

République Algérienne Démocratique et populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

N° d'ordre :

N° de série :

**Université Mentouri de Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Végétale**

Thèse pour l'obtention de Magister en Génétique et  
Amélioration des plantes  
Option Génomique et Techniques Avancées des Végétaux

Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) :  
caractérisation des bactéries associées aux nodules de la  
Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*

Présentée par  
Sebihi Fatima Zohra

**Soutenu le :    /    / 2008**

**devant le Jury d'Examens**

Président : Mme N.KHALFALLAH	Professeur- U. Mentouri- Constantine
Rapporteur : M.A.BENGUEDOUAR	Professeur- U. Mentouri- Constantine
Examineur : M.Y.BENHIZIA	M.C.- U. Mentouri- Constantine
Examineur : M. R.MERGHEM	Professeur- U. Mentouri- Constantine

Année Universitaire 2007/2008

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude, ma plus chaleureuse amitié ainsi que mon plus grand respect au Professeur Ammar BENGUEDOUAR du Laboratoire d'écologie microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature, pour m'avoir acceptée, suivie, de m'avoir fait confiance tout au long de mon passage au laboratoire.

Je tiens à assurer mon plus grand respect à l'égard du Dr BENHIZIA Yassine. qui ma suivie dans la réalisation pratique de ce travail. Je le remercie vivement pour ses nombreux conseils et sa sympathie légendaire.

Je remercie Mr Andrea SQUARTINI, Professeur à l'Université de Padoue (Italie) qui a beaucoup contribué à l'identification de nos isolats, notamment les techniques moléculaires.

J'adresse mes remerciements au Professeur Douadi KHELIFI du Laboratoire de Biochimie et Génétique des Plantes qui nous a énormément aidé dans la réalisation du profil des protéines totales SDS-PAGE.

Mes remerciements à MM. Nadjib BOURGHOUD et Mohamed Laid HADDI pour leurs précieux conseils.

## Liste des figures

- Figure 1** : Cycle d'azote (Peret ,2007)
- Figure 2** : Représentation schématique de la symbiose
- Figure 3** : Infection intracellulaire chez les Légumineuses.
- Figure 4** : Cycle de la Nitrogénase
- Figure 5** : Représentation du complexe nitrogénase.
- Figure 6** : génétique de la fixation.
- Figure 7** : Structure des facteurs Nod.
- Figure 8** : Régulation du facteur NodD
- Figure 9** : Présentation moléculaire de la symbiose
- Figure 10** : Phylogénie des Légumineuses
- Figure 11** : Pouvoir discriminant des différentes techniques de la taxonomie polyphasique
- Figure 12** : La légumineuse *Hedysarum perrauderianum* (Ain Oulmane, W. Sétif).
- Figure 13** : Collecte des nodules (Photo D.P. Beck, 1993)
- Figure 14** : Rinçage des racines et nodules (Photo D.P. Beck, 1993)
- Figure 15** : Conservation des nodules (Photo D.P. Beck, 1993)
- Figure 16** : Echantillon de nodules de *Hedysarum perrauderianum* (après collecte)
- Figure 17** : Hotte à flux laminaire
- Figure 18** : Dispositif de la mesure de la croissance.
- Figure 19** : Assemblage de Jarre de Léonard (Vincent, 1970)
- Figure 20** : Jarre de Léonard
- Figure 21** : Purification de l'ADN par le Kit Qiagen QIAquick PCR
- Figure 22** : Aspect des colonies sur YMA
- Figure 23** : Absorption du rouge Congo (0,0025%)
- Figure 24** : *Hper* sur BTB
- Figure 25** : Absorption du Calcofluor par les isolats
- Figure 26** : Protéolyse observée sur milieu Litmus milk
- Figure 27** : Uréase
- Figure 28** : Présence d'une Cellulase pour les isolats
- Figure 29** : Mise en évidence d'une polygalacturonase chez les isolats
- Figure 30** : Utilisation des sucres
- Figure 31** : Utilisation des Acides Aminés
- Figure 32** : Besoin en vitamines
- Figure 33** : Effet du Na Cl sur la croissance des isolats
- Figure 34** : Effet du pH sur la croissance des isolats
- Figure 35** : Plage de lyse
- Figure 36** : Racines avec des « pseudo-nodules »
- Figure 37** : Profils Electrophorétiques sur gel de polyacrylamide (12%) des protéines totales.
- Figure 38** : Profil ARDRA après digestion par *CfoI* des isolats

## Liste des tableaux

**Tableau N°1** : - Les différents gènes de la nodulation (*nod, nif, noe*)

**Tableau N°2** : Les espèces qui se trouvent en Algérie selon (Greuter.W,1989 ; Quezel et Santa,1962).

**Tableau N°3** : Classification des bactéries nodulant les Légumineuses et fixatrices d'azote symbiotique des légumineuses, d'après ICSP subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* (18 Août 2007).

**Tableau N°4** : Isolats et Souches de référence utilisés

**Tableau N°5** : Effet de la température

**Tableau N°6** : Effet des métaux sur la croissance des isolats

**Tableau N°7** : Blast des Isolats.

## Sommaire

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
 <b>Chapitre Un : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I- La fixation de l'azote</b>	<b>3</b>
1-1- L'azote	3
1-2- Les principales sources d'azote	3
1-2-1 Le sol	3
1-2-2- Les amendements organiques	4
1-2-3- Les engrais minéraux	4
1-2-4- L'atmosphère	4
1-2-5- La fixation symbiotique.	4
1-2-6- Fixation industrielle de l'azote	5
 <b>II- Fixation biologique de l'azote</b>	 <b>6</b>
2-1- Les fixateurs libres	7
2-2- Les fixateurs symbiotiques	7
2-3- Physiologie de la symbiose	8
2-4- Biochimie de la Fixation	10
2-4-1 -La nitrogénase	10
2-4-2- La leghémoglobine	12
2-4-3-Assimilation de l'ammonium	13
2-4-4-Spécificité de la symbiose	14
2-5- Génétique de la Fixation de l'azote	15
2-5-1-Facteur Nod	16
2-5-2-Régulation de gène <i>nodD</i>	19

<b>III- Les légumineuses</b>	<b>22</b>
3-1-Généralités	22
3-2-Classification	22
3-3-Importance	24
3-4- Le genre <i>Hedysarum</i>	25
<b>IV- Le Micro-Symbiont: les bactéries nodulant les Légumineuses (B.N.L.)</b>	<b>28</b>
4-1-Classification des bactéries nodulant les Légumineuses (B.N.L)	28
4-2- Coexistence des bactéries avec des rhizobia dans les nodules des légumineuses	37

## **Chapitre Deux : Matériels et méthodes**

<b>1-Isolement des bactéries à partir des nodules</b>	<b>39</b>
1-1- Collecte des nodules	39
1-2- Conservation et Stérilisation des nodules	40
1-3- Isolement des bactéries à partir des nodules	41
1-4- Observations des colonies et conservation des isolats	41
<b>2 - Caractéristiques métaboliques des isolats</b>	<b>42</b>
<b>2-1- Vitesse de croissance, absorption du rouge Congo et coloration au Calcofluor</b>	<b>43</b>
<b>2-2- Tests distinctifs entre Rhizobium et Agrobacterium</b>	<b>43</b>
a) Test du 3-Cétolactose	43
b) Précipitation du Ca- Glycérophosphate	44
c) Croissance sur Litmus Milk (Lait Tournesolé)	44
<b>2-3- Recherche des enzymes</b>	<b>45</b>
a) Réduction des nitrates	45
b) Activité cellulosique	45
c) Activité pectinolytique	46
d) Hydrolyse de l'urée	46

e) La recherche de la $\beta$ -galactosidase	46
<b>2-4- Tests nutritionnels</b>	<b>47</b>
a) Utilisation de la source de carbone	47
b) Utilisation des acides aminés comme source d'azote	47
c) Besoin en vitamines	47
<b>3- Effet des Facteurs abiotiques</b>	<b>48</b>
3-1- Tolérance au Chlorure de Sodium	48
3-2- Effet de la température	49
3-3- Croissance à différents pH	49
<b>3-4- Résistance intrinsèque aux métaux lourds</b>	<b>49</b>
<b>4- Caractérisation des rhizobia par la sensibilité aux phages</b>	<b>49</b>
<b>4-1- Isolement des bactériophages</b>	<b>50</b>
<b>4-2- Analyse des phages par la méthode de double couche</b>	<b>50</b>
<b>5- Test de nodulation (prestations symbiotiques avec la plante-hôte)</b>	<b>51</b>
<b>5-1- Croissance bactérienne</b>	<b>51</b>
<b>5-2- Préparation des jarres de Léonard</b>	<b>52</b>
<b>5-3 - Stérilisation des graines</b>	<b>53</b>
<b>5-4 - Inoculation des jarres</b>	<b>53</b>
<b>6-Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE</b>	<b>54</b>
<b>6-1- Introduction</b>	<b>54</b>
<b>6-2- Protocole</b>	<b>55</b>
<b>7- Caractérisation phylogénétique des isolats</b>	<b>55</b>
<b>7-1 -Analyse des fragments de restriction de l'ADN amplifié</b>	<b>56</b>
a-Extraction de l'ADN	56
b-Analyse des fragments de restriction de l'ADN amplifié	56
<b>7-2- Séquençage de l'ADNr 16S par la méthode Sanger</b>	<b>57</b>

# Chapitre Trois : Résultats

<b>1-Caractéristiques morphologiques, culturaux et physiologiques des isolats</b>	<b>59</b>
<b>1-1 Croissance sur YMA</b>	<b>59</b>
<b>1-2- Croissance sur YMA+ Rouge Congo</b>	<b>60</b>
<b>1-3-La vitesse de croissance.</b>	<b>60</b>
<b>1-4- Croissance sur YMA+ Calcofluor</b>	<b>61</b>
<b>1-5-Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i></b>	<b>61</b>
<b>1-6-Recherche d'enzymes spécifiques</b>	<b>62</b>
<b>1-7- Utilisation de la source de Carbone et d'azote, besoin en vitamines</b>	<b>64</b>
a) Utilisation de la source de carbone	<b>64</b>
b) Assimilation de la source d'azote	<b>65</b>
c) Besoin en vitamines	<b>66</b>
<b>2- Effet des facteurs abiotiques (pH, T°C et NaCl)</b>	<b>67</b>
<b>2-1- Tolérance au NaCl</b>	<b>67</b>
<b>2-2-Température de croissance</b>	<b>68</b>
<b>2-3- Effet du pH</b>	<b>69</b>
<b>3- Ecologie des isolats (sensibilité aux métaux lourds et aux rhizobiophages)</b>	<b>70</b>
<b>4- Test de nodulation</b>	<b>72</b>
<b>5- Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE</b>	<b>74</b>
<b>6-Caractérisation phylogénétique des isolats</b>	<b>75</b>
6-1- Profil ARDRA	<b>75</b>
6-2- Le Blast : <i>H. perrauderianum</i>	<b>76</b>

## **Chapitre Quatre : Discussion et conclusion**

<b>Discussion et conclusion</b>	<b>77</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>79</b>
<b>Annexes</b>	<b>94</b>

## Introduction

L'azote est un facteur limitant majeur de la production agricole, alors que l'atmosphère terrestre est constituée à 80% d'azote. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) est une molécule très stable, que seuls les organismes appartenant au groupe des procaryotes (mais aucun organisme eucaryote) sont capables de le réduire sous une forme combinée assimilable. Les systèmes fixateurs les plus efficaces sont des symbioses qui réalisent un couplage entre la fixation d'azote et la photosynthèse.

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux.

La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, renferme trois sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* ; la majorité des espèces nodulées se rencontrent dans la sous famille des *Papilionoideae*. Le genre *Hedysarum* est un parmi les plus répandu dans le monde ; plusieurs espèces sont rencontrées en Algérie dont certaines sont endémiques (*Hedysarum naudinianum*, *Hedysarum perrauderianum*).

Les rhizobia, deuxième élément de l'association, sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités, au sein desquels ils réduisent l'azote de l'air. Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte. Cette symbiose *Rhizobium*-Légumineuse (actuellement dénommée Symbiose Légumineuse-BNL selon de Ladjudie, 2006) fournit chaque année, à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais, et joue donc un rôle écologique et économique considérable.

En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique. Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Ralstonia* ainsi

que certaines  $\gamma$ -protéobactéries (Benhizia et col. 2004), forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes des légumineuses.

L'objectif de notre étude est l'identification des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère *Hedysarum perrauderianum*.

Ce travail consiste en une caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries isolées des nodules racinaires de cette légumineuse fourragère.

## **I- La fixation de l'azote**

### **1-1- L'azote**

La vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  et du méthane  $\text{CH}_4$  à travers les processus de la respiration et de la fermentation reliés au recyclage du carbone. La vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N). Le gaz diazote est le premier en importance dans l'atmosphère terrestre (78%) (Newton, 1998).

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les nucléotides, les acides nucléiques et la chlorophylle (Epstein, 1972).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Stenvenson, 1986). Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (Lamaze et col., 1990).

Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Hageman, 1984).

### **1-2- Les principales sources d'azote**

#### **1-2-1 Le sol**

La première source d'azote utilisée par les plantes est l'azote du sol. En absence de tout apport d'engrais les plantes non fixatrices d'azote utilisent l'azote du sol durant leur cycle physiologique. Même les plantes fixatrices d'azote atmosphérique utilisent d'abord l'azote de la semence et du sol durant la première phase de la croissance. L'azote du sol est essentiellement sous forme organique. C'est par minéralisation que la matière organique du sol libère l'azote utilisable par les plantes.

L'azote inorganique ou azote minéral, principalement  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ , disponible pour la plante, constitue une petite fraction de l'azote total du sol (2-5%). L'azote minéral se trouve essentiellement dans la solution du sol et une petite quantité de  $\text{NH}_4^+$  adsorbée aux sites d'échange cationique sur les colloïdes du sol. Très peu de N est libéré des minéraux du sol (Newton, 1998).

### **1-2-2- Les amendements organiques**

Les résidus organiques laissés sur le sol après les récoltes constituent une litière temporaire. Quand ils sont enfouis en début de saison, ces résidus enrichissent la matière organique du sol. Les amendements organiques incorporés aux sols sous forme de fumier ou de compost viennent également enrichir et constituent une source d'azote et d'humus.

### **1-2-3- Les engrais minéraux**

L'azote du sol et les amendements organiques ne suffisent pas pour atteindre des rendements optimaux. Des engrais minéraux azotés sont utilisés comme complément d'azote pour augmenter les rendements et intensifier la production végétale. Dans l'agriculture conventionnelle, la plus grande partie de N minéral vient des engrais dissous avec une contribution de minéralisation de l'azote organique dans sol (Newton, 1998).

### **1-2-4- L'atmosphère**

Une partie de N retourne à la terre quand de l'azote sous forme de gaz ( $\text{NO}_2$  ou  $\text{NH}_3$  de l'industrie, les automobiles ou des unités d'élevage confinées) réagit avec les pluies.

### **1-2-5- La fixation symbiotique**

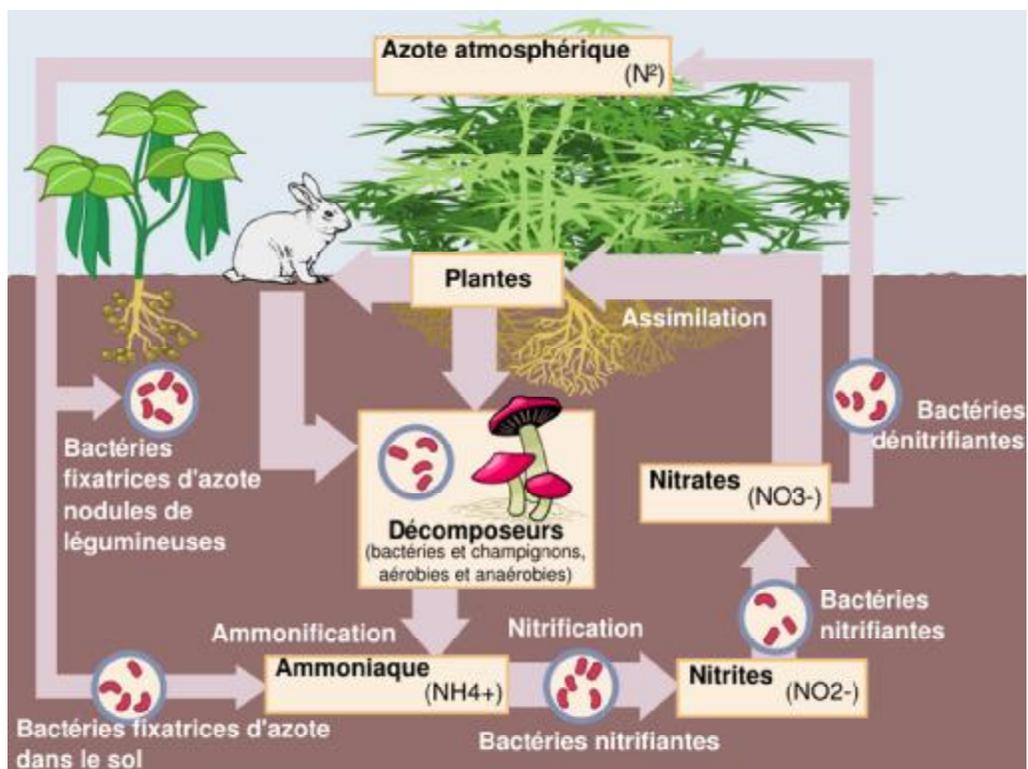
La plus grande partie de l'azote de la biosphère (79%) se trouve dans l'atmosphère (Haynes, 1986; Foth, 1990). La fixation d'azote est le principal moyen naturel par lequel l'azote atmosphérique est ajouté au sol.

Mais seul un nombre réduit de genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphère. Par la symbiose entre les bactéries réductrices de l'azote atmosphérique, une grande partie des légumineuses utilisent principalement l'azote provenant de l'atmosphère. A l'échelle mondiale, la fixation biologique annuelle de N est estimée au double de l'utilisation mondiale des engrais. Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible. (Newton, 1998).

### 1-2-6- Fixation industrielle de l'azote

La production agricole et la sécurité alimentaire mondiale seraient en danger sans engrais (fixation industrielle de l'azote atmosphérique). L'azote apporté comme élément nutritif pour la plante est loin de la source la plus importante.

Les réactions du processus Haber-Bosch :  $H_2 + N_2 \rightarrow NH_3$  (gaz ammoniac) : le gaz ammoniac peut être utilisé soit directement (ammoniac anhydre) soit pour la fabrication des autres engrais azotés, ex.  $NH_4NO_3$ ,  $KNO_3$ , etc...



**Figure 1. Cycle de l'azote**

La grande majorité de l'azote se trouve sous forme de diazote ( $N_2$ ) non-assimilable par les plantes. La fixation biologique de l'azote par les bactéries en symbiose avec les plantes actinorhiziennes et les Légumineuses permet d'accéder à une source quasi-illimitée d'azote. ( B. PERET, 2007)

L'azote minéral dans le sol est donc sous forme de  $\text{NO}_3^-$  et de  $\text{NH}_4^+$ . Le  $\text{NH}_4^+$ , une fois absorbé par les plantes, est rapidement incorporé dans des acides aminés en raison de sa toxicité. Le  $\text{NO}_3^-$  nécessite la présence d'un transporteur membranaire au niveau des poils absorbants pour son absorption (dont il induit la fabrication). Il est alors soit stocké dans les vacuoles des cellules (et intervient alors dans le contrôle de la pression osmotique), soit transporté vers les parties aériennes par la sève brute (où l'on ne trouve pas d'ammonium). C'est la forme d'azote qui est majoritairement absorbée (Newton, 1998).

## II- Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement.

C'est le processus de réduction enzymatique de l'azote atmosphérique en azote ammoniacal, ou ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) ; cette forme d'azote combiné représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (Hopkins, 2003)

Ce processus est comparable à celui de la photosynthèse qui permet de produire des substances glucidiques à partir du gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) de l'atmosphère. Alors que la photosynthèse est le fait de tous les végétaux (sauf les végétaux saprophytes), la fixation de l'azote n'est réalisée que par certaines espèces de bactéries et d'algues cyanophycées.

Les bactéries de la famille des Rhizobiacées en général, et celles du genre *Rhizobium* peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie se différencie en bactéroïde, capable de fixer l'azote atmosphérique.

Par ces nodules, la plante-hôte (la légumineuse) offre un microhabitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse. En retour, la bactérie fixe l'azote atmosphérique ( $\text{N}_2$ ) et le fournit à la plante hôte sous forme assimilable  $\text{NH}_3$  (Dommergues et col., 1999).

L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires.

Jusqu'à une date récente, on admettait que les champignons mycorrhiziens pouvaient fixer le N<sub>2</sub>. On sait maintenant que la propriété de fixer N<sub>2</sub> est strictement limitée aux procaryotes (Bowen, 1973 ; Postgate., 1974) et n'a jamais été démontrée chez les champignons filamenteux. La fixation du N<sub>2</sub> (mesurée par la réduction de l'acétylène-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en éthylène-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) par une racine mycorrhizée ne devrait pas être imputée au champignon lui-même mais aux bactéries associées de la mycorrhizosphère. (Silvester W.B, Bennett. K.J 1973).

## 2-1- Les fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophe (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*).

Ces associations vont de la simple multiplication bactérienne à la surface de la racine à la colonisation des espaces intercellulaires, caractéristiques des bactéries endophytes. C'est le cas par exemple de la colonisation par *Azospirillum* des espaces intercellulaires de l'épiderme et du cortex racinaire du maïs et du sorgho (Dobereiner et col, 1995 ; Kennedy et col ,1997)

D'autres associations avec les fixateurs libres ont évolué en de véritables symbioses, mais sans organogenèse particulière au niveau de la plante. C'est le cas de la bactérie endophyte *Azoarcus* qui peut pénétrer dans les cellules de la graminée tropicale *Leptochloa fusea* (Reinhold-Hurek et Hurek 1997). De plus, les cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*), bactéries photosynthétiques autotrophes, sont associées à des fougères comme les *Azolla* ou les *Cycas*, formant de véritables symbioses obligatoires permettant à la plante d'assimiler l'azote fixé par les bactéries qui demeurent, cependant, toujours à l'extérieur des cellules de la plante- hôte (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998).

## 2-2- Les fixateurs symbiotiques

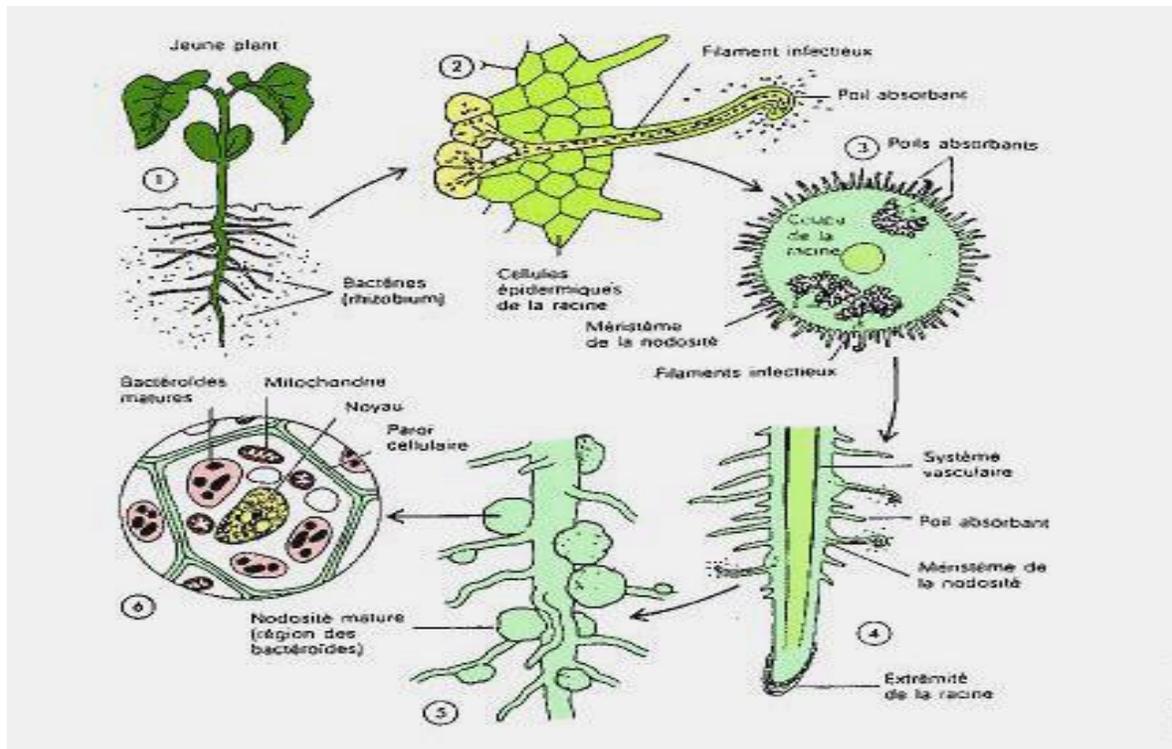
La réduction de l'azote étant coûteuse en énergie, les systèmes les plus efficaces sont ceux qui permettent un couplage entre la photosynthèse et la fixation biologique de l'azote. Dans ces associations fixatrices d'azote, le microorganisme induit l'apparition de structures

différenciées, appelées nodules, chez le partenaire végétal, et lui fournit une grande partie de l'azote nécessaire à sa croissance. C'est le cas des systèmes associant des plantes de la famille des légumineuses et certaine bactérie Gram négatif, communément et collectivement appelées les rhizobia ou bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) (Moulin, 2002), et d'Actinomycètes du genre *Frankia* (bactérie Gram positif, filamenteuses et sporulantes) qui nodulent des plantes ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones, dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica* (Benson et Silvester, 1999). En outre, plusieurs espèces de *Parasponia* de la famille des Ulmaceae, peuvent également développer des nodules fixateurs d'azote avec certaines bactéries (Trinick et Hadobas, 1989 : Young et Johnston, 1989: Davey et al, 1993).

### **2-3- Physiologie de la symbiose**

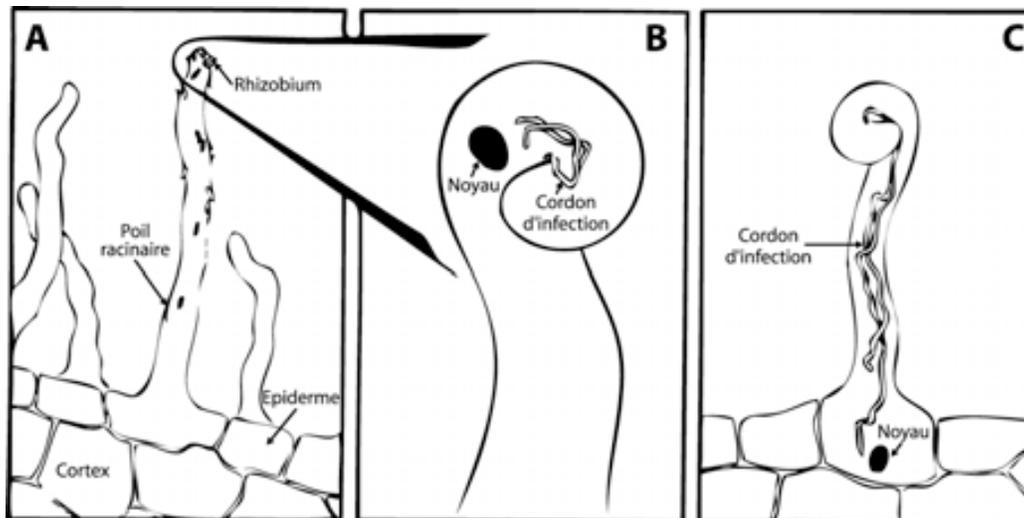
La symbiose commence par l'attachement des bactéries (ou microsymbiont) aux poils absorbants des racines de la plante légumineuse en germination ; on pense que cette liaison initiale dépend d'une reconnaissance cellulaire entre des molécules de surface comme des glycoprotéines des bactéries et de la plante.

La bactérie est encapsulée dans une poche de la paroi cellulaire et portée dans les profondeurs de la racine par la formation d'un filament infectieux constitué principalement de cellulose. Les cellules corticales sur l'extérieur de la racine se différencient pour former un méristème, un tissu végétal formé de cellules indifférenciées, siège de divisions rapides et nombreux, situé dans les régions de croissance de la plante, qui grandit et fait saillie pour former une nodosité. Les filaments infectieux qui prolifèrent libèrent alors les bactéries dans le cytoplasme de cellules hôtes, après avoir été recouvertes d'une membrane spéciale synthétisée par l'hôte, connues sous le nom de bactéroïdes. Au sein de cet environnement extrêmement protecteur, les bactéries se différencient finalement pour atteindre un stade de fixation de l'azote, en déréprimant les gènes de la nitrogénase et des cytochromes spécifiques des bactéroïdes. (Pelmont, 1995).



**Figure 2** : Représentation schématique de la symbiose

L'établissement de la symbiose plante-microorganisme est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire, entre la bactérie et la plante-hôte (Long, 1996). La plante produit des composés (des flavonoïdes) qui attirent et activent les bactéries fixatrices d'azote autour des racines. Par un phénomène de reconnaissance, les bactéries s'agglutinent sur les poils absorbants et forment un cordon infectieux qui va pénétrer dans la racine. Sous l'action des bactéries, le poil absorbant se déforme selon une allure bien particulière. Arrivées au niveau des vaisseaux conducteurs les bactéries provoquent le développement d'une tumeur qui formera la nodosité. (Hynes et O'Connell, 1990). Certaines cellules de la racine vont se différencier et retourner à l'état de méristème. Elles ne vont alors que se diviser. Rapidement la nodosité se forme. C'est logiquement à l'extrémité de cette nodosité que l'on trouve les cellules méristématiques. Plus à l'intérieur se trouve une zone riche en bactéries. C'est à cet endroit qu'elles s'enkystent, augmentent de volume et changent de forme. On parle alors de bactéroïdes. Bien qu'à l'intérieur des cellules végétales, ces bactéroïdes sont entourés par une membrane pér bactéroïdienne qui les isole, en partie, du cytoplasme cellulaire. A ce stade, ces micro-organismes fabriquent la nitrogénase, l'enzyme responsable de la fixation du diazote. (Hrishi, 1992)



**Figure 3 :** Infection intracellulaire chez les Légumineuses.

La bactérie colonise la rhizosphère et entre en contact avec le poil racinaire (A). Les facteurs Nod induisent la courbure du poil racinaire ce qui permet la création d'une zone confinée pour la bactérie qui initie l'infection (B). La mise en place du cordon d'infection suit le déplacement du noyau vers la base du poil (C). D'après Perret et col, 2000.

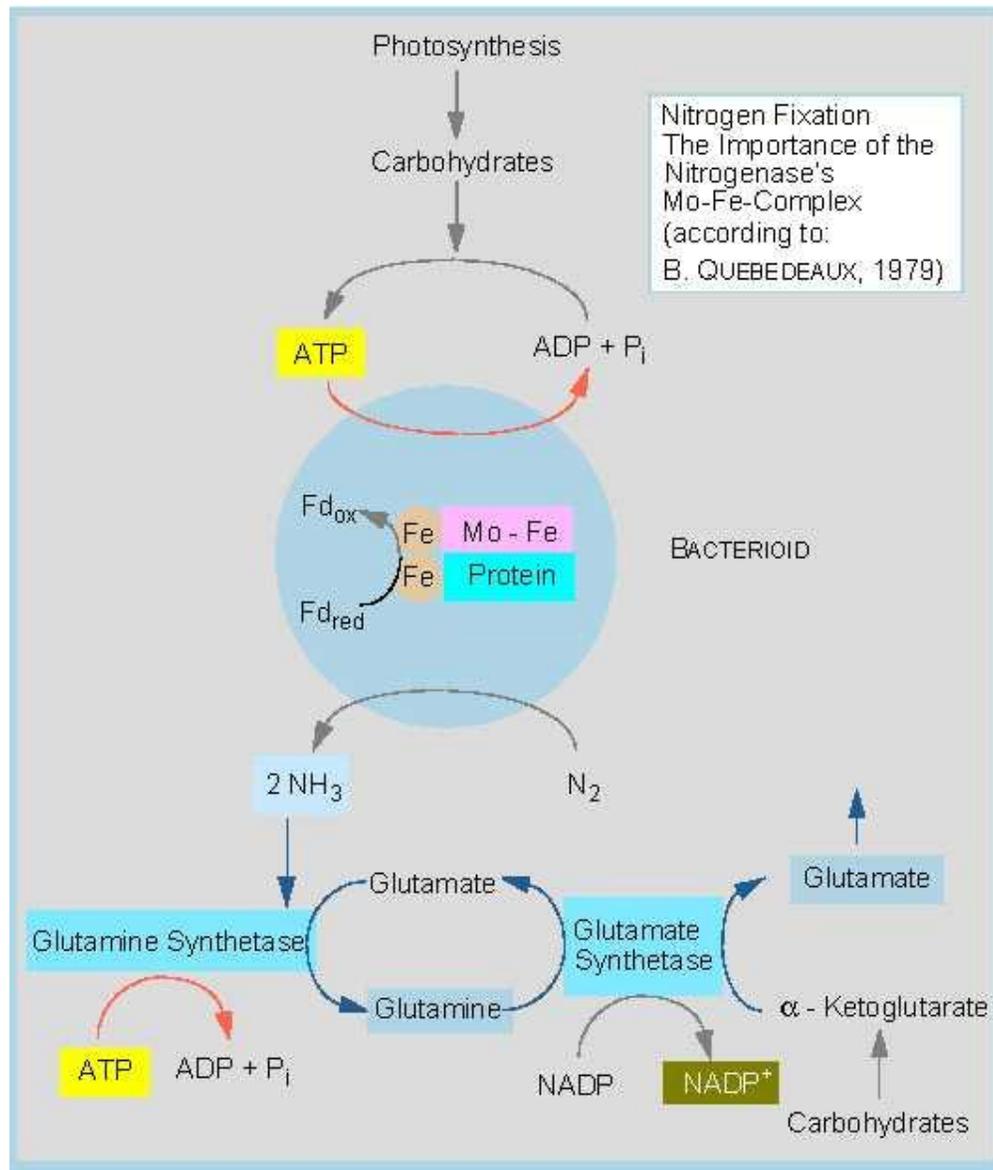
C'est au centre de la nodosité que les bactéroïdes vont fixer le diazote. Pour cela, ils synthétisent en collaboration avec la plante, une protéine, la leghémoglobine, dont le rôle est de fixer l'oxygène pour protéger la nitrogénase (les bactéroïdes produisent l'hème tandis que la plante produit la globine). Cette protéine peut représenter plus de 40 % des protéines d'une nodosité. Ce pigment présente la particularité de ne pas fixer entièrement l'oxygène ce qui permet aux bactéries de continuer la respiration sans gêner la fixation d'azote.

## 2-4- Biochimie de la Fixation

### 2-4-1 -La nitrogénase

Dans l'industrie, la fixation de l'azote est typiquement effectuée en présence de fer agissant comme catalyseur, à environ 500°C à une pression de 300 atm. Il n'est pas surprenant, par conséquent, que le processus biologique de fixation de l'azote nécessite un enzyme complexe : c'est le complexe nitrogénase.

Le complexe nitrogénase, qui réalise cette transformation fondamentale, est constitué de deux protéines :



**Figure 4 :** Cycle de la Nitrogénase

1) Une dinitrogénase réductase : (la nitrogénase I) qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du Fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003)

2) Une nitrogénase : appelée aussi molybdoprotéine (MoFe protéine) c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramérique)  $\alpha_2 \beta_2$  de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4 Fe - 4 S) reliés entre eux deux par deux, ce

tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise ces électrons pour réduire  $N_2$  en  $NH_3$ . (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003)

Le transfert des électrons de la réductase à la nitrogénase est couplé à l'hydrolyse de l'ATP par réduction.

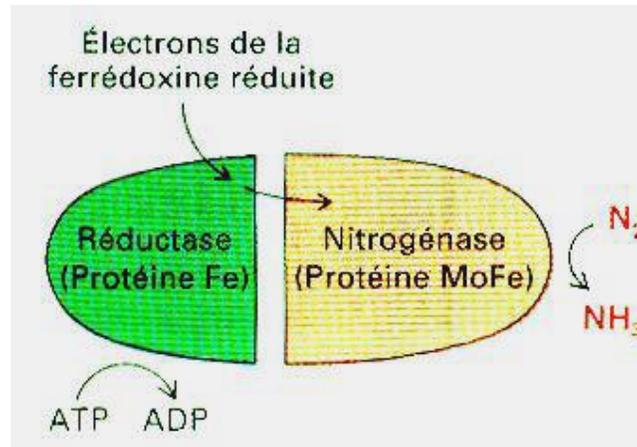


Figure 5 : Représentation du complexe nitrogénase.

#### 2-4-2- La leghémoglobine

Le complexe nitrogénase est extrêmement sensible à l'inactivation par  $O_2$ . La leghémoglobine abaisse considérablement la concentration d' $O_2$  libre dans les nodules de la plante en le fixant ; l'oxygène fixé par la leghémoglobine n'est plus libre dans les nodules et ne peut donc plus interagir avec la nitrogénase pour l'inhiber.

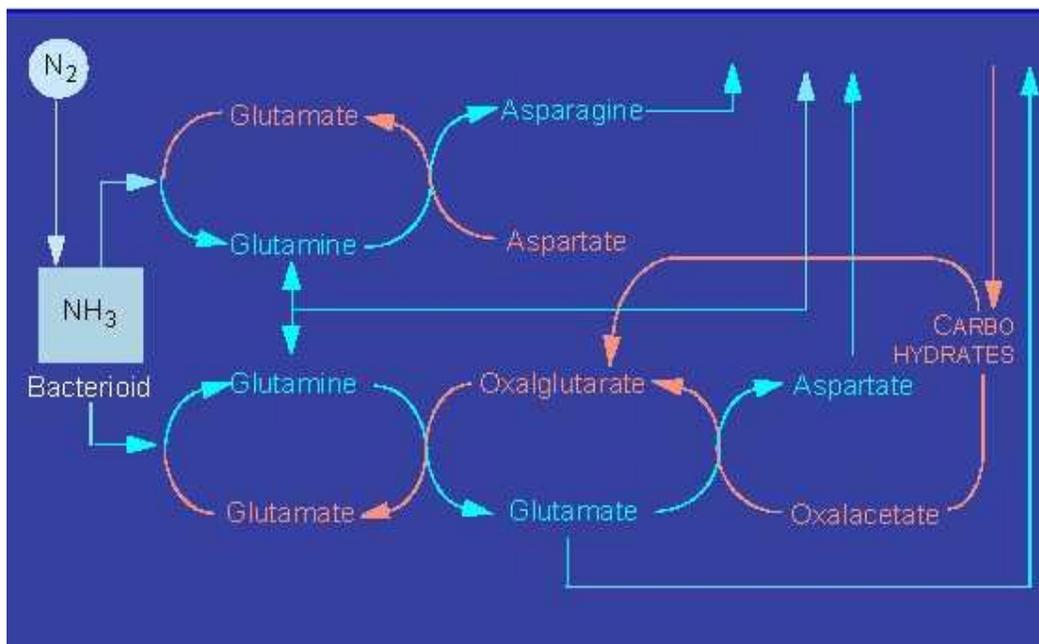
Le site actif contenant le molybdène du complexe nitrogénase est spécifiquement conçu pour réduire l'azote moléculaire ( $N_2$ ), mais peut être aisément empoisonné par l'oxygène moléculaire libre ( $O_2$  libre).

Néanmoins, les bactéroïdes ont également besoin, comme la plante hôte, d'un ravitaillement régulier en oxygène pour leur métabolisme. La plante hôte, répond à ces exigences en synthétisant de grandes quantités de leghémoglobine, qui va porter l'oxygène libre à un niveau suffisamment faible pour ne pas endommager la nitrogénase.

Bien que la plante synthétise le polypeptide de la leghémoglobine, le cofacteur constitué par l'hème est fourni par les bactéries elles-mêmes (la leghémoglobine est constituée de deux parties : un polypeptide et un hème).

### 2-4-3-Assimilation de l'ammonium

Quel que soit l'origine du  $\text{NH}_4^+$  celui-ci va être pris en charge, à l'intérieur de la plante, par un système enzymatique, GS-GOGAT. Sous ce nom barbare se cache deux enzymes travaillant à la chaîne. La première (GS pour Glutamine Synthase) rajoute un  $\text{NH}_3$  à une molécule de glutamate. La glutamine ainsi formée, transfère un de ses groupements azotés à un acide cétooglutarate, grâce à la seconde enzyme GOGAT (pour Glutamine OxoGlutamate Amino Transférase). On obtient alors deux molécules de glutamate, les réactions peuvent alors s'enchaîner en boucle. (Brewin et col.,1992)

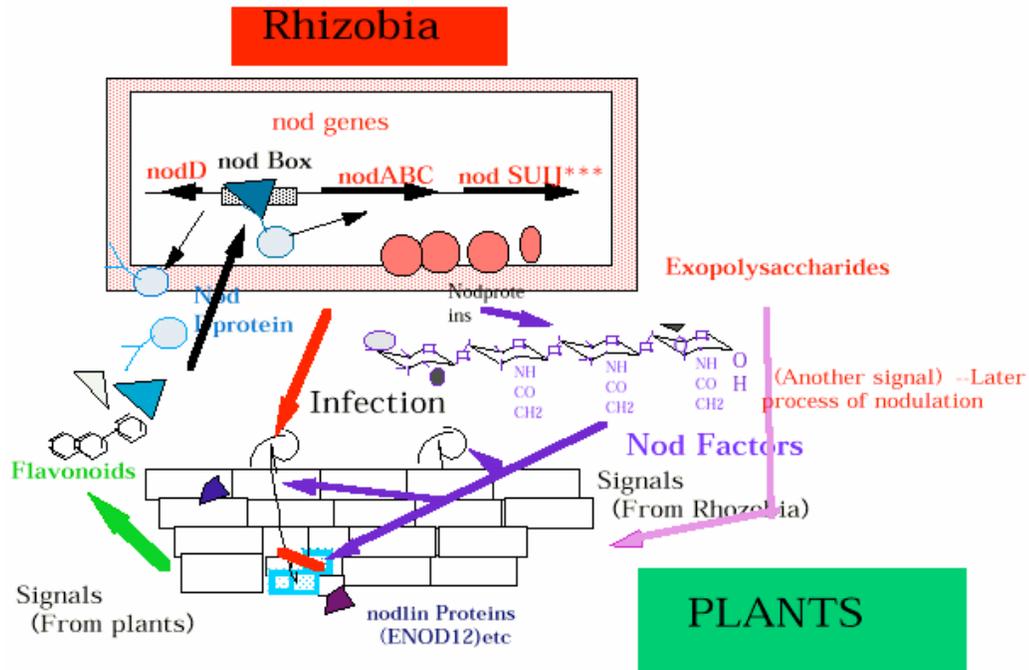


Le glutamate sert également de matrice aux différents acides aminés. Grâce à une transaminase, il transfère un de ses groupement azoté à une autre molécule pour former un acide aminé et un cétoacide. Les plantes symbiotiques fixent ainsi de 300 à 400 kg de diazote par hectare et par an.

#### 2-4-4-Spécificité de la symbiose

La symbiose légumineuses – *Rhizobium* est très spécifique, un *Rhizobium* donné n'est capable d'effectuer une symbiose fixatrice d'azote que si l'autre partenaire appartient au son spectre d'hôte. Et le contraire est juste. Les amplitudes des spectres des légumineuses et des rhizobia sont très variables. En effet, on retrouve des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel que *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et col, 1988), alors que cette même légumineuse possède d'autres partenaires bactériens (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga*). Boivin et col 1997. D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôte modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti* qui s'associe avec les espèces des genres *Medicago*, *Meliloti* et *Trigonella* (De lajudie et col 1994). Par contre, d'autres espèces nécessitent des dispositions particulières à la symbiose, comme le pois afghan (Galga) (Firmin et col 1993, Terefework et col 1998). En outre, les études de spectre d'hôte ont révélé qu'en proportion peu de rhizobia ne s'associaient qu'avec une seule espèce de légumineuse ; la plupart des rhizobia pouvant établir une symbiose avec différents partenaires végétaux (Zahran 2001, Perret et col 2000 ; Tan et col 1999).

## 2-5- Génétique de la Fixation de l'azote



5

Figure 6 : génétique de la fixation (site Internet gratuit)

Pour entamer cette symbiose, on décrit les gènes impliqués dans la fixation symbiotique de l'azote.

-gène *sym* : gènes nécessaires à la formation de nodosités symbiotiques fonctionnelles fixant l'azote.

-gène *nod* : gènes nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités, d'autres gènes sont également impliqués dans la formation de nodosités : les gènes *nol* et *noe*.

-gène *fix* : gènes nécessaires aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer l'azote.

-gène *nif* : gènes codant pour les trois sous-unités hautement conservées de la nitrogénase (réduisant l'azote moléculaire en ammoniac), ainsi que pour des protéines auxiliaires nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase.

Ces gènes symbiotiques sont induit seulement lorsque les bactéroïdes peuvent fixer l'azote, c'est-à-dire quand la bactérie peut nodulé la plante.

### 2-5-1-Facteurs nod :

Les facteurs *nod* sont des lipochito-oligosaccharides (LCO), formés d'une suite de 4 ou 5 unités de N-acétyl-D-glucosamine réunies par des liaisons  $\beta$  (1 --> 4) (structure de la chitine), et comprenant une chaîne lipidique (acide gras).(Spaink et col,1992) .selon le *Rhizobium*, le squelette de base est décoré par des groupement chimiques varies ( fructose, arabinose, carbamate, méthyle, acétyle,...), présent sur les glucosamines situés aux 2 extrémités (Long.1996 , Perret et col ,2000).

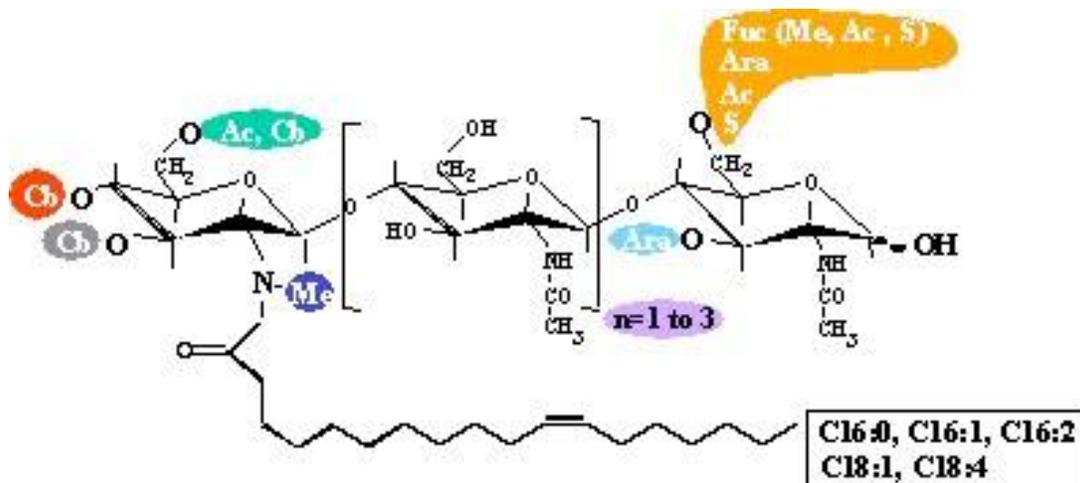


Figure 7 : Structure des facteurs Nod.

Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques substitutions observées chez les différentes espèces de rhizobia indiquées en couleur. Les variations les plus courantes de la chaîne d'acides gras sont également représentées. Ac, acétyl ; Ara, arabinosyl ; Cb, carbonyl ; Fuc, fucosyl ; Me, méthyl ; S, sulfuryl. D'après Cullimore et col, 2001

Les facteurs *nod* interviennent dans le phénomène de nodulation. L'interaction commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les diazotrophes et un échange de molécules signal. Les bactéries reconnaissent des flavonoïdes et d'autres molécules sécrétées par la plante hôte.

Parallèlement dans les bactéries, on trouve des gènes spécifiques de la nodulation, appelés opéron *nod*. Ces opérons regroupent en fait trois catégories de gènes :

- Les gènes régulateurs (*nod D*) : Ils codent pour la synthèse des protéines constituant le facteur de transcription. Chez les diazotrophes, ce gène s'exprime de manière constitutive. Les facteurs de transcription sont donc continuellement synthétisés, que la bactérie soit en symbiose ou non ( Hrish, 1992 ; Dénarié et col., 1996).
- Les gènes communs (*nod A, B, C*) : ils sont synthétisés par tous les diazotrophes sans exception, et codent pour des enzymes, catalysant la synthèse du facteur de nodulation, ou facteur nod (synthèse du squelette de base des facteurs Nod)
- Les gènes spécifiques (*nod H*) : on rencontre différents gènes spécifiques chez différents genres de bactéries (gènes *nod, nol* ou *noe*), présents chez certaines espèces et non chez d'autres, sont classés en fonction de leur rôle dans la synthèse ; type de substitution ajouté ou mode de sécrétion des facteurs Nod. leur rôle étant de coder pour des enzymes catalysant la synthèse du facteur de nodulation, ou facteur nod (modification du squelette de la molécule), on peut citer : les gènes *nodZ* et *nolK* (fucosylation) ; *noeC* (arabinosylation) ; *nodH* et *noeE* (sulfatation) ; *nodL*, *nodX* et *nolL* (acétylation) ; *nodS* et *noel* (méthylation) ; *nodU* et *nolO* ( carbamoylation). . (Hrish, 1992 ; Dénarié et col.,1996 ; Long 1996).

**Tableau N°1-** Les différents gènes de la nodulation (*nod*, *f*, *noe*) existants (cité dans un site Internet gratuit) : sur ce tableau on peut voir les fonctions des protéines que codent les différents gènes *nod*. La colonne « strains » désigne les différents types de *Rhizobium* possédant les différents gènes *nod*.

Genes	Functions or homologies	Strains <sup>a</sup>
Common <i>nod</i> -genes		
<i>nodM</i>	D-glucosamine synthase	Rm, Rlv, Rlt
<i>nodA</i>	Acyltransferase	All
<i>nodB</i>	Deacetylase	All
<i>nodC</i>	Chitin synthase	All
Genes involved in modifying the non-reducing terminus		
<i>nodE</i>	β-Ketoacylsynthase	Rm, Rlv, Rlt
<i>nodF</i>	Acyl carrier protein	Rm, Rlv, Rlt
<i>nodS</i>	Methyltransferase	RN, Ac, Bj, Rf, Rt
<i>nodL</i>	Acetyltransferase	Rm, Rlv, Rlt
<i>nodU</i>	Carbamoyltransferase	RN, Ac, Bj, Rf, Rt
<i>nodO</i>	Carbamoyltransferase	RN, Bj
Genes involved in modifying the reducing terminus		
<i>nodP</i>	ATP-sulfurylase	Rm, Rt, RN
<i>nodQ</i>	ATP-sulfurylase and APS kinase	Rm, Rt, RN
<i>nodH</i>	Sulfotransferase	Rm, Rt
<i>nodX</i>	Acetyltransferase	RlvTOM
<i>nodL</i>	Acetyltransferase	RN, Rl
<i>noeK</i>	Phosphomannomutase	RN
<i>noeJ</i>	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	RN
<i>noeL</i>	Dehydratase	RN
<i>nodK</i>	Sugar epimerase	Ac, RN
<i>nodZ</i>	Fucosyltransferase	Bj, Ac, RN
<i>noeE</i>	Sulfotransferase	RN
<i>noeI</i>	Methyltransferase	RN
Genes encoding transporters		
<i>nodI</i>	ATP-binding protein for transmembrane transport	All
<i>nodJ</i>	Integral membrane protein	All
<i>nodT</i>	Outer membrane protein transport?	Rlv, Rlt
<i>nodFGHI</i>	Transport?	Rm
<i>nodO</i>	Secreted pore-forming protein	Rlv
Genes encoding regulators		
<i>nodD</i>	LysR regulator protein family	All
<i>nodR</i>	DNA binding-protein, repressor	RN, Rm
<i>ryrM</i>	LysR regulator protein family	RN, Rm

<sup>a</sup> Rm = *Rhizobium meliloti*, Rlv = *R. leguminosarum* bv. *viciae*, RlvTOM = *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM, Rlt = *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, RN = NGR234, Ac = *Azorhizobium caulinodans*, Bj = *Bradyrhizobium japonicum*, Rf = *R. fredii*, Rt = *R. tropici*, Rl = *R. loti*.

Les flavonoïdes pénètrent dans les bactéries et réagissent avec des facteurs de transcription synthétisés par les gènes régulateurs de l'opéron *nod*. Ceci déclenche un rétrocontrôle positif, entraînant l'expression des gènes communs et spécifiques. Les facteurs *Onod* sont alors synthétisés par les bactéries. Ceci déclenche le programme de nodulation chez la plante hôte.

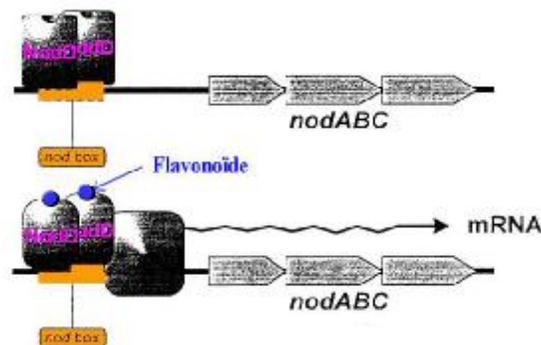
Les facteurs Nod sont synthétisés grâce aux enzymes des gènes communs, puis modifiés par les enzymes des gènes spécifiques, qui introduisent des fonctions ou des molécules sur le squelette oligosaccharidique. Ainsi, à partir d'un même squelette, chaque diazotrophe va le modifier pour se l'approprier et le rendre spécifique.

Plusieurs expériences ont été menées afin de démontrer la spécificité des facteurs *nod*.

- Introduction d'une mutation dans les gènes spécifiques : la bactérie synthétise les facteurs *nod*, mais ceux-ci ne sont plus spécialisés. La bactérie ne peut dans ce cas pas vivre en symbiose avec sa plante.
- Parfois, l'introduction d'une mutation dans les gènes spécifique entraîne l'expression d'un facteur nod différent. Dans ce cas, la bactérie qui le synthétise ne vit plus en symbiose avec son hôte favori, mais avec une autre plante reconnaissant ce nouveau facteur de nodulation. (Hrish, 1992 ; Dénarié et col 1996 ; Long 1996)

### 2-5-2-Régulation de gène *NodD* :

Les flavonoïdes compatibles activent la protéine Nod D, qui est un senseur de l'environnement et un activateur des gènes *nod*.



**Figure 8** : Régulation du facteur NodD

Les protéines NodD synthétisées vont se lier à la nod-box, lieu de régulation des gènes *nodA*, *B* et *C*.

Avec la coopération des flavonoïdes, les protéines NodD vont pouvoir promouvoir l'expression des gènes *nodA*, *B* et *C* : les protéines NodD ont un site de liaison pour les flavonoïdes ; une fois les flavonoïdes liés aux protéines NodD, ces dernières, liées à la nod-

box, sont capable d'induire la transcription de ces gènes, ces derniers sont transcrits, et les protéines NodA, B et C sont traduites.

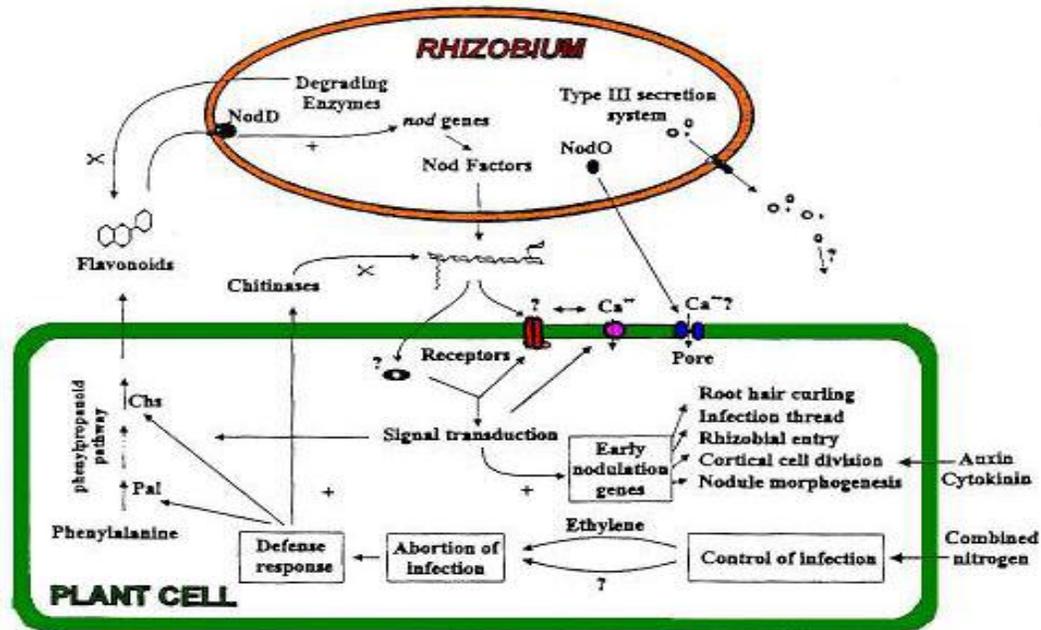


Figure 9 : Présentation moléculaire de la symbiose

La plante sécrète naturellement les flavonoïdes, pour attirer les bactéries ou champignons symbiotiques entre autre. NodD est capable de reconnaître la nod box, motif en amont des opérons des gènes *nod*, mais il lui faut une flavonoïde compatible pour pouvoir induire la transcription des gènes *nod*. Les flavonoïdes interagissent donc avec le régulateur de transcription NodD, et activent par l'intermédiaire de NodD, la transcription de gène *nod*. Les facteurs Nod, oligomère de chitine auquel est associée une chaîne d'acide gras, sont donc synthétisés ; certaines vont s'incruster dans la membrane de la cellule végétale (NodO, protéine formant des pores de sécrétion), d'autres vont entrer dans le cytoplasme de celle-ci pour induire la transduction de signaux. Les facteurs Nod sont perçus par la plante au niveau de la rhizosphère (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

Ces signaux vont agir sur des pompes calciques de la membrane, activer la nodulation (courbure du poil, filament infectieux, entrée du *Rhizobium*, division des cellules corticales, morphogenèse des nodules) ou encore réguler la production de flavonoïdes. Les hormones de croissance végétale (auxines, cytokinine) vont également avoir un rôle dans la régulation de la

nodulation. La différenciation du nodule dépend de la concentration des facteurs Nod : de faibles concentration de facteur Nod donne une déformation partielle du nodule ; une forte concentration de facteur Nod donne une crosse de verger et invagination. (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

### III- Les légumineuses

#### 3-1-Généralités

Une des plus importantes familles parmi les dicotylédones... C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales, comprenant des plantes herbacées, des arbres, des arbustes ou des lianes, à feuilles habituellement composées, souvent trifoliolées, rarement simples, généralement avec des stipules. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles. Les fleurs, pentamères avec 10 étamines, ou parfois plus, caractéristiques, ressemblent souvent à des papillons. Fruit en gousse uniloculaire s'ouvrant en deux valves séparées et contenant de nombreuses graines. (Fernand Wathan, 1967).

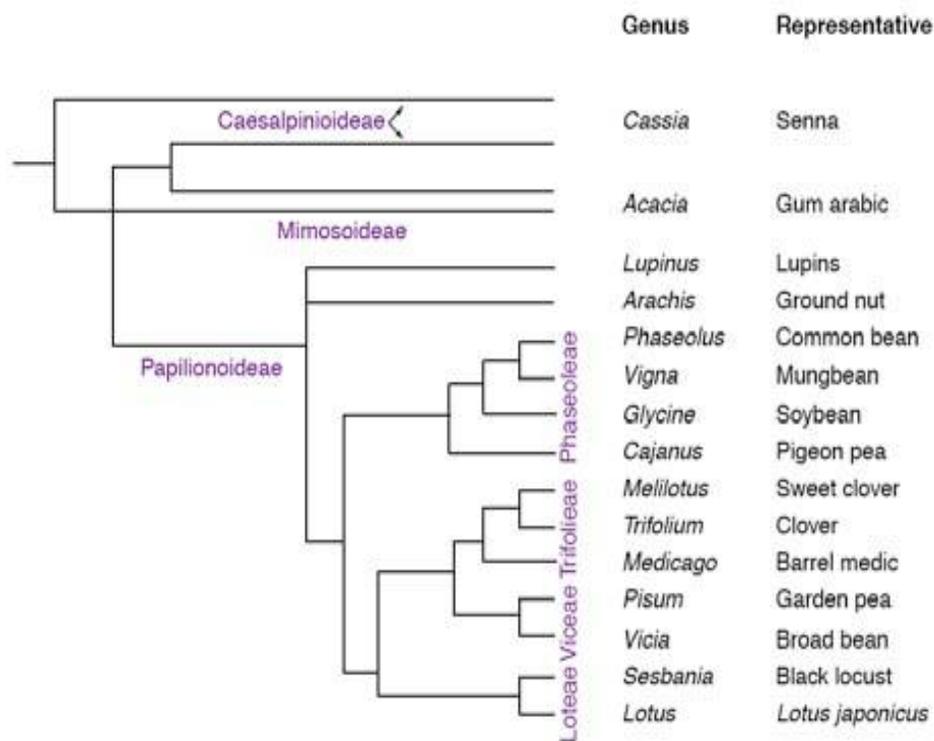
#### 3-2-Classification

Les légumineuses constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes, constituent un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifié (Allen et Allen, 1981 ; Broughton, 1984). Cette famille possède 674 genres et plus de 18000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les *Poaceae*, en terme de diversité (Polhill et col., 1981). Elle est subdivisée en trois sous familles d'importance inégale:

- **Les *Mimosoideae*** : ont de très nombreuses petites fleurs en grappes serrées à nombreuses étamines saillantes en dehors des petits pétales ; les fleurs sont symétriques. Sont en majorité des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (*Glycine, Acacia,...*) (Maxted et Bennett, 2001a).

- **Les *Caesalpinioideae*** : ont habituellement des fleurs comme des papillons et à étamines unies. comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. 23 % seulement des espèces parmi celles examinées, sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces nodulées se retrouvent majoritairement dans les tribus des *Caesalpinieae* et *Cassieae* ; les tribus *Cercideae* et *Amherstieae* étant très peu nodulées (Maxted et Bennett, 2001a).

- **Les Papilionaceae ou Fabaceae** : représente la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12000 espèces, principalement herbes et petits arbustes distribués dans le monde entier, présentes en régions tempérées et tropicales, et inclut les légumineuses à grain bien connues telles que des haricots et des pois, (Ferchichi, 2006). Elles ont des fleurs en forme de papillon avec un pétale supérieur appelé étendard, deux pétales latéraux ou ailes et une carène formée par deux pétales inférieurs unis ; les sépales au nombre de 5 sont soudés en tube ; les 10 étamines sont habituellement incluses dans les pétales, unies par leurs filets en un tube qui entoure le pistil, ou avec une étamine. Parmi les 21 % d'espèces déjà examinées la grande majorité (97%) sont nodulées (pois, haricot, fève, lentille...) par les rhizobia (Maxted et Bennett, 2001b).



**Figure 10** : Phylogénie de quelques Légumineuses (Udvardi et col. 2005)

De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales (Graham et Vance, 2003) et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé (*Vigna unguiculata*), la lentille (*Lens esculenta*), la cacahuète (*Arachis hypogea*).

De ce fait, les Légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Patriarca et col, 2004 ;

Gage, 2004; Stacey et col, 2006). Notamment, l'émergence de deux plantes modèles : le lotier (*Lotus japonicus* ; Handberg et Stougaard, 1992 ; Udvardi et col, 2005) et la luzerne (*Medicago truncatula* ; Barker et col, 1990) a permis d'accélérer l'étude des mécanismes de mise en place de la symbiose.

### **3-3-Importance**

Cette famille a un grand intérêt pour l'homme qui utilise ses produits comme aliments, gommages, teintures, résines, huiles et nombreux bois de construction.

Aussi certaines espèces de cette famille peuvent contracter une symbiose avec une bactérie du genre *Rhizobium*, pour permettre un accès privilégié à l'azote de l'air. Par cette symbiose, les plantes de cette famille s'affranchissent de la teneur en azote dans le sol. Ainsi ces plantes sont capables de s'adapter à des sols très pauvres, et très dégradés (Il faut rappeler que trèfles et luzernes étaient employés sur les sols en jachère, dans la rotation des cultures). (Fernand Wathan, 1967).

Ces plantes ont donc un rôle améliorateur des sols, en plus d'un intérêt alimentaire. L'intérêt alimentaire est évident : cette famille représente le 2ème rang mondial (derrière les céréales). On peut citer le soja, les lentilles, les haricots et autres fèves...

Les variétés modernes de céréales à haut rendement (riz, sorgho, maïs) obtenues par sélection, sont exigeantes en éléments minéraux ; elles épuisent rapidement les sols tropicaux qui sont, bien souvent, très pauvres en azotes, en phosphore et en autre élément indispensables à la croissance des végétaux. Les quantités d'engrais azotés et phosphatés nécessaires à une amélioration des rendements sont donc élevées et le coût de ces fertilisants généralement importés des pays développés est incompatible avec les ressources financières de la grande majorité des paysans dans les pays tropicaux, pays en voie de développement pour la plus part. Par ailleurs, l'épuisement des sols tropicaux, provoqué par une intensification de l'agriculture et de l'élevage (résultant elle-même de l'explosion démographique), est souvent aggravé par l'érosion. Pour cela, une solution consiste à planter des végétaux fixateurs d'azote. Dans le premier cas, ces végétaux servent d'engrais vert, c'est-à-dire qu'ils sont enfouis dans le sol par labourage avant de mettre en culture les céréales. Pour le deuxième problème, celui de la protection des sols érodés, les végétaux pionniers utilisés pour fixer les dunes mobiles ou les

pententes dénudées, en retenant le sol par leur puissant réseau racinaire, ces végétaux peuvent appartenir à la famille des légumineuses. (Dommergues, et col 1985).

Quelques espèces ne sont pas dénuées de toxicité (comme par exemple les fèves de Calabar). L'indigo est fourni par une espèce de légumineuses (intérêt en teinture). On peut noter aussi l'usage comme insecticide : le roténone, insecticide naturel obtenu à partir de plantes du genre *Derris*, est le seul utilisable en agriculture biologique.

### **3-4- Le genre *Hedysarum***

Le genre *Hedysarum* appartient à la sous famille des *Papilionaceae* qui est très répandue dans le monde, pousse sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, et présente ainsi une grande diversité. Les espèces de ce genre sont rencontrées à l'état naturel dans tout le bassin méditerranéen, en particulier en Afrique du Nord.

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 col., 2004).

Le genre *Hedysarum* renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames (Baattout 1991 ; Boussad et col., 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).

En Algérie ce genre comporte dix espèces, parmi lesquelles sont des endémiques très localisées, comme *Hedysarum perrauderianum* qui ne se trouve qu'en Algérie (Quezel et Santa, 1962), l'exploitation de *Hedysarum*, en Algérie, en tant que plante de pâturage, est restée très limitée ; alors que dans les autres pays, tels que l'Italie et l'Espagne, des programmes d'amélioration conduisent à la sélection de certaines variétés (Bronciarelli et Monotti, 1976). Voici un tableau comportant les principales espèces qui se trouvent en Algérie avec leur classification.

**Tableau N° 2-** Les espèces du genre *Hedysarum*, rapportées par, Quezel et Santa.(1962) Greuter, W.(1989) localisées sur le site algérien.

Classification	Espèces
Embranchement: spermatophytes	<i>H. aculeolatum</i>
Super Classe : Angiospermes	<i>H. boutignyanum</i>
Classe : Dicotylédones	<i>H.boveanum</i>
Ordre : Rosales	<i>H.brigantiacum</i>
Famille : Fabacées	<i>H.carnosum</i>
Genre : <i>Hedysarum</i>	<i>H.coronarum</i>
	<i>H.flexuosum</i>
	<i>H. humile</i>
	<i>H.naudinianum</i>
	<i>H.palidum</i>
	<i>H.perrauderianum</i>
	<i>H. spinosissimum subs capitatum</i>

Les plantes de ce genre sont d'une manière générale constituée d'un appareil souterrain robuste portant de nombreuses nodosités fixatrices d'azote et d'un système aérien à rameaux dimorphes : tige principale « orthotrope » et ramification latérales « plagiotropes ».

Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum* L (sainfoin), se caractérise par : calice en cloche, à 5 dents égales ou inégale. 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.

Les espèces spontanées d'intérêt pastoral et fourrager, particulièrement les légumineuses, occupent une importante place dans la flore Algérienne. L'une des solutions indiquées est la valorisation de ces ressources phytogénétiques par leur introduction au niveau des milieux dégradés (jachères, parcours, steppe, etc.) et des terres réservées aux cultures fourragères. Dans ce sens et afin d'utiliser de façon adéquate ce matériel végétal adapté et réduire les risques d'échecs, plusieurs études de distribution des espèces de *Medicago* (Abdelguerfi et col., 1988a, 1988b ; Abdelguerfi et Guittonneau, (1989), de *Scorpiurus* (Bensalem et col., 1988, 1990), de *Hedysarum* (Abdelguerfi-Berrekia et col., 1988, 1991) et de *Trifolium* (Zatout et col., 1989 ; Zatout, 1995) ont été effectuées à travers l'Algérie.

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. Toutefois, elles sont menacées par une érosion génétique incontestable comme en témoigne l'extinction de *H. humile* et la raréfaction de *H. flexuosum* et *H. aculeolatum*. Cette érosion serait accélérée par l'exploitation des cultures, le surpâturage, la dégradation des sols ainsi que les changements climatiques. Par ailleurs, il semble que cette érosion soit particulièrement accentuée au Maroc et, à un degré moindre, en Tunisie. L'Algérie paraît moins affectée par cette érosion avec neuf espèces rencontrées parmi les dix ciblées. Cette richesse suggère que ce pays constitue un centre d'origine de diversité de ces taxons. Quoiqu'il en soit, la diversité de toutes les espèces prospectées est sans doute révélatrice d'un potentiel génétique important pour une meilleure exploitation agronomique, en particulier la valorisation des jachères, la protection des sols marneux et la production fourragère. Il est donc indispensable d'établir une base de données biologiques et écologiques afin d'élaborer une stratégie de conservation et de valorisation de la diversité existante. Les travaux en cours de réalisation visent l'utilisation des marqueurs moléculaires pour mieux apprécier la diversité génétique des populations et pour l'amélioration assistée de ces ressources (Abdelguerfi et Guittonneau, 1989).

## IV-Le Microsymbiont: les bactéries nodulant les Légumineuses (B.N.L.)

### 4-1-Classification des bactéries nodulant les Légumineuses (B.N.L.)

« Rhizobia » est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les légumineuses, et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Actuellement on préfère substituer au terme de « rhizobia », qui est un terme dérivé du nom du genre *Rhizobium*, le terme de BNL (Zakhia et col. 2004). En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique. Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia* (classe des  $\alpha$ -protéobactéries) et *Burkholderia* et *Ralstonia* (classe des  $\beta$ -protéobactéries) ainsi que certaines  $\gamma$ -protéobactéries (Benhizia et col. 2004), forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuse (Zakhia et de Lajudie 2001; Moulin et col. 2001; Chen et col. 2001; Ngom et col. 2004).

Durant les cinq dernières années, on associe au groupe des rhizobia un autre groupe de non rhizobia, symbionts capables de noduler les racines des légumineuses et répertoriés dans les sous-classes de  $\alpha$   $\beta$  et  $\gamma$ -*proteobacteria* (Balachandar et col., 2007). Les sous-classes des  $\alpha$  et  $\beta$  -*proteobacteria* incluent *Methylobacterium nodulans* (Sy et col., 2001), *Blastobacter denitrificans* (Van Berkum and Eardly, 2002), *Devosia* sp.(Rivas et col., 2002), *Ochrobactrum lupini* (Trujilo et col., 2005), *Agrobacterium* like strains (Mhamdi et col., 2005), *Phyllobacterium trifolii* (Valverde et col., 2005), *Herbaspirillum lustianum* (Valverde et col., 2003), *Ralstonia taiwanensis* (renamed as *Cupriavidus taiwanensis*) (Chen et col., 2001), *Burkholderia tuberum*, *Burkholderia phymatum* (Vandamme et col., 2002), *Burkholderia cepacia* (Rasolomampianina et col., 2005). Le peu des  $\gamma$ -*Proteobacteria* décrites actuellement et rapportés par Benhizia et col. (2004), sont des bactéries associés aux nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*. Alors que les légumineuses nodulées par les  $\alpha$  et  $\beta$  -*proteobacteria* présentent une grande diversité.

La particularité de ces microorganismes, aussi bien les rhizobia que les non-rhizobia, donc les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) sont capables de s'associer aux racines de ces plantes avec la plupart des espèces de légumineuses en formant des nodosités sur les racines dont lesquelles ils réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac. La formation de

nodule est contrôlée par des molécules de signal bactériennes extracellulaires, appelées des facteurs Nod, qui sont reconnus par la plante hôte (Lerouge et col., 1990; Schultze et Kondorosi, 1998).

D'un point de vue morphologique et microscopique les bactéries nodulant les légumineuses (BNL) se présentent sous forme de bâtonnets à Gram négatif, mobiles (grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches) (Werner, 1992), avec des dimensions approximatives de 0.5 à 0.8  $\mu\text{m}$  de largeur et 1.3 à 3.0  $\mu\text{m}$  de longueur. Ils se développent facilement dans un milieu de culture proche de la neutralité avec une source de carbone et une source d'azote, à une température optimale de croissance de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Somasegaran et Hoben (1994) ont indiqué que les BNL se trouvent sous deux formes :

- une forme végétative (non bactéroïde) : ce sont des micro- organismes 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 leguminosarum* bv *trifoli*, *Ensifer meliloti* (anciennement *Rhizobium meliloti*), les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près 10 fois plus grande que ceux de la forme végétative. Par contre il n'existe pas de différence de taille entre les deux formes régulières chez le *Rhizobium* des groupes *Vigna* et *Lotus*.

Pour les bactéries, le peu de critères phénotypiques a limité la connaissance des liens de parenté entre les microorganismes. Ainsi l'identification d'une bactérie constitue un des aspects les plus délicat mais, néanmoins, des plus importants. Différents schémas de classification ont existé qui reflétaient l'état des connaissances du moment, en particulier le Manuel Bergey's (Krieg et Holt, 1984), qui était basé sur l'observation au microscope et sur les différents tests biochimiques. Depuis une vingtaine d'années, la taxonomie bactérienne a beaucoup évolué grâce l'avènement des méthodes de typage moléculaire. Ces méthodes permettent d'évaluer les relations phylogénétiques entre les microorganismes.

La classification des BNL, comme celle des autres espèces bactériennes, est constamment remise en question (Vandamme et col.1996 ; Stackebrandt et col. 2002). Les nouvelles taxonomies sont basées sur des données polyphasiques qui prennent en considération tous les facteurs discriminatoires déterminés par les différentes méthodes (Taxonomie numérique,

profils protéique, hybridation ADN-ADN, ADN-ARN, PCR des ARNr 16S et 23 S, PCR de l'ITS .... ) (Figure 11)

Avant, Jordan (1982) a reclassé les BNL, sur la base de leur vitesse de croissance in vitro et d'un ensemble de caractères phénotypiques, dans 2 genres: le genre *Rhizobium* révisé comprenant les souches à croissance rapide et le nouveau genre *Bradyrhizobium* les souches à croissance lente.

L'étude des caractères phénotypiques a permis de différencier les *Rhizobium* suivants :

- le grand groupe de *Rhizobium* qui nodule les racines de légumineuses et y fixe l'azote atmosphérique, caractérisé notamment par une croissance rapide sur milieu YMA (Yeast Mannitol Agar).

- *Bradyrhizobium* qui nodule les racines de certaines légumineuses tropicales et caractérisé par une croissance lente.

- *Azorhizobium* qui forme des nodules au niveau des tiges ou racines de légumineuses du genre *Sesbania*.

Depuis, l'application des techniques de la taxonomie polyphasique, et notamment l'utilisation de l'ADNr 16S comme marqueur taxonomique, la classification des BNL s'enrichit chaque année de plusieurs espèces, au fur et à mesure de l'exploitation de la diversité des bactéries symbiotiques associées aux légumineuses. Actuellement, le groupe des rhizobia ou bactéries nodulant les légumineuses (BNL) compte près de 60 espèces, respectivement décrites dans 11 genres bactériens de l'ordre des *Rhizobiales* de la sous classe  $\alpha$  des protéobactéries et 3 genres de l'ordre des *Burkholderiales* de la sous classe  $\beta$  des protéobactéries (Zakhia et de Lajudie , 2001, Moulin et col 2001, Ngoum et col., 2004, Chen et col., 2001, et Balachandar et col., 2007).

Les espèces de la sous classe  $\alpha$  appartiennent aux familles des *Rhizobiaceae* (genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* , *Allorhizobium*) , des *Phyllobacteriaceae* ( genres *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*), des *Methylobacteriaceae* ( genre *Methylobacterium*) (Sy et col., 2001), des *Brucellaceae* (genre *Octrobacterum*) (Trujillo et col., 2005),, des *Hyphomicrobiaceae* ( genres *Devosia*, *Azorhizobium*) (Rivas et col., 2002) et des *Bradyrhizobiaceae* (genres *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*) (Van Berkum et Eardly, 2002).

Toutefois, le groupe *Rhizobium* présentant une grande diversité animée actuellement par plusieurs espèces. En effet, de Lajudie (1994) a proposé, sur la base des études de

l'homologie de l'ADNr 16S, un groupe qu'il a désigné séparément sous le genre *Sinorhizobium*. Ce nouveau genre regroupe les espèces *S. meliloti*, *S. saheli*, *S. teranga*, *S. arbori*, *S. fredii*, *S. xinjiangense*, *S. kostiense* et *S. medicae*.

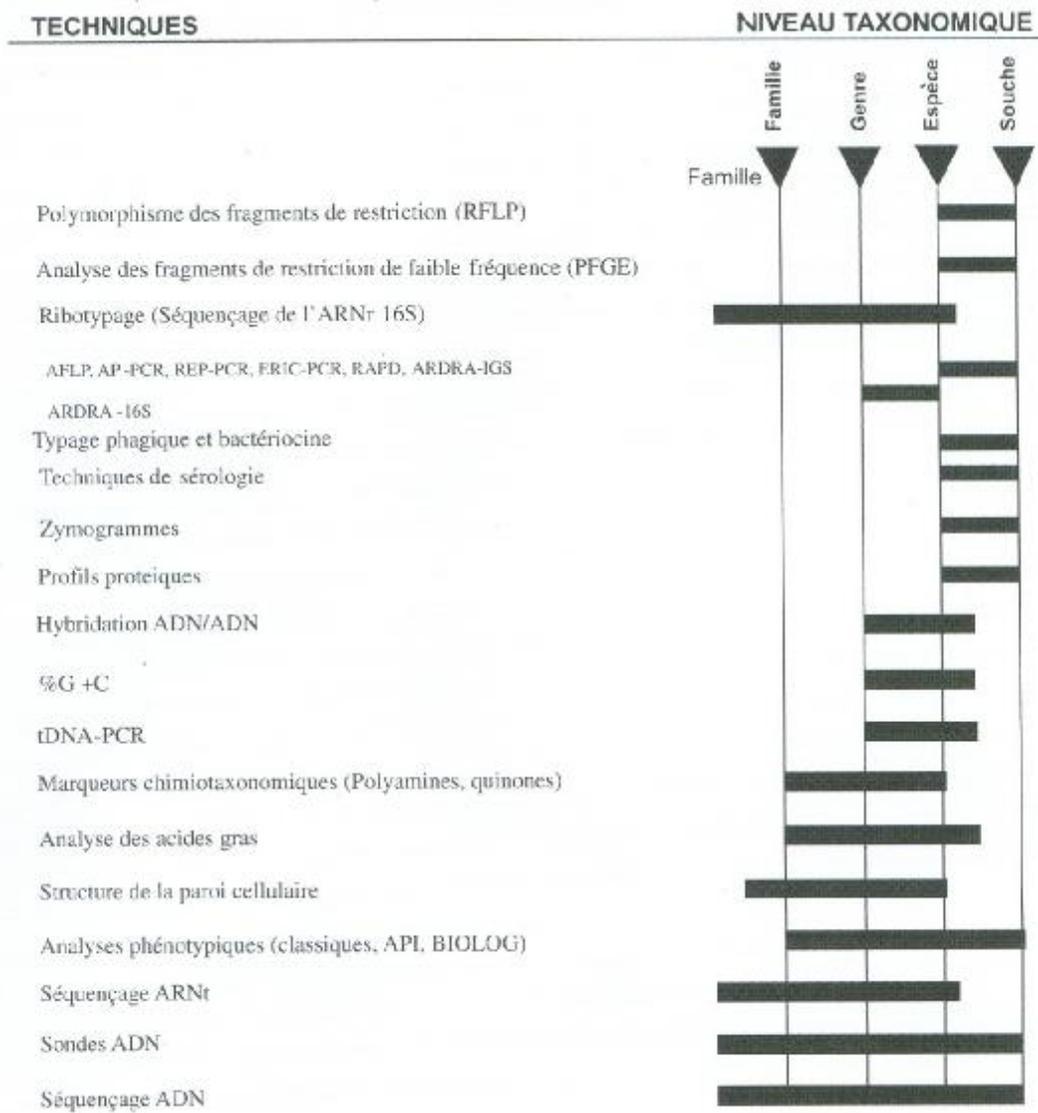
De Lajudie et col. (1998), utilisant la technique de PCR-RFLP de l'ITS de ADNr différencient une autre espèce qui présente une homologie de 96.2% avec le groupe *Sinorhizonium* mais qui se rapproche beaucoup plus de l'espèce *Agrobacterium vitis*. A tel point qu'ils l'ont rattaché au genre *Agrobacterium*.

Récemment, une autre espèce de *Phyllobacterium* : *P. trifolii* a été isolée à partir des nodules de la légumineuse *Trifolium pratense* sur le sol espagnol (Valverde et col, 2005).

Ngom et col. (2004) ont pu isolé *Ochrobactrum* à partir nodules de *Acacia mangium*, *Ochrobactrum lupini* des nodules de *Lupinus honoratum* par Trujilo et col (2005).

Les espèces de la sous classe  $\beta$  appartiennent à la famille des *Burkholderiaceae* et aux genres *Burkholderia* (*Burkholderia tuberum*, *Burkholderia phymatum* par Vandamme et col, 2002, *Burkholderia cepacia* par Rasolomampianina et col, 2005), *Ralstonia* (*Wautersia*) (Chen et col 2001 ; Vaneechoute et col 2004) et *Herbaspirillum* (Valverde et col 2003) . Par ailleurs chez les  $\gamma$ -*Proteobacteria*, des souches appartenant aux genres *Pantoea*, *Enterobacter*, *Escherichia* , *Leclercia* et *Pseudomonas* ont été isolées chez les plantes du genre *Hedysarum* par Benhizia et col. (2004) ; en effet, les profils d'ARDRA et l'analyse de l'empreinte digitale de RAPD de ces micro-symbionts montrent que les nodules formés sur ces légumineuses sauvages ne sont pas des espèces appartenant au groupe de rhizobia mais incluent beaucoup d'espèces *gamma-Proteobacteria* à savoir, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia vulneris* et *Pseudomonas* sp.

**Figure 11** : Pouvoir discriminant des différentes techniques de la taxonomie polyphasique (d'après Vandamme et al. 1996, modifié par Zakhia et de Lajudie, 2001).



**Tableau N°3** : Classification des bactéries nodulant les Légumineuses et fixatrices d'azote symbiotique des légumineuses, d'après ICSP Subcommittee on the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* (18 Août 2007)

Espèce	Plante- hôte	Référence
Classe : <b>Alphaproteobacteria</b> Ordre : <b>Rhizobiales</b>		
Famille : <b>Rhizobiaceae</b>		Frank.,1879
Genre : <b><i>Rhizobium</i></b>		
<i>R.leguminosarum</i>		Frank,1879 ;Jordan.,1984
biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>	Frank,1879 ;Jordan.,1984
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank,1879;Jordan.,1984
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L	Frank,1879;Jordan.,1984
<i>R.tropici</i>		
Type II A	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero et col., 1991
Type II B	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero et col.,1991
<i>R. etli</i>		
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>	Segovia et col., 1993; Hernandez-Lucas et col.,1995
biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	
<i>R.hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> et autres plantes de région arides	Wang et col., 1999 Chen et col., 1997
<i>R.gallicum</i>		
biovar <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger et col., 1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger et col. ,1997 Amarger et col. ,1997
<i>R mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum et col , 1998
<i>R. galegae</i>		
biovar <i>orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindstrom, 1989 Radeva et col.,2001
biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	Radeva et col .,2001; Zakhia et col., 2004
<i>R. giardinii</i>		
biovar <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L	Amerger et col. ,1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amerger et col. ,1997 Amerger et col. ,1997
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang et col. , 1998
<i>R.indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>	Wei et col. , 2002
<i>R sullae</i>	<i>Hedysaum coronarium</i>	Squartini et col . , 2002
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i>	Wei et col. , 2003
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla</i> , <i>Amphicarpaea</i> , <i>Gueldenstaedtia</i> Bioreactor	Tan et col. , 2001
<i>R. daejeonense</i>	Nod+ on <i>Medicago sativa</i>	Quan et col. ,2005
<i>R. cellulolyticum</i>		Garcia- Fral et col .,2007

Genre : <b><i>Sinorhizobium</i></b>		Chen et col. ,1988; de Lajudie et col. , 1994
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Dangeard.,1926; et Jordan., 1984; de Lajudie et col. , 1994
biovar <i>meliloti</i>		Villegas et col. , 2006
biovar <i>acaciae</i>		Bà et col. , 2002
biovar <i>medicaginis</i>	<i>M. Lasciniata, M. Sauvagei</i>	Bena et col, 2005; Villegas et col. , 2006
<i>S.fredii</i>		Scholla et Elkan., 1984; de Lajudie et col.,1994
chemovar <i>fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan.,1984
chemovar <i>siensis</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan., 1984
<i>Sinorhizobium xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>	Chen et col.,1988
<i>S. sahelense</i>	<i>Sesbania spp</i>	de Lajudie et col., 1994
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia spp</i>	Boivin et Giraud., 1999
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania spp</i>	Boivin et Giraud., 1999
<i>S. terangaie</i>		de Lajudie et col., 1994 ; Truper et de Clari., 1997
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia spp</i>	Lortet et col.,1996
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania spp</i>	Lortet et col.,1996
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago spp</i>	Rome et col.,1996
<i>S. Kostense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick et col., 1999
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang et col., 2002
<i>S. americanum</i>	<i>Acacia</i>	Toledo et col.,2003
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick et col., 1999
<i>S. Kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei et col., 2002
<i>S. adhaerens</i>	<i>Sesbania, Medicago</i>	Casida.,1982
Genre : <b><i>Allorhisobium</i></b>		de lajudie et col., 1998b
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de lajudie et col., 1998b
Famille : <b><i>Phyllobacteriaceae</i></b>		
Genre : <b><i>Mesorhizobium</i></b>		
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis et col., 1982
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus, Acacia spp</i>	Chen et col., 1991
biovar <i>loti</i>		Turner et col.,2002
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et col.,1994
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> et autres plantes tropicales	Chen et col.,1995
<i>M.mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et col.,1995
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	de lajudie et col., 1998a
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et col ,1999
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velasquez, 2001
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et col., 2004
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et col., 2004
<i>M. thiogangeticum</i>	soil (India, Clitoria ternatea)	Ghosh et Roy., 2005
<i>M.albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Wang et col .,2007
Genre : <b><i>Phyllobacterium</i></b>		
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde et col., 2005

Famille : <b>Methylobacteriaceae</b> Genre : <b>Methylobacterium</b> <i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp</i>	Sy et col, 2001; Jourand et col., 2004
Famille : <b>Brucellaceae</b> Genre : <b>Ochrobactrum sp.</b> <i>Ochrobactrum sp.</i> <i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Acacia mangium</i> <i>Lupinus albus</i>	Ngom et col ., 2004 Trujillo et col .,2005
Famille : <b>Hyphomicrobiaceae</b> Genre : <b>Azorhizobium</b> <i>A. caulinodans</i> <i>A. johannense</i> <i>Azorhizobium sp</i>	<i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania rostrata</i> <i>Sesbania virgata</i> <i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et col., 1988 Dreyfus et col., 1988 Dreyfus et col., 1988 Rinaudo et col .,1991
Genre : <b>Devosia</b> <i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas et col.,2002.,2003
Famille : <b>Bradyrhizobiaceae</b> Genre : <b>Bradyrhizobium</b> <i>B. japonicum</i> biovar <i>genistearum</i> biovar <i>glycinearum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningense</i> biovar <i>glycinearum</i> <i>B. yuanmingense</i> <i>B. betae</i> <i>B. canariense</i> biovar <i>genistearum</i> biovar <i>glycinearum</i> <i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Glycine max. Glycine soja</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max, Glycine soja</i>  <i>Lespedeza spp</i> <i>Bata vulgaris</i>  <i>Genisteeae et Loteae</i>  <i>Vigna, Lupinus, Mimosa,</i> <i>Acacia, Aeschynomene</i>	Jordan, 1982 Kirchner 1896;Jordan 1984 Vinuesa et col.,2005b Vinuesa et col.,2005b Kuykendall et col,1992 Xu et col,1995 Vinuesa et col,2004 Yao et col.,2002 Riva et col.,2004  Vinuesa et col.,2005b Vinuesa et col.,2005b Jordan.,1982,Dupuy et col.,1994,Alazard.,1985, Young et col., 1991
Genre : <b>Blastobacter</b> <i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	Van Berkum et Eardly.,2002
Classe : <b>Beta Proceobacteria</b> Ordre : <b>Burkholderiales</b> Famille: <b>Burkholderiaceae</b> Genre : <b>Burkholderia</b> <i>Burkholderia sp</i> <i>B. caribensis</i> <i>B. cepacia</i> <i>B.tuberum</i> <i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum,</i> <i>Aspalatus</i> <i>Alysicarpus glumaceus</i> <i>Aspalatus carnososa</i> <i>Aspalatus carnososa</i>	Moulin et col.,2001  Vandamme et col.,2002 Vandamme et col.,2002
Genre : <b>Wautersia(Ralstonia)</b> <i>W. taiwanensis</i>	<i>Mimosa spp</i>	Chen et col.,2001, Vanechoutte et col .,2004
Genre : <b>Herbaspirillum</b>		

<p><i>H. lusitanum</i></p> <p><b>Classe : Gamma-Proteobacteria</b>  <b>Ordre : Enterobacteriales</b></p> <p><i>Pantoea agglomerans</i>  <i>Enterobacter Kobei</i>  <i>Enterobacter cloacae</i>  <i>Leclercia adecarboxylata</i>  <i>Escherichia vulneris</i></p> <p><b>Ordre : Pseudomonadales</b>  <b><i>Pseudomonas sp.</i></b></p>	<p><i>Phaseolus vulagris</i></p> <p><i>Hedysarum carnosum,</i>  <i>H. Spinosissimum,</i>  <i>H. Pallidum,</i></p> <p><i>Hedysarum carnosum,</i>  <i>H. spinosissimum,</i>  <i>H. pallidum</i></p>	<p>Valverde et col., 2003</p> <p>Benhizia et col.,2004</p>
---	---	--

## 4-2- Coexistence des bactéries avec des rhizobia dans les nodules des légumineuses

L'appui de la microscopie électronique et l'immunofluorescence pour l'examen des nodules a beaucoup contribué à la connaissance des bactéries nodulant les légumineuses. En effet cette nouvelle importance réside dans diverses études qui ont couplé l'approche visuelle avec la caractérisation moléculaire des symbionts (Muresu et col, 2008). La stratégie traditionnelle étudiait le nodule-symbiont microbien comporte l'isolement et culture des tissus internes des nodules stérilisées (Vincent, 1970). La description des associations symbiotiques pour les diverses légumineuses donc a traditionnellement compté, comme un point de départ, sur la culturabilité de microsymbiont bactérien dans le nodule une fois ensemencé sur Yeast Mannitol Agar (YMA). Malgré la transformation physiologique des formes végétatives à la forme bactéroïde qui ne se divisent pas, il est observé que le rhizobia sont régulièrement trouvés dans les nodules. Ceci implique que quelques formes végétatives n'ont pas subi la conversion en bactéroïde (Paau et col, 1980; Timmers et col, 2000), ou quelques bactéroïdes peuvent être réanimé de nouveau à l'état culturable, ou tous les deux possibilités.

Des études récentes montrent l'apparition de certaines bactéries autres que des rhizobia, qui pouvaient noduler certaines légumineuses ; ces dernières appartiennent à des  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  - *Proteobacteria*, et mettent en évidence l'aspect « non cultivable » des rhizobia dans les nodules. En effet il s'avère que chez certaines légumineuses, notamment du genre *Hedysarum*, les souches de rhizobia sont associées aux nodules avec d'autres bactéries endophytes (Balachandar et col, 2007, Muresu et col, 2008, et Zakhia et de Lajudie, 2006 Benhizia et col. 2004).

Ainsi, la culturabilité semble être une exception plutôt qu'un état habituel. Il devrait noter, cependant, que l'isolement des taxa inattendus des nodules peuvent souvent être négligés (Zakhia et col 2006).

Brundu et col (2004) ont examinés 15 espèces sauvages de *Medicago* en Sardaigne et isolées 125 bactéries de ces nodules: seulement 29 pouvaient re-noduler leurs plante-hôtes, les 94 isolats restants étaient des saprophytes.

Dans d'autres cas l'analyse des nodules de quatre espèces de *Hedysarum* examinées en Algérie, par PCR directe du jus de nodule indique la présence des groupes non- rhizobials, et met en évidence l'absence du *Rhizobium*, les « résidents » cultivables des nodules, et la présence de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* et d'autres, qui produisent une pseudo-culture de croissance au lieu des colonies d'isolement (Benhizia et col, 2004). D'autre part en

utilisant l'analyse des oligonucléotides des gènes *nodC* et *nifH* par Bontemps et col. (2005), sur deux bactéries  $\gamma$ -*proteobacteria* isolées à partir de *H. Pallidum* et *H. spinosissimum* de Benhizia et col, 2004, n'indique aucune détermination génétique (gènes *nod* et *nif*) de nodulation ou de la fixation d'azote, cependant, l'abondance de ces endophytes bactériens au sein des plantes suggère que d'autres types d'interaction.

Ben Romdhane et col (2005) ont employé une PCR directe en étudiant les symbionts de *Acacia tortilis* en Tunisie, 25,8% des bactéries isolées s'avèrent des non-rhizobia. La même observation est constatée par Zakhia et col. (2004 et 2006) où les différents taxa bactériens trouvés dans les nodules des légumineuses, pourrait également représenter la croissance d'endophytes dans des nodules.

Certaines données ont prouvé que les divers endophytes des nodules sont le plus souvent représentés par quelques colonies, permettant l'identification de *Rhizobium* non-cultivable par PCR directe des nodules, dans les nodules de quelques espèces de plantes (*H. spinosissimum* et *T. purpureus*). (Muresu et col. 2008).

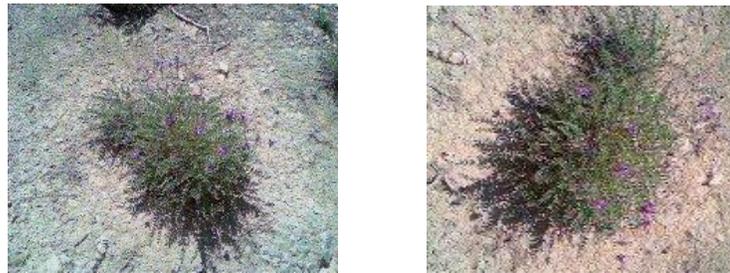
Il est possible que les endophytes divers que le rhizobia et les endophytes non culturable dans les nodules de légumineuses cohabitent, le nodule peut produire les composés antagoniques affectant négativement le rhizobia (Muresu et col. 2008), et/ou peut déclencher la réponse systémique de la défense de la plante ayant pour résultat la production des composés inhibiteurs tels que l'acide salicylique (De Meyer et col, 1999) dont les symbionts rhizobial pourraient avoir une sensibilité différentielle. En effet, quelques bactéries non-pathogènes eux-mêmes produisent les quantités suffisantes de l'acide salicylique (De Meyer et col. 1999; Audenaert et col, 2002).

## 1-Isolement des bactéries à partir des nodules

### 1-1- Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines de la plante *Hedysarum perrauderianum* située dans la zone de Sétif (Ain Oulmane).

C'est une légumineuse fourragère endémique décrite par Quezel et Santa (1962) comme une plante basse, sous-frutescente, avec des fleurs en grappe allongée purpurines plus ou moins violacées.



**Figure12** - La légumineuse *Hedysarum perrauderianum* (Ain oulmane, W. Sétif).

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent, J.M. (1970) et Somasegaran, P. et J. Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet (Figures 13 et 14).



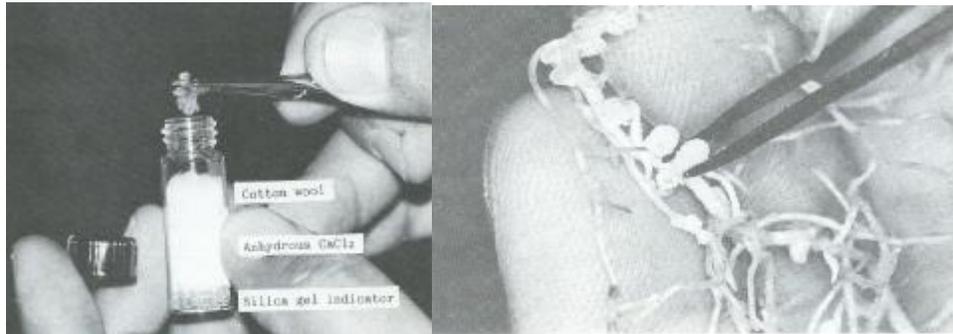
**Figure 13** - Collecte des nodules (Photo D.P. Beck, 1993)



**Figure 14** - Rinçage des racines et nodules (Photo D.P. Beck, 1993)

### 1-2- Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont conservés immédiatement au réfrigérateur à 4° C pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur, le chlorure de Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (Vincent, J.M., 1970) (Figure 15).



**Figure 15** - Conservation des nodules (Photo D.P. Beck, 1993)

Sur chaque flacon sont mentionnées le nom de la plante, date et lieu de collecte, et la date de conservation.



**Figure 16** - Echantillon de nodules de *Hedysarum perrauderianum* (après collecte)

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

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau au réfrigérateur toute une nuit. Les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol absolu puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) acidifié à 0.1% (p/v) pendant 3mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent, J.M.,1970).

### **1-4- Isolement des bactéries à partir des nodules**

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent, J.M. (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...). A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA, Vincent, J.M., 1970) additionné de rouge Congo (Annexes 1). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les mêmes nodules sont ensemencés sur une boîte de milieu Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de bromocrésol (GPA au BCP. Annexes 1). Les boîtes sont incubées trois jours à 28°C.

### **1-5- Observations des colonies et conservation des isolats**

Les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo sur milieu YMA et n'ayant pas acidifié le milieu GPA (virage du BCP au jaune) sont prises en considération. Ces colonies, propres aux bactéries nodulant les Légumineuses, en particulier le genre *Hedysarum* (Benhizia et col, 2004 ; Torche, A., 2006). Une observation microscopique (coloration de Gram) et un examen morphologique des colonies sur milieu YMA sont réalisés sur les isolats avant d'être conservés sur YMA tamponné avec du  $\text{CaCO}_3$  (3g/l) en tube incliné (Vincent, J.M. ; 1970 ; Beck et col.1993). Après incubation les souches sont stockées au réfrigérateur en vu de leur caractérisation.

Tableau N°4 – Isolats et Souches de référence utilisés

	Souches	Plante- hôte	Origine géographique	Source
<b>A6</b>	<i>Rhizobium sullae</i> sp. nov. RHA6	<i>H.coronarum</i>	Constantine, Algérie	A. Benguedouar-Constantine
<b>HS1</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. NZ096	<i>H spinossissimum. 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>Hca1</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.KD	<i>H.carnosum</i>	Biskra, Algérie	Y.Benhizia- Cne
<b>HnA</b>	<i>Pantoea agglomeans</i>	<i>H.naudinianum</i>	Setif, Algérie	A.Torche-Cne
<b>Hper1</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper2</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper3</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper4</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper5</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper6</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper7</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper8</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper9</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude
<b>Hper10</b>	Notre étude	<i>H. perrauderianum</i>	Sétif - Algérie	Cette étude

## 2- Caractéristiques métaboliques des isolats

Un certain nombre de caractères physiologiques et métaboliques propres aux bactéries associées aux nodules des légumineuses, en particulier les rhizobia, sont recherchés. En citant la bibliographie spécifique (Jordan, 1984 ; Vincent, J.M., 1970, 1982 ; Somasegaran et Hoben, 1994) il s'agit d'une part des **tests distinctifs** entre le genre *Rhizobium* et le genre *Agrobacterium*, et d'autre part la recherche d'**enzymes métaboliques** associés au processus de nodulation de la plante hôte par les bactéries.

Dans le premier cas, il s'agit de vérifier la vitesse de croissance des isolats pour la distinction entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente sur milieu YMA contenant du Bleu de Bromothymol, de tester l'absorption du rouge Congo faiblement concentré sur milieu YMA par les isolats, d'évaluer la précipitation du Ca-glycérophosphate, la croissance sur milieu au lait tournesolé (Litmus milk), et la production de 3-cétolactose sur milieu lactosé.

Dans le second cas on recherche certains enzymes intervenant dans la phase d'infection des racines de plantes par les souches bactériennes, notamment la pectinase (polygalacturonase), la cellulase (endoglucanase), la nitrate réductase et l'uréase.

### 2-1- Vitesse de croissance, absorption du rouge Congo et coloration au Calcofluor

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, ...). Pour cela on cultive nos isolats et les souches de référence sur milieu YMA + bleu de bromothymol (Annexes 1). L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours).

Les colonies typiques aux rhizobia absorbent faiblement le rouge Congo (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994) par rapport aux contaminants ou les souches occupant le nodule sans fixation de l'azote. Le test consiste à cultiver les isolats et souches témoins dans le milieu YMA contenant 0,0025% de rouge Congo et incubé dans l'obscurité à 28°C.

La majorité des souches de *Rhizobium* produisent des polysaccharides exocellulaires solubles dans l'eau et le principal constituant est un hétéropolysaccharide acide (80-90%) qui présente des liaisons  $\beta$ 1-3 et/ou  $\beta$ 1-4 entre ces constituants pariétaux. En soumettant les souches et isolats au Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, Sigma), les colonies qui présentent cette caractéristique apparaissent fluorescentes sous ultraviolet (Jordan, 1984 ; Struffi et col. 1998). Les bactéries sont cultivées sur milieu BIII (Dazzo, 1984) (Annexes 1) contenant 0,02% de Calcofluor et incubées 4 jours à 28°C et observé sous lumière ultraviolette. Les colonies fluorescentes sont considérées positives.

### 2-2- Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

#### a) Test du 3-Cétolactose (Bernaerts et De Ley, 1963)

Ce test permet de distinguer les colonies de *Rhizobium* et de *Agrobacterium* dont seul ce dernier produit l'enzyme, une 3-cétoglucosidase, sur les milieux successifs suivants :

Les souches sont mises en culture à 28°C pendant trois jours sur le premier milieu suivant :

Milieu 1 :

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g

Eau distillée	1000 ml
---------------	---------

Une anse de ce milieu est repiquée sur milieu solide contenant :

Milieu 2 :

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

Les boîtes sont incubées 48 heures à 28°C.

La révélation est mise en évidence par l'inondation des 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	1000 ml

La présence de cet enzyme se manifeste après environ 1 heure par la formation d'un **halo jaune** de Cu<sub>2</sub>O de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict.

#### b) Précipitation du Ca- Glycérophosphate

Pour les mêmes raisons que précédemment les souches et isolats sont mis en culture sur milieu au Mannitol-Calcium-Glycérophosphate (Annexes 1).

Sur ce milieu, *Agrobacterium* donne des colonies entourées par un halo brunâtre et un précipité clair (probablement du phosphate tricalcique), alors que les souches du *Rhizobium* ne donnent lieu à aucun brunissement (réaction négative).

#### c) Croissance sur Litmus Milk (Lait Tournesolé) (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984)

Selon Vincent (1970) les réactions sur le milieu au lait tournesolé permet de distinguer les formes non-rhizobiales et contaminants qui ont une croissance rapide accompagnée par une décoloration du tournesol.

La mise en évidence d'une protéolyse acide ou alcaline, se manifeste par un halo clair autour des colonies (développement d'une zone de digestion du « sérum » caractéristique des souches de *Rhizobium*).

Pour la préparation du milieu, une solution contenant 20 g de lait tournesolé dans 100 ml d'eau distillée et une autre solution contenant 3 g d'agar dans 100 ml sont stérilisées séparément à 110°C pendant 10mn. Refroidies à 50°C, les deux solutions sont mélangées pour constituer le milieu de culture.

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

### **2-3- Recherche des enzymes**

Le but est de rechercher la présence de certains enzymes qui jouent un rôle lors du processus d'infection (nodulation) des racines par les bactéries, particulièrement la polygalacturonase, la cellulase, la nitrate-réductase et à un degré moindre l'uréase, et la présence d'une  $\beta$ -galactosidase.

#### **a) Réduction des nitrates**

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Beringer, 1974) (Annexes 1) contenant 0,1% de  $\text{KNO}_3$  (p/v) pendant 4 jours avec agitation. Au terme de l'incubation à chaque tube on ajoute les réactifs nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et nitrate réductase 2 ( $\alpha$ -naphtylamine dans l'acide acétique 5M). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue.

#### **b) Activité cellulosique (Struffi et col, 1997)**

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode modifiée du rouge Congo de Teather et Wood (1982), composé capable de se lier de manière stable à une molécule non dégradable de Carboxyméthylcellulose (CMC). Une colonie bactérienne est mise en culture pendant 5 jours sur boite de milieu BIII (Dazzo, 1984) contenant 0,25% de CMC. Après incubation à 30°C, les boites sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 30°C. La solution du colorant est remplacée par une solution de NaCl 1 M ; les boites sont ensuite abandonnées à température ambiante puis vidées. Un **halo jaune-orangé** entoure les colonies qui montrent une présence de l'enzyme.

**c) Activité pectinolytique** (Struffi et col 1998)

Les souches bactériennes sont cultivées sur milieu YMA dont le mannitol est remplacé par l'Inositol 0,1% et additionné de 0,2% de pectine (Na-polygalacturonate), puis sont incubées à 28°C pendant 7 jours. Après incubation, les boîtes sont rincées délicatement avec l'eau courante puis avec une solution de rouge de ruthénium 0,05% pendant 30mn. Un halo décoloré autour des colonies indique une activité polygalacturonasique.

**d) Hydrolyse de l'urée** (Somasegaran et Hoben, 1994)

Pour mettre en évidence la présence d'une uréase, les isolats et souches témoins sont cultivées sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH à 30 °C pendant 48 heures. La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,20µm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C. La réaction positive est indiquée par la présence de colonies alcalinisant ou acidifiant le milieu.

**e) La recherche de la  $\beta$ -galactosidase**

La  $\beta$  galactosidase est un enzyme inductible, c'est-à-dire qu'elle n'est synthétisée que lorsque le lactose a pénétré dans la cellule bactérienne ; il suffit de quelques molécules de lactose intracellulaire pour que la synthèse de la  $\beta$  galactosidase ait lieu.

Pour rechercher cette enzyme, la bactérie est cultivée pendant 24 heures sur milieu lactosé à 1% (Kligler). Après incubation, à l'aide d'un öse on fait une suspension bactérienne épaisse dans 0.5ml d'eau distillé dans un tube à hémolyse. La paroi bactérienne est rendue perméable par adjonction d'une goutte de toluène. Ensuite on ajoute au contenu du tube un disque d'ONPG (orthnitro-phényl- $\beta$ -D-galactopyranoside).ce réactif, comme le lactose, possède un radicale  $\beta$ galactosidique. En présence de ce dernier, l'ONPG est hydrolysé en ornithnitrophénol de couleur jaune et en galactose. La coloration apparaît généralement après 15 à 30mn à 37°C.

## 2-4- Tests nutritionnels

### a) Utilisation de la source de carbone (Jordan, 1984)

Les souches sont cultivées sur le milieu BIII où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D- Arabinose, D- Fructose, D- Galactose, D- Saccharose, D- Glucose, D- Xylose, 4Sorbitol, Citrate de sodium, Lactose, Maltose et Raffinose, à concentration de 0,1%.

Un milieu BIII standard contenant du mannitol est utilisé pour une croissance témoin.

Les tubes sont inoculés avec 2 µl d'inoculum et incubés à 28°C pendant 24 heures, 48 heures et 72 heures. L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'estimation de la croissance en mesurant la densité optique à 600 nm ( $D.O._{\lambda 600}$ ).

### b) Utilisation des acides aminés comme source d'azote

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu défini 8 (Lindström et Lehtomäski, 1988) (Annexes 1) exempt de glutamate de sodium et additionné chaque fois de divers acides aminés : Valine, Tyrosine, Leucine, proline, Thréonine, Isoleucine, Lysine, Glycine, Sérine, Histidine, Arginine, Phénylalanine, Alanine, Cystéine, Méthionine, Asparagine, Tryptophane. Un milieu contenant du Na-glutamate est utilisé comme témoin.

Les tubes sontensemencés puis incubés à 28 °C. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à 600 nm ( $D.O._{\lambda 600}$ ).

### c) Besoin en vitamines (Jordan, 1984)

Afin d'étudier les besoins des souches en vitamines (Jordan, 1984) ; les isolats sont cultivés sur :

- milieu BIII standard (Dazzo, 1984) (Annexes 1),
- milieu BIII sans vitamines,
- milieu BIII additionné avec 100ug/l de l'une des vitamines suivants : Thiamine-HCl et Biotine,
- milieu BIII additionné des deux vitamines précédemment citées.

### 3- Effet des Facteurs abiotiques

#### 3-1- Tolérance au Chlorure de Sodium

Pour tester la tolérance de nos isolats et les souches de références au NaCl à différentes concentrations nous avons utilisé le milieu de Gloux et Le Rudulier (1989) dont la préparation est réalisée comme suit :

Solution A : g/l

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
NaHPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.05
Eau distillée	1000 ml

Solution B : mg/l

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
ZnSO <sub>4</sub>	1
CuSO <sub>4</sub>	1
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5
Eau distillée	1000 ml

Et

Biotine	2 g
Acide aspartique	100 mg
Acide lactique	0.74 g
Agar	10 g
Eau distillée	1000 ml

Le milieu est constitué de 100 ml de la solution A et 20 ml de la solution B.

Ajouter l'acide lactique et l'acide aspartique, compléter le volume à 1000 ml et ajuster le pH à 7,0.

Rajouter l'agar et stériliser à 120 °C pendant 20 minutes. La biotine est stérilisée par filtration est additionnée au milieu.

Le NaCl est rajouté à la concentration voulue : 20mM, 40 mM, 100mM, 200mM, 400mM, 1M, 1,5M et 2M.

La tolérance au NaCl est étudiée par l'estimation de la croissance en mesurant la D.O.  $\lambda_{600}$ , après incubation 48h à 28°C.

### 3-2- Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu BIII liquide et incubées à différentes températures : 4°C, 28°C, 30°C, 37°C, 40°C et 45°C.

### 3-3- Croissance à différents pH

Les souches sont cultivées sur le milieu BIII liquide à différents pH 5.3 ; 5.6 ; 5.8 ; 6.8 ; (témoin) ; 7.8 ; 8.8 ; et 9.8. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 600 nm après 36 heures et 48 heures d'incubation.

### 3-4- Résistance intrinsèque aux métaux lourds

La contamination des sols par les métaux est très répandue et l'origine peut être diverse : exploitations industrielles, centrale électrique, fabrication de pesticides, engrais, boues d'épuration, ... La préoccupation majeure est la contamination par les métaux lourds qui, à certaines concentrations, devient néfaste pour les animaux, végétaux et microorganismes. Plusieurs études ont prouvé que certains métaux lourds, Cadmium, (Sofia Cacoilo et col. 2005), Plomb, Mercure, Zinc, Cuivre, (Peter M.Kopittke et col. 2005), et autres, peuvent influencer la croissance et la physiologie des microorganismes. De même ces métaux affectent les processus de fixation de l'azote atmosphérique et la nodulation des légumineuses par les bactéries-hôtes. Une certaine attention a été donnée aux effets des métaux lourds sur les isolats, particulièrement les rhizobia, en en déterminant leur résistance intrinsèque aux métaux lourds. La concentration minimale inhibitrice est déterminée par la mise en culture des isolats et souches de référence sur boîte de milieu TY (Beringer, 1974) contenant des concentrations croissantes (de 200 à 5000µg/ml de milieu) des métaux lourds suivants :  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{SbO}_3$ . Les boîtes sont mise à incubation à 28°C pendant 5 à 7 jours.

## 4- Caractérisation des rhizobia par la sensibilité aux phages (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994)

La plupart des bactéries peuvent être infectées par les phages. L'environnement du sol abonde de virus qui peuvent infecter les microorganismes. Dans la mesure où l'interaction entre phages et leurs hôtes est fortement spécifique, elle peut faire l'objet d'outil pour les

études écologiques des rhizobia. Ces derniers se distinguent par leur résistance et sensibilité aux bactériophages. Les différents profils de sensibilité résultent d'une soumission des souches à une gamme de rhizobiophages ce qui permet de distinguer les populations de rhizobia. L'utilisation du typage phagique est possible mais peu appliquée. Cependant le phage s'avère un outil valable pour le polymorphisme des souches d'un même sérotype. Dans ce chapitre les phages sont isolés des différents sols et serviront donc pour tester la capacité de former des plages de lyses en présence des souches isolées du même site ou de référence.

#### **4-1- Isolement des bactériophages**

Faire une récolte d'échantillons de sol là où se cultivent ou se cultivaient les plantes. Prendre un échantillon de sol de la rhizosphère avec tout le matériel racinaire, nodules, ... Récolter les échantillons de différents sites, mélanger et conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

Dans des flacons de 150ml mettre 50ml de bouillon Mannitol Nitrate (MNB, Vincent, 1970) (Annexes 1). Inoculer les flacons avec une souche bactérienne. Incuber à 28°C avec agitation.

Quand la première série de cultures est en phase exponentielle de croissance (24 à 48h après inoculation), ajouter 1 gr de sol dans chaque flacon. S'assurer que chaque flacon est inoculé avec le sol des différents sites, incuber 18-20h à 28°C.

Centrifuger la suspension à 10000g 15mn ensuite filtrer le surnageant sur membrane 0.20µm et 0.45µm. Le filtrat contient les rhizobiophages qui, par leur taille, passe à travers la membrane filtrante. Ajouter au filtrat 10ml d'une culture fraîche de chaque souche utilisée. Incuber avec agitation 18-20h. Centrifuger puis filtrer. Reprendre l'opération deux fois.

Le trouble des cultures bactériennes diminue sensiblement 8-10h après addition du filtrat phagique. Le dernier filtrat est la suspension phagique. Répartir le filtrat dans des tubes de 20ml et ajouter quelques gouttes de chloroforme ; conserver à 4°C.

#### **4-2- Analyse des phages par la méthode de double couche**

Réaliser des dilutions  $10^{-1}$  du filtrat phagique dans du tampon phosphate pH 7,1.

*[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre .....14,2 gr]*

*[Dissoudre dans 800ml d'eau distillée, ajuster le pH à 7,1 avec HCl 0,1N. Compléter à 1000ml]*

Ajouter 0,1 ml de chaque dilution dans un tube de 2,5 ml de MNA\* maintenu à 50°C dans un bain-marie. Mélanger avec 0,5 ml d'une culture fraîche d'une culture de la souche et couler immédiatement sur boîte de MNA\*\* et répartir. Faire un témoin avec seulement du tampon phosphate et la souche (sans filtrat phagique) en agar et coulé sur boîte de YMA.

Laisser les boîtes 10-15mn puis incuber 24-72h. Observer les plages de lyse et les dénombrer.

\* milieu MNA « mou » avec 0,7% d'agar

\*\* milieu MNA avec 1,8% d'agar

## 5- Test de nodulation (prestations symbiotiques avec la plante-hôte)

L'habileté des microorganismes à noduler et à fixer l'azote avec la plante-hôte est un caractère important et pratique pour les rhizobia ou B.N.L. (bactéries nodulant les Légumineuses) et doit être analysé en détail (Graham et coll.1991). Les tests de nodulation doivent être conduits dans des jarres traditionnelles de Leonard (Vincent, 1970) ou dans des tubes appropriés (Beck et coll. 1993). Après l'isolement et les caractéristiques morphologiques, culturelles, biochimiques et physiologiques, une première approche pour identifier les isolats est leur capacité et aptitude à former des nodules avec la plante-hôte, *Hedysarum perrauderianum*, en conditions bactériologiquement contrôlées.

Il est utile d'établir une courbe de croissance des souches qui serviront à inoculer les plantes.



**Figure 17** - Hotte à flux laminaire

### 5-1- Croissance bactérienne (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970)

Des erlenmeyers de 250ml contenant 100 ml de TY, sont stérilisées à l'autoclave à 120°C pendant 20mn. Une culture des souches et isolats est réalisée dans des erlens de 250 ml

contenant 120ml de TY et qui serviront d'inoculum. Après incubation 5ml de cet inoculum vont ensemer 20 erlens de 250ml contenant 100ml de TY.

La densité optique (D.O.  $\lambda_{540}$ ) est mesurée à chaque heure durant 24h (Somasegaran, 1994). Le réglage de l'appareil s'effectue avec un milieu TY stérile



18-a-Erlens de 250 ml contenant du TY

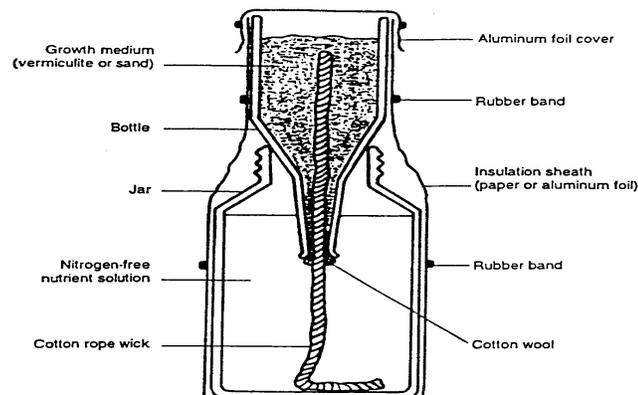


18-b- Spectrophotomètre

**Figure 18** -Dispositif de la mesure de la croissance.

### 5-2- Préparation des jarres de Léonard (Vincent, 1970)

Des bouteilles en plastique sont coupées latéralement en deux parties. Ces jarres sont stérilisées sous les hottes à flux laminaire par l'eau de javel concentrée laissées séchées sous la hotte. La partie supérieure de chaque jarre est remplie d'un mélange de sable et vermiculite humidifié avec la solution nutritive de Fåhrens (Annexes 1) et préalablement stérilisé à l'autoclave. La partie inférieure du dispositif est remplie de solution nutritive. Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse ce qui permet d'alimenter en continu, par capillarité, la partie supérieure en solution nutritive.



**Figure 19** - Assemblage de Jarre de Léonard (Vincent, 1970)

### 5-3 - Stérilisation des graines

Des graines (ou semis) de la plante *H. perrauderianum*, sont stérilisées à l'éthanol 95 % pendant 10 secondes puis par une solution d'acide sulfurique concentré pendant 30mn (ce temps s'explique par le fait que le  $H_2SO_4$  est un agent scarificateur efficace). Les graines sont ensuite rincées 10 fois avec l'eau distillée stérile. On les laisse imbiber dans le dernier rinçage pendant 5 à 6 heures.

Les graines stériles sont mises en germination sur des boîtes de TYA (Tryptone-Yeast-Agar) semi solide (7g/l d'agar). Les boîtes sont enveloppées avec du papier aluminium et mises à germer à l'obscurité.

### 5-4 - Inoculation des jarres

Après germination, les graines sont plantées dans le mélange sable-vermiculite (partie supérieure de la jarre) à raison d 2 à 3 graines par jarre , puis inoculées immédiatement avec 2 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance (D.O.~1). Deux jarres ne sont pas inoculées et serviront de témoin.

Enfin les jarres, sont couvertes du papier aluminium pendant les premières 24 heures d'inoculation et placées dans une chambre de croissance à température ambiante pendant huit semaines.



Figure 20 - Jarre de Léonard

## 6-Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

### 6-1- Introduction

L'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl sulfate (SDS-PAGE) (Kesters et de Ley, 1980 ; Kesters, 1985) a été très utilisée dans le passé, car elle est rapide et puissante et permet d'une part de comparer des souches bactériennes au niveau de l'espèce et de la sous espèce, et d'autre part les résultats obtenus sont généralement corrélés et compatibles avec ceux des études par hybridation ADN/ADN (Kesters , 1985 ; Vandamme et col, 1996). Cette technique a contribué à décrire de nombreuses nouvelles espèces de rhizobia ; *Sinorhizobium terangae* et *Sinorhizobium saheli* (de Lajudie et col ; 1994), *Mesorhizobium plurifarum*( de Lajudie et Col 1998a), *Allorhizobium undicola* ( de Lajudie et Col 1998b) ,*Sinorhizobium arboris* et *Sinorhizobium kostiense* (Nick et col,1999). Cependant, cette technique s'est avérée moins discriminante pour l'étude des bradyrhizobia (Doignon-Bourcier et col, 1999)

Afin d'affiner l'analyse phénotypique pour mieux cerner la diversité génétique et la taxonomie des 10 souches isolées des nodules de *Hedysarum perrauderienum*, nous avons procédé à l'analyse de ces dernier par SDS-PAGE. Pour cela, les protéines sont extraites et séparées en conditions standardisées et les profils électrophorétiques obtenus sont comparés à ceux de souches de références.

Une bactérie peut contenir plus de 2000 protéines différentes, qui constituent une importante source d'information. La SDS-PAGE (Sodium Dodecyl sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) consiste à extraire des protéines cellulaires totales, que l'on fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS. On obtient ainsi des profils caractéristiques de chaque souche bactérienne. Deux microorganismes très proches doivent avoir des profils électrophorétiques similaires ou identiques. Le profil électrophorétique d'une souche donnée est le reflet du bagage génétique du microorganisme et sa composition avec les profils d'autres bactéries permet de mesurer le degré de parenté avec ces microorganismes. Roberts et col (1980) ont étudié la diversité de rhizobia en utilisant cette technique, et depuis ; son application a été très importante dans la taxonomie des BNL. Elle a permis en effet la description de nombreuses espèces de *Mesorhizobium plurifarum*( de Lajudie et Col 1998a), *Allorhizobium undicola*( de Lajudie et Col 1998b), *Sinorhizobium arboris* ,*Sinorhizobium kostiense*( Nick et col,1999) et *Rhizobium sulae* ( Benguedouar et col,1997). Cette

technique présente un pouvoir discriminant variable selon les groupes bactériens étudiés ; elle ne s'est cependant avérée pas assez puissante pour la caractérisation taxonomique des bradyrhizobia (Doignon- Bourcier et col, 1999).

## 6-2- Protocole

Le protocole expérimental est basé sur la technique décrite par Laemmli (1970).

Une öse de platine, à partir d'un milieu solide, estensemencée sur un milieu de TY et incubée à 28°C pendant 18h. Une aliquote de 100 µl de chaque culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, est centrifugée à 7000 tours/min pendant 15 min.

La lyse des cellules s'effectue après traitement du culot bactérien obtenu par l'addition de 50 µl de tampon de lyse (Annexes 2) et mis en ébullition dans un bain-marie pendant 3 min à 100°C.

Un dépôt 40 µl de chaque échantillon est mis dans un puit. L'électrophorèse est réalisée sur un gel de polyacrylamide de 12 % (Annexes 2).

Après migration et démoulage, le gel est mis dans une solution de coloration contenant le bleu de Comassie et l'acide trichloracétique (60%) pendant une nuit sous une faible agitation. Enfin le gel est décoloré dans l'eau distillée sous faible agitation jusqu'à l'apparition des bandes polypeptidiques. Le gel est photographié à l'aide d'un appareil photo numérique.

## 7- Caractérisation phylogénétique des isolats

L'analyse phénotypique de nos isolats est suivie, dans une seconde étape, par une caractérisation moléculaire utilisant successivement :

-Une analyse par l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis ou Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomal amplifié),

-Un séquençage de l'ADNr par la méthode de Sanger.

Cette partie a été entièrement réalisée au **Laboratoire de Biologie Moléculaire du Département de Biotechnologie Agraire de l'Université de Padoue (Italie)** avec l'aimable contribution du Professeur Andrea SQUARTINI et ses collaborateurs.

### 7-1 -Analyse des fragments de restriction de l'ADN amplifié

Après amplification de l'ADN des gènes 16s d'un échantillon d'une communauté bactérienne (échantillon de sol par exemple), on en fait la digestion enzymatique par certaines enzymes de restriction, choisies pour leur fréquence de coupure.

#### a- Extraction de l'ADN

Le protocole utilisé pour l'extraction de l'ADN des isolats est celui rapporté par Benhizia et Col. (2004).

Les souches utilisées : *Hper1*, *Hper2*, *Hper3*, *Hper4*, *Hper5*, *Hper6*, *Hper7*, *Hper8*, *Hper9*, et *Hper10*. Les cellules bactériennes sont lysées en mettant en suspension une ôse de la colonie d'isolement dans 50 µl de tampon de lyse (0,25% SDS, 0,05M NaOH) dans un tube eppendorf. Après agitation 1mn au vortex, on chauffe à 95°C pendant 15 mn. Le lysat est centrifugé 15mn à 12000 t/mn (centrifugeuse type Eppendorf 5415D). 10 µl du surnagent sont ajoutés à 90ml d'eau stérile. Le reste des lysats est stocké à – 20°C jusqu'à utilisation.

#### b- Analyse des fragments de restriction de l'ADN amplifié

Un µl de lysat contenant tout l'ADN des isolats bactériens est traité dans un appareil de type PCR BioradI-Cycler à l'aide de 1 µl deux amorces universelles cibles ADNr 16S,

63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) (Marchesi et col., 1998)

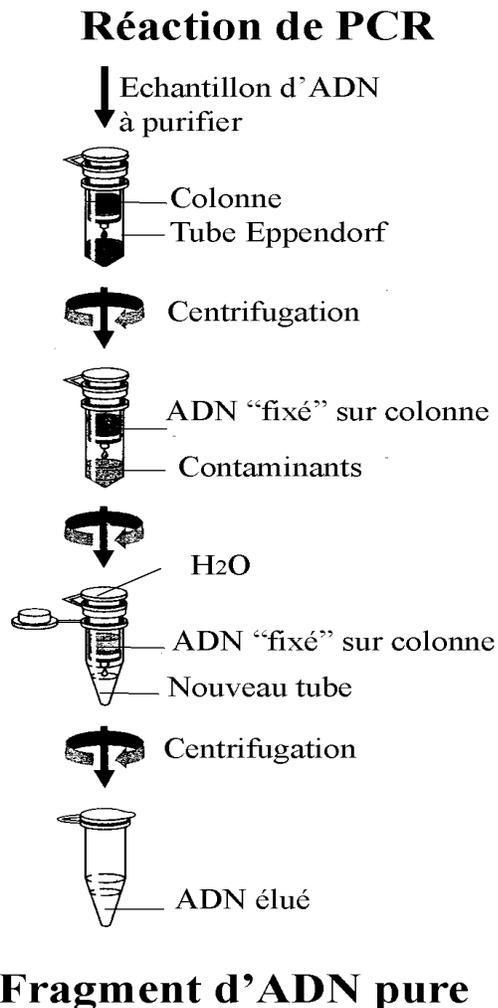
1389R (ACGGGCGGTGTGTACAAG) (Osborn et col., 2000)

Le tout est mis dans un volume réactionnel de 25 µl, en utilisant le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 2mn, 35 cycles à 95°C de 30sec, 55°C pendant 1mn, 72°C pendant 4mn et une élévation finale à 72°C pendant 10mn. 12 µl des produits de l'amplification des 25 µl du volume de réaction sont digérés une nuit à 37°C avec 1,5 µl de l'enzyme de restriction *CfoI* (enzyme obtenue à partir de l'espèce *Clostridium formicoaceticum* (Pharmacia, UPSALA, suède) ) dont le site de restriction est GCG/C et 1,5 µl de tampon de réaction 10x. Les fragments obtenus après digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'Agarose à 2%. La durée de migration électrophorétique est de 3h à 110V. Le fragment d'ADN amplifié peut être facilement repéré dans un gel en présence de Bromure d'Ethidium. Le gel est ensuite visualisé à l'aide d'un Transilluminateur UV et photographié par un appareil numérique Kodak DC290 à haute résolution.

## 7-2- Séquençage de l'ADNr 16S par la méthode 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 séquencer. La technique repose sur l'incorporation d'un nucléotide modifié (un dNTP auquel il manque deux atomes d'oxygène) qui empêche la contamination de la synthèse de l'ADN.

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



**Figure 21** - Purification de l'ADN par le Kit Qiagen QIAquick PCR (Qiagen, GmbH, Hilden Allemagne, 1999).

De l'amplification décrite précédemment, 13µl de l'ADNr 16S spécifique sont purifiés. Des aliquotes de 2 µl sont séparées sur gel d'agarose 0,8% dans du tampon TBE avec des

quantités d'ADN de bactériophage lambda variant de 5 à 150ng. L'observation du gel permet d'évaluer visuellement les quantités d'ADN à employer pour l'alignement. Une aliquote de 1 µl contenant environ 40ng d'ADN est transférée dans un tube eppendorf de 0,2ml puis 1 µl d'une solution de 6,4 pmol de l'amorce 63F (Marchesi et co., 1998) est ajouté aux tubes. Un deuxième tube de quantité égale est aussi préparé en ajoutant l'amorce reverse 1389R (Osborn et col., 2000).

Les didéoxyribonucléotides sont marqués au moyen de colorants fluorescents, avec chacun des quatre nucléotides une couleur différente. On utilisera un fluorescent terminator (Big Dye, Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, Calif. U.S.A.). Les quatre réactions peuvent ainsi se dérouler dans la même éprouvette; la couleur de la fluorescence reconnaîtra les extrémités « didéoxy » des brins d'ADN produits par la réaction. Le séquençage est effectué sur un compteur d'ADN séquentiel automatisé ABI prism Applied Biosystems 3730xl. Les chromatogrammes sont analysés par le programme DNASTAR de Chromas 2,23 (Technlysium Pty Ltd, Tewantin Australie).

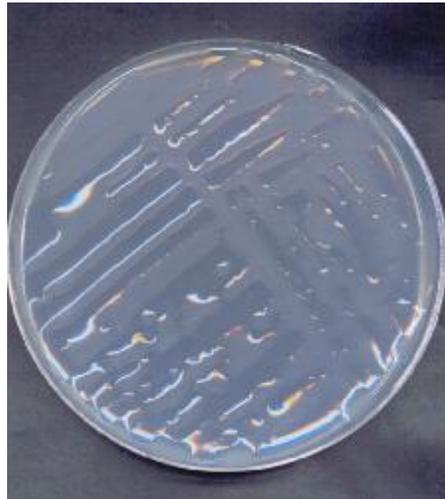
Les fragments de l'ADNr 16S séquencés des 10 souches étudiées sont comparés à l'ensemble des séquences se trouvant dans les bases de données (Altschul et coll., 1990) du site Web du NCBI sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 1- Caractéristiques morphologiques, culturaux et physiologiques des isolats

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de *H. perrauderianum*, nous avons tenu compte de 10 isolats dont les colonies absorbent très peu le rouge Congo. Les autres colonies contaminantes sont fortement colorées et acidifient rapidement le milieu Glucose-Peptone-Agar en présence du Pourpre de Bromocrésol.

### 1-1 Croissance sur YMA

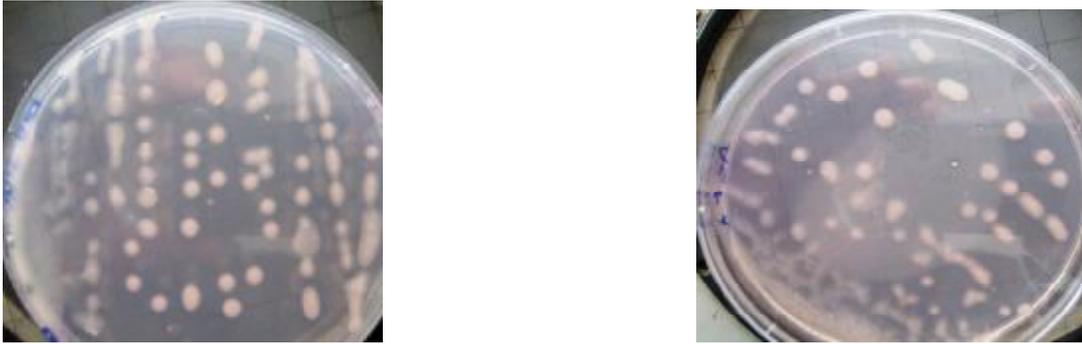
La croissance sur milieu YMA (Yeast mannitol Agar) est détectable après 24 heures ; les colonies typiques sont abondantes, circulaires, lisses, convexes, translucides, de couleur blanchâtre. L'observation microscopique montre des cellules en bâtonnets courts, Gram négatif.



**Figure 22-** Aspect des colonies sur YMA

### 1-2- Croissance sur YMA+ Rouge Congo

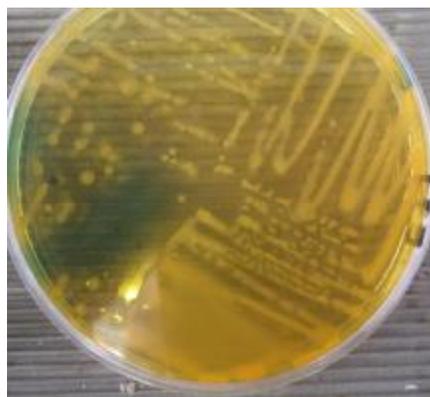
Les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le rouge Congo (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984).



**Figure 23-** Absorption du rouge Congo (0,0025%)

### 1-3-La vitesse de croissance

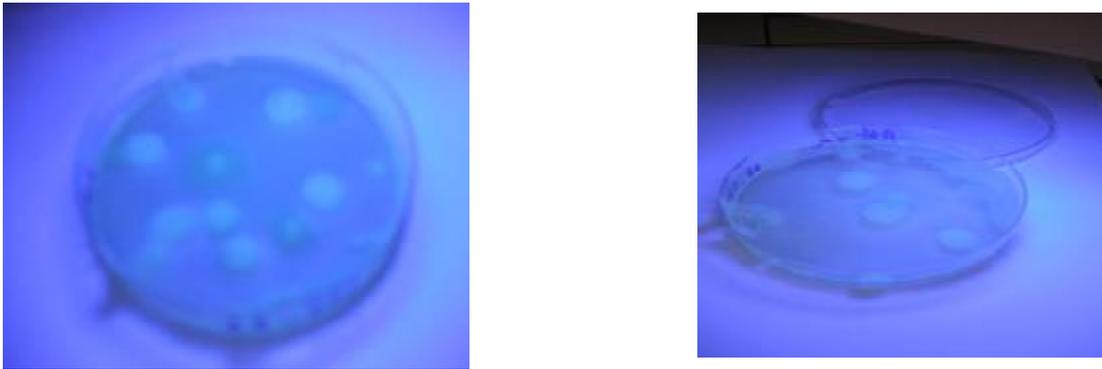
L'ensemble des isolats acidifie le milieu YMA +Bleu de Bromothymol (virage de l'indicateur de pH en moins de 24h, ce qui indique que nos isolats appartiennent à des bactéries à croissance rapide.



**Figure 24 - Hper sur BTB**

### 1-4- Croissance sur YMA+ Calcofluor

Tous les isolats absorbent le Calcofluor et donnent une coloration fluorescente lors d'une observation sous UV ; ce qui est en accord avec Jordan (1984) où la majorité des rhizobia produisent des polysaccharides exocellulaires solubles dans l'eau et le principal constituant est un hétéropolysaccharide acide (80-90%) qui présente des liaisons  $\beta$ 1-3 et/ou  $\beta$ 1-4 entre ces constituants pariétaux.



**Figure 25-** Absorption du Calcofluor par les isolats.

### 1-5-Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

Les différents tests discriminant les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* sont à l'avantage du second. Le genre *Agrobacterium* produit l'enzyme 3- cétolactose, produit des colonies entourées d'un halo brunâtre et présente un précipité clair sur milieu au Ca-Glycérophosphate.

Toutefois Les isolats ont montré une réaction positive sur le milieu Litmus milk, et présentent une croissance très rapide avec une production d'une protéolyse au bout de 24 heures. Ce caractère n'appartient pas au genre *Rhizobium*



**Figure 26** - Protéolyse observée sur milieu Litmus milk

### **1-6-Recherche d'enzymes spécifiques**

Tous nos isolats, en présence de souches témoins (*R. sulae*, *R. leguminosarum bv trifolii*, *R. leguminosrum bv viciae*) donnent des réactions positives avec les enzymes spécifiques, enzymes liés au processus de nodulation (Polygalacturonase, endoglucanase) ou liés au métabolisme azoté du sol (uréase, nitrate-réductase).

- nitrate-réductase : la croissance des isolats et souches témoins sur milieu à base de  $KNO_3$  et après addition de réactifs de la nitrate-réductase, montrent la présence de l'enzyme. (El Essawi et Abdelghaffar, 1967 ; Lindstrom et Lehtomaki, 1988 ; Struffi et col 1998).

- tous les isolats alcalinisent fortement le milieu à base d'urée (Mobley ,1992).



**Figure 27**- Uréase

- activité cellulosique : l'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies des isolats indique la présence d'une endogluconase (cellulase). Toutes les souches donnent une réaction positive (Lindeström et Lehtomak , 1988).



**Figure28** - Présence d'une Cellulase pour les isolats

- activité pectinolytique : après addition du rouge de ruthénium et le rinçage avec de l'eau, un halo clair est observé autour des colonies indiquant une réaction positive. Tous les isolats ont une activité polygalactoranasique.



**Figure29** - Mise en évidence d'une polygalacturonase chez les isolats

Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Struffi et col. (1998) et Fähreus (1957), qui supposent que les bactéries du genre *Rhizobium* stimulent les plantes à produire des polygalacturonases qui dégradent la paroi cellulaire au niveau du site d'infection et favorisent la pénétration des rhizobia. Par contre d'autres auteurs ont montré que le rhizobium produit les deux enzymes (la cellulase et la pectinase) qui dégradent les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilitant ainsi la pénétration des rhizobia à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos et col., 1992). Les isolats produisent une nitrate-réductase et une uréase comme le préconise la bibliographie (Struffi et col., 1998 ; Vincent, 1982).

A travers les résultats obtenus, notamment les caractéristiques morphoculturales, les enzymes spécifiques liés à l'interaction plante-microorganisme, les caractères distinguant les genre *Agrobacterium* et *Rhizobium*, nous pouvons avancer que les isolats présentent une morphologie et un aspect cultural propre aux rhizobia, comme le rapporte certains auteurs notamment Vincent (1970, 1982), Jordan (1984), Somasegaran et Hoben (1994), Struffi et col. (1998).

## **1-7- Utilisation de la source de Carbone et d'azote, besoin en vitamines**

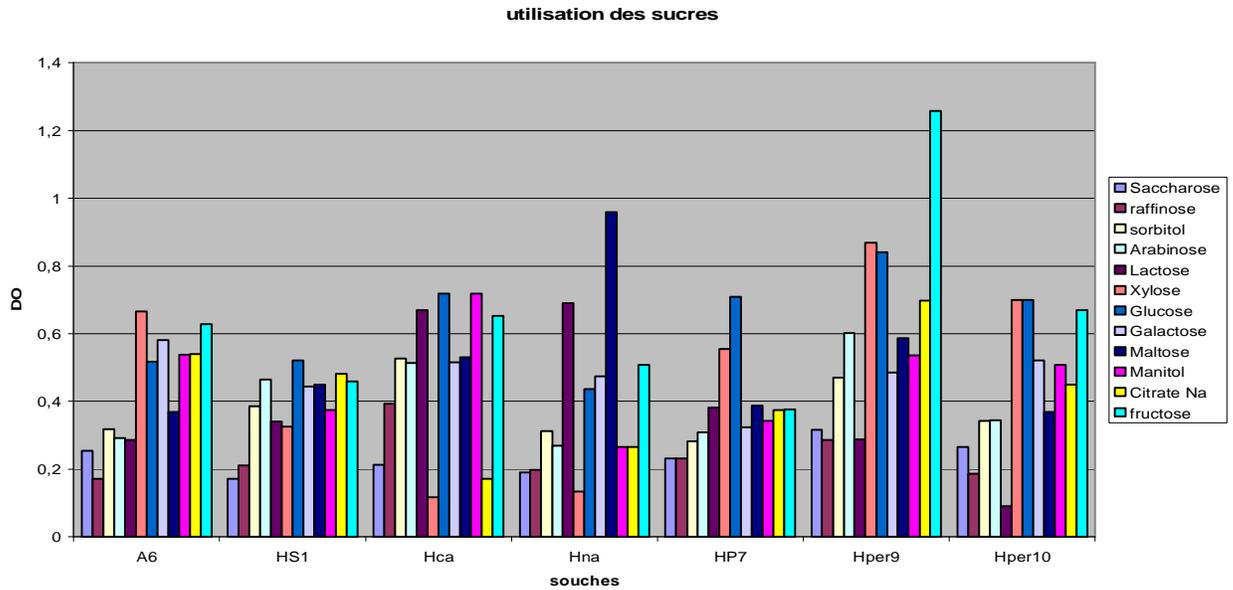
### **a) Utilisation de la source de carbone**

Tous les sucres associés au milieu BIII (Dazzo, 1982), en présence de témoin contenant du mannitol, sont assimilés par les isolats à un niveau différent.

La mesure de la densité optique fait apparaître que le glucose, le fructose, le sorbitol, et le Maltose donnent un bon développement pour la plupart des souches, le Xylose est le moins utilisé par les souches de référence. Pour nos isolats, il semble qu'ils n'ont pas de préférence particulière pour la source de carbone, mais ils utilisent faiblement le saccharose, le raffinose, et le lactose.

Les résultats de cette étude montre que les isolats sont capables d'utiliser une grande variété de carbohydrates comme source de carbone, ce qui est confirmé par Vincent (1970) Jordan (1984), Lindström et Lehtomaki (1988), Somasegaran et Hoben (1994).

D'autres auteurs constatent également un degré de différence dans l'assimilation des hydrates de carbone (Struffi et col. 1998, Rodriguez et col, 1987, Mulongoy et Elkan, 1977 ; El Essawi et Abdelghaffor 1967).



**Figure30** - Utilisation des sucres

### b) Assimilation de la source d'azote

La croissance des isolats sur le milieu défini 8 est variable selon la source d'azote. Ainsi toutes les souches peuvent croître en présence de la majorité des acides aminés. Nos isolats et les souches de référence montrent une bonne croissance avec l'Histidine, Glutamate de Na, Asparagine, Proline et Isoleucine, mais un peu moins sur milieu de Lindström et Lehtomäski (1988) en présence de thréonine, Méthionine, Serine, Lysine et Glycine.

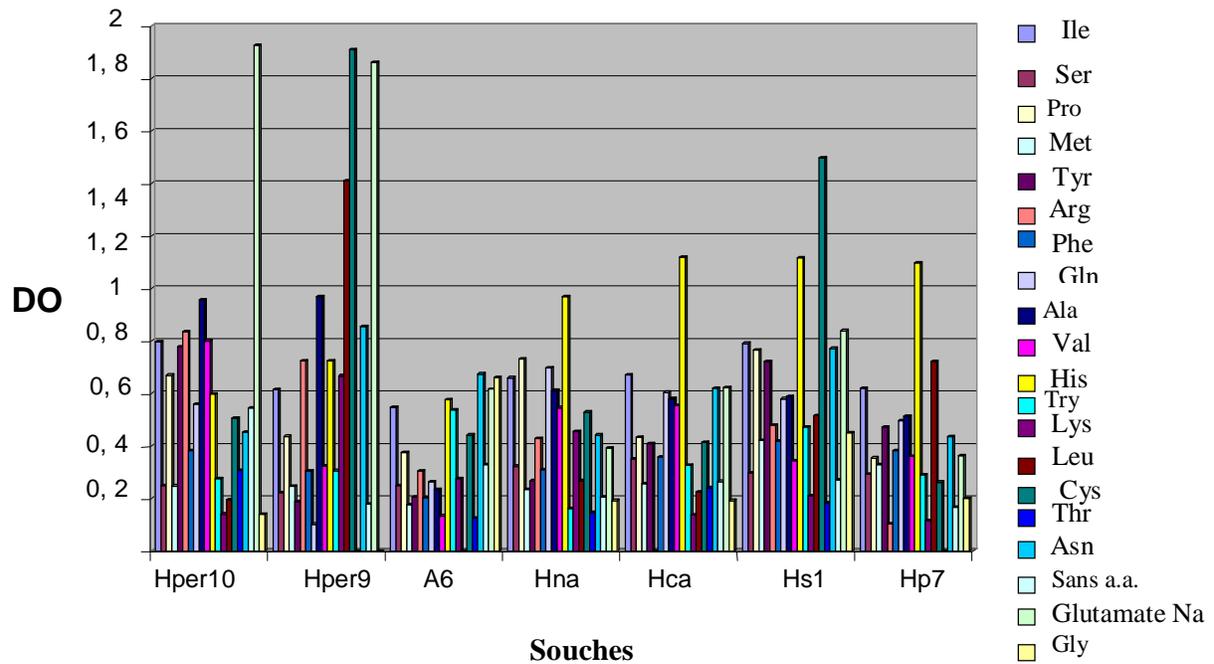


Figure 31- Utilisation des Acides Aminés

**c) Besoin en vitamines :**

Dans le cas de nos isolats l'incorporation des vitamines peut stimuler la croissance bactérienne (Dazzo, 1982 ; Vincent, 1970 ; Jordan, 1984). L'utilisation du milieu BIII (Dazzo, 1982) additionné de Thiamine et/ou de Biotine montre une bonne croissance des isolats. Toutefois la Thiamine, seule, favorise une bonne croissance (Struffi et col. 1998)

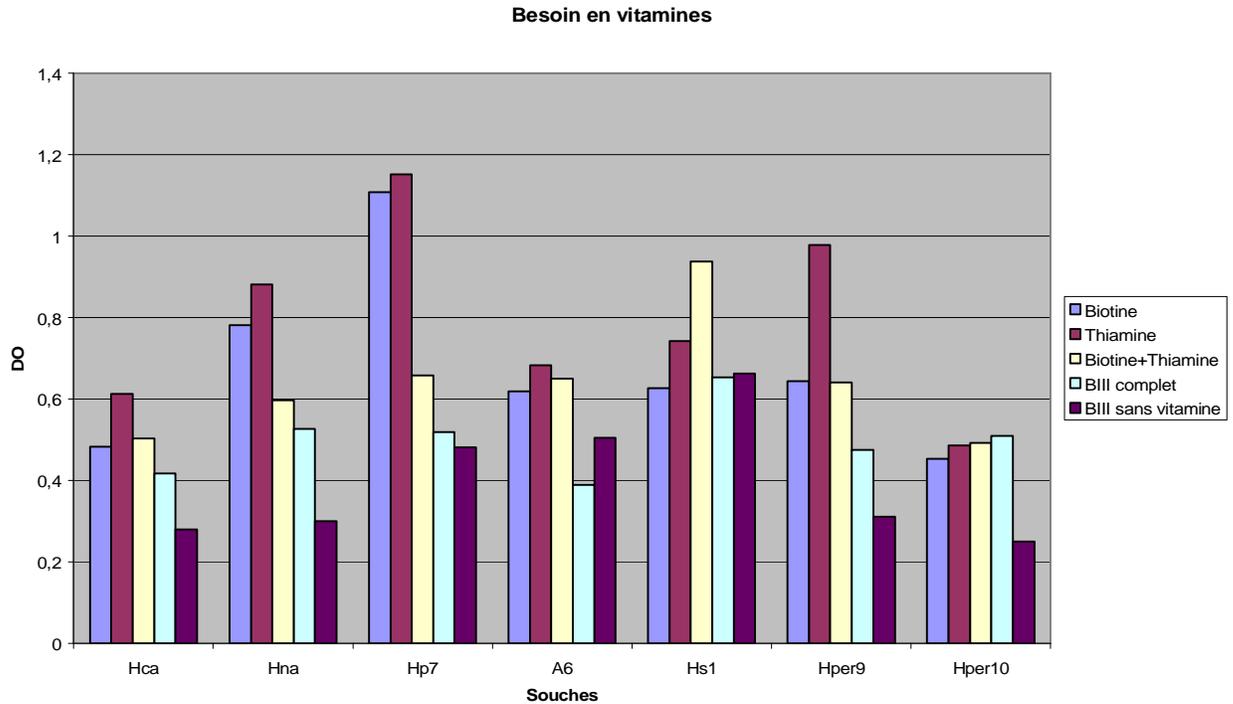


Figure 32- Besoin en vitamines

## 2- Effet des facteurs abiotiques (pH, T°C et NaCl)

### 2-1- Tolérance au NaCl

Tous les isolats y compris les souches témoins croissent en présence des concentrations de NaCl variant de 0.04M-1M, ils sont considérés comme halotolérantes. Aude la de 1.5M, aucune croissance n'est observé.

Les bactéries isolées à partir de *H coronarium*, *H palidum*, et *H carnosum* tolèrent des concentrations élevées de NaCl allant jusqu'au 1.5 M.

Miller et Wood (1996) ont rapportés que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs (Csonka et Hanson 1991). Certains auteurs ont rapporté que les rhizobia sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hotes ( Zahran 1999, Swaraj et Bishnoi

1999), l'effet d'inhibition de la salinité sur la nodulation à été attribué par les même auteurs à la diminution de la colonisation des rhizobia, et le manque de formation des poils racinaires.

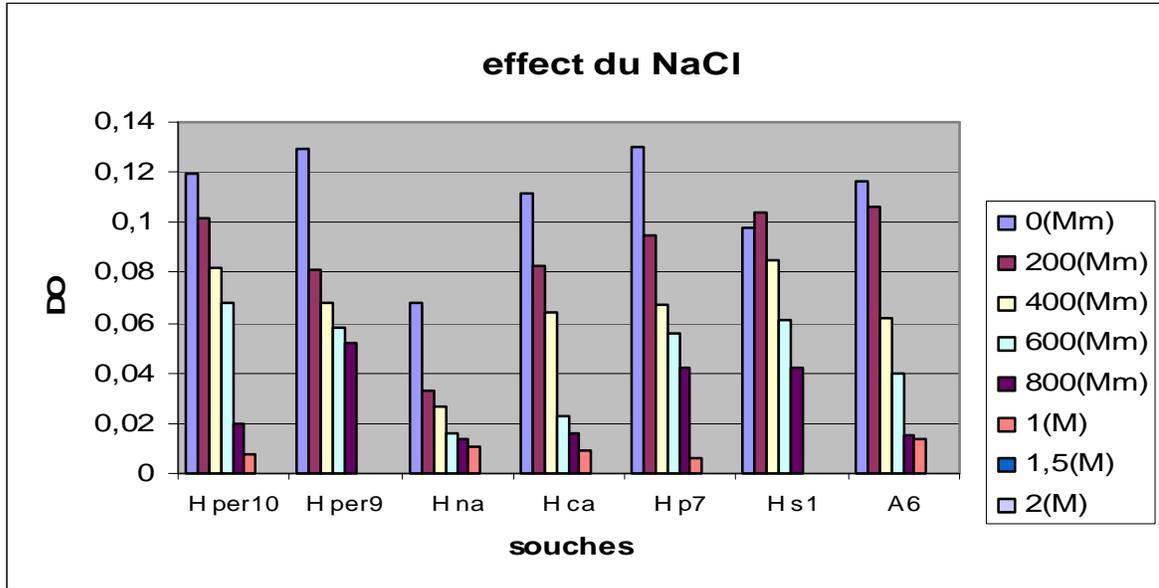


Figure 33 - Effet du Na Cl sur la croissance des isolats

## 2-2-Température de croissance

La plupart des isolats sont capables de croître à une température de 4°C jusqu'à 40°C, et montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 20° à 37°C. Toutefois nos isolats sont capables de pousser à 40°C. Ces résultats rejoignent ceux de Moawad et Beck, (1991) et Jordan (1984), Graham (1992) qui montrent que l'espèce *Rhizobium* cultive bien entre 20°C et 40°C.

Tableau N° 5- Effet de la température

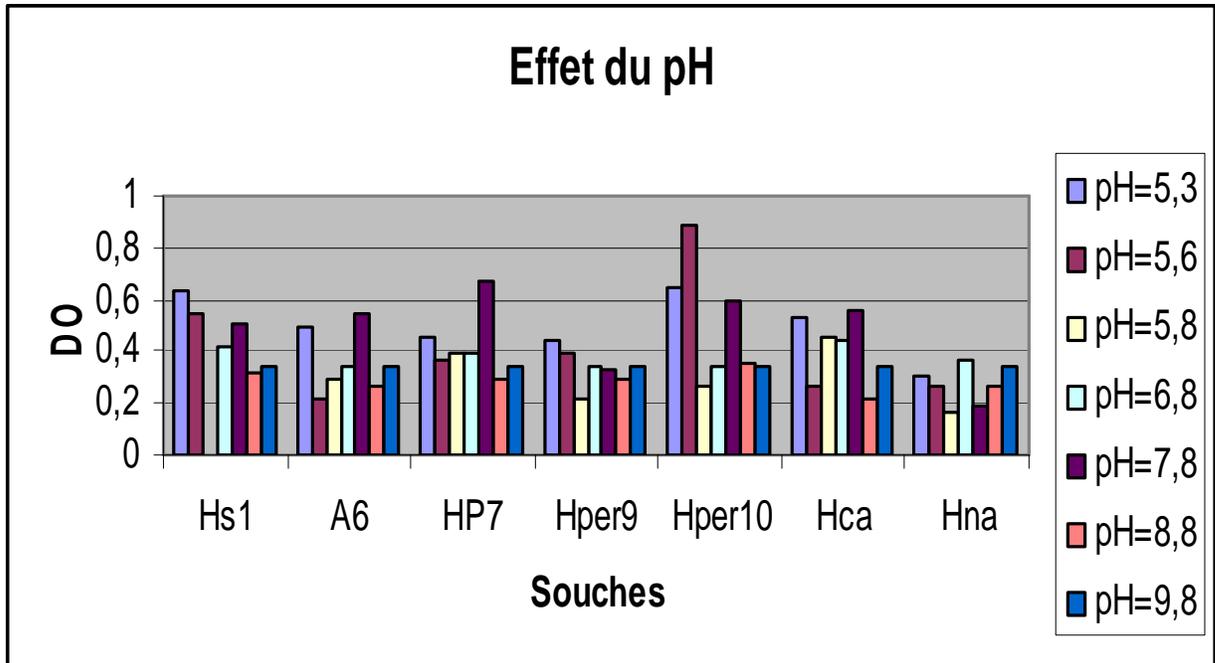
T°C	HS1	A6	Hp7	H per9	H per10	H ca	H na
4	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+
45	-	-	-	-	-	-	-

### **2-3/ Effet du pH**

Cultivés sur milieu liquide (BIII) à différents pH, les souches présentent un optimum aux pH voisins de 7,00. En deçà et au-delà, on observe une légère diminution. Il faut noter que le sol de prélèvement de la plante est voisin de l'alcalinité, donc il n'est pas surprenant que le microsymbiont cultive bien à pH basique.

La culture à pH acide (5,3) est rapportée par de nombreux travaux, qui stipulent que le pH cytoplasmique des souches tolérantes à l'acidité est moins fortement affecté par l'acidité externe (Graham et col. 1994). La tolérance des rhizobia à un pH acide dépend de leur capacité de maintenir un pH intracellulaire entre 7.2 et 7.5, même à un pH acide externe. Des différences dans la composition en lipopolysaccharides, accumulation des polyamines cellulaires (Fujihara 1993) ont été associés avec la croissance des cellules à pH acide. La composition et la structure de la membrane externe pourraient également être un facteur de tolérance au pH acide (Graham et col, 1994).

Hungria et Vargas (2000) ont noté que l'acidité du sol cause un problème important au cours de différentes étapes de la symbiose. Le microsymbiont est généralement le partenaire le plus sensible au pH, certaines souches de rhizobia peuvent tolérer l'acidité mieux que d'autres (Vargas et Graham, 1998).



**Figure 34** - Effet du pH sur la croissance des isolats

### 3- Ecologie des isolats (sensibilité aux métaux lourds et aux rhizobiophages)

En présence de métaux lourds, les souches bactériennes présentent une MIC variable (inhibition à des concentrations de 1000µg/ml pour le Hg et le Cd, et 5000 µg/ml pour le reste des métaux testés). (Tableau N°6). Toutefois les bactéries supportent l'antimoine aux fortes concentrations ; cela est noté chez les bactéries isolées à partir d'autres espèces de *Hedysarum* (Benhizia, 2004 ; Torche, 2006).

Les isolats ont montré une résistance intrinsèque très élevée au Zn, Cu, Pb, Cd. Ces résultats rejoignent ceux de trouvés par Struffi et col (1998) pour les rhizobia à croissance rapide (*Rhizobium sultae*). Les bactéries gram (-) sont tolérantes à des concentrations élevés de métaux lourds, alors que les bacteries gram (+) ne le sont pas (Barkey et col,1985).

Tableau N°6 - Effet des métaux sur la croissance des isolats

Métaux	Concentration (µg)/ml	<i>H per</i>	<i>H ca</i>	<i>H na</i>	A6	Hp7	Hs1
Cu	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	1000	+	+	+	+	-	+
	5000	-	-	-	-	-	-
Zn	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	1000	+	+	+	+	+	+
	5000	-	-	-	-	-	-
Cd	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	1000	-	-	-	-	-	-
	5000	-	-	-	-	-	-
Pb	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	1000	+	+	+	+	+	+
	5000	-	-	-	-	-	-
SBO3	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	1000	+	+	+	+	+	+
	5000	+	+	+	+	+	+
HgCl2	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+	+
	1000	-	-	-	-	-	-
	5000	-	-	-	-	-	-

Après isolement des bactériophages sur de culture fraîche des souches bactériennes, isolées à partir des nodules de la plante *Hedysarum perrauderianum*, indique l'apparition de plages de lyse pour l'ensemble de nos isolats.

Les interactions entre les rhizobiophages et leurs hôtes sont hautement spécifiques et peuvent être un outil valable dans les recherches écologiques avec les rhizobia (Somasegaran et Hoben 1994 ; Vincent, 1970).



**Figure 35-** Plage de lyse

#### **4- Test de nodulation**

La détermination et le suivi de la croissance des isolats sur milieu TY (Beringer, 1974) nous permet seulement de prendre les souches à une phase exponentielle de croissance ( $DO \lambda_{540} = 1,00$ ) pour pouvoir déterminer leurs aptitudes à noduler les graines germées de la légumineuse.



*Hper 10*



*Hper 1*



*Hper 4*



*Hper 7*



*Hper 9*



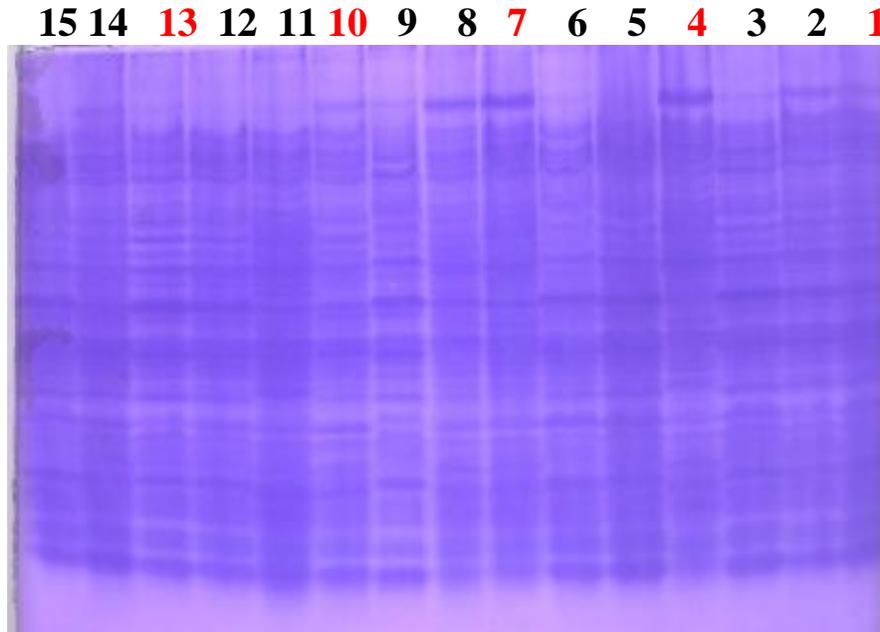
*Hper 8*

**Figure 36** - Racines avec des « pseudo-nodules »

En suivant certains protocoles relatifs à la scarification des graines (temps d'utilisation de l'acide sulfurique) et un temps suffisant pour imbiber les graines scarifiées, les prestations symbiotiques, en conditions aseptiques, des deux partenaires (isolats et Légumineuse *H. perrauderianum*) font apparaître une sorte de « pseudo-nodules » ou palettes, telles que observées chez les autres espèces de *Hedysarum* (Torche, 2006 ; Benhizia, 2004).

## 5/ Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE

A travers le profil électrophorétique SDS-PAGE réalisé selon Laemmli (1970) on remarque un profil unique pour les clusters suivants (*Hper1* et *Hna*), (*Hca* et *Hper5*) et (*Hper8* et *Hs1*), et un polymorphisme total entre les souches suivantes : *Hper 2*, *Hper 3*, *Hper 4*, *Hper6*, *Hper7*, *Hper9*, et *Hper10*

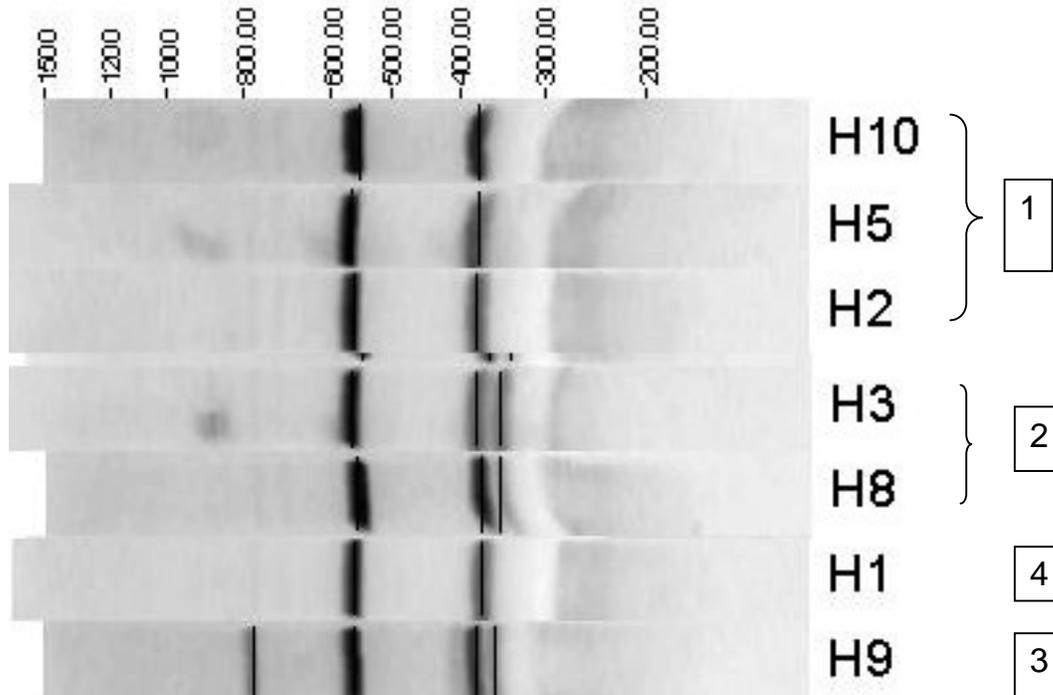


**Figure37** - Profils Electrophorétiques sur gel de polyacrylamide (12%) des protéines totales (Laemmli, 1970)  
 (1-A6 ; 2-*Hper1* ; 3-*Hper2* ; 4- *Hna* ; 5- *Hper3* ; 6-*Hper4* ;7-*Hca* ; 8-*Hper5* ; 9-*Hper6* ; 10-HP7 ; 11-*Hper7* ; 12-*Hper8* ; 13-*Hs1* ; 14-*Hper9* ; 15-*Hper10* )

Ce qui ressort de ce profil des protéines totales, c'est une similitude entre nos isolats (issus des racines de *H. perrauderianum*) et ceux isolés à partir des racines des autres espèces de *Hedysarum*, notamment *H. spinosissimum*, *H. carnosum* et *H. naudinianum* (Torche, 2006).

## 6- Caractérisation phylogénétique des isolats

### 6-1- Profil ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)



(**H1** : *Hper1* ; **H2** : *Hper2* ; **H3**- *Hper3* ; **H5**- *Hper5* ; **H8**- *Hper8* ; **H9**- *Hper9* ; et  
**H10**- *Hper10*)

**Figure 38** - Profil ARDRA après digestion par *CfoI* des isolats

Le profil de l'ADNr amplifié après digestion enzymatique et électrophorèse sur gel Agarose des isolats montre trois clusters avec trois profils différents :

- Le groupe des souches *Hper1*, *Hper2*, *Hper5* et *Hper10* présente un même profil
- Le groupe des souches *Hper3* et *Hper8*
- Le groupe de *Hper9*

Apparemment les souches des groupes 1 et 4 (Figure38) sont un seul et même isolat. Ce qui apparaît également sur le profil SDS-PAGE. Ce n'est pas le cas de *Hper3* et *Hper8* qui donnent un même profil ARDRA mais pas le même en ce qui concerne le profil SDS-PAGE. *Hper9* donne un profil unique, non observé dans la SDS-PAGE.

## 6-2- Le Blast : *H. perrauderianum*

Tableau N° 7- Blast des Isolats.

Isolats	Souche	% similarité
<i>Hper1, Hper2, Hper5, Hper10</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	100%
<i>Hper3, Hper8</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	100%
<i>Hper 9</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%

Les résultats du Blast, en consultant le site NCBI Sequence assimilent les isolats à des Gammaproteobacteria, ce qui est observé chez les bactéries isolées des nodules de *H. naudinianum* (*Pantoea agglomerans.*), *H. spinosissimum* ssp *capitatum* (*Pseudomonas* sp. NZ096.), *H. carnosum* (*Pseudomonas* sp.KD), *H. pallidum* (*Enterobacter kobei* ) Benhizia et col., (2004), Torche (2006).

## Discussion - Conclusion

Nous avons procédé dans ce travail à un isolement et une caractérisation des bactéries nodulant la Légumineuse fourragère *Hedysarum perrauderianum*, tout en suivant une démarche classique, celle appliquée par Vincent (1970, 1982), Somasegaran et Hoben (1994), relative à l'identification des bactéries appartenant aux genres *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Cette démarche se retrouve aussi dans les travaux de Benhizia et col.(2004), Torche (2006), Zakhia et de Lajudie (2004). A travers les résultats obtenus, notamment les caractères phénotypiques, les isolats se comportent pratiquement comme des rhizobia (morphologie des colonies sur YMA, vitesse de croissance, tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*, présence des enzymes spécifiques au processus de nodulation ou au métabolisme de l'azote, ...).

En effet les aspects morphologique et cultural des isolats sur les différents milieux de culture attribuent nos isolats à des souches à croissance rapide, et une morphologie des colonies proche du genre *Rhizobium* tel que décrit par Vincent (1970, 1982), Somasegaran et Hoben (1994), Jordan (1984). Il en est de même pour la croissance des isolats sur milieux spécifiques (absorption du rouge Congo, réaction avec le Calcofluor). Isolées des nodules, ces mêmes souches possèdent les enzymes nécessaires pour infecter la plante et induire le processus de nodulation. Toutefois les prestations symbiotiques ne sont pas très concluantes dans la mesure où le test de nodulation en conditions contrôlées nous donne de pseudo-nodules, que les spécialistes dénomment « palettes » .

Les mêmes observations sont constatées à travers la nutrition carbonée des isolats, azotée ou en présence de vitamines (Jordan, 1984 ; Struffi, 1998 ; Vincent, 1982). Ce constat est observé aussi pour les travaux de Benhizia et col. (2004) et Torche (2006) dans leur étude portant sur le même genre mais les espèces *H. naudinianum*, *H. pallidum*, *H. spinosissimum*, *H. carnosum*.

A travers l'étude écologique, les souches supportent certaines concentrations en métaux lourds (notamment le Hg et le Cd, métaux retrouvés régulièrement dans les sols). D'autre part les isolats sont particulièrement sensibles aux phages contenus dans les extraits de sol prélevés au niveau du site. Ces caractères écologiques sont particuliers aux bactéries nodulant les légumineuses (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

Les facteurs abiotiques révèlent que nos isolats se comportent différemment de *Rhizobium sllae* isolée à partir des racines de la légumineuse du même genre, *H. coronarium* notamment vis-à-vis du pH (cette dernière se cultive bien sur sols calcaires et argileux (Casella et

col., 1984), mais présentent les mêmes profils du point de vue température et NaCl. Pour ce dernier paramètre, nos souches sont sensibles aux concentrations élevées (notamment 1M et plus). En incubant nos isolats au-delà de 40°C, on ne constate aucune croissance. Ce qui n'est pas observé chez les bactéries du genre *Rhizobium*.

En réalisant un profil des protéines totales par SDS-PAGE, il ressort une similitude entre les souches isolées à partir des racines de *H. perrauderianum* et celles isolées des racines des autres espèces du genre *Hedysarum* (*H. pallidum*, *H. spinosissimum*, *H. carnosum*, *H. naudinianum*).

Cette similitude va apparaître dans l'étude phylogénétique des isolats. En effet les profils de restriction RFLP (ARDRA) et le séquençage rejoignent les résultats de Benhizia et col. (2004) et Torche (2006) où les souches étudiées appartiennent à la classe des  $\gamma$ -*Proteobacteria*.

En se référant à la taxonomie polyphasique (Vandamme, 1996 ; Zakhia et de Lajudie, 2006 ; Balachandar et col., 2007), seules les techniques de l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) et le Séquençage de l'ARNr 16S sont discriminatoires pour identifier nos isolats. En effet les méthodes phénotypes sont concluantes pour un comportement de nos isolats proche au genre *Rhizobium* alors que les techniques génotypiques, PCR-RFLP et le Séquençage de l'ARN ribosomique 16S (Woose et col., 1991), déterminent le genre (*Enterobacter* sp.) et l'espèce (*Pantoea agglomerans*).

Dans une perspective future, il est utile de se poser la question relative à la formation de nodules sur les racines de cette légumineuse. Il est possible, à notre point de vue, que la plante, étant endémique à la région de Sétif, se comporterait différemment au laboratoire, ceci d'une part. D'autre part il est aussi utile d'appliquer certaines techniques se retrouvant dans les travaux de Muresu (2008). En effet l'auteur préconise que les bactéries du genre *Rhizobium* existent sous forme de bactéroïdes à l'intérieur du nodule mais ne sont isolables (ou cultivables) sur les milieux de culture conventionnels. Seules l'application de la microscopie électronique et la microscopie par immunofluorescence et certaines réactions antigène-anticorps peuvent mettre en évidence les colonies bactériennes de *Rhizobium* dans les bactéroïdes.

## Références bibliographiques

- Abdelguerfi, A. et Guittonneau, G.G.** (1989)- Morphologie, écologie et répartition de *Medicago heferocarpa* Spach (*M. lesinsii* Small) en Algérie, espèce méditerranéenne du complexe *M. murex* Willd. *Candollea*, **44** : 422-433.
- Abdelguerfi-Berrekia, R., Abdelguerfi, A., Bounaga, N. et Guittonneau, G.G.** (1988) - Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. *Ann. Insf. Nat Agron. El Harrach*, **12** : 191-219.
- Abdelguerfi, A., Chapot, J.Y. et Conesa, A.P.** (1988a) - Contribution à l'étude de la répartition des luzernes spontanées en Algérie, selon certains facteurs du milieu. *Fourrages*, **113** : 89-106.
- Abdelguerfi, A., Chapot, J.Y., Conesa, A.P. et Roseau, R.** (1988b) - Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* en Algérie. I. Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. *Ann. Insf. Naf. Agron. El Harrach*, **12** : 304-328.
- Abdelguerfi-Berrekia, R., Abdelguerfi, A., Bounaga, N. et Guittonneau, G.G.** (1991) - Répartition des espèces spontanées du genre *Hedysarum* selon certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages*, **126** : 187-207.
- Alazard, D.** (1985)- Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *App. Environm. Microbiol.* **50** : 732-734.
- Allen, O. N. and E.K. Allen.** (1981) - *The Leguminosae*, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Madison
- Altschul S.F., Gish W., Meyers E.W., Lipman D.J.** (1990) - Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Amarger, N., Marcheret, V., and Laguerre, G.** (1997) - *Rhizobium gallicum* sp. Nov. and *Rhizobium giardinii* sp. Nov. from *phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47(4)**: 996-1006.
- Audenaert K, Pattery T, Cornelis P & Hofte M.** (2002) - Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**: 1147-1156.
- Bà, S., Willems, A. de lajudi, P., Roche, P., Jeder, H., Quatrini, P., Neyra, M., Ferro, M., Prome, J.C., Gillis, M., Boivin-Masson, C and Lorquin, J.** (2002) - Symbiosis and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp *raddiana* in Africa. *Syst. Appl. Microbiol.* **25(1)**: 130-145.
- Baattout 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'état. Orsay. France, Université de Paris.

**Balachandar. D. Balachandar, P. Raja, K. Kumar and SP. Sundaram.,** (2007) - Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. **2** (2) : 049-057

**Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad P, Flament P, Galuxy P, Génier G, Muel X, Toureur J, Dénarié J et Huguet T.**(1990) - *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep.* **8**: 40-49.

**Beck D.P., L.A. Materon., F. Afandi.** (1993) - paractical Rhizobiyum- Légume. *Technology Manual.* P.290.ICARDA. Syria.

**Béna, g., Lyet, A., Huguet,T and Olivieri, I.,** (2005) -*Medicago-Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the géographic expansion of the *Medicago*. *.J.Evol.Biol.* **18** :1547-1558.

**Benguedouar, A., Corich. V, Giacomini. A, Squartini . A, et Nuti. M.P ;** (1997) - characterzation of symbiotic bacteria from the mediterranean crop *Hedysarum coronarium* (Sulla) by multilocus enzymes electrophoresis. *Agro. Med.,* Vol **127**, 73-177.

**Benguedouar, A.** (2000) - Contribution à l'étude de la symbiose légumineuse : caractérisation de l'espèce *Rhizobium* «*hedysari*» nodulant la légumineuse *Hedysarum Coronarium* .Thèse de doctorat d'état en biologie appliquée. Université de Constantine.

**Benhizia .Y. Torche.A.**(2006) - Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bacteries associées aux nodules de la légumineuse du genre *hedysarum* :*H carnosum Desf., H spinosissimum subsp.capitatum Desf. et H. pallidum Desf.*

**Ben Romdhane S, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M & Ghorbal MH.** (2005) - Diversity of *Acacia tortilis* rhizobia revealed by PCR/RFLP on crushed root nodules in Tunisia. *Ann Microbiol* **55**: 249–258.

**Bensalem, K., Abdelguerfi, A. et Abdelguerfi-Berrekia, R.** (1988) - Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Scorpiurus* L. en Algérie. I. Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. *Ann. Inst. Nat. Agron.* El Harrach, **12** : 219-303.

**Bensalem, K., Abdelguerfi, A. et Abdelguerfi-Berrekia, R.** (1990) - Relations du genre *Scorpiurus* L. avec certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages,* **124** : 407-419.

**Benson, D. R and Silvester. W.B.** (1999) - biology of *frankia* strains, actinomycete symbionts of actnorhizal plants. *Microbiological Reviews.* **57(2)** : 293-319.

**Beringer, J.E.** (1974 ) - R-factor tranfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol*

**Bernaerts, J.E., J. De Ley** (1963) - A biochemical test for crown gall bacteria.

- Boivin , C., Giraud, E.,L.R., Malpica,C.A., and Rosenberg, C. (1997)** - Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite presente in legumes. *Journal of Bacteriology*. **173(9)** : 2809-2817.
- Boivin , C and Giraud,E.( 1999)** - Molecular symbiotic characterisaton of rhizobia: Toward a polyphasic approach using Nod factors and nod genes.In: highlights of Nitrogen Fixation Research. Eds.by Martinez-Romero E, and Hernandez ,G .Kluwer Academic Plenum Publishers: New York.295-299.
- Bonciarrelli F., Monotti M.(1976)** - Una nuova varieta d sulla (*Hedysarum coronarium* L) Rv. Di Agrn. **10** :1-2.
- Boussaid M., Benfadhel N.n Balazsy S., Kecskes M.(1995)** – les espèces méditerranéennes du genre *Hedysarum* l.In : BRG/NRA, ed. Ressources génétiques des plantes fourrafères et à gazon. France.
- Bowen G.D. (1973)** - *Mineral nutrition of octomycorrhizae. Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology*. G.C. Marks and T.T. Kozlowski, ed., Academic Press, New York and London, 151-197.
- Brundu G, Camarda I, Caredda M, Garau G, Maltoni S & Deiana P. (2004- )** A contribution to the study of the distribution of *Medicago–Rhizobium* symbiosis in Sardinia (Italy). *Agr Med* .**134**: 33–48.
- 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.
- Broughton, W.J., (1984)** - Nitrogen fixation: Legumes. *The Journal of Chartto and Windus* 2Td londress.117.
- Casida, L.E.Jr.,(1982)** -*Ensifer adhaerens*,gen.nov.,sp.nov.:A bacterial predator of bacteria in soil.*Int. J.Syst.Bacteriol.***32**:39-345.
- Chen,W. X., Yan,G.H., and Li, J.L.,(1988)** - Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to snorthizobium gen. nov . *Lnt. J. Syst.Bacrobiol.* **59**:1798-1804.
- Chen,W ., Wang, E., Wang, S., Li,Y., Chen, X.and Li,Y, (1995)** - Characterisation of *Rhizobium tiashanense* sp . nov. a moderately and slowly growing root nodue bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people’s republic of China .*Int.J.Syst.Bacterol.***45(1)**:153-159.
- Chen, W.X.,Tan, Z.Y., Gao,J.L.,Li,Yand wang, E.T., (1997)** - *Rhizobium hainanense* sp.nov.,isolated from tropical legumes.*Int.J.Syst.Bacteriol.* **47 (3)** : 870 -873.

**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.

**Csonka L.N., et Hanson A.D** (1991) - Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology .*Annu. Rev. Plant Physiol.* **45**: 569-606.

**Cullimore JV, Ranjeva R et Bono JJ** (2001) Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* **6**: 24-30.

**Dangeard, P.A.,**(1926) . Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses. Le Botaniste, Paris.

**Davey , M.R., Webster, G., Manders, G., Ringrose, F.L., Power, J. B., and Cocking, E.C.,** (1993) - Effective nodulation of micro-propagate shoots of the non- legume *Parasponia andersonii* by *Bradyrhizobium*. *Journal of experimental botany.* **44 (262)** : 863-867.

**Dazzo, F.B.** (1984) - Leguminous root nodules. In: *Experimental Microbial Ecology*. Editors by R. Burns and J. Staler, Blackwell Scientific Publications. Oxford.

**De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI et Sutherland JM** (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607-619.

**De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewetting D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kesters K., and Gills M ,**(1994) - Poluphasic taxonomy of Rhizobia : Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium melilot* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. Nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov. *Int .J.Syst. Bacteriol.* **44** : 715-733.

**De Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M.T., Lindstrom K., dreyfus B and Gills M** (1998a ) - Characterisation of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. Nov nt.*J. Syst. Bacteriol.* **48** : 369-382.

**De Lajudie P., Fulele-Laurent E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Dreyfus B., Kesters K., and Gills M ,**(1998b) - Description of *Allorhizobium undicola* gen. Nov.sp. For nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal. *Int . J. Syst. Bacteriol.* **48** : 1277-1290.

**De Meyer G, Capiou K, Audenaert K, Buchala A, Metraux JP et H'ofteM .** 1999- Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol Plant-Micr Interact* **12**: 450-458.

**Dénarié,J., Debelle .F., and Promé,J.C.,** (1996) - *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors : Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 503-535.

**Dobereiner , J., Baldani, V .L.D ,and Reis,V.M.** (1995) - Enophytic occurrence

of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: *Azospirillum VI* and related microorganisms. Ed. By I.Fendrik, M.del gallo, J.Vanderleyden and M.de Zamarocy. Springer verlag, Berlin, Germany.p. 3-14.

**Doignon-Bourcier F., Willems A., Torck U., Dreyfus B., Gills M and de Lajudie P,** (1999) - Diversity of bradyrhizobia from 27 tropical Leguminosae species native of senegal. *Syst.Appl. Microbiol.* **22** : 647-661.

**Dommergues Y, B. Dreyfus B, Hoang Gla Dlem et E. Duhoux.** (1985) - Dans *Ecology*.**72** (3) ,1080-1081. La Recherche N°162.

**Dommergues, Y.,Duhoux ,E., and Diem ,H.G.,**(1999) - Les arbres fixateurs d'azote : caractérisation fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Éditions espaces 34 (CRAD, FAO ; IRD).

**Dreyfus , B., Garcia, J.L., and Gills, M.,**(1988) - Characterisation of *Azorhizobium caulnodans* gen.sp. nov., a stem nodulating fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int.J. Syst.Bacteriol.***38(1)**: 89-98.

**Dupuy, N.A., Willems,A.,Pot,B., Dewettinck,D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan,G.,Greyfus, B., Kesters, K., Collins, M.T., and Gillis, M.,** (1994) - Phenotypic and genetic characterisation of Bradyrhizobia noduling the legumeinous tree *Acacia albida* . *Int.J. Syst. Bacteriol.* **44**: 461-473.

**El Essawi, T. M. et A.S.Abdelghaffar,** (1967) - Cultural and symbiobiotic proprties of rhizobia from egyptian Clover (*Trifolium alexandinum*). *J. Appl. Bact.* **30 (2)**: 354-361.

**Epstein, E.** (1972) - Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. John Wiley, New York.

**FERCHICHLA,** (2006)- workshop International « Diversité des Fabaceae Fourragères et de leurs Symbiotes » -Alger- Academic Publ.**39** :51-75.

**Firmin , J.L.,Wilson, K.E., Carlson, R.W.,davies, A.E., and Downie, J.A,**(1993) - Resistance to nodulation of afghanistant peas is ocercome by *nodX*, which mediates and O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-olgosaccharide nodulation factor.*Mol. Microbiol.***10**: 351-360.

**Fernand Wathman .**(1967) - fleurs du bassin méditerranéen. Paris VI edition:

**Foth, H. D.,** (1990) - Fundamentals of soil science. Henry, D. Foth (ed), John Wiley & sons, New York. 336p.

**Frank, B,** (1879) - Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen.Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.**7** :332-346.

**Gao, J.L., Turner, S.L., Kan , F.L., wang, E.T., Tan, Z.Y.,Qu,Y.H.,Gu,J., Terefework ,Z.,Young, J.P.W., Lindstrom , K. and Chen, W. X .,**(2004) – *mesorhizobium septentionale* sp. Nov. And *Mesorhizobium temperatum* sp. Nov.isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China.*Int. J.Syst.Evol.Microbiol.* **54**: 2003-2012.

**Gage DJ** (2004) - Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**: 280-300.

**Garcia- Fral , Paula, Rivas ,Raul , Willems, Anne ,Pex, Alvaro, Martens,Miet, Martinez-Molina, Eustoquio, Mateos, Pedro F., Velazquez, Encarna.** (2007) -*Rhizobium cellulosityticum* sp . nov., isolated from sawdust of *Populus alba* nt *J Sys. Evol.Microbiol.***57**: 844-848.

**Ghosh , W., and Roy, P.,**(2005) - *Mesorhizobium thiogangeticum* sp. Nov. a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 91-97.

**Gloux ket Le Rudulier. D.** (1989) - Transport and catabolism of praline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti*.*arch. microbial.***151** : 143-148.

**Graham P.H.** (1994) - Legume nodule symbioss. Methods of soil analysis. Part2 Microbiological and biochemical properties. Books series N°5. p.199-221. Madison. USA.

**Graham, P.H. ; M.J. Sadowsky ; H.H. Keyser ; Y.M. Barnet ; R.S. Bradley ; J.E. Cooper ; D.J. De Ley ; B.D.W. Jarvis ; E.B. Roslycky ; B.W. Strijdom ; and J.P.W. Young .**(1991) - Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int.J. Syst. Bacteriol.* **41**: 582-587

**Graham, P.H.** (1992) - Stress tolerance *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. microbial.***38**: 475-484.

**Graham PH et Vance CP.,** (2003) - Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**: 872-877.

**Greuter, W., H. M. Burdet et G. Long .**(1989) - MED-CHECKLIST. Conservatoire & Jardin botaniques de la Ville de Genève. 4-108

**Hageman, R. H.** (1984) - Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. In. Nitrogen in crop production. ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA, 67-85.

**Handberg K et Stougaard J** (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* **2**: 487-496.

**Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Boussaid M., Marrakchi M., Triffarah N.** (2004) – Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen .IPGRI-FAO ,130 : 65-72.

**Hardy .R.W.F, E.Jr. Knight.** (1968) - The biochenistry and postulated mechanisms of N<sub>2</sub> fixation. In "Progress in Phytochemistry" (L. Reinhold, ed.), 387-469.

**Hirsch AM, Lum MR et Downie JA** (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**: 1484-1492.

- Hrish, A.M.**, (1992) - Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**: 211-237.
- Haynes, R. J.** (1986) - Origin, distribution and cycling of nitrogen in terrestrial ecosystems. In: *Mineral nitrogen in the plant-soil system*. R. J. Haynes (Ed.) 1-15, Academic Press, Orlando.
- Hofer, A.V.** (1941) - *J. Bacteriol.* **41**: 193-224
- Hopkins, W. G.** (2003) - *Physiologie végétale*. Université des Sciences de Lille. Edition de boeck. P 99-120.
- Hynes, M. F, and O'Connell, M.P.**, (1990) - Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.* **36**: 864-896.
- Jarvis, B.D.W., pankhurst, C.E., and Patel, J.J.** (1982) – *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 378-380.
- Jordan, D.C.** (1982) – transfert of *Rhizobium japonicum* buchanan to *Bradyrhizobium* gen. nov. A genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. syst. Bacteriol.* **32**: 136-139.
- Jordan, D.C.** (1984) - Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.1 the Williams & Wlkins Co. Baltimore.
- Jourand, p., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M.; Dreyfus, B., and de lajudie, P.** (2004) – *Methylobacterium nodulans* sp. Nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root- nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2269-2273.
- Kennedy, I.R, Pereg-Gerk, L.L, Wood, C., Deaker, R, Gilchrist, K., and Katupitiya, S.** (1997) - Biological nitrogen fixation in non-leguminous Field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *azospirillum* and wheat. *Plant and soil.* **194**: 65-79.
- Kesters K., and de Ley J,** (1980) - Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their protins. In: *Microbial classification and identification*. Ed. by Goodfellow M. and boards. Academic Press. London. UK.
- Kesters K.**, (1985) - Numerical methods in the classification of bacteria by electrophoresis of their protins. *Computer- assisted bacterial systematic*. Academic press, London. UK. pp.273-297.
- Kirchner, O.**, (1896) - Die Wurzelknollchen der Sojabohne. *Beitr. Bol. Pflanz.* **7** : 213-224.
- Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'Neill, J.J., and Devne, T.E.**, (1988) – Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. j. Syst. Bacteriol.* **38**: 351-358.

**Laemmli, U.K.**(1970) - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

**Lamaze, T.; S. Khamis; C. Foyer; J. Farineau; M. H. Valadier et J. F. Morot-Gaudty** .(1990) - Effet d'une limitation en N sur la photosynthèse chez le maïs. In : *Physiologie et production du maïs*. INRA, Paris, 113-121.

**Leclerc, H., J. L Gaillard ; M. Simonet.** (1995) – *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien* . DOIN EDITEURS. P 412-415.

**Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Prome JC,Denarie J** (1990) - Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.

**Lindström, K. And S. Lehtomäki** .(1988) - Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**: 277-287.

**Lindstrom,K.,** (1989) - *Rhizobium galgea*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int.J.syst. bacteriol.***39(3)**: 365-367.

**Long, S.R.,** (1996) - *Rhizobium* symbiosis : nod factors in perspective. *Plant cell.***8**: 1885-1898.

**Lotet, G., Mear, N., Lorquin,J., dreyfus, B., de lajudie, p., Rosenberg, C and Boivin, C.,**(1996) – nod factor thin- layer chromatography profiling as tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *S. Teranga* and *Rhizobium* sp strains isolated from *Acacia* and *Sesbania* . *Mol. Plant-Microbe Interact.***9**: 736-747.

**Marchesi J.R., Sato T., Weghtman 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. *App. Environ. Microbiol.* **64**: 795-799.

**Martinez-Romero, E.,Segovia, L., Martins-Mercante, f., Franco,A.A., Graham, P.,and pardo,M.A,**(1991) -*Rhizobium tropici*,a novel spices nodulating *Phaseolus vulgaris* l.beans and *Leucaena* sp. *Trees.Int.J.Syst.bacteriol.***41**:417-426.

**Mateos, P. F., J.I. Jmenez-Zurdo, J.Chen, A. S.Squartini, S.K.Haack , E.Martinez-Molina, D. H. Hubbell, et F. B.dazzo.** (1992) - Cell- associated pectinolytic and cellulosic Enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Mcrobiol.* **58 (6)**:1816-1822.

**Maxted et Bennett, S.J,** (2001a) - Conservation, diversity and use of Mediterranean Legumes. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Maxted N, and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht , Netherlands, Kluwer Academic Publ.**39**:1-32.

**Maxted et Bennett, S.J,** (2001b) - Legume diversity in the Mediterranean region. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Maxted N and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ.**39**: 51-75

- Mhamdi R, Mrabet M, Laguerre G, Tiwari R, Aouani ME.** (2005) - Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium* like strains. *Can. J. Microbiol.* **51**:105-111.
- Miller K J., J.M Wood.** (1996) - Osmoadaptation by rhizosphère bacteria. *Ann. Review. Microbiol.*, **50** : 101-136.
- Mobley L.T.H.** (1992) - Urease microbial, *In* J. Lederbrg (ed), *Encyclopaedia of microbiology.* Academic Press. Inc. Vol4. P.327-346
- Moulin, L., Munve, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C.,**(2001) - Nodulation of legumes by members of  $\beta$  subclass of Proteobacteria . *Nature.* **411**: 948-950.
- Moulin .L.** (2002) - Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène nodA à l'identification de rhizobia au sein des bêta-Protéobactéries. Thèse de doctorat des sciences biologie. Université CLAUDE BERNARD-LYON I. France. pp.289.
- Mulongoy, K., et G. H. Elkan,** (1977) - Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen fixing efficiency. *J. Bacterial.* **131**: 179-187.
- Muresu. R., Polone E., Sulas. L., Baldan., Tondello.A., Delogu .G., Cappuccinelli. P., Alberghini. S., Benhizia.Y., Benhizia.H., Benguedouar.A., Mori. B., Calamassi.R.,Dazzo F.B., et Squartini .A.**(2008) - Coexistence of predominantly nonculturable rhizobiawith diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol Ecol.* 1-18.
- Newton, W.R** (1998) - Nitrogénase : fonction et évolution. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **13** : 238-241.
- Ngom , A., nakagawa,Y., sawada,h., Tsukahara,J., Wakabayashi,S., Uchiumi,T., Nuntagij,A., Kotepong, S., suzuki,A Hgashi,S.,and Abe,M.,** (2004) - A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the Ochrobactrum clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. appl. Microbiol.* **50(1)**: 17-27.
- Nick G., de Lajudie P., Eardly B.D., Suomalainen S., pauln L., Zhang X., Gillis M., And Lindstrom K,** (1999) - *Sinorhizobium arboris* sp. Nov. And *Sinorhizobium kostiense* sp. Nov. Isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49** : 1356-1368.
- Nour, S. M., Fernandez, M.P., Normand, p., and Cleyet-Marel, J.C.,** (1994) *Rhizobium ciceri* sp.nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J . Syst. Bacteriol.* **44 (3)**: 511-522.
- Osborn A.M, Moore E.R.B., Timmis K.N.,** (2000) - An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysys for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2** : 39-50.
- Paau AS, Bloch CB & Brill WJ .**(1980) - Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **143**: 1480–1490.

- Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S ,et Iaccarino M .(2004)** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* . **234**: 201-262.
- Pelmont J.** (1995) – Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. Vol 2. p. 541-572. Office des Publications .Universitaires.
- Perret , X.; Staehe Lin, C., and Selander, R.K.,** (2000) – Molecular basis of symbiotic promiscuity.*Microbiol. Mol.Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Peret, B.** (2007) - Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III (France)
- Peter M.Kopittke , Peter J. Dart, Neal W.Menzies.,(2005)** - Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*)
- Polhill, R. M., Raven, P.H.; and Stirton, C. H.,(1981)** -. Evolution and systematic of Leguminous. In: Advances in legume Systematics. Eds. Polhill, R.M, andRoyal, P. P. Botanic Gardens, Kew, UK.
- Postgate J.R.** (1974 ) - Evolution within nitrogen-fixing systems. Symposia of the Society for General Microbiology, **24**: 263-292.
- Quan, Z.x., Bae, H.S.,Baek,J.H., Chen, W.F., Im,w.T and Lee, S.T. ,(2005)** - *Rhizobium daejeonense* sp nov. Isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int. J. Syst. evol .Microbiol* .**55**: 2543-2549.
- Quezel. P., S Santa.** (1962) - nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. p.462-541.CNRS.
- Radeva, G., Jurgens, G., Niemi, M., Nick, G., Suominen, L., and Lindstrom, k,(2001)** - Description of two biovar in the *Rhizobium galgae* species: biovar *orientalis* and biovar *officinalis*. *Syst.Appl. Microbiol.* **24(2)** :192-205.
- Rasolomampianina R, Bailly X, Fetiarison R, Rabevohitra R, Bena G, Ramaroson L, Raherimandimy M, Moulin L, DeLajudie P, Dreyfus B .(2005)** - Nitrogen fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp) endemic to Madagascar host seven different genera belongs to \_ and \_ Proteobacteria. *Mol. Ecol.* **14** : 4135-4146.
- Reinhold-Hurek, B., and Hurek, T** (1997) - *Azoarcus* spp.and their interaction with grass roots. *Plant and Soil.***194** : 57-64.
- Reinhold-Hurek, B., and Hurek, T.** (1998) - Life grasses : diazotrophic endophytes. *Trends. Microbiol.***6** : 139-144.
- Rinaudo, g., Orenga, S., Fernandez,M.P., Meugnier, H ang bardin,R .,(1991)** - DNA homolges among members of the genus *Azorjizobium* and other tem and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*.*Int.J. Syst.Bacteriol* . **41** :114-120.
- Rivas , R., Velazquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba- Rao, N.S., Mateos,P.F., Gillis, M ., Dazzo, F.B., and Martinez-Molina, E.,** (2002) – a new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.F) Druce. *Appl. Environ .Microbiol.* **68** :5217-5222.

**Rivas , R., Willems, A., Subba-Rao,N.S., Mateos ,P.F., Dazzo, F.B., Kroppenstedt , R.M ., Martinez- Molina, E., Gillis, M.,and Velazquez ,E .,(2003) – Description of *Devosia neptunia* sp. Nov. That nodulates and fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India .Syst.Appl.Microbiol. **26** : 47-53.**

**Rivas , R., Willems, A., Palomo,J.L., Garcia-Benavides,P., Mateos ,P.F., Martinez-Molina, E., Gillis, M.,and Velazquez ,E.,(2004) – *Bradyrhizobium betae* sp . nov. Isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations .Int. J. Syst. Evol.Microbiol. **54**: 1271-1275.**

**Roberts G.P., Leps WT., Silver L.E and Brill W.J. (1980) - Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and calssify *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol. **39(2)** : 414-422.**

**Rodriguez, J., J.R.J. Freire, et I. Schrank.(1987) - Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*.Mircen Journal.**3** : 289-295.**

**Rome , S., Fernandez, M.P ., Brunel, B., Niormand, P and Cleyet-Marel,J.C.,(1996) – *Sinorhizobium medicae* sp. Nov. Isolated from annual *Medicago* spp. Int.J.Syst.Bacteriol. **46(4)**: 972-980.**

**Rubio LM et Ludden PW (2005) Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. J Bacteriol. **187**: 405-414.)**

**Scholla , M.H., and Elkan,G.H., (1984) - *Rhizobium fredii* sp . nov. a fast- growing species that effectively nodulate soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**:484-486.**

**Schultze M, Kondorosi A .(1998) - Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. **32**: 33-57.**

**Segovia , L.,Young,P.W., and Martinez-Romero,E., (1993) -Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseol* type Istrains as *Rhizobium etli* sp .nov.Int.J.Syst. Bacteriol.**43(2)**:374-377.**

**Silvester, W.B. K.J. Bennett. (1973) - *Acetylene reduction by roots and associated soil of new zealand conifers*. Soil Biol. Biochem. **5**: 111-179.**

**Sofia Caçoilo Cortceiro , Ana Isabel Gusmao Lima, Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira .(2005) - The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminasorum* biovar *viciae* undert Cd exposure.**

**Somasegaran. P et Hoben H. J (1994) - Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc . p.450.**

**Spaink, H.P., Arts,A., Stacey,G., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J ., and Kennedy, E.P., (1992) - Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin layer chromatography.MPMI. **5 (1)** : 72-80.**

**Squartini A., Struff, P., Doring, H., Selenska-Pobel, S., Tola, E., Giacomini, A., Venramin, E., Velazquez, E., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Dazzo, F. B., Casella, S and Nuti, M.P., (2002) – *Rhizobium sullae* sp nov ( Formerly *Rhizobium hedysari* ), the root- nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. Int.J.Syst. Evol. Microbiol. **13**: 821-831.**

**Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J et May GD., (2006) - Genetics and functional genomics of legume nodulation. Curr Opin Plant Biol. **9**: 110-121.**

**Stevenson, J. F (1986) - Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. John Wiley & Sons, New York.**

**Struffi, P., V. Corich ; A. Giacomini ; A. Benguedouar ; A. Squartini ; S. Casella ; M.P. Nuti .(1998) - Metabolic properties, stress tolerance and macromolècular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. J. Appl. Microbiol. **84**: 81-89**

**Swaraj K., et Bishnoi N.R (1999) - Effet of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. Indian J. Exp Biol. **37 (9)** :843-848.**

**Sy , A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de lajudie, P., Prin, y ., Neyra, M ., Gillis, M ., Boivin –Masson, C., and Dreyfus, B ., (2001) – Methylo trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fx nitrogen in symbiosis with legumes. J. Bacteriol. **183** : 214-220.**

**Tan , Z.Y., Wang, E.T., Peng, G.X., Zhu, M. E., Martinez-Romero, E., and Chen, W.X., (1999) - Characterisation of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. Int. J. Syst. Bacteriol. **49** :1457-1469.**

**Tan , Z.Y., Kan, F.L., , Peng, G.X., Wang, E.T., Reinhold-Hurek ,B., and Chen, W.X. (2001)- *Rhizobium yanglingense* sp .nov. isolated from ard and semi-arid regions in China .Int. J.Syst. Evol. Microbiol. **51**: 909-914.**

**Teather, R.M., Wood, P.J. (1982) - Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. **43**: 777-780.**

**Timmers ACJ, Soupe`ne E, Auriac MC, de Billy F, Vasse J, Boistard P et Truchet G .(2000) - Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. Mol Plant–Microbe Interact **13**: 1204–1213.**

**Toledo, I., Lloret, and Martinez-Romero, E., (2003) - *Sinorhizobium americanum* sp. nov. a new *Sinorhizobium speaies* nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. Syst. Appl. Microbiol. **26**: 54-64.**

**Torche, A. (2006)- Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister. Département de Biologie. Université de Constantine.**

**Trefework, Z., Nick, G .Suomalainen, S., Pauln, L., and Lindström ,K .,(1998) - Phylogeny of *Rizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. Int. j. Syst. Bact **48** :394-356.**

**Trinick, M.J., and Hadobas, P.A.,** (1989) - Competition by *Bradyrhizobium* strains for nodule formation of the non-legume *Parasponia andersonii* .Appl. Environ. Microbiol.**55** (5):1242-1248.

**Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A, Planchuelo, A.M? Rivas R., Ludena ,D, Mateos, P.F., Martinez-Molina, E.,and Velazquez, E.,** (2005) - Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl. Environ.Microbiol. **71**: 1318-1327.

**Trüper, H.G, and de Clari, L.,** (1997) -Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in “apposition”.Int. J. Bacteriol. **47**:908-909.

**Turner, S. L., Zhang, X.X., Li, F.D., and Young, P.W.,** (2002) - What does a bacterial genome sequence represent? Mis-assignment of MAFF 303099 to the genus *Mesorhizobium loti*. Microbiology. **148**: 3330-3331.

**Udvardi MK, Tabata S, Parniske M et Stougaard J** (2005) Lotus japonicus: legume research in the fast lane. Trends Plant Sci. **10**: 222-228.

**Valverde, A., Velazquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., and Igual, J.M.,** (2003) - *Herbaspirillum* sp.nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris* Int. J.Syst. Evol.Microbiol. **53**: 1979-1983.

**Valvaerde, A., Valazquez, E., Fernandez-Santos, F., Vizcaino, N ., Rivas ,R .,Mateos ,P. F., Martinez-Molina ,E., Igual J. M., and Willems ,A.,** (2005) -*Phyllobacterium trifolii* sp nov nodulating *Trifolium* and *lupinus* in Spanish soils Int j Syst Evol MICROBIOL . **55**: 1985-1989.

**Van Berkum , P., and Eardly , B.D .,** (1998) - Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae* .The *Rhizobiaceae* .eds .Spaink H.P ., Kondorosi A., and Hooykaas P.J.J. Dordrecht Kluwer academics.

**Van Berkum , P .,and Eardly B.D .,**(2002) -The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica* .Appl. Environ .Microbiol. **68**: 1132-1136.

**Vandamme P. Pot B., Gllis M., De Vos P., Kesters K., and Swings J,** (1996) - Polyphasic taxonomy , a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. **60** : 407-438.

**Vandamme ,P., Goris ,J., Chen W.M de Vos P and Willems A .,**(2002) -*Burkholderia tuberum* sp nov and *Burkholderia phymatum* sp .nov. nodulate the root of tropical legumes Syst. Appl. Microbiol .**25**(4): 507-12.

**Vanechoutte,M., Kampfer P., De Baere T., Flasen E., and G., Verschraegen .,**(2004) - *Wautersia* gen .nov. a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al1990) comb .nov . Int. J. Syst Evol. Microbiol. **54** : 317-327.

**Van Rhijn P and Vanderleyden . J.,** (1995) -The *Rhizobium* plant symbiosis Microbiological. Reviews. **59(1)**: 124-142.

**Velázquez, E., Igual, J.M., Willems, A., Frenandez, M.P., Munoz , E .,Mateos , P.F ., Abril A., Toro, N., Normand, P ., Cervantes, E., Gillis, M., and Martinez-Molina , E.,** (2001) - Mesorhizobium chacoense sp nov a novel species that nodulates Prosopis alba in the Chaco Arido region (Argentina).Int J Syst Evol Microbiol. **54** :1011-1021.

**Venuesa, P., Silva, C., Martínez-Romero, E., Werner,D., Leon-Barrios, M., Jarabo-Lorenzo, A ., Perez- Galdona , R ., and Willems A.,** (2005) - *Bradyrhizobium canariense* sp, nov, an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium genospecies* alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta Int J.Syst. Evole . Microbiol .**55**: 569-575.

**Villegas, M.D. C., Rome S., Maure L., Domergue , O., Gardan L., Bailly , X Cleyet-Marel, J.C., and Brunel B.,** (2006) - Nitrogen-fixing sinorhizobia with Medicago lacnta constitute a novel biovar (bv.b medicaginis)of S.meliloti .Syst .Appl. Microbiol. **128** : 58-64.

**Vincent, J.M.** (1970) - A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

**Vincent, J.M.,**( 1982) - Nitrogen fixation in legumes. Academic .Press .Australia.

**Wei, G.H, Wang , E.T., Tan, Z.Y.,, Zhu, M.E., and Chen , W.X.,** (2002) - *Rhizobium indigoferae* sp. nov., and *Sinorhizobium kummerowiae* sp nov ., respectively isolated from *Indigofera spp*, and *Kummerowia stipulacea*.int., J.Syst.Evol.Microbol. **52**: 2231-2239.

**Wei, G.H., Tan, Z.Y., , Zhu, M.E., Wang E.T., Han, S.Z., and Chen , W.X.,**(2003) - Characterization of rhizobia isolated from legume species with the genera Astragalus and *Lespedeza* grown in the Loess Pilateau of Chna and description of *Rhizobium loessense* sp nov. Int. J.Syst. Evol. Microbiol. **53**: 1575-1583.

**Young, J.P.W., and Johnston, A.W.B.,** (1989) - The evolution of specificity in the legume - rhizobium symbiosis. Trends Ecol.Evol.**4** : 341-349.

**Wang, E.T.,Van berkum, P., Beyene, d., Sui,X.H.,Dorado,O., Chen, W.X, and Martinez-Romero,E ,** (1998) - *Rhizobium huantlense* sp. Nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*.Int. J.Syst. Bacteriol.**48**: 687-699.

**Wang, E.T., Rogel,M.AGarcia de Lassantos, A., Martinez- Romero, J., Cevallos , M.A., and Martnez-Romero,E.,**(1999) - *Rhizobium etli* bv. Mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis* .Int.J.syst.Bacteriol.**49** : 1479-1491.

**Wang, E.T.,tan, Z.Y., Willems,A., fernandez-Lopez, ., M.,Reinhold-Hurek, B., and Martnez-Romero,E.,** (2002) - *Snorhizobium morelense*sp nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is gighly resistant to multiple antibiotics.Int. J.Syst.Bacteriol. **52**:1687-1693.

**Wang, Feng Qin, Wang, En Tao, Liu, Je, Chen, Qiang, Sui, Xin Hua, Chen, Wen Feng, Chen, Wen Xin.**(2007) – *Mesorhizobium albiziae* sp, nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China . Int J . Evol . Microbiol.**57**: 1192-1199.

**Werner. D.,** (1992) - symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Acad sin: 39.

**Werquin, M; H.W. Ackermann; R.C. Levesque.,** (1988) - A Study of 33 Bacteriophages of *Rhizobium meliloti*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY .American Society for Microbiology.

**Xu, L.M.,Ge,C. Cui , Z., LI, J., and Fan , H.,** (1995) - Bradyrhizobium liaoningense sp nov isolated from the root nodules of soybeans. Lnt. J. Syst. Bacteriol. **45(4)**: 706-711.

**Yao, Z. Y., Kan, F.L., Wei, G.H., and Chen,** (2002) - Characterization of rhizobia isolated from legume speaciesof genus *Lespedeza* and description of Bradyrhizobium yuanmngenes sp nov.Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 2219-2230.

**Yong, J.P.W., Downer, H.L., and Eardly, B.D.,** (1991) - Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by PCR-based sequencing of a16 RNA gene segment. J. Bacterial. **173**- 2271-2277.

**Young JPW, Haukka KE .**(1996) - Diversity and phylogeny of Rhizobia. New Phytol. **133**: 87-94.

**Zahran H.H** (1999) - *Rhizobium* legume symbioses and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. Microbiol. Molec. Rev. **63(4)** : 968-989.

**Zakhia F, deLajudie P.** (2001) -Taxonomy of rhizobia. Agronomie 21:569-576.

**Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie P.,**( 2004) - Characterisation of wild legumes nodulating baceria(LNB). In the infrared zone of Tunisia. Syst. Appl. Microbiol. **27**: 143-153.

Http// [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

## ANNEXE 1

### Milieux de Culture et Solution Nutritive

#### Milieu: Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol	10.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extrait de levure	0.5 g
L'eau distillé	1.0 litre

pH 6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

#### Milieu: Yest – Mannitol Agar (YMA)

YMB	1.0 litre
Agar	15 g

Ajouter l'agar, autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

#### Solution nutritive Fåhraeus (1957)

CaCl <sub>2</sub>	0.100 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.120 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.100 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.150 g
Citrate ferrique	0.005 g
*Solution stock des oligoéléments	1.0 ml

\* Solution stock des oligoéléments : (g/l)

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86 g
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	2.03 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.22 g
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.08 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.14 g

pH 6.8

**Milieu: Tryptone-Yeast (TY) (Beringer, 1974)**

Tryptone	5.0 g
Extrait de levure	3.0 g
CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0.87 g
L'eau distillé	1000 ml

pH 6.8 -7.2

Autoclave 120°C pendant 20 minutes

Pour le milieu TY agar, ajouter 12 g d'agar avant autoclavage.

**Milieu du 3-Cétolactose**

Milieu 1 :

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

pH 6.8

Une anse de ce milieu est ensemencée sur milieu solide contenant :

Milieu : 2

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

pH 6.8

Les boites sont incubées 2 jours à 28°C. Les résultats sont mis en évidence par l'inondation des boites avec les réactifs de Benedict à température ambiante:

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

**Milieu : Mannitol Calcium Glycérophosphate (Hofer, 1941) (g/l)**

KNO <sub>3</sub>	5
NaCl	3.8
MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	1.0
KCl	0.16
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.6
Ca-Glycérophosphate	0.8
Mannitol	20

**Milieu : BIII (Dazzo, 1984) (g/l)**

Mannitol	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.23
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.10
Glutamate de Na	1.10
Solution - stock de vitamine *	1 ml
Solution – stock d'oligoéléments **	1 ml

\*Solution – stock de vitamines (mg/l de tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M, pH 7,0)

Riboflavine	20
Acide para-amino-benzoïque	20
Acide nicotinique	20
Biotine	20
Thiamine-HCl	20
Pyridoxine-HCl	20
Panthoténate de Ca	20
Inositol	120

\*\*Solution – stock d'oligoélément (g/l)

CaCl <sub>2</sub>	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.145
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.125
CoSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.070

CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.005
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0.0043
ZnSO <sub>2</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.108
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.125
Nitryl triacétate	1.000

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

NB : le stock- vitamine est stérilisé par filtration (0.22µm) et le stock oligoélément par autoclavage.

### **Le Milieu de GLOUX et LE RUDULIER (1989)**

Solution A : g/l

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
NaHPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.05
Eau distillée	1000 ml

Solution B : mg/l

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
ZnSO <sub>4</sub>	1
CuSO <sub>4</sub>	1
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5
Eau distillée	1000 ml

En plus :

Biotine	2 g
Acide aspartique	100 mg
Acide lactique	0.74 g
Agar	10 g
Eau distillée	1000 ml

Prendre 100 ml de la solution A.

Mélanger avec 20 ml de la solution B

Ajouter l'acide lactique et l'acide aspartique, compléter le volume à 1000 ml et ajuster le pH à 7.

Ajouter l'agar, autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

La biotine est stérilisée par filtration et additionnée au milieu.

**Milieu Défini 8** (Lindström et Lehtomäki, 1988) (g/l)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.21
Glutamate de Na	1.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
CaCl <sub>2</sub>	0.11
Solution - stock de vitamines*	1ml
Solution - stock d'oligoéléments**	1ml

\*Solution-stock de vitamines (100µg/l)

Acide Nicotinique  
Biotine  
Thiamine-HCl  
Panthoténate de Ca

\*\*Solution – stock d'oligoéléments (mg/100ml d'eau distillée)

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
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	50

pH 6.8

### Milieu MNA (phage) (Vincent 1970)

#### Solution 1 : (g/l)

Mannitol	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	0.45
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10H <sub>2</sub> O	0.06
KNO <sub>3</sub>	0.6
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.01
Thiamine HCL	100μg
Biotine	0.5 μg
Agar	7
H <sub>2</sub> O distillée	1 L

#### Solution 2 : (g/l)

MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1
H <sub>2</sub> O distillée	100mL

Les deux solutions sont stérilisées séparément, et 0.5 ml de la solution 2 est additionnée dans la boîte de pétri avant d'ajouter 5 ml de la solution 1 additionnée d'agar.

## ANNEXE 2

### Electrophorèse des protéines totales (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

#### 1- Préparation des solutions-stock

- Tampon du gel de séparation : Tris HCl 3M, pH 8.8 - SDS 0.8%

Tris 3M	72.7 g
SDS 0.8%	1.6 g
Mercaptoéthanol( MCE)	0.8ml
Eau distillée	QSP 200 ml

Porter à pH 8.8 avec HCL puis compléter à 200ml eau distillée.

- Tampon du gel de concentration : Tris-HCl 0.5M pH 6.8- SDS 0.4%

Tris	12.1 g
SDS	0.8 g
$\beta$ -Mercaptoethanol 0.2%	400 $\mu$ l
Eau distillée	QSP 200 ml

Ajuster à pH 6.8 avec HCl.

-Solution d'Acrylamide/bis Acrylamide

Acrylamide 30%	60 g
Bis Acrylamide 0.8%	1.6 g
Eau distillée	QSP 200 ml

-Persulfate d'ammonium : 15%

Peser 0.15 g de persulfate d'ammonium et dissoudre dans 1 ml d'eau distillée. La solution est préparée au moment de l'emploi.

Conserver à 4°C. Renouveler le stock tous les mois)

#### 2- Préparation du gel de Séparation à 12%

Tampon de Séparation	3.14 ml
Solution Acryl/bis Acryl	10.4 ml
Eau distillée	QSP 25 ml

TEMED	12.5µl
Persulfate d'ammonium	140µl

### 3- Préparation du gel de concentration à 7.5%

Tampon Tris-HCl pH 6.8	5 ml
Solution Acryl/bis Acryl.	5 ml
Eau distillée	QSP 20 ml
TEMED	20 µl
Persulfate d'ammonium	200µl

### 4- Préparation du tampon de migration

Tris 0.025 M	1.06 g
Glycine 0.192 M	5.04g
SDS 0.1%	0.35 g
MCE 0.05%	175µl
Eau distillée	QSP 350 ml

### 5- Préparation des plaques de gel

La solution du gel de séparation est coulée entre les plaques de verre en laissant une hauteur de 3-4 cm pour le second gel: Eviter l'incursion de bulles d'air. Avec une pipette Pasteur niveler le gel avec une solution d'alcool (le butanol),

Après polymérisation du gel de séparation (20-30 mn) jeter l'isobutanol, rincer abondamment avec de l'eau distillée, sécher avec du papier filtre sans toucher la surface du gel , verser ensuite le gel de concentration (laissant une hauteur de 3-4 mm environ du bord supérieur). Insérer le peigne de manière inclinée ce qui évitera les bulles d'air. Après 20 mn de polymérisation retirer le peigne très lentement vers le haut et sécher les puits d'échantillons avec du papier filtre.

## 6- Préparation du tampon d'échantillon (tampon de lyse)

Tris	25mM
Glycérol	192mM
SDS	2.5%
$\beta$ -mercaptoéthanol	2.5% (v/v)
Bleu de Bromophénol	5 mg
Eau distillée	200 ml

Dans la préparation des échantillons après addition du SDS et le 3-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.

## 7- Migration électrophorétique

Remplir les puits par la solution du tampon de migration. Un volume de 20  $\mu$ l de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque put. Après le dépôt, la migration des protéines a été assurée par une différence de potentiel de départ de 106V (80 mA), jusqu'à ce que le voltage arrive à 287V.

La migration est finie quand l'indicateur (bleu de bromophénol) arrive à 3-4 mm de l'extrémité anodique du gel.

## 8- Révélation des bandes protéiques

### -Solution de coloration :

Acide Trichloracétique (TCA)	100ml
Bleu de Comassie (1% dans Ethanol 95%)	25 ml
Eau distillée	q.s.p. 500 ml

Mettre le gel dans 200 ml de solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation.

Décolorer avec l'eau distillée.

## ANNEXE 3

### Tableaux

Tableau N°8 : Source de carbone (D.O.<sub>λ600</sub>)

	A6	HS1	Hca	Hna	HP7	Hpe9	Hpe10
Saccharose	0,255	0,171	0,213	0,191	0,232	0,317	0,266
raffinose	0,172	0,21	0,393	0,198	0,231	0,285	0,187
sorbitol	0,318	0,385	0,526	0,313	0,282	0,47	0,343
Arabinose	0,292	0,465	0,514	0,27	0,308	0,602	0,344
Lactose	0,285	0,341	0,67	0,69	0,382	0,288	0,091
Xylose	0,665	0,326	0,117	0,133	0,554	0,869	0,7
Glucose	0,518	0,522	0,719	0,437	0,709	0,841	0,7
Galactose	0,581	0,444	0,515	0,474	0,323	0,486	0,521
Maltose	0,368	0,45	0,53	0,959	0,387	0,586	0,368
Manitol	0,538	0,374	0,718	0,266	0,342	0,536	0,507
Citrate Na	0,539	0,482	0,172	0,266	0,374	0,697	0,449
fructose	0,629	0,46	0,653	0,508	0,377	1,2585	0,669

Tableau N° 9: Besoin en vitamines (D.O.<sub>λ600</sub>)

	Hca	Hna	Hp7	A6	Hs1	Hper9	Hper10
Biotine	0,483	0,781	1,108	0,619	0,627	0,644	0,454
Thiamine	0,613	0,881	1,152	0,683	0,743	0,979	0,486
Biotine+Thiamine	0,504	0,597	0,659	0,651	0,937	0,641	0,492
BIII total	0,417	0,526	0,52	0,39	0,654	0,475	0,509
BIII sans vitamine	0,281	0,301	0,481	0,505	0,662	0,311	0,25

**Tableau N°10 : Utilisation de la source d'Azote (D.O.<sub>λ600</sub>)**

	Hpe10	Hpe9	A6	Hna	Hca	Hs1	Hp7
Isoleucine	0.797	0.615	0.547	0.660	0.670	0.790	0.620
Serine	0.249	0.222	0.248	0.323	0.351	0.297	0.293
Proline	0.669	0.437	0.374	0.732	0.433	0.764	0.354
Méthionine	0.247	0.246	0.177	0.235	0.256	0.421	0.329
Tyrosine	0.778	0.189	0.206	0.267	0.409	0.721	0.471
Argénine	0.835	0.723	0.305	0.429	0.613	0.479	0.103
phenialanine	0.382	0.305	0.202	0.310	0.358	0.419	0.382
Glutamine	0.559	0.102	0.263	0.697	0.604	0.580	0.496
Alanine	0.956	0.968	0.234	0.611	0.580	0.588	0.513
Valine	0.800	0.324	0.133	0.546	0.554	0.343	0.361
Histidine	0.598	0.724	0.576	0.969	1.119	1.117	1.098
tryptophane	0.275	0.306	0.537	0.162	0.326	0.471	0.290
Lysine	0.141	0.667	0.275	0.455	0.138	0.209	0.115
Leucine	0.195	1.409	0.326	0.267	0.225	0.515	0.722
cystéine	0.506	1.910	0.442	0.529	0.413	1.498	0.262
Thréonine	0.307	-	0.125	0.146	0.240	0.183	-
Asparagine	0.452	0.855	0.674	0.442	0.620	0.771	0.436
Sans acide amine	0.544	0.179	0.328	0.206	0.264	0.270	0.167
Glutamate Na	1.927	1.860	0.616	0.392	0.623	0.839	0.363
Glycine	0.140	0.858	0.661	0.192	0.192	0.451	0.200

**Tableau N° 11: Effet du NaCl (D.O.<sub>λ600</sub>)**

NaCl(mM)	HPE10	HPE9	HNA	HCA	HP7	HS1	A6
0	0,231	0,208	0,265	0,247	0,209	0,212	0,284
20	0,21	0,223	0,212	0,174	0,226	0,218	0,217
40	0,239	0,257	0,211	0,273	0,263	0,244	0,244
100	0,269	0,137	0,131	0,138	0,157	0,124	0,185
200	0,254	0,127	0,122	0,128	0,148	0,091	0,169
400	0,174	0,181	0,13	0,105	0,172	0,092	0,123
1000	0,057	0,026	0,028	0,04	0,023	0,064	0,023
1500	0,001	0,017	0,015	0,008	0,005	0,021	0,037
2000	0	0	0	0	0	0	0

**Tableau N° 12 : Effet du pH (D.O.<sub>λ600</sub>)**

	Hs1	A6	HP7	Hpe9	Hpe10	Hca	Hna
pH=5,3	0,639	0,493	0,454	0,443	0,647	0,526	0,3
pH=5,6	0,544	0,211	0,37	0,388	0,89	0,267	0,262
pH=5,8	0,423	0,287	0,397	0,215	0,268	0,458	0,168
pH=6,8	0,419	0,346	0,389	0,34	0,347	0,444	0,37
pH=7,8	0,511	0,543	0,674	0,329	0,592	0,563	0,191
pH=8,8	0,311	0,269	0,293	0,294	0,357	0,218	0,264
pH=9,8	0,349	0,926	0,507	0,504	0,41	0,319	0,339

**Tableau N° 13 : Mesure de la Croissance (D.O.<sub>λ540</sub>).**

DO						
Temps (heures)	A6	Hca	Hna	Hs1	Hp7	hper
1	0,061	0,064	0,072	0,07	0,071	0,132
2	0,169	0,115	0,087	0,103	0,140	0,312
3	0,515	0,400	0,264	0,502	0,383	0,809
4	0,982	0,921	0,714	0,84	1,243	1,357
5	1,326	1,150	1,244	0,898	1,071	1,728
6	1,314	1,320	1,323	1,039	1,181	1,748
7	1,528	1,346	1,458	1,412	1,435	1,876
8	1,584	1,567	1,402	1,412	1,407	1,941
9	1,755	1,495	1,582	1,351	1,467	1,878
10	1,702	1,384	1,673	1,378	1,526	2,01

## ANNEXE 4

**Le Blast** ([Http// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

H10 (*Hper10*), H1 (*Hper1*), H2 (*Hper2*), et H5 (*Hper5*) :

LOCUS AM184254 1478 bp DNA linear BCT 30-JUN-2006  
DEFINITION *Pantoea agglomerans* partial 16S rRNA gene, strain WAB1913.  
ACCESSION AM184254  
VERSION AM184254.1 GI: 109942120  
KEYWORDS 16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.  
SOURCE *Pantoea agglomerans*  
ORGANISM [Pantoea agglomerans](#)  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
Enterobacteriaceae; *Pantoea*.  
REFERENCE 1  
AUTHORS Abraham,W.R., Macedo,A.J., Gomes,L. and Tavares,F.C.A.  
TITLE Occurrence and resistance of pathogenic bacteria along the Tiete  
River downstream of Sao Paulo in Brazil  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 1478)  
AUTHORS Macedo, A.J.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (30-JAN-2006) Macedo A.J., Division Microbiology, GBF -  
National Research Center for Biot, Mascheroder Weg, 1 -  
Braunschweig, Low Saxony, 38124, GERMANY  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..1478  
/organism="Pantoea agglomerans"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="WAB1913"  
/isolation\_source="river water"  
/db\_xref="taxon:[549](#)"  
/country="Brazil:Sao Paulo, Tiete River"  
[gene](#) <1..>1478  
/gene="16S rRNA"  
[rRNA](#) <1..>1478  
/gene="16S rRNA"  
/product="16S ribosomal RNA"

### ORIGIN

```
1 tcattgctca gattgaacgc tggcggcagg ctaaacacat gcaagtcgaa cggtagcaca
61 gagagcttgc tctcgggtga cgagtggcgg acgggtgagt aatgtctggg aaactgcctg
121 atggaggggg ataactactg gaaacggtag ctaataccgc ataacgtcgc aagaccaaag
181 agggggacct tcgggcctct tgccatcaga tgtgcccaga tgggattagc tagtaggtgg
241 ggtaacggct cacctaggcg acgatcceta gctggtctga gaggatgacc agccacactg
301 gaactgagac acgggtcaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg
361 cgcaagcctg atgcagccat gccgcgtgta tgaagaaggc cttcgggttg taaagtactt
```

421 tcagcgggga ggaaggtgtt gtggtaata accgcagcaa ttgacgttac ccgcagaaga  
481 agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc ggtaatacgg aggggtgcaag cgtaatcgg  
541 aattactggg cgtaaagcgc acgcagggcg tctgtcaagt cggatgtgaa atccccgggc  
601 tcaacctggg aactgcattc gaaactggca ggctagagtc tttagaggg gggtagaatt  
661 ccaggtgtag cggtgaaatg cgtagagatc tggaggaata ccggtggcga aggcggcccc  
721 ctggacaaag actgacgctc aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct  
781 ggtagtccac gccgtaaacg atgtcgactt ggaggttgtg cccttgaggc gtggcttccg  
841 gagtaacgc gttaagtga ccgcctgggg agtacggccg caaggtaaa actcaaatga  
901 attgacgggg gcccgcaaa gcggtggagc atgtggtta attcgatgca acgcgaagaa  
961 cttacctac tcttgacatc cagagaactt ascagagatg stttgtgcc ttcgggaact  
1021 ctgagacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctctgttgt gaaatgttg gtaagtccc  
1081 gcaacgagcg caacccttat ctttgttgc cagcggctcg gccgggaact caaaggagac  
1141 tgccagtgat aaactggagg aagggtgggga tgacgtcaag tcatcatggc cttacgagt  
1201 agggctacac acgtgctaca atggcgcata caaagagaag cgacctcgcg agagcaagcg  
1261 gacctcataa agtgcgtcgt agtccggatt ggagtctgca actcgactcc atgaagtcgg  
1321 aatcgtagt aatcgtagat cagaatgcta cggatgaata gttcccgggc cttgtacaca  
1381 ccgccgtca caccatggga gtgggtgca aaagaagtag gtagctaac cttcgggagg  
1441 gcgcttacca ctttgtgatt catgactggg gtgaagtc

## H9

LOCUS EF633997 1404 bp DNA linear BCT 26-JUN-2007  
DEFINITION *Enterobacter cloacae* strain M 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence.

ACCESSION EF633997

VERSION EF633997.1 GI:149286357

KEYWORDS .

SOURCE *Enterobacter cloacae*

ORGANISM [Enterobacter cloacae](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
Enterobacteriaceae; *Enterobacter*; *Enterobacter cloacae* complex.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1404)

AUTHORS Ma,J.J., Cui,Z.J. and Li,B.

TITLE Antibacterial activity of lactic acid bacteria community SFC-2 used  
for fermentation of the air-dried

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1404)

AUTHORS Ma,J.J., Cui,Z.J. and Li,B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-MAY-2007) College of Agronomy and  
Biotechnology, China Agricultural University, No.2 Yuanmingyuan Xi Lu,  
Haidian,

Beijing 100094, China

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1404  
/organism="Enterobacter cloacae"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="M"  
/db\_xref="taxon:[550](#)"

[rRNA](#) <1..>1404  
/product="16S ribosomal RNA"

#### ORIGIN

```
1 tgcagtcgaa cggtagcaca gagagcttgc tctcgggtga cgagtggcgg acgggtgagt
61 aatgtctggg aaactgcctg atggaggggg ataactactg gaaacggtag ctaataccgc
121 ataacgtcgc aagaccaaag agggggacct tcgggcctct tgccatcaga tgtgccaga
181 tgggattagc tagtaggtgg ggtaacggct cacctaggcg acgateccta gctggtctga
241 gaggatgacc agccacactg gaactgagac acggtccaga ctctacggg aggcagcagt
301 ggggaatatt gcacaatggg cgcaagcctg atgcagccat gccgcgtgta tgaagaaggc
361 ctctcgggtg taaagtactt tcagcgggga ggaaggtgtt gaggttaata accttgcaa
421 ttgacgttac ccgcagaaga agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc ggtaatacgg
481 aggggtcaag cgtaatcgg aattactggg cgtaaagcgc acgcaggcgg tctgtcaagt
541 cggatgtgaa atccccgggc tcaactggg aactgcattc gaaactggca ggctggagtc
601 ttgtagaggg gggtagaatt ccaggtgtag cggtgaaatg cgtagagatc tggaggaata
661 ccggtggcga aggcggcccc ctggacaaag actgacgctc aggtgcgaaa gcgtggggag
721 caaacaggat tagataccct ggtagtccac gctgtaaacg atgtcgactt ggaggttgtt
781 cccttgagga gtggcttccg gagctaacgc gtaagtcca ccgctgggg agtacggccg
841 caaggtaaa actcaaatga attgacgggg gcccgcaaa gcggtggagc atgtggttta
901 atcgatgca acgcgaagaa cttacctac tcttgacatc cagagaactt agcagagatg
961 ctttgggtcc ttcgggaact ctgagacagg tctgcatgg ctgtcgcag ctctgtttgt
1021 gaaatgttgg gtaagtccc gcaacgagcg caacccttat ccttgttgc cagcgggtccg
1081 gccgggaact caaggagac tgccagtgat aaactggagg aaggtgggga tgacgtcaag
1141 tcatcatggc cttacgagt agggctacac acgtgctaca atggcatata caaagagaag
1201 cgacctcgcg agagcaagcg gacctataa agtatgtcgt agtccggatt ggagtctgca
1261 actcgactcc atgaagtcgg aatcgctagt aatcgtggat cagaatgcca cggatgaatac
1321 gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtgggttgc aaagaagtag
1381 gtagcttaac ctctgggagg gcgc
```

#### H 8

LOCUS EU162036 1283 bp DNA linear BCT 09-OCT-2007

DEFINITION Enterobacter sp. CMG24314 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION EU162036

VERSION EU162036.1 GI:157849639

KEYWORDS .

SOURCE Enterobacter sp. CMG24314

ORGANISM [Enterobacter sp. CMG24314](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
Enterobacteriaceae; Enterobacter.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1283)

AUTHORS Jamil,N. and Ahmed,N.

TITLE Characterization of Antibacterial Activity of Enterobacter sp.

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1283)

AUTHORS Jamil,N. and Ahmed,N.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (17-SEP-2007) Genetics, Centre for Molecular  
Genetics,

Karachi, Sindh 75270, Pakistan

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1283

/organism="Enterobacter sp. CMG24314"

/mol\_type="genomic DNA"

/strain="CMG24314"

/isolation\_source="soil"

/db\_xref="taxon:[475614](#)"

[rRNA](#) <1..>1283

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 ttctggetca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgaa cggtaacagg
61 aagcagcttg ctgcttcgct gacgagtggc ggacgggtga gtaatgtctg ggaaactgcc
121 tgatggaggg ggataactac tggaaacggt agctaatacc gcataacgtc gcaagaccaa
181 agagggggac ctccgggcct cttgccatcg gatgtgcca gatgggatta gctagtaggt
241 ggggtaacgg ctcacctagg cgacgatccc tagctggtct gagaggatga ccagccacac
301 tggaaactgag acacgggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg
361 ggcgcaagcc tgatgcagcc atgccgcgtg tatgaagaag gccttcgggt tgtaaagtac
421 ttcagcggg gaggaaggcg acaggggtaa taacctgtc gattgacgtt accgcagaa
481 gaagcaccgg ctaactcctg gccagcagcc gcggtataac ggagggtgca agcgttaatc
541 ggaattactg ggcgtaaagc gcacgcagcc ggtctgtcaa gtcggatgtg aatccccgg
601 gctcaacctg ggaactgcat tcgaaactgg caggctagag tctttagag ggggtagaa
661 tccaggtgt agcgggtaa tgcgtagaga tctggaggaa taccgggtggc gaaggcggcc
721 ccctggacaa agactgacg tcaggtgcca aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc
781 ctgtagtcc acgccgtaa cgatgtcgac ttggaggtg tgccttgag gcgtggttc
841 cggagctaac gcgtaagtc gaccgcctgg ggagtacggc cgcaaggta aactcaaat
901 gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtgga gcatgtggtt taattgatg caacgcgaag
961 aacctacct actcttgaca tccagagaac ttagcagaga tgctttggtg ccttcgggaa
```

1021 ctctgagaca ggtgctgcat ggctgctgctc agctcgtggt gtgaaatggt gggttaagtc  
1081 ccgcaacgag cgcaaccctt atcctttggt gccagcgggt cggccgggaa ctcaaaggag  
1141 actgccagtg ataaactgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcatcatg gcccttacga  
1201 gtagggctac acacgtgcta caatggcgca tacaagaga agcgacctcg cgagagcaag  
1261 cggacctcat aaagtgcgtc gta

## Résumé

Les légumineuses dont fait partie le genre *Hedysarum*, sont très répandues dans le bassin méditerranéen, mais ceci n'est pas généralisé pour toutes les espèces, en particulier l'espèce *H. perraudinianum*, endémique en Algérie, et qui se trouve rarement localisée à l'Est du pays (wilaya de Sétif).

Dans le but de caractériser les bactéries nodulant l'espèce *H. perraudinianum*, nous avons procédé à des tests phénotypiques et une caractérisation moléculaire des isolats.

Les isolats sont caractérisés par une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique (test biochimiques, physiologiques...), une prestation symbiotique sous conditions bactériologiquement contrôlée afin de tester les souches à l'aptitude de noduler la plante-hôte, et enfin une étude écologique des souches par la recherche des rhizobiophages et la résistance intrinsèque aux métaux lourds.

Un profil SDS-PAGE des protéines est réalisé avec les isolats en présence de souches témoins (*Rhizobium sulae* nodulant *H. coronarium*).

Les souches sont enfin identifiées par un profil ARDRA après digestion par une endonucléase et l'ADNr 16S séquencé et le Blast identifié en utilisant le NCBI Sequence. Ce dernier attribue les souches à la famille des *gammaproteobacteria*.

## Summary

The legumes of which is a part the genus *Hedysarum*, are very wide-spread in the Mediterranean Basin, but this is not generalized for all the species, in particular the species of *H. perraudinianum*, endemic in Algeria, and which is rarely localized in the East of the country (wilaya of Sétif).

With the aim of characterizing the bacteria nodulant the species *H. perraudinianum*, we carried out phenotypical tests and a molecular characterization of the isolates.

Isolates are characterized by a morphological study followed by a phenotypical characterization (physiological and biochemical test), a symbiotic performance under bacteriologically controlled conditions in order to test the strains with the aptitude of noduler the plant-host, and finally an ecological study of the strain by the research of the rhizobiophages and intrinsic resistance to heavy metals.

A profile SDS-PAGE of proteins is carried out with the isolates in the presence of reference strains (*Rhizobium sllae* nodulate *Hedysarum coronarium*).

Strains are finally identified by a profile ARDRA after digestion by an endonuclease and the ADN<sub>r</sub> 16S sequenced and identified Blast by using the NCBI Sequence. This last allots the strains to the family of the *Gammaproteobacteria*