

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université Mentouri Constantine**  
**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**  
**Département des Sciences de la nature et de la vie**

N° d'ordre : **215/Mag/2006**

N° de Série : **016/SN/2006**

**Mémoire de Magister**  
**En**  
**Biochimie et Microbiologie Appliquée**

Présenté par :

**Asma TORCHE**

Thème

**Isolement et caractérisation des bactéries  
nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum***

**Soutenue le : 20/09/2006**

**Devant le jury :**

**Président :** M<sup>ème</sup>. **Zahia Meraihi** Professeur. Université de Constantine

**Rapporteur :** **Mr. Amar Benguedouar** Professeur. Université de Constantine

**Examineurs :** M<sup>ème</sup>. **Aicha Mechakra** Maître de conférences. Université de Constantine

**Mr. Yacine Benhizia** Maître de conférences. Université de Constantine

Année universitaire : 2005-2006

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent particulièrement au Docteur Amar BENGUEDOUAR et le Docteur Yacine BENHIZIA du laboratoire des Biotechnologies, pour m'avoir proposé le sujet de thèse.

Je ne saurais remercier assez mon directeur de thèse le Docteur Amar BENGUEDOUAR pour m'avoir accepté dans son laboratoire, m'encadrer et m'avoir suivie régulièrement pour la réalisation de ce travail et de tout ce qu'il a fait pour me permettre d'atteindre ces résultats.

Par ses grandes qualités humaines, le Docteur Yacine BENHIZIA a su me guider et m'encourager depuis mes années de graduation, il m'a apporté à tout moment de précieux conseils dans l'orientation et la conduite de mes travaux. Je le remercie infiniment pour tout ce qu'il a fait pour rendre possible ce travail et d'avoir accepté de juger le fruit de mes efforts.

Mes remerciements s'adressent également Au Professeur Andrea SQUARTINI et l'équipe du laboratoire de Biotechnologie agraire de l'Université de Padova;

Au Professeur Douadi KHELIFI pour m'avoir ouvert son laboratoire sans aucune restriction et avec une grande modestie;

A madame Hayet BENHIZIA qui m'a énormément aidé plus particulièrement pendant les moments difficiles;

Au Docteur Mohamed Laid HADDI, M. Nadjib BOURGHOUD et le Docteur Nouredine KACEMCHAOUECHE pour ces nombreuses aides;

A toute l'équipe du laboratoire des Biotechnologies du département SNV de Constantine pour leur soutien matériel et moral;

A toutes et à tous qui, de loin ou de près, ont contribué à la réalisation de ce mémoire;

Aux membres du Jury d'Examens : M<sup>eme</sup> Zahia MERAIHI professeur de l'université de Constantine et M<sup>eme</sup> Aicha MECHAKRA maître de conférence de l'université de Constantine qui m'ont fait l'honneur de leur présence et d'avoir sacrifié leur temps pour juger ce travail.

## الملخص:

تم عزل مجموعة من البكتيريا انطلاقا من العقد الجذرية لعدة أنواع من النبات البقولي  
لجنس *Hedysarum* : *H. pallidum* ( مستوطنة بشمال إفريقيا ) ، *H. spinosissimum*  
*subsp capitatum* ( نوع من غرب المتوسط ) ، *H. carnosum* ( مستوطنة بشمال  
إفريقيا) و *H. naudinianum* ( مستوطنة بالجزائر).

بالنسبة لنوع *H. naudinianum* فإنها أول دراسة يتم من خلالها تبين علاقة التعايش  
نبات بقولي - بكتيريا.

تعريف السلالات البكتيرية تضمن مجموعة من الدراسات المرفولوجية متنوعة بدراسة  
مظهرية تحوي : الاختبارات التفريقية ما بين جنسي *Rhizobium* و *Agrobacterium* ،  
اختبارات بيوكيميائية و فيزيولوجية، إضافة إلى تبين مقاومة و حساسية السلالات للمعادن الثقيلة  
و المضادات الحيوية وكذا البكتريوفاجات.

قدرة العزلات البكتيرية على تكوين عقد جذرية على جذور النبات العائل تم تقديرها عن

طريق اختبار تكوين العقد الجذرية وفق طريقة Vincent (1970) .

تم إجراء تقنية الهجرة الكهربائية على جال عديد الاكريل أميد تحت ظروف التشويش

(SDS-PAGE) لتبيين محتوى البروتينات الكلية للعزلات.

التعريف الوراثي للعزلات البكتيرية كان عن طريق دراسة جزيئية بواسطة تقنية ARDRA

(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) باستعمال أنزيم الحصر *CfoI*

ثم تبين تتابع القواعد النيوكليوتيدية .

من الناحية المظهرية ، العزلات أعطت نتائج مشابهة للسلالات الشاهدة ،

*Gammaproteobacteria* ، وقد تم تأكيد ذلك من الناحية الوراثية.

الكلمات المفتاحية: *Hedysarum*, *H. naudinianum*, *Rhizobium*, *Gammaproteobacteria*, التعايش

## Summary:

Bacteria were isolated from the nodules of different leguminous species of the genus *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf.( endemic north African), *H. spinosissimum* subsp. *Capitatum* (species of the Western Mediterranean), *H. carnosum* Desf. ( endemic north African) and *H. naudinianum* Coss.( endemic of Algeria).

For the species *H. naudinianum* , it is the first study to highlight the symbiotic association plant-bacterium.

The characterization of the strains consist of a morphological study followed by a phenotypical characterization which includes distinctive tests between the genus *Rhizobium* and *Agrobacterium*, biochemical and physiological tests as well as the measurement of the resistances and the sensitivities of the strains to heavy metals, antibiotics and with the phages.

The aptitude of the isolates to form nodules on the plants hosts is evaluated by nodulation test according to the method of Vincent (1970).

The technique of electrophoresis on polyacrylamide gel in denaturing conditions (SDS-PAGE) is carried out to determine the profile of total proteins of the isolates.

The phylogenetic characterization is carried out by a molecular study by analyzing the strains by the technique of the ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Analysis Restriction) by using the restriction enzyme *CfoI*, then sequenced their DNAr.

Phenotypiquely, the isolates give comparable results with those of the strains of reference Gammaproteobacteria. This is confirmed by the phylogenetic study.

**Key words:** *Hedysarum*, *H. naudinianum*, *Rhizobium*, Gammaproteobacteria, Symbiosis.

## Résumé :

Des bactéries ont été isolées à partir des nodules des espèces de plantes légumineuses du genre *Hedysarum* : *H. pallidum* Desf. (endémique nord Africaine), *H. spinosissimum* subsp. *Capitatum* (espèce de la méditerranée occidentale), *H. carnosum* Desf. (endémique nord Africaine) et *H. naudinianum* Coss. (endémique de l'Algérie).

Pour l'espèce *H. naudinianum* Coss., c'est la première fois qu'une étude est faite pour mettre en évidence l'association symbiotique plante-bactérie.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclue des tests distinctifs entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*, tests biochimiques et physiologiques ainsi que la détermination des résistances et des sensibilités des souches aux métaux lourds, antibiotiques et aux phages.

L'aptitude des isolats à former des nodules sur les plantes hôtes est évaluée par le test de nodulation selon la méthode de Vincent (1970).

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée pour déterminer le profil des protéines totales des isolats.

La caractérisation phylogénétique est effectuée par une étude moléculaire en analysant les souches par la technique de l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) en utilisant l'enzyme de restriction *CfoI* puis séquencé leur DNAr.

Phénotypiquement, les isolats donnent des résultats comparables à ceux des souches de référence Gammaproteobacteria. Ceci est confirmé par l'étude phylogénétique.

**Mots clés :** *Hedysarum*, *H. naudinianum*, *Rhizobium*, Gammaproteobacteria, Symbiose.

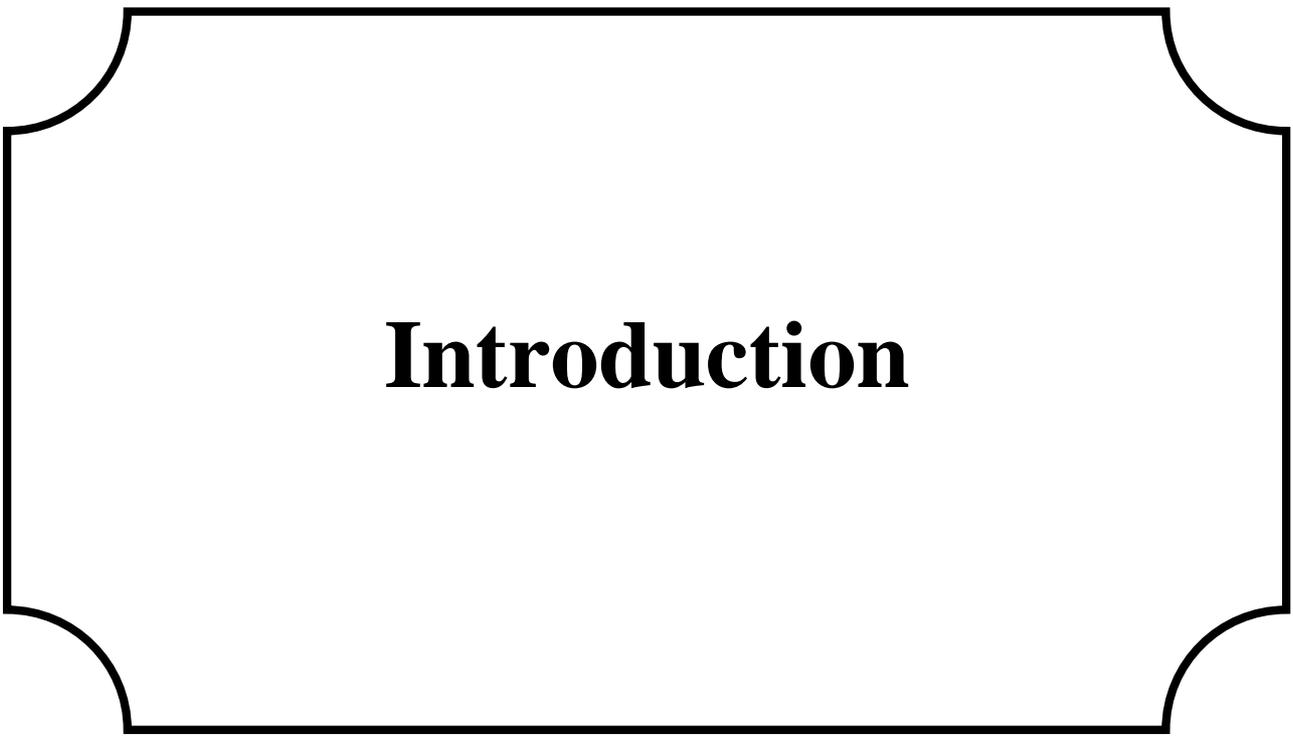
# Sommaire

<b>Introduction</b>	1
<b>CHAPITRE I : Etude Bibliographique</b>	
<b>I- Fixation biologique de l'azote</b>	3
<b>I-1- Azote</b>	3
<b>I-2- Cycle de l'azote</b>	3
<b>I-2-1- Fixation de l'azote</b>	5
<b>I-2-2- Ammonification</b>	5
<b>I-2-3- Nitrification</b>	5
<b>I-2-4- Dénitrification</b>	5
<b>I-3- Fixation biologique de l'azote</b>	5
<b>I-3-1- Fixateurs libres</b>	6
<b>I-3-2- Fixateurs symbiotiques</b>	7
<b>I-4- Mécanisme enzymatique : Nitrogénase</b>	7
<b>I-4-1- Structure</b>	7
<b>I-4-2- Fonction et régulation</b>	9
<b>II- Interaction <i>Hedysarum</i>- bactérie</b>	10
<b>II-1- Le macro symbionte : <i>Hedysarum</i></b>	10
<b>II-1-1-<i>H. coronarium</i> L.</b>	11
<b>II-1-2- <i>H. carnosum</i> Desf.</b>	12
<b>II-1-3- <i>H. pallidum</i> Desf.</b>	12
<b>II-1-4- <i>H. spinosissimum</i> L.</b>	12
<b>II-1-5- <i>H. naudinianum</i> Coss.</b>	12
<b>II-2- Le micro symbionte: <i>Rhizobium</i></b>	14
<b>II-2-1- Caractères cytologiques et morphologiques du rhizobia</b>	15
<b>II-2-2- Caractères biochimiques et culturels du rhizobia</b>	15
<b>II-2-3- Classification du rhizobia</b>	16
<b>III- Nodulation</b>	18
<b>III-1- Génétique de la nodulation chez la bactérie</b>	18
<b>III-1-1- Gènes nod</b>	18
<b>III-1-2- Gènes <i>nif</i></b>	18

III-1-3- Gènes <i>fix</i>	19
III-1-4- Autres gènes	19
<b>III-2- Génétique de la nodulation chez la plante</b>	19
<b>III-3- Les substances responsables de la nodulation</b>	20
III-3-1- Flavonoïdes	20
III-3-2- Facteurs Nod	20
III-3-3- Autres substances	21
<b>III-4- Processus de la nodulation</b>	21
III-4-1- Pré échange de signal d'infection et déclenchement du nodule	21
III-4-2- Attachement	23
III-4-3- Curling des poils radiculaires et déclenchement du fil d'infection	23
III-4-4-Endocytose des bactéries et développement de symbiosome	23
<b>IV- Taxonomie bactérienne</b>	25
IV -1- Classification basée sur le concept d'inoculation croisée	25
IV -2- Taxonomie polyphasique	26
IV -2-1- Méthodes phénotypiques	28
IV -2-2- Méthodes génotypiques	31
IV -2-3- Phylogénie	33
<b>CHAPITRE II : Matériels et méthodes</b>	
<b>I- Isolement des bactéries à partir des nodules</b>	35
I-1- Collecte des nodules	35
I-2- Conservation des nodules	38
<b>I-3- Isolement des bactéries à partir des nodules</b>	38
I-3-1- Stérilisation des nodules	39
I-3-2- Isolement selon la méthode des nodules écrasés	39
<b>II- Caractères cultureux</b>	41
<b>III- Authentification des isolats</b>	42
<b>III-1- Test de nodulation</b>	42
III-1-1- Préparation des jarres de Leonard	42
III-1-2- Stérilisation des graines	43
III-1-3- Inoculation des jarres	44
<b>IV- Caractérisation phénotypique des bactéries</b>	47
IV-1- Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	47

IV-1-1-Test du 3-cétolactose	47
IV-1-2-Précipitation du glycérophosphate de calcium	48
IV-1-3- Croissance sur Litmus milk (lait tournesolé)	48
<b>IV-2- Tests nutritionnels</b>	49
IV-2-1- Source de carbone	IV- 49
2-2- Source d'azote	49
IV-2-3- Besoin en vitamines	49
<b>IV-3-Tests biochimiques (recherche des enzymes spécifique)</b>	50
IV-3-1-Réduction des nitrates	50
IV-3-2- Hydrolyse de l'urée	50
IV-3-3- Activité pectinolytique	50
IV-3-4-Activité cellulolytique	50
<b>IV-4-Tests physiologiques</b>	51
IV-4-1- Tolérance au NaCl	51
IV-4-2- Température de croissance	51
IV-4-3- Effet de pH	51
<b>IV-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques</b>	51
IV-5-1- Métaux lourds	51
IV-5-2- Antibiotiques	52
<b>IV-6- Sensibilité aux phages</b>	52
<b>V- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE</b>	55
<b>V-1- SDS-PAGE des protéines</b>	55
V-1-1-Principe	55
V-1-2- Protocole	56
<b>VI- Caractérisation moléculaire</b>	59
<b>VI -1- Extraction de l'ADN</b>	59
<b>VI -2- Analyse par l'ARDRA (analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S)</b>	59
VI-3- Le séquençage selon la méthode de Sanger	60
<b>CHAPITRE III : Résultats et discussion</b>	62
I- Caractères cultureux	65
	77
	77

<b>I- Authentification des isolats</b>	
<b>III- Caractérisation phénotypique des bactéries</b>	
<b>III-1- Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i></b>	
III-1-1-Test du 3-cétolactose	77
III-1-2-Précipitation du glycérophosphate de calcium	77
III-1-3- Croissance sur Litmus milk (lait tournesolé)	77
<b>III-2- Tests nutritionnels</b>	79
III-2-1- Source de carbone	79
III-2-2- Source d'azote	79
III-2-3- Besoin en vitamines	84
<b>III-3-Tests biochimiques (recherche des enzymes spécifiques)</b>	84
III-3-1-Réduction des nitrates	84
III-3-2- Hydrolyse de l'urée	87
III-3-3- Activité pectinolytique	87
III-3-4-Activité cellulolytique	87
<b>III-4-Tests physiologiques</b>	90
III-4-1- Tolérance au NaCl	90
III-4-2- Température de croissance	93
III-4-3- Effet de pH	93
<b>III-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques</b>	97
III-5-1- Métaux lourds	97
III-5-2- Antibiotiques	97
<b>III-6- Sensibilité aux phages</b>	100
<b>IV- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE</b>	101
<b>V- Analyse numérique de la caractérisation phénotypique</b>	105
<b>VI- Caractérisation moléculaire</b>	106
<b>Conclusion générale</b>	108
<b>Références bibliographique</b>	112
<b>Annexe</b>	



# **Introduction**

## Introduction

Les légumineuses sont des plantes herbacées, des arbustes, des lianes ou des arbres à racines présentant souvent des nodosités traduisant une symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote.

En 1838, Boussingault mit en évidence l'aptitude des légumineuses à utiliser l'azote atmosphérique, et en 1888, les chimistes allemands Hellriegel et Wilfarth ont démontré que cette aptitude est liée au développement des nodules suivant l'infection des racines par des microorganismes du sol (Brewin, 2002).

Parmi les légumineuses, le genre *Hedysarum* est composé d'un grand nombre d'espèces avec une répartition très étendue dans le monde. Différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Afrique du Nord et en Europe du Sud.

Les espèces du genre *Hedysarum* d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi et coll., 2004).

L'association symbiotique plante légumineuse- bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement.

L'interaction plante-bactérie présente un haut niveau de spécificité d'hôte basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires. Les plantes produisent des molécules-signal (flavonoides) au niveau de leurs racines. Ce signal, une fois perçu par la bactérie induit l'expression des gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod. Ceux-ci sont des signaux de la nodulation ciblant le programme organogénique de la plante et conduisant à la formation des nodules (Gage, 2004).

Les interactions symbiotiques sont caractérisées chez les légumineuses par la formation des nodules racinaires colonisés par des bactéries fixatrices d'azote (rhizobia). Auparavant le groupe des bactéries qui colonisent les racines des légumineuses n'était composé que d'Alphaproteobacteria, mais récemment deux souches de Betaproteobacteria ont été décrites comme bactéries capables d'induire une nodulation chez les légumineuses du genre *Burkholderia* (Moulin et coll., 2001) et du genre *Ralstonia* (Chen et coll., 2001). Ainsi

que des souches de Gammaproteobacteria ont été désignées comme des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia et coll., 2004).

Ce présent travail repose sur une étude taxonomique des bactéries associées aux nodules des espèces légumineuses du genre *Hedysarum* : *H. pallidum* Desf. (endémique nord Africaine), *H. spinosissimum* subsp *capitatum* Desf. (espèce de la méditerranée occidentale), *H. carnosum* Desf. (endémique nord Africaine), et *H. naudinianum* Coss. (endémique de l'Algérie) (Quezel et Santa, 1962).

Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules.
- Etude morphologique et microscopique
- Authentification des isolats par le test de nodulation
- Caractérisation phénotypique des isolats comprenant une série de tests
- Analyse des profils protéiques par SDS-PAGE
- Analyse moléculaire par la technique de l'ARDRA

# **Chapitre I**

## **Etude bibliographique**

# **I- Fixation biologique de l'azote**

## **I-1- Azote**

L'azote est un élément essentiel pour toutes les formes de vie découvertes sur notre planète. La plus grande partie de l'atmosphère, 78% en volume, est constituée d'azote ( $N_2$  ou diazote) un gaz incolore et inodore (Hopkins, 2003).

Par rapport à leur masse de matière sèche, l'azote est le 4ème élément nutritif des plantes, c'est un constituant essentiel des protéines, des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes. Il est donc combiné à la matière organique mais on le trouve aussi à l'état minéral sous forme de  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  et  $NO_2$  (Hopkins, 2003).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorise ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Les plantes assimilent l'azote sous forme  $NO_3^-$  et  $NH_4^+$ . L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Bado, 2002).

## **I-2- Cycle de l'azote**

L'azote est généralement reparti dans trois ensembles principaux : l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote.

Le cycle de l'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et soumet de nouveau l'azote dans la nature. C'est un cycle continu et peut être décomposé en quatre types de réaction où les microorganismes jouent un rôle dans ces derniers.

En général, l'azote de l'atmosphère passe successivement par les étapes de fixation, de nitrification et de dénitrification. Les nitrates assimilés par les plantes et les animaux après la nitrification passe par une décomposition et une ammonification, puis il est de nouveau soumis à une nitrification.

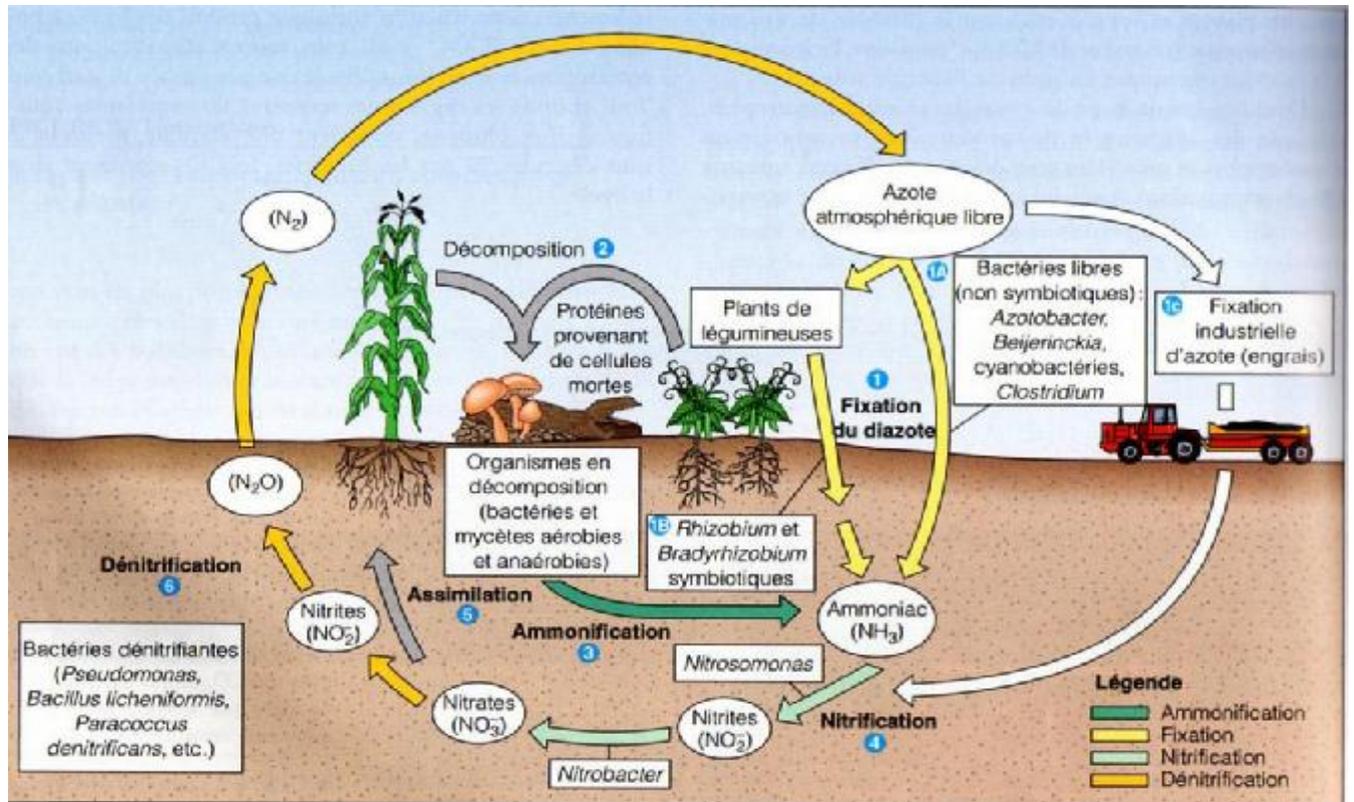


Figure1 : cycle de l'azote (Tortora et coll., 2003)

### **I-2-1- Fixation de l'azote**

Les rares créatures terrestres capables d'absorber directement l'azote atmosphérique sont des bactéries parmi lesquelles, les cyanobactéries.

On appelle fixation de l'azote le processus par lequel ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac (réduction du diazote en ammoniac).

### **I-2-2- Ammonification**

Un très grand nombre de bactéries et de champignons est capable de transformer l'azote de la matière organique, aussi bien en conditions aérobies qu'en anaérobies. Lors de la décomposition d'un organisme végétal mort, les protéines sont hydrolysées en acides aminés. Ces derniers perdent leurs groupements amines ( $\text{NH}_2$ ) qui sont convertis en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) au cours d'un processus appelé désamination.

### **I-2-3- Nitrification**

C'est la production de nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) par oxydation des ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Au cours de la première étape de cette réaction, le genre *Nitrosomonas* oxyde les ions ammonium en nitrites. Dans la deuxième étape, des organismes dont le genre *Nitrobacter*, oxydent les nitrites en nitrates.

### **I-2-4- Dénitrification**

Lorsque la teneur en oxygène de l'atmosphère du sol devient insuffisante pour qu'il puisse remplir son rôle d'accepteur d'électrons, les nitrates peuvent être réduits en nitrites par un nombre relativement élevé de microorganismes. Ces nitrites peuvent être par la suite convertis en ammoniac mais si le potentiel d'oxydoréduction continue à baisser (d'environ 300 à 100mV), certaines bactéries réduisent les nitrites en oxyde nitreux et en azote moléculaire, qui s'échappent vers l'atmosphère extérieure.

## **I-3- Fixation biologique de l'azote**

Le cycle de l'azote implique la transformation d'environ  $3 \times 10^9$  tonnes d' $\text{N}_2$  par an sur la totalité. Les transformations (par exemple la fixation de l' $\text{N}_2$ ) ne sont pas exclusivement biologiques. La foudre participe avec environ 10% de l'offre du monde en azote fixé et 25% pour l'engrais chimique (Zahran, 1999), le reste de l'azote fixé à l'échelle mondiale (environ

60%) est représenté par la réduction de l'azote en ammoniac par des organismes vivants. Ce processus est connu sous le terme de fixation biologique de l'azote (Hopkins, 2003).

L'agriculture des anciens grecs et romains a exploité la fixation biologique de l'azote en cultivant des légumineuses, bien que le rôle des microorganismes dans la fixation de l'azote n'ait été découvert qu'en 1888 par H. Hellriegel et H. Wilfarth (Hopkins, 2003).

Les organismes qui peuvent fixer l'azote c'est-à-dire convertissent l'azote gazeux stable dans l'atmosphère en une forme biologiquement utile, appartiennent à un groupe biologique connu sous le nom de procaryotes. Ces procaryotes fixateurs d'azote, remplissent une fonction écologique irremplaçable, puisque jusqu'à la découverte des procédés de synthèse industrielle de l'ammoniac, ils étaient les seuls capables à faire entrer l'azote dans les cycles biologiques (Davet, 1996).

La fixation de l'azote est l'apanage du domaine des procaryotes simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique nommé dinitrogénase qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac. Les microorganismes fixateurs se trouvent soit à l'état libre dans le sol (ou dans l'eau), soit associés de façon étroite à d'autres organismes (champignons (lichen) ou végétaux chlorophylliens) (Hopkins, 2003).

### **I-3-1- Fixateurs libres**

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

L'intensité de la fixation de l'azote par les bactéries libres est très variable selon les lieux et les conditions climatiques. On les rencontre en conditions anaérobies ou microaérophiles, mais aussi en conditions aérobies (Davet, 1996).

Les espèces aérobies comme le genre *Azotobacter*, ont développé plusieurs mécanismes pour protéger leur nitrogénase contre le dioxygène. Ainsi elles métabolisent celui-ci très rapidement ce qui réduit au minimum la diffusion intracellulaire du gaz. Les espèces anaérobies tel que *Clostridium pasteurianum* possèdent la même aptitude. En plus des bactéries, plusieurs genres de cyanobactéries comprennent des espèces fixatrices d'azote. Leur nitrogénase est enfermée dans un hétérocyste, une structure cellulaire spécialisée qui fournit les conditions anaérobies nécessaire à la fixation de l'azote (Tortora et coll., 2003).

La quantité totale d'azote fixé par les bactéries libres représente environ 50 millions de tonnes chaque année (Davet, 1996)

### **I-3-2- 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 dû aux bactéries libres (Davet, 1996). Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbiote. La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées nommées nodules (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 intégrera les protéines végétales (Tortora et coll., 2003).

Chez les légumineuses, le symbiote est une bactérie appartenant à l'un des trois genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, ou *Azorhizobium*. La découverte d'une association fonctionnelle entre un *Bradyrhizobium* et Ulmacée, laisse entrevoir que la spécificité des Rhizobiaceae est peut être moins stricte qu'on ne le pensait (Davet, 1996).

Dans les nodules des non légumineuses, le symbiote est une bactérie filamenteuse (*Frankia*) qui fait partie du groupe des actinomycètes. Un petit nombre d'associations symbiotiques qui ne provoquent pas de formations de nodules ont été étudiées, comme l'association de la plante *Azolla* avec la cyanobactérie *Anabaena* (Hopkins, 2003).

### **I-4- Mécanisme enzymatique : Nitrogénase**

#### **I-4-1- Structure**

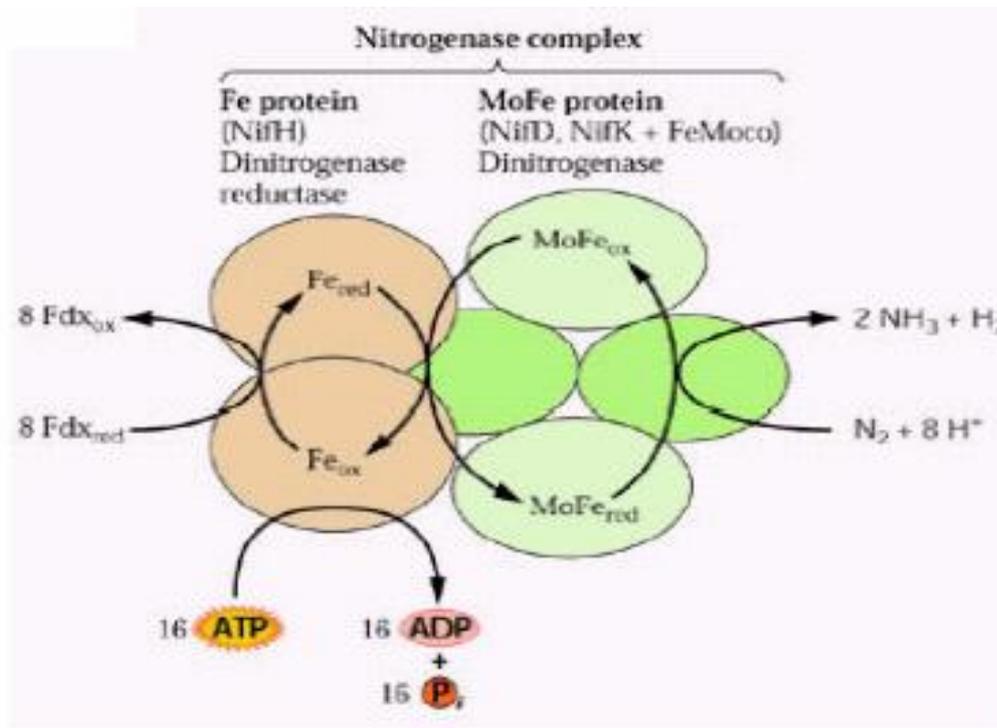
La fixation de l'azote est catalysée par un complexe enzymatique nommé nitrogénase ou dinitrogénase. Seules les cellules procaryotes sont capables de fixer l'azote. La nitrogénase a été purifiée chez pratiquement tous les procaryotes fixateurs d'azote connus (Hopkins, 2003). Une remarquable conservation des séquences de nucléotides des gènes de structure de cette enzyme a pu être mise en évidence chez toutes les bactéries fixatrices étudiées (Davet, 1996).

La nitrogénase est une enzyme à multi sous unités composée de deux protéines de taille différente (Hopkins, 2003 ; Davet, 1996 ; Werner, 1992). La Fe-protéine (petite protéine) est un dimère de deux sous unités polypeptidiques identiques. Sa masse moléculaire est de 64 KDa. La plus grande protéine du nitrogénase appelée Mo-Fe-protéine est un

tétramère composé de deux sous unités non identiques de type  $\alpha\beta\beta$ . La masse moléculaire est de 245 KDa (Hopkins, 2003 ; Werner, 1992).

Dans la nouvelle nomenclature, la Fe-protéine s'appelle nitrogénase réductase. Elle contient un cluster unique de quatre ions fer liés à quatre groupements soufre ( $\text{Fe}_4\text{S}_4$ ). La Mo-Fe-protéine s'appelle dinitrogénase, elle contient deux ions molybdène sous la forme d'un cofacteur fer-molybdène-soufre, avec des clusters ( $\text{Fe}_4\text{S}_4$ ) dont on ne connaît le nombre exact (Hopkins, 2003 ; Werner, 1992).

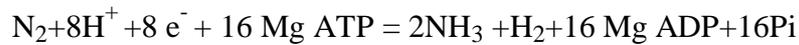
Une autre nitrogénase a été découverte récemment chez les mutants d'*Azotobacter vinelandii* constituée de deux protéines l'une contenant du fer et l'autre du fer et du vanadium. Une troisième nitrogénase, utilisant seulement le fer, a été découverte plus récemment (Davet, 1996 ; Werner, 1992).



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

## I-4-2- Fonction et régulation

La fixation de N<sub>2</sub> dans les nodules des légumineuses suit l'équation générale :

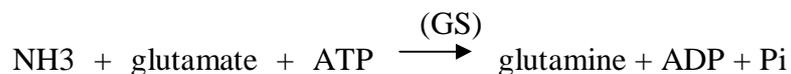


Le principal produit de la fixation de l'azote est l'ammoniac. La réduction de diazote se déroule en deux temps : lors de la première étape, la Fe-protéine est réduite par un donneur primaire d'électrons, habituellement la ferrédoxine. Dans la seconde étape, la Fe-protéine réduite transfère les électrons à la Mo-Fe-protéine qui catalyse à la fois la réduction du diazote gazeux et la production d'hydrogène (Hopkins, 2003).

L'ATP dans la réaction réagit avec la Fe-protéine réduite et intervient dans le transfert des électrons entre la Fe-protéine et la Mo-Fe-protéine. Pour chaque molécule de diazote réduite, au moins 16ATP sont nécessaires, deux par électron (Hopkins, 2003).

Les nitrogénases sont dénaturées irréversiblement par l'oxygène. Dans les nodules des légumineuses, l'apport d'oxygène est régulé en grande partie par une protéine qui lie l'oxygène, la leghémoglobine (Davet, 1996 ; Werner, 1992).

un dispositif intéressant de la fixation de l'azote, qui distingue les bactéries de nodule des diazotrophes vivants libres, est le fait que l'ammoniac fixée est immédiatement excrétée sans une autre assimilation par la bactérie. Cette ammoniac est alors assimilée dans le cytoplasme de la cellule de la plante hôte par l'action combinée de deux enzymes, la glutamine synthétase (GS) et la glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) (Brewin et coll., 1992) :



## II- Interaction *Hedysarum*-bactérie

### II-1- Le macro symbionte : *Hedysarum*

*Hedysarum spp* est une légumineuse fourragère spontanée assez répandue dans la région méditerranéenne. Différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Afrique du Nord et en Europe du Sud dans des étages bioclimatiques et des conditions édapho-agricoles assez variables (Abdelguerfi-Berrekia et coll., 1988).

Ces espèces d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi et coll., 2004).

Le genre *Hedysarum* renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames (Baattout, 1991 ; Boussaid et coll., 1995). Il est représenté en Afrique du Nord par des espèces faisant partie du groupe méditerranéen en présentant un nombre chromosomique de base  $n = 8$  (Quezel et Santa, 1962 ; Pottier-Alapetite, 1979).

Ce groupe méditerranéen compte 10 espèces :

**Les espèces diploïdes :** *H. coronarium* L. ; *H. carnosum* Desf. ; *H. spinosissimum* L. avec les deux sous-espèces subsp. *H. capitatum* Desf. et subsp. *H. euspinosissimum* Briq. ; *H. flexuosum* L. et *H. aculeolatum* Munby. [subsp. *micranthum* (Batt) Maire. et subsp. *mauritanicum* (Pomet) Maire].

**Les espèces di-tétraploïdes :** *H. pallidum* Desf. ; *H. naudinianum* Coss. et *H. perralderianum* Coss.

Les espèces *H. humile* L. ainsi que *H. membranaceum* Coss. et Bal. ne sont pas définies du point de vue caryologique (Hannachi et coll., 2004).

En Algérie, le genre *Hedysarum* regroupe des espèces endémiques. Certaines espèces ont une localisation régionale : *H. coronarium* dans le Nord-Est et *H. flexuosum* dans le Centre Nord du pays ( Abdelguerfi-Berrekia et coll., 1988).

Les espèces du genre *Hedysarum* sont caractérisées par une diversité considérable qui concerne aussi bien la morphologie que les aires de répartition de leurs peuplements.

Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum* L. (sainfoin), se caractérise par : Calice en cloche, à 5 dents égales ou inégales. Pétales à onglet très court. Carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité. Etamines diadelphes (9-1), à tube fendu en dessus.

Gousse aplatie, divisée en articles monospermes ovales, orbiculaires ou quadrangulaires, se séparant à maturité. Feuilles imparipennées à deux stipules latérales.

### II-1-1- *H. coronarium* L.

L'espèce *H. coronarium* L. également appelée Sulla ou sainfoin d'Espagne, occupe une large aire de répartition dans le bassin méditerranéen, de nord d'Afrique au sud d'Espagne et du centre au sud d'Italie (Squartini et coll., 2002).

Cette légumineuse pérenne est employée pour le foin, l'ensilage et le pâturage. Parmi les espèces du genre, seule *H. coronarium* L. a été domestiquée et a toujours été utilisée comme plante fourragère dans plusieurs pays tels que l'Espagne, le Portugal, l'Italie, la Grèce et l'Israël dus à un certain nombre de dispositifs agronomiques appropriés (Benguedouar et coll., 1997; Strufi et coll., 1998).

A l'état spontané, cette espèce se localise sur des sols argilo-limoneux bien drainés des zones méridionales du bassin méditerranéen. Et montre en fait une résistance marquée aux conditions extrêmes, s'étendant de la sécheresse à la salinité au pH alcalin, permettant sa culture en terre semi-aride et argiles calcaires avec un pH aussi élevé que 9,3 (Benguedouar et coll., 1997; Hannachi et coll., 2004). (Fig.3).



**Figure3 :** *Hedysarum coronarium* et leur graines

### **II-1-3- *H. pallidum* Desf.**

Plante vivace, endémique en Tunisie et Algérie, se rencontre généralement dans l'Oranie, le Constantinois et les Aurès, dans les forêts et les broussailles (Quezel et Santa, 1962). Elle est représentée par des formes annuelles (diploïdes,  $2n = 16$ ) et des formes pérennes (tétraploïdes  $2n = 4 X=32$ ) ( Abdelguerfi-Berrekia et coll., 1988). (Planche1)

### **II-1-2- *H. carnosum* Desf.**

C'est une espèce diploïde annuelle endémique en Tunisie et Algérie (Quezel et Santa, 1962).

D'après Abdelguerfi-Berrekia et coll. (1988), elle se caractérise par un bon développement végétatif et par son aptitude à peupler des terrains arides et salés.

Cette légumineuse pousse dans les oueds sous des pluviométries très réduites (150mm), préfère les sols moyennement calcaires à très calcaires et est plus fréquente sur les terrains plats et de faible pente. (Planche1)

### **II-1-4- *H. spinosissimum* L.**

C'est une espèce méditerranéenne annuelle polymorphe présente des inflorescences en tête dense (même à la fructification) et atteignant au plus 2cm de long. Elle se caractérise par des folioles glabrescentes, souvent plus ou moins alternes dans la portion inférieure de la feuille. Elle pousse sur des sols salés à très salés et caillouteux.

La sous espèce *H. spinosissimum* sbsp *capitatum* (Desf.) Asch.et Gr à allogamie prépondérante présente des fleurs de 15-20mm de couleur purpurine ou blanchâtre (Quezel et Santa, 1962). (Planche1)

### **II-1-5- *H. naudinianum* Coss.**

L'espèce *H. naudinianum* Coss est une plante vivace, endémique de l'Algérie et assez rare. Elle se rencontre dans le tell constantinois (mont de Bibans), dans l'algérois (Littoral, Atlas tellien), à Boghar et au nord de Sétif (Bougaa, Ain Roua). Cette légumineuse pousse dans les forêts claires de pin d'Alep et préfère des sols moyennement calcaires à très calcaires (Abdelguerfi-Berrekia et coll., 1988; Quezel et Santa, 1962).

L'espèce possède des gousses réticulées lisses sur les faces, courtement dentées à la périphérie, très aplaties, grandes, larges de 8-10 mm. Plante basse, sous-frutescente, à



*H. pallidum* Desf.



*H. carnosum* Desf.



*H. spinosissimum* L.



-Gousses-

-Graines-

*H. naudinianum* Coss.

feuilles argentées. Fleurs en grappes allongées, longues de 15-20 mm, pourprées. Folioles vertes, glabres en dessus (Quezel et Santa, 1962). (Planche1).

## II-2- Le micro symbionte: *Rhizobium*

Le premier critère pour l'existence du genre *Rhizobium* (Rhizobiaceae) est leur capacité d'envahir les racines des plantes légumineuses et de stimuler la production des nodules. Le prestige de ces bactéries dans l'agriculture est expliqué par leur aptitude d'entrer dans un rapport symbiotique avec la plante hôte appropriée pour la fixation de l'azote atmosphérique (Allen et Allen, 1950).

Les rhizobia sont des bactéries du sol, de forme bâtonnets, à Gram négatif. Phénotypiquement, se sont les fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges des plantes légumineuses où elle se différencie en bactéroïdes (Gage, 2004 ; Graham, 1991 ; Haukka et coll., 1998). Phylogénétiquement, et par l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, ces endosymbiontes de nodules constituent un ensemble de bactéries groupé dans la classe alpha de l'embranchement phylogénétique Proteobacteria (Vinuesa et coll., 1998 ; Tan et coll., 2001).

Le raccordement important entre les plantes légumineuses, les nodules des racines et la fixation symbiotique de l'azote a été établie en 1888 par les chimistes allemands Hellriegel et Wilfarth. Ils ont démontré que l'aptitude à utiliser l'azote atmosphérique par les plantes légumineuses est liée au développement des nodules suivant l'infection des racines par des microorganismes du sol. Dans la même année, Beijerinck a pu isoler des microorganismes à partir des nodules de lupin et de pois. *Bacillus radicicola* était probablement le premier nom utilisé pour les souches isolées. Le microbiologiste allemand Franc qui n'a pas été convaincu par l'identification de Beijerinck a proposé le nom *Rhizobium leguminosarum*, et ce nom a supporté de 1889 jusqu'à aujourd'hui. Plus tard, beaucoup de propositions taxonomiques ont été faites pour nommer les bactéries de nodules, mais tous ont fortement souligné la plante hôte à partir duquel la bactérie *Rhizobium* a été isolée. Bien qu'il y ait eu quelques améliorations mineures dans la nomenclature, il n'y a pas beaucoup de changement au cours de 100 années suivantes (Brewin, 2002 ; Broughton, 2003).

## II-2-1- Caractères cytologiques et morphologiques du rhizobia

Les rhizobia sont des bâtonnets , Gram négatif, non sporulant d'une largeur variant entre 0.5 et 0.9µm et une longueur entre 1.2 et 3µm. ces bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou deux à six flagelles péritriches (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben , 1994).

Sur la base de la matière sèche, les cellules des rhizobia contiennent 52 à 55% de carbone et 4 à 5% d'azote (Allen et Allen, 1950).

La plus grande proportion du génome rhizobial se compose de plasmides, qui contribuent de manière significative à l'écologie et à l'exécution symbiotique des souches rhizobiales. Les gènes symbiotiques de nodulation (*nod*) et les gènes de la fixation de l'azote (*nif*, *fix*) sont situés sur le plasmide symbiotique (pSym) (Silva et coll., 2003).

Les bactéries du genre *Rhizobium* se trouvent sous deux formes :

- une forme végétative (non bactéroïde) : ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes.

- une forme bactéroïde : chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhisobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative ( Somasegaran et Hoben , 1994).

## II-2-2- Caractères biochimiques et culturaux du rhizobia

Deux groupes sont généralement assignés aux cultures des rhizobia: Le premier groupe comporte les rhizobia à croissance rapide, qui produisent une turbidité en bouillon et présentent une bonne croissance sur la surface des milieux solides dans 5 à 7 jours. Le deuxième groupe implique les rhizobia à croissance lente, qui exigent de 9 à 12 jours ou plus pour obtenir approximativement le même développement (Allen et Allen, 1950).

La fixation de l'azote est un processus riche d'énergie qui exige jusqu'à 22% de la photosynthèse de la plante. La production de la nitrogénase-hydrogène dépendante est un facteur important dans l'efficacité de la fixation symbiotique de l'azote. Pour avoir une utilisation plus efficace d'énergie, un certain nombre du genre *Rhizobium* et beaucoup de souches du *Bradyrhizobium* qui ont un système de prise de l'hydrogène (Hup), réutilisent l'hydrogène produit par la nitrogénase (Gage, 2004).

Les rhizobia sont des bactéries aérobies et ce comportement est conditionné en grande partie par le potentiel d'oxydo/réduction du milieu (Allen et Allen, 1950; Vincent, 1970).

Ces endosymbiontes chimioorganotrophes et facilement cultivés sont capables d'utiliser une large gamme de carbohydrates et presque tous les membres de ces bactéries utilisent aisément les mono et les disaccharides et à moins degré les tri et polysaccharides, les alcools et les acides de sucres (Allen et Allen, 1950; Vincent, 1970). Dans les nodules, les bactéroïdes utilisent le carbone et l'énergie fournis par la plante sous forme d'acide dicarboxilique (Gage, 2004 ; Suominen et coll., 1999).

Les bactéries du genre *Rhizobium* peuvent utiliser les acides aminés de la plante pour arrêter leur assimilation d'ammonium, cependant elles doivent fournir à la plante l'ammonium afin d'obtenir les acides aminés. L'azote inorganique combiné ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) est généralement suffisant pour leur croissance, mais il existe des souches qui exigent les acides aminés et/ou les vitamines pour un bon développement. Beaucoup de rhizobia réduisent les nitrates aux nitrites lentement, si la quantité appropriée des nitrates est présente (Gage, 2004 ; Vincent, 1970).

Les milieux au mannitol et au extrait de levure sont les milieux les plus utilisés pour la culture des rhizobia (Allen et Allen, 1950).

Les éléments inorganiques majeurs tels que des traces fortes de Fe, Mg, Ca, K, Na,... et peu de quantités de Mn, Cu, Al, Pb,... sont généralement additionnés au milieu complexe. Tous ces éléments peuvent être trouvés dans l'extrait de levure (Allen et Allen, 1950 ; Vincent, 1970).

Le taux de croissance optimum de la majorité de rhizobia se produit entre 25 et 30°C. Les rhizobia préfèrent la neutralité, leur pH optimum est de 6.8 - 7.0. Ils ont toujours une tolérance à peu près identique à l'alcalinité, mais ils se comportent différemment à l'acidité (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Beck et coll., 1993).

### **II-2-3- Classification du rhizobia**

La taxonomie basée sur le concept des groupes d'inoculation croisée a échoué en raison des nombreuses exceptions dans cette règle. Les techniques moléculaires se sont considérablement développées pendant les 20 dernières années et ont facilité de cette manière la caractérisation des rhizobia. Cependant, la classification de ces derniers a subi de grands remaniements dus à de nouvelles données phylogénétiques et polyphasiques menant finalement à la description de nouveaux taxa (Zakhia et de Lajudie, 2001).

Selon le Bergey's Manuel (Jordan, 1984) les rhizobia appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Gracilicutes, au domaine des Bacteria, à l'embranchement des Proteobacteria, à la classe Alpha, à l'ordre Rhizobiales et à la famille Rhizobiaceae.

**Tableau1** : Classification courante des rhizobia (Weir, 2005)

<b>Genre</b>	<b>Espèce</b>	<b>Espèce initiale</b>
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>galegae</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>gallicum</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>giardinii</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>hainanense</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>huautlense</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>indigoferae</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>	espèce type
<i>Rhizobium</i>	<i>loessense</i>	<i>Rhizobium huanglingense</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>mongolense</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>sullae</i>	<i>Rhizobium hedysari</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>undicola</i>	<i>Allorhizobium undicola</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>yanglingense</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>amorphae</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>chacoense</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>ciceri</i>	<i>Rhizobium ciceri</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>huakuii</i>	<i>Rhizobium huakuii</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	<i>Rhizobium loti</i> , espèce type
<i>Mesorhizobium</i>	<i>mediterraneum</i>	<i>Rhizobium mediterraneum</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>plurifarium</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>septentrionale</i>	nouvelle espèce
<i>Mesorhizobium</i>	<i>temperatum</i>	nouvelle espèce
<i>Mesorhizobium</i>	<i>tianshanense</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>americanum</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>arboris</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>fredii</i>	<i>Rhizobium fredii</i> , espèce type
<i>Ensifer</i>	<i>kostiense</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>kummerowiae</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>medicae</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>meliloti</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>
<i>Ensifer</i>	<i>adhaerens</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>saheli</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>terangae</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>xinjiangense</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	<i>Rhizobium japonicum</i> , espèce type
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>liaoningense</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>yuanmingense</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>canariense</i>	
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	espèce type
<i>Methylobacterium</i>	<i>nodulans</i>	Sy <i>et al.</i> 2000. Jourand <i>et al.</i> 2004
<i>Burkholderia</i>	<i>tuberum</i> (STM678)	Moulin <i>et al.</i> 2001, Vandamme <i>et al.</i> 2002
<i>Burkholderia</i>	<i>phymatum</i> (STM815)	Vandamme <i>et al.</i> 2002
<i>Ralstonia</i>	<i>taiwanensis</i>	Chen <i>et al.</i> 2001, Chen <i>et al.</i> 2003
<i>Devosia</i>	<i>neptuniae</i>	Rivas <i>et al.</i> 2003
<i>Blastobacter</i>	<i>denitrificans</i>	van Berkum & Eardly 2002
<i>Ochrobactrum</i>	<i>lupini</i>	Trujillo <i>et al.</i> 2005

### III- Nodulation

#### III-1- Génétique de la nodulation chez la bactérie

Un certain nombre de gènes bactériens indiqués *nod* et *nol* est exigé pour la nodulation. Ces gènes sont localisés sur un grand plasmide appelé plasmide Sym, mais de tels gènes sont situés sur le chromosome de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (Sharma et coll., 1993). Plusieurs groupes de gènes de microsymbionte contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote.

##### III-1-1- Gènes *nod*

Trois ensembles de gènes semblent négocier les premières étapes de la nodulation :

**Les gènes *nod* communs :** les gènes *nod* ABCJI sont présents chez tous les rhizobia étudiés jusqu'ici et les mutations dans ces gènes mènent à un phénotype  $Nod^-$ . Ces gènes codent pour les étapes conservées évolutives essentielles pour le processus de nodulation (Sharma et coll., 1993). Les gènes *nod* communs comportant *nod* A, B, C, J et I sont situés sur un opéron duquel *nod* ABC sont essentiels pour la nodulation. Ces derniers sont fonctionnellement interchangeables entre les espèces et nécessaires notamment pour induire le curling et inciter les cellules végétales à se diviser (Brewin et coll., 1992 ; Pelmont, 1995).

**Les gènes *hsn* :** (host specific nodulation) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables (Pelmont, 1995). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia (Sharma et coll., 1993). Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet, 1996).

**Les gènes *nodD* :** gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoides (Pelmont, 1995; Sharma et coll., 1993).

##### III-1-2- Gènes *nif*

La synthèse de la dinitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (Hopkins, 2003). Ces gènes comprennent les gènes structuraux de la nitrogénase ; *nifH*, *nifD*, *nifK* dont *nifH* code pour la réductase et *nifD* et *nifK* pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Pelmont, 1995). Aussi les gènes par

exemple, *nifB*, *nifE* sont impliqués dans la synthèse du cofacteur FeMo qui est nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase (Brewin et coll., 1992).

### **III-1-3- Gènes *fix***

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote. (Brewin et coll., 1992 ; Hopkins, 2003)

### **III-1-4- Autres gènes**

Les gènes affectant les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides (*exo* et *lps*) et les déterminants pour la prise d'acide dicarboxilique par les bactéroïdes (*dct*) peuvent être nécessaire pour la symbiose mais pas uniquement exprimés en état symbiotique (Brewin et coll., 1992).

## **III-2- Génétique de la nodulation chez la plante**

Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite la production par les cellules hôtes d'un certain nombre de protéines nommées nodulines en réponses des stimuli provenant des bactéries symbiotiques. Ces protéines sont codées par des gènes NOD localisés dans le génome des cellules hôtes (Hopkins, 2003; Davet, 1996).

Une distinction est parfois faite entre les nodulines tardives, qui sont exprimés autour du début de la fixation de l'azote, et les nodulines précoces, qui sont exprimés aux étapes initiales de l'infection et du développement de nodule (Brewin et coll., 1992).

Certaines nodulines sont des enzymes du métabolisme azoté (glutamine synthétase, GOGAT) ou carboné (saccharose synthase, PEP carboxylase). La plus spectaculaire est une protéine qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la légghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène, et ce dispositif est indispensable à la fixation de l'azote (Pelmont, 1995).

### **III-3- Substances responsables de la nodulation**

#### **III-3-1- Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont les composés excrétés des plantes, les plus importants de la perspective symbiotique (Perret et coll, 2000). Ces substances phénoliques sont les facteurs les plus subtils qui aident les associés à s'associer (Broughton et coll., 2000).

Les flavonoides, qui incluent des isoflavones, des chalcones, des flavonols, des flavones, et des anthocyanidines et autres composés relatifs induisent des gènes pour la nodulation (Terefework, 2002), déclenchent spécifiquement leur expression (Perret et coll., 2000), et interagissent avec les protéines NodD qui servent comme sondes environnementales et activateurs de transcription (Broughton et coll., 2000). Parfois, les flavonoides sont catabolisés et leur dégradation pourrait mener à l'apparition de quelques composés qui peuvent être des inducteurs plus efficaces des gènes *nod* qu'eux même (Broughton et coll., 2000). Bien que des petites quantités sont excrétés sans interruption, les concentrations des flavonoides dans la rhizosphère augmentent en réponse du rhizobia compatibles (Broughton et coll., 2000).

Habituellement, les rhizobia les plus promiscueux sont induits par un grand nombre de flavonoides et de composés relatifs (Terefework, 2002). La capacité induisante change avec les flavonoides et le rhizobia et dans certains cas des flavonoides telles que le chrysin peuvent contrarier l'induction des gènes *nod* (Perret et coll., 2000 ; Terefework, 2002).

En plus à l'induction des gènes *nod*, les flavonoides semblent avoir des rôles multiples pendant plusieurs étapes du développement du nodule et de la plante (Terefework, 2002), et leur production est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle la plupart des nodules se développent plus tard (Broughton et coll., 2000).

#### **III-3-2- Facteurs Nod**

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia, est une étape essentielle dans la nodulation. Les signaux Nod, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod sont des molécules lipochitoooligosaccharidiques (Terefework, 2002).

Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Debellé et coll., 2001).

La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nodABCD* codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs Nod, et les gènes *hsn* pour les diverses substitutions des facteurs Nod (Debellé et coll., 2001).

La longueur et la saturation des composants de substitués d'acides gras du noyau lipooligosaccharide, le type et la position des divers substitués sur les facteurs Nod, jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

### **III-3-3- Autres substances**

D'autres produits semblent être nécessaires pour le développement continu du fil d'infection et de l'organogenèse du nodule, et ceux-ci représentent un troisième ensemble de signaux. Parmi ce dernier, les polysaccharides extracellulaires (EPS), les lipopolysaccharides, les K-antigènes, les glucanes cycliques, les lectines et les protéines exportés par le système de sécrétion de type trois (TTSS) ( Broughton et coll., 2000 ; Terefework, 2002).

### **III-4- Processus de la nodulation**

Le développement de la relation symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses est un processus fortement interactif qui inclue la communication moléculaire entre les organismes, une phase d'infection où les rhizobia entrent dans les nodules et une phase symbiotique finale où les rhizobia qui occupent les nodules fixent l' $N_2$ .

#### **III-4-1- Pré échange de signal d'infection et déclenchement du nodule**

L'étape préliminaire de l'interaction plante-microbe comporte un échange de molécules de signal qui répandent entre la racine de jeune plante et les bactéries dans l'environnement immédiat du sol. Les racines de la légumineuse sécrètent une variété de composés flavonoïdes, et ces composés sont identifiés par les produits des rhizobia du gène *nodD* (Brewin et coll., 1992). Les gènes *nod* codent pour les facteurs de nodulation (lipochitine-oligosaccharides) qui à leur tour induisent des événements précoces du procédé d'infection de la plante hôte, tel que des changements de l'épiderme de la racine,

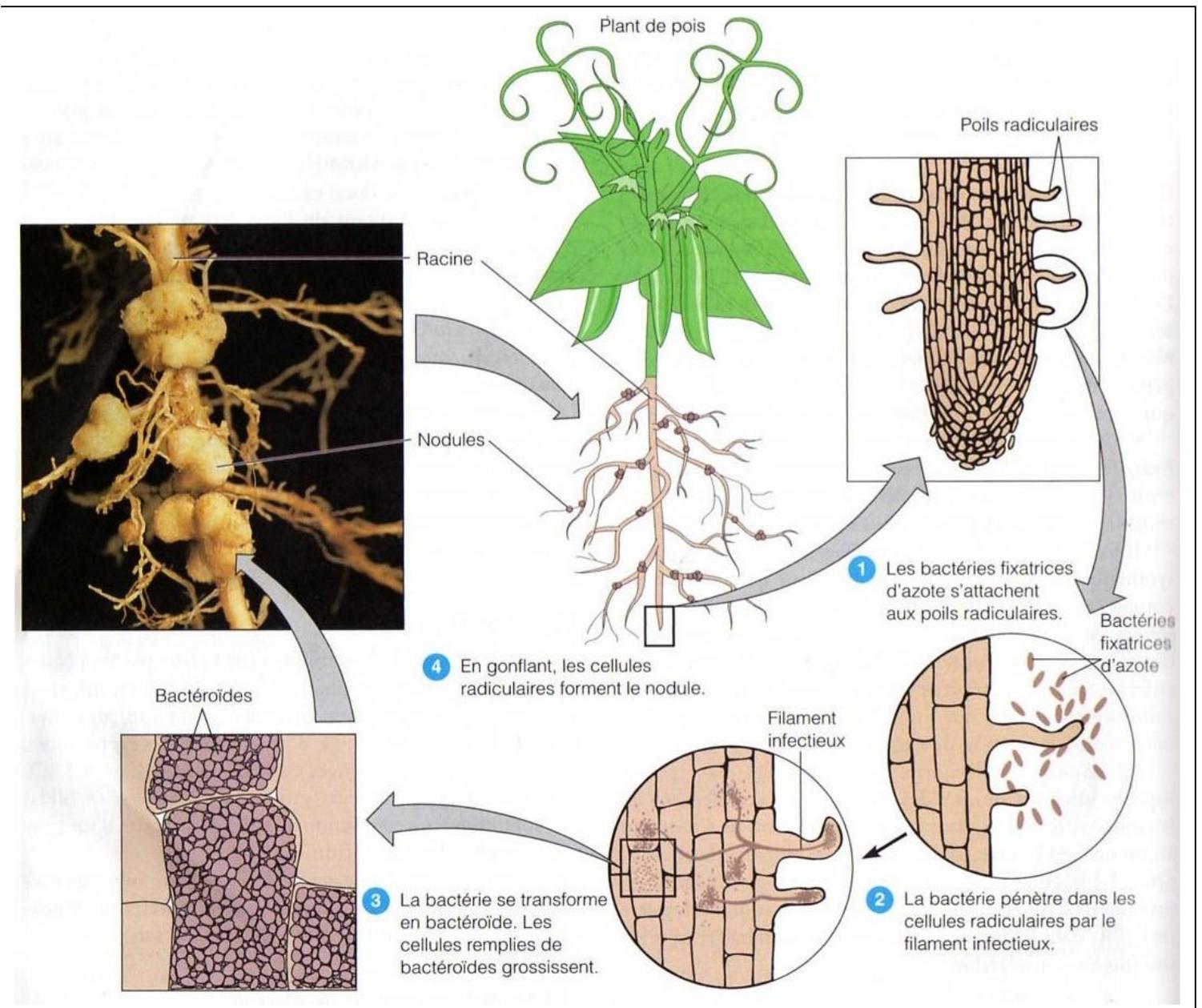


Figure 4: formation d'un nodule (Tortora et coll., 2003)

déformation et bordage des poils de la racine, et divisions des cellules dans le cortex de la racine et finalement le déclenchement du nodule primordial (Razaneen et coll., 2002).

### **III-4-2- Attachement**

L'attachement bactérien sur la surface des cellules de racine de plante est un processus complexe, y compris les facteurs extérieurs des bactéries (par exemple protéine de rhicadhésine, ions de Ca<sup>2+</sup>, fibrilles de cellulose, CPS , LPS, EPS, 1-2 -β-glucanes cyclique ) et (lectins et d'autres adhesins )de la plante (Razaneen et coll., 2002).

### **III-4-3- Curling des poils radiculaires et déclenchement du fil d'infection**

Même sans attachement bactérien, la molécule de signal rhizobial (lipooligosaccharide) est suffisante pour motiver le curling des poils absorbants et provoquer l'initiation de la formation d'un nodule.

Les rhizobia envahissent la racine en digérant la paroi des cellules du poil absorbant et forment un fil infectieux qui croît comme intrusion dans les cellules hôtes (Brewin et coll., 1992).

Pendant que le fil d'infection croît par 3 à 6 couches de cellules externes de cortex racinaire, l'activité méristématique est lancée devant le bout du fil d'infection délimitant ainsi la région dans laquelle le nodule se développera éventuellement. La croissance du fil d'infection continue dans cette région méristématique où les rhizobia sont déchargés à l'intérieur de la plupart des cellules et continuent à se diviser jusqu'à ce que le cytoplasme soit rempli de bactéroïdes (Fenton , 1994).

### **III-4-4- Endocytose des bactéries et développement de symbiosome**

En cours de développement de nodule, les bactéries subissent des changements morphologiques et physiologiques qui mènent à la formation des bacteroides (Fenton ,1994). Ces derniers sont entourés par une membrane nommée la membrane peribactéroïdienne qui a une structure et une fonction spéciale pour l'interaction plante-microbe et l'échange des métabolites et des molécules de signal. Les bacteroides intracellulaires avec leurs membranes peribactéroïdienne constitue le symbiosome.

L'endocytose est la conséquence de l'interaction physique entre les lipopolysaccharides bactériens et les composants glycoprotéiques et glycolipidiques de la membrane des cellules de la plante (Brewin et coll., 1992).

Les rhizobia continuent à se diviser jusqu'à ce que le cytoplasme de chaque cellule contienne plusieurs milliers de bactéroïdes, inclus séparément ou dans de petits faisceaux dans la membrane peribactéroïdienne.

Après que les bactéroïdes aient cessé la division, ils développent la capacité de fixation de l' $N_2$  (Brewin et coll., 1992 ; Razaneen et coll., 2002).

## IV- Taxonomie bactérienne

La taxonomie est généralement prise comme synonyme du systématique ou du biosystématique et est traditionnellement divisée en trois parts:

- Classification, c'est-à-dire l'arrangement ordonné des organismes dans les groupes taxonomiques sur la base de la similitude.

- Nomenclature, c'est-à-dire marquer les unités définies dans la classification.

- Identification des organismes inconnus, c'est-à-dire le processus pour déterminer si un organisme appartient à un des unités définies (classifiées) et marquées (nommées). Cependant, il y a une interaction dynamique continue entre la classification, la nomenclature et l'identification des nouveaux taxa (Young et coll., 2003).

L'espèce est l'unité de base dans la classification bactérienne, elle se compose d'un groupe de souches d'origine commune, y compris la souche type, et est principalement définie en terme de similitude entre les souches. Malgré que l'espèce soit l'élément central dans la taxonomie bactérienne, la structure hiérarchique de la taxonomie exige également les taxa les plus hauts du genre et de la famille (Dijkshoorn et coll., 2000).

Les bactéries du genre *Rhizobium* ont été classifiées et identifiées depuis l'aube de la bactériologie et leur taxonomie a toujours subi des révisions et des changements avec le progrès et l'évolution des méthodes d'identification utilisées.

### IV-1- Classification basée sur le concept d'inoculation croisée

La classification des rhizobia a été traditionnellement basée sur le concept d'inoculation croisée qui signifie que la taxonomie rhizobiale a été largement basée sur la spécificité de la plante hôte. Ainsi, les gènes des rhizobia de la nodulation (*nod*) qui sont les déterminants de la gamme de l'hôte ont eu un rôle important dans la taxonomie rhizobiale (Suominen et coll., 2001).

Dans cette classification, le critère pour l'inclusion dans le genre *Rhizobium* est la capacité de former des nodules sur les racines des plantes légumineuses, et l'inclusion dans n'importe quelle espèce dépend de la gamme des plantes hôtes nodulées. Par exemple *R. lupine* qui peut noduler la plante légumineuse *Lupinus.sp* ne peut pas infecter les plantes légumineuses dans d'autres groupe d'inoculation croisée tel que *Glycine max* qui est une plante hôte dans le groupe d'inoculation croisée nodulé par *B. japonicum* (Dixon, 1969).

Il y a beaucoup de problèmes dans cette classification, y compris le fait qu'il existe environ 18.000 espèces des légumineuses aussi bien que les rhizobia innombrables, et en outre la présence des combinaisons dans les quelles presque toutes les traces de la spécificité ont disparu. Comme exemple, un certain nombre du genre *Phaseolus* forme des nodules avec un grand nombre du rhizobia et un certain nombre des rhizobia peut noduler environ 50% de toutes les légumineuses (Broughton, 2003).

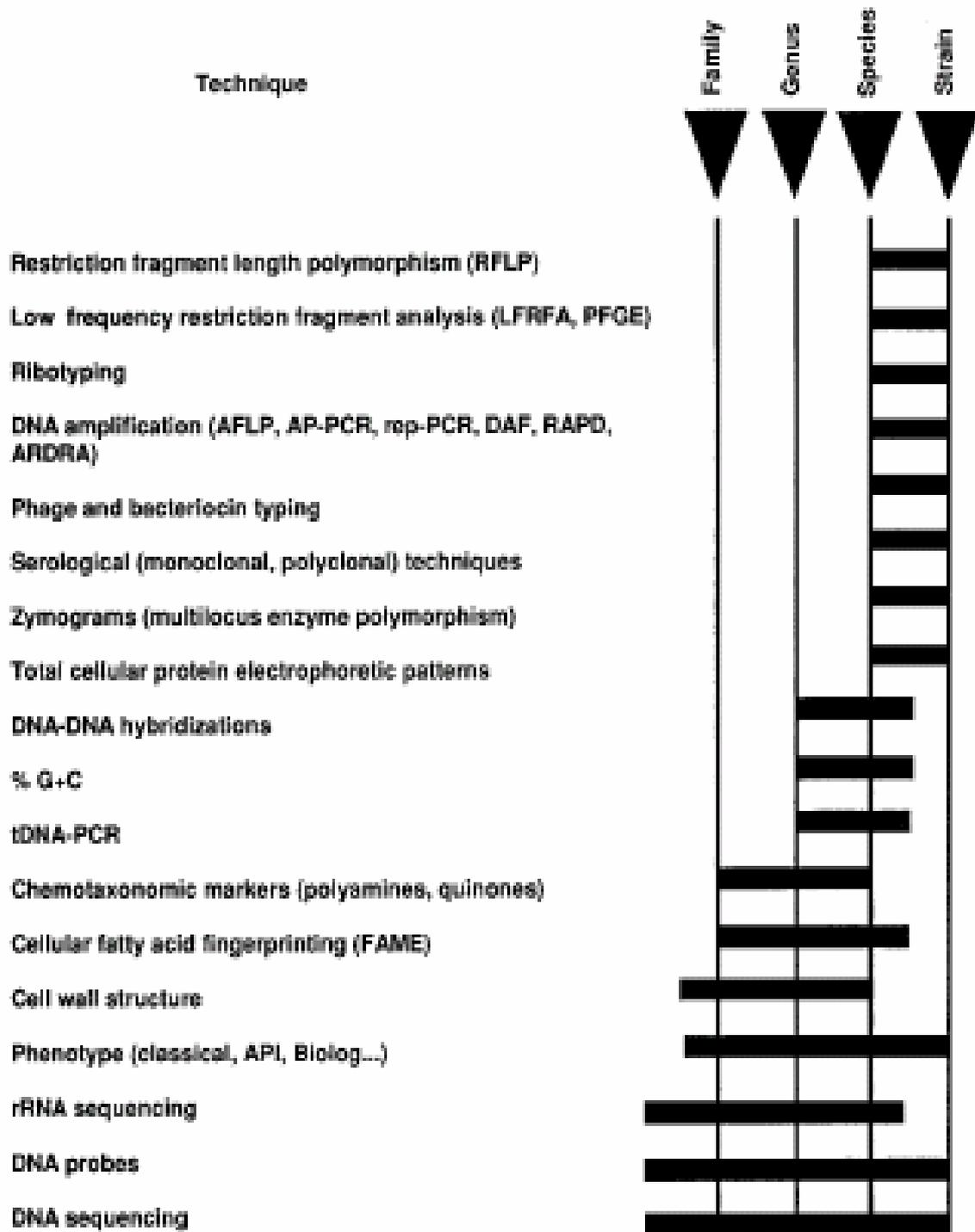
Cependant, la classification des rhizobia devrait s'ajuster sur la taxonomie bactérienne générale, et inclut un panneau de dispositifs génomiques, phénotypiques et phylogénétiques au lieu des propriétés uniques de la nodulation (Zakhia et de Lajudie, 2001).

#### **IV-2- Taxonomie polyphasique**

La taxonomie bactérienne moderne vise l'intégration de toutes les données et les informations phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques menant à une taxonomie polyphasique et une classification plus stable.

Cette dernière est réalisée en choisissant de diverses techniques complémentaires avec différents niveaux distinctifs. Le niveau de discrimination d'une technique peut changer selon le taxon bactérien étudié, et il est d'intérêt primaire de comprendre à quel niveau cette méthode diffuse l'information taxonomique. Cependant, chaque technique utilisée dans la taxonomie a sa propre puissance distinctive sur les différents taxa, et leur champ d'application dépend des conditions et du nombre de souches à caractériser (Zakhia et de Lajudie, 2001; Vandamme et coll., 1996).

Le niveau de l'information taxonomique de certaines techniques est illustré dans la figure 5 :



**Figure 5** : Niveau de l'information taxonomique de certaines des techniques utilisées (Vandamme et coll., 1996).

#### **IV-2-1- Méthodes phénotypiques**

La classification phénotypique est basée sur l'ensemble des similitudes et de différences entre les bactéries. La consistance phénotypique est exigée pour produire des systèmes taxonomiques utiles et peut donc influencer la profondeur d'une ligne hiérarchique. Les méthodes phénotypiques constituent la base pour la description formelle des taxa (Young et coll., 2003 ; Vandamme et coll., 1996).

La caractérisation phénotypique comporte les caractéristiques morphologiques, physiologiques, et biochimiques. La morphologie d'une bactérie inclut les caractéristiques cellulaires (forme, endospores, flagelles, corps d'inclusion, coloration de Gram...) et coloniales (couleur, dimension, forme...). Les caractéristiques physiologiques et biochimiques incluent des données sur la croissance aux différents températures et valeurs de pH, aux différents concentrations de sels, aux conditions atmosphériques, à la croissance en présence de différents agents antimicrobiens et aux données sur la présence ou l'activité de divers enzymes et de composés de métabolisme (Vandamme et coll., 1996).

L'ensemble des tests phénotypiques spécifiques aux études sur la diversité rhizobiale est résumé dans le tableau 2.

## Tableau 2 : Tests phénotypiques

(Les tests spécifiques aux études sur la diversité des rhizobia sont indiqués en gras)

(O'Brien et Colwell, 1987)

### I- Cytologiques

**1) micromorphologie cellulaire** (forme, dimension et organisation cellulaire, présence et disposition des flagelles, présence de spore, de la capsule, des granules de poly-13hydroxybutyrate, coloration de Gram); **2) mobilité.**

### II- Morphologiques

**1) morphologie de la colonie** (diamètre, forme, élévation, aspect de la surface, apparence, opacité, texture, marge) ;

**2) production de pigments**

### 111- Physiologiques

**1) température optimale et maximum de température de croissance, 2) tolérance aux sels (NaCl) ; 3) croissance à différents pH**

### IV- Biochimiques

1) production d'acidacétique de l'éthanol ; 2) production d'acides de carbohydrates (amygdaline, arbutine, arabitol, arabinose, cellobiose, dextrine, dulcitol, érythritol, éthanol, fructose, galactose, glucose, glycogène, inositol, inuline, lactose, maltose, mannitol, melibiose, muconate, N-acetylglucosamine, raffinose, rhamnose, ribose, salycine, sorbitol, saccharose, trehalose, xylose); activité esculinasique; 4) aminoacide decarboxylase (lysine, ornithine, histidine, acide glutamique, glutamine, asparagine, malate); 5) arginine dehydrolase; 6) hydrolyse de la caseine; 7) réaction au jaune d'oeuf; 8) activité estérasique et lipasique; 9) hydrolyse de la gélatine ; 10) oxydation du gluconate; 11) activité hémolytique; 12) production d'indole; 13) production de levain; 14) test du rouge de méthyle; **15) réduction des nitrates**, (production de nitrites, dénitrification); 16) activité oxydasique; **17) activité pectinasique, 18) hydrolyse de l'urée**; 19) réaction de Voges-Proskauer; **20) réaction protéolytique sur lait tournesolé; 21) test du 3cétolactose; 22) précipitation du calcium-glycérphosphate**; 23) production de mélanine

### V- Culturaux

**1) croissance sur milieux sélectifs** [gélose Mac Conkey (MCA), gélose thiosulfate-citrate-bile

sels-saccharose (TCBS), gélose Samonella-Shigella (SS), gélose à l'éosine et bleu de méthylène (EMB), gélose au vert brillant (BG), gélose au sélénite de Na, bouillon présomptif des entérocoques, bouillon à l'éthyl violet et azide (EVA). Gélose Brucella, gélose coeur-cystéine, eau peptonée, gélose tryptone-extrait de levure (TY), gélose Luria-bertoni (LB); **vitesse de croissance (temps de génération)**

### VI- Nutritionnels

**1) utilisation comme seule source de carbone** (acide adipique, acide glucuronique, acide glutamique, acide vanillique, aconitate, amidon, amygdaline, Alcool amylique, ammonium oxalate, ammonium tartrate, anthrone, L-arabinose, arbutine, asparagine, 1,2-butylène glycol, malonate de calcium, caprate, hydrolysai de caséine, chlorate de choline, cellobiose, cystéine, cholestérol, dextrine, dulcitol, ergostérine, erythrose, esculine, hexose-6- phosphate, D-fructose, fucose, D-galactose, glycérol, glucose, inositol, inuline, cis-aconitate, (x-cétoglutarate, lactose, lysose, citrate de magnesium, malate, maltose, D- mannose, D(+)-melibiose, D-melissitose monohydrate, methanol, O-methyl-D-mannoside, méso-inositol, methyl-DL-glucoside, mésoérythritol, 2-méthionine, nicotinate, pyruvate, polyéthylèneglycol, 1,2-propylèneglycol, riboflavine, raffinose, rhamnose, D-ribose, salycine, acétate de Na, alginate de Na, benzoate de Na, citrate de Na, butyrate de Na, D-gluconate de Na, formiate de Na, hippurate de Na, succinate de Na, sorbitol, tagatose, tréhalose, hydroxyméthylaminomethane, urée, vanilline, xylène, xylose). **2) utilisation comme seule source d'azote** (acide aspartique, acide L-glutamique, L-alanine, DLasparagine, L-arginine, cystéine, cystine, DL-phénylalanine, glycyl-DL-valine, glutamine, glycine, isocytosine, L(+)-isoleucine, L-histidine, DL-leucine, DL-lysine, L-méthionine, pyrimidine, Lproline, glutamate de Na, DL-serine, L(+)-tyrosine, DL-tryptophane, DL-valine); **3) besoin en vitamines** [ acide ascorbique, acide folique(B.), acide thiotique, acide nicotinique, acide panthoténique, (B.), D-biotine (H), calcium-D-panthoténate cyanocobalamine (B1<sub>2</sub>), pyridoxine (B<sub>6</sub>), nicotinamide (PP), riboflavine (B<sub>2</sub>), thiamine (B,)]

### VII- Résistance,

#### tolérance et sensibilité

**1) résistance aux antibiotiques** (acide nalidixique, ampicyhne, auréomycine, chloramphénicol,

dihydrostreptomycine, erythromycine, ethambutal, furazolidone, gentamycine, kanamycine, lincomycine néomycine, nitrofurantoine, novobiocine, oiendomycine penmcitme G, polymyxine, rifampicine, spectinomycine, streptomycine, Terramycine, tétracycline, triméthoprim, vancomycine); **2) résistance aux métaux lourds** [aluminium (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O), cAdnium (CdC<sub>12</sub>.2H<sub>2</sub>O), mercure (HgCl<sub>2</sub>), plomb (Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, cuivre (CuCh<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O), zinc (ZnCl<sub>2</sub>)]; **3) tolérance aux colorants** (bleu de bromothymol, bleu de méthylène, pourpre de bromocrésol, bleu de crésyl brillant, cristal violet, erythrosine A, fischine basique, methyl-violet, nigrosine, orcéine, picocarminiopyronine B, G et Y, rosanilline, rouge iodé, rouge de méthyle, rouge neutre, safranine T, soudan I, vert brillant, vert lumière SF, vert de méthyle, violet de gentiane); **4) tolérance aux pesticides** (carbendazol, chlordimeform, dimethoate, malathion, omethoate, phoxine); 5) autres tolérances (tellurite de K, nitrate d'argent, desoxycholate de Na, hypochlorite de Na).

Les méthodes phénotypiques incluent également les techniques chimiotaxonomiques. Le terme « chimiotaxonomie » se rapporte à l'application des méthodes analytiques pour rassembler l'information sur divers constituants chimiques de la cellule pour classer les bactéries (Vandamme et coll., 1996).

En plus de la coloration de Gram qui permet de distinguer les bactéries sur la base de la composition de la paroi cellulaire et de sa perméabilité, il existe d'autres techniques pour analyser les différents polymères de la paroi tel que les acides teichoïques qui peuvent être facilement extraits et purifiés par la chromatographie gaz-liquide (Benguedouar, 2000).

Les LPS (lipopolysaccharides) composants principales de la membrane externe des bactéries Gram négatif peuvent être analysés par des techniques d'électrophorèse et des techniques immunologiques (Yang et Lin, 1998).

La grande variabilité des chaînes latérales des quinones isoprénoidiques (qui se produisent dans la membrane cytoplasmique) peut être employée pour caractériser les bactéries à différents niveaux taxonomiques (Vandamme et coll., 1996).

Dans la taxonomie bactérienne, la diversité des protéines cellulaires est considérée un facteur important, et de nombreuses études ont indiqué la grande corrélation entre la teneur en protéines totales et l'hybridation ADN-ADN. Les profils issus par l'électrophorèse SDS-PAGE ont indiqué que les différentes souches possèdent différents profils mais les souches qui appartiennent à la même espèce ont des profils semblables (Yang et Lin, 1998).

La classification par des techniques sérologiques est basée sur la présence de la variabilité dans les constituants antigéniques des cellules. Les composants structuraux tels que les capsules, les enveloppes cellulaires, les flagelles, des molécules intracellulaires, et les produits de sécrétion tels que les enzymes et les toxines tous ont été utilisés dans les études sérologiques. Les antigènes peuvent être des protéines ou des carbohydrates et peuvent être thermolabiles ou thermostables (Dudmani et Belbin, 1988 ; Vandamme et coll., 1996).

Les données phénotypiques étaient les premières à analyser au moyen de la comparaison numérique assistée par l'ordinateur. La taxonomie numérique a permis la comparaison d'un grand nombre de traits phénotypiques pour un grand nombre de souches. Les matrices des données montrant le degré de similitude entre chaque paire de souches et l'analyse des clusters ayant pour résultat des dendrogrammes ont indiqué une image générale de la consistance phénotypique d'un groupe particulier de souches. En effet, cette

analyse d'un grand nombre de caractéristiques phénotypiques est taxonomiquement significative (Vandamme et coll., 1996).

#### **IV-2-2- Méthodes génotypiques**

Les méthodes génotypiques sont ceux orientées sur les molécules de l'ADN ou l'ARN.

##### **Détermination de la composition en bases de l'ADN (mole % G+C) :**

La détermination des moles % (G+C) est une des méthodes génotypiques classiques et est considérée comme une partie de la description standard des taxa bactériens. Théoriquement, la composition des bases d'une espèce donnée est une propriété constante. Ainsi, la composition des teneurs en G et C de différentes espèces devrait refléter le degré de parenté entre ces espèces. D'une façon générale, la gamme observée n'est pas plus de 3% dans une espèce bien définie et pas plus de 10% dans un genre bien défini. Les valeurs de % (G+C) dans le monde bactérien varient entre 24% et 76%. Des % (G+C) équivalents n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées d'une manière très différente sur l'ADN. (Vandamme et coll., 1996 ; Tortora et coll., 2003).

##### **L'hybridation moléculaire :**

Les hybridations ADN-ADN sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. Dans les techniques classiques l'un des ADN est généralement marqué par un isotope radioactif ou par une enzyme afin de reconnaître la provenance de chaque brin d'ADN dans les hybrides. Les techniques plus modernes ne nécessitent pas de marquage tel que les techniques spectrophotométriques.

On peut employer l'hybridation ADN-ARN pour déterminer le degré de parenté entre l'ADN d'un organisme et l'ARN d'un second organisme de la même façon qu'on utilise l'hybridation ADN-ADN (Benguedouar, 2000 ; Tortora et coll., 2003).

##### **Etude de l'homologie des ARNr :**

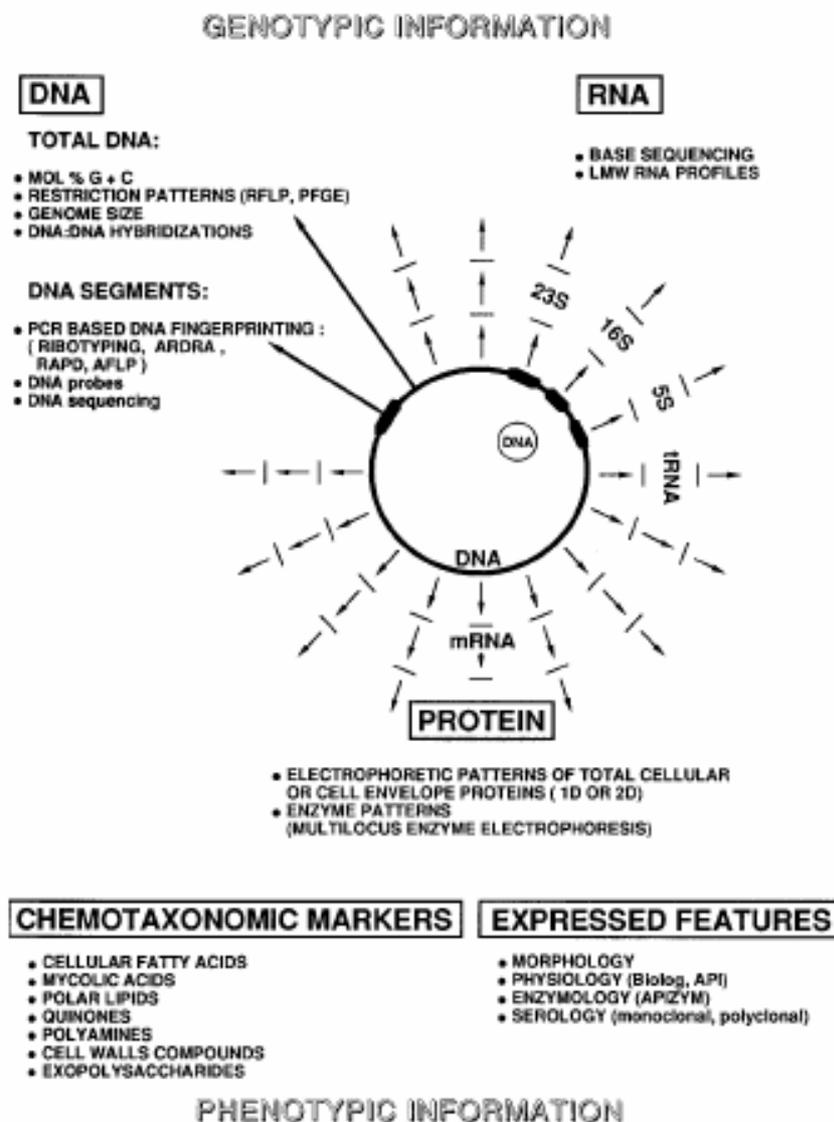
Le développement progressif de nouvelles techniques moléculaires fait appel de se concentrer sur l'étude comparative des molécules de l'ARNr.

Initialement on commença par déterminer la séquence du ARNr 5S, mais s'agissant d'une petite molécule et donc d'une faible valeur informationnelle, pour cela, et à des fins taxonomiques, sont plus utiles les séquences des sous unités plus grandes, en particulier la sous unité 16 S pour les procaryotes.

Le séquençage des ARNr 16S avec les amorces conservées et les transcriptases reverses était une avance importante dans la phylogénie bactérienne et eu comme conséquence une augmentation spectaculaire des séquences de l'ARNr 16S.

Le séquençage direct des parties ou des molécules presque entières de ARNr 16S ou 23S est réalisé en employant la technique de la PCR (Réaction en Chaîne de l'ADN-Polymérase) avec le choix des amorces appropriées (Vandamme et coll.,1996 ; Benguedouar, 2000).

Les différents types d'informations utilisées dans la taxonomie bactérienne sont illustrés dans la figure 6 :



**Figure 6:** Divers composants cellulaires et les techniques phénotypiques et génotypiques utilisés (Vandamme et coll., 1996).

### IV-2-3- Phylogénie

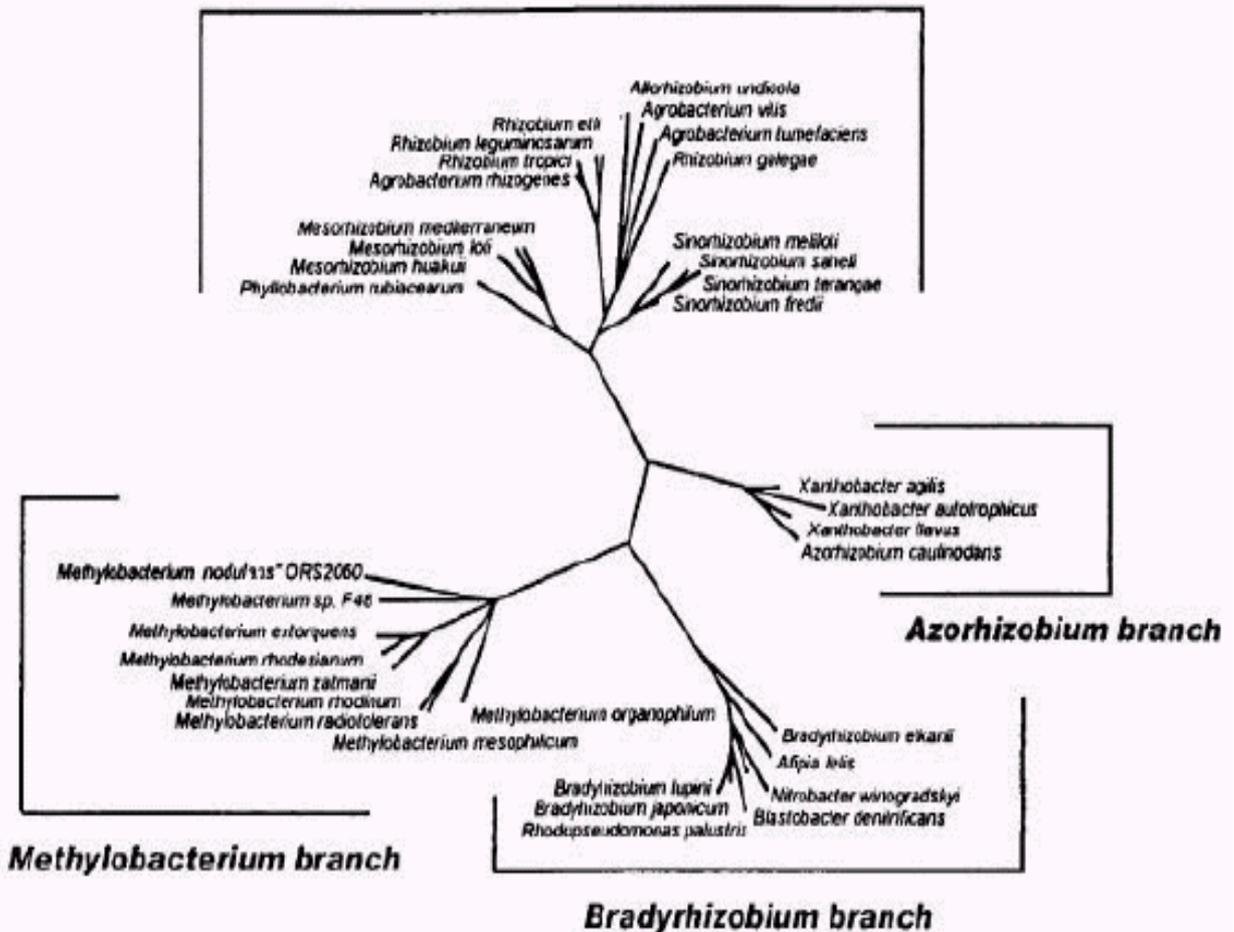
La classification phylogénétique est basée sur les rapports héréditaires entre les bactéries encodés par les données des séquences de l'ARNr 16S ou 23S. L'ARNr est la meilleure cible pour étudier les rapports phylogénétiques parce qu'il est présent chez toutes les bactéries, fonctionnellement constant et se compose de domaines fortement conservés ainsi que plus variables (Young et coll., 2003, Vandamme et coll., 1996).

Le concept phylogénétique d'une espèce bactérienne est considéré comme un assemblage des isolats d'origine commune, et la génération de la diversité génétique est résultée dans un clone avec différents degré de recombinaison, et est caractérisée par un certain degré de consistance phénotypique et un degré significatif d'hybridation ADN-ADN et en plus de 97% d'homologie des séquences d'ADNr 16S (Zakhia et de Lajudie, 2001).

La phylogénie du rhizobia basée sur les gènes de nodulation est différentes à cela basé sur les séquences de l'ARNr 16S, et l'histoire évolutionnaire des gènes de nodulation est demeuré peu claire (Suominen et coll., 2001).

Phylogénétiquement, les rhizobia sont divisés en six genres principaux : *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* en plus d'un septième genre *Methylobacterium* qui est rajouté après l'isolement et l'identification de l'espèce *Methylobacterium nodulans* qui nodule la plante légumineuse africaine *Crotalaria* spp. (Sahgal et Johri, 2003; Suominen et coll., 2001 ;Sy et coll., 2000). La figure montre l'arbre phylogénétique des différents rhizobia dans la classe *a*-proteobacteria.

**Rhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium and Allorhizobium branch**



**Figure 7:** Arbre phylogénétique des différents rhizobia dans la classe  $\alpha$ -proteobacteria (Sahgal et Johri, 2003)

# **Chapitre II**

## **Matériels et méthodes**

# I- Isolement des bactéries à partir des nodules

## I-1- Collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir de quatre espèces du genre *Hedysarum* situées dans des régions de l'est algérien différentes sur le plan climatique et pédologique.

*H. spinosissimum* subsp *capitatum* est située dans le plateau d'Ain El Bey à la périphérie de la ville de Constantine. *H. pallidum* se rencontre à Sétif (Amoucha) et à Oum El Bouaghi. *H. carnosum* est récoltée dans la région d'El Faïd au sud est de Biskra. *H. naudinianum* est également collectée de Sétif ( Bougaa, AinRoua et Ain Esfa). (Fig. 8).

Les nodules devraient être rassemblés des plantes vertes et saines suspectées d'une activité élevée de fixation d'azote. De telles plantes ont habituellement de grands nodules avec des intérieurs rouge-rose qui peuvent indiquer la présence de la léghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La forme des nodules collectés diffère selon les espèces végétales. (Planche 2).

La collecte est réalisée selon la méthode de Vincent (1970) et Beck et coll. (1993) :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm de profondeur.
- Soulever lentement le bloc de sol et des racines.
- Enlever soigneusement le sol et casser les blocs de sol avec précaution pour éviter d'endommager les racines et les racines secondaires ou beaucoup de nodules sont souvent trouvés.
- Placer délicatement toute la plante dans un sachet en plastique.

Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante et laver délicatement les racines sous l'eau courante.

Pour des raisons de stockage et d'isolement, les racines doivent être coupées 1 à 2 mm de site d'attache de nodules, ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables et propres de bactéries.

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

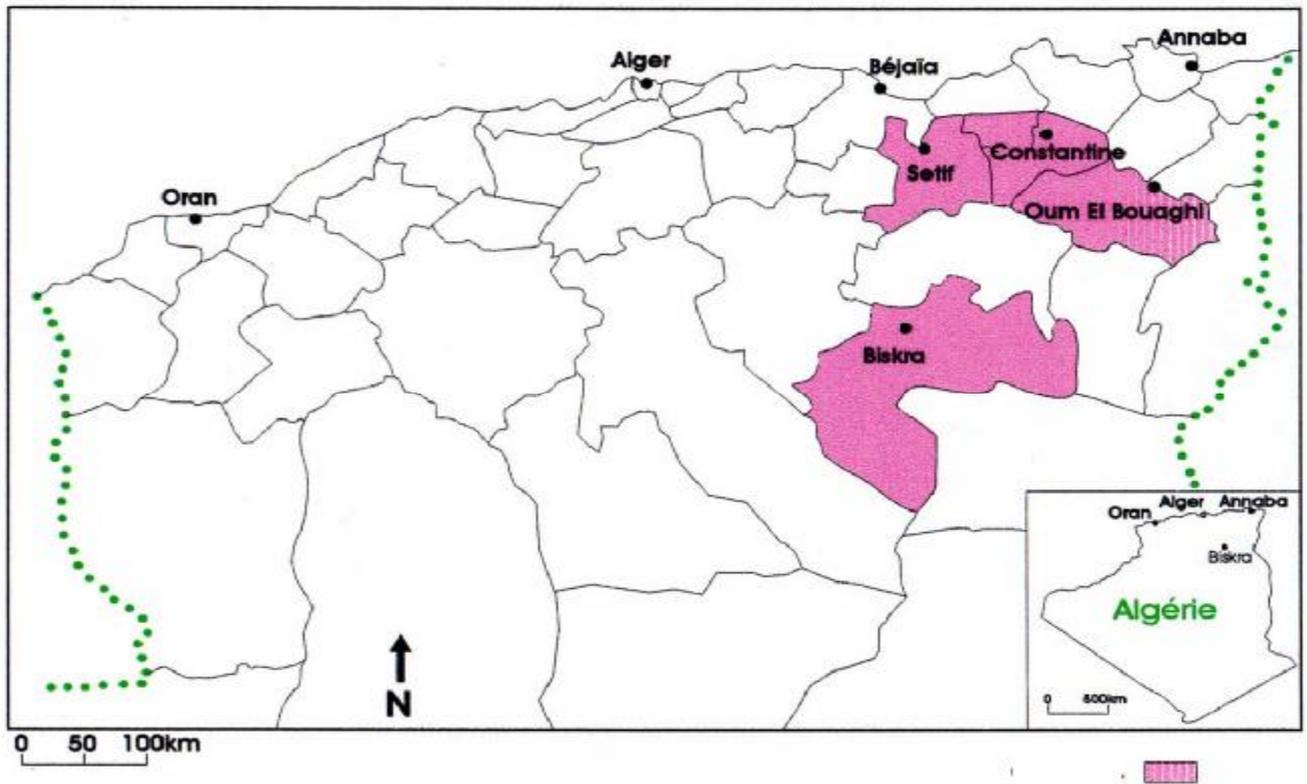
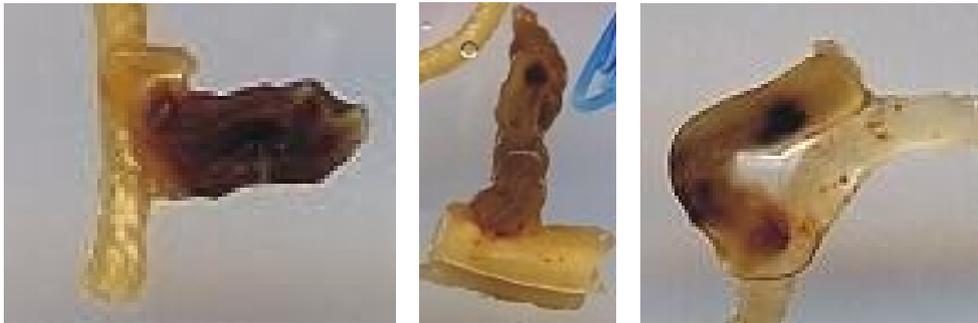


Figure 8 : Localisation géographique des zones de prélèvement



**-forme irrégulière-**



**-forme allongée irrégulière-**



**-forme arrondie -**

**Planche2** : Différentes formes de nodules du genre *Hedysarum*

## I-2- Conservation des nodules

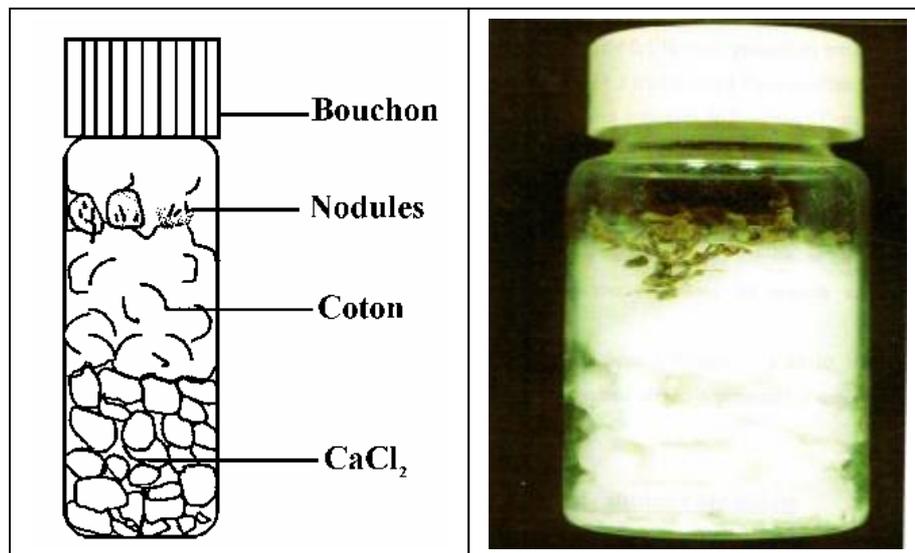
Pour un usage immédiat, les nodules frais peuvent être stockés dans le réfrigérateur à 4C° jusqu'à 48 heures.

Pour une longue période de stockage la dessiccation des nodules est recommandée, ce qui permet une longue conservation.

La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre contenant un déshydratant tel que le CaCl<sub>2</sub> anhydre et une couche de coton sur laquelle reposent les nodules. (Fig. 9).

Chaque flacon doit être identifié par les informations suivantes :

- nom de la plante hôte,
- date de conservation,
- date et lieu de prélèvement.



**Figure 9 :** Conservation des nodules sous CaCl<sub>2</sub> (Vincent, 1970).

### **I-3- Isolement des bactéries à partir des nodules**

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Les nodosités conservées par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans l'eau distillée pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C, puis une heure à la température ambiante.

#### **I-3-1- Stérilisation des nodules**

Sous la hotte à flux laminaire, les nodosités sont immergées dans l'éthanol 95 % pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0,1% (1g Hg Cl<sub>2</sub> + 5 ml HCl + 1l d'eau distillée) pendant 3 minutes.

Enfin, les nodosités sont rincées 10 fois à l'eau distillée stérile, puis on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant 1heure après le dernier rinçage.

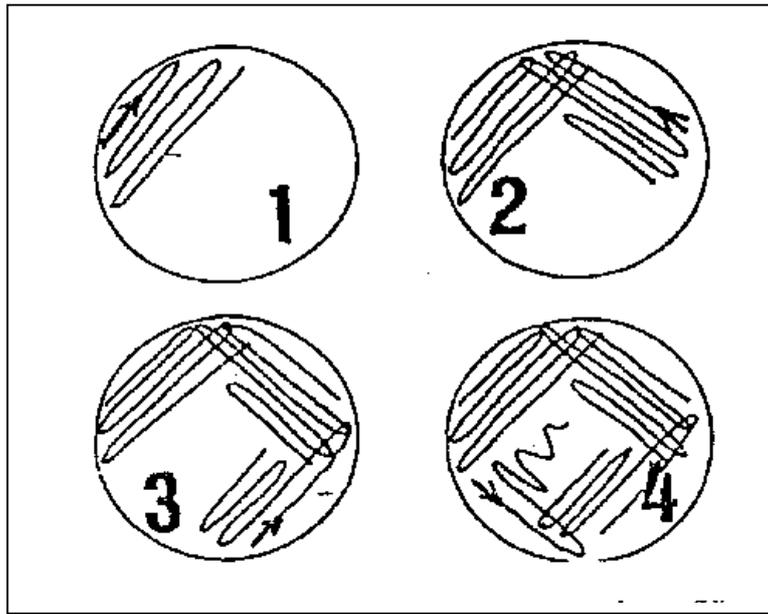
#### **I-3-2- Isolement selon la méthode des nodules écrasés**

Dans une boîte de pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile. Dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile.

Les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen.

A l'aide d'une anse de platine, une suspension de nodules est étalée selon la technique des quatre cadrans sur les milieux YMA+rouge Congo, GPA+ Bromocrésol pourpre (Annexe 1) de manière à isoler des simples colonies (Fig. 10).

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



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

A partir des nodules collectés et après leur stérilisation, 11 souches sont isolées : 5 souches à partir de *H. naudinianum*, 3 souches à partir de *H. pallidum*, 2 souches à partir de *H. spinosissimum* et 1 souche à partir de *H. carnosum*.

**Tableau 3** : Les souches utilisées dans cette étude

	<b>Souche</b>	<b>Plante- hôte</b>	<b>Origine géographique</b>	<b>Source</b>
<b>4</b>	<i>R. sullae</i> RH44	<i>H. coronarium</i>	Espagne méridionale	A.Toffanin- Madrid
<b>19</b>	<i>R. sullae</i> RH19	H. coronarium	Sicile, Italie	S. Casella- Pise
<b>A6</b>	<i>Rhizobium sullae</i> sp. nov. RHA6	<i>H. coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar-Constantine
<b>F</b>	<i>R. sullae</i> RHF	<i>H. coronarium</i>	Pise, Italie	S. Casella- Pise
<b>H</b>	<i>R. sullae</i> HCNT1	<i>H. coronarium</i>	Volterra, Italie	S. Casella- Pise
<b>I</b>	<i>R. sullae</i> RHIS123	<i>H. coronarium</i>	Cadix, Espagne	F.J.Ollero- Seville
<b>T</b>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolli</i> 843			B.J.Rolfe, Combera
<b>V</b>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 1003			Rothamstead Collection
<b>HS1</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. NZ096	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HS6</b>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HS15</b>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HP7</b>	<i>Enterobacter kobei</i>	<i>H. pallidum</i>	Setif, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HP10b</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	H. pallidum	Setif, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HP22a</b>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>H. pallidum</i>	Setif, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HP23</b>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>H. pallidum</i>	Setif, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>Hca1</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.KD	<i>H. carnosum</i>	Biskra, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>Hca4</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.523 11	<i>H. carnosum</i>	Biskra, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HnA</b>	Isolat	<i>H. naudinianum</i>	Setif, Algérie	Notre étude
<b>HnM1</b>	Isolat	<i>H. naudinianum</i>	Setif, Algérie	Notre étude
<b>HnM2</b>	Isolat	<i>H. naudinianum</i>	Setif, Algérie	Notre étude
<b>HnN1</b>	Isolat	<i>H. naudinianum</i>	Setif, Algérie	Notre étude
<b>HnN2</b>	Isolat	<i>H. naudinianum</i>	Setif, Algérie	Notre étude
<b>HP</b>	Isolat	H. pallidum	Setif, Algérie	Notre étude
<b>HPSb+</b>	Isolat	<i>H. pallidum</i>	Oum elbouaghi, Algérie	Notre étude
<b>HPSb-</b>	Isolat	<i>H. pallidum</i>	Setif, Algérie	Notre étude
<b>HS</b>	Isolat	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Notre étude
<b>Hscapt</b>	Isolat	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Notre étude
<b>Hcar</b>	Isolat	<i>H. carnosum</i>	Biskra, Algérie	Notre étude

## II- Caractères cultureux

### Les milieux utilisés : (Annexe 1)

Milieu liquides : YMB (yeast mannitol broth).

Milieux solides: YMA (yeast mannitol agar).

YMA+RC (yeast mannitol agar+ rouge Congo)

YMA+BTB (yeast mannitol agar+ bromothymol blue)

GPA+BCP (Glucose peptone agar+ Bromocrésol pourpre).

### Ensemencement sur milieux liquides et solides

Toutes les souches sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 9ml du milieu YMB puis les placer dans un bain –marie agitateur de 120 tours / minute à 28 °C pendant 24 à 48 heures.

L'ensemencement sur les milieux solides se fait à partir d'une culture sur YMB selon la méthode des trois cadrans, puis incubation dans une étuve à 30°C pendant 24 heures.

### Conservation des souches

Deux méthodes sont utilisées pour la conservation des souches bactériennes :

La première méthode est la conservation sur YMA additionné de 3 g/l de  $\text{CaCO}_3$  comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes à essai en formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose.

Après incubation à 30 °C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4 °C au réfrigérateur.

Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

La deuxième méthode est la conservation sur YMA additionné 30% (v/v) de glycérol. Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes d'Eppendorf en un temps de 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, puis mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur à – 20°C.

## **Examen microscopique par la coloration de Gram**

A partir des cultures sur YMB on prépare des lames pour la coloration de Gram. Sous la hotte à flux laminaire, la préparation est étalée en couche mince, séchée et fixée. Les lames sont déposées sur un support.

Les étapes de la coloration :

- Recouvrir le violet de gentiane, laisser agir 1 minute.
- Verser sur la lame la solution iode et laisser agir 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber la goutte à goutte l'alcool-acétone.
- Laver avec de l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fuschine, laisser agir 1 minute.
- Laver avec de l'eau distillée.
- Observer à immersion.

## **III- Authentification des isolats**

### **III-1- Test de nodulation**

Ce test est une première approche pour identifier les souches, permet d'évaluer leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte avant la mise en collection.

Pour réaliser ce test nous avons utilisé la technique des jarres de Leonard (Vincent, 1970).

#### **III-1-1- Préparation des jarres de Leonard**

Les jarres (bouteilles d'eau minérale en plastiques sont coupées en deux parties (Fig.11b)) sont lavés avec un détergeant courant, puis désinfectés sous hotte à flux laminaire avec une solution d'hypochlorite de sodium.

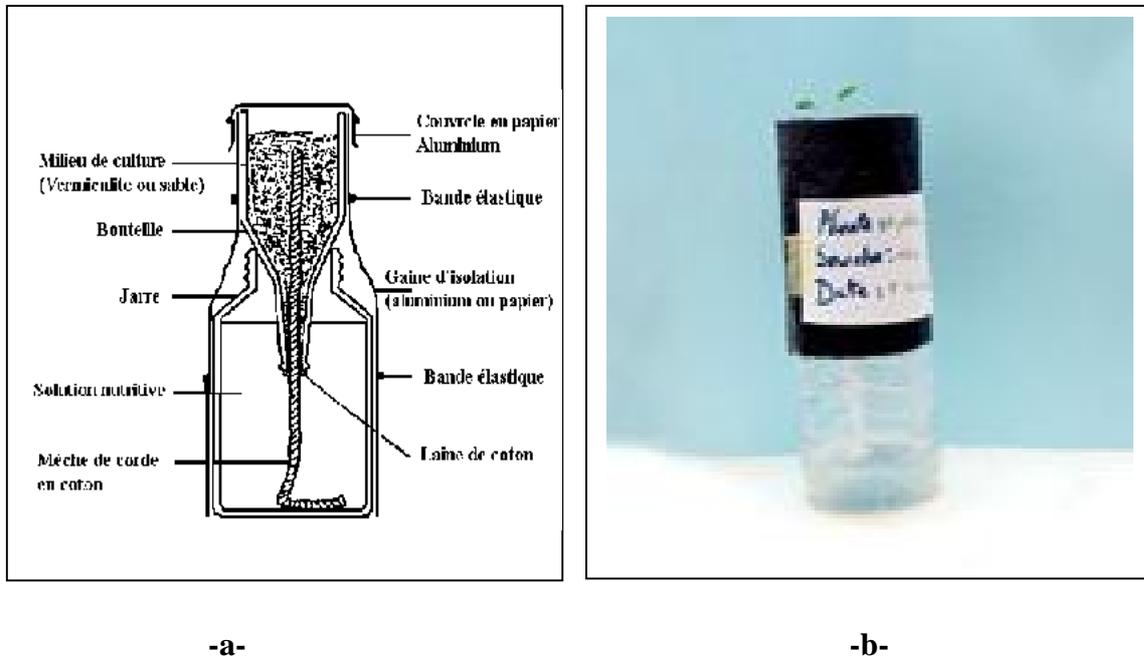
Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse. Les bouchons percés à l'aide d'une pince et les cordons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

La partie supérieure est remplie par un mélange de vermiculite-sable alors que la partie inférieure contient la solution nutritive de Farhaeus (Annexe 1). Donc le cordon de compresse lié aux deux parties permet d'humidifier le mélange avec la solution nutritive.

A la fin de la préparation on met du papier aluminium pour éviter toute contamination.

Le sable est lavé plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis séché à l'étuve. La vermiculite est aussi lavée puis séchée et enfin moulue dans un mixeur.

Le mélange vermiculite–sable (3:1) est humidifié avec la solution nutritive de Fährus et stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes dans des bécjers recouverts par du papier aluminium.

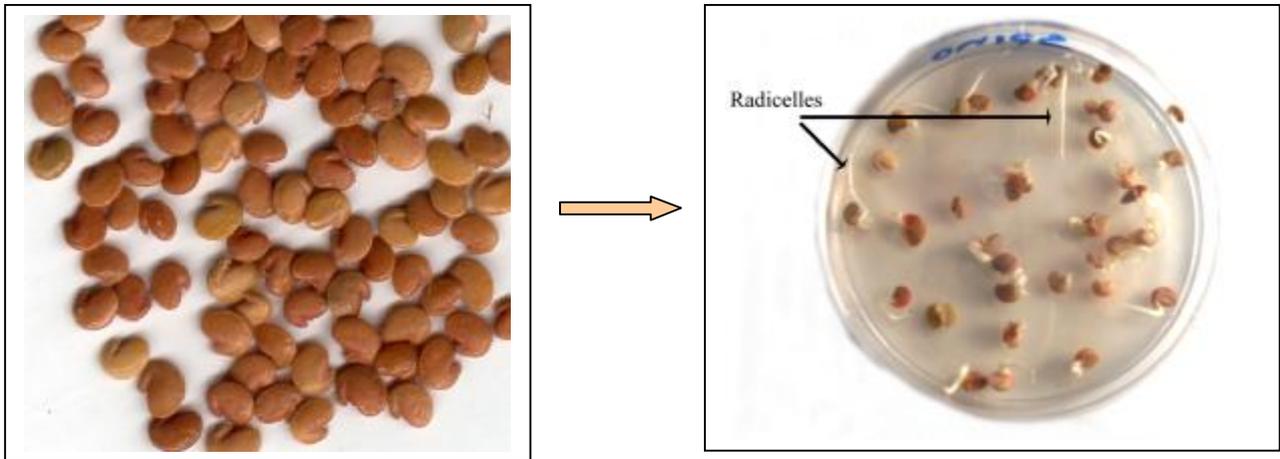


**Figure 11 :** a- Assemblage de la Jarre de Léonard (Vincent, 1970).  
b- Type de Jarre utilisé dans notre étude.

### III-1-2- Stérilisation des graines

Sous la hotte à flux laminaire, les graines placées dans des tubes stériles sont stérilisées à l'éthanol 95% (5 à 10 secondes), puis à l'acide sulfurique concentré pendant 3 minutes, et enfin rincées 10 fois à l'eau distillée stérile. On les laisse gonfler pendant 2 heures lors de dernier rinçage.

Les graines sont mises à germer sur boites de TYA(Beringer, 1974). pendant 3 à 7 jours. Les boites sont couverte avec de papier aluminium (Fig. 12).



**Figure 12** : Germination des graines sur milieu TYA (Beringer, 1974).

### **III-1-3- Inoculation des jarres**

Les inoculums sont cultivés pendant 24 heures à 28°C avec agitation. Dans chaque jarre sont plantées 3 graines, puis inoculée avec 2 ml d'inoculum en phase de croissance exponentielle. La partie supérieure des jarres est couverte avec du plastique noir pour éviter toute exposition des racines à la lumière.

Enfin, les jarres couvertes du papier aluminium sont placés dans une chambre de croissance équipée d'un système de lumière discontinue 8h/16h.

L'irrigation des jarres s'effectue aseptiquement à chaque fois que le niveau de la solution nutritive a diminué, pour éviter une sécheresse du mélange vermiculite-sable.

Après environs dix semaines, les plantes sont récoltées, les racines sont rincées afin d'observer le résultat de la nodulation.



**Figure 13 :** Jarres placés dans la chambre de culture.

Le test est réalisé en mettant en place les deux partenaires, les bactéries et les espèces végétales de *Hedysarum*.

Il s'agira aussi de réaliser des nodulations croisées en tenant compte de toutes les espèces de *Hedysarum* (*H. coronarium*, *H. pallidum*, *H. spinosissimum*, *H. carnosum*, *H. naudinianum*).

**Tableau 4:** Plantes et souches testées pour la nodulation

Plantes Souches					
	H. coronarium	H. pallidum	H. spinosissimum	<i>H. carnosum</i>	<i>H. naudinianum</i>
HS1	*	*	*	*	*
HS6	*	*	*	*	*
HS15	*	*	*	*	*
HP7	*	*	*	*	*
HP10b	*	*	*	*	*
HP22a	*	*	*	*	*
HP23	*	*	*	*	*
Hca1	*	*	*	*	*
Hca4	*	*	*	*	*
4	*				*
19	*				*
A6	*				*
F	*				*
H	*				*
I	*				*
T	*				*
V	*				*
HnA					*
HnM1					*
HnM2					*
HnN1					*
HnN2					*
HP		*			
HPSb+		*			
HPSb-		*			
HS			*		
Hscapt			*		
Hcar				*	

\* partenaires mis en association par les tests de nodulation.

## Nodulation couplée

Ce test est réalisé en mettant en contact la plante avec sa bactérie spécifique et une souche de *Rhizobium* (*R. sultae*).

**Tableau 5:** Plantes et souches testées pour la nodulation couplée

<b>Plantes souches</b>	H. pallidum	H. spinosissimum	H. carnosum	H. naudinianum
<b>A6</b>	*	*	*	*
<b>(HS1, A6)</b>		*		
<b>(HS6, A6)</b>		*		
<b>(HS15, A6)</b>		*		
<b>(HS, A6)</b>		*		
<b>(Hscapt, A6)</b>		*		
<b>(HP7, A6)</b>	*			
<b>(HP10b, A6)</b>	*			
<b>(HP22a, A6)</b>	*			
<b>(HP23, A6)</b>	*			
<b>(HP, A6)</b>	*			
<b>(HPSb<sup>+</sup>, A6)</b>	*			
<b>(HPSb<sup>-</sup>, A6)</b>	*			
<b>(Hca1, A6)</b>			*	
<b>(Hca4, A6)</b>			*	
<b>(Hcar, A6)</b>			*	
<b>(HnA, A6)</b>				*
<b>(HnM1, A6)</b>				*
<b>(HnM2, A6)</b>				*
<b>(HnN1, A6)</b>				*
<b>(HnN2, A6)</b>				*

\* partenaires mis en association par les tests de nodulation.

## IV- Caractérisation phénotypique des bactéries

### IV-1- Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

#### IV-1-1-Test du 3-cétolactose

Ce test permet de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium* (Jordan, 1984). Il se base sur l'oxydation du C<sub>3</sub> du glycosyl des saccharides (Bernaerts et De Ley, 1963).

Les souches sont cultivées à 28°C pendant 3 jours sur le milieu suivant :

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Une anse de ce milieu estensemencée sur milieu solide contenant :

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Les boîtes sont incubées 2 jours à 28°C.

Pour révéler les résultats il est nécessaire d'inonder les boîtes avec le réactif de Benedict à température ambiante.

#### Réactif de Benedict :

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

La présence du 3-cétolactose se manifeste par la formation d'un halo jaune de  $\text{Cu}_2\text{O}$  autour des colonies après environ 1 heure. Le diamètre du halo est 2-3cm, jaune comparativement avec le fond bleu du réactif de Benedict.

Seules les souches de *Agrobacterium* spp. produisent l'enzyme 3-cétoglucosidase.

#### **IV-1-2- Précipitation du glycérophosphate de calcium**

Les souches sont cultivées 2 jours à 30°C sur gélose au mannitol et au calcium glycérophosphate (Hofer, 1941).

Composition du milieu Mannitol-Calcium Glycérophosphate en g/l

$\text{KNO}_3$	5
$\text{NaCl}$	3.8
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{KCl}$	0.16
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6
Ca- Glycérophosphate	0.8
Mannitol	20
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

La croissance de *Agrobacterium* spp. sur ce milieu produit des colonies entourées d'un halo brunâtre et présentent un précipité clair, constitué probablement de phosphate tricalcique. *Rhizobium* spp, sur ce milieu, ne donnent lieu à aucun brunissement (réaction négative).

#### **IV-1-3- Croissance sur Litmus milk (lait tournesolé)**

Les réactions sur Litmus milk ( après 1 à 6 semaines ) sont utilisées pour la mise en évidence d'une protéolyse acide ou alcaline, par la présence d'un halo clair autour des colonies (développement d'une zone de digestion du sérum) (Vincent, 1970) caractéristique des souches de *Rhizobium*.

Les formes non rhizobial ou contaminantes se reconnaissent par une croissance rapide sur ce milieu, le plus souvent accompagnée d'une décoloration du lait.

Pour la préparation du milieu, il est nécessaire de stériliser séparément à 110°C / 10mn les deux solutions :

**Solution 1** : contient 20 g de lait tournesolé dans 100ml d'eau

**Solution 2** : contient 3g d'agar dans 100ml d'eau.

Les deux solutions refroidies à environ 50°C sont mélangées, pour constituer le milieu de culture.

Les bactéries sontensemencées sur boîtes et incubées à 28°C pendant 15 à 20 jours. Il est mis en évidence la formation d'une zone de protéolyse clair autour des colonies. L'acidification du milieu est en outre accompagnée de l'apparition d'une couleur rose.

## **IV-2- Tests nutritionnels**

### **IV-2-1- Source de carbone**

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : xylose, arabinose, saccharose, fructose, galactose, raffinose, lactose, maltose, glucose puis le sorbitol et le citrate de Na.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

### **IV-2-2- Source d'azote**

Les souches sont cultivées sur le milieu Défini 8 (Vincent, 1970) (Annexe 1) où le glutamate de sodium est remplacé par l'un des acides aminés suivants : valine, tyrosine, leucine, proline, thréonine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane, lysine, glycine, sérine, histidine, arginine, méthionine, alanine, asparagine et cystéine.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

### **IV-2-3- Besoin en vitamines**

Les souches sont cultivées sur le milieu B III (Dazzo, 1982) (Annexe 1) où la solution stock des vitamines est remplacée par une solution stock contenant seulement une des vitamines suivantes : riboflavine, acide p-aminobenzoïque, acide nicotinique, biotine, thiamine-HCl, pyridoxine-HCl, panthotenate de Ca.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

### **IV-3-Tests biochimiques (recherches des enzymes spécifiques)**

#### **IV-3-1-Réduction des nitrates**

Les souches sont cultivées sur TY contenant 0.1% de  $\text{KNO}_3$  (w/v).

Après 4 jours d'incubation avec agitation à 28°C, on dépose à la surface de la culture 3 à 4 gouttes des réactifs de la nitrates réductase (Guiraud,1998).

**Réactif I :** Acide sulfanilique à 3% dans l'acide dilué à 25%.

**Réactif II :**  $\alpha$  naphthylamine à 0.5% dans l'acide dilué au même temps.

#### **IV-3-2- Hydrolyse de l'urée**

Les souches cultivées sur TY sontensemencées sur YMA contenant 2% w/v d'urée et 0.012 g/l de rouge de phénol comme indicateur de pH.

Le milieu solide sans urée est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis refroidi jusqu'à environ 45°C. La solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22 $\mu\text{m}$ ) et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire puis incubation à 30°C pendant 48 heures.

#### **IV-3-3- Activité pectinolytique**

Les souches en phase de croissance exponentielle sur TY sontensemencées sur milieu semblable au YMA où le mannitol est remplacé par 0.1% d'inositol et 0.2% de pectine.

L'incubation dure 7jours à 30°C. Les boîtes sont ensuite rincées délicatement à l'eau de robinet puis remplies d'une solution de rouge de Ruthénium 0.05% et laisser agir pendant 30 min . Un halo décoloré autour des colonies indique une activité pectinolytique.

#### **IV-3-4-Activité cellulolytique**

Les bactéries cultivées sur milieu TY sontensemencées sur YMA contenant 0.25% w/v de CMC ( carboxy-methyl-cellulose).

Les bactéries sont mises en incubation à 30°C pendant 5 jours.

Les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante. Les boîtes ensuite remplies d'une solution de rouge de Congo (1mg/ml) et incubées 30 min dans l'étuve

à 30°C. La solution colorante est remplacées par une solution de NaCl 1N, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 min puis sont vidées de cette solution.

Les colonies apparaissent sur fond rouge, avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanasique.

## **IV-4-Tests physiologiques**

### **IV-4-1- Tolérance au NaCl**

Les souches sont cultivées sur le milieu Lactate-aspartate de sodium (Gloux et Le Rudelier, 1989) (Annexe 1).

Les différentes concentrations de NaCl sont : 0.5% (85,5mM), 1% (171mM), 2%(342 mM), 3% (513 mM), 5%(855mM), 10% (1710mM).

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

### **IV-4-2- Température de croissance**

Les différentes souches sont cultivées sur YMA et incubées aux températures suivantes : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C.

Les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

### **IV-4-3- Effet de pH**

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différents pH : 4 , 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 6.8, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

## **IV-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques**

### **IV-5-1- Métaux lourds**

La concentration inhibitrice est déterminée en cultivant les différentes souches sur le milieu TYA contenant différentes concentrations de métaux lourds.

L'incubation dure jusqu'à 7 jours.

Les métaux lourds utilisés : Hg Cl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> et SbO<sub>3</sub> de 0.5 à 6000 µg/ml de TYA.

#### **IV-5-2- Antibiotiques**

##### **Préparation des solutions stock d'antibiotiques :**

On les prépare en dissolvant 1g d'antibiotique dans 100 ml de solvant correspondant. La solution préparée est stérilisée par filtration (0.22µm).

Le test est fait en ajoutant la quantité désirée d'antibiotique au milieu de culture TYA refroidi à environ 45 °C. L'incubation varie de 1 à 7 jours selon l'antibiotique.

Les antibiotiques utilisées : spectinomycine, érythromycine, rifampicine, gentamycine, streptomycine, kanamycine, chloramphénicol, acide nalidixique de 0.5 à 5000 µg/ml de TYA.

**Tableau 6 : les solvants des antibiotiques utilisées**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Solvants</b>
Spectinomycine	Eau distillée
Erythromycine	Ethanol 95%
Rifampicine	Ethanol 95%
Gentamycine	Eau distillée
Streptomycine	Eau distillée
Kanamycine	Eau distillée
Chloramphénicol	Ethanol 95%
Acide nalidixique	NaOH 1N

#### **IV-6- Sensibilité aux phages**

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) et est réalisée en deux étapes :

##### **1- Isolement des bactériophages**

Collecter des échantillons de sols provenant des lieux de récolte des différentes espèces du genre *Hedysarum* utilisées dans cette étude :

Les stocker à 4 °C au réfrigérateur jusqu'au moment de l'utilisation.

**Tableau 7:** les sols provenant des lieux de récolte des différentes espèces du genre *Hedysarum*

<b>Sol</b>	<b>Espèce végétale</b>	<b>Souche correspondante</b>
<b>CHAAB ERSAS CONSTANTINE</b>	<b>H. coronarium</b>	<b>4</b>
		<b>19</b>
		<b>A6</b>
		<b>F</b>
		<b>H</b>
		<b>I</b>
		<b>T</b>
		<b>V</b>
<b>AIN BABOUCH OUM ELBOUAGHI</b>	<b>H. pallidum</b>	<b>HPSb+</b>
<b>TANDJA AMOUCHE SETIF</b>	<b>H. pallidum</b>	<b>HP7</b>
		<b>HP10b</b>
		<b>HP22a</b>
		<b>HP23</b>
		<b>HP</b>
		<b>HPSb-</b>
<b>EL FAID BISKRA</b>	<i>H. carnosum</i>	<b>Hca1</b>
		<b>Hca4</b>
		<b>Hcar</b>
<b>AIN ELBEY CONSTANTINE</b>	<b>H. spinosissimum</b>	<b>HS1</b>
		<b>HS6</b>
		<b>HS15</b>
		<b>HS</b>
		<b>Hscapt</b>
<b>MAOCLANE BOUGAA</b>	<b>H. naudinianum</b>	<b>HnA</b>
		<b>HnM1</b>
		<b>HnM2</b>
		<b>HnN1</b>
		<b>HnN2</b>

- Préparer des flacons contenant 150ml de MNB stérile (Annexe 1).
- Inoculer les flacons avec les souches (5%) et incuber dans un bain Marie agité 28°C pendant 18-20 heures.
- Ajouter à la phase exponentielle de croissance 1g de sol au flacon et incuber dans un bain Marie agité 28°C pendant 18-20 heures.
- Séparer les cellules et le sol par centrifugation (10000t/min)(G) pendant 15min.
- Filtrer le surnageant à travers une membrane filtre stérile (0.22µm).
- Ajouter 10ml de filtrat à une culture fraîche de la même souche bactérienne et incuber dans un bain Marie agitateur 28°C pendant 18-20 heures.
- Centrifuger et filtrer, répéter cette opération 2 fois de plus.
- Mettre le dernier filtrat dans des tubes à raison 10 ml par tubes, ajouter 2 ml de chloroforme et stocker à 4 °C.

## **2- Analyse des phages**

Ensemencer les souches dans le MNB. Après 3 jours d'incubation, étaler 0.1 ml de la culture sur une boîte de Pétri contenant le milieu MNA (Annexe 1). Une anse de chaque suspension de phage est déposée sur la couche bactérienne. La localisation des dépôts est marquée sur le dos de la boîte. Laisser sécher pendant 10-15 min. retourner les boîtes et incuber à 30°C pendant 24-48heures.

## **V- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE**

L'électrophorèse est la migration des molécules chargées en solution sous l'influence d'un champ électrique. La vitesse de migration des molécules dépend de la force du champ (qui agit sur la charge, la taille et la forme des molécules ainsi que la concentration ionique), viscosité et température du milieu dans lequel les molécules se déplacent (Coyne et coll., 2002).

Plus de 2000 protéines différentes sont présentes dans une cellule bactérienne ; ce qui constitue une source d'information très riche pour la caractérisation et l'identification et donc la connaissance d'un organisme bactérien (Ndiaye et coll., 2002).

Les protéines sont des composés amphotères ; leur charge est déterminée par le pH de la solution. Donc, à un pH donné et dans des conditions non dénaturantes la séparation électrophorétique des protéines est déterminée par la taille et la charge des molécules.

### **V-1- SDS-PAGE des protéines**

C'est une technique de criblage, connue pour son important pouvoir de discrimination, permet de distinguer les espèces bactériennes et même des souches au sein d'une même espèce. Elle peut être utilisée à des fins analytiques ou préparatifs, et est relativement rapide, peu coûteuse et reproductible (Benguedouar, 2000 ; Ndiaye et coll, 2002).

#### **V-1-1-Principe**

Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) est un détergent anionique qui dénature les protéines et confère une charge négative au polypeptide proportionnellement à sa longueur. Les complexes SDS-protéines qui se forment sont chargés négativement à pH 7 et toutes les protéines possèdent la même densité de charge. Donc, dans des séparations dénaturantes de SDS-PAGE, la migration est déterminée non pas par la charge intrinsèque du polypeptide, mais par le poids moléculaire exprimé en Daltons (Benguedouar, 2000; Coyne et coll, 2002).

La séparation des protéines d'une souche bactérienne par SDS-PAGE donne un profil ou électrophorogramme caractéristique de la souche et reproductible si les techniques employées sont standardisées. Chaque bande d'un profil électrophorétique est composée de plusieurs protéines de structure différente mais de mobilité identique (Ndiaye et coll, 2002).

## V-1-2- Protocole

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970).

### 1- préparation des extraits protéiques

Une aliquote de 100 µl de chaque culture bactérienne, en phase de croissance exponentielle en milieu TY, est centrifugée à une vitesse de 7000 tours/min pendant 15 min à 4°C et le culot mis en suspension dans 50 µl de tampon de lyse et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (w/v) en conditions dénaturantes.

Tampon de lyse :

Tris	25 mM
Glycérol	192 mM
SDS	2.5%
β-mercaptoéthanol	2.5%
Bleu de Bromophénol	5 mg
Eau distillée	200 ml

Dans la préparation des échantillons après addition du SDS et β-mercaptoéthanol, la solution est portée au bain-marie bouillant 3mn pour une dénaturation complète des protéines. Ce traitement est nécessaire pour la rupture des ponts disulfure.

### 2- préparation des solutions stocks (Solutions mères)

Solution d'acrylamide :

Acrylamide 30%	60 g
Bis acrylamide 0.8%	1.6 g
H <sub>2</sub> O	QSP 200 ml

Tampon resolving: Tris-HCl 3M pH 8.8

Tris	3M	72.7g
SDS	0.8%	1.6g
Mercaptoéthanol (MCE)		0.8ml
H <sub>2</sub> O		QSP 200 ml

Ajuster à pH 8.8 avec HCl.

Tampon stacking : Tris-HCl 0.5M pH 6.8

Tris	0.5M	12.1 g
SDS	0.4%	0.8 g
(MCE)	0.2%	400 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		QSP 200 ml

Ajuster à pH 6.8 avec HCl.

### 3-préparation des gels

Gel de séparation (resolving gel) à 12% :

Solution d'acrylamide	10.4 ml
Tampon resolving	3.14 ml
Tetraméthylènediamine (TEMED)	12.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	QSP 25 ml

Gel de concentration ( stacking gel ) à 7.5 % :

Solution d'acrylamide	5 ml
Tampon stacking	5ml
TEMED	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	QSP 20 ml

Juste avant de couler chaque gel ajouter du persulfate d'ammonium (ammoniumperoxodisulfate) 15%.

Préparer 0.15 g de persulfate dans 1 ml d'eau distillée et ajouter au :

Resolving gel	140 $\mu$ l
Stacking gel	200 $\mu$ l.

### 4- préparation du tampon de migration pH 8.3

Tris	0.025M	1.06 g
Glycine	0.192M	5.04 g
SDS	0.1%	0.35 g
(MCE)	0.05%	175 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		QSP 350ml

## 5- Préparation des plaques de gel

Monter les plaques dans le couleur (1 plaque blanche + 1 spacer de chaque coté + 1 plaque en verre + 1 intercalaire en plastique etc.).

- Couler le resolving et recouvrir d'eau + butanol
- Retirer l'eau + alcool et couler le stacking
- Placer rapidement les peignes
- Laisser polymériser, démonter et retirer les peignes
- Placer 1 ou 2 plaques dans l'appareil à électrophorèse et remplir avec le tampon migration.

## 6- Dépôts des échantillons et migration électrophorétique

Avant de déposer les échantillons, remplir les puits avec le tampon de migration .

A l'aide d'une seringue Hamilton (100 $\mu$ l), un volume de 20  $\mu$ l de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puit.

La migration électrophorétique est réalisée en appliquant un ampérage constant de 80 mA et un voltage de départ de 127V qui atteint à la fin de migration la valeur de 287 V. La migration dure jusqu'à 5 heures, et elle est arrêtée lorsque le front formé par l'indicateur bleu de bromophénol arrive à 3-4 mm de l'extrémité inférieure du gel.

## 7- Révélation des bandes protéiques

- Solution de coloration

Solution mère (bleu de Comassie et de méthanol)	25 ml
Acide trichloracétique (TCA) à 60 %	40 ml
Eau distillée	QSP 200 ml

Après migration, le gel est démoulé. Le gel de concentration est écarté, et donc le gel de séparation est mis dans un récipient contenant la solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation.

La décoloration est effectuée en remplaçant la solution de coloration par l'eau distillée jusqu'à la décoloration complète de gel et l'apparition nette des bandes protéiques.

Le poids moléculaires des bandes polypeptidiques obtenues est déterminé en utilisant un kit LMW (Low Molecular Weight) constitué d'un mélange de protéines de poids moléculaires connus : Phosphorylase b **97KDa**, Albumine **66 KDa**, Uvalbumine **45KDa**, Anhydrase carbonique **30KDa**, Inhibiteur de trypsine **20.1KDa**,  $\alpha$ -Lacalbumine **14.4KDa**.

## **VI- Caractérisation moléculaire**

La caractérisation moléculaire des souches isolées est réalisée avec le concours et l'aimabilité au Professeur A. Squartini du laboratoire de biotechnologie agraire de l'Université de Padoue (Italie), et est effectuée par la technique de l'ARDRA selon le protocole expérimental décrit par Benhizia (2006).

### **VI -1- Extraction de l'ADN**

Le protocole d'extraction est sensiblement le même quelle que soit la nature de l'échantillon. Des cellules sont lysées en remettant une anse de la colonie d'isolement dans 50 µl de tampon de lyse (0,25% SDS, 0.05M NaOH) dans un tube d'Eppendorf, agiter 60 secondes sur un vortex puis chauffer à 95°C pendant 15 minutes. Le lysat est centrifugé 15 minutes à 12000 t/mn (centrifugeuse type Eppendorf 5415D) et 10 µl du surnageant sont prises et ajoutées au 90 µl d'eau stérile. Le reste des lysats est stocké à -20°C avant la PCR.

### **VI -2- Analyse par l'ARDRA (analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S)**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique permettant d'amplifier *in vitro* des séquences d'ADN par répétition de réaction d'élongation en présence d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques.

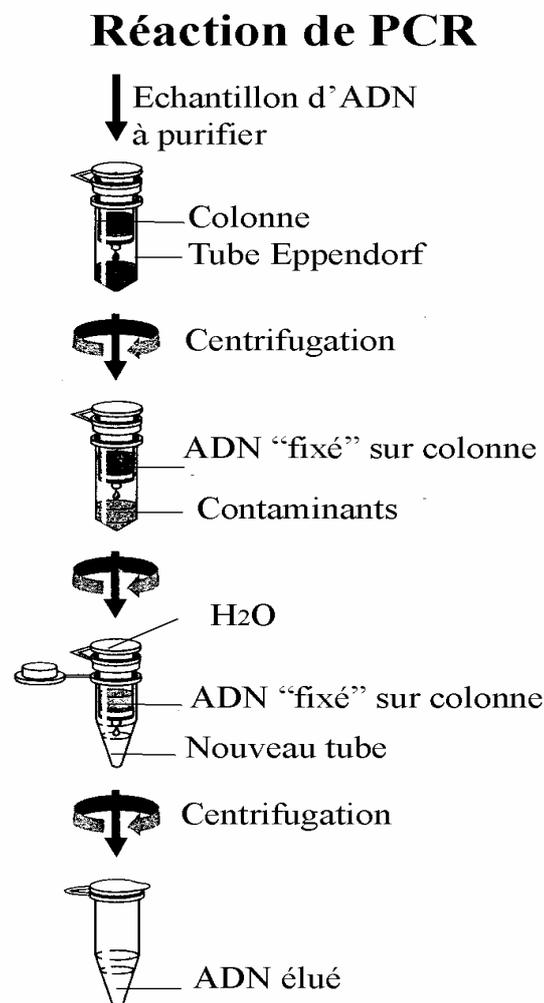
Un µl de lysat dilué contenant tout l'ADN des isolats bactériens est traité par un appareil de type PCR BioRad I-Cycler à l'aide des deux amorces bactériennes universelles cibles ADNr 16S, la 63F(5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC) (Marchesi et coll., 1998) et la 1389R (5'ACGGGCGGTGTGTACAAG) (Osborn et coll., 2000) à 1µM, sont mises dans un volume réactionnel de 25µl, en utilisant le programme suivant: dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes; 35 cycles à 95°C pour 30 sec, 55°C pendant 1 minute, 72°C pendant 4 minutes et une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. 12µl des produits de l'amplification des 25µl du volume de réaction, sont digérés durant une nuit à 37°C avec 1,5µl de l'enzyme de restriction *CfoI* (enzyme obtenue à partir de la bactérie *Clostridium formicoaceticum* et dont le site de restriction est « GCG/C », Pharmacia, Upsal, Suède) et 1,5µl du tampon de réaction 10 x. Les fragments obtenus après digestion sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. La durée de la migration électrophorétique est de trois heures à 110 V. Le segment d'ADN amplifié peut être facilement repéré dans un gel coloré au bromure d'éthidium. Le gel ainsi coloré est

visualisée à l'aide d'un transilluminateur UV et photographié en utilisant un appareil-photo numérique Kodak DC290 à haute résolution.

### VI-3- Le séquençage selon la méthode de Sanger

La méthode Sanger consiste à synthétiser in vitro des brins d'ADN complémentaires à l'un des brins de l'ADN que l'on veut séquencé. La technique repose sur l'incorporation d'un nucléotide modifié (un didésoxyribonucléotide, auquel il manque deux atomes d'oxygène) qui empêche la contamination de la synthèse d'ADN.

Avant de procéder au séquençage, l'ADN à analyser doit être purifié selon le protocole suivant :



### Fragment d'ADN pure

**Figure 14:** Purification de l'ADN par le Kit Qiagen QIAquick PCR (Qiagen, GmbH, Hilden Allemagne, 1999).

Les didéoxyribonucléotides sont marquées au moyen de colorants fluorescents, avec une couleur différente pour chacun des quatre types de nucléotides en utilisant un fluorescent terminators (Big Dye, PerkinElmer/Applied Biosystems, Foster City Calif. U.S.A). Les quatre réactions peuvent ainsi se dérouler dans la même éprouvette; la couleur de la fluorescence permet de reconnaître les extrémités « didésoxy » des brins d'ADN produits par la réaction. Le séquençage est effectué sur un compteur d'ADN séquentiel automatisé ABI prism Applied Biosystems 3730xl. Des chromatogrammes sont analysés par le programme DNASTAR de Chromas 2,23 (Technelysium Pty Ltd, Tewantin Australie).

Les fragments de l'ADNr 16S séquencés des souches étudiées sont comparés à l'ensemble des séquences déjà entreposées dans les bases de données (Altschul et coll., 1990) Site web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ce type d'analyse est pratiqué pour toute séquence nouvellement acquise, qui est comparée (Benhizia, 2006).

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

## I- Caractères culturels

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

Les isolats diffèrent dans leur absorption du rouge Congo ; on trouve celles qui ne l'absorbent pas et gardent leur couleur blanchâtre (HnA, HnM), ou l'absorbent faiblement, en plus de celles qui l'absorbent (reste des souches).

En général, les rhizobia produisent des colonies blanches ou absorbent faiblement le rouge Congo. Malgré que ce dernier soit souvent rajouté aux milieux de culture pour isoler les rhizobia ou pour tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être un agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries.

Kneen et La Rue (1983), ont déclaré que les souches de *R.meliloti* et *R.trifoli* sur YMA- rouge Congo apparaissent blanches, roses, oranges ou rouge. Ceci est valable pour les souches Gammaproteobacteria (Benhizia, 2006) qui présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo.

Les isolats ne modifient pas le pH sur milieu GPA-bromocrésol pourpre, mais la plupart d'entre elles provoquent une réaction acide sur YMA au bleu de bromothymol avec un virage de la couleur du milieu du vert vers le jaune ce qui prouve que les isolats ont une croissance rapide (Beck et coll., 1993), à l'exception, de la souche HPSb+. Ce résultat peut s'expliquer par la présence chez la bactérie d'un mécanisme neutralisant de l'acidité (de Oliveira et de Magalhães, 1999). (Planche3).

L'examen microscopique des cellules bactériennes donne des bactéries de forme bâtonnet à extrémités arrondies, Gram négatif et de différentes tailles. (Planche4).

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, l'aspect des colonies et l'examen microscopique montre que les isolats ont la description des rhizobia ainsi que les Gammaproteobacteria.



**Colonies sur YMA**

**-GPA-BCP-**



**-YMA-BTB-**



**-YMA-rouge Congo-**



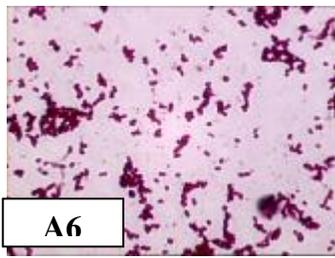
**Rhizobia (A6)**



**Gammaproteobacteria (HS1)**

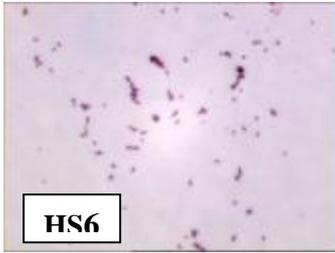


**Isolats (HnA)**

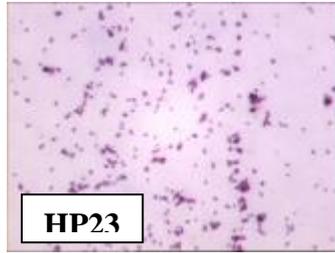


A6

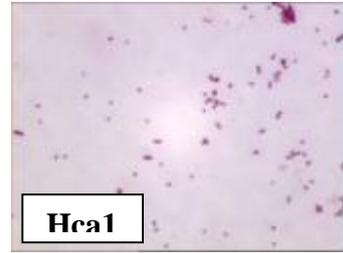
Rhizobia



HS6

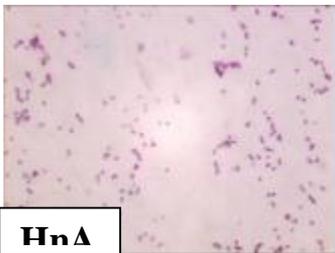


HP23

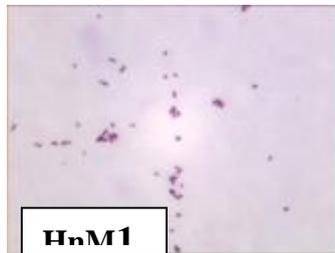


Hca1

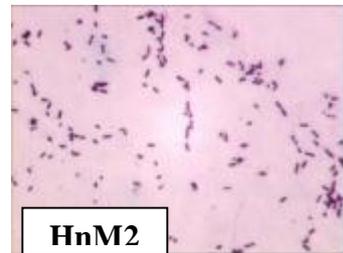
Gammaproteobacteria



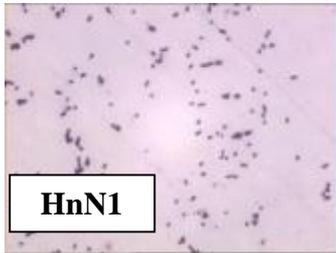
HnΔ



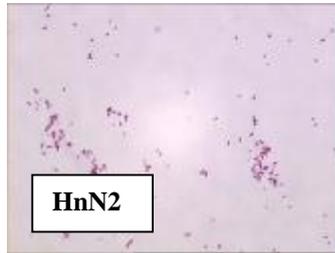
HnM1



HnM2

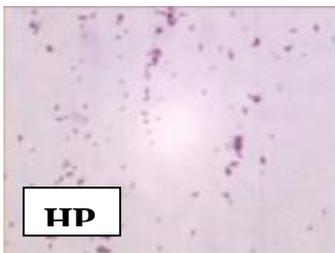


HnN1



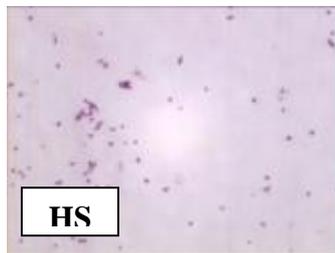
HnN2

*H. naudinianum*



HP

*H. pallidum*



HS

*H. spinosissimum*



Hcar

*H. carnosum*

Isolats

Planche 4: examen microscopique par la coloration de Gram

## II- Authentification des isolats

La capacité des bactéries d'infecter les racines de légumineuses et de former des nodules s'appelle "l'infektivité", alors que le terme "efficience" donne une indication de la capacité des plantes nodulées à fixer l'azote (Beck et coll., 1993).

Dans notre étude, nous avons utilisé le système des jarres de Leonard pour évaluer la capacité de nos souches de former des nodules sur les racines des différentes espèces du genre *Hedysarum* sous des conditions bactériologiques contrôlées. Donc ce système fournit la protection de toute contamination en utilisant un support (sable-vermiculite) inerte et sec et l'arrosage se fait par-dessous (cordon de compresse stérile). Ainsi que l'inoculation des souches est réalisée sous des conditions d'asepsie stricte.

Après une période de culture de deux à trois mois dans une chambre de culture sous des conditions également contrôlées, les plantes sont prélevées pour évaluer la nodulation. La croissance des plantes s'est déroulée normalement jusqu'à la fin du test. La partie aérienne est bien développée en prenant les feuilles comme résultat positif de cette partie (feuilles colorées « vertes »), ainsi que la partie racinaire présente une stimulation même en absence des nodules. Chez toutes les espèces végétales testées le nombre de nodules obtenus est limité et de petite taille.

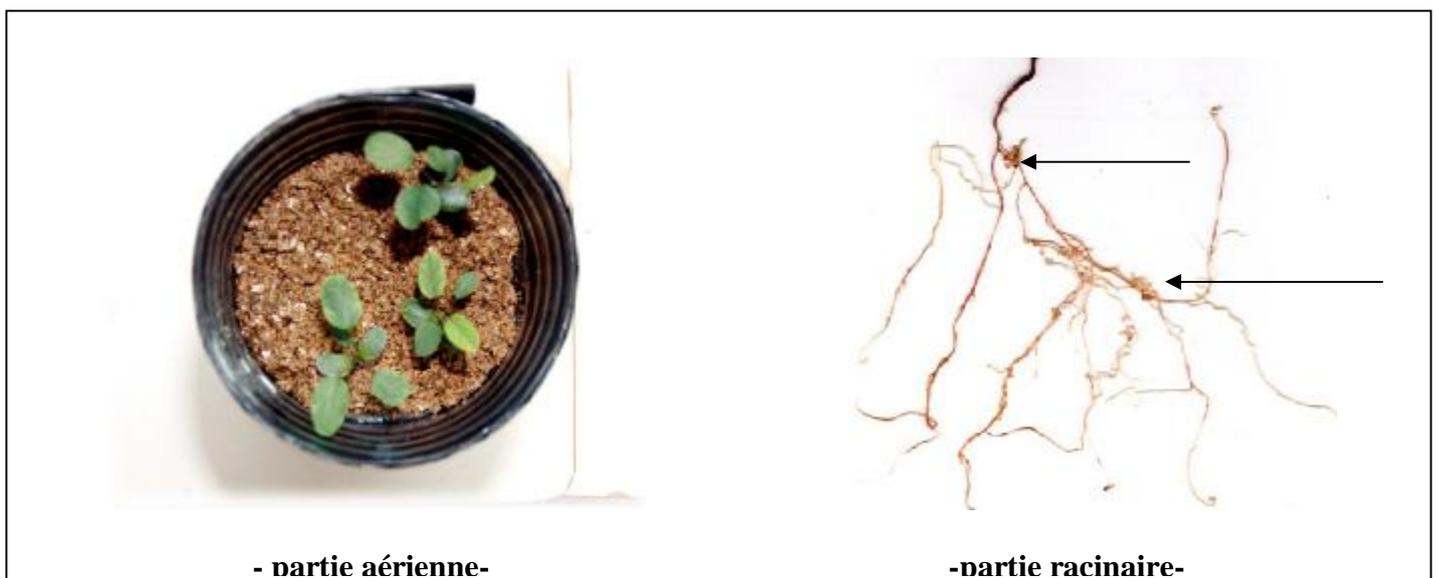


Figure 15: développement des plantes

→ nodules

Les résultats du test de nodulation diffèrent selon les espèces végétales et les souches inoculées.

L'infectivité est le résultat de l'interaction de la légumineuse hôte et la souche envahissante (Beck et coll., 1993).

#### Premier test de nodulation

***H. pallidum*** : on observe la formation des nodules en présence de toutes les souches Gammaproteobacteria testées (souches spécifiques ou croisement) et aussi avec ces isolats.

**Tableau 8** : résultat du 1<sup>ier</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. pallidum*

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<i>H. pallidum</i>	HS1	08-12-2004	14-02-2005	3p (2-1-10)
		07-02-2005	27-04-2005	3p (1-3-0)
	HS6	08-12-2004	20-02-2005	3p (1-6-0)
		07-02-2005	27-04-2005	3p (3-6-3)
	HS15	08-12-2004	05-02-2005	(-)
		07-02-2005	27-04-2005	3p (4-3-0)
	HP7	18-11-2004	24-01-2005	2p (3-2)
		05-12-2005	13-02-2005	3p (5-2-8)
	HP10b	05-12-2004	13-02-2005	2p (3-2)
		05-12-2004	13-02-2005	3p (4-2-0)
	HP22a	05-12-2004	13-02-2005	3p (4-2-2)
		20-11-2004	13-02-2005	3p (3-0-0)
	HP23	18-11-2004	05-02-2005	2p (2-0)
		18-11-2004	08-02-2005	2p (2-1)
	Hca1	12-12-2004	20-02-2005	3p (2-8-3)
		07-02-2005	27-04-2005	2p (1-2)
	Hca4	08-12-2004	14-02-2005	2p (3-0)
		06-03-2005	18-05-2005	1p (3)
	HP	22-11-2004	05-02-2005	2p (2-0)
		19-12-2004	03-03-2005	3p (3-7-1)
HPSb+	15-12-2004	20-02-2005	3p (12-12-0)	
	28-02-2005	09-05-2005	3p (5-5-3)	
HPSb-	22-11-2004	08-02-2005	1p (1)	
	19-12-2004	02-03-2005	3p (2-3-8)	

**chiffre + p** : nombre de pieds ; **chiffre** : nombre de nodule ; (-) : absence de nodules et de palettes.



**- naud/ HnA-**



**-naud/HnM1-**



**-naud/HnM2-**



**-naud/HnN1-**



**-naud/HnN2**

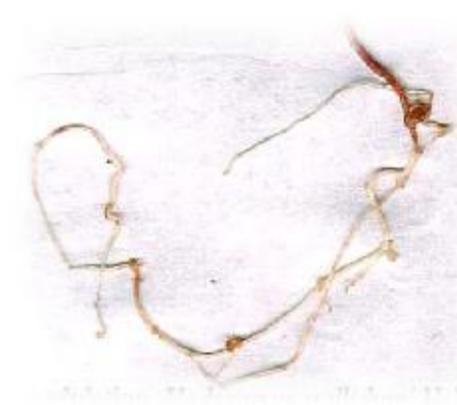
***H.naudinianum* / isolats**



**-*H. coronarium*/ 4-**



**-*H. spinosissimum*/Hscapt-**



**-*H. pallidum*/HPSb-**



**-*H. carnosum*/Hcar**

**Plantes /Souches**

*H. spinosissimum* : on observe également des nodules avec toutes les souches testées et l'apparition des structures appelée palettes avec les souches non spécifiques (HP7 et Hca4).

**Tableau 9** : résultat du 1<sup>ier</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. spinosissimum*

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<i>H. spinosissimum</i>	HS1	07-02-2005	27-04-2005	3p (2-0-0)
		07-02-2005	27-04-2005	2p (2-0)
	HS6	05-12-2004	13-02-2005	3p (12-1-5)
		20-12-2004	02-03-2005	2p (4-5)
	HS15	20-12-2004	03-03-2005	2p (8-0)
		13-11-2005	26-01-2006	3p (4-3-1)
	HP7	20-12-2004	03-03-2005	1p (7)
		13-11-2005	26-01-2005	3p (12pa-5-6)
	HP10b	05-12-2004	14-02-2005	3p (4-4-6)
		07-02-2005	27-04-2005	3p (5-2-1)
	HP22a	26-12-2004	03-03-2005	1p (6)
		21-02-2005	08-05-2005	1p (1)
	HP23	05-12-2004	14-02-2005	2p (7-0)
		20-12-2004	03-03-2005	1p (4)
	Hca1	15-12-2004	02-03-2005	2p (22-10)
		21-02-2005	08-05-2005	(-)
	Hca4	07-02-2005	27-04-2005	2p (6-1)
		13-11-2005	26-01-2006	2p (6pa)
	HS	20-12-2004	03-03-2005	3p (12-3-6)
		21-02-2005	18-05-2005	2p (2-3)
HScapt	21-02-2005	08-05-2005	3p (3-0-0)	
	13-11-2005	26-01-2006	2p (17-3)	

**chiffre + p** : nombre de pieds ; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

***H. carnosum***: on a obtenu peu de nodules et un nombre élevé de palettes. Les nodules sont absents même en présence de la souche spécifique.

**Tableau 10:** résultat du 1<sup>ier</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. carnosum*

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. carnosum</b>	<b>HS1</b>	25-09-2005	08-12-2005	(-)
		20-09-2005	08-12-2005	<b>1p (3pa)</b>
	<b>HS6</b>	15-12-2004	03-03-2005	<b>3p (4-2-0)</b>
		13-02-2005	27-04-2005	<b>1p (3)</b>
	<b>HS15</b>	17-01-2005	27-03-2005	(-)
		09-01-2005	03-04-2005	<b>2p (2pa-23pa)</b>
	<b>HP7</b>	21-02-2005	08-05-2005	<b>2p (3-0)</b>
		20-09-2005	08-12-2005	<b>1p (1pa)</b>
	<b>HP10b</b>	21-02-2005	08-05-2005	<b>3p (3-0-0)</b>
		28-02-2005	09-05-2005	<b>2p (7-0)</b>
	<b>HP22a</b>	19-12-2004	03-03-2005	<b>2p (1-6)</b>
		04-12-2005	21-02-2006	<b>1p (3pa)</b>
	<b>HP23</b>	12-12-2004	13-02-2005	<b>3p (23pa-4-7)</b>
		08-12-2004	20-02-2005	<b>1p(3)</b>
	<b>Hca1</b>	21-02-2005	08-05-2005	<b>1(2pa)</b>
		06-03-2005	28-05-2005	(-)
	<b>Hca4</b>	21-02-2005	08-05-2005	<b>1p (1)</b>
		21-12-2005	21-02-2006	<b>3p(1pa-2pa-6pa)</b>
	<b>Hcar</b>	21-02-2005	08-05-2005	(-)
		10-10-2005	27-12-2005	<b>2p (3pa)</b>

**chiffre + p** : nombre de pieds ; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

***H. coronarium*** : formation des nodules en présence des souches Gammaproteobacteria (pas toutes les souches) et les souches de rhizobia en plus de l'apparition des palettes.  
On observe qu'il y a échec de la nodulation avec la souche spécifique A6 (R. sulae).

**Tableau 11** : résultat du 1<sup>ier</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. coronarium*

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. coronarium</b>	<b>HS1</b>	05-12-2004	20-02-2005	<b>2p (7-14)</b>
		09-01-2005	27-03-2005	<b>1p (1pa)</b>
	<b>HS6</b>	05-12-2004	20-02-2005	(-)
		09-01-2005	27-03-2005	(-)
	<b>HS15</b>	19-12-2004	02-03-2005	<b>3p(1-1-3)</b>
		12-01-2005	27-03-2005	(-)
	<b>HP7</b>	19-12-2004	03-03-2005	<b>3p (4-4-0)</b>
		09-01-2005	27-03-2005	<b>3p (1-2pa-0)</b>
	<b>HP10b</b>	19-12-2004	03-03-2005	<b>3p (4-7-10)</b>
		17-01-2005	03-04-2005	<b>2p (3pa)</b>
	<b>HP22a</b>	19-12-2004	03-03-2005	<b>2p (1-3)</b>
		12-12-2004	12-03-2005	<b>3p (2-4-1)</b>
	<b>HP23</b>	19-12-2004	03-03-2005	(-)
		17-01-2005	03-04-2005	<b>2p (1pa-0)</b>
	<b>Hca1</b>	20-12-2004	02-03-2005	(-)
		17-01-2005	03-04-2005	<b>3p (2-0-0)</b>
	<b>Hca4</b>	09-01-2005	27-03-2005	<b>3p (3-1-2)</b>
		09-01-2005	27-03-2005	(-)
	<b>4</b>	03-03-2005	17-05-2005	<b>3p (2-2-1)</b>
		10-11-2005	29-01-2006	<b>2p (1-3pa)</b>
	<b>19</b>	03-03-2005	17-05-2005	(-)
		21-11-2005	08-02-2006	<b>1p (1pa-2)</b>
	<b>A6</b>	21-03-2005	28-05-2005	(-)
		20-09-2005	08-02-2006	(-)
	<b>F</b>	03-03-2005	17-05-2005	<b>3p (3-1-0)</b>
		10-11-2005	29-01-2006	<b>2p (1-2pa)</b>
	<b>H</b>	03-03-2005	17-05-2005	<b>2p (1-3)</b>
		13-11-2005	29-02-2005	<b>1p (1pa)</b>
<b>I</b>	03-03-2005	17-05-2005	<b>3p (0-1-3)</b>	
	03-03-2005	17-05-2005	(-)	
<b>T</b>	03-03-2005	17-05-2005	(-)	
	21-11-2005	25-02-2005	<b>1p (2-2pa)</b>	
<b>V</b>	03-03-2005	17-05-2005	(-)	
	21-11-2005	08-02-2006	(-)	

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes;  
(-) : absence de nodules et de palettes.

**H. naudinianum** : nous avons difficilement obtenu des nodules pour cette espèce. Elle a donné des nodules avec les souches spécifiques (isolats de cette espèce). Mais avec les autres souches la nodulation est réussie qu'avec deux souches de Gammaproteobacteria et trois souches de rhizobia. Les palettes sont également présentes chez cette espèce.

**Tableau 12:** résultat du 1<sup>ier</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. naudinianum* en présence des souches de référence Gammaproteobacteria.

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. naudinianum</b>	<b>HS1</b>	08-12-2004	20-02-2005	(-)
		12-01-2005	27-03-2005	(-)
	<b>HS6</b>	05-12-2004	20-02-2005	<b>2p (2-3)</b>
		08-12-2004	20-02-2005	<b>1p (1)</b>
	<b>HS15</b>	08-12-2004	20-02-2005	(-)
		18-01-2005	03-04-2005	<b>1p (1pa)</b>
	<b>HP7</b>	07-02-2005	27-04-2005	(-)
		27-11-2005	08-02-2005	(-)
	<b>HP10b</b>	08-12-2004	20-02-2005	(-)
		11-10-2005	27-12-2005	(-)
	<b>HP22a</b>	17-01-2005	03-04-2005	<b>1p (1pa)</b>
		07-02-2005	27-04-2005	<b>1p (1)</b>
	<b>HP23</b>	12-12-2004	20-02-2005	(-)
		07-04-2004	27-04-2005	(-)
	<b>Hca1</b>	08-12-2004	20-02-2005	(-)
		30-01-2005	03-04-2005	<b>1p (1pa)</b>
	<b>Hca4</b>	30-01-2005	03-04-2005	(-)
		21-02-2005	08-05-2005	(-)

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

**Tableau 13 :** résultat du 1<sup>ier</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. naudinianum* en présence des souches de référence rhizobia

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. naudinianum</b>	<b>4</b>	19-12-2004	03-03-2005	(-)
		13-11-2005	26-01-2006	<b>2p (2-0)</b>
	<b>19</b>	19-12-2004	03-03-2005	(-)
		27-02-2005	09-05-2005	(-)
	<b>A6</b>	21-03-2005	28-05-2005	(-)
		26-10-2005	26-01-2006	(-)
	<b>F</b>	12-01-2005	12-03-2005	(-)
		03-01-2005	27-03-2005	<b>1p (13pa)</b>
	<b>H</b>	26-12-2004	03-03-2005	(-)
		27-02-2005	09-05-2005	<b>2p (1-0)</b>
	<b>I</b>	06-01-2005	12-03-2005	(-)
		06-01-2005	27-03-2005	(-)
	<b>T</b>	09-01-2005	03-03-2005	(-)
		27-02-2005	09-05-2005	<b>2p (2-3)</b>
	<b>V</b>	19-12-2005	03-03-2005	(-)
		10-03-2005	28-05-2005	<b>1p (1)</b>

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

**Tableau 14:** résultat du 1<sup>ier</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. naudinianum* en présence des isolats spécifiques

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. naudinianum</b>	<b>HnA</b>	26-10-2005	26-01-2006	(-)
		27-11-2005	25-02-2006	<b>2p (2-5)</b>
	<b>HnM1</b>	13-11-2005	26-01-2006	<b>1p (2)</b>
		23-11-2005	25-02-2006	<b>3p (1-2-0)</b>
	<b>HnM2</b>	06-03-2005	28-05-2005	(-)
		13-11-2005	26-01-2006	<b>2p (2-0)</b>
	<b>HnN1</b>	06-03-2005	28-05-2005	(-)
		23-11-2005	25-02-2006	<b>3p(1-1pa-0-0)</b>
	<b>HnN2</b>	06-03-2005	28-05-2005	(-)
		23-11-2005	25-02-2006	<b>2p (2pa-0)</b>

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

## Deuxième test de nodulation

A cause de l'échec de la nodulation chez les espèces végétales testées ou le nombre limité et la taille très minime des nodules on a réalisé un deuxième test pour voir si la souche rhizobiale a un rôle dans la nodulation, en supposant qu'elle stimule la formation des nodules (clé de la nodulation) et laisse après la souche spécifique de la plante continuer son chemin pour l'infection des racines et la nodulation.

***H. pallidum*** : on observe que cette espèce a pu former des nodules en présence de la souche rhizobiale A6. La nodulation est réussie en présence de couples de souches. en plus de nodules en remarque l'apparition des palettes.

**Tableau 15:** résultat du 2<sup>ème</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. pallidum*

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. pallidum</b>	<b>A6</b>	25-09-2005	08-12-2005	<b>1p (2)</b>
	<b>(A6, HP7)</b>	25-09-2005	08-12-2005	<b>1p (1)</b>
	<b>(A6, HP10b)</b>	21-11-2005	21-02-2006	<b>1p (2-4pa)</b>
	<b>(A6, HP22a)</b>	21-11-2005	08-02-2005	<b>2p (3-2)</b>
	<b>(A6, HP23)</b>	27-09-2005	08-12-2005	<b>1p (2-5pa)</b>
	<b>(A6, HP)</b>	21-11-2005	21-02-2006	<b>2p (1-1-1pa)</b>
	<b>(A6, HPSb+)</b>	27-09-2005	08-12-2005	<b>1p (1)</b>
	<b>(A6, HPSb-)</b>	27-09-2005	20-12-2005	<b>1p (3pa)</b>

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

***H. spinosissimum***: cette espèce a également former des nodules en présence de la souche rhizobiale A6, mais on observe que la nodulation est réussie seulement en présence du couples de souches (A6, HS6) et (A6, HS15). Les palettes apparaissent avec tous les couples de souches.

**Tableau 16:** résultat du 2<sup>ème</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. spinosissimum*.

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. spinosissimum</b>	<b>A6</b>	13-11-2005	20-02-2006	<b>1p (4-6pa)</b>
	<b>(A6, HS1)</b>	24-11-2005	20-02-2006	<b>1p (3pa)</b>
	<b>(A6, HS6)</b>	11-11-2005	08-02-2006	<b>2p (12-2-2pa)</b>
	<b>(A6, HS15)</b>	10-11-2005	20-02-2006	<b>1p (5-10pa)</b>
	<b>(A6, HS)</b>	24-11-2005	20-02-2006	<b>2p (0-4pa)</b>
	<b>(A6, HScapt)</b>	24-11-2005	20-02-2006	<b>2p (0-4pa)</b>

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

***H. carnosum***: le résultat de la nodulation est négatif avec la souche rhizobiale A6. Il est positif seulement avec le couple de souches (A6, Hcar). On remarque que le nombre de palettes a augmenté.

**Tableau 17:** résultat du 2<sup>ème</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. carnosum*

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. carnosum</b>	<b>A6</b>	04-12-2005	21-02-2006	<b>3p (3pa-2pa-1pa)</b>
	<b>(A6, Hca1)</b>	05-12-2005	08-02-2006	<b>2p (5pa-1pa)</b>
	<b>(A6, Hca4)</b>	21-11-2005	21-02-2006	<b>(-)</b>
	<b>(A6, Hcar)</b>	11-10-2005	27-12-2005	<b>3p (3-6pa-0)</b>

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; (-) : absence de nodules et de palettes.

***H. naudinianum*** : cette espèce n'a pas pu former des nodules en présence de la souche rhizobiale A6. La nodulation est réussie en présence de couples de souches. pour le couple (A6, HnN1) on remarque l'absence de nodules et la présence d'une palette.

**Tableau 18:** résultat du 2<sup>ème</sup> test de nodulation pour l'espèce *H. naudinianum*

Plante	Souche inoculée	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied
<b>H. naudinianum</b>	<b>A6</b>	26-10-2005	26-01-2006	<b>(-)</b>
	<b>(A6, HnA)</b>	21-11-2005	25-02-2006	<b>2p (1-0)</b>
	<b>(A6, HnM1)</b>	21-11-2005	25-02-2006	<b>3p (2-0-0)</b>
	<b>(A6, HnM2)</b>	21-11-2005	25-02-2006	<b>3p (3-0-0)</b>
	<b>(A6, HnN1)</b>	21-11-2005	25-02-2006	<b>3p (1pa-0-0)</b>
	<b>(A6, HnN2)</b>	21-11-2005	25-02-2006	<b>1p (1)</b>

**chiffre + p** : nombre de pieds; **chiffre** : nombre de nodule; **pa + chiffre** : nombre de palettes; **(-)** : absence de nodules et de palettes.

A partir des résultats obtenus, on peut conclure que les résultats du premier test sont plus significatifs par rapport à ceux du deuxième test (aptitude des souches de former de nodules). On remarque également que la présence de la souche rhizobiale A6 n'a pas d'influence sur la formation de nodules par les autres souches.

Enfin, on peut supposer que les souches Gammaproteobacteria et les isolats spécifiques des plantes peuvent infecter les racines des plantes et former des nodules sans l'intervention de la souche rhizobiale, mais le processus de l'interaction plante-bactérie reste contestable.



- *H. pallidum*/Rh-



- *H. carnosum*/Rh-



- *H. spinosissimum*/Rh-



- *H. naudinianum*/Rh-

**Plantes / Rhizobia**



- *H. pallidum*/(A6+HP) -



- *H. carnosum*/(A6+Hca)-



- *H. spinosissimum*/(A6+HS)-



- *H. naudinianum*/(A6+Hn)-

**Plantes / (Rhizobia+ Souche spécifique)**

**Planche 6 : Résultats du 2<sup>ème</sup> test de nodulation**

### **III- Caractérisation phénotypique des bactéries**

#### **III-1- Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium***

##### **III-1-1- Test du 3-cétolactose**

Après l'addition du réactif de Benedict, aucun halo n'est formé autour des colonies et ces dernières restent toujours blanchâtres, ce qui signifie que toutes les souches ne produisent pas la 3-cetoglucosidase et donc n'oxydent pas le C<sub>3</sub> du glycosyl des saccharides . Le même résultat est démontré par deLajudie (1998) pour le genre *Allorhizobium* et Lambert (1990) pour le genre *Phylobacterium*.

##### **III-1-2-Précipitation du glycérophosphate de calcium**

L'incubation des souches pendant 2 jours sur gélose au mannitol et au calcium glycérophosphate ne donne lieu à aucun brunissement ni un précipité ( résultat négatif ). Sur ce milieu nos résultats sont comparables à ceux indiquées par Struffi (1998).

Les résultats de ces deux tests ont conclu que nos isolats n'appartiennent pas au genre *Agrobacterium*.

##### **III-1-3- Croissance sur Litmus milk (lait tournesolé)**

Les souches du rhizobia sur ce milieu présentent une croissance lente, les colonies apparaissent dès le troisième jour et sont entourées d'un halo clair. Alors que les souches des Gammaproteobacteria présentent une croissance rapide avec une décoloration du milieu de culture.

Pour les isolats, les souches HnN1 et HnN2 présentent le même comportement des souches du rhizobia tandis que le reste des souches montre un résultat similaire à celui des souches Gammaproteobacteria.

Les souches du rhizobia et les isolats HnN1 et HnN2 sur ce milieu ont le même comportement décrit par Struffi (1998) et Benguedouar (2000).

La différence remarquée dans les résultats des rhizobia et des Gammaproteobacteria ainsi qu'entre les isolats donne une première approche sur la caractérisation et l'identification des isolats.

**Tableau 19:** Résultats des testes distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

test souche	3-cétolactose	glycérophosphate de calcium	Litmus milk
HS1	-	-	-
HS6	-	-	-
HS15	-	-	-
HP7	-	-	-
HP10b	-	-	-
HP22a	-	-	-
HP23	-	-	-
Hca1	-	-	-
Hca4	-	-	-
4	-	-	+
19	-	-	+
A6	-	-	+
F	-	-	+
H	-	-	+
I	-	-	+
T	-	-	+
V	-	-	+
HnA	-	-	-
HnM1	-	-	-
HnM2	-	-	-
HnN1	-	-	+
HnN2	-	-	+
HP	-	-	-
HPSb+	-	-	-
HPSb-	-	-	-
HS	-	-	-
Hscapt	-	-	-
Hcar	-	-	-

+ :résultat positif ; - : résultat négatif

## **III-2- Tests nutritionnels**

### **III-2-1- Source de carbone**

Les mesures de la densité optique montrent une faible croissance en présence du xylose (s1). Le sorbitol (s6) et le citrate de sodium (s7) donnent un bon développement pour la plupart des souches. Le mannitol présente une bonne source de carbone pour toutes les souches sauf pour la souche HP. Mais généralement on remarque que les souches peuvent utiliser tous les carbohydrates testés et n'exigent pas le mannitol comme source de carbone.

L'utilisation des sucres peut fournir les caractères différentiels pour l'identification des espèces (Allen et Allen, 1950). Tan et coll. (1999) ont trouvé que toutes leurs isolats utilisent le mannitol comme seule source de carbone. Alors que Struffi et coll. (1998) montrent que les souches testées peuvent utiliser une large gamme d'hydrates de carbone.

### **III-2-2- Source d'azote**

La croissance des souches sur le milieu défini 8 varie d'une source d'azote à une autre et presque toutes les souches peuvent croître en présence de la majorité des acides aminés testés.

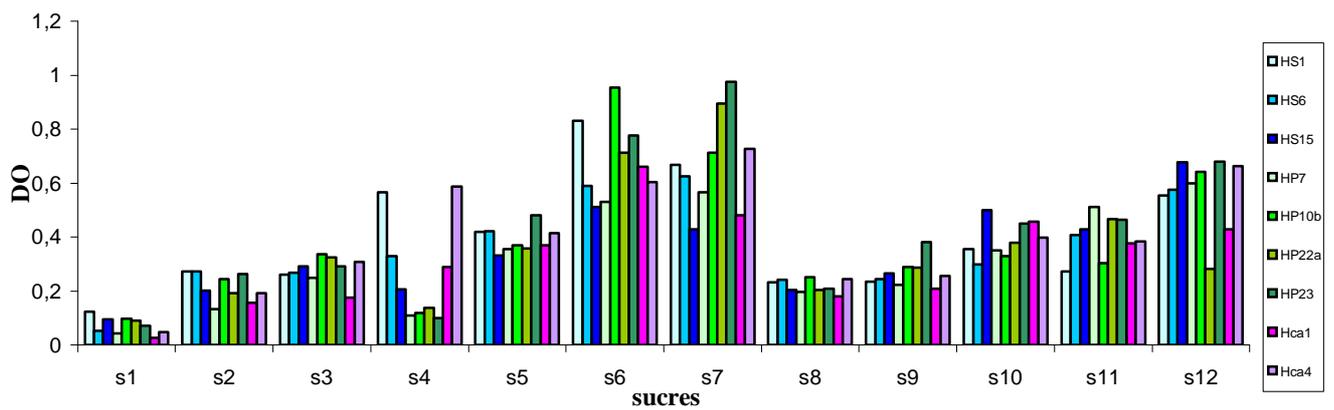
La majorité des souches n'utilisent pas la méthionine (a15) comme source d'azote.

La souche A6 n'a pas pu pousser avec l'histidine (a13) contrairement à tous les autres souches. Ainsi que la souche 4 avec la phénylalanine (a 8).

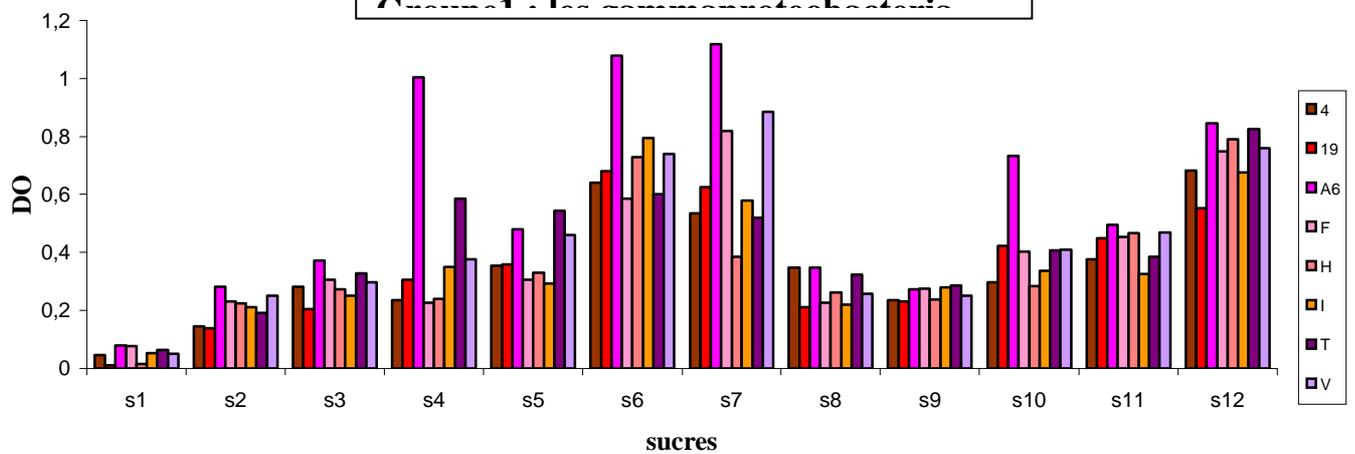
La lysine (a10) ne donne pas une bonne croissance pour la plupart des souches surtout les souches HP23, I et T.

Aucun trouble n'est observé en présence de la tyrosine (a 3) pour les souches HS1, HP7, HP10b, Hca4 et 4, la leucine (a4) pour les souches HS15, Hca4, I et V, la thréonine (a 5) pour les souches HS1, HS6, Hp7, Hca1 et Hca4 et l'isoleucine (a 6) pour les souches HS6, HS15, 4, Hscapt, Hcar.

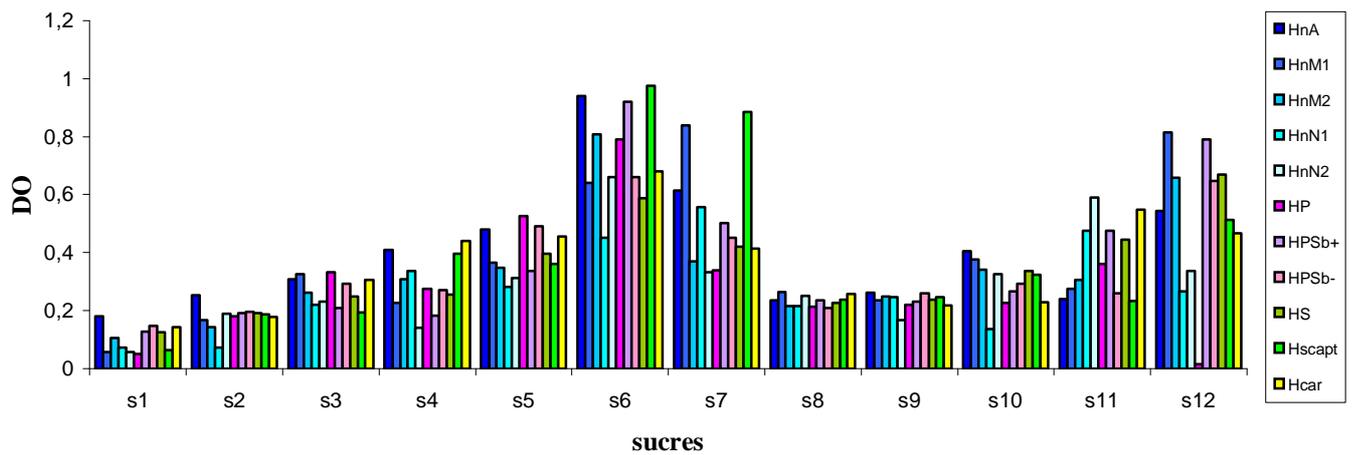
Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Jordan, 1984), comme c'est trouvé par Struffi et coll. (1998) avec la thréonine.



**Groupe 1: les commensales**

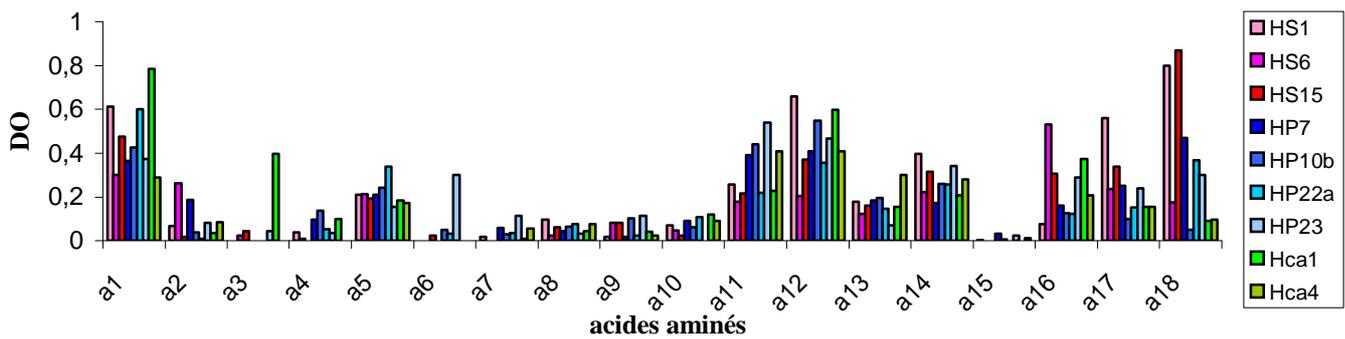


**Groupe 2: les rhizobia**

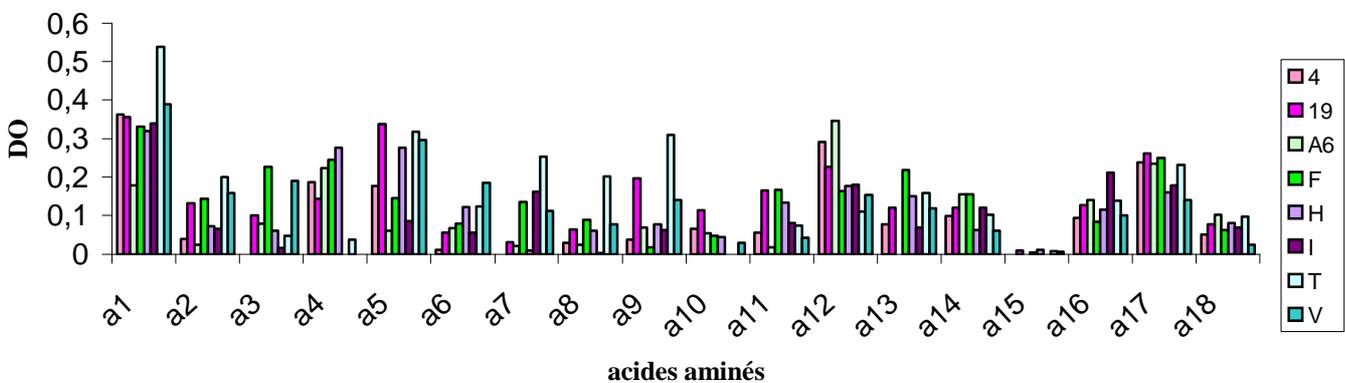


**Groupe 3: les isolats**

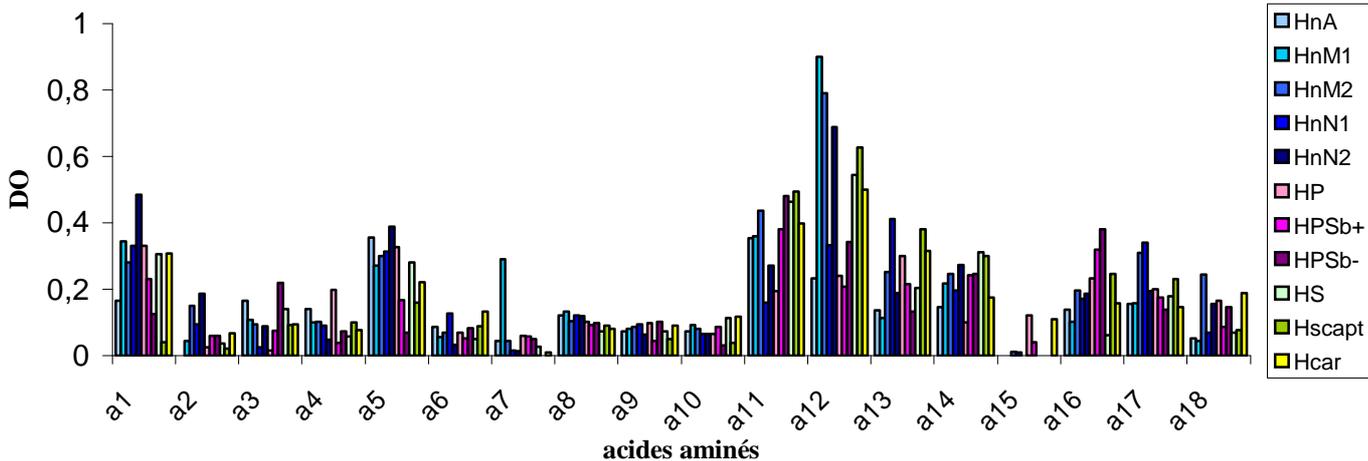
**Planche 7:** Utilisation de la source de carbone par les trois groupes des souches testées



**Group 1: les commensales bactéries**

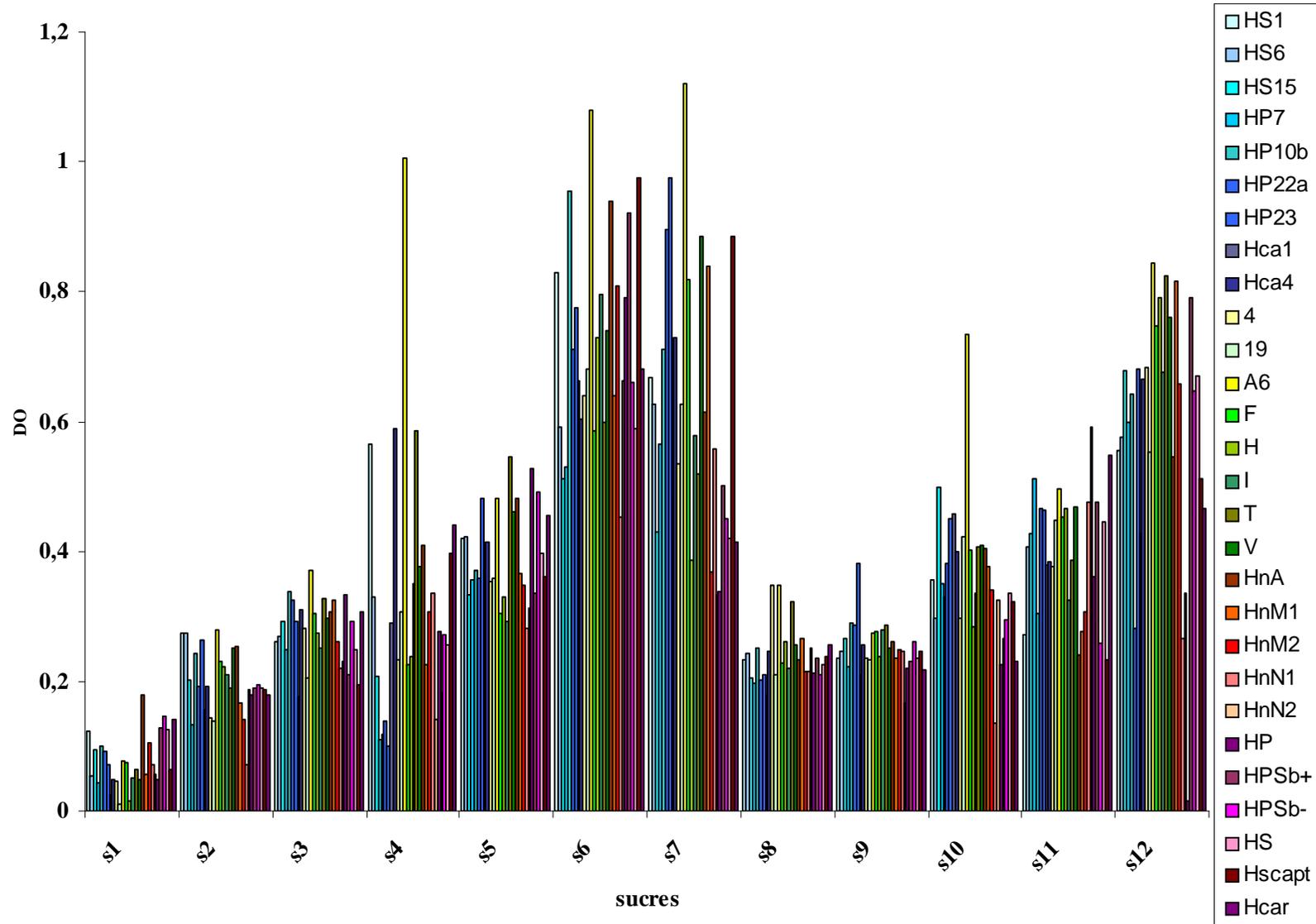


**Group 2: les rhizobia**

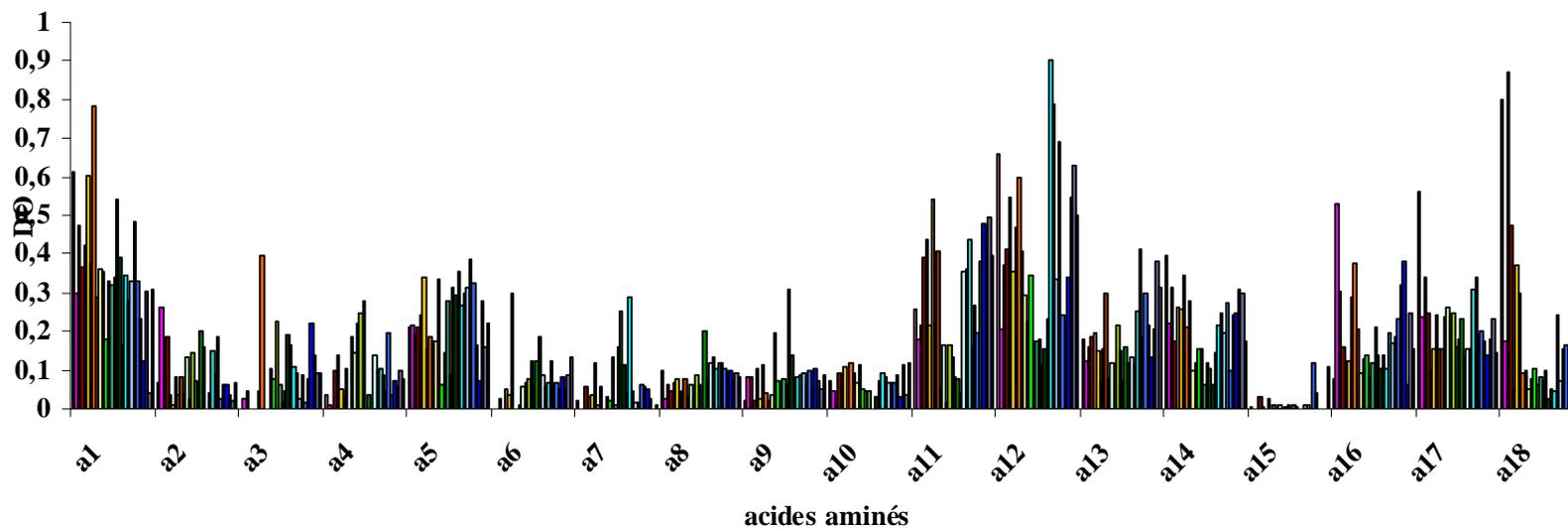
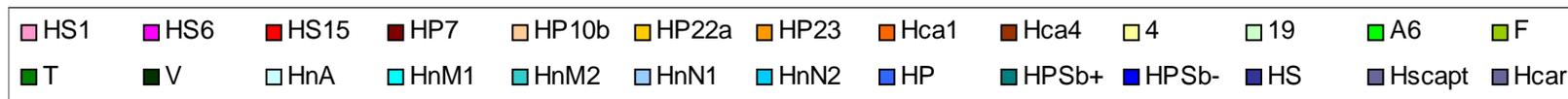


**Group 3: les isolats**

**Planche 8:** Utilisation de la source d'azote par les trois groupes des souches testées



**S1:** xylose, **s2:** arabinose, **s3:** saccharose, **s4:** fructose, **s5:** galactose, **s6:** sorbitol, **s7:** citrateNa, **s8:** raffinose, **s9:** lactose, **s10:** maltose, **s11:** glucose, **s12:** mannitol



**Figure 17:** utilisation de la source d'azote par toutes les souche testées a1: glutamate Na, a2: valine, a3: tyrosine, a4: leucine a5: proline, a6: thréonine a7: isoleucine, a8: phenylalanine, a9: tryptophane, a10: lysine, a11: glycine, a12: serine, a13: histidine, a14: arginine, a15: méthionine, a16: alanine, a17: asparagines, a18: cystéine

### **III-2-3- Besoin en vitamines**

La stimulation de croissance par les vitamines est différente selon la vitamine utilisée.

Pour les souches *Gammaproteobacteria* on observe que les vitamines aminobenzoïque (v2) et pantothenate-Ca (v7) ne stimulent pas la croissance de la souche HS15, également la riboflavine (v1) pour la souche HS1. Cette dernière est bien développée en présence de la thiamine-HCl (v5) . La biotine (v4), la thiamine-HCl (v5), la pyridoxine-HCl (v6) et la pantothenate-Ca (v7) donnent des valeurs élevées de la densité optique pour la majorité des souches *Gammaproteobacteria*.

La plupart des souches rhizobiales testées montrent une bonne stimulation de croissance avec la biotine (v4).

Pour les isolats, on trouve que la vitamine nicotinique (v3) n'est pas un bon stimulateur de croissance pour les souches HPSb+, HPSb- et HS. Les autres vitamines donnent un bon développement.

Le milieu (B III+ toutes les vitamines ) (complet) ne signifie pas une croissance optimale pour la majorité des souches contrairement pour d'autres ( souche 4 ).

Werner (1992) démontre que le besoin en vitamines chez les rhizobia est très variable et qu'en général la croissance du *Bradyrhizobium* est stimulée par la biotine et celle de *Rhizobium* par la thiamine et la pantothénate. Les autres vitamines ne sont pas exigées pour la croissance des rhizobia.

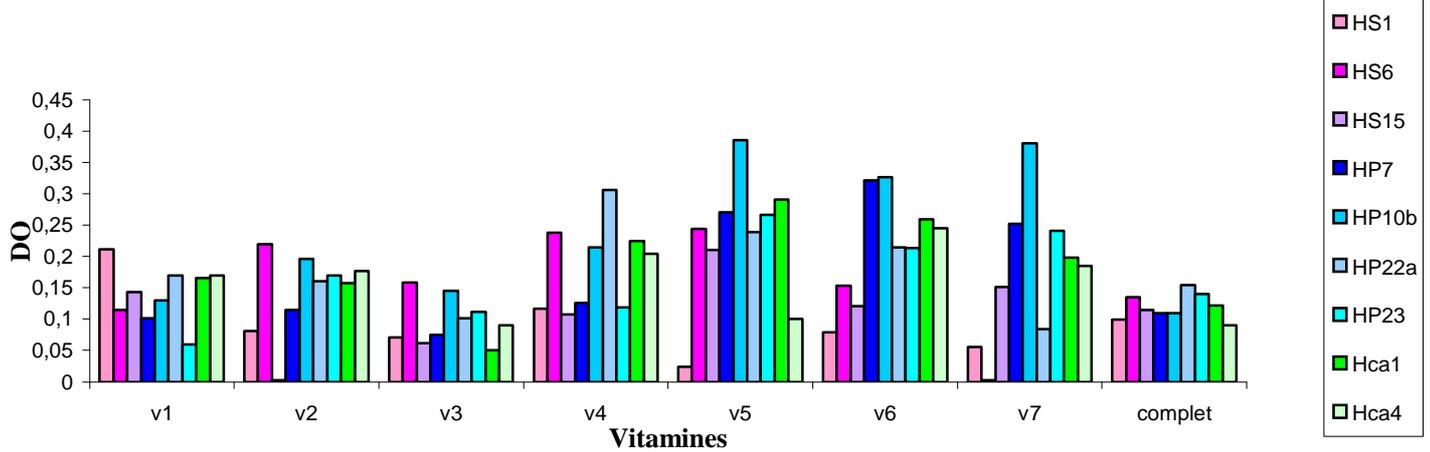
### **III-3-Tests biochimiques (recherche des enzymes spécifiques)**

#### **III-3-1-Réduction des nitrates**

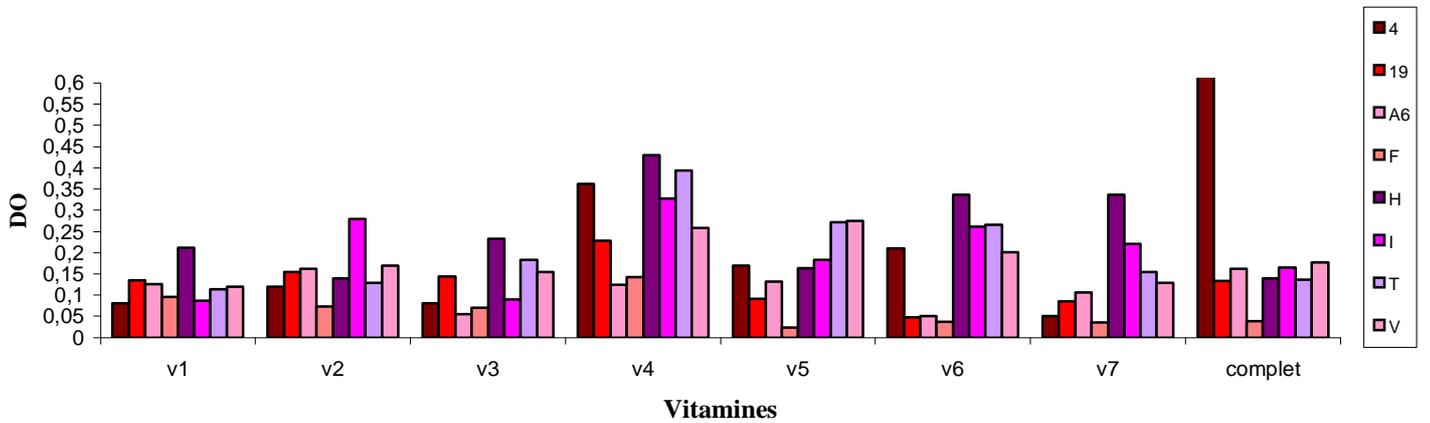
Toutes les souches réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition des réactifs I et II de la nitrate réductase, sauf la souche Hca4 qui a donné une réaction négative, mais après l'addition de la poudre de zinc apparaît la couleur rougeâtre.

La coloration rouge ou rose traduit la décomposition des nitrates en nitrites. La réaction peut être rendue négative par la réduction des nitrites formés; il faut donc contrôler, dans le cas de l'absence de coloration, s'il reste des nitrates en ajoutant au milieu un peu de poudre de zinc qui les réduit et entraîne une coloration ( Guiraud, 1998).

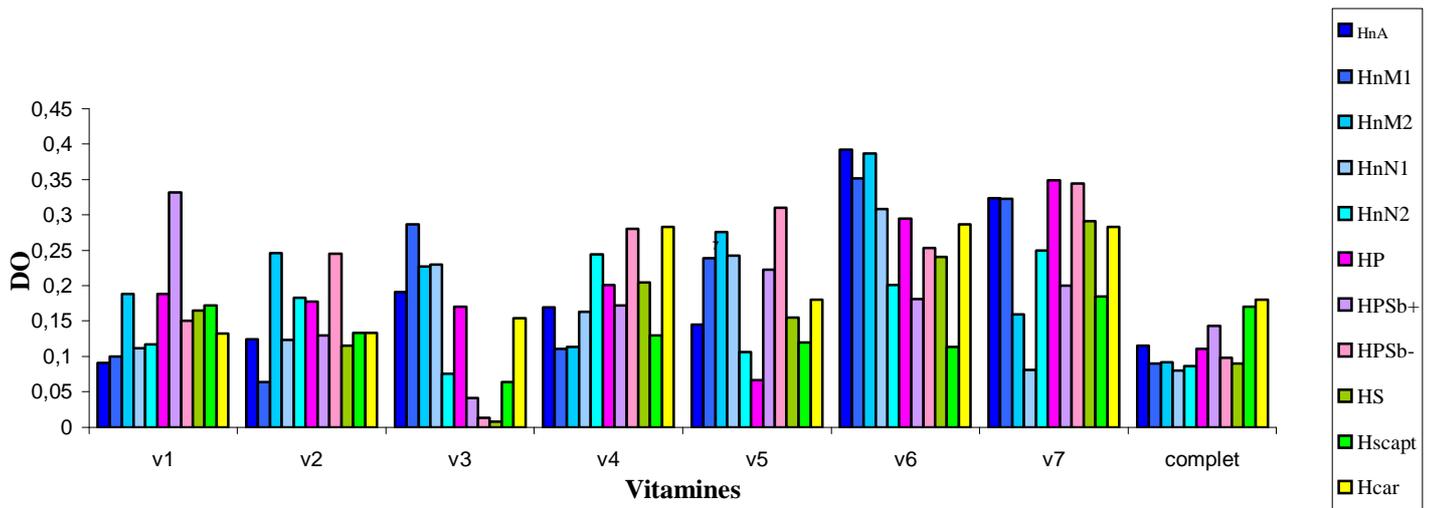
Il existe trois types de nitrate réductase chez la bactérie, qui peuvent effectuer la réduction des nitrates en nitrites dans différentes conditions physiologiques : la nitrate réductase membranaire respiratoire (NAR) peut produire de l'énergie métabolique en employant le nitrate comme accepteur final d'électron pendant la dénitrification anaérobie.



**Group 1: les commensales**

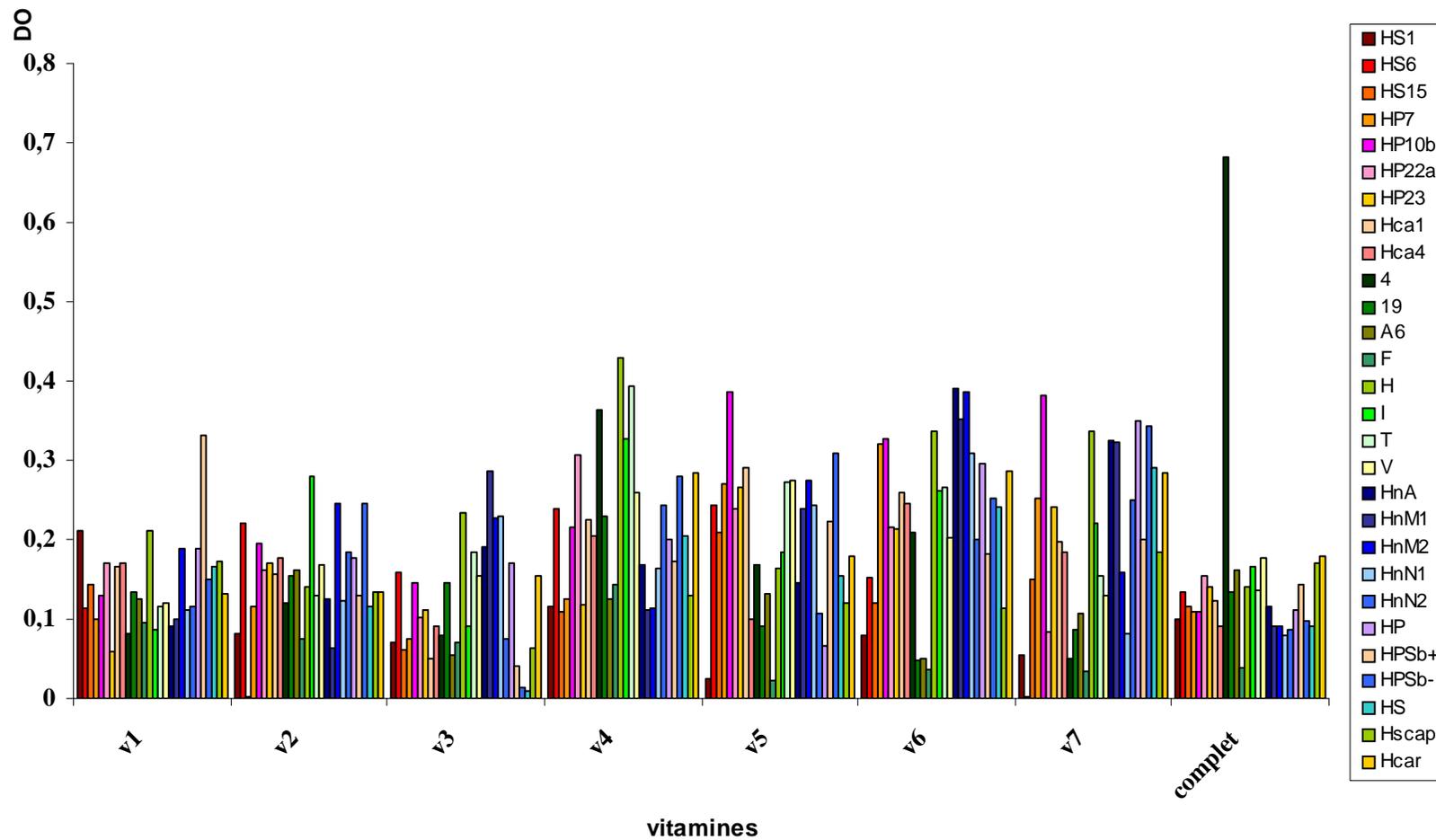


**Group 2: les rhizobia**



**Group 3: les isolats**

**Planche 9: Besoin en vitamines des trois groupes des souches testée**



**Figure 18:** Besoin en vitamines de toutes les souches testées

**V1:** riboflavine, **V2:** p-aminobenzoïque, **V3:** nicotinique, **V4:** biotine, **V5:** thiamine-HCl, **V6:** pyridoxine-HCl, **V7:** pantothénate-Ca

La nitrate réductase assimilatrice cytoplasmique (NAS) peut convertir le nitrate en ammonium, qui peut alors être incorporé aux biomolécules. La troisième enzyme est une nitrate réductase dissimilatrice (NAP) qui existe dans le périplasme de quelques bactéries Gram négatives et peut ramener le nitrate au nitrite dans les conditions aérobies et anaérobies (Çelen et Kiliç, 2004).

Une étude de la distribution de la nitrate réductase dans les bactéroïdes indique qu'une proportion de l'activité totale est membranaire et que cette activité est semblable à celle dans la fraction soluble (Kennedy et coll., 1975).

Luciński et coll.(2002) montrent que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes.

### **III-3-2- Hydrolyse de l'urée**

Toutes les souches ont une activité uréasique et alcalinisent le milieu de culture en observant un virage de la couleur de l'indicateur de pH (rouge de phénol) du rouge vers le jaune ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium comme s'est montré dans l'équation (Guiraud, 1998) :



L'uréalyse est une propriété très répandue dans le monde bactérien et se traduit par la libération de l'ammonium qui a une importance très répandue dans le monde agricole (Mobly, 1992).

### **III-3-3- Activité pectinolytique**

Après l'addition du rouge de ruthénium et le rinçage avec de l'eau un halo clair est observé autour des colonies indiquant une activité pectinolytique pour tous les souches.

### **III-3-4-Activité cellulolytique**

Pour les souches de rhizobia, les colonies apparaissent sur un fond rouge entourés d'un halo jaune orangé ce qui met en évidence l'activité cellulolytique, par contre pour les souches Gammaproteobacteria, on remarque l'absence de l'halo et une activité cellulolytique négative. Pour les isolats, seulement les souches HnN1 et HnN2 qui ont présenté le résultat positif, les autres souches montrent un résultat négatif.

**Tableau 20: Résultats des tests biochimiques**

enzyme souche	Nitrate réductase	Uréase	Cellulase	Pectinase
<b>HS1</b>	+	+	-	+
<b>HS6</b>	+	+	-	+
<b>HS15</b>	+	+	-	+
<b>HP7</b>	+	+	-	+
<b>HP10b</b>	+	+	-	+
<b>HP22a</b>	+	+	-	+
<b>HP23</b>	+	+	-	+
<b>Hca1</b>	+	+	-	+
<b>Hca4</b>	-	+	-	+
<b>4</b>	+	+	+	+
<b>19</b>	+	+	+	+
<b>A6</b>	+	+	+	+
<b>F</b>	+	+	+	+
<b>H</b>	+	+	+	+
<b>I</b>	+	+	+	+
<b>T</b>	+	+	+	+
<b>V</b>	+	+	+	+
<b>HnA</b>	+	+	-	+
<b>HnM1</b>	+	+	-	+
<b>HnM2</b>	+	+	-	+
<b>HnN1</b>	+	+	+	+
<b>HnN2</b>	+	+	+	+
<b>HP</b>	+	+	-	+
<b>HPSb+</b>	+	+	-	+
<b>HPSb-</b>	+	+	-	+
<b>HS</b>	+	+	-	+
<b>Hscapt</b>	+	+	-	+
<b>Hcar</b>	+	+	-	+

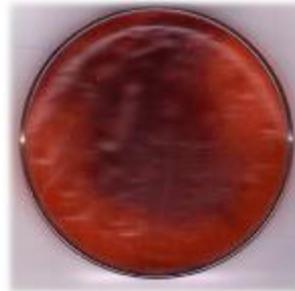
+: activité enzymatique positive; -: activité enzymatique négative



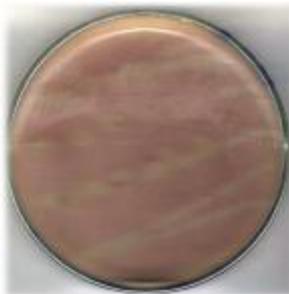
**Activité uréasique positive**



**Activité cellulolytique positive**



**Activité cellulolytique négative**



**Activité pectinolytique positive**

**Planche10** : tests enzymatiques

Les hémicelluloses, et surtout la cellulose, constituants majeurs des cellules végétales ne sont accessibles qu' à une flore spécialisée (Davet, 1996). La démonstration de la présence de la cellulase et du hémicellulase en plus du pectinase chez les rhizobia suppose que cette dernières infectent la plante légumineuse en hydrolysant la paroi des cellules racinaires dans le site d'infection (Martinez-Molina, 1979).

Les constituants de la paroi cellulaire des plantes sont généralement semblables dans toutes les plantes dicotylédones et ne sont pas très divers chimiquement. Les enzymes hydrolysant ces substrats peuvent jouer un rôle dans le procédé d'infection mais ne peuvent pas jouer un rôle direct dans la détermination de la spécificité de l'hôte (Hubbell, 1978).

### **III-4-Tests physiologiques**

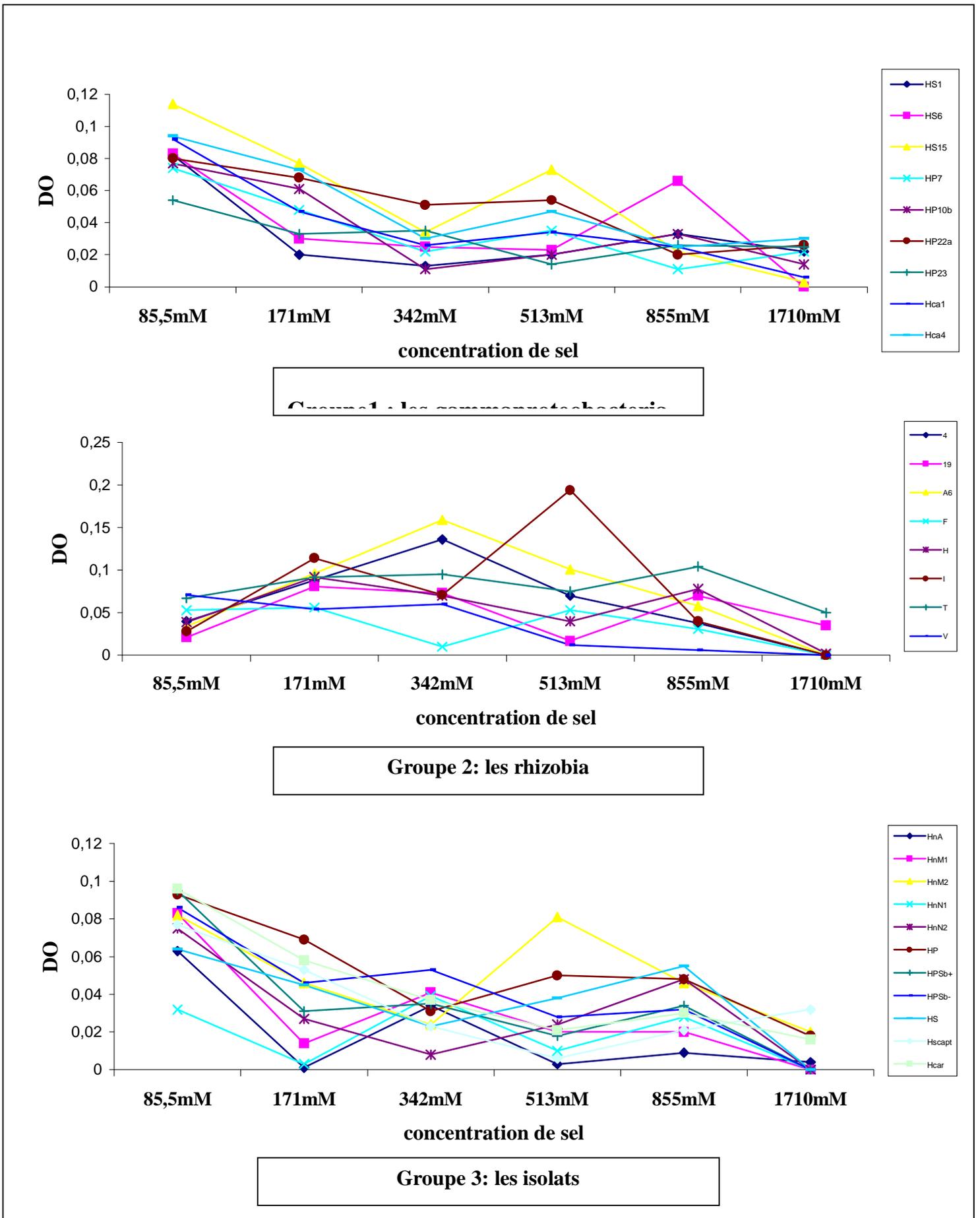
#### **III-4-1- Tolérance au NaCl**

Toutes les souches croissent en présence des concentrations de NaCl variant de 0.5% (85.5mM) à 5% (855mM). A une concentration de 10% (1710mM) aucune croissance n'est observée pour la majorité des souches.

Batzli et ces collaborateurs (1992), déclarent que la tolérance au NaCl donne l'évidence de la diversité entre les isolats. Ainsi Wei et coll.(2003) ont trouvé que les espèces de *Rhizobium loessence* isolées à partir des plantes légumineuses du trèfle et d'astragale n'ont pas pu croître dans un milieu de culture avec 5% de NaCl , tandis que les isolats de *Bradyrhizobium* ont pu tolérer cette concentration et leur croissance est inhibée à une concentration de 8% de NaCl (Raza et coll., 2001).

La symbiose légumineuses- *Rhizobium* et la formation des nodules sur les racines des plantes légumineuses sont plus sensibles au sel et au stress osmotique que leur rhizobia (Zahran, 1999). La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase ( Saadallah et coll., 2001).

Beaucoup d'espèces bactériennes ainsi que les rhizobia s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes (Zahran, 1999).



**Planche11:** Effet de NaCl sur la croissance des trois groupes des souches testées

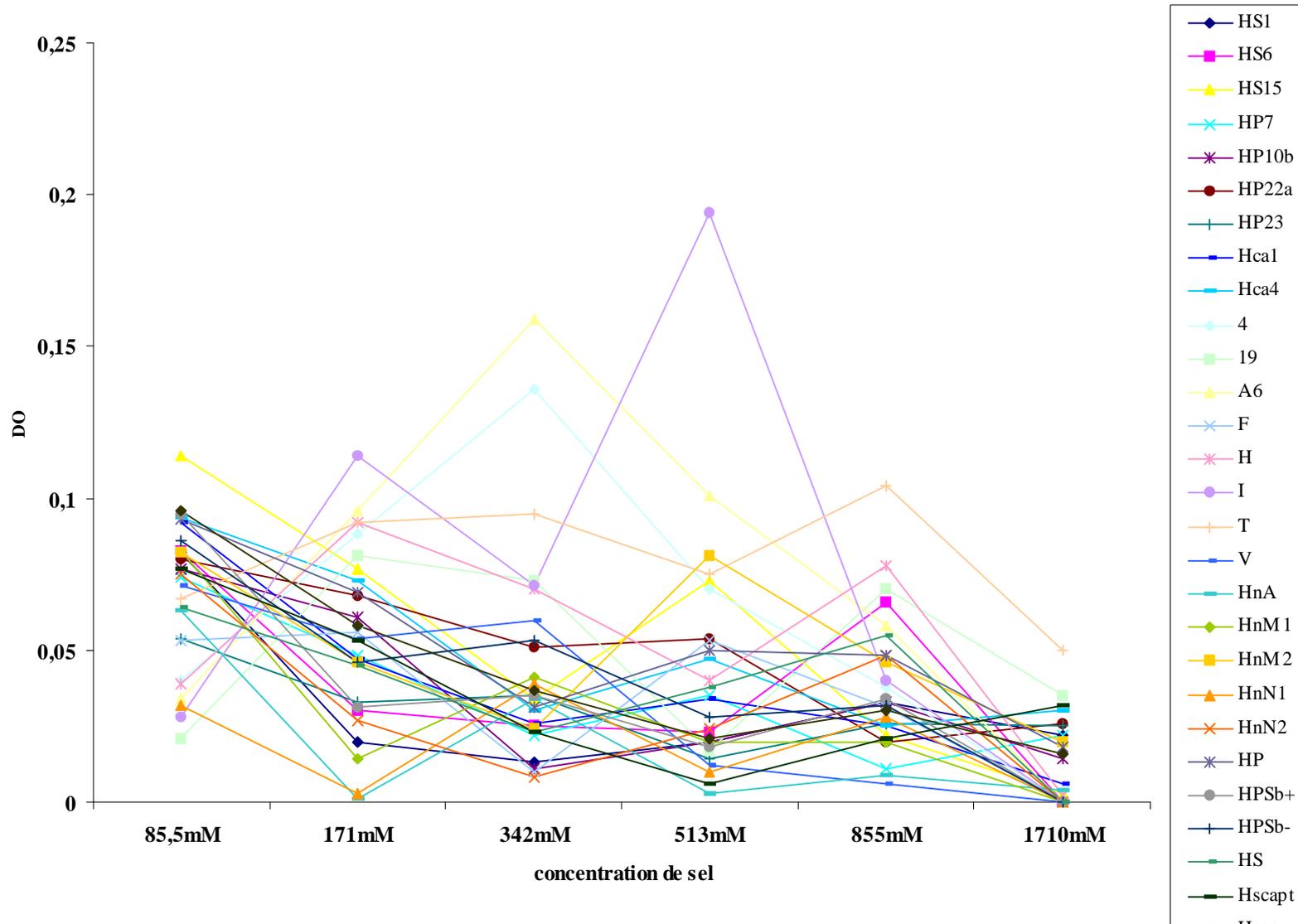


Figure 19: Effet du NaCl sur la croissance de toutes les souches testées

### **III-4-2- Température de croissance**

La plupart des souches sont capables de croître à une température de 4°C jusqu'à 45°C et montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 20°C à 37°C. Sauf quelques souches ( HP7, HP22a, 4 et HnM1) qui peuvent résister la température 50°.

Les souches rhizobiales isolées par Wei et coll.(2003) peuvent également croître à 4°C et celles isolées par Diouf et coll.(2000) résistent des températures très élevée de 40°C à 44°C. Razaneen et coll.(2002) déterminent que les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermorésistance est probablement reliée à la capacité des bactéries de survivre dans des périodes chaudes.

### **III-4-3- Effet de pH**

Les souches peuvent survivre dans l'intervalle de pH 4.0 à pH 10. L'optimum de croissance de toutes les souches testées se situe entre pH 6.5 et pH 7.5.

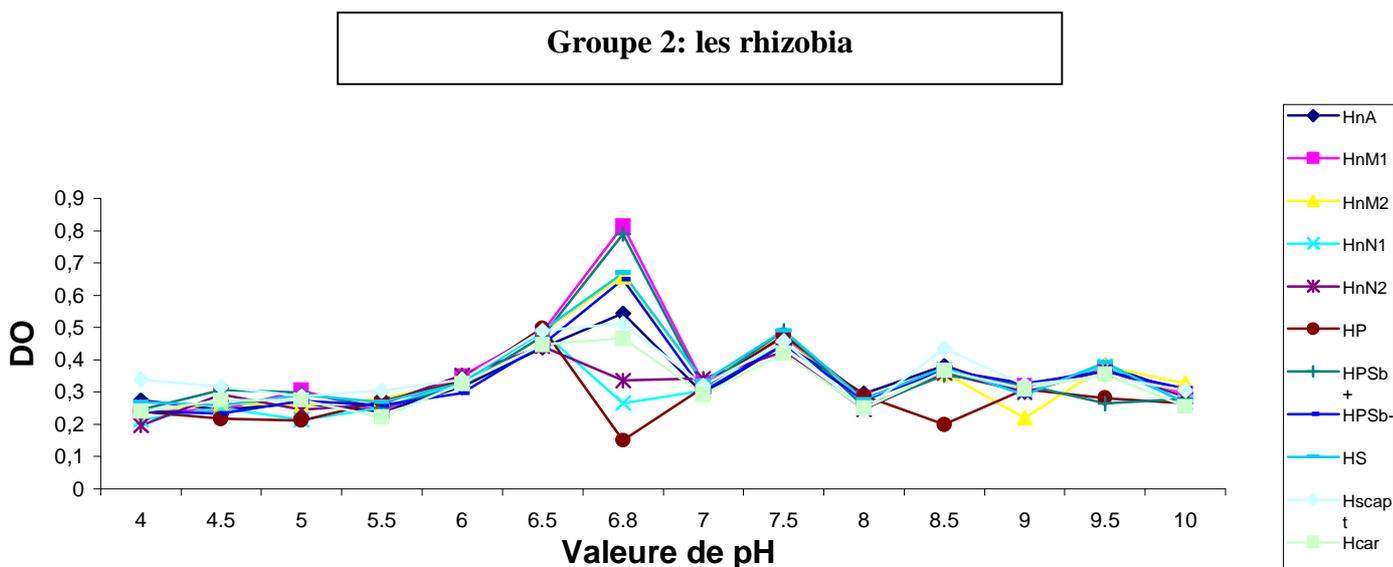
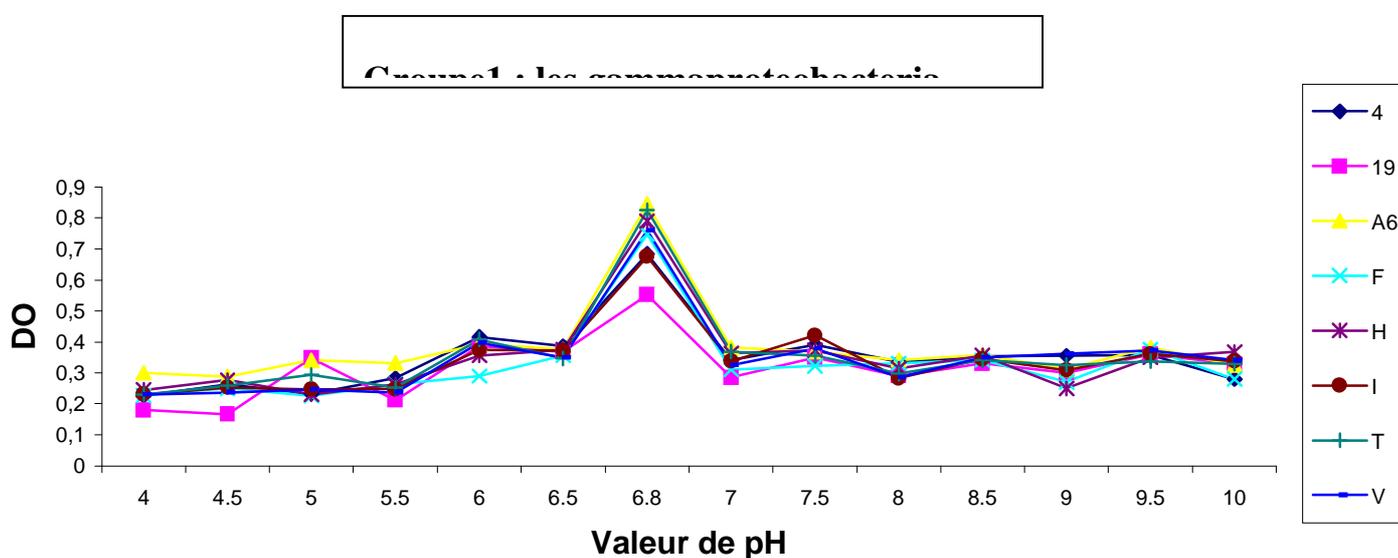
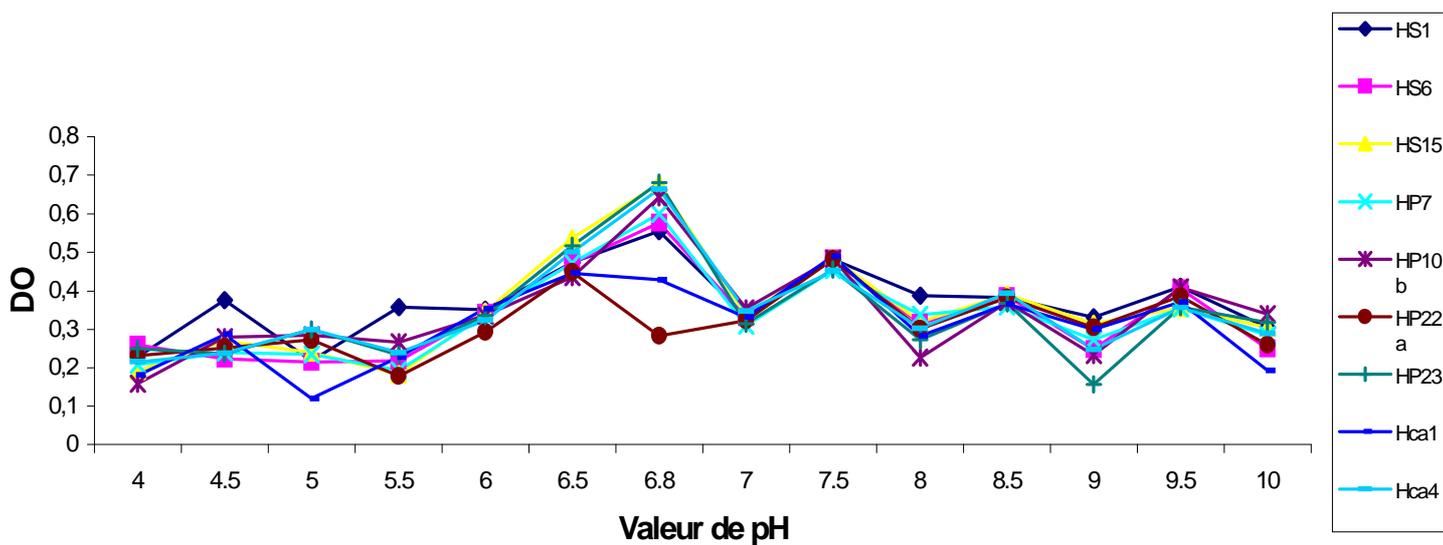
La croissance des souches à des valeurs élevées du pH n'est pas surprenant du fait qu'elles sont toutes proviennent des sols neutres à alcalins (Annexe 2) .

Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Maatallah et coll.(2002) qui ont détecté la croissance de leur isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0 et pH supérieur à 7.5. Ainsi Raza et coll.(2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10).

**Tableau 21 :Température de croissance**

Tempéra souche	4°C	20°C	28°C	30°C	37°C	45°C	50°C
<b>HS1</b>	+	+	+	+	+	-	-
<b>HS6</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>HS15</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>HP7</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	+
<b>HP10b</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>HP22a</b>	+(6j)	+	+	+	+	-	+
<b>HP23</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>Hca1</b>	+(6j)	+	+	+	+	-	-
<b>Hca4</b>	-	+	+	+	+	-	-
<b>4</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>19</b>	+	+	+	+	+	-	-
<b>A6</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>F</b>	+(5j)	+	+	+	+	+	-
<b>H</b>	+(5j)	+	+	+	+	-	-
<b>I</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>T</b>	+	+	+	+	+	+	-
<b>V</b>	+	+	+	+	+	+	-
<b>HnA</b>	+	+	+	+	+	+	-
<b>HnM1</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>HnM2</b>	-	+	+	+	+	+	-
<b>HnN1</b>	+	+	+	+	+	+	-
<b>HnN2</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>HP</b>	+(6j)	+	+	+	+	-	-
<b>HPSb+</b>	+(6j)	+	+	+	+	+	-
<b>HPSb-</b>	-	+	+	+	+	+	-
<b>HS</b>	+	+	+	+	+	-	-
<b>Hscapt</b>	-	+	+	+	+	+	-
<b>Hcar</b>	+	+	+	+	+	-	-

+: croissance; -: pas de croissance; +(5j): croissance après 5jours; +(6j): croissance après 6 jours.



**Planche 12:** Effet du pH sur la croissance des trois groupes des souches testées

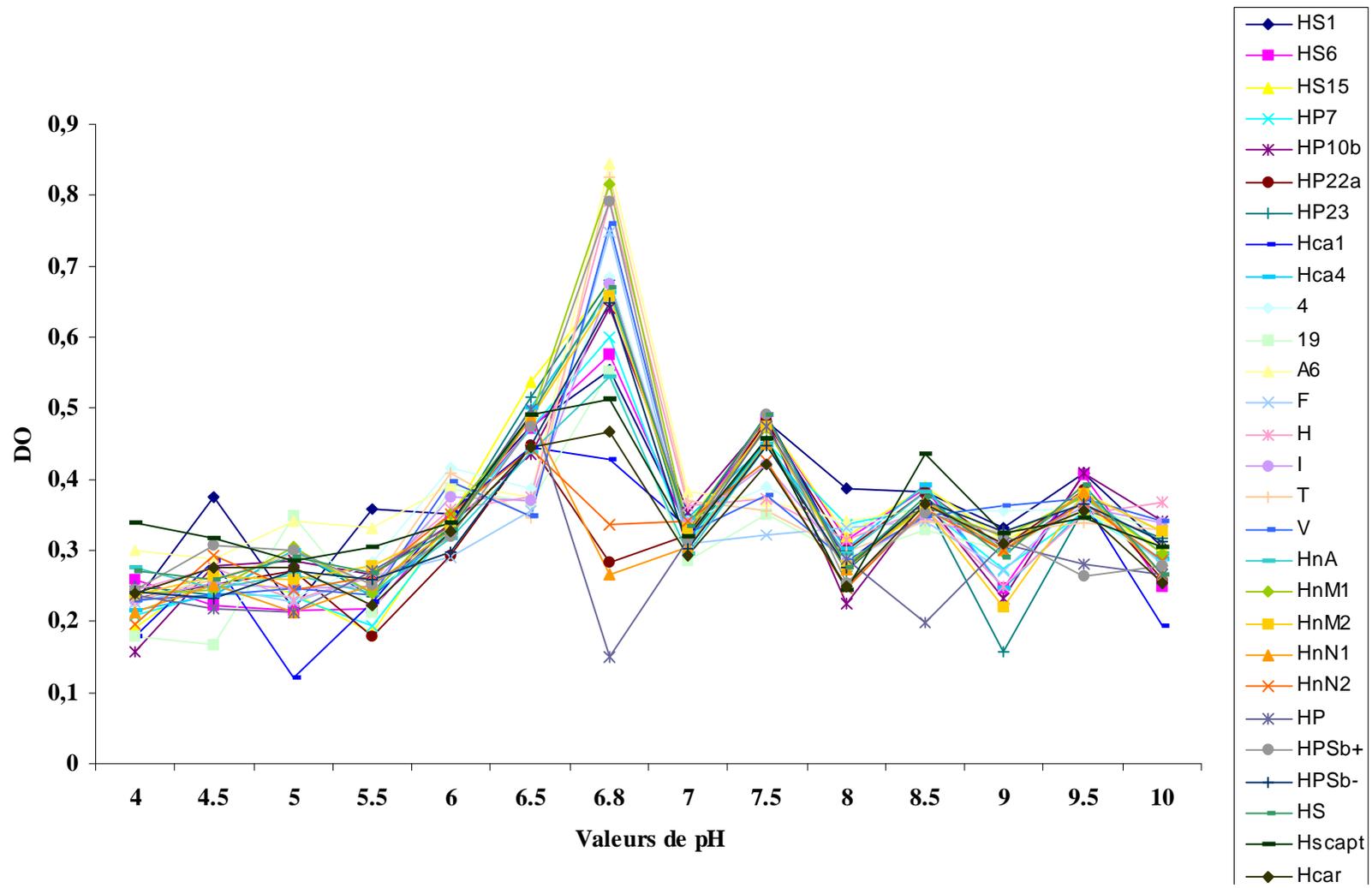


Figure 20: Effet du pH sur la croissance de toutes les souches testées

### **III-5- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques**

#### **III-5-1- Métaux lourds**

Les souches tolèrent les métaux lourds à des concentrations différentes. La concentration inhibitrice est différente selon les souches et les métaux lourds.

Toutes les souches résistent la présence des concentrations très élevées d'antimoine.

La majorité des souches tolèrent la présence de  $ZnCl_2$ ,  $CuCl_2$  et de  $Pb(CH_3OO^-)_2$  et la concentration inhibitrice est observée à des concentrations importantes.

La sensibilité des souches apparaît avec le  $HgCl_2$  et elle est différente selon les souches. la concentration inhibitrice ne dépasse pas  $250\mu g/ml$  pour les souches *Gammaproteobacteria* et varie entre  $500\mu g/ml$  et  $750\mu g/ml$  pour les souches de rhizobia ainsi que les isolats.

Biro et coll. (1995) déterminent que la sensibilité aux métaux lourds a une importance primaire pour la sélection des isolats qui sont écologiquement divers, et ils ont trouvé une diversité particulièrement élevée chez les isolats de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance qui immobilisent , mobilisent ou transforment les métaux lourds, et donc elles peuvent influencer la solubilité des métaux lourds par l'altération de leurs propriétés chimiques (Gremion, 2003).

#### **III-5-2- Antibiotiques**

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches résistent la spectinomycine et l'érythromycine, la majorité d'entre elles sont résistantes à l'acide nalidixique. Elles ont une résistance comparable pour la streptomycine et la gentamycine. Les concentrations inhibitrices diminuent avec le chloramphénicol et deviennent minimales en présence de la kanamycine et la rifampicine .

La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée dans les études rhizobiales en tant que moyen d'identification des souches et est considérée comme un bon trait pour comparer les différentes souches (Beck et coll.,1993). Les résultats obtenus par Maatallah et coll. (2002) montrent que les souches sont résistantes aux kanamycine, érythromycine et à l'acide nalidixique et ceux obtenus par Batzli et coll. (1992) présentent des souches avec grande tolérance aux tétracycline et chloramphénicol et une faible tolérance aux streptomycine, kanamycine et à l'acide nalidixique.

**Tableau 22** : Concentrations inhibitrices en présence de différents métaux lourds

<b>CI<math>\mu</math>g/ml</b> <b>souche</b>	<b>HgCl<sub>2</sub></b> <b>5- 1500</b>	<b>ZnCl<sub>2</sub></b> <b>5- 3000</b>	<b>CuCl<sub>2</sub></b> <b>5-2000</b>	<b>Pb (CH<sub>3</sub>OO<sup>-</sup>)<sub>2</sub></b> <b>5- 2500</b>	<b>SbO<sub>3</sub></b> <b>5- 6000</b>
HS1	250	2750	1500	2250	6000<
<b>HS6</b>	250	2500	1750	2250	6000<
<b>HS15</b>	500	2250	1500	2250	6000<
<b>HP7</b>	250	2500	1500	2250	6000<
<b>HP10b</b>	250	2250	1500	2250	6000<
<b>HP22a</b>	250	2750	1750	2250	6000<
<b>HP23</b>	250	2250	1500	2250	6000<
<b>Hca1</b>	250	2250	1500	2250	6000<
<b>Hca4</b>	250	2750	1500	2250	6000<
<b>4</b>	750	2750	1500	2250	6000<
<b>19</b>	500	2750	1500	2250	6000<
<b>A6</b>	500	2750	1500	2250	6000<
<b>F</b>	750	3000	1500	2250	6000<
<b>H</b>	750	3000	1500	2250	6000<
<b>I</b>	500	2500	1500	2250	6000<
<b>T</b>	500	2750	1500	2250	6000<
<b>V</b>	500	3000	1500	2250	6000<
HnA	750	2750	1500	2250	6000<
<b>HnM1</b>	500	2750	1750	2250	6000<
<b>HnM2</b>	750	2750	1500	2250	6000<
<b>HnN1</b>	500	2250	1500	2250	6000<
<b>HnN2</b>	750	2750	1500	2250	6000<
<b>HP</b>	750	2750	1500	2250	6000<
<b>HPSb+</b>	750	2250	1750	2250	6000<
<b>HPSb-</b>	500	3000	1750	2250	6000<
<b>HS</b>	750	3000	1500	2250	6000<
<b>Hscapt</b>	500	2750	1500	2250	6000<
<b>Hcar</b>	750	2500	1500	2250	6000<

**Tableau 23** : Concentrations inhibitrices en présence de différentes antibiotiques

<b>CI<math>\mu</math>g/ml</b> <b>souche</b>	<b>Rif</b> <b>5-300</b>	<b>Spec</b> <b>5-5000</b>	<b>Gent</b> <b>5-1500</b>	<b>Eryt</b> <b>5-5000</b>	<b>Strept</b> <b>5-1500</b>	<b>Kan</b> <b>5- 600</b>	<b>Ac nal</b> <b>5-5000</b>	<b>Chlor</b> <b>5-600</b>
HS1	200	5000<	300	5000<	500	20	5000<	100
<b>HS6</b>	100	5000<	1250	5000<	1250	600	5000	500
<b>HS15</b>	50	5000<	1250	5000<	1250	400	5000	100
<b>HP7</b>	50	5000<	300	5000<	600	300	5000	100
<b>HP10b</b>	100	5000<	400	5000<	400	300	5000	300
<b>HP22a</b>	200	5000<	200	5000<	1000	100	5000	400
<b>HP23</b>	50	5000<	500	5000<	500	100	1500	100
<b>Hca1</b>	100	5000<	400	5000<	400	20	1500	100
<b>Hca4</b>	100	5000<	1250	5000<	1250	600	5000	100
<b>4</b>	200	5000<	100	5000<	500	20	3000	300
<b>19</b>	50	5000<	1500	5000<	1250	20	3000	100
<b>A6</b>	200	5000<	1250	5000<	1250	600	5000<	500
<b>F</b>	50	5000<	100	5000<	1000	20	5000<	300
<b>H</b>	100	5000<	1250	5000<	1250	500	3000	500
<b>I</b>	50	5000<	600	5000<	1000	20	1500	300
<b>T</b>	50	5000<	300	5000<	400	100	3000	100
<b>V</b>	200	5000<	600	5000<	600	500	3000	400
HnA	50	5000<	100	5000<	400	20	3000	300
<b>HnM1</b>	50	5000<	300	5000<	1000	20	3000	100
<b>HnM2</b>	200	5000<	300	5000<	1250	20	5000	500
<b>HnN1</b>	300	5000<	300	5000<	1000	20	5000<	300
<b>HnN2</b>	200	5000<	300	5000<	400	50	1500	300
<b>HP</b>	50	5000<	400	5000<	1250	20	3000	400
<b>HPSb+</b>	50	5000<	1000	5000<	1000	600	5000	500
<b>HPSb-</b>	200	5000<	200	5000<	400	200	5000<	300
<b>HS</b>	50	5000<	1500	5000<	1500	600	5000<	400
<b>Hscapt</b>	200	5000<	600	5000<	1500	20	1500	100
<b>Hcar</b>	200	5000<	200	5000<	400	50	1500	100

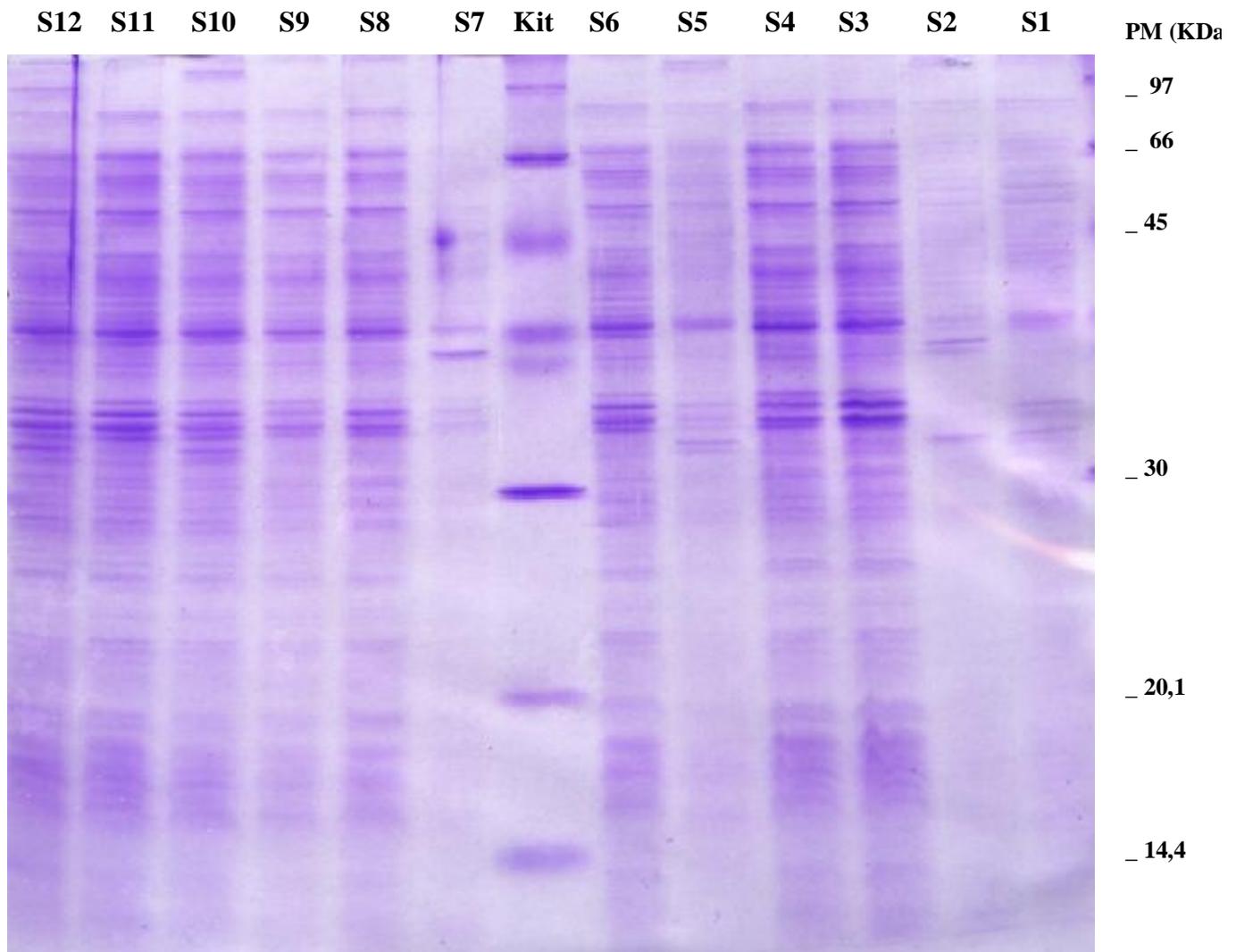
### **III-6- Sensibilité aux phages**

Toutes les souches présentent un résultat négatif par rapport à ce test (absence de la zone de lyse). Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs points :

- On a pas pu isoler des phages
- Les souches ont vraiment développer une résistance contre les phages.
- Les phages isolés ne sont pas spécifiques pour nos souches.

Kleczkowska (1945) démontre la présence des bactériophages dans le sol et que la relation bactérie-phage est très spécifique. Somasegaran et Hoben (1994) utilisent le test phagique pour caractériser plusieurs souches de *Bradyrhizobium*. Egalement, une rangée de bactériophages est utilisée par Struffi et coll. (1998) qui ont trouvé des souches résistantes aux phages.

## IV- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE



**Figure 21:** profils protéiques des différentes souches

**Souches isolées :** S1(HP), S2 (HS), S3 (Hcar), S4 (HnA), S5 (HnM1), S6 (HnN1).

**Souches de référence :** Gammaproteobacteria [S7(HP23), S8 (HS1),S9(Hca1)],  
Rhizobia [S10(A6), S11(T), S12 (V)]

### Analyse numérique des profils protéiques

La caractérisation des souches par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE repose sur le degré de similitude entre les bandes polypeptidiques des isolats et des souches de référence. Chaque bande est caractérisée par leur poids moléculaire que l'on peut déterminer à partir de leur rapport frontal.

### 1- Détermination des poids moléculaires des protéines analysées :

Après avoir obtenu les électrophorégrammes de chaque souche, nous avons calculé le rapport frontal ( mobilité relative) de chaque bande polypeptidique selon la formule suivante (Coyne et coll., 2002) :

$$Rf = \text{distance parcourue par la protéine} / \text{distance parcourue par le marqueur}$$

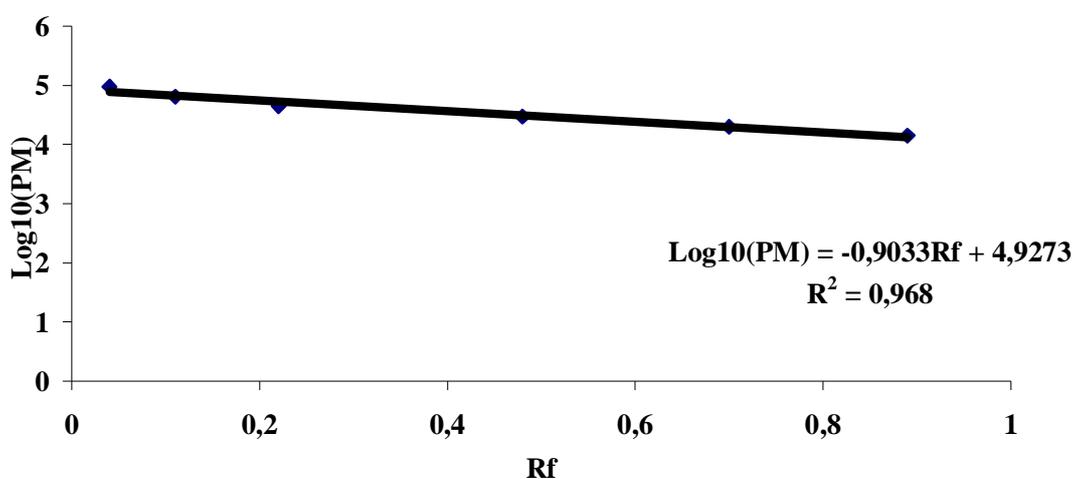
On peut déterminer le poids moléculaire des protéines à partir de la courbe d'étalonnage du Kit ou de l'équation issue de cette dernière.

La courbe d'étalonnage du Kit (figure) met en évidence la relation entre le logarithme décimal des poids moléculaires des protéines connues (protéines du Kit) et leur mobilité électrophorétique relative (Coyne et coll., 2002) .

**Tableau 24:** Paramètres du Kit

Rapport frontal Rf	Poids moléculaire Da	Log <sub>10</sub> (PM)
Rf1= 0.3/6.8= 0.04	97 000	4.98
Rf2= 0.8/6.8= 0.11	66 000	4.81
Rf3= 1.5/6.8= 0.22	45 000	4.65
Rf4= 3.3/6.8= 0.48	30 000	4.47
Rf5= 4.8/6.8= 0.70	20 100	4.30
Rf6= 6.1/6.8= 0.89	14 400	4.15

Front= distance parcourue par le marqueur =6.8 cm



**Figure 22 :** la courbe d'étalonnage du Kit

**Tableau 25 :Diagramme type**

bande	Rf	PM	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.0147	82035.15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	0.0294	79560.95	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
3	0.0661	73705.51	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
4	0.1176	66221.65	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0.1323	64224.39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
6	0.1470	62301.71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
7	0.1617	60422.68	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0.1764	58600.32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	0.1838	57703.21	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0.2205	53468.64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
11	0.2352	51856.11	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
12	0.25	50280.54	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
13	0.2647	48764.07	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
14	0.3088	44493.85	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	0.3382	41860.07	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
16	0.3529	40597.56	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
17	0.3823	38185.63	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
18	0.3970	37033.94	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
19	0.4117	35925.26	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	0.4191	35375.28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
21	0.4264	34841.75	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
22	0.4411	33790.91	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
23	0.4632	32270.07	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
24	0.4852	30831.87	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1
25	0.5	29895.09	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
26	0.5147	28993.45	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
27	0.5735	25656.65	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
28	0.6176	23409.92	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
29	0.6470	22019.12	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
30	0.6617	21355.02	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0.6764	20715.71	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0.7205	18897.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
33	0.7352	18327.36	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
34	0.7647	17238.52	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
35	0.7794	16718.60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
36	0.7941	16214.36	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
37	0.8235	15254.57	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
38	0.9117	12696.96	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
39	0.9705	11235.69	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

**0:** Absence de la bande polypeptidique ; **1:** presence de la bande polypeptidique

## 2- Coefficient de similitude:

Les électrophorégrammes des souches sont traités par une analyse numérique basée sur la détermination du coefficient de similitude selon la méthode de Jana et coll. (1992).

Le coefficient de similitude permet de déterminer le degré de ressemblance entre les profils protéiques des différentes souches. Ce coefficient est calculé par comparaison de la mobilité relative des bandes des souches prises deux à deux.

$$Cs = Ns / (Ns + Nd) \times 100$$

Avec :

**Ns** : nombre de bande qui ont mobilités relatives (poids moléculaires) similaires.

**Nd** : nombre de bande qui ont mobilités relatives (poids moléculaires) différentes.

**Tableau 26** : Coefficient de similitude entre les isolats et les souches témoins

<b>Isolats</b> <b>Témoins</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>
<b>S7</b>	<b>66.6</b>	<b>64.1</b>	53.8	53.8	<b>71.7</b>	61.5
<b>S8</b>	51.2	46.1	71.7	71.7	48.7	79.4
<b>S9</b>	56.4	46.1	<b>79.4</b>	<b>79.4</b>	58.9	<b>89.7</b>
<b>S10</b>	56.4	48.7	76.9	76.9	61.5	82
<b>S11</b>	41	41	66.6	66.6	43.5	74.3
<b>S12</b>	46.1	43.5	56.4	56.4	43.5	51.2

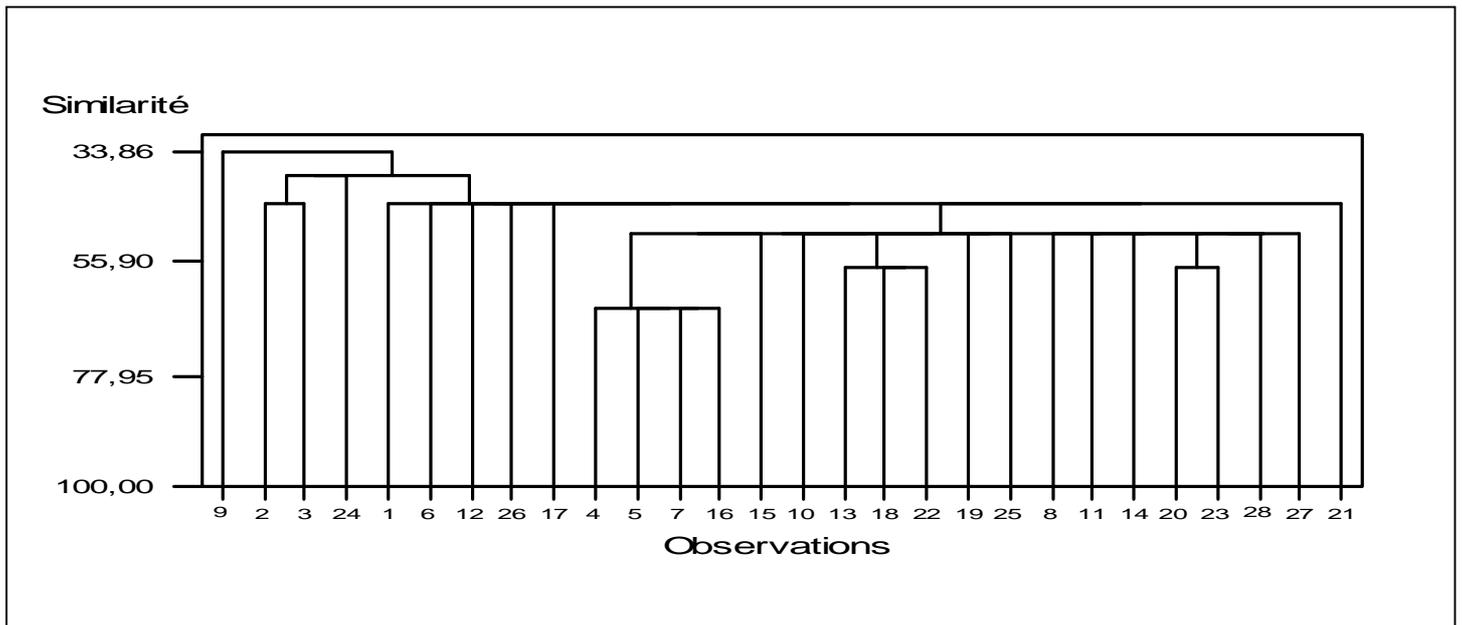
Les résultats obtenus montre que les isolats donnent un degré de similitude élevé avec les souches Gammaproteobacteria.

## V- Analyse numérique de la caractérisation phénotypique

L'ensemble des résultats obtenus de la caractérisation phénotypique est traité par une analyse numérique avec l'aide d'un logiciel statistique, Minitab, mettant en évidence de toutes les caractères phénotypiques suivants :

- Assimilation des sucres
- Assimilation des acides aminés
- Assimilation des vitamines
- Influence des facteurs intrinsèque : Température, pH et NaCl
- Résistance aux antibiotiques et métaux lourds
- Recherches des enzymes spécifiques.

Les matrices des données (Annexe4) donnent comme résultat un dendrogramme qui indique la consistance phénotypique des souches (Fig.23).

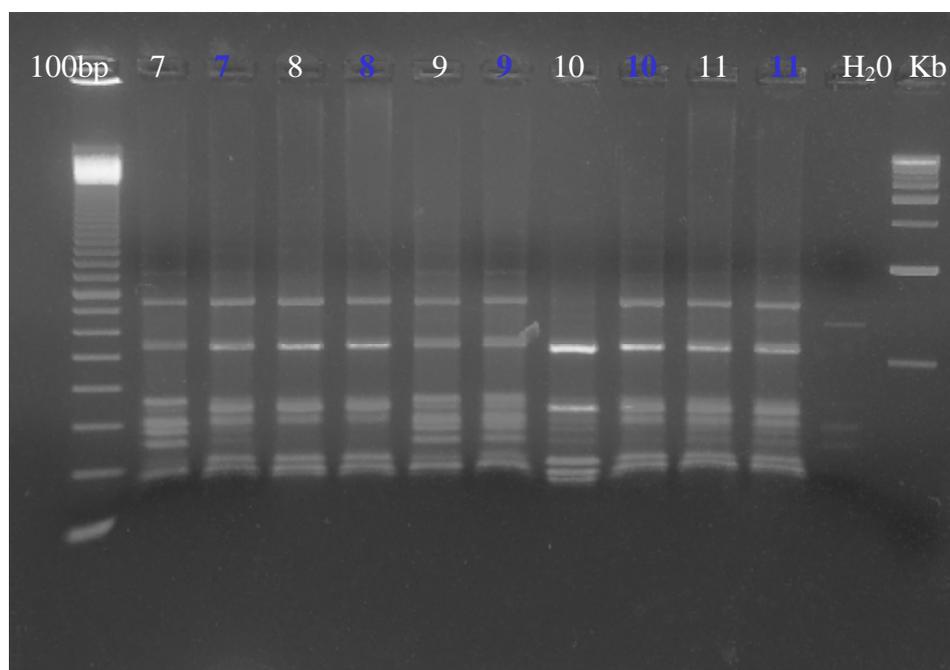
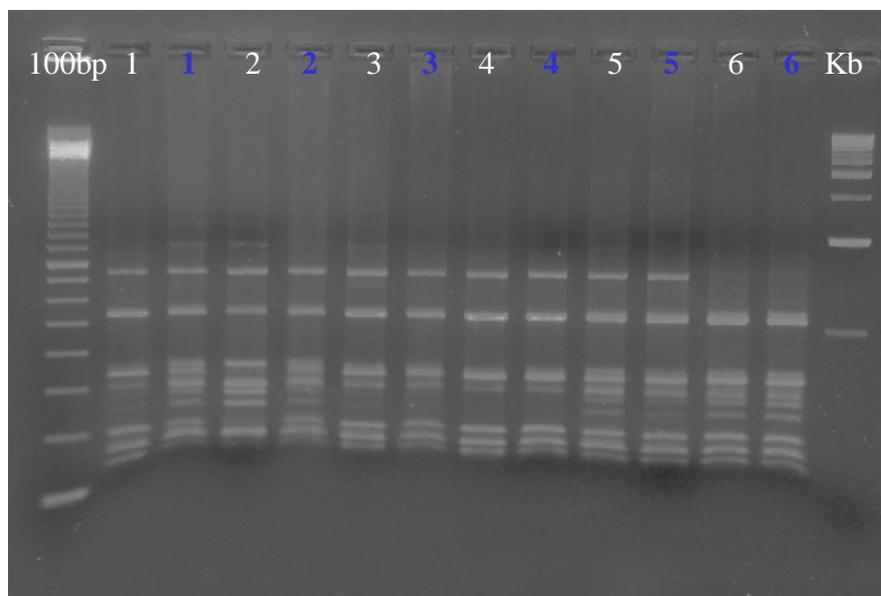


**Figure 23:** Dendrogramme des caractères phénotypiques

Le dendrogramme est très peu significatif, dans la mesure où les groupes de bactéries ne sont pas distincts. Trois phénons distinguent la souche Hcar (isolée à partir des nodules de *H. carnosum*) des souches isolées à partir des nodules de *H. spinosissimum* et le reste des isolats. Les résultats obtenus à partir des caractères étudiés montrent une très forte similitude et par conséquent le dendrogramme ne fait pas ressortir une distinction appréciable.

## VI- Caractérisation moléculaire

**Analyse par l'ARDRA** (analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S).



**Figure 24** : Profils électrophorétique sur gel d'agarose de l'ARDRA

**Isolats** : **1/1**(HnA), **2/2**(HnM1), **3/3**(HnM2), **4/4**(HnN1), **5/5**(HnN2), **6/6**(HP), **7/7**(HPSb+), **8/8**(HPSb-), **9/9**(HS), **10/10**(Hscapt), **11/11**(Hcar).

Pour confirmer les résultats de l'étude phénotypique et définir le statut taxonomique, les isolats ont subi une caractérisation moléculaire, en les analysant par la technique de l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Cette dernière permet d'étudier le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S, et donne les principales différences entre les souches analysées. Ces fragments sont le résultat de la digestion des produits d'amplification de l'ADNr 16S avec l'enzyme de restriction *CfoI*.

Les résultats obtenus par le biais de cette analyse donnent des profils électrophorétique qui semble être similaire et généralement, on peut supposer que les souches peuvent appartenir au même groupe taxonomique. Mais l'observation de près montre qu'il y a des impuretés au niveau des échantillons analysés. De ce fait, les résultats obtenus ne sont pas très significatifs et on ne peut pas tirer une conclusion finale sur le statut taxonomiques des souches isolées. (Selon les observations faites par le Professeur A. Squartini, du Département des biotechnologies, Université de Padoue, Italie).

Malgré l'insuffisance des résultats obtenus par l'ARDRA, on a pu faire le séquençage de six isolats. Les séquences obtenues sont comparées avec les séquences des souches isolées et identifiées par Benhizia et coll. (2004). On a trouvé que ces souches appartiennent tous à la classe des Gammaproteobacteria (*Panotoea agglomerans*, *Pseudomonas* sp).

**Tableau27** :Résultats du séquençage ADNr 16S (A. Squartini)

<b>Plante hôte</b>	<b>Isolats</b>	<b>Espèce correspondante</b>
<b>H. naudinianum</b>	<b>1 noir (HnA)</b>	<i>Panotoea agglomerans</i>
<i>H. naudinianum</i>	<b>2 noir (HnM1)</b>	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>H. pallidum</i>	<b>6 noir (HP)</b>	<i>Panotoea agglomerans</i>
<i>H. spinossissimum</i>	<b>9 noir (HS)</b>	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>H. spinossissimum</i>	<b>10 noir ( Hscapt)</b>	<i>Panotoea agglomerans</i>
<i>H. carnosum</i>	<b>11 noir (Hcar)</b>	<i>Panotoea agglomerans</i>

**NOM: TORCHE**

**Prénom: Asma**

**Date de soutenance : 20/09/2006**

**Titre : Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre  
*Hedysarum***

**Nature du diplôme : Magister en Biochimie et Microbiologie Appliquée.**

**Résumé :**

Des bactéries ont été isolées à partir des nodules des espèces de plantes légumineuses du genre *Hedysarum* : *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss.

Pour l'espèce *H. naudinianum* Coss., c'est la première fois qu'une étude est faite pour mettre en évidence l'association symbiotique plante-bactérie.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique qui inclue des tests distinctifs entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*, tests biochimiques et physiologiques ainsi que la détermination des résistances et des sensibilités des souches aux métaux lourds, antibiotiques et aux phages.

L'aptitude des isolats à former des nodules sur les plantes hôtes est évaluée par le test de nodulation selon la méthode de Vincent (1970).

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée pour déterminer le profil des protéines totales des isolats.

La caractérisation phylogénétique est effectuée par une étude moléculaire en analysant les souches par la technique de l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) en utilisant l'enzyme de restriction *CfoI* puis séquencé leur DNAr.

Phénotypiquement, les isolats donnent des résultats comparables à celles des souches de référence Gammaproteobacteria. Ceci est confirmé par l'étude phylogénétique.

**Mots clés :** *Hedysarum*, *H. naudinianum*, *Rhizobium*, Gammaproteobacteria, Symbiose.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire des biotechnologies – Faculté des sciences de la nature et de vie. Université Montouri Constantine

**Directeur du Mémoire :** Mr. A. Benguedouar

Professeur. U.M.C

**Membres de jury :**

**Président :**

M<sup>eme</sup> .Z. Meraihi

Professeur. U.M.C

**Examineurs :**

M<sup>eme</sup> .A. Mechakra

Maître de conférences. U.M.C

Mr. Y. Benhizia

Maître de conférences. U.M.C



## **Annexe 1:**

### **Milieux de culture et solutions utilisés**

#### **Composition de milieu YMB (Yeast mannitol broth) en g/l. (Vincent, 1970)**

Mannitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

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

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

#### **Composition de milieu YMA+ rouge Congo en g/l**

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

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

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

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5 ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

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

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

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	15
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

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

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

Ca Cl <sub>2</sub>	0.10
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.15
Citrate de fer	0.005
Micro éléments	1ml

**Solution micro éléments g/l**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	2.03
ZnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.14
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

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

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0.87
Eau distillée	1000ml
Agar	12
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

**Composition de milieu Défini 8 en g/l. (Vincent, 1970)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub>	0.21
CaCl <sub>2</sub>	0.21
Glutamate-Na	1
Mannitol	1
Solution stock vitamines	1ml
Oligoéléments	1ml
pH	6.9
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Solution stock vitamines : (mg/l)

Acide nicotinique	100
Thiamine	100
Panhotenate-Ca	100

Dissoudre dans un tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M pH 7.

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

Solution oligoéléments : (mg/l)

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

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage.

**Composition de milieu B III en g/l .(Dazzo, 1982)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.23
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.10
Glutamate-Na	1.10
Solution stock vitamines	1ml
Solution stock oligoéléments	1ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Solution stock vitamines : (mg/l)

Riboflavine	20
Acide p-aminobenzoïque	20
Acide nicotinique	20
Biotine	20
Thiamine-HCl	20
Pyridoxine-HCl	20
Panthotenate-Ca	20
Inositol	120

Dissoudre dans un tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M pH 7.

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

Solution oligoéléments : (mg/l)

CaCl <sub>2</sub>	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.145
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.125
CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.070
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.005
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.0043
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.108
Na Mo O <sub>4</sub>	0.125
Nitril triacetate	1

Ce dernier n'est rajouté qu'après avoir ajusté le pH à 5.0 évitant ainsi une précipitation.

La stérilisation de la solution des oligoéléments est effectuée par autoclavage.

**Composition de milieu lactate-aspartate de sodium (Gloux et Le Rudelier, 1989).**

Solution A: (g/l)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.3
$\text{NaHPO}_4$	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
Eau distillée	1000ml

Solution B: (mg/l)

$\text{H}_3\text{BO}_4$	10
$\text{ZnSO}_4$	1
$\text{CuSO}_4$	1
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
Eau distillée	1000ml

Biotine	2g
Acide aspartique	100mg
Acide lactique	0.74mg
Eau distillée	1000ml

Préparation de milieu

- Prendre 100ml de la solution A.
- Mélanger avec 20ml de la solution B ensuite compléter à 1000ml.
- Additionner l'acide lactique et l'acide aspartique.
- Ajuster le pH à 7.
- Autoclaver à 120 °C pendant 20minutes.

La biotine est stérilisée par filtration et additionnée au milieu.

On ajoute dans chaque cas la concentration sélectionnée de NaCl.

### Composition de milieu MNB/MNA (Mannitol Nitrate) (Vincent, 1970)

Solution A :

Mannitol	10	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	0.45	g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10H <sub>2</sub> O	0.06	g
KNO <sub>3</sub>	0.60	g
FeCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.01	g
Thiamine-HCl	100	µg
Biotine	0.5	µg
Agar	7.5	g
Eau distillée	1	litre

Solution B :

MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1	g
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1	g
Eau distillée	100	ml

Les deux solution A et B sont stérilisées séparément (Autoclave 120 °C pendant 20minutes), puis ajouter 0.5 ml de B à 5 ml de A.

## Annexe 2:

### pH du Sol

Les différents sols sont tamisés ( tamis Ø 2mm), puis on mesure leur pH selon le protocole expérimental suivant :

- Placer 4 g de sol dans un gobelet, ajouter 10 ml d'eau distillée.
- Agiter pendant 60 min. Laisser reposer 18 heures. Agiter 15 min.
- Mesurer à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné avec les solutions « étalon » pH 4, pH 7 et pH 10.
- La valeur du pH de la solution du sol est lue sur l'écran digital du pH mètre.

Pour chaque sol on fait deux répétitions.

#### Résultats :

<b>SOL</b>	<b>MAOCLANE (BOUGAA)</b>	<b>AIN BABOUCH (OUM ELBOUAGHI)</b>	<b>TANDJA AMOUCHA (SETIF)</b>	<b>AIN ELBEY (CONSTANTINE)</b>	<b>API CULTURE (CONSTANTINE)</b>	<b>EL FAID (BISKRA)</b>
<b>pH 1</b>	7.93	7.44	7.37	7.74	7.30	7.60
<b>pH 2</b>	7.53	7.37	7.48	8.48	8.13	7.97
<b>pH</b>	7.73	7.40	7.42	8.11	7.71	7.78

## ANNEXE 3 :

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

### 1-Source de carbone :

DO Sucre Souches	Xylose	Arabinose	saccharose	fructose	galactose	sorbitol	Citrate Na	raffinose	lactose	maltose	glucose	mannitol
HS1	0.124	0.273	0.260	0.566	0.420	0.830	0.668	0.234	0.235	0.356	0.272	0.554
HS6	0.053	0.273	0.268	0.330	0.422	0.590	0.626	0.243	0.245	0.298	0.408	0.576
HS15	0.095	0.201	0.291	0.206	0.332	0.513	0.430	0.204	0.266	0.500	0.428	0.678
HP7	0.044	0.133	0.248	0.109	0.356	0.530	0.566	0.196	0.223	0.351	0.512	0.600
HP10b	0.099	0.244	0.337	0.118	0.370	0.955	0.712	0.250	0.289	0.330	0.304	0.642
HP22a	0.091	0.191	0.325	0.138	0.357	0.712	0.895	0.203	0.286	0.380	0.466	0.282
HP23	0.071	0.263	0.292	0.100	0.482	0.776	0.975	0.209	0.382	0.450	0.464	0.680
Hca1	0.026	0.156	0.176	0.289	0.370	0.662	0.480	0.180	0.210	0.458	0.378	0.428
Hca4	0.048	0.193	0.309	0.588	0.414	0.604	0.728	0.245	0.257	0.398	0.385	0.664
4	0.045	0.144	0.281	0.234	0.354	0.640	0.534	0.347	0.235	0.298	0.376	0.684
19	0.010	0.139	0.205	0.306	0.358	0.680	0.626	0.210	0.232	0.422	0.448	0.552
A6	0.078	0.280	0.371	1.005	0.480	1.080	1.120	0.348	0.273	0.734	0.496	0.845
F	0.075	0.231	0.305	0.225	0.305	0.586	0.820	0.227	0.276	0.402	0.454	0.748
H	0.015	0.223	0.273	0.239	0.331	0.730	0.386	0.262	0.237	0.284	0.466	0.790
I	0.052	0.211	0.251	0.350	0.292	0.796	0.578	0.219	0.278	0.336	0.325	0.676
T	0.063	0.190	0.328	0.586	0.544	0.600	0.520	0.323	0.287	0.406	0.386	0.825
V	0.049	0.251	0.296	0.376	0.460	0.740	0.885	0.257	0.250	0.410	0.468	0.760
HnA	0.179	0.253	0.307	0.410	0.480	0.940	0.614	0.234	0.262	0.404	0.240	0.544
HnM1	0.056	0.167	0.325	0.225	0.365	0.640	0.840	0.265	0.235	0.376	0.276	0.815
HnM2	0.106	0.142	0.261	0.307	0.347	0.808	0.368	0.215	0.247	0.341	0.306	0.658
HnN1	0.071	0.071	0.220	0.335	0.281	0.452	0.558	0.215	0.245	0.136	0.476	0.266
HnN2	0.056	0.188	0.230	0.141	0.312	0.662	0.332	0.251	0.167	0.324	0.590	0.336
HP	0.049	0.179	0.332	0.276	0.526	0.790	0.338	0.212	0.219	0.226	0.360	0.015
HPSb+	0.128	0.190	0.209	0.181	0.336	0.920	0.502	0.235	0.231	0.266	0.476	0.790
HPSb-	0.146	0.195	0.292	0.271	0.492	0.660	0.450	0.209	0.260	0.293	0.259	0.648
HS	0.125	0.190	0.248	0.255	0.396	0.588	0.420	0.225	0.236	0.336	0.444	0.670
Hscapt	0.063	0.186	0.194	0.396	0.360	0.975	0.885	0.237	0.245	0.323	0.233	0.512
Hcar	0.142	0.178	0.306	0.440	0.456	0.680	0.414	0.256	0.217	0.229	0.548	0.466

## 2-Source d'azote :

DOA Souche	Glutamate Na	valine	tyrosine	leucine	proline	threonine	Isoleucine	Phénylalanine	tryptophane
HS1	0.612	0.069	0.004	0.038	0.211	0.005	0.020	0.096	0.020
HS6	0.300	0.263	0.026	0.010	0.215	0.002	0.008	0.025	0.083
HS15	0.475	0.018	0.045	0.007	0.193	0.025	0.000	0.063	0.082
HP7	0.366	0.188	0.000	0.097	0.211	0.009	0.058	0.045	0.019
HP10b	0.425	0.038	0.000	0.138	0.244	0.050	0.030	0.066	0.103
HP22a	0.603	0.011	0.003	0.052	0.340	0.034	0.035	0.076	0.026
HP23	0.376	0.083	0.045	0.035	0.157	0.300	0.116	0.031	0.115
Hca1	0.785	0.035	0.399	0.101	0.184	0.008	0.011	0.044	0.043
Hca4	0.289	0.085	0.057	0.018	0.174	0.004	0.056	0.076	0.023
4	0.362	0.039	0.055	0.187	0.177	0.011	0.006	0.030	0.037
19	0.356	0.133	0.101	0.144	0.337	0.055	0.032	0.064	0.198
A6	0.179	0.024	0.079	0.223	0.061	0.067	0.021	0.025	0.070
F	0.332	0.144	0.226	0.245	0.145	0.079	0.136	0.089	0.018
H	0.320	0.072	0.061	0.276	0.277	0.123	0.010	0.061	0.077
I	0.340	0.066	0.016	0.008	0.086	0.055	0.162	0.002	0.063
T	0.539	0.200	0.047	0.037	0.317	0.124	0.254	0.201	0.309
V	0.390	0.158	0.190	0.014	0.296	0.185	0.113	0.078	0.141
HnA	0.166	-0.013	0.166	0.140	0.356	0.086	0.043	0.120	0.073
HnM1	0.345	0.043	0.107	0.100	0.270	0.055	0.290	0.132	0.081
HnM2	0.280	0.150	0.094	0.102	0.299	0.069	0.044	0.104	0.086
HnN1	0.331	0.095	0.024	0.090	0.313	0.126	0.015	0.120	0.094
HnN2	0.484	0.186	0.088	0.047	0.388	0.033	0.014	0.119	0.064
HP	0.330	0.025	0.015	0.198	0.327	0.069	0.060	0.101	0.099
HPSb+	0.230	0.060	0.075	0.038	0.167	0.051	0.057	0.092	0.045
HPSb-	0.125	0.060	0.220	0.072	0.070	0.083	0.050	0.099	0.103
HS	0.306	0.036	0.140	0.057	0.280	0.050	0.027	0.074	0.074
Hscapt	0.040	0.020	0.092	0.100	0.159	0.089	0.015	0.091	0.050
Hcar	0.308	0.067	0.095	0.076	0.221	0.133	0.009	0.080	0.090

<b>DOA</b> <b>Souches</b>	<b>lysine</b>	<b>Glycine</b>	<b>séline</b>	<b>Histidine</b>	<b>arginine</b>	<b>méthionine</b>	<b>Alanine</b>	<b>asparagine</b>	<b>cystéine</b>
<b>HS1</b>	0.070	0.258	0.658	0.179	0.399	0.004	0.075	0.560	0.800
<b>HS6</b>	0.048	0.179	0.205	0.123	0.223	0.001	0.531	0.238	0.176
<b>HS15</b>	0.025	0.217	0.370	0.160	0.315	0.028	0.306	0.340	0.870
<b>HP7</b>	0.091	0.392	0.410	0.183	0.173	0.032	0.162	0.250	0.472
<b>HP10b</b>	0.062	0.440	0.548	0.197	0.261	0.007	0.125	0.100	0.050
<b>HP22a</b>	0.109	0.219	0.357	0.147	0.259	0.010	0.124	0.153	0.369
<b>HP23</b>	0.003	0.540	0.468	0.070	0.343	0.026	0.290	0.240	0.301
<b>Hca1</b>	0.120	0.228	0.598	0.155	0.209	0.008	0.375	0.156	0.091
<b>Hca4</b>	0.092	0.408	0.408	0.300	0.280	0.012	0.208	0.157	0.096
<b>4</b>	0.066	0.056	0.292	0.077	0.099	0.002	0.095	0.239	0.051
<b>19</b>	0.115	0.166	0.227	0.121	0.121	0.010	0.128	0.261	0.078
<b>A6</b>	0.054	0.018	0.346	0.000	0.156	0.004	0.141	0.235	0.103
<b>F</b>	0.047	0.167	0.164	0.219	0.156	0.005	0.084	0.250	0.063
<b>H</b>	0.044	0.134	0.177	0.150	0.062	0.012	0.116	0.161	0.080
<b>I</b>	0.000	0.080	0.180	0.070	0.120	0.008	0.212	0.179	0.070
<b>T</b>	0.010	0.075	0.111	0.158	0.103	0.008	0.139	0.232	0.097
<b>V</b>	0.029	0.043	0.154	0.119	0.061	0.006	0.101	0.140	0.025
<b>HnA</b>	0.073	0.354	0.232	0.136	0.145	0.000	0.139	0.156	0.052
<b>HnM1</b>	0.093	0.359	0.900	0.114	0.218	0.000	0.102	0.157	0.045
<b>HnM2</b>	0.080	0.436	0.790	0.252	0.245	0.011	0.196	0.309	0.244
<b>HnN1</b>	0.065	0.159	0.334	0.411	0.196	0.010	0.171	0.341	0.070
<b>HnN2</b>	0.066	0.270	0.690	0.188	0.273	0.009	0.187	0.193	0.155
<b>HP</b>	0.066	0.194	0.240	0.300	0.100	0.120	0.233	0.200	0.164
<b>HPSb+</b>	0.086	0.380	0.207	0.216	0.242	0.039	0.320	0.175	0.087
<b>HPSb-</b>	0.031	0.480	0.342	0.132	0.245	0.000	0.380	0.138	0.145
<b>HS</b>	0.113	0.464	0.544	0.204	0.311	0.003	0.062	0.180	0.069
<b>Hscapt</b>	0.038	0.494	0.628	0.380	0.299	0.004	0.245	0.230	0.076
<b>Hcar</b>	0.118	0.398	0.500	0.316	0.175	0.110	0.157	0.145	0.188

### 3-Besoin en vitamine :

DOv Souche	Riboflavine	p- aminobenzoï c	nicotinique	biotine	HCl Thiamine-	HCl Pyridoxine-	e-Ca Pantothénat	Complet
HS1	0.212	0.081	0.071	0.117	0.024	0.079	0.055	0.099
HS6	0.114	0.220	0.158	0.238	0.244	0.153	0.003	0.135
HS15	0.143	0.002	0.062	0.108	0.210	0.121	0.151	0.115
HP7	0.101	0.115	0.075	0.126	0.270	0.321	0.252	0.110
HP10b	0.130	0.196	0.145	0.215	0.386	0.327	0.381	0.109
HP22a	0.170	0.161	0.102	0.306	0.239	0.215	0.084	0.154
HP23	0.060	0.170	0.112	0.119	0.266	0.213	0.241	0.140
Hca1	0.165	0.157	0.050	0.225	0.291	0.259	0.198	0.122
Hca4	0.170	0.177	0.090	0.204	0.100	0.245	0.185	0.090
4	0.081	0.120	0.080	0.363	0.169	0.210	0.051	0.681
19	0.135	0.155	0.145	0.229	0.091	0.048	0.086	0.134
A6	0.126	0.162	0.055	0.124	0.132	0.050	0.106	0.162
F	0.096	0.074	0.071	0.143	0.023	0.037	0.035	0.038
H	0.212	0.140	0.233	0.430	0.164	0.337	0.337	0.140
I	0.087	0.280	0.090	0.328	0.184	0.261	0.221	0.165
T	0.115	0.130	0.184	0.394	0.272	0.266	0.154	0.136
V	0.120	0.169	0.155	0.259	0.275	0.202	0.130	0.177
HnA	0.091	0.124	0.191	0.169	0.145	0.392	0.324	0.115
HnM1	0.100	0.064	0.287	0.111	0.239	0.352	0.323	0.090
HnM2	0.188	0.246	0.227	0.113	0.276	0.387	0.159	0.092
HnN1	0.112	0.123	0.230	0.163	0.243	0.308	0.081	0.080
HnN2	0.117	0.183	0.076	0.244	0.106	0.201	0.250	0.086
HP	0.188	0.178	0.170	0.201	0.066	0.295	0.349	0.111
HPSb+	0.332	0.130	0.041	0.172	0.222	0.181	0.200	0.143
HPSb-	0.150	0.245	0.013	0.280	0.310	0.253	0.344	0.098
HS	0.165	0.115	0.008	0.205	0.155	0.241	0.291	0.090
Hscapt	0.172	0.133	0.064	0.130	0.120	0.113	0.185	0.170
Hcar	0.132	0.133	0.154	0.283	0.180	0.287	0.283	0.180

#### 4-Tolérance au NaCl :

<b>%NaCl</b> <b>souche</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>HS1</b>	0.082	0.020	0.013	0.020	0.033	0.022
<b>HS6</b>	0.082	0.030	0.025	0.023	0.066	0.006
<b>HS15</b>	0.114	0.077	0.034	0.073	0.022	0.003
<b>HP7</b>	0.074	0.048	0.022	0.035	0.011	0.022
<b>HP10b</b>	0.077	0.061	0.011	0.020	0.033	0.014
<b>HP22a</b>	0.080	0.068	0.051	0.054	0.020	0.026
<b>HP23</b>	0.054	0.033	0.035	0.014	0.026	0.025
<b>Hca1</b>	0.092	0.047	0.026	0.034	0.025	0.006
<b>Hca4</b>	0.094	0.073	0.030	0.047	0.025	0.030
<b>4</b>	0.040	0.088	0.136	0.070	0.038	0.005
<b>19</b>	0.021	0.081	0.073	0.017	0.070	0.035
<b>A6</b>	0.034	0.096	0.359	0.101	0.058	0.000
<b>F</b>	0.053	0.056	0.101	0.053	0.031	0.008
<b>H</b>	0.039	0.092	0.070	0.040	0.078	0.002
<b>I</b>	0.028	0.114	0.071	0.194	0.040	0.000
<b>T</b>	0.067	0.092	0.095	0.075	0.104	0.050
<b>V</b>	0.071	0.054	0.060	0.012	0.06	0.001
<b>HnA</b>	0.063	0.001	0.034	0.003	0.009	0.004
<b>HnM1</b>	0.083	0.014	0.041	0.020	0.020	0.004
<b>HnM2</b>	0.082	0.046	0.024	0.081	0.046	0.020
<b>HnN1</b>	0.032	0.003	0.009	0.010	0.028	0.008
<b>HnN2</b>	0.075	0.027	0.008	0.024	0.048	0.008
<b>HP</b>	0.093	0.069	0.031	0.050	0.048	0.018
<b>HPSb+</b>	0.095	0.031	0.035	0.018	0.034	0.004
<b>HPSb-</b>	0.086	0.047	0.053	0.028	0.032	0.006
<b>HS</b>	0.064	0.045	0.023	0.038	0.055	0.000
<b>Hscapt</b>	0.077	0.053	0.023	0.006	0.021	0.032
<b>Hcar</b>	0.096	0.058	0.037	0.021	0.030	0.016

### 5- Effet du pH:

pH souche	4	4.5	5	5.5	6	6.5	6.8	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
<b>HS1</b>	0.227	0.376	0.218	0.357	0.350	0.474	0.554	0.332	0.481	0.388	0.382	0.331	0.410	0.304
<b>HS6</b>	0.259	0.223	0.215	0.218	0.342	0.472	0.576	0.330	0.483	0.315	0.386	0.247	0.406	0.249
<b>HS15</b>	0.192	0.269	0.239	0.183	0.345	0.536	0.678	0.338	0.485	0.320	0.390	0.314	0.356	0.305
<b>HP7</b>	0.208	0.240	0.235	0.194	0.335	0.471	0.600	0.309	0.453	0.337	0.360	0.273	0.354	0.285
<b>HP10b</b>	0.158	0.279	0.285	0.266	0.336	0.435	0.642	0.354	0.484	0.226	0.371	0.233	0.408	0.340
<b>HP22a</b>	0.232	0.252	0.272	0.179	0.293	0.448	0.282	0.322	0.482	0.301	0.382	0.304	0.385	0.260
<b>HP23</b>	0.250	0.237	0.300	0.234	0.335	0.516	0.680	0.315	0.455	0.272	0.367	0.157	0.358	0.318
<b>Hca1</b>	0.180	0.286	0.120	0.227	0.353	0.446	0.428	0.331	0.490	0.282	0.365	0.300	0.370	0.193
<b>Hca4</b>	0.215	0.238	0.299	0.239	0.323	0.500	0.664	0.347	0.451	0.302	0.393	0.247	0.356	0.289
<b>4</b>	0.227	0.264	0.232	0.283	0.416	0.387	0.684	0.340	0.390	0.335	0.353	0.356	0.358	0.280
<b>19</b>	0.180	0.167	0.348	0.212	0.386	0.368	0.552	0.285	0.350	0.290	0.330	0.301	0.360	0.328
<b>A6</b>	0.300	0.288	0.340	0.332	0.392	0.376	0.845	0.382	0.369	0.341	0.358	0.312	0.382	0.326
<b>F</b>	0.228	0.250	0.227	0.264	0.290	0.356	0.748	0.310	0.322	0.331	0.341	0.271	0.376	0.280
<b>H</b>	0.245	0.277	0.230	0.263	0.357	0.375	0.790	0.364	0.373	0.314	0.357	0.250	0.350	0.368
<b>I</b>	0.230	0.254	0.247	0.248	0.374	0.371	0.676	0.338	0.421	0.283	0.345	0.309	0.361	0.338
<b>T</b>	0.230	0.260	0.294	0.252	0.408	0.347	0.825	0.369	0.355	0.297	0.340	0.326	0.338	0.329
<b>V</b>	0.230	0.237	0.247	0.237	0.397	0.349	0.760	0.324	0.378	0.286	0.349	0.362	0.373	0.340
<b>HnA</b>	0.275	0.246	0.265	0.240	0.316	0.438	0.544	0.295	0.447	0.295	0.382	0.301	0.381	0.296
<b>HnM1</b>	0.239	0.244	0.305	0.239	0.350	0.486	0.815	0.326	0.471	0.281	0.362	0.319	0.374	0.295
<b>HnM2</b>	0.238	0.264	0.259	0.278	0.331	0.486	0.658	0.332	0.475	0.278	0.360	0.220	0.380	0.327
<b>HnN1</b>	0.214	0.252	0.214	0.252	0.328	0.486	0.266	0.305	0.450	0.274	0.371	0.300	0.382	0.267
<b>HnN2</b>	0.196	0.293	0.244	0.263	0.352	0.442	0.336	0.342	0.426	0.247	0.359	0.300	0.367	0.285
<b>HP</b>	0.238	0.217	0.212	0.271	0.335	0.498	0.015	0.315	0.475	0.288	0.199	0.309	0.281	0.265
<b>HPSb+</b>	0.244	0.307	0.299	0.251	0.319	0.473	0.790	0.315	0.490	0.254	0.353	0.322	0.264	0.279
<b>HPSb-</b>	0.242	0.233	0.272	0.260	0.297	0.447	0.648	0.302	0.448	0.275	0.369	0.326	0.365	0.311
<b>HS</b>	0.270	0.259	0.290	0.268	0.329	0.490	0.670	0.333	0.491	0.277	0.376	0.291	0.392	0.266
<b>Hscapt</b>	0.339	0.316	0.286	0.304	0.339	0.490	0.512	0.320	0.458	0.244	0.435	0.323	0.347	0.305
<b>Hcar</b>	0.240	0.275	0.275	0.222	0.326	0.446	0.466	0.292	0.420	0.250	0.366	0.310	0.355	0.255



## Annexe 4:

### Les matrices des données analysées par le logiciel statistique Minitab

#### Analyse hiérarchique des observations : xy; ara; sacc; fruc; gal; sor; cit; raf;

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapes de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	100,00	0,000	27 28	27	2
2	26	100,00	0,000	26 27	26	3
3	25	100,00	0,000	25 26	25	4
4	24	100,00	0,000	24 25	24	5
5	23	100,00	0,000	23 24	23	6
6	22	100,00	0,000	22 23	22	7
7	21	100,00	0,000	21 22	21	8
8	20	100,00	0,000	20 21	20	9
9	19	100,00	0,000	19 20	19	10
10	18	100,00	0,000	18 19	18	11
11	17	100,00	0,000	17 18	17	12
12	16	100,00	0,000	16 17	16	13
13	15	100,00	0,000	15 16	15	14
14	14	100,00	0,000	13 15	13	15
15	13	100,00	0,000	12 13	12	16
16	12	100,00	0,000	11 12	11	17
17	11	100,00	0,000	10 11	10	18
18	10	100,00	0,000	9 10	9	19
19	9	100,00	0,000	8 9	8	20
20	8	100,00	0,000	7 8	7	21
21	7	100,00	0,000	6 7	6	22
22	6	100,00	0,000	5 6	5	23
23	5	100,00	0,000	4 5	4	24
24	4	100,00	0,000	3 4	3	25
25	3	100,00	0,000	2 3	2	26
26	2	100,00	0,000	1 2	1	27
27	1	0,00	1,000	1 14	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
Groupe1	28	0,964	0,069	0,964

#### Cluo 'xy'-'man';

Enregistrement du fichier sous : C:\Documents and Settings\User\Bureau\ASMA  
CONSTANTINE.MPJ

#### Analyse hiérarchique des observations : GNa; Val; TYR; LEU; PRO; THR; ILE; PHE;

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapes de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	100,00	0,000	24 28	24	2

2	26	100,00	0,000	25	26	25	2
3	25	100,00	0,000	22	25	22	3
4	24	100,00	0,000	23	24	23	3
5	23	100,00	0,000	21	23	21	4
6	22	100,00	0,000	19	22	19	4
7	21	100,00	0,000	20	21	20	5
8	20	100,00	0,000	14	20	14	6
9	19	100,00	0,000	7	16	7	2
10	18	100,00	0,000	13	14	13	7
11	17	100,00	0,000	11	13	11	8
12	16	100,00	0,000	1	4	1	2
13	15	55,28	1,000	19	27	19	5
14	14	55,28	1,000	18	19	18	6
15	13	55,28	1,000	12	18	12	7
16	12	55,28	1,000	11	17	11	9
17	11	55,28	1,000	11	12	11	16
18	10	55,28	1,000	10	11	10	17
19	9	55,28	1,000	8	10	8	18
20	8	55,28	1,000	1	9	1	3
21	7	55,28	1,000	7	8	7	20
22	6	55,28	1,000	6	7	6	21
23	5	55,28	1,000	5	6	5	22
24	4	55,28	1,000	3	5	3	23
25	3	55,28	1,000	2	3	2	24
26	2	55,28	1,000	1	2	1	27
27	1	36,75	1,414	1	15	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
Groupe1	28	27,250	0,937	1,509

**Cluo 'GNa'-'CYS';**

## Analyse hiérarchique des observations : NR; UR; CEL; PEC

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapas de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	100,00	0,000	27 28	27	2
2	26	100,00	0,000	26 27	26	3
3	25	100,00	0,000	25 26	25	4
4	24	100,00	0,000	24 25	24	5
5	23	100,00	0,000	23 24	23	6
6	22	100,00	0,000	20 23	20	7
7	21	100,00	0,000	21 22	21	2
8	20	100,00	0,000	17 21	17	3
9	19	100,00	0,000	19 20	19	8
10	18	100,00	0,000	18 19	18	9
11	17	100,00	0,000	8 18	8	10
12	16	100,00	0,000	16 17	16	4
13	15	100,00	0,000	15 16	15	5
14	14	100,00	0,000	14 15	14	6
15	13	100,00	0,000	13 14	13	7
16	12	100,00	0,000	12 13	12	8
17	11	100,00	0,000	11 12	11	9
18	10	100,00	0,000	10 11	10	10
19	9	100,00	0,000	7 8	7	11

20	8	100,00	0,000	6	7	6	12
21	7	100,00	0,000	5	6	5	13
22	6	100,00	0,000	4	5	4	14
23	5	100,00	0,000	3	4	3	15
24	4	100,00	0,000	2	3	2	16
25	3	100,00	0,000	1	2	1	17
26	2	29,29	1,000	1	10	1	27
27	1	29,29	1,000	1	9	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
Groupe1	28	7,393	0,485	1,028

**Cluo 'NR'-'PEC';**

### Analyse hiérarchique des observations : NaCl1; NaCl2; NaCl3; NaCl4; NaCl5; NaCl6

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapas de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	100,00	0,000	27 28	27	2
2	26	100,00	0,000	23 27	23	3
3	25	100,00	0,000	25 26	25	2
4	24	100,00	0,000	24 25	24	3
5	23	100,00	0,000	22 24	22	4
6	22	100,00	0,000	20 23	20	4
7	21	100,00	0,000	19 22	19	5
8	20	100,00	0,000	16 20	16	5
9	19	100,00	0,000	18 19	18	6
10	18	100,00	0,000	17 18	17	7
11	17	100,00	0,000	15 17	15	8
12	16	100,00	0,000	14 16	14	6
13	15	100,00	0,000	13 15	13	9
14	14	100,00	0,000	11 14	11	7
15	13	100,00	0,000	12 13	12	10
16	12	100,00	0,000	10 12	10	11
17	11	100,00	0,000	9 11	9	8
18	10	100,00	0,000	2 10	2	12
19	9	100,00	0,000	8 9	8	9
20	8	100,00	0,000	7 8	7	10
21	7	100,00	0,000	6 7	6	11
22	6	100,00	0,000	5 6	5	12
23	5	100,00	0,000	4 5	4	13
24	4	100,00	0,000	3 4	3	14
25	3	100,00	0,000	1 3	1	15
26	2	42,26	1,000	1 2	1	27
27	1	18,35	1,414	1 21	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
Groupe1	28	8,893	0,533	1,465

## Cluo 'NaCl1'-'NaCl6';

### Analyse hiérarchique des observations : 4°C; 20°C; 28°C; 30°C; 37°C; 45°C; 50°C

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapas de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	100,00	0,000	26 28	26	2
2	26	100,00	0,000	25 27	25	2
3	25	100,00	0,000	23 26	23	3
4	24	100,00	0,000	20 25	20	3
5	23	100,00	0,000	22 24	22	2
6	22	100,00	0,000	14 23	14	4
7	21	100,00	0,000	21 22	21	3
8	20	100,00	0,000	18 21	18	4
9	19	100,00	0,000	4 19	4	2
10	18	100,00	0,000	17 18	17	5
11	17	100,00	0,000	16 17	16	6
12	16	100,00	0,000	15 16	15	7
13	15	100,00	0,000	13 15	13	8
14	14	100,00	0,000	11 14	11	5
15	13	100,00	0,000	12 13	12	9
16	12	100,00	0,000	7 12	7	10
17	11	100,00	0,000	8 11	8	6
18	10	100,00	0,000	1 8	1	7
19	9	100,00	0,000	5 7	5	11
20	8	100,00	0,000	3 5	3	12
21	7	100,00	0,000	2 3	2	13
22	6	42,26	1,000	10 20	10	4
23	5	42,26	1,000	9 10	9	5
24	4	42,26	1,000	4 9	4	7
25	3	42,26	1,000	4 6	4	8
26	2	42,26	1,000	2 4	2	21
27	1	42,26	1,000	1 2	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

Groupel	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
1	28	13,643	0,646	1,230

## Cluo '4°C'-'50°C';

### Analyse hiérarchique des observations : HgCl2; ZnCl2; CuCl2; Pb; SbO3

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapas de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	100,00	0,000	17 27	17	2
2	26	100,00	0,000	23 26	23	2
3	25	100,00	0,000	19 25	19	2
4	24	100,00	0,000	22 23	22	3

5	23	100,00	0,000	20	22	20	4
6	22	100,00	0,000	15	21	15	2
7	21	100,00	0,000	18	20	18	5
8	20	100,00	0,000	6	19	6	3
9	19	100,00	0,000	14	18	14	6
10	18	100,00	0,000	16	17	16	3
11	17	100,00	0,000	12	16	12	4
12	16	100,00	0,000	8	15	8	3
13	15	100,00	0,000	13	14	13	7
14	14	100,00	0,000	10	13	10	8
15	13	100,00	0,000	11	12	11	5
16	12	100,00	0,000	9	11	9	6
17	11	100,00	0,000	1	9	1	7
18	10	100,00	0,000	7	8	7	4
19	9	100,00	0,000	5	7	5	5
20	8	100,00	0,000	4	5	4	6
21	7	100,00	0,000	3	4	3	7
22	6	42,26	1,000	24	28	24	2
23	5	42,26	1,000	10	24	10	10
24	4	42,26	1,000	3	10	3	17
25	3	42,26	1,000	2	6	2	4
26	2	42,26	1,000	2	3	2	21
27	1	42,26	1,000	1	2	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
Groupe1	28	16,964	0,759	1,225

**Cluo 'HgCl2'-'SbO3';**

### Analyse hiérarchique des observations : Rif; Spec; Gent; Eryt; Strept; Kan; ACNA

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapes de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	100,00	0,000	22 28	22	2
2	26	100,00	0,000	21 25	21	2
3	25	100,00	0,000	10 22	10	3
4	24	100,00	0,000	1 21	1	3
5	23	100,00	0,000	18 19	18	2
6	22	100,00	0,000	16 18	16	3
7	21	100,00	0,000	15 16	15	4
8	20	100,00	0,000	8 15	8	5
9	19	100,00	0,000	2 14	2	2
10	18	100,00	0,000	3 9	3	2
11	17	100,00	0,000	7 8	7	6
12	16	100,00	0,000	5 7	5	7
13	15	100,00	0,000	4 5	4	8
14	14	59,18	1,000	20 27	20	2
15	13	59,18	1,000	12 26	12	2
16	12	59,18	1,000	17 24	17	2
17	11	59,18	1,000	20 23	20	3
18	10	59,18	1,000	10 20	10	6
19	9	59,18	1,000	6 17	6	3
20	8	59,18	1,000	4 13	4	9
21	7	59,18	1,000	2 12	2	4
22	6	59,18	1,000	3 11	3	3

23	5	59,18	1,000	6	10	6	9
24	4	59,18	1,000	4	6	4	18
25	3	59,18	1,000	1	4	1	21
26	2	59,18	1,000	2	3	2	7
27	1	42,26	1,414	1	2	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
Groupe1	28	34,893	1,081	1,712

### Cluo 'Rif'-'Chlor';

Enregistrement du fichier sous : C:\Documents and Settings\User\Bureau\ASMA  
CONSTANTINE.MPJ

\* REMARQUE \* Le fichier existant a été remplacé.

### Analyse hiérarchique des observations : xy; ara; sacc; fruc; gal; sor; cit; raf;

Distance euclidienne, Liaison simple

Etapes de fusion

Etape	Nombre de groupes	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes joints	Nouveau groupe	Nombre d'obs. dans nouveau groupe
1	27	64,64	1,414	7 16	7	2
2	26	64,64	1,414	5 7	5	3
3	25	64,64	1,414	4 5	4	4
4	24	56,70	1,732	20 23	20	2
5	23	56,70	1,732	18 22	18	2
6	22	56,70	1,732	13 18	13	3
7	21	50,00	2,000	20 28	20	3
8	20	50,00	2,000	20 27	20	4
9	19	50,00	2,000	19 25	19	2
10	18	50,00	2,000	14 20	14	5
11	17	50,00	2,000	13 19	13	5
12	16	50,00	2,000	4 15	4	5
13	15	50,00	2,000	11 14	11	6
14	14	50,00	2,000	10 13	10	6
15	13	50,00	2,000	8 11	8	7
16	12	50,00	2,000	4 10	4	11
17	11	50,00	2,000	4 8	4	18
18	10	44,10	2,236	12 26	12	2
19	9	44,10	2,236	4 21	4	19
20	8	44,10	2,236	4 17	4	20
21	7	44,10	2,236	4 12	4	22
22	6	44,10	2,236	4 6	4	23
23	5	44,10	2,236	1 4	1	24
24	4	44,10	2,236	2 3	2	2
25	3	38,76	2,449	2 24	2	3
26	2	38,76	2,449	1 2	1	27
27	1	33,86	2,646	1 9	1	28

Subdivision finale

Nombre de groupes: 1

	Nombre d'observations	Somme des carrés dans le groupe	Distance moyenne du point central	Distance maximale du point central
Groupe1	28	110,000	1,965	2,605

### Cluo 'xy'-'Chlor';

## Annexe 5:

### Le séquençage de l'ADNr 16S des isolats

Le séquençage de l'ADNr 16S des souches isolées donne des séquences similaires à celles des souches Gammaproteobacteria isolées et caractérisées par Benhizia et coll. (2004): (HS6 et HS15) AY531217 correspondent à la séquence AJ583835 (Bank de collection de souches) pour l'espèce *Pantoea agglomerans* et (HS1) AY531218 correspond à la séquence AY014817 (Bank de collection de souches) pour l'espèce *Pseudomonas* sp.

**Hs6 = Hs15 = AJ583835. *Pantoea agglomerans* [gi:37359624]**

```
LOCUS      AJ583835                1392 bp    DNA        linear    BCT 30-SEP-2003
DEFINITION  Pantoea agglomerans partial 16S rRNA gene, strain Pa850T.
ACCESSION  AJ583835
VERSION    AJ583835.1  GI:37359624
KEYWORDS   16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE     Pantoea agglomerans
  ORGANISM Pantoea agglomerans
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Pantoea.
REFERENCE  1
  AUTHORS  Moreno, Badosa and Montesinos,E.
  TITLE    Biocontrol of postharvest rot and fire blight pathogens by
Erwinia
            herbicola EPS125. Studies on mode of action
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1392)
  AUTHORS  Moreno,C.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (29-SEP-2003) Moreno C., Plant Pathology, Universitat
de
            Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona, SPAIN
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..1392
            /organism="Pantoea agglomerans"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="Pa850T"
            /db_xref="taxon:549"
  gene     1..1392
            /gene="16S rRNA"
  rRNA    <1..>1392
            /gene="16S rRNA"
            /product="16S ribosomal RNA"
```

ORIGIN

```

1 ggggtgacgag tggcgcacgg gtgagtaatg tctggggatc tgcccgatag agggggataa
61 cactggaaa cgggtggctaa taccgcataa cgtcgcaaga ccaaagaggg ggaccttcgg
121 gcctctcact atcggatgaa cccagatggg attagctagt aggcggggta atggcccacc
181 taggcgacga tccctagctg gtctgagagg atgaccagcc aactgggaac tgagacacgg
241 tccagactcc tacgggaggg agcagtgggg aatattgcac aatggggcgca agcctgatgc
301 agccatgccc cgtgtatgaa gaaggccttc gggttgtaaa gtactttcag cggggaggaa
361 ggcgatgggg ttaataacct tntcgattga cgttaccgcg agaagaagca ccggctaact
421 ccgtgccagc agccgcggta atacggaggg tgcaagcgtt aatcggatt actgggcgta
481 aagcgcacgc aggcggctctg ttaagtcaga tgtgaaatcc ccgggcttaa cctgggaact
541 gcatttgaaa ctggcaggct tgagtcttgt agaggggggt agaattccag gtgtagcggg
601 gaaatgcgta gagatctgga ggaataccgg tggcgaaggc ggccccctgg acaaagactg
661 acgctcaggt gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccc
721 taaacgatgt cgacttggag gttgttcctt tgaggagtgg cttccggagc taacgcgcta
781 agtcgaccgc ctggggagta cggccgcaag gttaaaactc aaatgaattg acggggggccc
841 gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctactctt
901 gacatccacg gaatttggca gagatgcctt agtgccttcg ggaaccgtga gacaggtgct
961 gcatggctgt cgtcagctcg tgttgtagaa tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac
1021 cttatcctt tgttgccagc gattcggctg ggaactcaaa ggagactgcc ggtgataaac
1081 cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcac catggccctt acgagtaggg ctacacacgt
1141 gctacaatgg cgcatacaaa gagaagcgac ctccgagag caagcggacc tcacaaagtg
1201 cgtcgtagtc cggatcggag tctgcaactc gactccgtga agtcggaatc gctagtaatc
1261 gtggatcaga atgccacggg gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc
1321 atgggagtggt gttgcaaaa aagtaggtag cttaaccttc gggagggcgc ttaccacttt
1381 gtgattcatg ac

```

**Hs1 = AY014817. *Pseudomonas* sp. NZ096 [gi:17220735]**

```

LOCUS      AY014817                1457 bp    DNA        linear    BCT 30-NOV-
2001
DEFINITION Pseudomonas sp. NZ096 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  AY014817
VERSION    AY014817.1  GI:17220735
KEYWORDS   .
SOURCE     Pseudomonas sp. NZ096
  ORGANISM Pseudomonas sp. NZ096
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1457)
  AUTHORS  Godfrey,S.A.C., Harrow,S.A., Marshall,J.W. and Klena,J.D.
  TITLE    Characterization of Pseudomonas species (sensu stricto) causing
            'ginger blotch' disease of cultivated Agaricus bisporus using
            16S
            rRNA gene typing
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1457)
  AUTHORS  Godfrey,S.A.C., Harrow,S.A., Marshall,J.W. and Klena,J.D.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (28-NOV-2000) Integrated Crop Protection, Crop & Food
            Research Ltd., Private Bag 4704, Christchurch 8152, New Zealand
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..1457
            /organism="Pseudomonas sp. NZ096"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="NZ096"
            /db_xref="taxon:148758"
  rRNA   <1..>1457
            /product="16S ribosomal RNA"

```

ORIGIN

```

1 agagtttgat cctggctcag attgaacgct ggcggcaggg ctaacacatg caagtgcgagc
61 ggatgaaggg agcttgctcc tggattcagc ggcggacggg tgagtaatgc cttagaatct
121 gcctggtagt gggggacaac gtttcgaaag gaacgctaata accgcatacgc tcttacggga
181 gaaagcaggg gaccttcggg ccttgcgcta tcagatgagc ctaggctcggg ttagctagtt
241 ggtgaggtaa tggctcacca aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtca
301 cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggga gcagtgggga atattggaca
361 atgggcgaaa gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggctctcg gattgtaaag
421 cactttaagt tgggaggaag ggtttagat taataactctg caattttgac gttaccgaca
481 gaataagcac cggctaactc tgtgccagca gccgcggtaa tacagaggtg gcaagcgtta
541 atcggaaatta ctgggcgtaa agcgcgcgta ggtggttcgt taagttggat gtgaaatccc
601 cgggctcaac ctgggaactg catccaaaac tggcgagcta gagtatggta gagggtggtg
661 gaatttcctg tgtagcgggtg aatgtagtag atataggaag gaacaccagt ggcgaaggcg
721 accacctgga ctgataactga cactgagggtg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat
781 accctggtag tccacgccgt aaacgatgtc aactagccgt tgggagcctt gagctcttag
841 tggcgcagct aacgcattaa gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca
901 aatgaattga cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg
961 aagaacctta ccaggccttg acatccaatg aactttccag agatggattg gtgccttcgg
1021 gaacattgag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa
1081 gtcccgtaac gagcgcaacc cttgtcctta gttaccagca cgtaatgggtg ggcactctaa
1141 ggagactgcc ggtgacaaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcac catggccctt
1201 acggcctggg ctacacacgt gctacaatgg tccgtacaaa gggttgccaa gccgcgaggt
1261 ggagctaate ccataaaaacc gatcgtagtc cggatcgcag tctgcaactc gactgctgta
1321 agtcggaate gctagtaate gcgaatcaga atgtcgcggg gaatacgttc ccgggccttg
1381 tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtggt gttgcaccag aagtagctag tctaaccttc
1441 gggaggacgg ttaccac

```

**AY531218.** Gamma proteobacterium [gi:46850545]

LOCUS AY531218 1256 bp DNA linear BCT 23-JUL-2004

DEFINITION Gamma proteobacterium Hs1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AY531218

VERSION AY531218.1 GI:46850545

KEYWORDS .

SOURCE gamma proteobacterium Hs1

ORGANISM gamma proteobacterium Hs1  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1256)

AUTHORS Benhizia,Y., Benhizia,H., Benguedouar,A., Muresu,R.,  
Giacomini,A.  
and Squartini,A.

TITLE Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus  
Hedysarum

JOURNAL Syst. Appl. Microbiol. 27, 462-468 (2004)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1256)

AUTHORS **Benhizia,Y.**, Benhizia,H., Benguedouar,A., Muresu,R.,  
Giacomini,A.  
and Squartini,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (21-JAN-2004) Dipartimento di Biotecnologie Agrarie,  
University of Padova, Strada Romea 16, Legnaro (Padova) 35020,  
Italy

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1256  
/organism="gamma proteobacterium Hs1"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolate="Hs1"

capitatum" /isolation\_source="root nodules"  
 /specific\_host="Hedysarum spinosissimum subsp.  
 /db\_xref="taxon:272913"  
 rRNA <1..>1256  
 /product="16S ribosomal RNA"  
 /note="similar to Pseudomonas sp. strain NZ096 16S  
 rRNA gene with GenBank Accession Number AY014817"

ORIGIN

1 cggcggacgg gtgagtaatg cctaggaatc tgcctggtag tgggggacaa cgtttcgaaa  
 61 ggaacgctaa taccgcatatc gtcctacggg agaaagcagg ggaccttcgg gccttgcgct  
 121 atcagatgag cctaggtcgg attagctagt tggtgaggta atggctcacc aaggcgacga  
 181 tccgtaactg gtctgagagg atgatcagtc acactggaac tgagacacgg tccagactcc  
 241 tacgggaggg agcagtgggg aatattggac aatgggacgaa agcctgatcc agccatgccg  
 301 cgtgtgtgaa gaaggtcttc ggattgtaaa gcactttaag ttgggaggaa gggttgtaga  
 361 ttaatactct gcaatcttga cgttaccgac agaataagca cgggctaact ctgtgccagc  
 421 agccgcggta atacagaggg tgcaagcgtt aatcgggaatt actgggcgta aagcgcgcgt  
 481 aggtgggttcg ttaagttgga tgtgaaatcc ccgggctcaa cctgggaact gcattcaaaa  
 541 ctgtcgagct agagtatggt agaggggtggt ggaatttcct gtgtagcggg gaaatgcgta  
 601 gatataggaa ggaacaccag tggcgaaggc gaccacctgg actgatactg acactgagggt  
 661 gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgt  
 721 caactagccg ttgggagcct tgagctctta gtggcgacgc taacgcatta agttgaccgc  
 781 ctggggagta cggccgcaag gttaaaactc aaatgaattg acgggggccc gcacaagcgg  
 841 tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggcctt gacatccaat  
 901 gaactttcca gagatggatt ggtgccttcg ggaacattga gacaggtgct gcatggctgt  
 961 cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttggggtta agtcccgtaa cgagcgcaac ccttgtcctt  
 1021 agttaccagc acgttatggt gggcactcta aggagactgc cggtgacaaa ccggaggaag  
 1081 gtggggatga cgtcaagtca tcatggccct tacggcctgg gctacacacg tgctacaatg  
 1141 gtcggtacaa agggttgcca agccgcgagg tggagctaata cccataaaac cgatcgtagt  
 1201 ccggatcgca gtctgcaaac tcgactgcgt gaagtcggaa tcgctagtaa tcgtgc

**AY531217**. *Gamma proteobacterium* [gi:46850544]

LOCUS AY531217 609 bp DNA linear BCT 23-JUL-2004

DEFINITION *Gamma proteobacterium* Hs6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AY531217

VERSION AY531217.1 GI:46850544

KEYWORDS .

SOURCE *gamma proteobacterium* Hs6

ORGANISM *gamma proteobacterium* Hs6

*Bacteria*; *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 609)

AUTHORS **Benhizia,Y.**, Benhizia,H., Benguedouar,A., Muresu,R., Giacomini,A.

and Squartini,A.

TITLE *Gamma proteobacteria* can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*

JOURNAL *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 462-468 (2004)

REFERENCE 2 (bases 1 to 609)

AUTHORS Benhizia,Y., Benhizia,H., Benguedouar,A., Muresu,R., Giacomini,A.

and Squartini,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (21-JAN-2004) Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, University of Padova, Strada Romea 16, Legnaro (Padova) 35020, Italy

FEATURES Location/Qualifiers

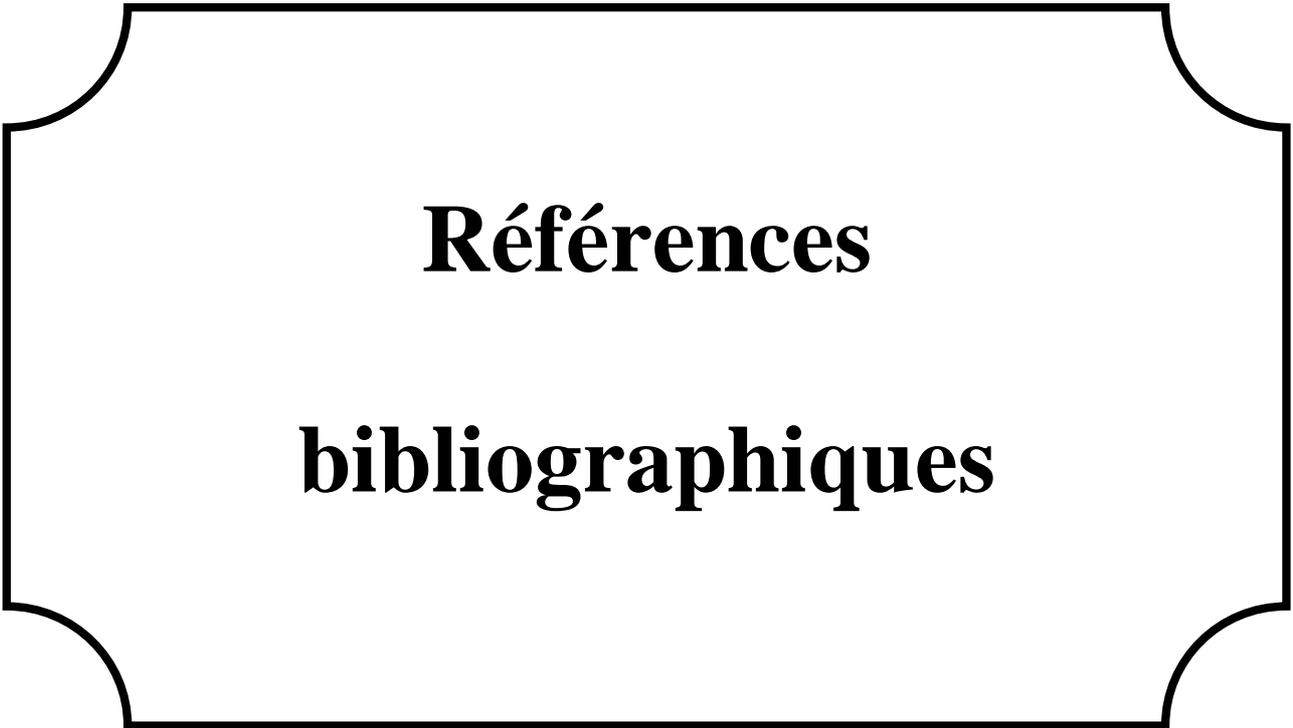
source 1..609

/organism="gamma proteobacterium Hs6"

capitatum"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolate="Hs6"  
/isolation\_source="root nodules"  
/specific\_host="Hedysarum spinosissimum subsp.  
rRNA  
/db\_xref="taxon:272912"  
complement(<1..>609)  
/product="16S ribosomal RNA"  
/note="similar to Pantoea agglomerans 16S rRNA gene  
with  
GenBank Accession Number AJ583835"

ORIGIN

```
1 gatccacgat tactagcgat tccgacttca cggagtcgag ttgcagactc cgatccggac
61 tacgacgcac tttgtgaggt ccgcttgctc tcgcgaggtc gcttctcttt gtatgcgcca
121 ttgtagcacg tgtgtagccc tactcgtaag ggccatgatg acttgacgtc atccccacct
181 tcctccggtt tatcaccggc agtctccttt gagttcccga ccgaatcgct ggcaacaaaag
241 gataaggggt gcgctcgttg cgggacttaa cccaacattt cacaacacga gctgacgaca
301 gccatgcagc acctgtctca cggttcccga aggcactaag gcactctctgc caaattccgt
361 ggatgtcaag agtaggtaag gttcttcgcg ttgcatcgaa ttaaaccaca tgctccaccg
421 cttgtgcggg cccccgtcaa ttcatttgag ttttaacctt gcggccgtac tcccaggcg
481 gtcgacttaa cgcgtagct cccggaagcca ctctcaagg gaacaacctc caagtcgaca
541 tcgtttacgg cgtggactac cagggtatct aatcctggtt gctccccacg ctttcgcacc
601 tgagcgta
```



**Références**

**bibliographiques**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

**Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N., Guittonneau G.G., 1988.** -

Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. I- Etude auto écologique. Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach. 12: 191-219.

**Allen O. N., Allen E.K., 1950.** - Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. Bacterial.Rev.14: 273-330.

**Altschul S.F., Gish W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990.** - Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.

**Baatout H., 1991.** - Le complexe d'espèces *Hedysarum spinosissimum* L. dans le bassin méditerranéen occidental: analyse de la structure génétique des populations, conséquences au niveau de la systématique des deux sous-espèces *capitatum* et *euspinosissimum* dans le genre *Hedysarum*. Thèse d'Etat. Orsay, France, Université Paris-Sud.

**Bado D. V., 2002.** - Role des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor.

**Batzly J.M., Graves W. R., Vanberkum P 1992.**- Diversity among Rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. Applied and environmental microbiology. 58(7): 2137-2143

**Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993.** - Pratical *Rhizobium*- Legume Technology Manual . ICARDA.Syria.

**Benguedouar A., Corich V., Giacomini A., Squartini A., Nuti M.P., 1997.** - Characterization of symbiotic bacteria from the Mediterranean legume crop *Hedysarum coronarium* (Sulla) by multilocus enzyme electrophoresis. Agr. Med.127:173-177.

**Benguedouar A., 2000.** – Etude de la symbiose : *Rhizobium* –*Hedysarum coronarium*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary* . thèse de doctorat de l'université de Constantine.Algérie.

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

**Benhizia Y., 2006.** – Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum*: *H.carnosum* Desf., *Hspinossissimum subsp.capitatum* Desf. Et *H.pallidum* Desf. Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine.

**Beringer J. E., 1974.** - R-Factor transfer in rhizobium legume. J. Gen. Microbiol., 84: 188-198.

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

**Biro B., Bayoumi H.E., Balazsy S., Kecskes M., 1995.-** Metal sensitivity of some symbiotic N<sub>2</sub>-fixing bacteria and Pseudomonas strains. Acta Biol Hung. 46(1):9-16.

**Boussaid M., BenFadhel N., Trifi-Farah N., Abdelkefi A., Marrakchi M., 1995.** – Les espèces méditerranéennes du genre *Hedysarum* L. In: BRG / INRA, ed. Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. France,

**Brewin N.J., Downie J.A., Young J.P.W., 1992** - Nodule formation legumes. encyclopedia of microbiology, M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New york.3:239-248.

**Brewin N. J., 2002.** - Pods and Nods: a new look at symbiotic nitrogen fixing. Biologist.Rev. 49 (3).

**Broughton W. J., Jabbouri S., Perret X., 2000.** - Keys to Symbiotic Harmony” Journal of Bacteriology. 182(20): 5641-5652.

**Broughton W. j., 2003.** - Roses by Other Names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. Journal of Bacteriology. 185 (10): 2975-2979.

**Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M., Vandamme P.,**

2001 - *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1729-1735.

**Çelen E., Kiliç M. A., 2004.** – Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil. Turk J Biol. Tubitak. 28 : 9-14.

**Coyne V. E., James M.D., Reid S.J., Rybicki E.P., 2002.-** SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Molecular Biology Techniques Manual. Third Edition. University of Cape Town.

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

**Dazzo F.B., 1982.** - Leguminous root nodules, pp. 431-446. In: Experimental Microbial Ecology (R. Burns, J. Slater, eds.) Oxford, Blackwell Scientific Publications.

**Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C. 2001.** - nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. Acta Biochimica Polonica Minireview .48 (2): 359–365.

**de Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B., Gillis M., 1998.-** *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 48 : 1277–1290.

**de Oliveira L.A., de Magalhães H.P.,1999.-** Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. Rev Microbiol.30(3).

**Dijkshoorn L., Ursing B. M., Ursing J. B., 2000.** – Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. J. Med Microbiol. 49: 397-401.

**Diouf A., de Lajudie P., Neyra M., Kersters K., Gillis M., Martinez-Romero E., Gueye M., 2000.-** Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50 : 159–170.

**Dixon R. O. D., 1969. –** Rhizobia ( with particular reference to relationships with host plants). Microbiol.Rev. 23: 137-158.

**Dudmani W.F., Belbin L., 1988. -** Numerical Taxonomic Analysis of Some Strains of Rhizobium spp. That Uses a Qualitative Coding of Immunodiffusion Reactions. Applied and Environmental Microbiology. 54 (7): 1825-1830.

**Fähreus A., 1957. -** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. 16: 354-381.

**Fenton M., 1994. -** The expression in soil bacteria of symbiotic genes from *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. Dept of Microbiology and Genetics, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

**Gage D.J., 2004. -** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol Mol Biol.Rev. 68 (2): 280-300.

**Gloux K., Le Rudulier D., 1989.-** transport and catabolism of proline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti* .Arch.miicrobial.151 : 143-148.

**Graham P.H., 1991. –** What are Rhizobia ?.The College of Agricultural Food and Environment Science.

**Gremion F., 2003.-** Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods. Thèse pour l’obtention du grade de docteur ès sciences. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. Lausanne, EPFL

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

**Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Boussaid M., Marrakchi M., Trifarah N., 2004.** - Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, 130: 65 - 72.

**Haukka K., Lindström K., Young P.W., 1998.** - Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol.Rev.* 64 (2) : 419-426.

**Hofer A. V., 1941.** – A characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and Van Delden). *J. Bacteriol.* 41(2): 193-224.

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

**Hubbell D.H., Morales V.M., Umali-Garcia M., 1978.** – Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. *Applied and environmental microbiology.*35(1): 210-213.

**Jana S.C., Chakrabartty P.K., Mshara A.K., 1992.** – Taxonomic relationship of some members of enterobacteriaceae based on their protein profiles. *J. Basic Microbial.*32 :29-33.

**Jordan D. C., 1984** - Rhizobiaceae. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. p: 234-245.

**Kennedy I.R., Rigaud J., Trinchant J.C., 1975.**- Nitrate reductase from bactéroïdes of *Rhizobium japonicum* : enzyme characterisation and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim Biophys Acta.* 397(1): 24-35.

**Kleczkowska J., 1945.** – A quantitative study of the interaction bacteriophage with *Rhizobium* using the technique of poured plates. Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Herts

**Kneen B.E., LaRue T.A., 1983.** - Congo red absorption by *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and environmental microbiology.* 45(1): 340-342.

**Laemmli U.K., 1970.-** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

**Lambert B., Joos H., Dierickx S., Vantome R., Swings J., Keresters K., Van montagu.,1990. -** Identification and Plant Interaction of a Phyllobacterium sp., a Predominant Rhizobacterium of Young Sugar Beet Plants. *Applied and environmental microbiology*.56 (4): 1093-1102.

**Lucinski R., Polcyn W., Rotayczak L., 2002.-** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes. *Acta Biochimia Polonia*.49 (2): 537-546.

**Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., 2002. -** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22 : 321–329

**Marchesi J.R., Sato T., Weightman A. J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998. -** Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795-799.

**Martinez-Molina E., Morales V. M., Hubbell D. H., 1979. –**Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. . *Appl. Environ. Microbiol.*38(6) : 1186-1188.

**Mobley L.T.H., 1992. –** Urease Microbial .J Lederberg (ed). *Encyclopedia of microbiology* . 4 :327-346.

**Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C., 2001. -** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411: 948-950.

**Ndiaye A.A., Sylla S.N., Gueye M., delajudie P., Ndoye I., 2002.-** Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des Rhizobiums *d'Acacia tortilis* (Forsk.)Hayne supsp.*Raddiana* (Savi) *Brenan*. *African Journal of Science and Technology. Science and Engineering Series* 3(1):33-43.

**O'Brien M., Colewell R., 1987. –** Characterization tests for numerical taxonomic studies. *Method Microbial.* 19: 69-104.

**Osborn A.M., Moore E.R.B., Timmis K.N., 2000.** - An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2: 39-50.

**Pelmont J., 1995.** - bactérie et environnement adaptation physiologique. Vol 2. Office des Publications Universitaires.

**Perret X., Staehelin C., Broughton W.J., 2000.** - Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*; 64(1): 180–201.

**Pottier-Alapetite G., 1979.** - Flore de la Tunisie. Angiospermes Dicotylédones. Apétales-Dialypétales . Imprimerie Officielle de la République Tunisienne.

**Quezel P., Santa S., 1962.** - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed.Paris, France.

**Raza S., Jørnsgård B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L., 2001.** - Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 32 (6):379-383.

**Rasanen L.A., 2002.** - Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

**Saadallah K., Drevon J.J, Abdelly C., 2001.-** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21 : 627–634.

**Sahgal M., Johri B.N., 2003.** - The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*. 84 (1): 43-49.

**Sharma P. K., Kundu B.S., Dogra R. C. 1993.** - Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. *Biotech. Adv.* 11:741-779

**Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L. E., Martínez-Romero E., Souza V., 2003.** - *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications. *Appl Environ Microbiol.Rev.* 69 (2) : 884-893

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

**Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S., Nuti M.P., 2002.** -*Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1267–1276.

**Struffi P., Corich V., A Giacomini., 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: 81- 89.

**Suominen L., Paulin L., Saano A., Saren A. M., Tas E., Lindström K., 1999.** - Identification of nodulation promoter (*nod*-box) regions of *Rhizobium galegae*. *FEMS Microbiology Letters.* 177 (2): 217-223.

**Suominen L., Roos C., Lortet G., Paulin L., Lindström K., 2001.-** Identification and Structure of the *Rhizobium galegae* Common Nodulation Genes: Evidence for Horizontal Gene Transfer. *Molecular Biology and Evolution.* 18:907-916.

**Sy A., Giraud E., Samba R., de Lajudie P., Gillis M., Dreyfus B., 2001.-** Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. *Rev. can. microbiol./Can. J. Microbiol.* 47(6) : 503-508

**Tan Z.Y., Hurek T., Vinuesa P., Müller P., . Ladha J.K., Reinhold-Hurek B., 2001.** - Specific Detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* Strains Colonizing Rice (*Oryza*

*sativa*) Roots by 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer-Targeted PCR. Appl Environ Microbiol.Rev.67 (8) : 3655-3664.

**Tan Z.Y., Wang E.T., Peng G.X., Zhu M.E., Martinez-Romero E., Chen W.X., 1999.** - Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. International Journal of Systematic Bacteriology.49: 1457–1469.

**Terefework Z., 2002.-** Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. ACADEMIC DISSERTATION IN MICROBIOLOGY. University of Helsinki. ISSN:1239-9469

**Tortora G.j., Funk B.R., Case C.L., 2003.-** Introduction à la microbiologie . Edition du Renouveau Pédagogique Inc.

**Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Keresters K., Swings J., 1996.** - Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiological.Rev. 60 (2): 407–438.

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

**Vinuesa P., Rademaker J. L.W., de Bruijn F.J., Werner D., 1998.** - Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains Nodulating Endemic Woody Legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR Genomic Fingerprinting, and Partial 16S rDNA Sequencing . Appl Environ Microbiol.Rev. 64 (6) : 2096-2104.

**Wei G.H., Tan Z.Y., Zhu M.E., Wang E.T., Han S.Z., Chen W.X., 2003.-** Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera Astragalus and Lespedeza grown

in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 53 :1575–1583.

**Weir B.,2005.** - current taxonomy of rhizobia [Updated 20th October 2005] New Zealand Rhizobia.

**Werner D., 1992.** -Symbiosis of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany . Edition Chapman & Hall.

**Yang F.L., Lin L.P., 1998.** - Cytostructure, lipopolysaccharides, and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Bot. Bull. Acad. Sin. 39: 261-267.

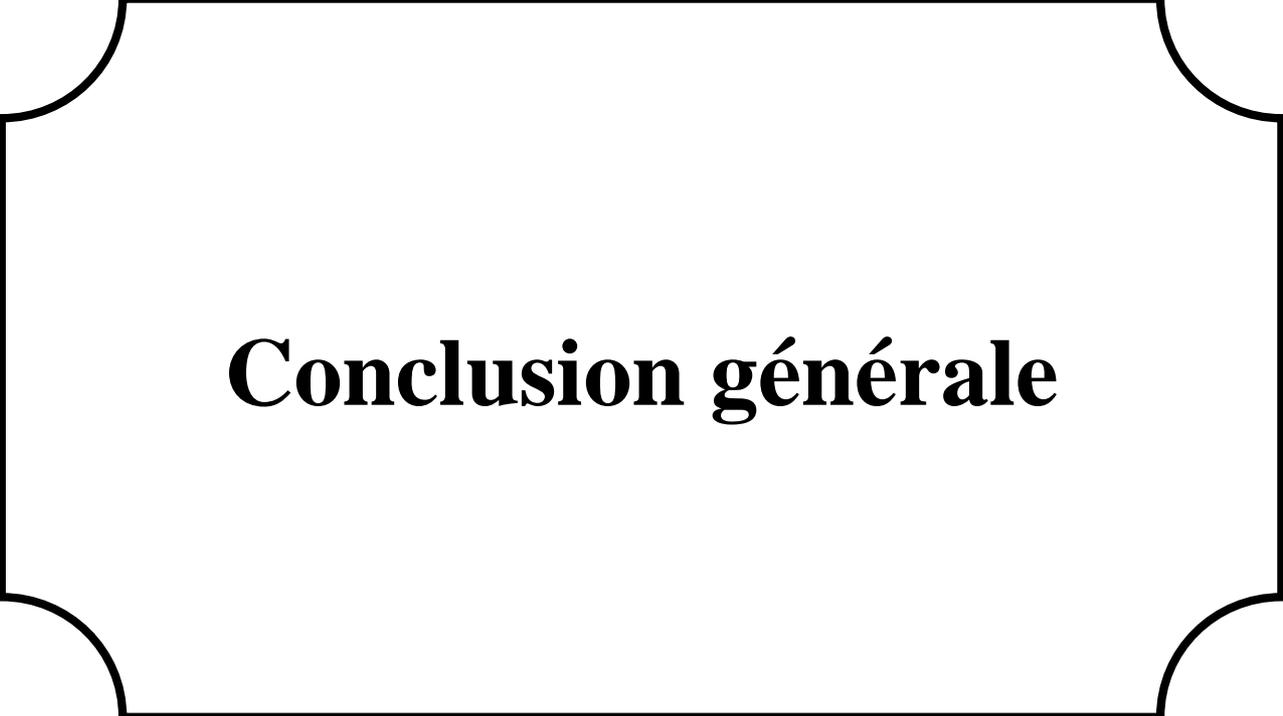
**Yann P., 2006.-** Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses.Master Recherche. Microorganisme du génome aux interaction avec l'hôte. Université de Paul Sabatier.Toulouse III.

**Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H., 2003.** – Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* – a reply to Farrand *et al.* (2003). Int J Syst Evol Microbiol.53: 1689-1695.

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

**Zakhia F., de Lajudie P., 2001.** - taxonomy of rhizobia . Agronomie 21 : 569–576.





# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

Dans cette étude nous avons essayé de caractériser et d'identifier des souches bactériennes isolées à partir des nodules de quatre espèces du genre *Hedysarum* : *H. pallidum*, *H. spinosissimum* subsp *capitatum*, *H. carnosum* et *H. naudinianum*.

Cette caractérisation à des fins taxonomiques comporte une étude phénotypique et génotypique en présence des souches témoins du genre *Rhizobium* isolées à partir des nodules de *H. coronarium* ; *R.sullae* et des souches appartenant aux espèces de *R. leguminosarum* bv *trifolii* et *R. leguminosarum* bv *visiae*, ainsi que des souches appartenant à la classe des Gammaproteobacteria isolées et caractérisées par Benhizia et coll.(2004).

L'aspect morphologique des isolats sur les différents milieux de culture montre qu'ils ont une croissance rapide avec une production abondante des poly  $\beta$ -hydroxybutyrates (PHB). La croissance sur YMA-rouge Congo montre que les souches présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo. Les souches ne modifient pas le pH sur le milieu GPA et provoquent une réaction acide sur YMA-BTB en 24 heures.

L'examen microscopique par la coloration de Gram révèle des bactéries à Gram négatif de forme bâtonnet à extrémités arrondies et de différentes tailles.

Le test de nodulation sous des conditions bactériologiques contrôlées en utilisant la technique des jarres de Leonard est réalisé pour confirmer la relation symbiotique entre les souches bactériennes et les plantes hôtes et l'évaluation de l'aptitude des souches à pénétrer dans les tissus racinaires et former des nodules. Les résultats obtenus montrent que nos souches sont infectives et on remarque qu'il y a une bonne stimulation de la partie racinaire et un bon développement de la partie aérienne.

Pour voir si la souche rhizobiale a un rôle dans l'infectivité des souches Gammaproteobacteria et les isolats spécifiques des plantes qui ont donné peu de nodules et de petite taille, on a supposé qu'elle stimule la nodulation. Mais les résultats obtenus suggèrent que la souche rhizobiale n'a aucune influence dans le processus de la nodulation de ces souches.

L'identification phénotypique comporte une série de tests qui englobe des tests distinctifs entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*, tests nutritionnels et biochimiques, l'effet des facteurs abiotiques, la recherche des concentrations inhibitrices par les métaux lourds et les antibiotiques ainsi que la sensibilité aux phages.

Les isolats et les souches de référence ne produisent pas le 3-cétoglucosidase et ne donnent pas un précipité sur gélose au mannitol et au glycérophosphate, montrant ainsi un résultat négatif avec les test du 3-cétolactose et la précipitation du Ca-glycérophosphate qui sont très spécifiques au genre *Agrobacterium* (Jordan, 1984), et confirme ainsi que nos souches n'appartiennent pas à ce genre.

Deux souches seulement (HnN1, HnN2) ont donné un résultats positif sur le lait tournesolé (Litmus milk) qui se traduit par un halo clair autour des colonies. Ce résultat est obtenu avec les souches de référence de *Rhizobium* sp. Le reste des isolats et les souches de référence Gammaproteobacteria présentent un résultat négatif avec une décoloration du milieu de culture.

Les résultats des tests nutritionnels montrent que les souches peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates et n'exigent pas le mannitol comme seule source de carbone. Les souches peuvent pousser en présence de la majorité des acides aminés testés mais la présence de certains acides aminés ne donne pas lieu à aucun trouble. La stimulation de la croissance par les vitamines diffère selon la vitamine utilisée et les résultats montrent que les souches n'exigent pas toutes les vitamines.

La recherche des enzymes spécifiques nécessaires pour la relation symbiotique démontre que les souches sont pourvues d'une nitrate réductase, uréase et pectinase. On remarque que la cellulase est présente seulement chez les souches de référence rhizobiales et les deux isolats (HnN1, HnN2). Le reste des isolats et les souches de référence Gammaproteobacteria montre une activité endoglucanasique négative.

L'effet des facteurs intrinsèques montre que les souches sont halotolérantes et peuvent résister des concentrations élevées du NaCl arrivant jusqu'à 10% (1710 mM), cette propriété est probablement due à l'accumulation des osmolytes. Les souches présentent une croissance optimale dans l'intervalle de 20 à 37 °C. Elles sont considérées comme thermorésistantes du fait qu'elles présentent une croissance jusqu'à 45°C. Il apparaît aussi que des souches peuvent se développer à une température de 50°C. Les résultats de l'effet du pH révèle la croissance des souches à des valeurs comprises entre pH 4 et pH 10 avec un optimum de croissance entre pH 6.5 et pH 7.5.

La tolérance des souches aux métaux lourds est différente. Toutes les souches tolèrent la présence de l'antimoine et leur sensibilité apparaît avec le mercure. Les souches tolèrent différemment la présence du zinc, du cuivre et du plomb mais en général la concentration inhibitrice est observée à des concentrations élevées.

Pour les antibiotiques, les souches étudiées sont résistantes à l'acide nalidixique, érythromycine et spectinomycine. Elles sont sensibles au chloramphénicol, kanamycine, et rifampicine.

Toutes les souches présentent un résultat négatif par rapport au test phagique et semblent être tous résistantes aux phages.

La technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée pour déterminer le profil des protéines totales des souches. Les valeurs des coefficients de similitude des bandes polypeptidiques entre les isolats et les souches témoins suggèrent que les isolats testés se rapprochent au Gammaproteobacteria et donnent une idée sur la position taxonomique des isolats.

Les résultats de la caractérisation phénotypique montrent que nos isolats aient la description des Gammaproteobacteria. Seulement les deux souches (HnN1, HnN2) qui ont donné un comportement différent vis-à-vis des deux tests : croissance sur Litmus milk et la production de la cellulase et on suppose qu'elles peuvent être des rhizobia.

Pour confirmer la caractérisation phénotypique, les isolats ont subi une étude moléculaire en les analysant par la technique de l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) en utilisant l'enzyme de restriction *CfoI*. Les résultats de cette analyse donnent des profils qui semblent être similaires mais ne sont pas très significatifs du fait qu'on a obtenu des impuretés avec les souches analysées. On a pu faire le séquençage de seulement six souches isolées parmi les onze et on a trouvé qu'elles appartiennent à la classe des Gammaproteobacteria spécifiquement les espèces de *Pseudomonas sp* et *Pantoea agglomerans*.

Les résultats obtenus de cette étude montre une autre fois que la relation symbiotique plante légumineuse- bactérie n'est pas restreinte aux espèces du genre *Rhizobium* et que les Gammaproteobacteria peuvent s'associer aux nodules des légumineuses.

L'espèce *H. naudinianum* est une autre espèce légumineuses semble avoir une infection bactérienne non rhizobiale, et à partir de nos résultats on suppose l'existence des bactéries appartenant à la classe Gammaproteobacteria dans l'association symbiotique des deux partenaires.

La présence des bactéries qui n'appartiennent pas au genre *Rhizobium* dans l'association symbiotique est démontrée par plusieurs auteurs. Sy et coll. (2001) ont démontré comment des bactéries appartenant à la famille des Methylobacteriaceae peuvent être des symbiontes de fixation de l'azote des espèces du genre *Crotolaria*. Des membres bactériennes de la classe Betaproteobacteria ont été également désignés comme des microorganismes symbiotiques (Chen et coll., 2003 ; Moulin et coll., 2001). Benhizia et coll.(2004) montrent l'association symbiotique entre les espèces légumineuses du genre *Hedysarum* et les membres de la classe Gammaproteobacteria.

Il est judicieux d'approfondir cette investigation en l'améliorant par plusieurs points :

- Etudier l'efficacité symbiotique des bactéries infectives associées aux espèces du genre *Hedysarum*.
- Discuter l'absence de la cellulase, enzyme nécessaire pour l'envahissement des bactéries à l'intérieur des tissus racinaires et rechercher l'agent qui favorise cette pénétration.
- Etudier le processus de la nodulation et essayer de comprendre l'interaction des signaux moléculaires au niveau génomique pour les deux partenaires.
- Développer le rôle des EPS (exopolysacchrides) dans la nodulation.
- Elargir la recherche de l'interaction plante- bactérie en étudiant la position taxonomiques des microsymbiontes des autres espèces du genre *Hedysarum* localisées surtout dans le bassin méditerranéen .