....	7
2-1-1-Généralités : .....	7
2-1-2- Classification : .....	7
2-1-3- Importance : .....	7
3-la symbiose <i>Retama sphaerocarpa-Bradyrhizobium</i> : .....	7
3-1-Le genre <i>Retama</i> : .....	7
3-1-1- <i>Retama sphaerocarpa</i> : .....	8
3-1-2-Systématique de <i>Retama sphaerocarpa</i> : .....	8
3-1-3- Distribution géographique de <i>Retama sphaerocarpa</i> : .....	9
3-2- Le microsymbiote : <i>rhizobium</i> .....	10
3-2-1- Généralité : .....	10
3-2-2- Genre <i>Bradyrhizobium</i> : .....	11
3-2-3- Classification : .....	11
4-Le processus de nodulation : .....	11
4-1- l'infection et la formation des nodules : .....	12

### Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1-Matériel biologique : .....	14
2. Méthodes : .....	14
2.1. Caractérisation phénotypique : .....	14

---

2.1.1. Test de nodulation.....	14
2.1.2. Caractérisation physiologique :.....	16
2.1.2.1.Effet de température.....	16
2.1.2.2.Effet de pH.....	16
2.1.2.3.Effet de NaCl .....	17
2.1.3. Caractérisation nutritionnelle :.....	17
2.1.3.1.Assimilation de la source de carbone: .....	17
2.1.3.2.Assimilation de la source d'azote : .....	17
2.1.4. Sensibilité et résistance aux antibiotiques : .....	18
<b>Chapitre 3 : Résultats et Discussions</b>	
1.Caractérisation phénotypique : .....	20
1.1.Résultats de test de nodulation : .....	20
1.1.1.Les résultats d'Ahnia (2018):.....	20
1.1.2.Les résultats de Chaïch (2017) :.....	21
1.1.3.Le résultat de Mahdhi et al. (2007) :.....	23
1.1.4.Resultats de Stępkowski (2018) :.....	25
1.2.Caractérisation physiologique :.....	25
1.2.1. Effet de la température :.....	25
1.2.2.Effet du pH.....	27
1.2.3. Effet du NaCl .....	28
1.3. Caractérisation nutritionnelle : .....	30
1.3.1. Assimilation de la source de carbone.....	30
1.3.2. Assimilation de source d'azote .....	32
1.4.Sensibilité et résistance aux antibiotiques : .....	34
<b>Conclusion.....</b>	<b>40</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>53</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>41</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>36</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>36</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Différents antibiotiques testés (Ahnia et al., 2018). .....	18
Tableau 2. La nodulation de <i>Genistasaharae</i> inoculée par les souches représentative et la souche type de référence <i>E.garamanticus</i> . (Chaïch, et al. 2018). .....	21
Tableau 3. La nodulation de <i>Genistasaharae</i> par différentes souches. (Mahdhi, et al. 2007)..	23
Tableau 4. Assimilation des différents substrats carbonés par les souches de <i>Retama</i> ainsi que les souches de référence. ....	31
Tableau 5. Assimilation des différentes sources d'azote par les souches de <i>Retama</i> ainsi que les souches de référence. Souches 1 2 3 4 5. ....	33
Tableau 6. Sensibilité et résistance aux antibiotiques par les souches de <i>Retama</i> ainsi que les souches de référence. ....	35
Tableau 7. Isolats et souches de référence utilisés dans cette étude des antibiotiques (Mahdhi, 2007). ....	37



## Liste des figures

Figure 1. Cycle de l'azote (Pujic P., 2009).....	3
Figure 2. La nitrogénase (Yann, 2006).....	5
Figure 3.Représentation schématique de la symbiose (Sebihi, 2008).....	6
Figure 4. Plante de <i>Retama sphaerocarpa</i> (Quézel, 1962).....	9
Figure 5.Répartition géographique du genre <i>Retama</i> dans le bassin Méditerranéen (Benmiloud-Mahieddine, 2013) .....	9
Figure 6.Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S, 15 genres $\alpha$ -protéobactéries - 05 genres $\beta$ -protéobactéries et 02 genres $\gamma$ -protéobactéries. Les genres engras contiennent les rhizobiums nodulants les légumineuses (Masson-Boivin et al., 2009).....	10
Figure 7.Etapes du processus de nodulation lors de la symbiose Légumineuses-Rhizobium(OULED AMRANE Saadia, 2012).....	12
Figure 8.Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé (Patriarca et al., 2004).....	13
Figure 9.Test de nodulation sur la plante hôte <i>Retama sphaerocarpa</i> . (Ahnia, 2018).....	15
Figure 10.Teste de nodulation avec différentes plantes légumineuses. (Ahnia,Boulila et al 2014) .....	20
Figure 11.Effet de la température sur la croissance des souches de <i>Retama</i> . (Ahnia, 2018) .....	26
Figure 12.Effet du pH sur la croissance des souches de <i>Retama</i> . (Ahnia, 2018).....	27
Figure 13. Effet du NaCl sur la croissance des souches de <i>Retama</i> . (Ahnia, 2018).....	29

## Liste des abréviations

**BNL** : Bactéries nodulant les lég

**NaCl** : Chlorure de sodium

**ADNr 16S** : ADN ribosomique

**Nod** : Le gène de nodulation

**ADNr** : Acide DéoxyriboNucléique ribosomique

**ARN** : Acide Ribo Nucléique

**mM** : MilliMolar

**NH<sub>3</sub>** : Ammoniac

**Nod / nod** : Nodulation

**sp** : Species (single)

**USDA** : United States Drugs and Agricultural Office

**YMB** : Yeast mannitol broth

**YMA** : Yeast mannitol agar

# **Introduction**

---

## Introduction

La famille des Légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales (Saoudi. M, 2008).

Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées *rhizobiums*. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie. C'est donc une véritable symbiose avec un échange bénéfique pour les 2 partenaires (Giraud, E., 2007)

Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) comprenant notamment les espèces du genre *Rhizobium* sont des bactéries du sol, à Gram négatif, qui ont une signification scientifique et agronomique profonde due à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, relation d'importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol (Saoudi.M , 2008).

Les légumineuses arbustives du genre *Retama* appartiennent à la tribu des *Genisteeae* indigènes du bassin méditerranéen (Algérie, Maroc, Tunisie, Espagne, etc.). Le pouvoir symbiotique des *rhizobia* associés à *Retama* adapté aux conditions arides dans le bassin méditerranéen est efficace pour reconstituer la biodiversité caractéristique ainsi que les propriétés physiques et biologiques des sols (Ahnia, 2018).

La tribu des *Genisteeae* (Adens.) Benth., est essentiellement méditerranéenne (Polhill, 1976). Elle possède une grande importance écologique, non seulement pour la grande diversité des espèces, mais aussi par la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées et de dominer de nombreuses communautés végétales (Lopez Gonzalez, 2001). Deux espèces spontanées vivaces (permanentes) jouent un rôle clé dans la fixation des dunes et la préservation de l'écosystème saharien appartenant à deux genres (*Retama* et *Genista*) de cette tribu.

Ce travail consiste à faire une étude analytiques des articles scientifiques étudiée les caractères phénotypiques et symbiotiques des bactéries nodulant des légumineuses

appartiennent à la tribu des *Genisteeae* principalement les travaux de (Ahnia,2018) ; (Chaïch, 2017) ;( Mahdhi, 2007).

En Algérie, 67 isolats provenant des nodules racinaires de *Retama raetam* et *R. sphaerocarpa*, originaires du nord-est de l'Algérie, ils ont été identifiés comme *Bradyrhizobium sp* (Boulila F. *et al.*, 2009).

Ces isolats pourraient faire l'objet d'une nouvelle espèce et ceci constitue l'objectif du travail de (Ahnia, 2018), qui consiste à décrire et à statuer sur la position taxonomique de ces souches isolées de nodules racinaires de *Retama* d'Algérie

Selon Mahdhi, 2007 En Tunisie, 28 isolats à partir de nodules racinaires de *Genista.saharae* échantillonnés dans la région infra-aride de la Tunisie à Nefta.

Le but de cette étude était d'étudier, en utilisant des propriétés phénotypiques, la diversité taxonomique d'une collection de 28 bactéries rhizobiennes isolées des nodules racinaires de *G.saharae* échantillonnés dans la région infra aride de la Tunisie.

Et d'après Chaïch, 2017 En Algérie, 57 souches rhizobiennes ont été isolées à partir de nodules provenant de plusieurs sites de la région hyper-aride de Metlili et Taïbet.

L'objectif principal de cette étude est de décrire l'isolement et la caractérisation des rhizobia sont *G.saharae* poussant dans quatre sites, à une distance de 400 Km à l'intérieur de la zone hyper aride du Sahara algérien.

**Première partie**  
**Partie bibliographique**

# **Chapitre 01**

## **Synthèse bibliographique**

# Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

## 1. L'azote :

L'azote est une molécule essentielle qui représente le quatrième élément nutritif important des plantes, présent dans l'atmosphère en grande quantité (78% en volume). C'est un gaz incolore et inodore qui se trouve également sous forme de ( $N_2$  ou diazote) (François et al., 1997 ; Hopkins, 2003 ; Raven et al., 2014 ; Wolfgang et al., 2009).

La plupart des êtres vivants ont besoin de convertir l'azote atmosphérique en nitrate ( $NO_3^-$ ) ou, parfois, en ions ammonium ( $NH_4^+$ ) pour synthétiser leurs acides aminés et d'autres molécules d'azote. La dégradation des matières organiques azotées dans le sol produit ces ions (Figarella et al., 2007 ; Hopkins, 2003 ; Raven et al., 2014 ; Wolfgang et al., 2009).

### 1.1. Le cycle de l'azote :

Contrairement au carbone, l'azote est abondant dans l'atmosphère mais est difficilement assimilable par les organismes, même s'il peut pénétrer dans la biomasse de diverses manières. Cela fait du cycle biogéochimique de l'azote le cycle le plus complexe qui soit (Hopkins, 2003 ; Meyer et al., 2004 ; Wolfgang et al., 2009).

En général, l'azote de l'atmosphère passe successivement par les étapes de fixation, d'ammonification, de nitrification et de dénitrification. (Figure 01).

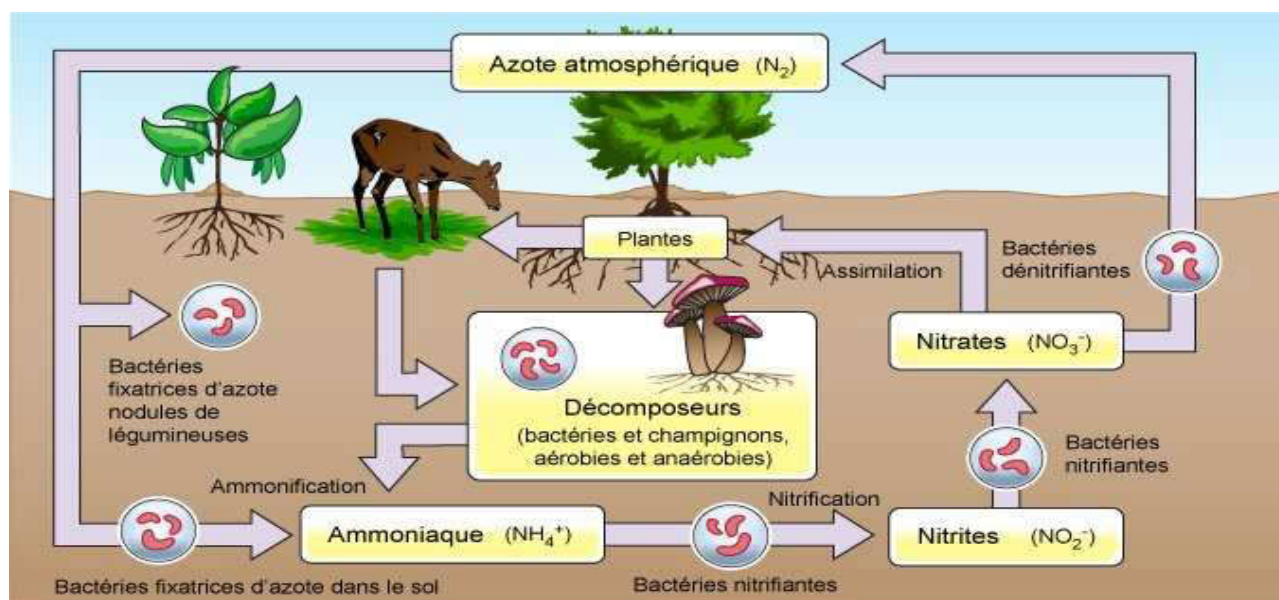


Figure 1. Cycle de l'azote (Pujic P., 2009).

#### 1.1.1. Ammonification, nitrification, dénitrification :



Au cours de la décomposition, l'azote organique est transformé en ammoniac par une série de microorganismes. Ce processus est connu sous le terme d'ammonification. Une partie de l'ammoniac peut être volatilisée et retourner dans l'atmosphère, mais la plus grande partie est recyclée en nitrate par des bactéries de sol.

L'oxydation de l'ammoniac en nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) par les bactéries du genre *Nitrobacter* est la première étape de la production de nitrate. La nitrification est le produit final de l'activité des bactéries nitrifiantes.

L'énergie libérée lors de l'oxydation de substances inorganiques comme l'ammonium ou le nitrite est utilisée par les bactéries nitrifiantes pour transformer le dioxyde de carbone en carbone organique.

Les plantes sont en concurrence avec des bactéries dites dénitrifiantes qui consomment l'azote du sol. Ces bactéries diminuent le nitrate contenu dans le diazote au cours de la réaction de dénitrification, qui renvoie le nitrate dans l'atmosphère à un rythme de 93 à 190 millions de tonnes par an (Hopkins, 2003).

### 1.1.2. La fixation biologique de l'azote :

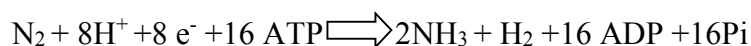
La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase (Halbleib et Ludden, 2000).

La réaction catalysée est la suivante :



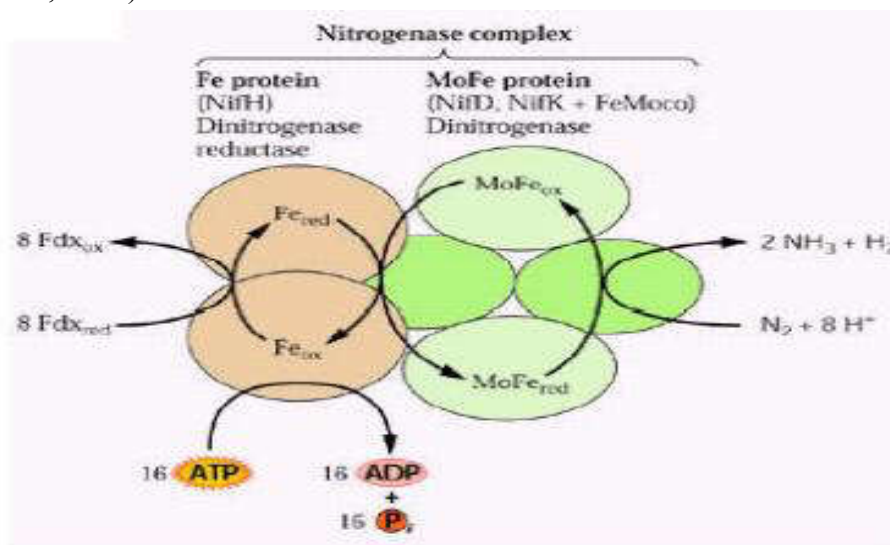
(n= nombre de mole d'hydrogène ; p= nombre de mole d'ATP)

Le complexe nitrogénase peut également réduire les protons en dihydrogène. La quantité d'ATP nécessaire étant variable suivant les conditions, la stœchiométrie exacte de la réaction reste encore aujourd'hui inconnue. Dans le modèle standard, on considère cependant qu'une mole de dihydrogène est nécessaire pour réduire une mole de diazote et que ceci nécessite l'hydrolyse de 2 moles d'ATP (p=2 et n=1) (Halbleib et Ludden, 2000). L'équation globale typique de la fixation d'azote est dans ces conditions :



La fixation de l'azote étant un processus très coûteux en énergie, les diazotrophes pratiquent une régulation stricte de son activité. La transcription des gènes *nif* est réprimée

par l'ammonium et par l'oxygène rendant la fixation impossible en inactivant la nitrogène (Oldroyd et Downie, 2008).



**Figure 2.** La nitrogénase (Yann, 2006)

### 1-1-2-1 -les fixateurs libres :

le groupe des bactéries fixatrices libres non associées avec une plante spécifique fixent leur azote à l'état libre ou dans la rhizosphère de certaines plantes (Francois et al., 1997), elle 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).

Malgré le fait que certaines espèces soient aérobies (ex : *Azotobacter*), la majorité d'entre elles ne peuvent fixer l'azote que dans des conditions anaérobies ou lorsque la pression partielle d'oxygène est très faible.

Les bactéries non symbiotiques des *Azotobacter* , *Azotococcus* , *Beijerinckia* sont des bactéries aérobie capables de fixer l'azote (Raven et al., 2007).

### 1-1-2-2-les fixateurs symbiotiques :

La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes, soit plus du double de l'apport du aux bactéries libres (Davet, 1996). Dans les relations symbiotiques, le partenaire bactérien est le symbiote et la plante est l'hôte .le type le plus typique d'interaction symbiotique se traduit par le développement de nodules, qui sont des formations multicellulaire hypertrophiques, sur les racines de la plante hôte (Hopkins, 2003).l'association symbiotique entre une plante et la

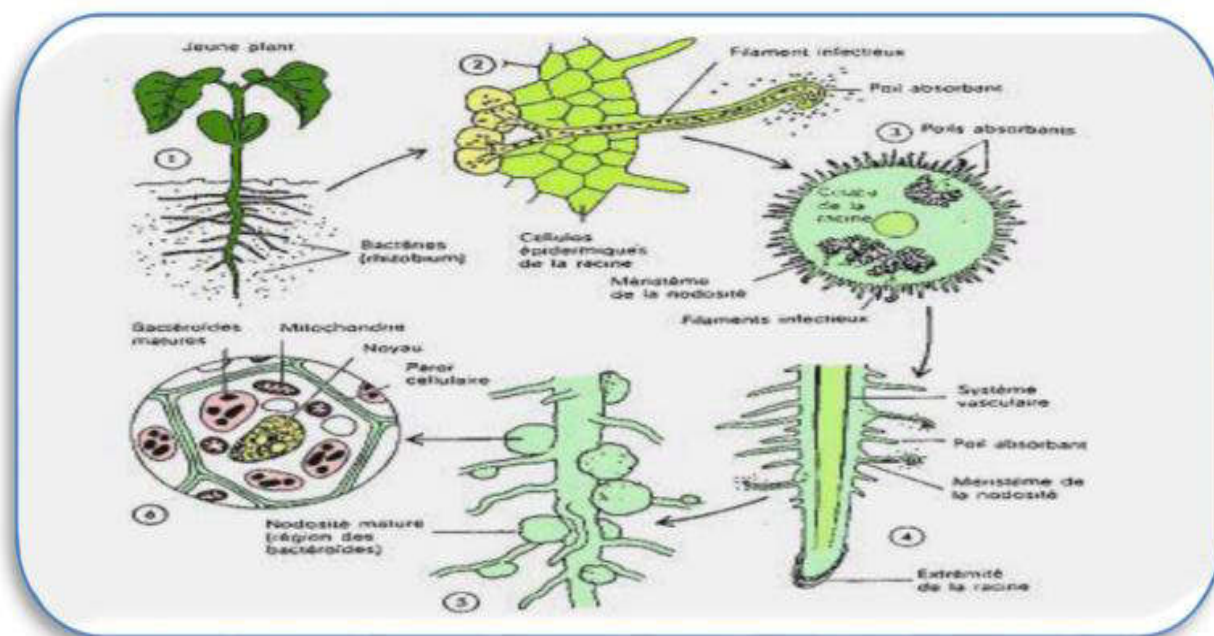
bactérie à bénéfice réciproque donne lieu à une fixation d'azote. la plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qui intègrera les protéines végétales (Tortora et al., 2003).

*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, ou *Azorhizobium* sont les trois genres de bactéries qui constituent le symbiote des légumineuses, découvrant qu'un *Bradyrhizobium* et un Uimaceae ont une relation utile. Suggère que la spécificité des rhizobiaceae pourrait être moins stricte qu'on ne le pensait (Davet, 1996).

## 2-La symbiose *rhizobiums* -légumineuses :

La symbiose *rhizobiums*-légumineuses est la symbiose la plus étudiée et la mieux connue (Allen et Allen, 1981). Elle représente plus de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (Hardy et Havella, 1975) et d'un point de vue écologique et agronomique, c'est un lien très important.

La réponse de la plante hôte à la symbiose est le développement de structures différenciées et spécialisées, appelées nodules ou nodosités, qui se trouvent souvent au niveau des racines et, dans certains cas, des tiges. Le site réel de la fixation de l'azote atmosphérique est ces organes, ou biotopes, où les bactéries se développent.



**Figure 3.** Représentation schématique de la symbiose (Sebihi, 2008)

## **2-1-Le macrosymbiote : légumineuses**

### **2-1-1-Généralités :**

Parmi les angiospermes dicotylédones, les légumineuses (*Fabaceae*) constituent la troisième plus grande super-famille avec plus de 750 genres et 19000 espèces. Elles ont généralement des feuilles composées ou rarement simples. Les fleurs sont pentamères, avec 10 étamines ou plus, et les fruits uniloculaires avec deux valves séparées (Dommergues et al., 1999).

### **2-1-2- Classification :**

Actuellement, la famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles, les *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae* (LPWG, 2013 et Cardoso, 2013).

Si les bactéries sont capables de trouver les conditions physiologiques nécessaires pour fixer l'azote de l'air, la nodulation des légumineuses par les *rhizobia* est assez fréquente.

En effet, parmi les 20% de légumineuses étudiées, 97% des espèces testées sont nodulées de la sous-famille des *papilionoideae* (composée de 28 tribus avec environ 480 genres et 13800 espèces ; pois, haricot, fève, lentille....), plus de 90% des espèces sont nodulées dans la sous-famille des *Mimosoideae* (composée de 80 genres et 3270 espèces ; robinier, glycine, acacia...), et 23%.

### **2-1-3- Importance :**

Les légumineuses participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote, en s'établissant comme flore pionnière, initiatrice d'une succession écologique.

Elles constituent par ailleurs une source d'alimentation extrêmement importante aussi bien pour l'homme que pour l'animal. Si les légumineuses ont été utilisées empiriquement depuis l'Antiquité pour améliorer ou entretenir la fertilité des sols, il n'y a qu'une quinzaine d'années que le mécanisme moléculaire régissant la mise en place de cette symbiose a été découvert (Lerouge et al., 1990).

## **3-la symbiose *Retama sphaerocarpa-Bradyrhizobium* :**

### **3-1-Le genre *Retama* :**

*Retama* a un rôle écologique notable dû à la formation des îles de fertilité où la croissance d'un nombre des annulaires et de toute autre espèce boisée est favorisée (Pugnaire

et al., 1996). Il a une capacité remarquable de résister à la sécheresse grâce à son architecture de couronne et son système profond de racine (Miller, 1994).

Les plantes du genre *Retama* marquant généralement des nodules et contient trois espèces : *Retama sphaerocarpa*, *Retama monosperm*, et *Retama retam* (Gomez Sal et al., 1999).

### 3-1-1-*Retama sphaerocarpa* :

Arbrisseaux de là 2 m à rameaux pubescents plus ou moins dressés, caractérisés par de petites fleurs jaunes (5-6mm), situées en grappes latérales sur les rameaux âgés, feuilles très petites, gousse globuleuse, jaune brun de 713× 5-7 mm pâturage rocailleux (Kutiel et al., 1980)

### 3-1-2-Systématique de *Retama sphaerocarpa* :

Selon Maire (1952-1987), l'espèce *Retama sphaerocarpa* a subi la classification suivante

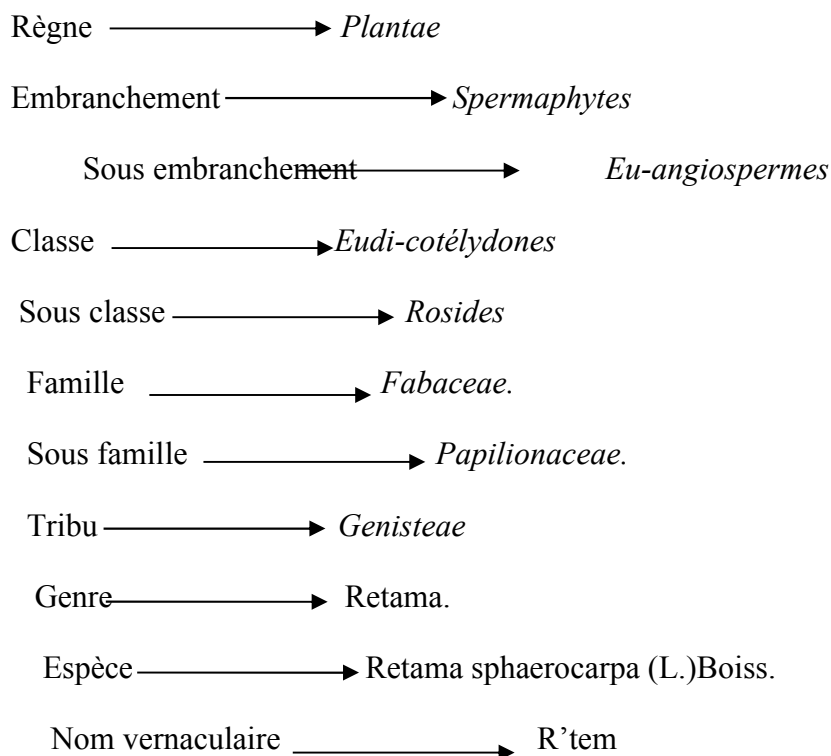






Figure 4. Plante de *Retama sphaerocarpa* (Quézel, 1962).

**3-1-3- Distribution géographique de *Retama sphaerocarpa* :**

*Retama sphaerocarpa* est une plante qui croit dans les pâturages rocailleux et argileux des montagnes, forêts claires, bords des torrents dans les steppes (Maire, 1952-1987). Cette espèce est répondeue en Espagne, au Portugal et en Afrique du nord et très rare au Sahara. En Algérie, *R. sphaerocarpa* est signalée à *Ain Sefra, Oued M'zab, Constantine, Maillot, Bouira* (Quezel et Santa, 1962).

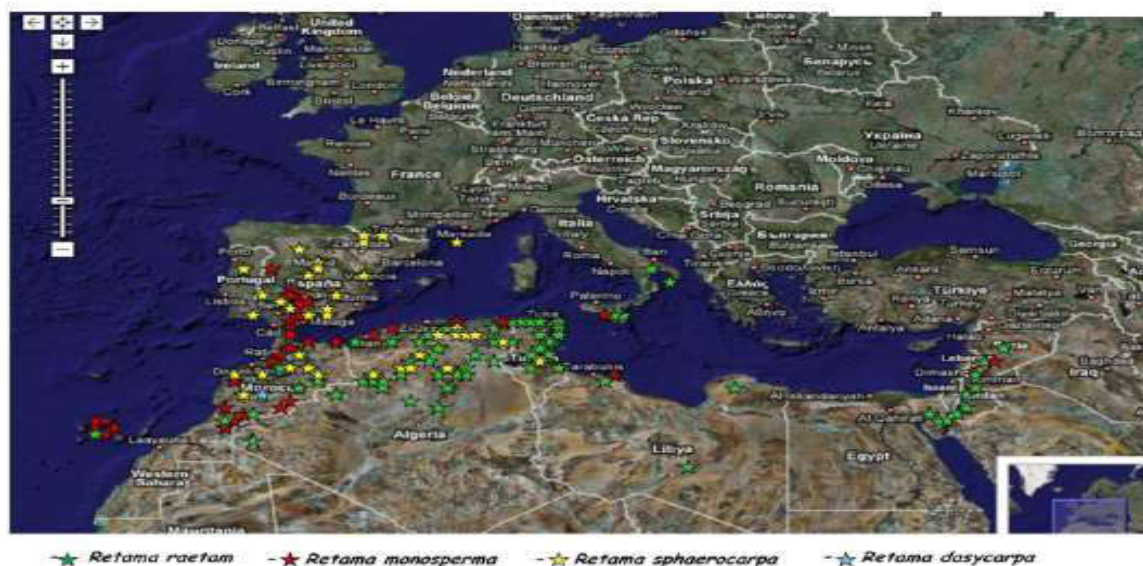


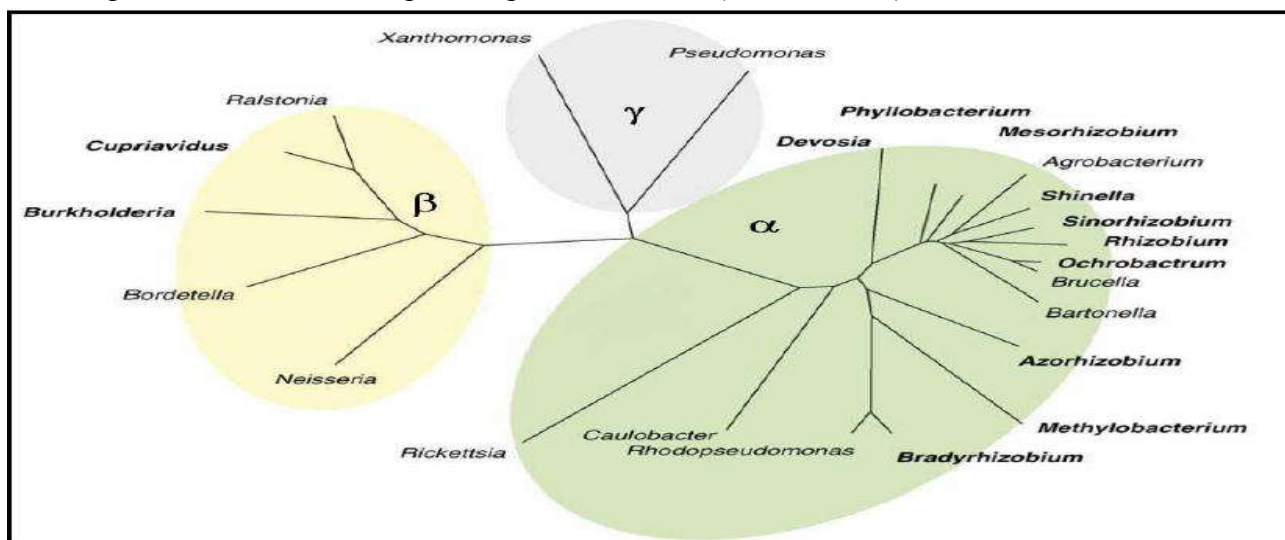
Figure 5. Répartition géographique du genre *Retama* dans le bassin Méditerranéen (Benmiloud-Mahieddine, 2013)

### 3-2- Le microsymbiote : *rhizobium*

#### 3-2-1- Généralité :

Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie communément appelée « *rhizobium* ». Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, *Rhizobium* décrit au XIX<sup>ème</sup> siècle comme des bactéries Gram négative, aérobie ou micro-aérophile et présents soit à l'état libre en générale ou en association avec des légumineuses, possédant une forme de bâtonnets régulier de 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$  de largeur sur 1.2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur (Jordan, 1984). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un seul flagelle polaire ou par 2 à 6 flagelle péritriches (Wener 1992).

Les rhizobiums sont des bactéries chimiogantrophes qui se nourrissent de glucides relativement simples comme le glucose et de composés amines. Certaines espèces ont également besoin de vitamines. Les rhizobiums sont divisés en deux genres en fonction de leur vitesse de croissance. *Rhizobium*, qui contient des souches à croissance rapide produisant de la turbidité en milieu liquide en deux ou trois jours et un taux de doublement toutes les quatre à huit heures, et *Bradyrhizobium*, qui contient des souches à croissance lente produisant la même chose en cinq à sept jours et toutes les six à huit heures, sont les deux genres qui diffèrent à cet égard (Samasegaran et Hoben, 1994), leurs croissance est optimale à une température de 28°C et un pH compris entre 6 et 7 (Burton, 1985).



**Figure 6.** Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S, 15 genres  $\alpha$ -protéobactéries - 05 genres  $\beta$ -protéobactéries et 02 genres  $\gamma$ -protéobactéries. Les genres en gras contiennent les rhizobiums nodulants les légumineuses (Masson-Boivin et *al.*, 2009)

### 3-2-2- Genre *Bradyrhizobium* :

Les bactéries dites « à croissance lente » font partie du genre *Bradyrhizobium*. Depuis sa caractérisation par Jordan (1982 et 1984), ce genre n'a connu comme espèces décrites que *Bradyrhizobium japonicum* nodulant le soja et siratro. *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendal et al., 1992), et *B.liaoningensis* (Xu et al., 1995) sont deux nouvelles espèces qui ont été récemment définies sur la base de l'hybridation ADN/ADN.

Il existe de nombreuses souches de *Bradyrhizobium* qui ont été identifiées à partir de diverses légumineuses, mais il n'est pas toujours évident de les classer en fonction de leur espèce. Le nom *Bradyrhizobium sp.* Est utilisé pour les classer ; le nom de leur installation d'isolement suit (Dupuy et al., 1994).

### 3-2-3- Classification :

Règne : *Bacteria*

Sous-règne : *Negibacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Alphaproteobacteria*

Ordre : *Rhizobiales*

Famille : *Bradyrhizobiaceae*

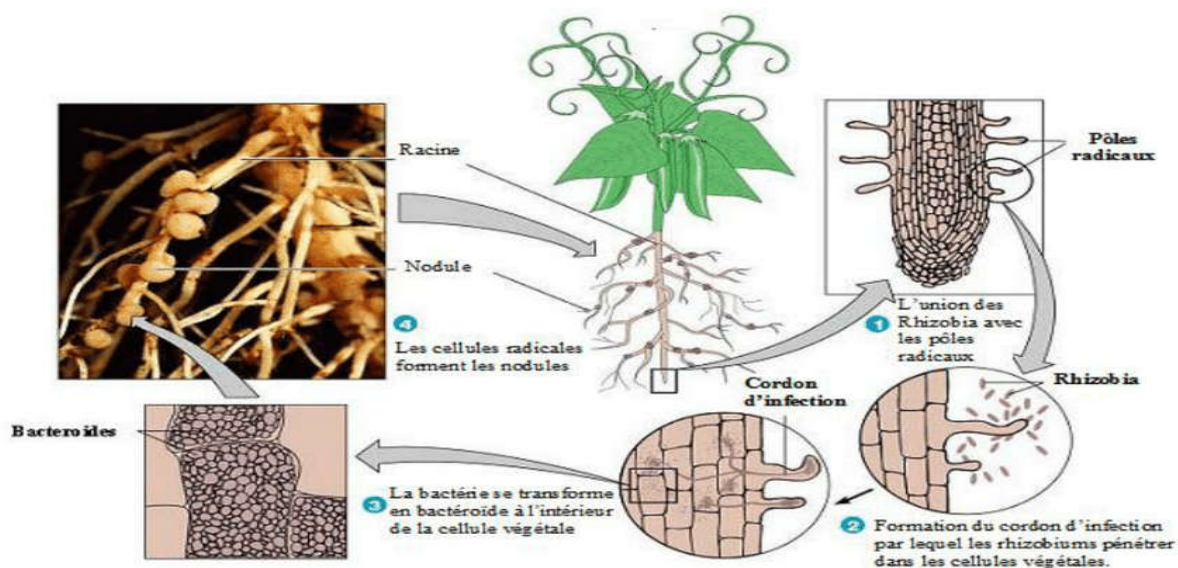
Genre : *Bradyrhizobium* ( Jordan, 1982)

Espèce : *Bradyrhizobium betae* (Rivas et al., 2004)

### 4-Le processus de nodulation :

La capacité des rhizobiums à provoquer la formation de nodules dans les racines ou les tiges d'une plante hôte spécifique est essentielle au processus symbiotique de fixation de l'azote (Oldroyd, 2001).





**Figure 7.** Etapes du processus de nodulation lors de la symbiose Légumineuses-Rhizobium (OULED AMRANE Saadia, 2012).

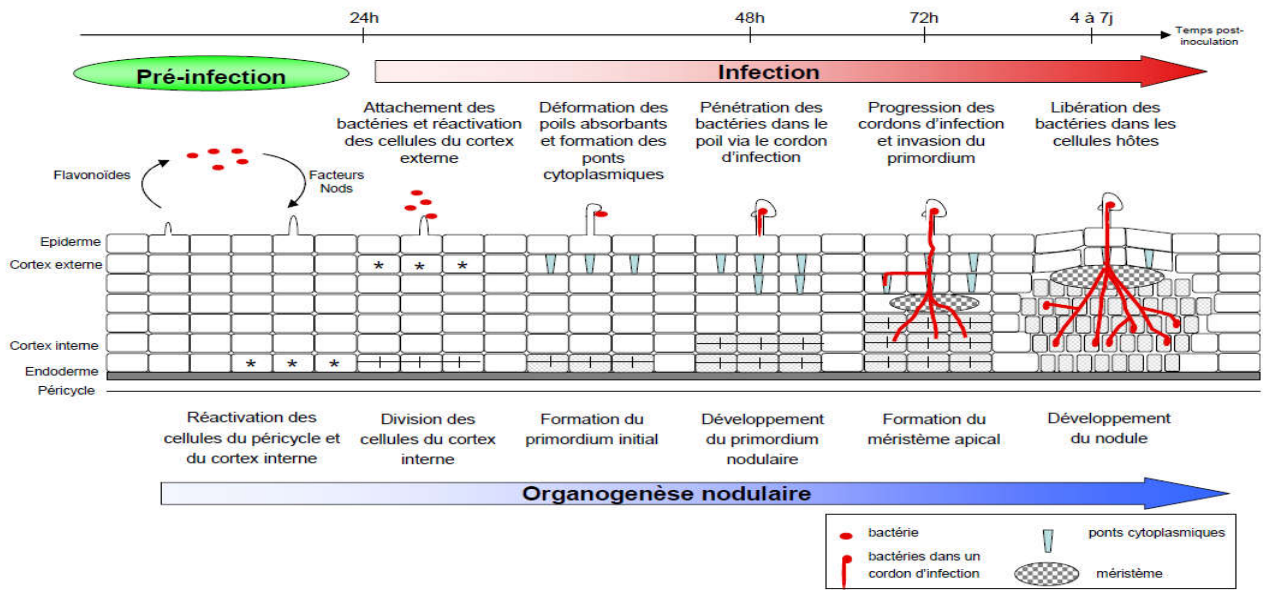
#### 4-1- l'infection et la formation des nodules :

Le nodule, seul organe de la racine nécessaire à la vie bactérienne et à l'activité de la nitrogénase, sert de lieu d'attachement symbiotique. Une conversion moléculaire entre le microsymbiont et la plante hôte conduit à la production de nodules (Foucher et Kondorosi, 2000).

L'interaction s'initie par un dialogue moléculaire spécifique entre les deux partenaires rhizobia et des jeunes poils absorbants cette l'étape de pré-infection prend quelques heures à 24h postinoculation (Oldroyd, 2000).

Finalement, les cellules végétales infectées et les bactéries infectantes se différencient en cellules capables de fixer et d'assimiler l'azote. La structure nouvellement formée, qui se compose des bactéries qui différencient dans des bactéroïdes enfermés dans une membrane de cellules de la plante, s'appelle un symbiosome.

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobium-légumineuse est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de rhizobium donnée n'est capable, en général, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de rhizobium (Tilak et al., 2005).



**Figure 8.** Les différentes étapes conduisant à la formation d'un nodule indéterminé (Patriarca *et al.*, 2004).

**Deuxième partie**  
**Partie expérimentale**

# **Chapitre 02**

## **Matériels et méthodes**

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### 1-Matériel biologique :

Ici (Ahnia, 2018) utilisé le matériel suivant : les isolats ont été obtenus dans un travail précédent à partir de nodules efficaces stérilisés en surface de plantes *R.sphaerocarpa* poussant dans des sols algériens, et cultivés sur de la gélose à la levure et au mannitol (YMA) à 28°C. Toutes les cultures pures ont été testées pour leur capacité à établir une symbiose efficace avec *R.sphaerocarpa* dans des conditions contrôlées.

Tandis que (Chaïch et al., 2007) et (Mahdhi et al., 2017) utilisés les matériels suivants : les bactéries ont été isolées à partir de nodules racinaires naturels prélevés sur des plantes *G.saharae* poussant en Tunisie et en Algérie. L'isolement des bactéries à partir des nodules a été effectué comme décrit par Vincent en 1970. La pureté de chaque isolat a été assurée par l'étalement répété de colonies individuelles sur des plaques de gélose à l'extrait de levure et au mannitol (YMA).

### 2. Méthodes :

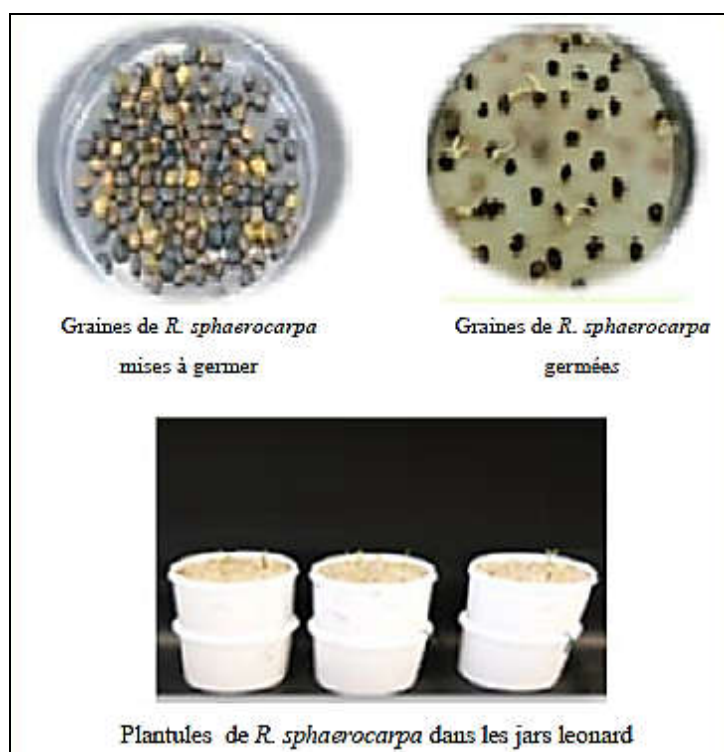
#### 2.1. Caractérisation phénotypique :

Les caractéristiques phénotypiques suivantes ont été recherchées dans cette étude analytique : capacité de nodulation, caractéristiques physiologiques et nutritionnelles, sensibilité et résistance aux antibiotiques.

##### 2.1.1. Test de nodulation

Le test de nodulation est la première étape pour identifier les nodosités isolées qui ont été collectées. En fait, cela permet aux chercheurs d'évaluer la capacité des bactéries à infecter à nouveau la plante hôte (Bourebaba, 2016).

Sous une plaque chauffante à flux laminaire, les grains de *R. sphaerocarpa* ont été stérilisés ( $H_2SO_4$ ) pendant 3 heures, puis rincés abondamment (10 fois ou plus) dans de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'acide. Les graines ont été laissées dans de l'eau de distillation stérile pendant 24 heures lors du dernier rinçage pour accélérer leur germination. (Boulila et al., 2009) Puis on les laisse pendant 5 à 7 jours dans des boîtes de Pétri contenant du papier absorbant stérile imbibé d'eau distillée stérile dans l'obscurité à 20°C. (Ahnia, 2018).



**Figure 9.** Test de nodulation sur la plante hôte *Retama sphaerocarpa*. (Ahnia, 2018)

Une fois que les grains ont germés, ils ont été soigneusement transférés dans des pots Leonard contenant de la vermiculite et un environnement Jensen stérile (Somasegaran et al., 1994). Des suspensions de cultures bactériennes (2 ml,  $10^8$ – $10^9$  cellules/ml) ont été ajoutées au pots Leonard contenant les grains germés (âgé de 2–5 jours), puis les plantes ont été cultivées en serre (23-25°C) pendant un minimum de 4 semaines et un maximum de 8 semaines, (Bourebaba et al., 2016) après cela, les plantes ont été examinées pour la présence de nodules, leur nombre, leur taille et leur apparence, ainsi que l'apparence et le poids de la partie aérienne (Ahnia et al., 2018).

Selon (Chaïch et al., 2017), La souche de référence ORS1400 d'*Ensifer garamanticus* et des représentants des nouveaux isolats ont été testés pour la nodulation sur *G.saharae*. Après avoir été scarifiées et stérilisées, les graines ont été placées sur des boîtes de Pétri avec 10% d'agar et stockées à 4°C pendant 48 heures avant d'être déplacées dans une chambre de croissance (dans l'obscurité température 22°C le jour et 15°C). Après une semaine de germination, les plantules ont été transplantées dans des tubes de verre contenant de l'attapulgite calcinée stérile (Oil Dri Us special, Damolin, Danemark), 40 ml de solution nutritive minérale et aucune source d'azote (Bertrand et al., 2000). Une suspension rhizobienne (environ  $10^9$  cellules/ml) provenant d'une culture en début de phase stationnaire a

été utilisée pour inoculer un ml de chaque tube. Les témoins étaient des plantes non inoculées. Dix répliques de plantes par traitement ont été créées. Chaque plante a été élevée dans une chambre de croissance avec un cycle de jour de 14 heures et de nuit de 10 heures. La température de l'air était de 22°C (jours) et 15°C (nuit). 42 jours après l'injection, les plantes ont été récoltées.

Et d'après (Mahdhi et al., 2007), les graines de *G.saharae* qui pousse spontanément dans la région de Nafta et stérilisées en surface dans de l'acide sulfurique à 98% pendant une heure. Elles ont ensuite été soigneusement lavées et ont germé dans des boîtes de Pétri. Dans des tubes de verre contenant de la gélose pour semis de Fahraeus, les semis germés ont été transplantés aseptiquement (Vincent, 1970). 48 heures après le transfert, l'inoculation a été effectuée en utilisant 1 ml de l'isolat approprié de bouillon de culture rhizobien, qui contenait environ  $10^9$  cellules/ml. Des témoins non inoculés ont également été inclus. Trois plantes ont été régulièrement utilisées dans les tests de nodulation des racines avec chaque isolat. Les racines des plantes ont été vérifiées pour la nodulation trois semaines plus tard.

### **2.1.2. Caractérisation physiologique :**

Selon (Ahnia et al., 2018), les expériences de cette section examinent les effets de la température, du pH et du NaCl sur le développement des souches de référence et des souches de *Bradyrhizobium sp.* (RST89, RST91, RST88bis). Comme inoculum standard, un volume de culture cellulaire contenant environ  $10^7$  cellules/ml, comptées en utilisant la cellule de Malassez, a été utilisé pour chaque expérience. Après incubation, la croissance des bactéries a été mesurée par absorbance à une longueur d'onde de  $\lambda=600\text{nm}$ . Chaque test a pris en compte trois répétitions. Les contrôles négatifs sont pris sous forme de tubes à essai contenant des YMB non inoculés.

#### **2.1.2.1.Effet de température**

Ce test a été réalisé sur milieu YMB, effet des différentes températures sur la croissance des souches étudiées. Après ensemencement, les élevages sont incubés pendant 10 jours à différentes températures 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C, 37°C.

#### **2.1.2.2.Effet de pH**

Les souches ont été évaluées pour leur capacité à croître à différents pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 sur du milieu de culture YMB. Une fois inoculées, les cultures ont été incubées à 28°C pendant 10 jours.

### 2.1.2.3.Effet de NaCl

Une étude a été menée sur la croissance des souches rhizobiennes, où cette étude a été réalisée dans du milieu de culture YMB contenant les concentrations utilisées sont 100, 200, 300, 400, 500 et 600 nM, et après ensemencement, les cultures ont été incubées en 28°C pendant 10 jours.

Selon ( Chaïch et al., 2017), Dans des études répétées au moins deux fois et comprenant trois répétitions , les souches nouvellement isolées ont été testées pour leur croissance dans une gamme de température et de concentration de NaCl. Avant d'être utilisées, les précultures des souches testées ont été produites et conservées pendant 16 jours au maximum. En utilisant 10 µl pour inoculer 150 µl de YEM liquide dans des microplaques à 96 puits, le volume de la préculture a été ajusté à une densité optique (600 nm) de 0,5. Sur un agitateur orbital tournant à 150 rpm, les microplaques ont ensuite été incubées à 28, 40, 42 et 45°C. La DO a été enregistrée à l'aide d'un spectrophotomètre pour suivre la croissance bactérienne. Les souches de référence *R.etli* CFN42, *E,meliloti* ORS 665, *E.garamanticus* ORS1400.

D'après (Mahdhi et al., 2007), Détermination de la tolérance au NaCl ( 1,2,3,4 et 5% p/v) ; température maximale de croissance (15, 28, 35, 40 et 45°C) et croissance à différentes températures décrit par (Mohamed et al., 2000).

### 2.1.3. Caractérisation nutritionnelle :

Selon Ahnia et al., 2018 :

#### 2.1.3.1.Assimilation de la source de carbone:

Sur le milieu YMB, où l'extrait de levure a été remplacé par 0,1 % de NH<sub>4</sub>Cl et le mannitol par la source de carbone à examiner à une concentration de 1%, l'utilisation des substrats de carbone a été testée. D-glucose, mannitol, D-galactose, fructose, D-mannose, citrate, le malonate, cellobiose,

dextrine, saccharose, sorbose, rhamnose était l'un des substrats examinés. Dix jours à 28°C ont été consacrés à l'incubation des tubes d'inoculation.

#### 2.1.3.2.Assimilation de la source d'azote :

Dans le milieu YMB, où l'extrait de levure a été remplacé par l'un des acides aminés suivants à 0,1 %, l'utilisation des acides aminés par les souches comme seule source d'azote est examinée (Bourebaba, 2016). glycine, proline, cystéine et histidine était l'un des acides aminés examinés..



Selon (Mahdhi et al., 2007) :

La production d'acide et d'alcali a été déterminée dans le milieu YMA avec l'indicateur bromothymol bleu (0-0025% p/v). le milieu YMA modifié (Somasegaran et Hoben., 1994) a été utilisé pour analyser la capacité des isolats à utiliser les hydrates de carbone (1% p/v :glucose , galactose, fructose et sucrose) et les acides aminés (0-1% p/v :L-arginine, L-proline, L-leucine et L-tyrosine) comme seules sources de carbone et d'azote, respectivement.

#### 2.1.4. Sensibilité et résistance aux antibiotiques :

Selon (Ahnia et al., 2018) :

Ce test a été réalisé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA solide. Le milieu a été additionné de différentes quantités d'antibiotiques à tester et cela selon la concentration finale souhaitée (voir tableau 01).

Les solutions mères ont été préparées et stockées comme décrite par Sambrook et Russell (2001). Les solutions d'antibiotiques utilisées ont été stérilisées par filtration (filtre 0,20µm, Sigma) puis additionnées au milieu YMA préalablement autoclavé. Les antibiotiques choisis appartiennent à plusieurs familles et ciblent différents sites au niveau de la bactérie.

Chaque boîte a étéensemencée par spot avec 10 µl d'une pré-culture fraîchement préparée ayant une DO de l'ordre de 0.8 à 1 soit 10<sup>8</sup> bactéries/ml. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque antibiotique et pour chaque souche. Pour chaque test, des boîtes témoins ont été préparées. Ces témoins ont été réalisés sous des conditions standards avec 0.1% (w/v) NaCl, pH 7.0 et incubés à 28°C.

Les résultats de chaque test ont été évalués après 08 jours d'incubation. Par comparaison avec les boîtes témoins, les souches ont été notées sensibles (pas de croissance) ou résistantes (bonne croissance) (Somasegaram et Hoben, 1994).

**Tableau 1.** Différents antibiotiques testés (Ahnia et al., 2018).

Antibiotiques	Charges(µg/ml)	Cible	Familles
Ampicilline	10,50 et 100	<i>Paroi bactérienne:</i> Ils agissent sur la synthèse du <i>peptidoglycane</i> en inhibant les protéines liant la <i>pénicilline</i> (PLP).	Aminopénicillines

Streptomycine	10	Sous unité 30S du ribosome. Erreur de lecture du code génétique lors de la traduction, des protéines.	Aminosides
Gentamicine	30		
Spectinomycine	50		
Kanamycine	50		
Rifampicine	5	Sous-unité bêta de l'ARN <i>polymérase</i> , codée par le gène <i>rpoB</i> . En se liant de façon covalente à cette sous-unité beta, elle inhibe l'ARN <i>polymérase</i> .	Rifamycines
Erythromycine	50	Inhibant la synthèse des protéines bactériennes en se liant à la partie 50s du ribosome et en empêchant la translocation peptidique.	Sulfamides
Tétracycline	5	Empêche la fixation de l' <i>aminoacyl</i> -ARNt entrant dans le site A du ribosome.	Cyclines
Chloramphénicol	20	La synthèse peptidique en se fixant sur le ribosome bactérien.	Phénicolés

Selon (Mahdhi et al., 2007) :

Détermination de la résistance aux antibiotiques (Ampicilline, 60 et 100µg/ml ; Streptomycine, 60 et 100 µg/ml ; kanamycine, 60 et 100µg/ml et acide nalidixique, 20, 50 et µg/ml).

# **Chapitre 03**

## **Résultats et discussion**

## Chapitre 3 : Résultats et Discussions

### 1. Caractérisation phénotypique :

#### 1.1. Résultats de test de nodulation :

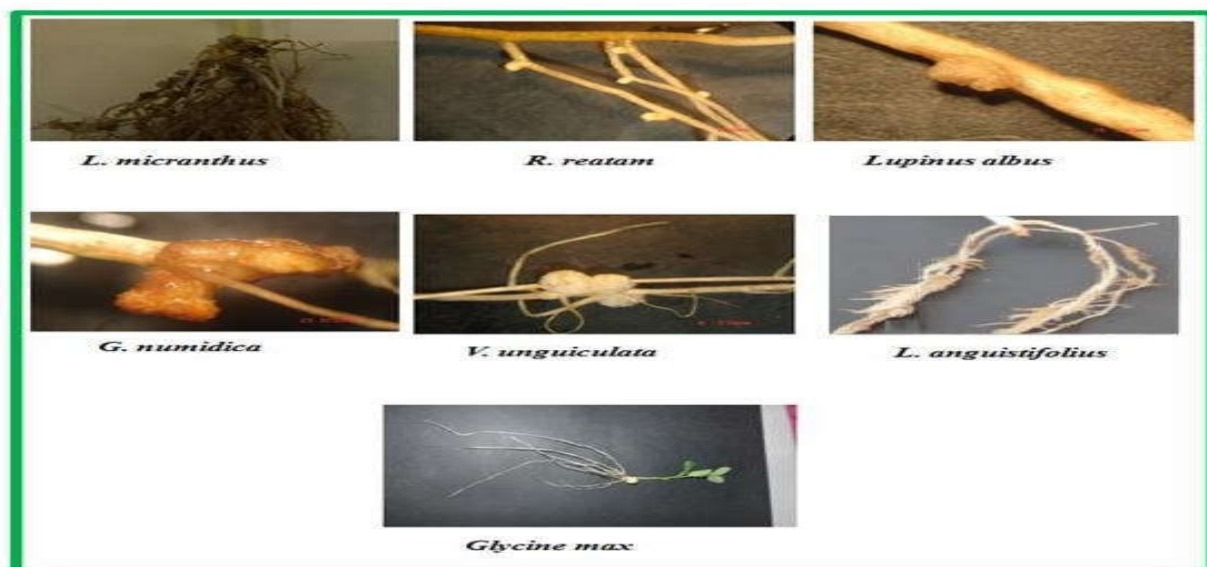
##### 1.1.1. Les résultats d'Ahnia (2018):

Selon les résultats de (Ahnia, et al. 2018) L'apparition de nodules sur la plante hôte *Retama.sphaerocarpa* appartient à la tribu de *Genista* été obtenue après deux mois d'inoculation. Leur nombre varie de 10 à 22, leur taille est de 1 à 3 mm, de couleur brune et de forme allongée multilobée. Ce résultat confirme ceux obtenus par Boulila en (2009) et considéré comme témoin positif pour le test de nodulation croisé.

La figure 10 nous montre l'apparition de nodules bruns, indiquant la fixation d'azote sur les plantes suivantes: *Lupinus micranthus*, *Genista numidica*, *Retama reatam*, *Lupinus albus*.

L'apparition de nodules a été observée également sur *Vigna unguiculata* dites à large spectre d'hôte mais ces nodules étaient de couleur blanche. Cependant, aucun nodule n'est apparu avec les deux plantes: *Lupinus angustifolius* et *Glycine.max*.

Ce résultat est en concordance avec celui trouvé par (Chahboune, et al. 2011), (Ahnia, Boulila et al 2014), (Bourbaba 2016).



**Figure 10.** Teste de nodulation avec différentes plantes légumineuses. (Ahnia, Boulila et al 2014).

Il a été rapporté que les souches appartenant au *symbiovarGlycinearum* ne peuvent noduler que les légumineuses *Glycine .max.* Alors que les souches *symbiovarGenistearum* ne peuvent noduler que les *Genistea*. (Vinuesa 2005)

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobia- légumineuses 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 nodulée que par un certain nombre d'espèces bactériennes. (tilak et al 2005) .

### 1.1.2. Les résultats de Chaïch (2017) :

**Tableau 2.** La nodulation de *Genistasaharae* inoculée par les souches représentative et la souche type de référence *E.garamanticus*. (Chaïch, et al. 2018).

Souches	Teste de nodulation	
	Nod	Nbr de nodule* (par plante)
Gs111 <sup>E</sup>	+	4.8±1.60
Gs656 <sup>E</sup>	+	7.2±2.71
Gs659 <sup>E</sup>	+	3.6±2.04
Gs6514 <sup>N</sup>	+	8.2±2.48
Gs6515 <sup>E</sup>	+	11.8±0.75
Gs6516 <sup>E</sup>	+	10.8±2.79
Gs6522 <sup>E</sup>	+	8±1.90
Gs663 <sup>M</sup>	+	7.4±2.25
Gs661 <sup>E</sup>	+	2.2±0.75
Gs666 <sup>N</sup>	+	5±1.26
Gs6620 <sup>E</sup>	+	4.2±2.14
Gs675 <sup>N</sup>	+	6.4±0.8
Gs6713 <sup>E</sup>	+	5.8±2.79
Gs6716 <sup>E</sup>	+	4.2±0.40

Gs6718 <sup>E</sup>	+	9.2±1.60
Gs6719 <sup>E</sup>	+	2.6±0.49
Gs6720 <sup>E</sup>	+	4.6±0.49
Gs6722 <sup>E</sup>	+	4.6±0.80
<i>E.garamanticus</i> ORS1400 <sup>T</sup>	+	7.2±1.47

\*Moyenne du nombre nodules par plant.

E:GenusEnsifer;N:GenusNeorhizobium; M:GenusMesorhizobium.

Selon les recherches de (Chaïch, et al. 2017), collectant des nodules de *G. saharae* dans une zone géographiquement reculée de la région aride 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 (voir le tableau 4 pour la liste des isolats. 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.

## 1.1.3. Le résultat de Mahdhi et al. (2007) :

Tableau 3. La nodulation de *Genistasaharae* par différentes souches. (Mahdhi, et al. 2007)

Souches	Teste de nodulation	
	Nod	Nbr de nodulation
GN34	+	6
GN27	+	5
GN2	+	4
GN56	+	3
GN51	+	3
GN68	+	3
GN54	+	4
GN5	+	5
GN7	+	4
GN22	+	3
GN76	+	3
GN49	+	3
GN10	+	3
GN64	+	3
GN59	+	4
GN46	+	5
GN26	-	0

GN33	-	0
GN25	-	0
GN44	+	5
GN36	+	4
GN9	+	4
GN55	+	3
GN38	+	3
GN15	-	0
GN50	+	5
GN24	+	3
GN29	+	6

Selon les études de (Mahdhi, et al. 2007), sur les 28 isolats, 4 isolats classés comme phyllobactéries par analyse de séquençage du gène de l'ARNr 16S ne peuvent généralement pas établir une relation symbiotique efficace avec leurs plantes hôtes d'origine. Les isolats restants ont formé 3 à 6 nodules par plant après 3 semaines (Tableau 3).

Les résultats de (Mahdhi, et al. 2007) ont montré que les souches *Ensifer* et

*Rhizobium* nodulant les *Genistaspp.* Aucune souche de *Brachyrhizobium* n'a été observée. Ce résultat confirme les résultats obtenus par (Mahdhi et Mars 2006) le tunisien *Retamaraetam* a Tunisia. (Zakhia, et al. 2004) ont mentionné qu'environ 69 isolats ont été isolés à partir de légumes sauvages poussant spontanément dans les régions arides de Tunisie, et seulement deux souches de rhizobium brady ont établi une relation symbiotique efficace.

(Mahdhi, et al. 2007) a signalé que les arbustes de *G. saharae* dans les régions subarides de Tunisie sont apparentés à plusieurs espèces de rhizobiums du genre *Ensifer* (75%), *rhizobia* (10 %) et *phyllobactéries* (15 %).



Enfin les résultats obtenus par (Mahdhi, et al. 2007), démontre que quelques isolats peuvent être présents une nouvelle souche nodulante *G.saharae* nécessite une caractérisation phylogénétique pour établir leur taxonomie

(Mahdhi, et al. 2007) a signalé que les arbustes de *G. saharae* dans les régions subarides de Tunisie sont apparentés à plusieurs espèces de rhizobiums du genre *Ensifer* (75%), *rhizobia* (10 %) et *phyllobactéries* (15 %).

#### **1.1.4. Résultats de Stepkowski (2018) :**

Les genres *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* (précédemment *Sinorhizobium*) et *Bradyrhizobium* sont à large spectre d'hôte en raison de leur capacité à noduler une large gamme de *Fabaceae spp.*

Les *Genistasaharae* sont infectés exclusivement par des genres de *rhizobium* à croissance rapide, en particulier *Ensifer*, dont la prédominance d'*Ensifer* en tant que symbiote peut être causée par des exigences spécifiques de *Genista*, favorisant ce genre de rhizobium.

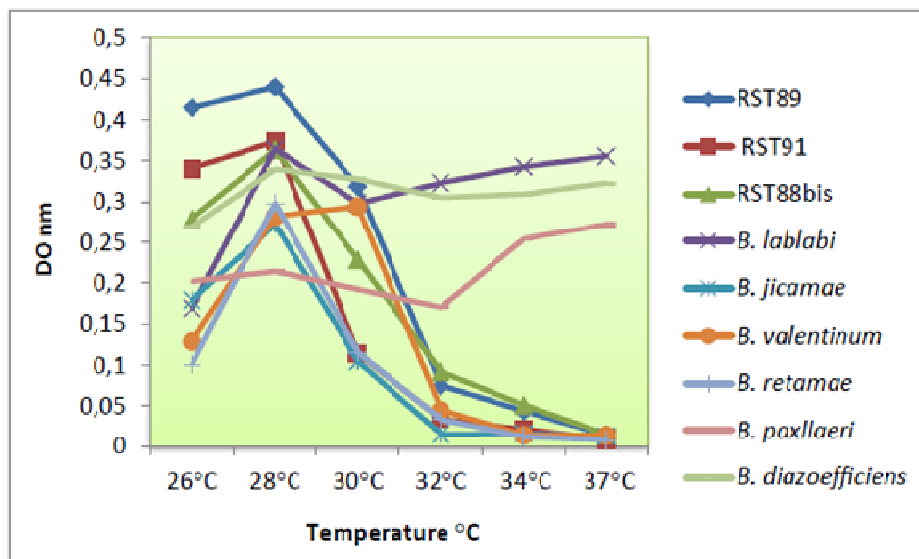
Cependant, cela peut être lié à la haute teneur en sel et à l'habitat aride des légumineuses, ce qui peut favoriser *Ensifer* par rapport à d'autres genres *rhizobium*. (Stepkowski, et al. 2018).

#### **1.2. Caractérisation physiologique :**

Les résultats d'(Ahnia et al., 2018) :

##### **1.2.1. Effet de la température :**

Les résultats du travail de Ahnia (2018) ont été basés sur les souches RST89, RST91 et RST88bis, ils montrent que la température optimale pour la croissance de ces souches se situe entre 26°C et 30°C. Cependant, à l'exception des points de référence (*B. paxllaeri*, *B. diazoefficiens*, *B. lablabi*), aucune croissance n'a été observée après 32°C.



**Figure 11.** Effet de la température sur la croissance des souches de *Retama*. (Ahnia, 2018)

Ces résultats sont en concordance avec celui trouvé par Bourebaba (2016), comme ses résultats ont montré que la capacité de souches isolées à croître à diverses températures a été déterminée sur une plage de 20°C à 41°C.

En effet, toutes les souches testées, y compris les souches de référence, montrent une croissance entre 20°C et 30°C, avec un pic à 28°C. Des températures supérieures ou égales à 37 °C empêchent 75 % des souches de se développer, mais certaines souches continuent de croître même à 39°C. Cependant, aucune croissance n'a été observée à 41°C.

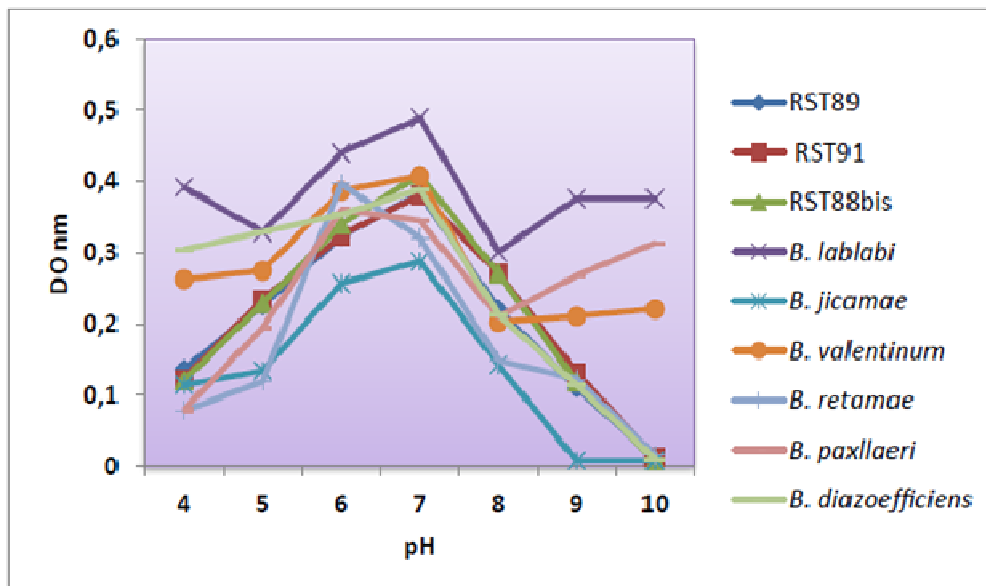
Ces résultats corroborent les résultats Dakak (2010) qui montre que la majorité des souches sont capables de croître à des températures allant de 4°C à 45°C, avec un optimum de croissance entre 25°C et 30°C, et aucune croissance au-dessus de 45°C.

Selon certaines recherches, nombreux rhizobiums ne peuvent pas se développer à 38°C. La majorité des rhizobiums préfèrent une plage de température comprise entre 28 et 31°C pour une croissance (Thami-Alami et al., 2010).

Les rhizobiums produisent des protéines appelées « protéines de choc thermique » pour résister aux impacts des températures élevées (Michiels et al., 1994). La déshydratation et la dégradation des enzymes sont provoquées par les températures élevées dans le cycle métabolique bactérien. Les basses températures, en revanche, entraînant l'inactivation-parfois irréversible (Cloutier et al, 1992).

### 1.2.2.Effet du pH

Le travail de Ahnia (2018) montrent que les souches RST89, RST91 et RST88bis se croisent entre pH4 et pH7, avec un optimum à pH7, et que la croissance ralentit pour s'empêcher entre pH9 et pH10.



**Figure 12.** Effet du pH sur la croissance des souches de Retama. (Ahnia, 2018)

Selon Bourebaba (2016), les résultats de l'effet du pH sur la croissance des souches étudiés montrent que tous les souches, y compris les 7 souches de référence, poussent bien en pH acide ou neutre. Cependant, cette croissance est affectée par pH8 (75%) et donc seulement 36,36 % de croissance est observée à pH9 avant de cesser à pH11.

Les résultats obtenus dans le travail de Dakak (2010) découvre que l'ensemble des isolats testés et des souches de référence peut se déplacer entre pH3,5 et pH10.

Selon (Graham, 1994), la structure et la composition de la membrane externe de la bactérie peuvent jouer un rôle dans la façon dont elle tolère un pH acide. Hangria et Vargas (2000) qu'à différents stades de la symbiose, l'acidité du sol pose un problème important. Le partenaires le plus sensible au pH est généralement le microsymbiont. les différentes souches de rhizobia réagissent différemment à l'acidité (Vargas et Graham, 1988).

Selon (Jordan, 1984, Van Rossum et al., 1994, Yan et al., 2000), ils ont convenu, après leurs études, que Les *rhizobiums* à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité que les *bradyrhizobiums*. Cependant, même au sein d'une même espèce, il peut y avoir une large gamme de tolérance au pH. (Glenn et Dilworth, 1994)

Selon (Raza et al., 2001) Les souches de *rhizobium* isolées de deux espèces, *Lupinus luteus* et *Lupinus angustifolius*, poussent très bien dans une large gamme de pH (pH 4 à pH 10) .

(Bourebaba et al., 2016) a également trouvé que La croissance de certains isolats de *Bradyrhizobium* de *Lupinus micranthus* est inhibée à pH11.

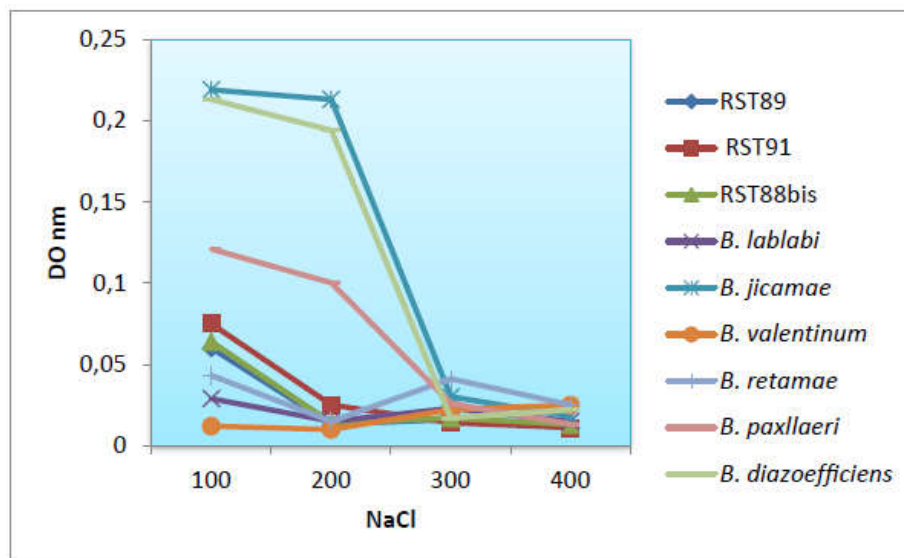
L'acidité du sol inhibe la fixation symbiotique de l'azote en limitant la survie et la persistance des rhizobiums dans le sol, ainsi qu'en réduisant la nodulation. (Appunu et Dhar, 2006) L'exclusion des protons, la production d'exopolysaccharides et les modifications de l'hydrophobicité de la membrane plasmique sont autant de mécanismes d'adaptation au pH de l'environnement chez les *rhizobiums*. (Correa et Barneix, 1997).

La majorité des sols peuvent tolérer des niveaux de pH aussi élevés que 9, ce qui rend l'alcalinité moins préjudiciable à la survie du *rhizobium*. Cependant, l'effet négatif de l'alcalinité du pH du sol est le manque de minéraux tels que le fer et le manganèse, qui sont nécessaires à la fois aux *rhizobiums* et à la plante hôte.

Rappelez-vous que le pH est l'un des facteurs les plus importants limitant la survie et les propriétés symbiotiques des *rhizobiums* dans le sol. (Shetta et al., 2011)

### **1.2.3. Effet du NaCl**

Les résultats de l'effet du NaCl du travail de Ahnia (2018) sur la croissance des racines RST89, RST91 et RST88bis montrent que le NaCl a un effet sur la croissance des racines de *Retama*. En effet, après 100 mm, il y a une diminution de la croissance des souches. Les souches de référence particulièrement *B. lablabi*, *B. valentinum* et *B. retamae* sont également affectées par le NaCl.



**Figure 13.** Effet du NaCl sur la croissance des souches de *Retama*. (Ahnia, 2018)

Ces résultats confirment ceux trouvés par Bourebaba (2016) qui ont montré que toutes les souches isolées ainsi que les souches de références sont sensibles à la salinité. En conséquence, seulement 22.72% des souches croient à 85 mm de NaCl.

Les résultats obtenus dans le travail de Dakak (2010) montrent que jusqu'à une salinité de 855mM de NaCl, la croissance des souches n'est pas affectée par la présence de des deux isolats D, E qui ont montré une forte sensibilité à la même concentration de NaCl.

Les résultats obtenus, montrent que jusqu'à une salinité de 855 mm de NaCl, la croissance des souches de référence et de nos isolats n'est pas affectée à l'instar des deux isolats D, E qui ont montré une nette sensibilité a cette même concentration de NaCl. La majorité des isolats et souches de référence demeure osmo-tolérants, bien que la croissance de la totalité des micro-symbiontes étudiés est altérée à 1710mM de NaCl.

Graham et Parker (1964) et Thami-Alami et al.(2010) ont montré que les *rhizobia* à croissance rapide sont plus tolérants à la salinité que ceux à croissance lente. Toutefois, des souches à croissance lente nodulant le genre *Vigna* pouvant tolérer des concentrations élevées de NaCl de l'ordre de 4% à 5.5% ont été caractérisées par Mpeperek et al. (1997).

Miller et Wood (1996) en particulier pendant la phase de symbiose, il a été constaté que le rhizobium est une bactérie sensible à la salinité. Cependant, elle dispose d'un mécanisme d'adaptation qui lui permet de contrecarrer les effets du stress salin, ce qui lui permet de tolérer de grandes concentrations.

les résultats de (Chaïch, et al. 2017) :

Les isolats rhizobiens de *Genista saharae* ont été testés pour leur croissance à différentes températures et concentrations de NaCl. Sur les 22 isolats testés, deux ont poussé jusqu'à 40°C, 11 jusqu'à 42°C et 4 jusqu'à 45°C.

Toutes les souches ont toléré une croissance à 1% de NaCl, sauf l'isolat Gs6721 de *Ensifer sp.* l'isolat Gs675 de *Neorhizobium sp.* ne s'est pas développé à 2% NaCl. Les autres isolats étaient tolérants au sel jusqu'à 4% NaCl. Sauf deux souches *Ensifer* (Gs6515 et Gs6521). Les souches types *Ensifer meliloti* LMG6133 et *rhizobium etli* CFN42 ont montré une tolérance au sel plus faible que la plupart des isolats, et la souche *R.etli* était sensible à la haute température.

le résultat de (Mahdhi et al. (2007) :

, la majorité des isolats sont capables de se développer à des pH compris entre 6 et 12, mais aucun n'a pu se développer à un pH de 4. La plupart des isolats testés tolèrent des concentrations de NaCl de 1 à 3%. un isolat (STM4301) est capable de se développer en présence de 4% de NaCl. la majorité des isolats sont capables de se développer à des températures comprises entre 28 et 40°C, mais pas à 45°C. Quatre isolats (GN2,GN27, GN34 et GN50) sont capables de se développer à 15°C.

### **1.3. Caractérisation nutritionnelle :**

Les résultats d'(Ahnia et al., 2018) :

#### **1.3.1. Assimilation de la source de carbone**

Selon les résultats obtenus par (Ahnia, 2018) montré que, les souches de *Retama* assimilent le D-glucose, mannitol, D-galactose, sorbose et fructose. Cependant les souches ne présentent aucune croissance en présence de mannose, citrate, malonate, cellobiose, dextrine, saccharose et rhamnose.

Bourbaba (2016), Elle a montré à travers les résultats obtenus qu'il existe une diversité dans la réponse pour l'assimilation du sucre comme seule source de carbone par les souches de *L.micranthus* testées et les souches de références. Comme la plupart des souches poussant en présence du fructose, du D-galactose, du L-arabinose et du L.rhamnose. Ce dernier est le sucre le mieux assimilé par *L.micranthus*. Cependant, les souches assimilent le saccharose et aucune d'entre elles, la raffinose.

Nous constatons également que Salmi (2019) a souligné que les souches de *Bradyrhizobium* nodulant *Lupinus micranthus* et *Calicotome spinosa* assimilent bien le D-galactose et le fructose comme seule source de carbone contrairement au saccharose.

**Tableau 4.** Assimilation des différents substrats carbonés par les souches de *Retama* ainsi que les souches de référence.

Souches/ Tests	RST8 9T	RST 91	RST88 bis	B. lablab i CCB AU 23086 T	B. jicam ae PAC6 8T	B. valentin um LmjM3 T	B. retam ae Ro19 T	B. paxlla eri LMT R 21T	B. diazoeffific iens USDA 110T
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	-	+	-	-	+
D-galactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Mannose	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Citrate	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Malonate	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrine		-	-	+	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+		+	+	+

(+) positive, (-) négative.

Aussi, (Dekak, 2010), à travers une représentation graphique, nous a fait comprendre la différence de l'assimilation des sucres par les isolats selon leur partenaire symbiotique. Les

isolats issus d'*Argyrolobium uniflorum* montrent une bonne croissance en présence de glucose, maltose, arabinose, fructose et sucrose et un faible développement en présence de raffinose, xylose, lactose et sorbitol. Tant disque les isolats isolés à partir des nodules de *Genista microcephala* ont enregistré les plus faible taux de croissance pour tous les sucres utilisés, en les comparant avec les densités optique enregistrés par les souches de références qui sont bien développées dans la gamme des sucres utilisés.

En 1985, Stowers a démontré que les bactéries *Bradyrhizobium* assimilent les monosaccharides par différentes capacités. En revanche, le genre assimile moins les saccharides, les trisaccharides sont rare.

Autre travaux montré que les différentes souches du genre *Rhizobium* ont un grande aptitude à assimiler les mono et les disaccharides, et d'une manière restreinte les tri et polysaccharides ( Van Rossum et al.,1995).

Quant à Xu et al., 1995, il a montré que *Bradyrhizobium liaoningense* et *Bradyrhizobium japonicum* ont déterminé une utilisation rare pour les monosaccharides et variable pour les didaccharides.

### 1.3.2. Assimilation de source d'azote

Selon Ahnia (2018), les résultats obtenus dans le tableau IX montrent que les souches de *Retama* ont une bonne croissance en présence de l'histidine, comme seule source d'azote mais aucune croissance n'a été observée en présence de glycine, proline et cystéine comme c'est le cas aussi de la plupart des souches de référence utilisées.

Ce résultat est en concordance avec celui trouvé par (Bourebaba, 2016), Cependant, certaines souches de *Bradyrhizobium* ont été isolées à partir de *Lupinus micranthus* qui présentaient une bonne croissance en présence de l'histidine, proline, et cystéine.

D'après ( Yang et al., 2008) les *rhizobia* assimilent les acides aminés par différentes manières. D'autre part certains acide on le rôle d'inhibiteurs de croissance selon le travail (Struffi et al., 1998) .



**Tableau 5.** Assimilation des différentes sources d'azote par les souches de *Retama* ainsi que les souches de référence. Souches 1 2 3 4 5.

Souches	RST89T	RST91	RST88bis	<b>B. lablabi</b> CCBAU 23086T	<b>B. jicamae</b> PAC68T	<b>B. valentinum</b> LmjM3T	<b>B. retamae</b> Ro19T	<b>B. paxllaeri</b> LMTR 21T	<b>B. diazoeffifici</b> <i>ens</i> USDA 110T
Histidine	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Proline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cystéine	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+): positive, (-) : negative.

Quant à (Dakak , 2010), le résultat était différent par rapport aux résultat de (Bourebaba, 2016) et (Ahnia, 2018).

Alors que Dakak (2010) a montré que La croissance des isolats et des souches de référence varie d'une source d'azote à une autre, en analysant la (Figure 15) en remarque un bon développement des isolats de *Genista microcephala* et la souche de référence HCa1, HP7 et A6 en présence de la leucine. Par ailleurs les isolats (AB2', B3, AN11', AN123', N2, YN12) issus des nodules d'*Argyrolobium uniflorum* affichent un bon développement en présence de la proline contrairement à la souche N1 qui a montré une croissance appréciable avec la leucine et la thréonine. En contrepartie la phénylalanine a réprimé la croissance de l'ensemble des isolats et des souches de référence étudiés, d'autre part l'asparagine ne favorise pas la croissance des souches et isolats et elle a assuré un faible développement des souches (A6, HP7, HS1).

Le premier formé des isolats (AN123', AN11', N1) montrant une corrélation positive avec les acides aminés isoleucine, asparagine, glycine, lysine, sérine, leucine, méthionine, glutamine, tyrosine, tryptophane et proline.

Le deuxième groupe est composé des isolats (N2, YN12, B3, AB2') leur corrélation est négatives avec les acides aminées : tyrosine, tryptophane, proline, histidine, thréonine, alanine, valine, cystéine et arginine.

Le troisième groupe constitué des isolats K, E, A et la souche de référence HnA affiche une corrélation négative avec l'ensemble des acides aminés utilisés à l'exception de la phénylalanine.

Le quatrième groupe regroupe les isolats D, F, M et les souches de référence HCA1, HP7, HS1, A6, sa corrélation est positif avec les acides aminés isoleucine, asparagine, glycine, lysine, sérine, leucine, méthionine, glutamine et négatif avec histidine, thréonine, alanine, valine, cystéine et arginine.

Par ailleurs l'ensemble des isolats et les souches de référence n'utilisent pas la phénylalanine comme source d'azote.

D'après l'étude faite par Liu et al., 2005, l'histidine et l'alanine peuvent être les acides aminés les plus assimilés.

Quant à Yang et al., 2008 ont montré que les *rhizobia* assimilent différemment les acides aminés.

le resultat de (Mahdhi et al., 2007)

, phénotypiquement, tous les isolats ont une croissance rapide, produisent des acides et sont capables d'utiliser une large gamme de source de carbone et l'azote.

#### **1.4.Sensibilité et résistance aux antibiotiques :**

Les résultats d'(Ahnia et al., 2018) :

Le travail de Ahnia (2018) montrent que les souches RST89, RST91 et RST88bis résistent l'ampicilline 10µg et 50µg, la tétracycline 50µg, et la chloramphénicol 20µg. Cependant, elles sont sensibles aux streptomycines 10µg, erythromycines50µg, gentamycines30µg, spectinomycines50µg, kanamycines 50µg et aux rifampicines 50µg (Tableau 6).

**Tableau 6.** Sensibilité et résistance aux antibiotiques par les souches de *Retama* ainsi que les souches de référence

Souches / Tests	RST 89	RST 91	RST88 bis	<i>B. lablabi</i> CCBA U 23086 T	<i>B. jicamae</i> PAC68 T	<i>B. valentini</i> LmjM 3T	<i>B. retamae</i> Ro19 T	<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21T	<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110T
Ampicilline 10µg	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Ampicilline 50µg	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Ampicilline 100µg	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Streptomycine 10µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycine 30µg	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Spectinomycine 50µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamycine 50µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicine 5µg	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Erythromycine 50µg	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Tétracycline 5µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chloramphénico 1 20µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): positive, (-) : négative.

Selon Dekak (2010), les résultats montrent que les souches étudiées sont résistantes à la spectinomycine et à l'érythromycine, la majorité d' entre elles également résistantes à la gentamycine. Cependant, les isolats et les souches de référence ont montré une

sensibilité remarquable à la kanamycine, au chloramphénicol, à la streptomycine et à la rifampicine.

Selon (Beck et al., 1993) on peut utiliser les antibiotiques comme moyenne d'identification et de comparaison pour les *Rhizobiales*.

D'autre part les *Rhizobiales* présentent une résistance variable selon la souche, en même temps les souches de la même espèce présentent une résistance variable (Zhang et al., 1991) et (Odee et al., 1997).

En 2002 Maatallah trouve que les *rhizobia* résistent à la kanamycine et l'érythromycine, par contre (Batzli et al 2002) présente des souches qui tolèrent fortement la tetracycline et une faible tolérance pour la kanamycine.

(Graham et al., 1991) dit que l'effet d'antibiotique dépend de leur concentration et de leur nature. Cet effet variait d'une espèce à l'autre, d'une souche à l'autre.

L'inactivation intra ou extracellulaire est le mécanisme de résistance le plus fréquent chez les bactéries gram négatives

le résultat de (Mahdhi et al., 2007) :

la plupart des isolats sont résistants à 100 µg/ml d'ampicilline et de streptomycine, mais pas à 100 µg/ml de kanamycine, sauf sept isolats. La majorité des isolats, 21 isolats, étaient résistants à 100 µg/ml d'acide nalidixique (Tableau 7).

**Tableau 7.** Isolats et souches de référence utilisés dans cette étude des antibiotiques (Mahdhi, 2007).

Référence souches	Am (100 µg/ml).	Str (100 µg/ml)	Ka (100 µg/ml)	Na (100 µg/ml)
GN34=STM4025	-	-	+	+
GN27	+	+	+	+
GN2	+	+	-	+
GN56	+	+	-	+
GN51	+	-	-	+
GN68	-	+	+	+
GN54=SMT4030	+	+	-	+
GN5	+	+	+	+
GN7	+	-	-	+
GN22=SMT4020	+	+	-	+
GN76=STM4033	+	+	+	-
GN49	+	+	-	+
GN10=STM4016	+	+	-	+
GN64=STM4032	+	+	-	+
GN59	+	+	-	+
GN46	+	+	-	+
GN26=STM4022	+	+	-	+
GN33=STM4024	-	+	-	-

GN25=STM4021	+	+	-	-
GN44=STM4028	+	-	-	-
GN36=STM4026	-	-	+	+
GN9=STM4015	+	+	-	+
GN55=STM3031	+	+	-	+
GN38=STM4027	-	+	-	+
GN15=STM4018	+	+	+	+
GN50=STM4029	+	+	-	+
GN24	-	+	-	-
GN29=STM4023	+	-	-	-
<i>B.japonicum</i> N2P5549 <sup>T</sup> =LMG138 <sup>T</sup>	+	+	+	+
<i>R.mongolense</i> STM246 <sup>T</sup> =LMG1944 <sup>T</sup>	-	-	-	-
<i>R.etli</i> CFN42 <sup>T</sup> =USDA9032	-	-	-	+
<i>R.galegae</i> HMBI540 <sup>T</sup> =LMG6214 <sup>T</sup>	-	+	-	+
<i>R.tropiciIB</i> CIAT899 <sup>T</sup> =HAMBII1163 <sup>T</sup>	-	-	-	-
<i>M.loti</i> ORS664=LMG6125 <sup>T</sup>	+	+	-	+

<i>M.mediterranem</i> ORS2739 <sup>T</sup> =LMG17148 <sup>T</sup>	-	-	-	-
<i>R.etli</i> CFN42 <sup>T</sup> =USDA9032	+	+	-	+

Am :ampicilline ; Str :streptomycine ; Ka : kanamycine ; Na : acide nalidixique.

# **Conclusion**



---

## Conclusion

Selon l'étude réalisée par Ahnia *et al.*, (2018), où une caractérisation polyphasique et génomique ont été réalisées afin de décrire les souches RST89, RST91 et RST88bis isolées de *Retama sphaerocarpa* d'Algérie et de statuer sur leur position taxonomique.

En effet, la caractérisation phénotypique a révélé que ces souches étudiées, cultivées sur milieu YMB sont extrêmement lente, Ces souches sont caractérisées par un large spectre d'hôte. En effet, elles sont capables de noduler, en plus de *Retama sphaerocarpa* (plante hôte), *R. raetam*, *L. micranthus*, *L. albus* et *G. numidica*.

Ces souches de *Retama sphaerocarpa* sont mésophiles avec un optimum de croissance à pH7. Cependant, leur croissance est très affectée à partir de 100Mm du NaCl. Ces souches sont résistantes à l'ampicilline et peuvent assimiler D-glucose, D-galactose, fructose et l'histidine.

Dans cette étude (Mahdhi, 2007) et (Chaïch, 2017) ont été essayé de caractériser et d'identifier des souches bactériennes isolées à partir des nodules conservés présents au niveau des racines de la plante légumineuse d'une espèce de genre *Genista saharae*.

Selon les résultats de (Ahnia, 2018). La conservation structurelle des gènes de nodulation est bien corrélée avec la gamme d'hôtes symbiotiques des souches RST89, RST91 et RST88bis de *R. sphaerocarpa*, comme le montre le test de nodulation. Par contre aucune symbiose n'a pu être établie avec *Lupinus angustifolius*, alors qu'une symbiose (nodules bruns) a été établie avec *Lupinus micranthus*.

Selon la perspective d'Ahnia *et al.* (2018), il serait intéressant de poursuivre l'étude de description des autres souches nodulant *Retama*, Ceci afin d'inventorier, d'enrichir et de protéger les *rhizobia* comme ressources génétique et patrimoine algérien.

Ahnia *et al.* (2018), ils ont été signalé qu'une étude sur les *rhizobia* nodulant *Retama* du sahara algérien est en cours afin d'identifier, décrire et sélectionner les souches ayant un ou des atouts économiques et environnementales pour la fertilisation et la restauration des sols pauvres et /ou dégradés.

# **Références**

## **Bibliographiques**

## Références bibliographiques

**Allen, O.N., Allen, E.K. (1981)** The *Leguminosae*: a source book of characteristics, uses and

nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison. 806 p.

**Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A.G., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., Salmi, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L. (2014)** *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 105,1121-1129.

**Ahnia, H, Y Bourebaba, D Durán, et F Boulila.** «*Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel

species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria.»

*Microbiologie systématique et appliquée*, 2018: 41(4), 333-339.

**Beck, D. P., & Afandi, F. (1993).** *Practical Rhizobium-legume technology manual*. Technical Manual - International Center for Agricultural Research in the Dry Areas 1993.

**Boumaza, O .2006.**"Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de *Genista tricuspidata* (Fabaceae), et *Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae)."

**Boulila, F. (2009)** Caractérisation phénotypique et génotypique des rhizobia isolés de *Retama*. Thèse de doctorat de l'université Aderrahmane MIRA de Bejaia. 127 p.

**Boulila, F., Depret, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G. (2009)** *Retama*

species growing in different ecological–climatic areas of northeastern Algeria have a narrow

range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst.*

*Appl. Microbiol.* 32, 245-255

**Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., Palacios, J.M.,**

Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L. (2016) Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating

*Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. Syst.

App. Microbiol. 39, 266-274.

**Chahboune, R., Barrijal, S., Moreno, S., Bedmar, E.J. (2011a)** Characterization of *Bradyrhizobium* species isolated from root nodules of *Cytisus villosus* grown in Morocco.

Syst. Appl. Microbiol. 34, 440-445.

**Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velazquez, E., Bedmar, E.J. (2011b)** *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. Int. J. Syst.

Evol. Microbiol. 61, 2922-2927

**Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2012)** *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. Syst. Appl. Microbiol. 35, 302-305.

**Chaich K., B. A.-M. (2017).** Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. Symbiosis (2017) 71. ISSN 0334-5114.

J. Cloutier, D. Prévost, P. Nadeau, H. Antoun, Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia, Appl. Envir. Microbiol, 58 (9) (1992) 2846-2853.

**O. S. Correa, A. J. Barneix,** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*, World

J. Microbiol. Biotec, 13 (1997) 153-157.

**Davet, P. (1996)** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Ed.INRA, Paris. 383 p.

**Dekak, A. (2009).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. In *diplôme de Magister* (p. 16). Université de Tébessa.

**Dommerguesy., Duhaux, E ., Hoang G. D.** 1999. Les arbres fixateurs d'azote Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. 475 .

Dupy, N.A., Willems, A., Pot, B., dewettinck, D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, M.T., and Gillis, M., (1994)-phenotypic and genetic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 461-473.

**Foucher, F., Kondorosi, E. (2000)** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol. Biol.* 43, 773-786.

**Glenn, A.R., Dilworth, M.J. (1994)** The life of root nodule bacteria in the acidic underground.

*FEMS Microbiol. Lett.* 123, 1-10

**Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon,**

**D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L.,**

**Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L.,**

**Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D.,**

**Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C., Sadovsky, M. (2007)** Legume symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science.* 316, 1307-1312

**Gloux, K et D. Rudulier.**(1989)- Transport and catabolism of praline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbiol.151:143-148.

**Halbleib**, Cale M, et Paul W Ludden. «Regulation of Biological Nitrogen fixation.» 2000: 04.

**Hopkins, W. (2003).** Physiologie Végétale Université des Sciences et Technologie de Lille. In W. Hopkins, *Physiologie Végétale Université des Sciences et Technologie de Lille* (pp. 99-119).

**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. Int. J. Syst.

Bacteriol. 32 (1), 136-139.

**Jordan**, D.C. (1984) Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In : N.R. Kreig and

J.H. Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.1 The Williams & Wlkins

Co. Baltimore. pp. 234-242

**Kuykendall**, L., Sayena, D.B., Devine, T.E., Udell, S.U. (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum*, Jordan 1982 and a proposal for *B. elkanii* sp. nov. J. Microbiol.

38, 501-505.

**Liu**, L., McBride, K.M., Reich, N.C. (2005) STAT3 nuclear import is independent of tyrosine

phosphorylation and mediated by importin- $\alpha$ 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 8150-8155.

**R. Maire, P. Quezel**, Flore de l'Afrique du nord (Maroc, Algérie, Tunisie, tripolitaine,

(Cyrénaïque et Sahara) *Dicotyledonae*. Volume XVI. Ed lechevalier S.A.R.L. Paris, (1987)

192-207.

**Masson-Boivin, C.**, Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.* 17, 458-466.

**Mahdhi, M.**, et M Mars. «Genotypic diversity of rhizobia isolated from *Retama raetam* in arid

regions of Tunisia.» *Ann Microbiol* 56,, 2006: 305–311.

**Mahdhi, M.**, et al. «Diversité phénotypique et génotypique de *Genista saharae* microsymbiontes de la région infra-aride de Tunisie \*.» 2007: 06.

J. Maâtallah, E. B. Berraho, S. Munoz, J. Sanjuan, C. Lluch Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L) growing in Moroccan soils, *Agronomie*, 22 (2002) 321-329.

**J. Michiels, C. Verreth, J.Vanderleyden.** Effects of temperature stress on bean nodulating

*Rhizobium* strains, *Appl. Env. Microbiol*, 60 (4) (1994) 1206-1212.

**KJ. Miller, JM. Wood,** Osmo adaptation by rhizosphere bacteria, *Annu. Rev. Microbiol*, 50

(1996) 101-136.

**S. Mpepereki, F. Makonese, A.G. Wollum,** Physiological characterization of indigenous

rhizobia nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*, 22 (1997) 275-292.

**Odee, D.W., Sutherland, J.M., Makatiani, E.T., Mc Inroy, S.G., Sprent, J.I.** (1997)

Phenotypic characteristics and composition of the rhizobia associate with woody legumes

growing in diverse Kanyen conditions. *Plant Soil*. 188, 65-75.

**OULED AMRANE Saadia.** «Inventaire des légumineuses herbacées spontanées de la région

d'El Goléa Caractérisation symbiotique, phénotypique et génotypique des rhizobia associés.»

mémoire de magister, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique,

2012, 91.

**Pujic P., N. P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes. *Biofature* 298

**Quezel, P., Santa, S. (1962)** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome I. pp. 462-541.

**Raza, S., Jorngard, B., Abou-Taleb, H., Christiansen, J.L. (2001)** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 379-383

**Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L., Garcia-Benavides, P., Mateos, P.F., Martinez-Molina,**

E., Gillis, M., Velazquez, E. (2004) *Bradyrhizobium betae* sp. nov. isolated from roots of *Beta*

*vulgaris* affected by tumor-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1271-1275.

**Raven. al, M. e. (2007).** Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae*. tunisia.

**A. Salmi,** Caractérisation phénotypique, génotypique et phylogénétique des rhizobia nodulant

*Calycotome spinosa*. Thèse de Doctorat en Sciences. Université A.MIRA de Béjaia, (2019)

105 p.

**Sambrook, J., Russell, D.W. (2001)** *Molecular cloning: a laboratory manual*. N. Y.: Cold



Spring. 1885 p.

**Saoudi M. 2008.** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N. LP) : caractérisation des

bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister,

Biologie Végétale. Université Mentouri de Constantine, Pp. 11-16-17.

**Sebihi, F.Z, et Benguedouar. A .,** (2008)- Les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister. Université de Constantine. Algérie.

**Somasegaran, P., Hoben, H.J.** (1994) Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York,

450 p.

**Stowers, M.D.** (1985) Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Ann. Rev. Microbiol. 39,

89-108.

**Stepkowski, T, J Banasiewicz, C Granada, M Andrews, M Andrews, et L Passaglia.**

«Phylogénie et Phylogéographie des Symbiontes Rhizobiens Nodulant Légumineuses de la

Tribu Genisteae.» 2018: 15.

**Struffi, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, A., Casella, S., Nuti, M.P.**

(1998) Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. J. Appl. Microbiol. 84 (1), 81-89.

I. Thami-Alami, N. Elboutahiri, SM. Udupa Variability in natural population of

*Sinorhizobium meliloti* in Morocco, Options Méditerranéennes, Séries A. Mediterr. Semin, 92

(2010) 265-269.

**Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., De, R., Saxena, A.K., Shekhar-Nautiyal, C.,**

Mittal, S., Tripathi, A.K., Johri, B.N. (2005) Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Curr. Sc. 89, 136-150.

**Tortora G.J., F. B. (2003).** Introduction à la micrpbologie .Edition de Renouveau Pédarogique Inc. 826-830.

**Van Rossum, D., Schuurmans, F.P., Gillis, M., Muyotcha, A., Van Verseveld, H.W., Stotthamer, A.H., Boogerd, F.C. (1995)** Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium*

strains nodulating Peanut (*Arachis hypogae* L.) roots. Appl. Env. Microbiol. 61, 1599-1609.

**Vincent, J. M. (1970).** *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.* IBP Handbk 15 Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.

**Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., Martinez-Romero, E. (2005a)** Population genetics and

phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. Mol. Phylogenet. Evol.

34, 29-54

**Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona,**

R., Werner, D., Martinez-Romero, E. (2005b) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae: Genisteae*)

from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*,

*Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol.

Microbiol. 55, 569-575.

**Werner, D.** (1992) Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Bot.

Bull. Acad. Sin. 39, 261-267.

**Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H.** (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov.

isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 706-711

**Yang, C.Y., Yang, J.K., Li, Y.G., Zhou, J.C.** (2008) Genetic diversity of root nodulating

bacteria isolated from pea (*Pisum sativum*) in subtropical regions of China. Sci. China Ser.

C-Life Sci. 51, 854-862.

**Zakhia, F. H.-M. (2004).** Characterisation of Wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the Infra-arid Zone of Tunisia. pp. 380–395.

X. Zhang, R. Harper, M. Karsisto, K. Lindström, Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated

from root nodules of leguminous trees, Int. J. Syst. Bacteriol, 41 (1991) 104-11

# **Annexe**

## Annexe

Les milieux de culture Milieu :

Yeast Mannitol Broth (YMB) (Somasegaran et Hoben 1994) :

Mannitol	10.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 0.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.1g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	1000ml
PH	6.8
Autoclavage	120° Pendant 20 minutes

Milieu: Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent 1970)

YMB	1000ml
Agar	15g
PH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20minute

*Retama spp* هي شجيرات أصلية في حوض البحر الأبيض المتوسط و تنكيف لتنمو في ظروف قاحلة , و هي قا درة على إنتاج العقيدات الجذرية لتثبيت الازوت الجوي , مفيد لاستعادة النظم الايكولوجية المتدهورة القاحلة و الشبه قاحلة .

في هذه الدراسة لجأنا إلى دراسات أخرى سابقة مقالات كل من (Chaïch, 2017 ; Mahdhi, 2007) حيث تم دراسة البقوليات بهدف توصيف البكتيريا التي تغذي جذور هذا النبات (BNL).

تم عزل بكتيريا مكونة للعقد الجذرية للبقوليات من جنس *Retama* من نوع *Retama sphaerocarpa* السلالات المعزولة تم تمييزها بواسطة دراسة النمط الظاهري و النمط التكويني الذي اظهر على أنها تحمل صفات *Rhizobium*

و في ظروف المراقبة البكتيريولوجية تم إجراء اختبار التعايش و ذلك حسب تقنية Vincent 1970 . النتائج المحصل عليها تظهر صفات خاصة ب *Rhizobium* بوجود سلالات شاهدة .

تم وصف 125 عزلة من العقيدات الجذرية ل *R. sphaerocarpa* و *Retama raetam* نشأت في شمال شرق الجزائر , على انها *Bradyrhizobium sp*

فظهرت ان بعض عزلات *R. sphaerocarpa* تختلف عن الأنواع المذكورة أعلاه , وقد تم تمييزها في عمل Ahnia et al بالطرق الجزيئية والظاهرية على أنها سلالة جديدة *Bradyrhizobium algeriense sp*

## Résumé

*Retama spp.* (tribu *Genisteeae*, famille *Fabaceae*) sont des arbustes indigènes au bassin méditerranéen et adaptés pour croître dans des conditions arides. Ils sont capables de produire des nodules racinaires fixateurs de N<sub>2</sub>, ce qui les rend utiles pour la restauration des écosystèmes dégradés arides ou semi-arides.

Dans cette étude, nous avons abordés plusieurs études (Chaïch, 2017 ; Mahdhi, 2007) où cette Légumineuse a été étudiées a pour but de caractériser les bactéries nodulant les racines de cette plante (BNL).

Des bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse fourragère *Retama sphaerocarpa*, sont caractérisés par une étude phénotypique et symbiotique qui donne une description comparable à celle des *Rhizobium*.

Un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est effectué en mettant en évidence l'aptitude des isolats à noduler les racines de la plante hôte qui a montré la formation des nodules ce qui indique que les isolats sont infectifs et elle Confirme qu'il a la capacité de coexister entre lui et la plante hôte.

Cent vingt-cinq isolats de nodules racinaires de *Retama raetam* et de *R. sphaerocarpa*, originaires du nord-est de l'Algérie, l'ont été décrits comme *Bradyrhizobium sp.* Certains des isolats de *R. sphaerocarpa* semblaient différer des espèces susmentionnées, et ils ont été caractérisés dans le travail d'Ahnia et al. (2019), par des méthodes moléculaires, phénotypiques et phylogénétiques. Ces souches de *R. spaherocarpa* sont proposées de définir le nouveau *Bradyrhizobium algerienne sp. nov.*

**Les Mots clés :** *Retama*, *Bradyrhizobium*, phénotypique, N<sub>2</sub>

## Abstract :

*Retama spp.* (tribe *Genisteeae*, family *Fabaceae*) is shrubs native to the Mediterranean basin and adapted to grow under arid conditions. They are able to produce N<sub>2</sub>-fixing root nodules, which makes them useful for restoration of arid or semiarid degraded ecosystems. In this study, we used previous studies (Chaïch, 2017 ; Mahdhi, 2007), where this leguminous was studied with the aim of characterizing the bacteria nodulating the roots of this plant (BNL).

Bacteria isolated from the nodules of the forage legume *Retama sphaerocarpa* are characterized by a genotypic and symbiotic study that gives a description comparable to that of the *Rhizobium*.

A nodulation test under bacteriologically controlled conditions is performed by highlighting the ability of the isolates to nodulate the roots of the host plant which showed the formation of nodules indicating that the isolates are infectious and it confirms the relationship symbiotic between the host plant and the micro-symbiont which is a specific relationship.

One hundred twenty-five isolates from root nodules of *Retama raetam* and *R. sphaerocarpa*, native of Northeastern Algeria, were described as *Bradyrhizobium sp.* Some of the *R. sphaerocarpa* isolates appeared to differ from the above-mentioned species, and have been characterized in this work of Ahnia et al. (2019) by molecular, phenotypic and phylogenetic methods. These *R. spaherocarpa* strains are proposed to define the novel *Bradyrhizobium algeriense sp. nov.*

Keyword: *Retama*, *Bradyrhizobium*, phenotypic, genotypic, N<sub>2</sub>