



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Etres vivants

MEMOIRE présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences biologiques

Option: Biotechnologie des plantes médicinales

Thème :

Isolement et caractérisation des rhizobiums nodulant l'espèce végétale *Genista cineria* dans la région de Tébessa.

❖ Présenté par :

- BAKKOUCHE Nesrine
- BENDAR Amina

❖ Devant le jury :

Mr. MEKAHLIA Med Nacer	MCA	Université de Tébessa	Président
Mr. DEKAK Ahmed	MAA	Université de Tébessa	Rapporteur
Mr. FATMI Hindel	MAA	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance : 11/06/2017

Note :..... Mention :.....

ملخص

نركز في هذه الدراسة على التصنيف المظهري للبكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للنبات البقولي و الطبي *Genista Cinerea* على مستوى منطقة بكارية . تبسة

تم انتقاء السلالات المدروسة علي اساس اختبار فيزيولوجي (مستويات pH المختلفة، مقاومة الملوحة ودرجة الحرارة) بالإضافة للاختبار البيوكيميائي والغذائي (مصدر الكربون (السكر) ومصدر النتروجين (الأحماض الامينية)).

بعض البكتيريا المعزولة أظهرت خصائص ذات أهمية من خلال مقارنتها مع السلالات المرجعية فهي قادرة على استيعاب مجموعة متنوعة من المواد الكربونية والنيتروجينية تحمل درجات pH تتراوح بين 4 و10 وتراكيز كلوريد الصوديوم من 2 % الى 10 % ودرجة حرارة بين 4 درجات مئوية و55 درجة مئوية.

بينت الدراسة الاحصائية للعناصر المدروسة ان البكتيريا المعزولة انطلقا من نمط تغذية الريزوبيا أن هناك مؤشر تنوع بيولوجي لبكتيريا العقد الجذرية لنبات *Genista Cinerea* ومعدل تشابه يساوي 43.22% مقارنة مع السلالات المرجعية.

الكلمات المفتاحية: ريزوبيا، العقد الجذرية، التصنيف المظهري، *Genista Cinerea* .

Résumé :

Dans cette étude nous nous penchons à mettre en évidence la position taxonomique des bactéries qui ont été isolée à partir des nodules de la légumineuse *Genista Cinerea*, endémique et médicinale dans la région de Tébessa localisé au niveau de Bekkaria. Les isolats caractérisés par une étude phénotypique, tests physiologiques (différent degrés de pH, concentrations NaCl et tolérance à la température), biochimiques et nutritionnels (source de carbone (sucres) et source d'azote (Acides aminés)).

Certains isolats ont présenté des caractéristiques intéressantes en les comparants avec les souches de référence, ils sont capables d'assimiler une multitude de substances carbonées et azotées, de tolérer des pH allant de 4 à 10, des concentrations en NaCl de 2% à 10% et des températures comprises entre 4°C et 55°C.

L'analyse statistique des paramètres étudiés nous a permit d'avancer que les isolats montrent une biodiversité importante. Avec un taux de similarité égale à 43.22% en comparaison avec les souches de références.

Mots clés : *Rhizobia*, Nodusité, biodiversité, *Genista Cinerea* .

Abstract :

This study focused on the taxonomic position of bacteria that have been isolated from the nodules of endemic leguminous and medicinal plant *Genista Cinerea* in Tebessa located in Bekkaria area, characteristics by a phenotypic study, physiological tests (different degrees of pH, NaCl concentrations and their tolerance to temperature), biochemical and nutritional tests (source of carbon (sugars) and source of nitrogen (Amino acids)).

Some isolates have presented interesting characteristics by comparing them with reference strains. They are able to assimilate a variety of carbonaceous and nitrogenous substances, tolerate pH ranging from 4 to 10, NaCl concentrations from 2% to 10% and temperatures between 4 °C and 55 °C.

The statistical analysis of the parameters studied allows us to predict that the isolats shows an important biodiversity and a similarityrate equal to 43.22% comparing them with reference strains.

Key words: *Rhizobia*, Nodosity, **Phenotypic taxonomy**, *Genista Cinerea*.

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement, à **Mr. DEKAK Ahmed** qui nous assistées et guidées, nous le remercions d'avoir été toujours présent et nous avoir suivies régulièrement pour la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse, ces conseils précieux et ces encouragement.

Un grand merci aux membres du jury: **Mr. MEKAHLIA Med Nacer** MCB à l'université de Laarbi Tébessi -Tébessa- et **Mr. FATMI Hindel** MAA à l'université de Laarbi Tébessi -Tébessa- pour 'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.

Nous remercions toute l'équipe du laboratoire sans exception surtout **Mr.Hamdi** pour son aide et sa gentillesse.

Nous n'oublions pas de présenter nos remerciements à tous qui ont contribué à la réalisation et l'accomplissement de ce travail.

Table des matières

Introduction	01
Chapitre I : Revue Bibliographique	03
I. Fixation de l'azote	03
I.1. L'azote	03
I.2. L'azote minéral	04
I.3. Le cycle d'azote	04
I.3.1 Décomposition et minéralisation d'azote organique	06
a. Ammonification	06
b. Nitrification	06
I.3.2. Dénitrification	08
I.4. Fixation biologique de N ₂	08
I.5. Alimentation en N des plantes légumineuses : Mécanisme de la fixation symbiotique	09
II. La symbiose Rhizobium/légumineuse	10
II.1. La symbiose	10
II.1.2. Rhizobium	11
II.1.3. Présentation générale de légumineuse	11
II.1.4. l'association <i>Rhizobium</i> / racines	11
II.2. La nodulation	11
II.2.1. Historique de la nodulation	12
II.2.2. Morphologie des nodules	12
a. Nodosités à forme indéterminée	12
b. Nodosités à croissance déterminé	12
II.2.3. Les zones de nodule	14
a. La zone méristématique	14
b. La zone de préfixation	14
c. La zone de fixation .	14
d. La zone de dégénérescence	14
II.2.4. Les étapes de la nodulation	15
II.2.5. Pré-infection	16

II.2.6. Infection	16
II.3. Génétique de la fixation	16
II.3.1. Les flavonoïdes	16
II.3.2. Les facteurs nod	17
II.3.3. Les gènes nod	18
II.4. Les gènes de la fixation	18
II.4.1. Les gènes nif	18
II.4.2. les gènes fix	19
II.5. Biochimie de la fixation	19
II.5.1. la nitrogénase	19
II.5.2. la léghémoglobine.	20
Chapitre II : Matériels et méthodes	22
I. Identification des souches de <i>Rhizobia</i> nodulant « <i>Genista Cineria</i> »	22
I.1 Zone de prélèvement	22
I.2. Le genet cendré « <i>Genista Cinerea</i> »	23
I.3. Classification botanique	23
II. Isolement des bactéries à partir des nodules	23
II.1. Collecte des nodules	23
II.2. Conservation des nodules	24
II.3. Stérilisation des nodules	24
II.4. Ecrasement des nodules	25
II.5. Isolement de souches de <i>Rhizobia</i>	25
III. Les caractères cultureux	25
III.1. Les milieux des cultures utilisées pour la croissance des <i>Rhizobia</i>	26
III.1.1. Milieu liquide	26
a- Milieu YMB	26
III.1.2. Milieu solide	26
a. Milieu YMA	26
b. Milieu YMA-RC	26
c. Milieu YMA additionné de 20 % glycérol	27
III.2. La culture dans les milieux	27
a. Le milieu YMB	27
b. Le milieu YMA. RC	27

c. Le milieu YMA	
III.2. La culture dans les milieux	27
III.3. Purification des rhizobiums et conservation des souches	27
IV. Tests physiologiques (Effet des facteurs abiotiques)	29
IV.1. Effet de pH	29
IV.2. Effet de la salinité (Tolérance du NaCl)	29
IV.3. Effet de la température	29
V. Tests biochimiques (Tests nutritionnels)	29
V.1. La source de carbone	29
V.2. Utilisation des acides aminés comme source d'Azote	30
VI. Analyses statistiques	30
Chapitre III : Résultats et discussion	31
I. Caractérisation culturaux	31
I.1. Croissance sur YMA. RC	31
I.2. Croissance sur bouillon YMB	31
I.3. Croissance sur YMA	32
II. Tests physiologiques (Effet des facteurs abiotiques)	33
II.1. Effet de pH	33
II.2. Effet de la salinité (Tolérance au NaCl)	34
II.3. Effet de la température	35
III. Caractérisation biochimique (Tests nutritionnels)	36
III.1. Utilisation des sources de carbone (sucres)	36
III.2. Utilisation des acides aminés comme source d'Azote	38
IV. Biodiversité des isolats	40
Conclusion	42

Listes des figures :

Figure N°	Titre	Page
01	Cycle de l'Azote	05
02	Azote assimilable par les légumineuses au niveau de la rhizosphère	09
03	Structure des nodules déterminés et un nodule indéterminé	13
04	Schéma globale du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule	15
05	Structure de quelques flavonoïdes présents dans les exsudats de plantes hôtes	17
06	La nitrogénase	20
07	La carte de la localisation géographique de Bekkaria.	22
08	La plante de <i>Genista Cinerea</i> dans le site de prélèvement	22
09	Nodules prêts à être conservés.	24
10	Ensemencement par la technique des quatre cadrans	25
11	Aspect morphologique d'isolat GIg1-5 sur le milieu YMA-RC après 6 jours d'incubation 30C°	31
12	Apparition d'un trouble après incubation pendant 24h sur bouillon YMB	32
13	Aspect morphologique d'isolat sur le milieu YMA après 6 jours d'incubation	33
14	Effet des différents pH sur la croissance des isolats et les souches de références	34
15	Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des isolats et les souches de références.	35
16	Utilisation des sucres comme sources de carbone par les isolats et les souches de références.	37
17	Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les isolats et les souches de références.	38
18	Classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références.	41

Liste des Tableaux :

Tableau N°	Titre	Page
01	Comparaison entre un nodule déterminé et un nodule indéterminé	13
02	Isolats et Souches de référence utilisés dans cette étude.	28
03	Effet de la température sur les isolats et les souches de référence.	36
04	ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée des quatre paramètres étudiés.	39
05	Matrice des corrélations (coefficient de PEARSON) entre les isolats et les souches de références.	41

Liste des abréviations :

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp. Nov
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ANOVA	Analyse de la variance
BNL	Bactéries nodulant les légumineuses
BNR	Bactéries du nodule racinaire
pH	Potentiel hydrique
T°	Température
NaCl	Chlorure de sodium
C	Carbone
CAH	Classification hiérarchique ascendante
CH4	Méthane
CO2	Dioxyde de carbone
Cm	Centimètre
DO	Densité optique
Fix	Gène fixateur d'azote
GS	Glutmasesyntase
H2NO3	Acide nitrique
HgCl2	Chlorure de Mercure
K	Kilogramme
KD	Kilo Dalton
LOS	Lipo-oligosaccharides
M	Mol
Mo	Molybdène
N	Azote
N2	di azote
N2O	Oxyde d'azote
NO3	Nitrates
N/ha	Azote/ Hécтар
NH4	Ammonium
NH3	Ammoniac
Nif	Nitrogen fixation = gène de fixation d'azote
nifH	Nitrogénase protéines de fer
nifA	Activateur de la transcription
nod	Gène de régulation de nodulation
Nod	Protéine régulatrice de nodulation
NO3	Nitrates
NO 2	Nitrites
RC	Rouge Congo
YMA	Yeast Mannitol agar
YMB	Yeast Mannitol broth
G	Genista cinerea
I	indéterminé
D	Déterminé
g	grappe

Introduction

Chapitre I :
Revue bibliographique

Chapitre II :
Matériels et méthodes

Chapitre III :

Résultats et discussions

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

Chapitre I

Revue bibliographique

I. Fixation de l'azote

I.1. L'azote

La vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone CO₂ et du méthane CH₄ à travers les processus de la respiration et de la fermentation liés au recyclage du carbone. La vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N) (Newton, 1998).

L'azote révèle comme l'agent principal de la croissance des végétaux (Gautier, 1993). La majeure partie de l'azote se trouve sous forme de di azote (N₂) atmosphérique (Péret, 2007), un gaz incolore et inodore. L'azote est un facteur limitant majeur des productions végétales (Renier, 2008), et agricole (Wade et Krasova, 1998).

Chez les végétaux, on le rencontre sous formes minérales ou organiques (Claude et *al.*, 2011). Si, sous forme minérale, l'azote est représenté par les nitrates, l'ammoniac et quelquefois les nitrites, la majeure partie de cet élément est retrouvée sous forme organique dans des molécules à complexité variable (Hopkins, 2003).

Nous pouvons aussi dans le cas de nutrition azotée, distinguer des organismes autotrophes et des organismes hétérotrophes. Les premiers cités sont capables d'exploiter l'azote inorganique, tandis que les organismes hétérotrophes sont dépendants de l'azote organique (Nultsch, 1998).

En effet, l'azote s'unit, dans les feuilles et dans les racines (Soltner, 2005), aux acides dérivés des glucides avec lesquels il forme les acides amines, élément constructifs des protéines; constituant essentiel du cytoplasme et de ses inclusions (chloroplastes, mitochondries, ADN...) (Madigan et *al.*, 2007), aux acides nucléiques, enzymes et les cofacteurs (Tortora et *al.*, 2003), La transformation de l'azote atmosphérique en ammoniac repose sur le pouvoir des bactéries à réduire le di azote (Hopkins, 2003).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone (Calvet, 2003), stimule le développement et l'activité racinaire, favorise ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Bado, 2003), il est essentiel pour la synthèse des 3 enzymes de la photosynthèse (Lamaze et *col.*, 1990). Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO₃⁻) et d'ammonium (NH₄⁺) (Hageman et Burris, 1978). L'importance relative de

chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Bado, 2003). La concentration requise en azote pour une croissance optimale des plantes varie entre 2 et 7% sur une base de matière sèche (Calvet, 2003). Et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif (floraison), L'insuffisance ou la carence de cet élément se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (Tourte et *al.*, 2005). Les feuilles matures entrent en sénescence puisque leur azote est redirigé vers les feuilles croissantes. S'il y a excès, l'élongation des tiges est favorisée au détriment de la maturation et le développement racinaire est inhibé, pouvant mener à un approvisionnement inadéquat en eau et en éléments minéraux (Hopkins, 2003).

I.2. L'azote minéral

C'est le produit de la décomposition de l'azote organique par la flore et la faune du sol notamment par la microflore bactérienne et fongique (Vilain, 1997).

Pour KACHAKA (2008) l'azote minéral proviennent aussi, pour une part non négligeable, de l'azote ammoniacal fixé sur les argiles.

L'azote minéral présent dans un petit volume de terre peut provenir de la minéralisation in situ, d'un transfert d'ion en phase liquide ou d'un apport d'engrais minéraux.

Il peut connaître différentes destinées :

- ✓ Etre absorbé par les micro-organismes et les bêtantes
- ✓ Etre entraîné par l'eau (lessivassions, remonté capillaire)
- ✓ Etre volatilisé ou dénitrifié

La teneur en azote minéral à un instant est donc la résultante des phénomènes sus-cité (Vilain, 1997).

I.3. Le cycle d'azote

L'atmosphère terrestre est composée à près de 80% de N_2 . L'azote est un élément important dans la constitution de nombreuses molécules organiques (les acides aminés et protéines, en particulier (Zahran, 1999). les plantes ne peuvent pas assimiler l'azote moléculaire (atmosphérique), ce dernier est assimilé par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-) ou, parfois, d'ions ammonium (NH_4^+). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol (Bado, 2003) L'azote se déplace sans cesse entre sa forme

minérale et sa forme organique. Les molécules organiques contenant de l'azote se décomposent dans le sol sous l'action des micro-organismes du sol. Cette décomposition produit de l'azote sous forme minérale (des nitrates) (Figure 1). Les plantes utilisent les nitrates puisés par leurs racines pour fabriquer de la matière organique azotée ; et le cycle recommence (Rennenberg et *al.*, 2009).

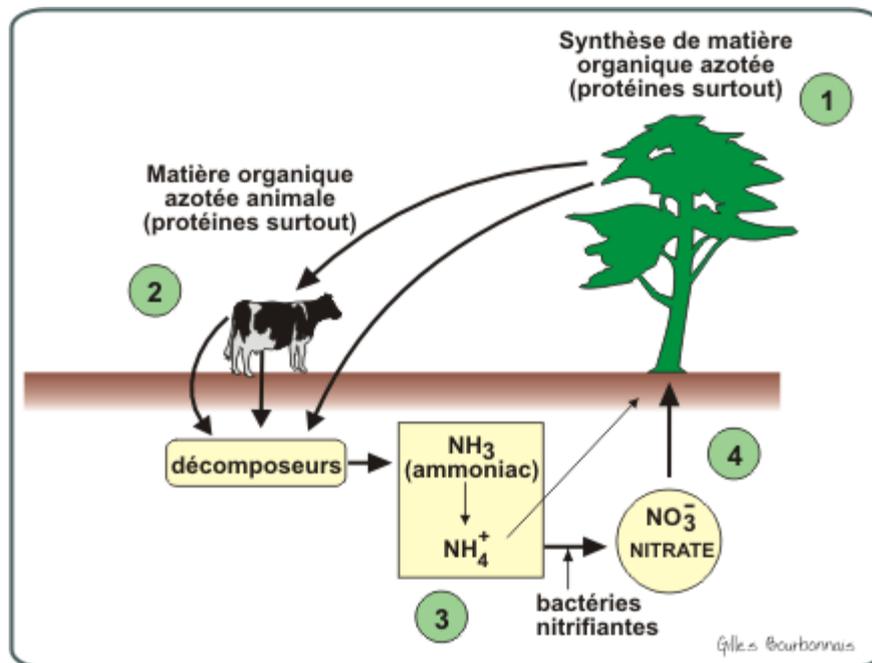


Figure 1 : Cycle de l'azote (Rennenberg et *al.*, 2009)

1. Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions NO_3^- puisés dans le sol.

2. Les animaux utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leur propre matière organique azotée. Les protéines de la viande, par exemple, sont produites à partir des acides aminés fabriqués par les plantes et mangés, sous forme de protéines végétales, par l'animal.

3. Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en CO_2 , H_2O et ammoniac (NH_3). Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions NH_4^+

4. D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le NH_4^+ en nitrate (NO_3^-) qui peut être assimilé par les plantes. Certaines plantes peuvent assimiler l'ion NH_4^+ qui se forme directement à partir d'ammoniac (Rennenberg et *al.*, 2009)

I.3.1 Décomposition et minéralisation d'azote organique

A part des légumineuses, les végétaux ne peuvent assimiler directement l'azote contenu dans les composés organiques. Ainsi, cela nécessite la minéralisation de ces composés sous l'action des micro-organismes décomposeurs, laquelle permet la libération de l'azote sous des formes minérales dans le sol. Puisqu'une partie des composés azotés, stockés dans la Revue bibliographique 6 biomasse, est sans cesse restituée au milieu sous forme de matière organique morte, contenue dans la litière et autres déchets, excréta et cadavres, la production de litière et sa décomposition représentent les facteurs clés du stockage et de la libération de l'azote nécessaire pour la culture (Madigan et *al.*, 2007).

La décomposition, qui correspond à la dépolymérisation de la matière organique, est réalisée par des enzymes extracellulaires de bactéries et de champignons (Bado, 2003). Ces micro-organismes convertissent ensuite l'azote organique en NH_4^+ , lors de l'ammonification. L'azote ammoniacal produit est utilisé à la fois par les plantes, et les microorganismes, tels que les bactéries nitrifiantes qui transforment le NH_4^+ en NO_3^- qui est la forme la plus facilement assimilable par les plantes (Madigan et *al.*, 2007).

a. Ammonification

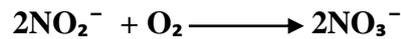
L'ammonification, c'est le processus par lequel les bactéries et les champignons transforment les matières organiques en libérant leurs composants azotés. Plus précisément, c'est le processus par lequel l'azote sous forme organique devient de l'azote ammoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). Par son manque de spécificités, ce processus peut avoir lieu dans une large gamme de température, d'humidité et de pH du sol (Raven et *al.*, 2007).

b. La nitrification

La nitrification se réalise en deux étapes par des bactéries autotrophes et certains champignons (Raven et *al.*, 2007). La première étape s'explique par les bactéries nitrosantes suivant la réaction ci-après qui se nomme : **la nitrosation**



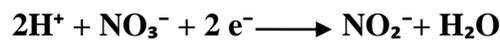
La deuxième étape c'est l'oxydation par des bactéries nitratantes, ce qui réalise la **nitratation**



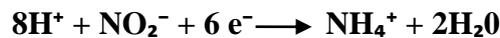
Donc, la nitrification est un processus aérobie strict. Ce processus est affecté par le contenu en eau, avec une humidité optimum du sol entre 30 et 60% (Emmanuel et *al.*, 2007), mais aussi par la température, avec un optimum vers 37°C, et le pH avec un optimum à pH 5,5-6,5 (Soltner, 2005).

Les formes d'azote réduites s'accumulent dans les sols mal drainés et mal oxygénés. Le NO_3^- est la forme azotée la plus abondante dans le sol et la plus disponible pour les plantes. En outre, la présence de NO_3^- dans le sol stimule sa vitesse d'absorption, qui indique un transporteur membranaire induit (Emmanuel et *al.*, 2007).

Une fois absorbé, l'ion NO_3^- peut être soit directement assimilé, soit réduit par la nitrate réductase (NR) en nitrite (NO_2^-) suivant la réaction suivante :



Le produit de la réaction, NO_2^- , migre dans les plastes racinaires ou les chloroplastes foliaires pour être réduit en NH_4^+ par le nitrite réductase (NiR) :

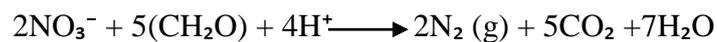


L'absorption de NO_3^- par les racines est ensuite sensible aux basses températures, aux conditions anaérobies et aux inhibiteurs de la respiration et de la synthèse protéique (Vilain, 1997).

En conséquence, la réduction de NO_3^- est synchronisée avec l'activité photosynthétique, capable de fournir l'énergie nécessaire ainsi que les squelettes carbonés indispensables à l'incorporation de NH_4^+ . La réduction de la proportion de NO_3^- dans les racines ou dans les feuilles est également régulée par la concentration de NO_3^- dans le sol. Puis, à faible concentration, la majorité de NO_3^- est réduite dans les racines et les acides aminés formés sont transportés dans les parties aériennes alors qu'à forte concentration, l'assimilation de NO_3^- dans les racines devient limitant et une forte proportion de NO_3^- est assimilée dans les feuilles, formant du NH_4^+ rapidement assimilé. La matière organique est à son tour restituée au milieu, sous forme de litière et autres déchets, pour y être minéralisée lors de l'ammonification et poursuivre le cycle de l'azote (Soltner, 2005).

I.3.2. Dénitrification

Sont correspond à un retour vers l'atmosphère de l'azote sous sa forme moléculaire N₂, N₂O (gaz à effet de serre qui contribuent à détruire la couche d'ozone dans la stratosphère) et NH₃. Ce processus est commandé par une réaction de réduction de NO₃⁻ (Emmanuel, 2007), par l'intermédiaires des bactéries (Bacillus, Pseudomonas, Achromobacter) qui transfert la matière organique selon la réaction suivante (Soltner, 2005):



I-4- Fixation biologique de N₂

Suite à la fixation naturelle de N₂, par oxydation chimique ou par assimilation par des microorganismes spécialisés libres ou symbiotiques, l'azote est rendu utilisable pour les cultures. L'azote atmosphérique ou le diazote représente ainsi la source majeure de production de substances protéiques essentielles au développement des plantes (Raven et *al.*, 2007).

La majorité du processus de fixation est la fixation biologique de N₂. L'origine de ce processus se confond avec l'apparition de la vie sur terre, il y a 3,5 milliards d'années (Madigan et *al.*, 2007). Les organismes fixateurs comprennent à la fois des procaryotes symbiotiques ou libres, tels que des bactéries hétérotrophes, aérobies (Azotobacter) et principalement anaérobies (Clostridium), ainsi que des bactéries autotrophes (Rhodospirillum) très répandues dans le sol, sur la surface des feuilles et des écorces. Les systèmes symbiotiques des plantes légumineuses sont relativement compris que des méconnaissances persistent sur la fixation par des cyanobactéries symbiotiques ou des bactéries libres hétérotrophes. Il est alors difficile d'établir avec précision leur taux de fixation de N₂ même si leur contribution est considérée importante. Cependant, les fixateurs les plus puissants sont les bactéries symbiotiques de végétaux supérieurs, tels que le genre Rhizobium symbiotiques des légumineuses, pouvant fixer jusqu'à 200 kg N ha⁻¹ (Roger et *al.*, 1996). Ces bactéries se développent dans le sol et colonisent les poils absorbants ce qui induit la formation des nodules. 20% de l'azote ainsi fixé dans les nodules est transféré à la plante, qui fournit en échange des glucides aux bactéries, et 80% est émis dans le sol après la mort et la décomposition des nodules. Dans des conditions normales, les organismes fixateurs profitent

alors de l'azote sans qu'il y ait excrétion de composés azotés, mais à leur mort et après à leur mort et après humification, N est devenu à disposition des végétaux fournissant en moyenne 25 kg N ha⁻¹ au niveau des continents. Dans la plupart des écosystèmes, les organismes fixateurs conduisent en effet à l'accumulation de composés azotés dans le temps, menant à un apport proche de l'équilibre avec d'autres ressources limitantes. Ce processus est alors suffisant pour maintenir le stock de composés azotés dans l'écosystème et reconstituer les pertes (Sebihi, 2008).

I-5- Alimentation en N des plantes légumineuses : Mécanisme de la fixation symbiotique

Les plantes, incapables de réduire N₂ atmosphérique, prélèvent l'azote du sol pour satisfaire leurs besoins nutritifs, qui dépendent de la phénologie de la plante. Pour se faire, les plantes absorbent directement NH₄⁺ ou NO₃⁻ selon leurs disponibilités dans le sol. Les ions NO₃⁻ et NH₄⁺ sont des formes de N susceptibles d'être assimilés par les plantes (Figure 2). En ce qui concerne les légumineuses, elles sont bénéficiées par deux sources d'azote, l'une provient de l'azote déjà disponible à travers la décomposition et minéralisation des matières organiques dans le sol et l'autre est assurée par la captation de N₂ à partir de la fixation symbiotique entre les légumineuses et les bactéries fixatrices (Pelmout, 1993).

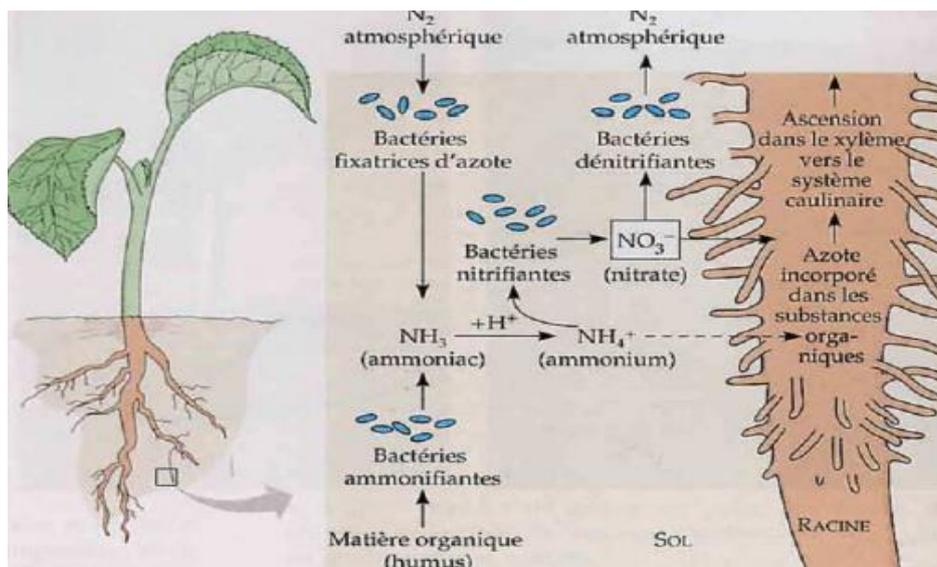


Figure 2: Azote assimilable par les légumineuses au niveau de la rhizosphère (site web 2) (<http://www.biosol.free.fr>, TERA, 2011)

L'ion nitrate vient de la transformation de l'ammonium par les bactéries nitrifiantes. L'ion ammonium est obtenu par hydrogénation de l'ammoniac. Ensuite, l'ammonium est le dérivé de l'azote atmosphérique après transformation par les bactéries fixatrices d'azote ou de l'azote contenu dans l'humus, après minéralisation. Ainsi, le nitrate migre le long du xylème d'une racine vers le système caulinaire de façon ascendante et puis il est incorporé à des chaînes carbonées pour donner des acides aminés et des protéines au niveau de la feuille (Pelmout, 1993).

II. La symbiose *Rhizobium*/légumineuse

II.1.1 La symbiose

Certaines plantes hébergent dans leurs tissus des bactéries qui assimilent l'azote de l'air. La plante profite du travail fait par les bactéries, celles-ci trouvent protection et compensation du côté de la plante. Un tel échange de bons procédés s'appelle symbiose (Pelmout, 1993).

La symbiose, qui signifie (vivant ensemble), est un terme générale s'appliquant aux relations étroites (Raven et *al.*, 2007); permanente et obligatoire (Mioulane, 2006) permet à deux espèces différentes de vivre ensemble, chacune tirant profit de l'autre (Saoudi, 2008).

Certaines relation symbiotiques, typiquement responsables de maladies, sont parasites (Raven et *a.l.*, 2007).

Toutefois, la limite entre le parasitisme et la symbiose n'est pas toujours très nette, car le bénéfice que tire de la symbiose l'un ou l'autre des deux partenaires n'est pas évident dans tous les cas. Quoi qu'il en soit, la symbiose n'occasionne ni dommage durable ni la mort de l'un des partenaires, ce qui par contre, est la règle pour le parasitisme. Très souvent la symbiose s'établit entre un partenaire autotrophe et un partenaire hétérotrophe (Nultsch, 1998).

Il y a deux types de la symbiose Endo- et Ecto selon la position relative des partenaires, on parlera d'endo ou ecto-symbiose. Si le symbiote se trouve à l'extérieur de l'hôte, on parle d'ecto-symbiose; sinon, on parle d'endo-symbiose. L'endosymbiose peut être intra- ou extracellulaire (Mioulane, 2006)

II.1.2 Rhizobium

Les Rhizobium, ou Rhizobia, sont des bactéries strictement aérobies du sol, gram négatifs, de la classe α - et β - Protéobactéries, qui ont la capacité d'établir des associations symbiotiques avec les plantes de la famille des légumineuses. Ainsi, les associations avec ces bactéries permettent essentiellement à la plante de survenir à leur besoin nutritionnel en azote (Pelmout, 1993).

II.1.3 Présentation général des légumineuses

La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous familles : Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow, 2003) et compte environ 20 000 espèces (Gepts, 2004).

II.1.4 La symbiose Rhizobium-légumineuses

Lors de l'association Rhizobium/ racines de plante légumineuses, les bactéries pénètrent dans les racines par le canal des poils absorbantes y transforment et induisent une transformation des tissus de la plante à l'origine des fameux nodules. Cette association n'est pas obligatoire, car les bactéries peuvent être cultivées séparément et la plante peut pousser sans ses bactéries (Pelmout, 1993).

L'existence de cette association permet à la plante d'acquérir la faculté de fixer directement l'azote atmosphérique, ce que ne peuvent pas faire les autres plantes supérieures. La fixation de l'azote atmosphérique s'effectue au niveau de la rhizosphère (Macheix *et al.*, 2005) volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes qui se caractérise par des compositions chimiques et biologiques différentes de celles du sol qui n'est pas sous l'influence directe des racines (Alami *et al.*, 1999).

Cette symbiose est relativement répandue dans la nature. Elles ont une grande importance économique pour l'homme (Pelmout, 1993).

II.1.5. La nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Grusak, 2002).

II.1.5.1 Historique de la nodulation

La présence de nodosités chez les légumineuses est historiquement bien connue, mais leur origine était controversée. (Woronin, 1866) fut le premier à signaler l'observation des micro-organismes ressemblant aux bactéries dans les nodosités de *Lupinus mutabilis*.

Hellriegel et Wilfarth (1888) ont montré que la formation de nodosités est le résultat d'une infection externe chez les espèces de genres *Lupinus*, *Phaseolus*, *Ornithopus*, *Vicia*, et *Trifolium*. Beijerinck (1888) fournit la première preuve que les bactéries sont à l'origine de la formation de nodosités, en préparant des cultures pures d'organismes provenant de nodosités de *Vicia faba* L. et en infectant avec ces mêmes cultures des plants de fève cultivés sur un sol stérile.

II.1.5.2 Morphologie des nodules

Dans la famille des légumineuses, la morphologie des nodules et le type de nodosité développée est déterminé par la plante hôte (Dart, 1975; Newcomb et al., 1979). Deux types majeurs de nodosités (Figure 3) sont souvent distingués en se basant sur l'existence ou non du méristème persistant:

- a. Nodosités à forme indéterminée** où l'activité méristématique se maintient. De nouvelles cellules apicales sont continuellement infectées. Cela résulte en une forme cylindrique de la nodosité. Ces nodosités sont connues chez les légumineuses des zones tempérées (sulla, pois, *Vicia* sp., *Medicago sativa* L., etc...) (Hirsch et al., 2001).
- b. Nodosités à croissance déterminée** où l'activité méristématique cesse tôt. Les cellules infectées engendrent d'autres cellules infectées et la nodosité en grandissant par expansion acquiert une forme sphérique. Ce type de nodosité existe seulement chez les légumineuses des zones tropicales telles que le soja et le haricot (Hirsch et al., 2001).

Les deux types de nodosités partagent la même organisation générale se basant sur l'existence d'un tissu central entouré par plusieurs tissus périphériques. Le tissu central contient à la fois les cellules infectées par les rhizobiums et d'autres non. Les tissus périphériques sont formés essentiellement par un cortex interne et un autre externe séparés par l'endoderme nodulaire (Van de Wiel et al., 1990).

Un troisième type intermédiaire a été identifié chez les espèces du genre *Lupinus* et *Sesbania* (*Sesbania rostrata* Brem.). Les divisions cellulaires se font dans le cortex externe ou interne, conduisant à la formation de nodosités déterminées ou indéterminées (Hirsch et al., 2001).

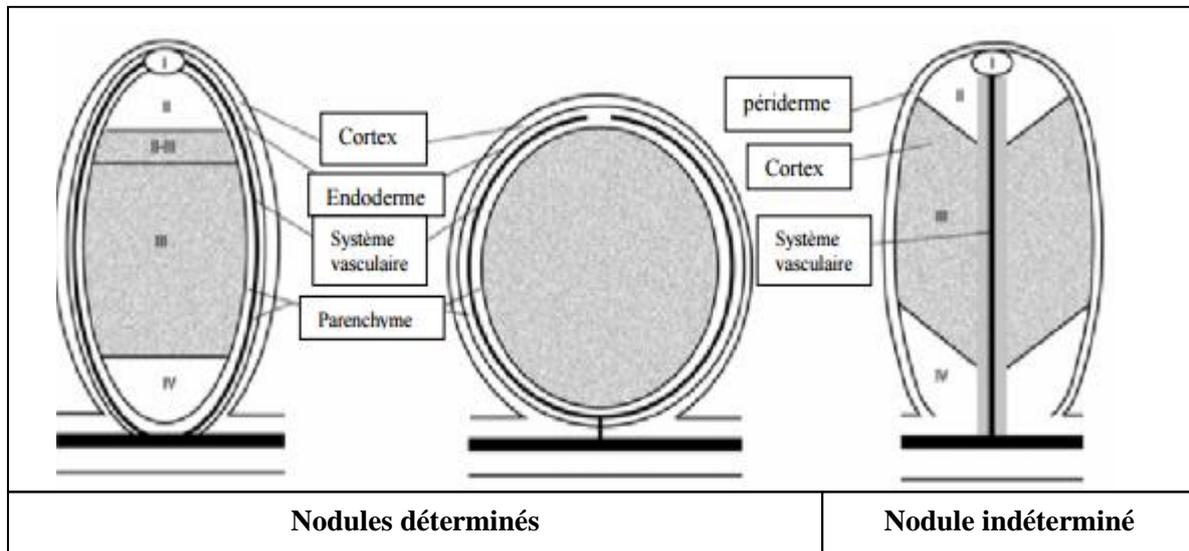


Figure 3: Structure des nodules déterminés et un nodule indéterminé (Pawlowski et Bisseling, 1996).

Tableau 1: Comparaison entre un nodule déterminé et un nodule indéterminé (Dommergues et al., 1998).

Type de nodule	Indéterminé	Déterminé
Site de la première division cellulaire	Cortex interne	Cortex externe
Croissance des nodules	Division cellulaire méristème persistant	Expansion et/ou division des cellules
Cordon d'infection	Large	Etroit
Transport	Amides	Urédés
Induction des gènes nod	Flavones Flavanones	Isoflavones

II.2.5.3 Les zones de nodule

L'un des meilleures études structurales sur la différenciation de *Rhizobium meliloti* et la formation des nodules a été publiée par le groupe Truchet à Toulous. La différenciation en nodule forme deux tissus principaux:

- Une partie centrale où se déversent les cellules bactériennes. Celles-ci augmentent fortement de taille et se transforment en bactéroïdes, séparés du cytoplasme végétal par une membrane spéciale.
- Une partie périphérique qui contribue à donner au nodule sa forme ballonnée ou en masse .Le nodule comporte quatre zones, qui sont évoquées par le croquis
 - a. **La zone méristématique** (zone 1) formé de petites cellules non contaminées par les rhizobia et qui assurent la croissance de la nodosité (Pelmout,1993).
 - b. **La zone de préfixation** (zone 2), qui comprend la zone d'invasion (zone de pénétration des cordons d'infection, où les cellules expriment les gènes des nodulines précoces), la partie proximale de la zone d'invasion où les *Rhizobiums* commencent à être relâchés du cordon d'infection et la zone de préfixation où les cellules de la plante hôte contenant les astéroïdes sont plus différenciés que dans la zone d'invasion (Dommergues et *al.*,1998).

Dans la région de la transition entre 2et3, les cellules végétales apparaissent fortement chargées en amyloplastés (graine d'amidon), qui délimite la zone symbiotique
 - c. **La zone de fixation** (zone 3) cette zone est le siège de la fixation de l'azote dont elle contient un très grande nombre de bactéries.
 - d. **La zone de dégénérescence** (zone 4), les cellules de la plantes hôte dégénérent. Cettezone apparaît normalement au bout de 5 semaines après l'infection initiale (Pelmout, 1993).

II. 3 Les étapes de la nodulation

✓ dialogue moléculaire

Le mode de reconnaissance de la symbiose entre légumineuses et *Rhizobia* est un processus complexe. Les bactéries fixatrices d'azote, présentes à l'état saprophyte dans la rhizosphère, répondent par chimiotactisme positif aux exsudats racinaires de la plante (Barbour et *al.*, 1991). Ces bactéries sont attirées par des acides aminés, des sucres, des acides dicarboxyliques de la rhizosphère, mais aussi des flavonoïdes (Figure 4). L'infection des légumineuses par des bactéries s'effectue par deux modes différents : via les poils absorbants où se il y a la formation de cordons d'infection, ou via des blessures occasionnées par des éléments extérieurs (Journet, 2004).

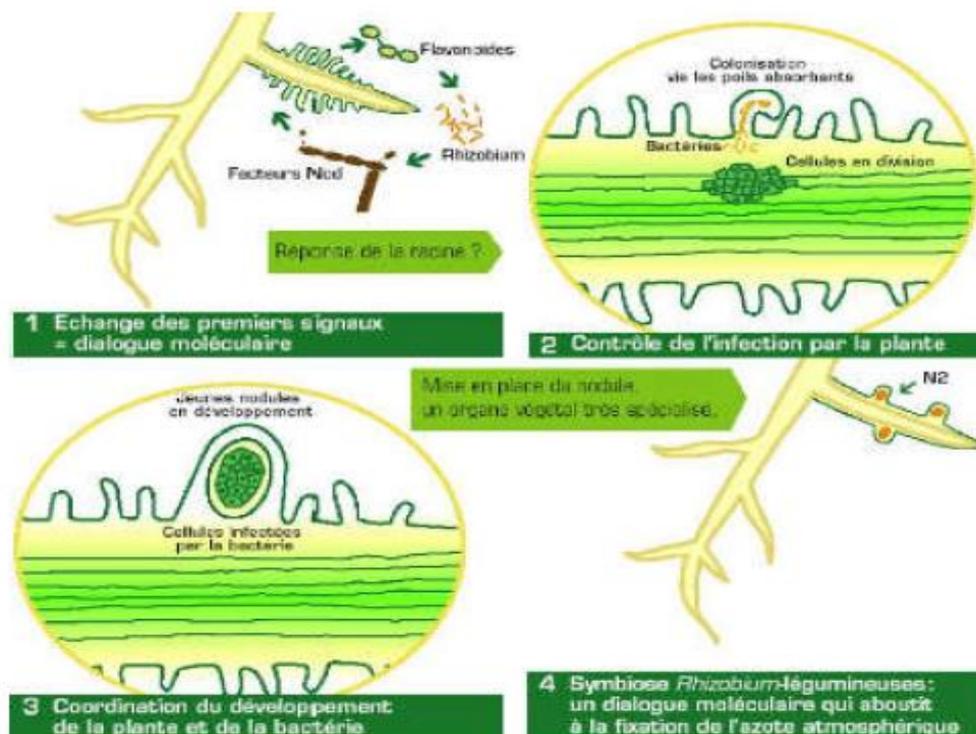


Figure 4: Schéma globale du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule (Journet, 2004).

II.3.1 Pré-infection

L'interaction entre la plante et la bactérie commence dans la rhizosphère, la croissance des bactéries s'effectue d'une manière sélective par la plante (Mouna, 2008). En effet, les

rhizobia sont attirés vers les poils absorbants des racines par une large gamme de substances de types flavonoïdes (Figure 5) et isoflavonoïdes, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine. D'ailleurs, en milieu pauvre en azote qu'une production est plus importante. Ainsi, les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires engendrent l'expression des gènes nod bactériennes qui va produire par conséquent des facteurs Nod. Et ces facteurs Nod induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte et la déformation du poil racinaire se poursuit (Mhadhbi et *al.*, 2008) .

II. 3.2 Infection

L'infection des racines pourrait avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil absorbant et en conséquence la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. La croissance des nodosités continue dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité (Mhadhbi et *al.*, 2008).

II.4 Génétique de la fixation

II.4.1 Les flavonoïdes

Ils se trouvent chez les végétaux, où ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les *Rhizobia*. Ces exsudats qui sont émis par les cellules des racines de légumineuses vont attirer la bactérie, qui en retour relâche des lipopolysaccharides (LPS) provenant de sa membrane. Ces LPS ont une structure antigénique spécifique, reconnue par la plante, la bactérie peut lyser la paroi de la cellule végétale et s'y introduire. Il y a formation d'un cordon infectieux, qui se ramifie au fur et à mesure de son passage dans d'autres cellules végétales. Dans le cytoplasme, les bactéries ne sont pas libres, elles sont regroupées dans des vésicules de séquestration. Si la cellule est diploïde, elle se nécrose et meurt. Si elle est tétraploïde en revanche, il y a formation d'un nodule (Bruneton, 1993).

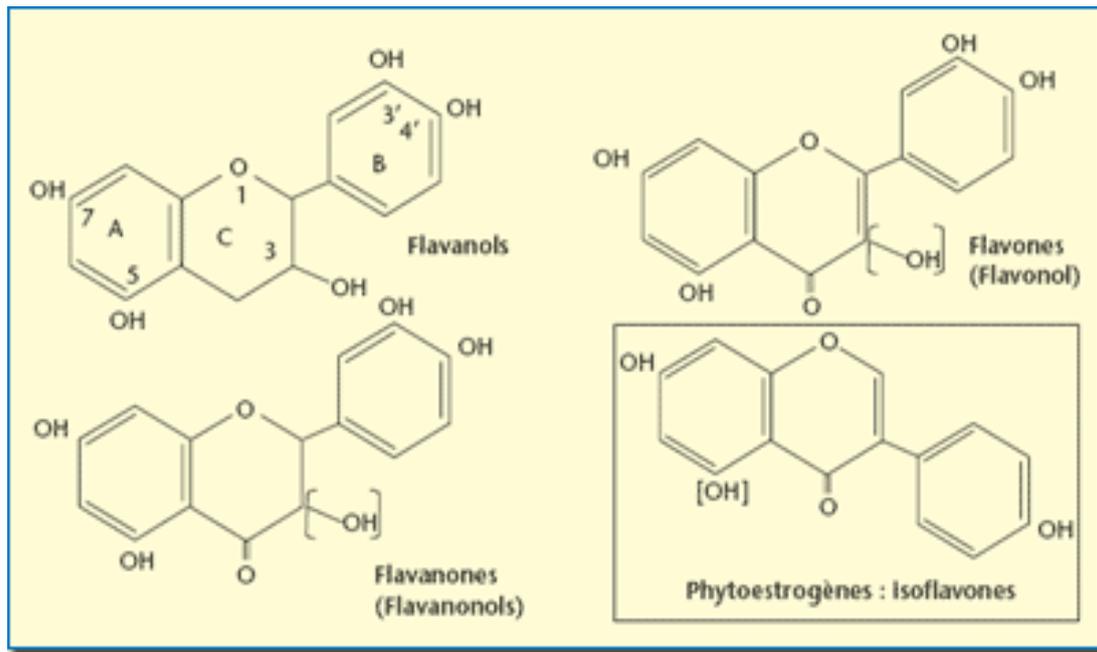


Figure 5 : Structure de quelques flavonoïdes présents dans les exsudats de plantes hôtes
(Bruneton, 1993).

II.4.2 Les facteurs nod

L'existence d'un facteurs de nodulation (dits facteur Nod) a été montrée la première fois chez *Rhizobium meliloti* (Pelmout, 1993). sont des lipo-oligosaccharides (LCO) constitué d'un squelette de moins de 20 résidus de N-acétyl-glucosamine réunies par des liaisons β (1-4) (Spaink et al., 1992), la nature de l'acide gras et varie avec la souche de *rhizobia* considérée (Dommergues et al, 1998). Sur lesquels sont fixés divers radicaux, ont été purifiés à partir de bactéries hyper-productrices.

La symbiose *Rhizobia*/ Légumineuse se met en place lorsque la bactérie forme des facteurs Nod qui vont être reconnus par la plante (Macheix et al., 2005), ils sont capables à concentration très faible (10-12 M, soit une molécule par cellule racinaire) (Denarié, 2000) d'induire, en l'absence de toute bactérie, la réponse de la racine : courbure du poil absorbant, formation du cordon d'infection et d'une nodosité. Le programme morphogénétique est donc entièrement codé par la plante, mais induit par le facteur Nod de la bactérie. Le facteur Nod se fixent sur le plasmalemmes végétal et entraînent des dépolarisations et des flux ioniques :

influx de Ca^{++} puis efflux de Cl^- , compensés plus tard par un efflux de K^+ . Bien qu'on ait des preuves indirectes de leur existence, les récepteurs des facteurs Nod restent inconnus (Selosse, 2006).

La structure des facteurs Nod, qui est contrôlée par un ensemble des gènes *nod* dits spécifique, détermine un deuxième niveau de spécificité (Dommergues *et al.*, 1998).

II.4.3 Les gènes *nod*

Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy *et al.*, 1994). Les gènes régulateurs *nodD* codent pour des protéines qui, en présence de signaux (de type flavonoïdes) sécrétés par la plante, activent l'expression des autres gènes *nod* de la bactérie ; ils sont dits gènes *nod* structuraux (Pelmont, 1993). Trois gènes *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC*) sont des gènes de nodulations communs à tous les rhizobiums ; ils codent pour le squelette chitinoooligosaccharidique des facteurs de nodulation . Une autre série de gènes de spécificité d'hôte, *nod E*, *F*, *G*, *H*, codent pour des modifications des facteurs *nod* (Hopkins, 2003).

II.4.2 Les gènes de la fixation :

II.4.2.1 Les gènes *nif*

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le rhizobium libre, ils sont au nombre de 20 (Dupuy *et al.*, 1994). Ils comportent des gènes structuraux de la nitrogénase dont *nif H*, *nif D*, *nif K* ; *nif H* codent pour la réductase alors que *nif D* et *nif K* le font pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Pelmont, 1995, Crossman, 2004). Les *Nif B*, *E* et *N* codent, eux, pour la synthèse du cofacteur FeMo de la dinitrogénase et enfin le *nif S* pour la maturation de la dinitrogénase (Werner, 1992).

II.4.2.2 Les gènes fix

Les gènes *fix* N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, *fix* G, H, I, S codent pour la pompe cationique, *fix* A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Crowley et Kraemer, 2007).

Chez tous les rhizobiums et quelque soit le groupe auquel ils appartiennent, il existe au moins un gène *nod* D et des gènes *nod* A, B, C. D'où l'hypothèse d'une origine unique de ces gènes clés impliqués dans les échanges de signaux de nodulation. (Dénarié *et al.*, 1996).

Ces gènes auraient ensuite été transférés horizontalement entre différents groupes de bactéries du sol, conférant à celles-ci l'aptitude à noduler les légumineuses.

Ce transfert latéral des gènes de nodulations a contribué à l'évolution et à l'étendue de la capacité symbiotique (Moulin *et al.*, 2001).

II.5 Biochimie de la fixation

II.5.1 La nitrogénase

La nitrogénase (*nif*, pour la fixation de l'azote) enzyme responsable de la réduction de l'azote moléculaire (Militao, 2004), est présent dans une grande variété de bactéries du sol et ne fonctionne que dans des conditions anaérobies, car le système enzymatique est inactive de manière irréversible par l'oxygène. La réaction générale de la formation de NH₃ peut s'écrire de la réaction suivante (Hallard, 2013):



La nitrogénase (Figure 6) est en réalité un complexe enzymatique formé de deux protéines: la première appelée composant 1 (la Fe- Mo- protéine), contient du fer et des molybdènes et composant 2 (la Fe- protéine) ne contient que du fer. Ces composants peuvent être dénommés respectivement dinitrgénase et dinitrogénase réductase (Hagman et Burris, 1978).

- Composant 1 qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, est un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ codé par les gènes *nifD* et *nifK*, c'est la composante principale du système de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4 Fe- 4S) relié entre eux deux par deux, ce tétramère est associé à un facteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire N₂

en NH_3 (Leclerc, 1995; Hopkins, 2003).

- Composant 2 c'est le donneur d'électrons, c'est un homodimère codé par le gène *nifH*, elle contient du fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa

Elle ne peut transporter qu'un électron à la fois.

Ainsi, on pense qu'elle sert probablement à l'emmagasinage temporaire de l'électron (Leclerc, 1995; Hopkins, 2003)

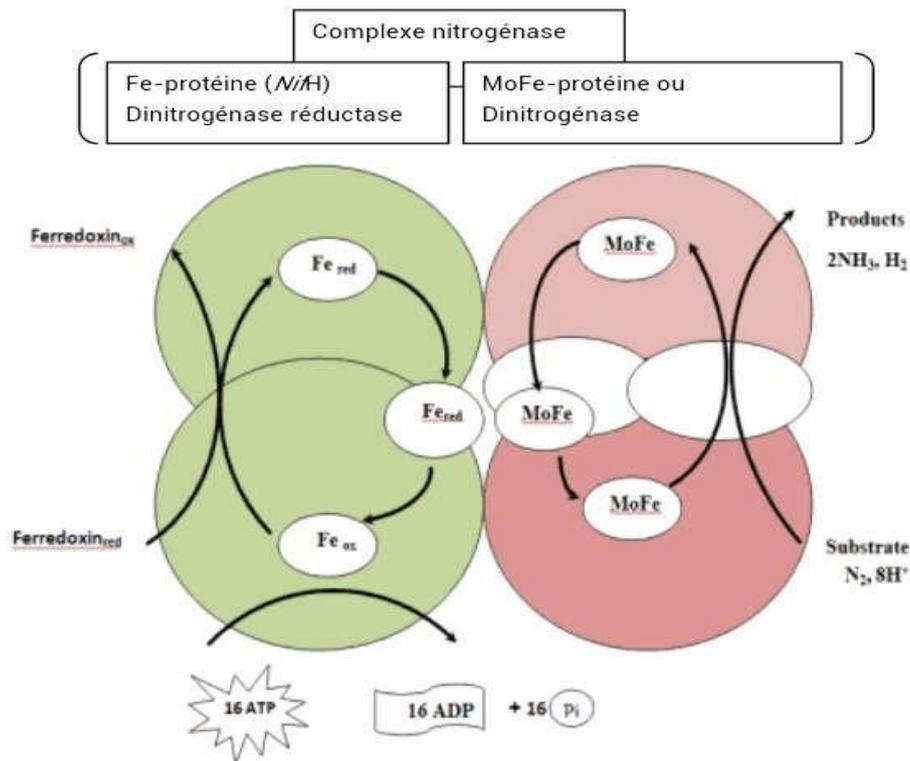


Figure 6: La nitrogénase (Yann, 2006)

II.5.2 La légghémoglobine

La composante de la protection de la nitrogénase qui est extrêmement sensible et l'inactivation par les concentration élevée en O_2 (noduline particulièrement affine pour l'oxygène, qui réduit la tension d' O_2 dans la nodule, elle interviendrait aussi en facilitant le transport de l' O_2 aux batéroïdes (Dommergues et *al.*,1998).

C'est une chromoprotéine formée de deux sous unités, de structure comparable aux globines ou de mycoglobine (Tourte et *al.*, 2005; Hopkin, 2003; Madigan et *al.*, 2007).

Synthétisée par la plante hôte, et peut constituer jusqu'à 30% des protéines de la cellule hôte (Hopkin, 2003).

Pour protéger la nitrogénase qui est sensible a l'oxygène, la leghémoglobine de coloration

rouge due a la présence du fer présente des similitudes avec les l'hémoglobine animales. Elle permet au *Rhizobium* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule (Kundu, 2003).

Chapitre II

Matériels et méthodes

I. Identification des souches de *Rhizobia* nodulant « *Genista Cineria* »

I.1. Zone de prélèvement

Les collectes des nodules sont réalisées à partir des racines de la plante *Genista Cineria* située dans la région de Tébessa (Bekkaria).

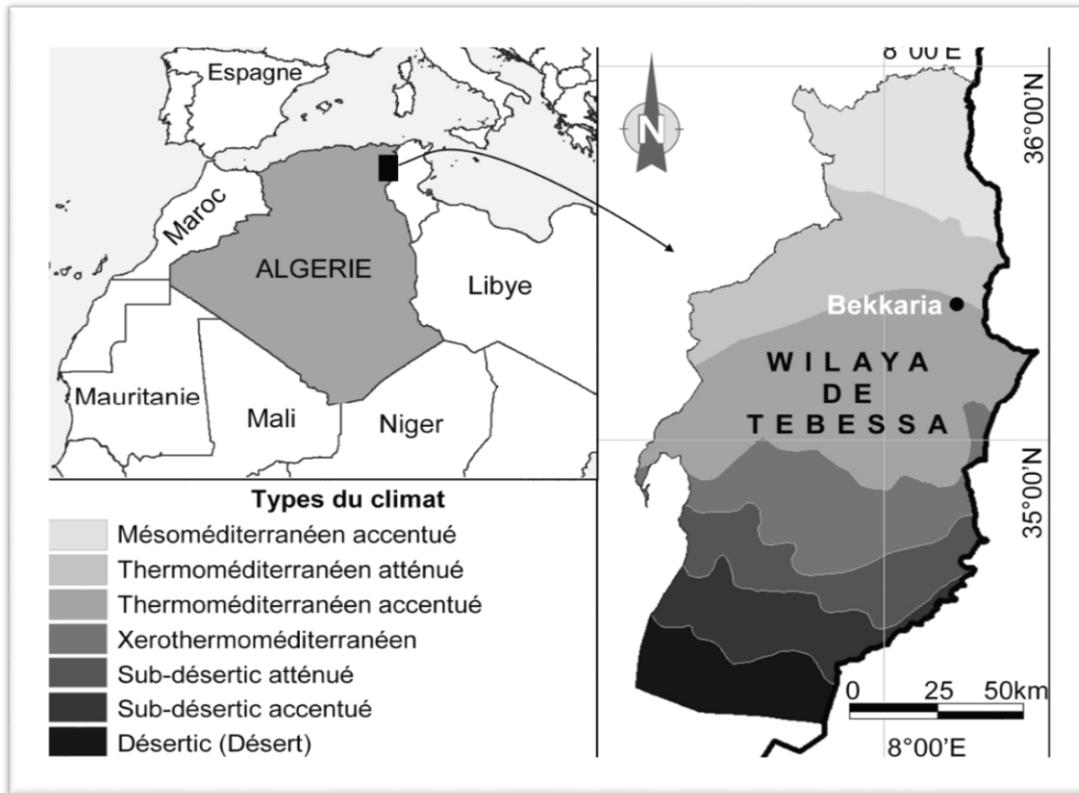


Figure 7 : La carte de la localisation géographique de Bekkaria.



Figure 8 : La plante de *Genista Cineria* dans le site de prélèvement

I.2. Le genet cendré «*Genista Cinerea*»

Le matériel végétal retenu dans ce travail concerne une légumineuse endémique de l'Algérie. Le genet cendré *Genista Cinerea* appartenant de la famille *Fabaceae*, arbuste port érigé et étalé, a longs rameaux flexueux et a écorce grise. Petites feuilles de 10mm de long et de 3 mm de large peu nombreuses. Lancéolées ou ovale, gris-vert et a revers soyeux. Floraison jaune d'or très parfumée en mai- juin (Michel, 2006).

I.3. Classification botanique Selon Ozenda (2007) :

Règne : tracheobionta

Sous-règne : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Genista*

Espèce : *Genista Cinerea*

II. Isolement des bactéries à partir des nodules

II.1. Collecte des nodules

La collecte 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 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules (surtout les racines secondaires qui portent souvent beaucoup nodules). Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet.



Figure 9 : Nodules prêts à être conservés.

II.2. Conservation des nodules

L'utilisation de souches de *rhizobia* isolées à partir des nodules prélevés sur des légumineuses est la méthode la plus efficace pour constituer une collection. Il n'est toute fois pas toujours possible de pratiquer les techniques d'isolement immédiatement après le prélèvement des nodules. Nous avons utilisé une méthode de conservation de ces nodosités afin que celles-ci ne subissent pas de détériorations irréversibles.

Pour un usage immédiat, les nodules peuvent être conservés au réfrigérateur à 4°C, à condition que le délai ne dépasse pas 48h. Pour une longue période de stockage, une dessiccation au chlorure de calcium (CaCl_2) est recommandée (Vincent, 1970), cela permet une conservation de 6 à 12 mois.

La conservation se fait dans un tube en verre contenant du CaCl_2 couvert de coton, les nodules sont déposés sur le coton et le tube est fermé hermétiquement et identifié d'une étiquette portant les informations suivantes :

- nom de la plante hôte ;
- date de conservation ;
- date et lieu de Collecte.

1- Stérilisation des nodules

Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol 95% puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure (HgCl_2) acidifié à 1% ($0.1\text{gHgCl}_2+0.5\text{mlHCl}+100\text{ml}$) pendant 30', ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

2- Ecrasement des nodules

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri à l'aide d'une pince stérile, flambée au bec Bunsen. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale.

3- Isolement de souches de *Rhizobia*

Après l'écrasement et l'obtention d'un jus trouble. A l'aide d'une anse de platine prélever la suspension de nodule est étalée selon la technique des quatre cadrans sur gélose coulé en boîte (YMA+RC), puis incubé dans une étuve à 30C° Pendant 48h (Vincent, 1970).

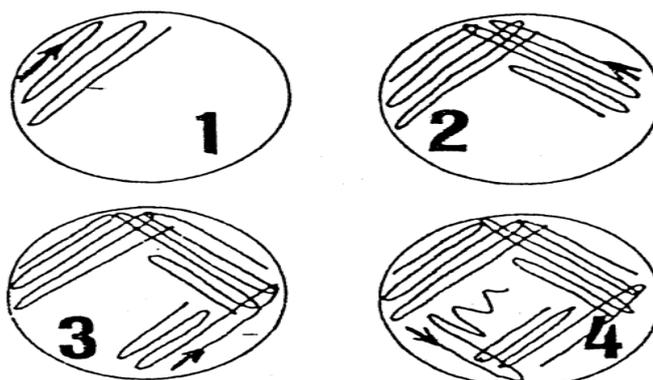


Figure 10 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

III. Les caractères culturels : Selon Vincent (1970)

Toujours, on note que toutes les manipulations se déroulent dans des conditions stériles c'est-à-dire autour de la flamme du bec bunsen et sur payasse bien désinfecter par l'eau de javel et l'éthanol absolue.

III.1. Les milieux des cultures utilisées pour la croissance des *Rhizobia* :

Il existe plusieurs milieux de culture utilisés pour la croissance et la caractérisation des Rhizobiums.

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries, pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants :

III.1.1. Milieu liquide

a- Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) : Bouillon de culture ne contienne pas d'agar –agar, il est totalement liquide, Ce milieu a la composition suivante en gramme/litre (Vincent, 1970):

Mannitol	10 g;
K ₂ HPO ₄	0.5 g;
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.2 g;
NaCl	0.1 g;
Extrait de levure	0.5 g;
L'eau distillée	1litre.

III.1.2. Milieu solide :

b- Milieu YMA : (Yeast Mannitol Agar) : Le milieu nutritif est un milieu de culture solide, mis au point par (Vincent, 1970). Ce milieu est utilisé pour isoler les bactéries symbiotiques fixatrices d'Azote, Ce milieu à la composition suivante en gramme/litre :

YMB	1.0litre;
Agar	15 g.

c- Milieu YMA-RC :

Le milieu nutritif Agar qui possède la même fonction, mais ce milieux contienne la solution de rouge Congo. Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dilué dans l'éthanol puis complété jusqu'à 100ml d'eau distillée) (Vincent, 1970), la composition du milieu est la suivante :

YMB :	1litre
Solution stock de rouge Congo :	1ml

Agar : 15 g.

d- Milieu YMA additionné de 20 % glycérol : Le milieu nutritif Agar qui possède la même fonction, mais ces milieux contiennent 20% de glycérol par litre et utilise pour la conservation des souches (Vincent, 1970), la composition du milieu est la suivante :

YMB (1litre);

Glycérol 20%;

Agar 15 g.

Tous les milieux, dont le pH a été ajusté à 6.8. Les milieux sont stérilisés dans un autoclave à 120°C pendant 20 min.

III.2. La culture dans les milieux :

a)- Le milieu YMB :

Les souches sont mise en culture dans des tubes sur milieu YMB, incubé 28°C dans un bain marie agitateur pendant 24h (Vincent, 1970).

b)- Le milieu YMA. RC :

A l'aide d'une anse de platine, la suspension bactérienne (isolat cultivé dans YMB) est prélevé et ensemencé dans des boites de pétri contenant le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) + rouge de congo RC, incubé dans une étuve à 30°C pendant 3 jours à une semaine (Vincent, 1970).

c)- Le milieu YMA :

L'ensemencement sur le milieu YMA se fait à partir de sa culture sur YMB incubé dans une étuve à 30°C pendant 48 h (Vincent, 1970).

III.3. Purification des rhizobiums et conservation des souches :

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux, des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis incubées à 28°C pendant 24h à 48h. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC (Tableau 02).

La conservation des souches se fait sur milieu YMA additionné de 20 % glycérol comme agent neutralisant l'acidité. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle (18h), des repiquages sont effectués sur la surface de la gélose. Après incubation à 28°C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 3 à 4 ans (Vincent, 1970).

Tableau 02 : Isolats et Souches de référence utilisés dans cette étude

	Code des souches	Souches	Plante-hôte	Origine Géographique	Sources
Les souches de références	A6	<i>Rhizobium sullae</i> <i>sp. nov</i> RHA6	<i>Hedysarum</i> <i>Coronarum</i>	Constantine Algérie	A. Bengueouar UNV. Constantine
	HS1	<i>Pseudomonas</i> <i>Hedysarum</i>	<i>Capitatum</i> <i>sp. NZ096</i>	Constantine Algérie	Y. Benhizia Constantine
	HnA	<i>Pantoea</i> <i>Agglomerans</i>	<i>Hedysarum</i> <i>Naudinianum</i>	Sétif Algérie	A. Troche Constantine
	Hca1	<i>Pseudomonas</i> sp. KD	<i>Hedysarum carnosum</i>	Constantine Algérie	Y. Benhizia Constantine
	HP7	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Hedysarum pallidum</i>	Sétif Algérie	A. Troche Constantine
Les isolats	GI	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébessa	Notre étude
	GIg15	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébessa	Notre étude
	GIg12	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébessa	Notre étude
	GIg13	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébessa	Notre étude
	GIg23	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébessa	Notre étude
	GIg11	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébessa	Notre étude
	GIg21	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébessa	Notre étude

	GI22	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	GIg14	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébéssa	Notre étude
	GD	Isolat	<i>Genista cineria</i>	Bakaria Tébéssa	Notre étude

G : Genista ; I : indéterminé ; D : déterminé ; g : grappe

IV. Tests physiologiques (Effet des facteurs abiotiques) :

IV.1. Effet de pH :

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB liquide à différents pH (2, 4, 8 et 10). La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 680 nm après incubation à 28°C dans un bain-marie agitateur pendant 24h.

IV.2. Effet de la salinité (Tolérance du NaCl) :

Le milieu utilisé pour réaliser ce test est le milieu YMB contenant des concentrations en NaCl (2%, 4%, 6%, 8% et 10%), le pH du milieu de culture est 6.8. les taux de croissances sont enregistrés en mesurant la densité optique des cultures bactériennes à 680 nm après incubation à 28°C dans un bain-marie agitateur pendant 24h.

IV.3. Effet de la température :

L'ensemble des souches sont mises en culture sur le milieu YMA solide dans des boîtes de Pétris et incubées à différentes températures : 4°C, 30°C, 37°C, 44°C et 55°C à l'étuve pendant une semaine.

V. Tests biochimiques (Tests nutritionnels) :

V.1. La source de carbone :

L'utilisation des sucres comme une seule source de carbone. Le test est réalisé sur le milieu YMB où le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D-Lactose, D-Fructose, D- Glucose, D- Galactose et D-Xylose, et la quantité de l'extrait de levure est réduit à 0.05g/l. Les tubes sontensemencés et incubés au bain-marie agitateur à 28°C pendant 24 heures. L'estimation de la croissance est réalisée en mesurant la densité optique à 680 nm (Jordan, 1984).

V.2. Utilisation des acides aminés comme source d'Azote :

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu défini 8 (Vincent, 1970) (Annexe 01) exempt de glutamate de sodium et additionné chaque fois de divers acides aminés : L-Leucine, L-Alanine, L-Proline, L-Isoleucine et L-Cystéine. Les tubes sontensemencés puis incubés à 28 °C. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à 680 nm (Sebihi, 2008).

VI. Analyses statistiques :

L'exploitation des données obtenues a été réalisée par l'utilisation des logiciels MINITAB 16, commençant par une ANOVA à deux facteurs avec quatre répétitions par échantillons, ainsi que pour la classification hiérarchique ascendante (CAH). Par contre le test de corrélation de PERSONNÉ a été réalisé en utilisant le logiciel Excel stat 2014.

Chapitre III

Résultats et discussion

I. Caractérisation culturaux :

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de *Geniستا cineria* , nous avons tenu compte 10 isolats avec cinq souches de références A6, HS1, HnA, Hca1et HP7, la sélection des isolats se fait selon les deux critères : pour leur vitesse de croissance et les isolats qui n'absorbent pas ou peu le rouge Congo.

I.1. Croissance sur YMA. RC :

La Croissance sur YMA. RC des souches isolées à partir des nodules de *Geniستا cineria* a donné au bout de 24 à 72h, des colonies absorbant très peu ou pas le Rouge Congo restant ainsi rose à blanchâtre sur le milieu YMA-RC (Figure 11), Ceci est observé chez la majorité des *rhizobia* (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

Cette propriété est commune avec le genre *Bradyrhizobium* ; par contre le genre *Agrobacterium* et les formes contaminants absorbent fortement ce colorant (Jordan, 1984). Nos résultats sont convenables avec ceux de Benahmed, (2009) qui a mentionné que pour la souche de référence A6 à une faible absorption du RC. Les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le RC (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984 et Sebihi, 2008).

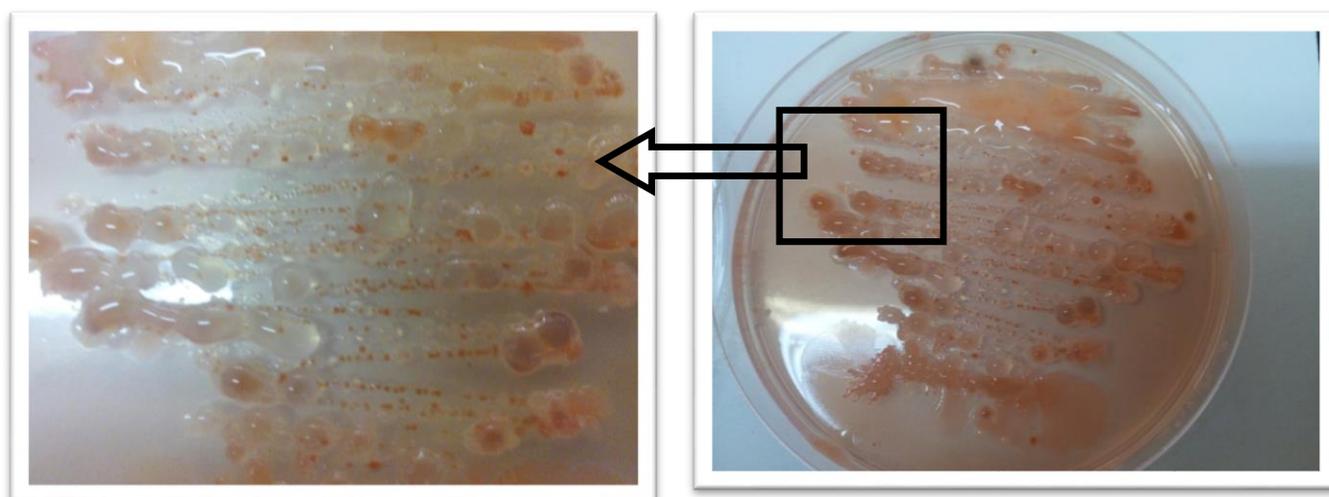


Figure 11 : Aspect morphologique d'isolat GIg1-5 sur le milieu YMA-RC après 6 jours d'incubation 30C°

I.2. Croissance sur bouillon YMB :

Le bouillon YMB est utilisé comme support de repiquage d'un milieu à un autre. Une fois ensemencé et après 24h d'incubation à 28°C, il se caractérise par l'apparition d'un trouble

(Figure 12), ce qui a été observé au niveau de tous nos isolats. Les mêmes résultats avancés par Vincent (1970) ; Jordan (1984).



Figure 12 : Apparition d'un trouble après incubation pendant 24h sur bouillon YMB

I.3. Croissance sur YMA:

L'ensemble des isolats présentent des colonies, après 24 à 72 heures d'incubation dans une étuve à 28° C. Les colonies obtenues présentent quatre aspects macroscopiques de couleur blanchâtre, translucides, lisses et visqueuse (Figure 13). Les isolats se caractérisent par une forte viscosité due à une production excessive et abondante des exopolysaccharides et de Poly β -hydroxybutyrate (Zahran, 1999 et Bouras, 2006).

Il y a une différence dans la vitesse de croissance, entre les colonies des différents isolats. L'ensemble des isolats (GI, GIg1-5, GIg1-2, GIG1-3, GIg2-3, GIg1-1) présentent une croissance rapide, et pour les isolats (GIg2-1, GI2-2, GIg1-4, GD) présentent une croissance lente (plus de trois jours d'incubation).

Cette propriété montre qu'il y a une biodiversité entre les isolats (Ndoy, 2005), Nos résultats sont en accord avec ceux de (Dib, 2013) qui ont décrit une croissance lente pour certains isolats de *Astragalus armatus* aussi.

La première classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* s'était basée sur ce critère (Jordan, 1984). En fait, les souches à croissance rapide (du genre *Rhizobium* possèdent un taux de régénération inférieur à six heures) (Perry et al., 2004, Somasegran et Hoben, 1994).



Figure 13: Aspect morphologique d'isolat sur le milieu YMA après 6 jours d'incubation

II. Tests physiologiques (Effet des facteurs abiotiques):

Généralement, les souches de *Rhizobia* possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans les zones arides et semi-arides. Les principaux facteurs limitant de l'activité biologique sont: les températures élevées, les pH extrêmes et la salinité élevée (Cacciari et *al.*, 2003).

II.1. Effet de pH :

Il ressort de l'histogramme (Figure 14), que les isolats (GI,GIG1-5,GIG1-2,GIG1-3,GIG2-3 et GIG1-1) et les souches de références testées tolèrent majoritairement les deux types de pH utilisés dans cette étude, le pH acide (04) et alcalin (8.0 ; 10). Ainsi que les isolats testés (GIg2-1, GI2-2, GIg1-4 et GD) ne sont pas capables de pousser dans pH2 ou croissance très faible ($D.O \leq 0.1000$), les isolats GIg1-5 ,GIg1-3 et GIg1-1 présente une croissance optimale ($D.O \geq 0.8000$ dans les pH 8 et 10).

Ces résultats concordent ceux de Raza et *al.* (2001), qui ont trouvé que les *Rhizobium sp* du lupin tolèrent les variations du pH (de 04 à 10).

Selon Jordan, (1984), les souches à croissance lente semblent être plus tolérantes aux pH faible que les souches à croissance rapide (plus sensibles à l'acidité) et Rai et *al.* (2012) a également signalé que les *rhizobia* à croissance rapide sont capables de croître à un pH de 4.

En général, les rhizobiums sont des bactéries neutrophiles, cependant leur pH optimal de croissance peut varier (El-Hilali, 2006), et la croissance des isolats dans pH 6.8 présente une bonne croissance.

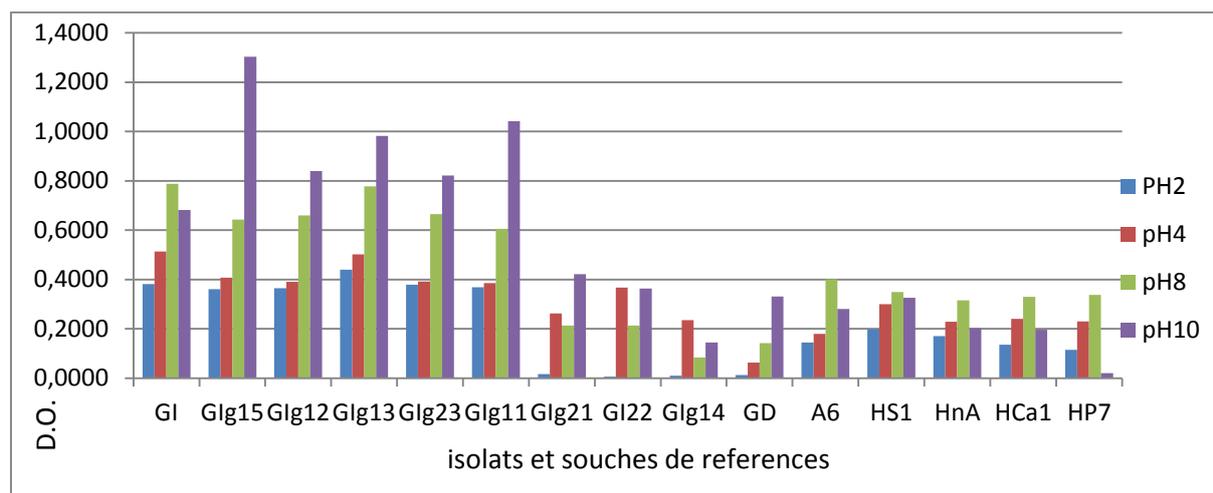


Figure 14 : Effet des différents pH sur la croissance des isolats et les souches de références

L'analyse statistique des données (Annexe 03) fait montrer une différence très hautement significative entre les pH utilisés, et une différence très hautement significative entre les isolats (à un seuil de signification $\alpha=0,001$) mais pour l'interaction entre les pH et les isolats fait montrer une différence très significative ($p < \alpha = 0.01$).

Les résultats enregistrés (Tableau 3) sont en concordance avec celles avancés par Maatallah et *al.* (2002), qui ont détecté une croissance de leurs isolats à des valeurs de pH comprises entre 4 et 7.5 et plus. Une croissance optimale de la majorité des isolats est observée au pH neutre, ainsi qu'au pH alcalin (8.0 et 10).

II.2. Effet de la salinité (Tolérance au NaCl) :

Les résultats obtenus sont rapportés dans la (Figure16), pour les isolats et les souches de références montre que tous les isolats se développent en présence des concentrations de NaCl variant 2% à 10%, ils sont considérés comme halotolérantes.

En effet, des résultats équivalents sont notés par Jebara et *al.* (2001) et Abbas et *al.* (2001) sur le fait que les *Rhizobia* à croissance rapide peuvent tolérer des concentrations supérieures à 2%, ainsi qu'à partir de L'histogramme obtenu on observe que tous les isolats supportent plus des concentrations de NaCl 2%, 6% et aussi 8% (croissance optimale), par contre le développement des isolats dans le NaCl 4% elle est varié. Ce qui correspond aux résultats de Gaur et Sen, (1981) affirmant que plusieurs souches de *Mesorhizobium ciceri* (d'origine indienne) tolèrent plus de 2% de NaCl.

Selon Miller et Wood, (1996) ont rapportés que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations

élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs (Csonka et Hanson, 1991). Certains auteurs ont rapporté que les *rhizobia* sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Zahran, 1999, et Bishnoi, 1999), l'effet d'inhibition de la salinité sur la nodulation a été attribué par les mêmes auteurs à la diminution de la colonisation des *rhizobia*, et le manque de formation des poils racinaires.

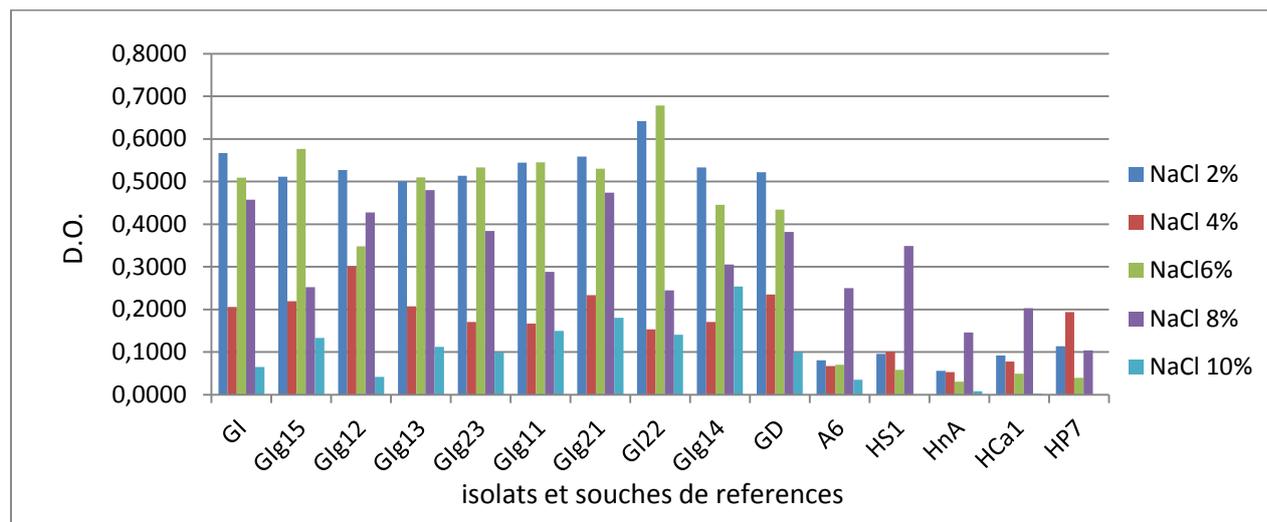


Figure 15: Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des isolats et les souches de références.

L'étude statistique (Annexe 03) des résultats fait ressortir une différence très hautement significative entre les pourcentages de NaCl utilisés (à un seuil de signification $\alpha=0,001$), et une différence non significative entre les isolats avec une interaction entre les isolats et concentrations NaCl très significative ($p<\alpha=0,05$). Des résultats rapportés par Merabet et *al.* (2006), montrent que les *rhizobia* tolèrent une salinité allant jusqu'à 5% de NaCl in vitro.

II.3. Effet de la température :

Les résultats obtenus (Tableau 03), montrent que toutes les souches testées sont capable de croître entre 4°C et 55°C à l'exception des souches de références HS1, HnA, Hca1 qui n'ont pas poussés à la température 44°C et 55°C avec les deux isolats GIG2-3 et GIG1-1 qui n'ont pas poussés à la température 55°C.

La plupart des isolats sont capables de croître à une température de 4°C jusqu'à 55°C, et montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 20° à 37°C. Toutefois nos isolats sont

capables de pousser à 40°C et plus ou moins dans la T° 44 °C et 55°C. Ces résultats rejoignent ceux de Jordan, (1984) et Graham, (1992) qui montrent que l'espèce *Rhizobium* se développe mieux entre 20°C et 40°C.

L'action de la température n'a pas d'effet de la même manière sur les bactéries dans leur habitat naturel, dans la mesure où les composants du sol exercent une action protectrice

Tableau 3 : Effet de la température sur les isolats et les souches de références

	T°	4°C	30°C	37°C	44°C	55°C
Souches de références	A6	+ (6j)	++	++	+	+
	HS1	+	++	++	-	-
	HnA	+	+	+	-	-
	Hca1	+ (6j)	+	+	-	-
	HP7	+ (6j)	++	+	+	+
Les isolats	GI	+	+	+	+	
	GIg1-5	+	+	+	+	+
	GIg1-2	+	+	+	+	+
	GIg1-3	+	+	+	+	+
	GIg2-3	+	+	+	+	-
	GIg1-1	+	+	+	+	-
	GIg2-1	+	+	+	+	+
	GI2-2	+	+	+	+	+
	GIg1-4	+	+	+	+	+
GD	+	+	+	+	+	

(-) pas de croissance, (+) croissance normale, (++) bonne croissance

III. Caractérisation biochimique (Tests nutritionnels) :

III.1. Utilisation des sources de carbone (sucres) :

La représentation graphique des mesures de la densité optique (Figure 16), nous indique clairement la différence d'assimilation des sucres par les isolats, le galactose et le xylose Présentent une bonne source de carbone. Par contre les souches de référence assimilent bien les sucres qui sont utilisés (mono et disaccharides).

Ce résultat est conforme avec la bibliographie sur les *rhizobia* selon Jordan, (1984) ; Vincent, (1982), ils utilisent faiblement les monosaccharides (Glucose, Xylose et Fructose) et di saccharides (Lactose).

Les *rhizobia* présentent un large spectre d'assimilation vis-à-vis des hydrates de carbone. Les *rhizobia* à croissance rapide ont la capacité de produire l'enzyme NADP-6 phosphogluconate déshydrogénase qui leur permet d'utiliser une large gamme de sucres par rapport aux bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*). (Martinez-Romero et al., 1991).

Les *Rhizobiums* ont une aptitude à assimiler les mono- saccharide comme le fructose, galactose, par contre Les *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides (Graham, 1964).

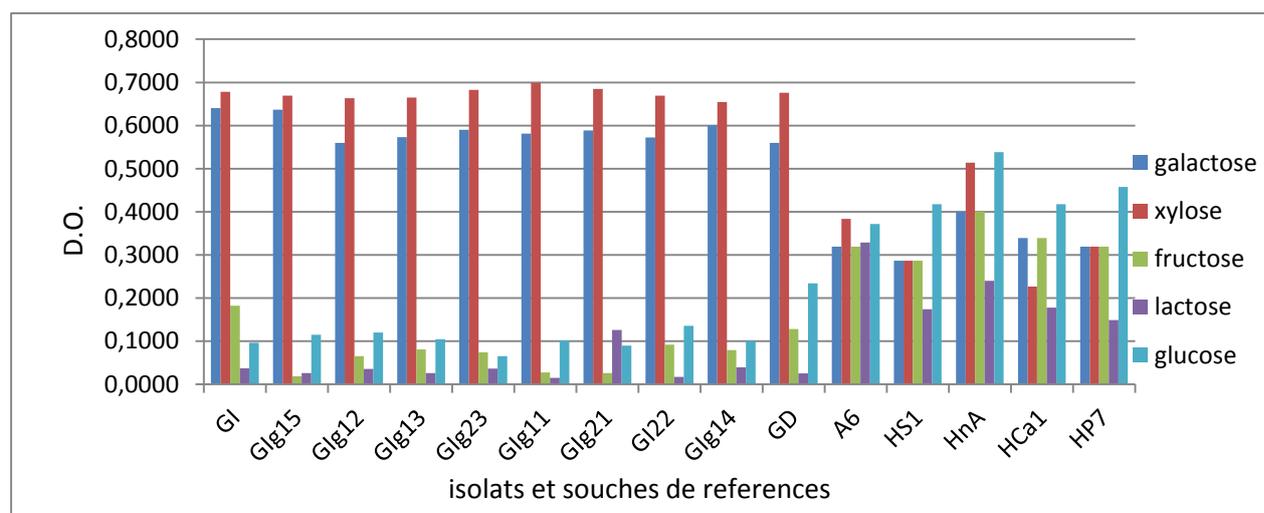


Figure 16: Utilisation des sucres comme sources de carbone par les isolats et les souches de références.

L'étude statistique ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée (Annexe 3) selon la source d'azote (DO en fonction des sucres et isolats) (Tableau 4), montre une différence très hautement significatives entre les sucres utilisées (à un seuil de signification $\alpha=0,001$), ainsi qu'une différence non significative dans l'utilisation de ces derniers par les isolats et les souches de références (Tableau 5) et aussi pour l'interaction entre les Isolats et sucres. D'autres auteurs constatent également un degré de différence dans l'assimilation des hydrates de carbone (Struffi et al., 1998, Rodriguez et al., 1987).

III.2. Utilisation des acides aminés comme source d'Azote

La représentation graphique des mesures de la densité optique (figure 18), nous indique clairement la différence d'assimilation des acides aminés par les isolats. Nos isolats et les souches de références montrent une bonne croissance avec L-Leucine et L-Proline (Annex 02) ces résultats rejoignent ceux de (Saoudi, 2008) qui ont avancés que les *Rhizobia* assimilent beaucoup mieux l'histidine, l'alanine, la glutamine, la cystéine et la proline que le reste des aminoacides.

Toutefois, isolats et souches de référence assimilent très bien les acides aminés utilisés (Tableau 04). Jordan, (1984) ; Somasegaran et Hoben, (1994) ont constaté que beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les *rhizobia*.

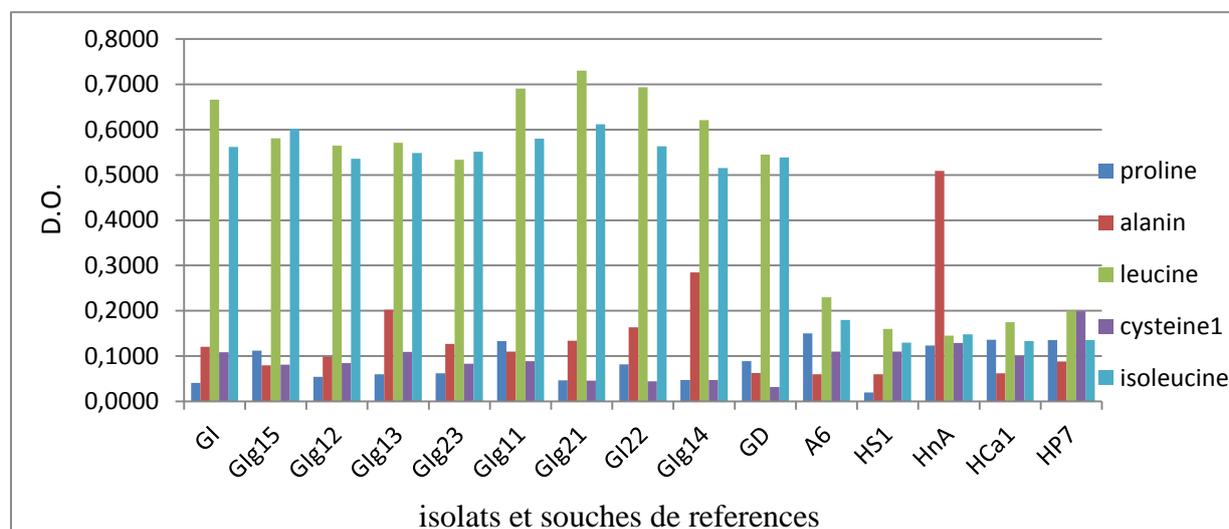


Figure 17 : Utilisation des acides aminés comme source d'azote par les isolats et les souches de références.

L'étude statistique ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée (Annexe 03) selon la source d'azote (DO en fonction des acides aminés et isolats) (tableau 04) montre une différence très hautement significatives entre les acides aminés utilisés, ainsi qu'une différence non significative dans l'utilisation de ces derniers par les isolats et les souches de références. (Tableau 5) et aussi pour l'interaction entre les Isolats et les acides aminés.

Ce qui va dans le sens des résultats de Nour et *al.* (1994) qui indiquent que les acides aminés ne peuvent pas être utilisés comme source d'azote et qu'ils peuvent même jouer un rôle d'inhibiteurs pour la croissance rhizobienne (Jordan, 1984).

Tatbleau 04 : ANOVA à deux facteurs avec répétition contrôlée des quatre paramètres étudiés

Paramètres	Sources de variation	Dl	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Sources de carbone	Isolats	9	0,03947	0,03947	0,00439	1,09	0,373NS
	Sucres	4	15,0329	15,0329	3,75823	935,22	0,000***
	Isolats*Sucres	36	0,19639	0,19639	0,00546	1,36	0,106NS
	Erreur	150	0,60278	0,60278	0,00402		
	Total	199	15,87154				
Sources d'azote	Isolats	9	0,08713	0,08713	0,00968	1,4	0,195NS
	A.A.	4	11,9896	11,9896	2,9974	432,11	0,000***
	Isolats*A.A.	36	0,34047	0,34047	0,00946	1,36	0,102NS
	Erreur	150	1,04049	1,04049	0,00694		
	Total	199	13,45768				
pH	Isolats	9	7,56444	7,56444	0,84049	24,61	0,000***
	Ph	3	4,63291	4,63291	1,5443	45,21	0,000***
	Isolats*Ph	27	2,16893	2,16893	0,08033	2,35	0,001**
	Erreur	120	4,09888	4,09888	0,03416		
	Total	159	18,46516				
NaCl	Isolats	9	0,07741	0,07741	0,0086	0,84	0,582NS
	NaCl	4	5,33251	5,33251	1,33313	129,91	0,000***
	Isolats*NaCl	36	0,76616	0,76616	0,02128	2,07	0,001**
	Erreur	150	1,53934	1,53934	0,01026		
	Total	199	7,71542				

[(*) $P < \alpha = 0,05$] : Différence significative;

[(**) $P < \alpha = 0,01$] : Différence très significative;

[(***) $P < \alpha = 0,001$] : Différence très hautement significative;

[NS] : Différence non significative.

IV. Biodiversité des isolats :

Le coefficient de PEARSON représenté sous forme d'une matrice des corrélations est élaboré à la base des données enregistrées pour les paramètres étudiés effet du pH, effet de salinité, sources de carbone et sources d'azotes (Tableau 05).

Cette analyse fait ressortir des couples de similarité significatives à un seuil de signification $\alpha=0,05$ entre les isolats. [(GI, GIg2-3)=96,7%*,(GIg1-5, GIg1-1)=98%*, (GIg1-2, GIg1-3,GIg2-3)=97,3%*,(GIg 1-3, GIg 2-3)=98,2%*, (GIg2-1 , GI-22) = 94,3%*,(GIg1-4, GI2-2) = 92,3%* (GD, GIg2-1) = 94%*.

Ce coefficient nous permet d'évaluer et d'estimer le pourcentage de similarité entre les dix isolats deux à deux. L'interprétation de cette analyse montre que il n'y pas une similarité significative entre les isolats et les souches des références (A6 : *rhizobium* et les γ *protéobactérie*).

La classification hiérarchique ascendante des isolats à partir des résultats obtenus, permet d'avoir une première indication sur la biodiversité des isolats nodulant la légumineuse *Genista Ceniréa* (Figure 18). A partir de laquelle on peut avancer que les isolats regroupés dans un seul cluster lié au cluster des souches de références avec un taux de similarité égale à 43.22%, ainsi les clusters des isolats présentent un taux de similarité de 71.60% entre eux. Par ailleurs il existe également une biodiversité au sein des micro-symbiotes de la plante hôte *Genista Cenirea*, formant ainsi trois sous cluster différents SCI :(GD, GIg1-4,GI2-2 etGIg2-1)=94.83%, SCII :(GI,GIg1-2, GIg2-3 et GIg1-3)=97.12%, SCIII :(GIg1-5 et GIg1-1) = 99.00%.

D'autre part le (SCI) est relié au deux sous clusters SCII et SCIII à un niveau de similarité égale à 71.60% tant dis que les deux autres clusters SCII et SCIII affichent un taux de similarité de 92.70%.

Ces résultats sont en accord avec de nombreux auteurs qui ont montré qu'il existe une grande diversité parmi les souches isolées des nodules d'une même légumineuse (Prescott et *al.*, 2006) ; (Dib, 2013) et (Merabet et *al.*, 2006).

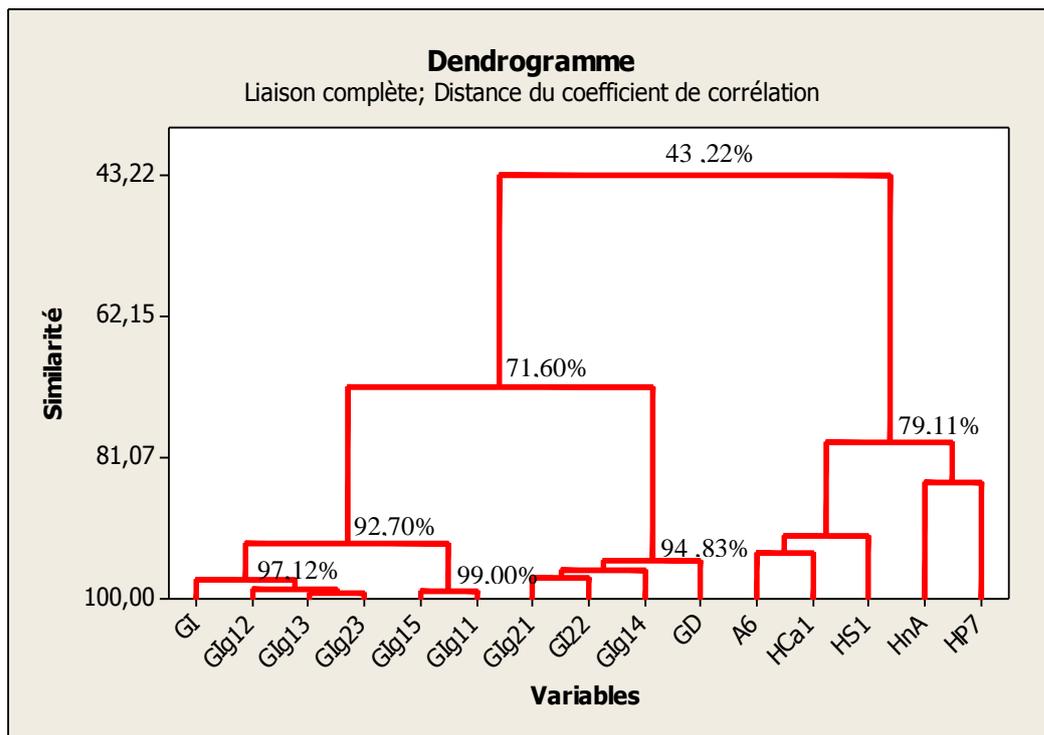


Figure 18 : Classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références.

Conclusion

Dans cette étude nous avons essayé d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules de des racines de l'espèce végétale *Genista cinerea* légumineuse médicinale et fourragère qui est prélevée à partir de région semi-aride de Tébessa (Bekkaria) et de les caractériser en présence de cinq souches de référence : A6, HS1, HnA, Hca1 et HP7.

Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux *rhizobia* selon Vincent, (1970) ; Somasegaran et Hoben, (1994) et Jordan, (1984). Cette caractérisation a pour but l'étude de la biodiversité des isolats, par une approche phénotypique, physiologique et biochimique en présence des souches de référence dont leur position taxonomique est connue. *Rhizobium sultae* (Benguedouar, 2000) et des souches appartenant à la classe des *Gamma protéobactéria* isolées et caractérisées par Benhizia et al. (2004).

Les dix isolats absorbent peu le Rouge Congo restant ainsi rose à blanchâtre sur le milieu YMA-RC, ayant une vitesse de croissance lente avec des aspects macroscopiques différentes couleur blanchâtre, translucides, visqueuse et circulaires sur le milieu de culture YMA. Ces aspects qui rapprochent nos isolats à des caractéristiques des *Rhizobia*.

L'étude des facteurs abiotiques (NaCl, pH et température) fait ressortir que les souches isolées des racines de la Légumineuse *Genista cinerea* et les souches de références tolèrent des concentrations relativement élevées en NaCl. Ceci est constaté dans la plupart des travaux en relation avec la taxonomie des *rhizobia*, Cette tolérance s'explique le plus souvent par la présence de molécules osmoprotectrices dans les cellules bactériennes (Nour et al., 1995). La croissance des isolats est observée aussi bien à pH voisin de l'acidité qu'aux pH alcalins (pH4 à pH10). Dans la mesure où les racines sont prélevées à partir des racines d'une plante située dans une zone semi-aride (région de Bekkaria), on note que les isolats se développent bien aux températures de 20°C et 37°C. Les tests nutritionnels montrent que les souches utilisent une large gamme de carbohydrates et préférentiellement les monosaccharides que les disaccharides. D'autre part elles n'exigent pas la présence du mannitol comme seule source de carbone (Struffi et al., 1998).

D'autre part l'ensemble des bactéries n'assimilent pas de la même manière les acides aminés ; elles se cultivent bien en présence de l'histidine, l'alanine, la glutamine, la cystéine et

Conclusion générale

la proline contrairement à l'espèce *Mezorhizobium ciceri* qui utilise uniformément tous les aminoacides.

L'analyse statistique fait ressortir que les isolats montrent une biodiversité remarquable qui nous permet d'avancer que notre plante hôte *Genista cinerea* peut être noduler par plusieurs souches de *Rhizobia* présentes au niveau de la rhizosphère.

La classification hiérarchique ascendante des isolats et des souches de références, révèle le rapprochement des critères culturels et morphologiques de nos isolats aux celles affichés par les souches de références, et pour cerner d'avantage la position taxonomique des isolats il est judicieux d'approfondir cette investigation en améliorant plusieurs points :

- La détermination du statut taxonomique des isolats de cette étude par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'ADNr 16S. L'hybridation ADN/ADN pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les *rhizobia* ou parmi un tout autre genre des *Protéobactéries*.

- Elargir le champ de comparaison entre les isolats et les souches de référence en adhérent autres souches de *rhizobia* localisé surtout dans le bassin méditerranéen.