

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI-CONSTANTINE
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département d'Écologie et de Biologie



N° ordre : 105105/DS2017

N° série : 07/ECO/2017

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Filière : Biotechnologie Végétale

Spécialité : Génomique et Biotechnologie Avancés

Saoudi Mouna

Intitulée :

**Caractérisation phénotypique et génotypique des
bactéries nodulant la légumineuse du genre
*Phaseolus***

Soutenu le 15/06/2017

Devant le jury :

Président :	Kitouni Mahmoud	Prof à l'Univ. Frères Mentouri Constantine
Rapporteur :	Benhizia Yacine	Prof à l'Univ. Frères Mentouri Constantine
Examineurs :	Bendjoumana katia	Prof à l'Univ Abbas laghrour Khenchela
	Rouag Noureddine	MCA à l'Univ Ferhat abbes Sétif 1
	Chaib Ghania	MCA à l'Univ Mentouri Constantine
	Halis Youcef	MCA à MCA à CRSTRA, Biskra

2016/2017

Remerciements

La réalisation de cette thèse est l'aboutissement d'un parcours académique, long et laborieux, parfois semé d'embûches. Au cours duquel malgré les tribulations, les moments de doutes inhérents à tout apprentissage, j'ai toujours été convaincu de vivre des moments inoubliables.

C'est un devoir de remercier au début d'un tel travail tous ceux qui, plus ou moins directement, ont contribué à le rendre possible et agréable. C'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse. Je désire alors leur exprimer ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le professeur Benguedouar Ammar mon premier rapporteur pour son aide, sa rigueur scientifique et sa patience avec nous, et pour ces conseils très utiles.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur BENHIZIA Yacine d'avoir été le directeur de cette thèse pour ses conseils et surtout pour son engagement.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur KITOUNI Mahmoud pour avoir accepté de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de consacrer du temps, pour juger ce travail et aider à son amélioration.

Je suis également reconnaissante envers Madame le Professeur, BENDJEMANA Katia, Madame CHAIBE Ghania, Monsieur ROUAG Nouredine, et Monsieur HALIS Youcef pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail.

J'adresse ma profonde gratitude à Monsieur Guergouri Ali Professeur à l'université de Sfax, Tunisie, pour l'accueil chaleureux, et de m'avoir donné les moyens pour réaliser une partie de ce travail.

Mes remerciements ne peuvent se terminer sans citer une personne qui était toujours prête pour donner l'aide afin de réaliser ce document, Merci à vous Ms Bentrifa Abderrahmen, directeur général de la ferme pilote, El Khroub, Constantine .

Je n'oublie pas d'adresser mes vifs remerciements aux membres du laboratoire d'écologie microbienne : Fatima, Razika, Asma, Rdja, Wissem, Laila, Mériem, Basma, Hanane et Sabira avec qui j'ai passé de réels bons moments au coin d'une paillasse, au tour d'une table.

En fin, je remercie tous ceux qui ont croisé ma route pendant ces années, et qui directement ou indirectement ont contribué à l'accomplissement de cette thèse.

Dédicaces

*Mes remerciements ne peuvent se terminer sans remercier ma famille:
ma mère pour ses prières, mon père, mon mari pour sa patience, mes frères,
mes sœurs surtout Amel pour son soutien et ses encouragements, mes beaux
frères, ma belle mère pour ses aides,
et bien sûr mes enfants chéris : Djouhaina , Djoumana et mon petit poussin
Abdelmounen à qui je n'ai pas pu offrir beaucoup de temps au cours
de la rédaction de cette thèse.*

Table des matières

Table des matières

Liste des figures

Listes des Tableaux et des planches

Liste des abréviations

Introduction **1**

Revue bibliographique

1. La fixation biologique de l'azote	4
2. Les Légumineuses	5
2.1. Le genre <i>Phaseolus</i>	5
2.1.1. La légumineuse <i>P. vulgaris</i>	7
2.1.2. La légumineuse <i>Phaseolus coccineus</i>	8
3. Le microsymbiont	10
3.1 Classification des Rhizobium	10
3.2. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des <i>Rhizobiums</i>	11
3.2.1 Méthodes phénotypique	11
a. L'analyse phénotypique classique	12
b. Les systèmes commerciaux	12
c. La composition des parois cellulaires	12
d. FAME (« Fatty Acid Methyl Ester ») ou analyse des acides gras cellulaires	12
e. Le MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry)	13
3.2.2. Méthodes utilisées pour une identification Moléculaire	14
a. Détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G + C)	14
b. Le séquençage de l'ADNr 16S, et d'autres gènes ribosomiques:	15
c. Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)	16
d. L'hybridation ADN-ADN	16

4. La génétique de la nodulation.....	19
4.1. Les flavonoïdes	19
4.2. Les gènes de nodulation.....	20
4.2.1. Gènes nod communs (ABCIIJ).....	20
4.2.2. Gènes nod spécifiques (nod H, nod FE, nod G, nod MN, nod Q etc.).....	20
4.2.3. Gènes nif	21
5. La symbiose Rhizobium-légumineuse.....	21
6. L'organogénèse d'un nodule racinaire	23
6.1. Formation des bactéroïde	23
6.2. Les étapes de la nodulation	23
6.2.1. Préinfection.....	23
6.2.2. L'infection	24
6.2.3. Développement du nodule	24
Chapitre 2: Matériel et méthodes	25
I. Isolement des bactéries à partir des nodules	27
I.1. Collecte des nodules	27
I.2. Conservation et stérilisation des nodules.....	28
I.3. Isolement, purification et conservation des bactéries.....	29
2. Caractérisation métabolique des isolats.....	29
2.1. Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	30
2.1.1. Test du 3-Cétolactose (Bernaerts et De Ley, 1963)	30
2.1.2. Précipitation du Ca- Glycérophosphate.....	31
2.2. Recherche d'enzymes spécifiques pour la nodulation	31
2.2.1. Réduction des nitrates	31
2.2.2. Activité cellulosique (Struffi <i>et al.</i> , 1997).....	31
2.2.3. Activité pectinolytique	32
2.2.4. Hydrolyse de l'urée (Somasegaran et Hoben, 1994).....	32
2.2.5. La recherche de la β -galactosidase.....	32

2.3. Tests nutritionnels.....	33
2.3.1. Utilisation de la source de carbone (Jordan, 1984)	33
2.3.2. Utilisation des acides aminés comme source d'azote	33
3. Effet des Facteurs abiotiques.....	33
3.1. Tolérance au Chlorure de Sodium	33
3.2. Effet de la température.....	34
3.3. Croissance à différents pH.....	35
3.4. Résistance intrinsèque aux métaux lourds	35
4.Caractérisation des rhizobia par la sensibilité aux phages (Vincent., 1970 ; Semasegaran et Hoben., 1994)	35
4.1. Isolement des bactériophages	36
4.2. Analyse des phages par la méthode de double couche	36
5. Prestation symbiotique avec la plante hôte.....	37
5.1.Stérilisation des graines	37
5.2. Préparation des jarres de Léonard.....	38
5.3. Inoculation des jarres	38
6. Identification moléculaire des isolats :	38
6.1. Extraction de l'ADN génomique	38
6.2. Amplification du matériel génétique par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	39
Chapitre 3:Résultats et discussion	40
1-Aspect morphologique et cultural des isolats et vitesse de croissance	41
2. Etude des caractères métaboliques des isolats.....	46
2.1 Les tests distinctifs.....	46
2.1.1. Test du 3-cetolactose	46
2.1.2. Test du glycérophosphate de calcium	46
2.2. Recherche d'enzymes spécifiques	46
2.2.1. Nitrate-réductase	47

2.2.2.L'Uréase	47
2.2.3. L'Activité cellulosique	47
2.2.4. L'Activité pectinolytique	47
2.3. Les besoins nutritionnels.....	48
2.3.1. Source de carbone	48
2.3.2. Utilisation des acides aminés comme source d'azote	53
3. Les facteurs abiotiques	58
3.1. Effet du pH.....	59
3. 2.Tolérance à la salinité	63
3.3. Effet de la température.....	68
3.4. Résistance aux métaux lourds	71
4. La sensibilité aux bacteriophages	75
5. Test de nodulation	76
6. Caractérisation génotypique des isolats.....	79
Conclusion et Perspectives.....	82
References bibliographiques	84
Annexes	

Résumé

La symbiose *Rhizobium*-légumineuses est un processus naturel, qui peut avantagée la plante par l'assimilation d'azote atmosphérique. En Algérie, L'haricot ou le *Phaseolus* est une légumineuse qui occupe une place primordiale dans la nutrition humaine, pour ses valeurs protéiques et glucidiques, et pour son intérêt économique pour le payé et le citoyen. Dans le but d'améliorer le rendement de cette légumineuse, 86 isolats ont été isolés à partir des nodules racinaires de deux espèces de *Phaseolus* ; *P. vulgaris* et *P.coccineus* cultivées sur cinq sites situés dans l'Est et le Nord Est de l'Algérie. Ces isolats sont caractérisés par une étude phénotypique (tests physiologiques, biochimiques et nutritionnels) avec les souches de référence, qui donne une description comparable à celle des *Rhizobium*. Aussi nos isolats présentent une réaction positive au contact directe avec les bactériophages ce qui permet de les utiliser comme marqueurs pour l'identification des bactéries. Un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est effectué en mettant en évidence l'aptitude des isolats à noduler les racines de la plante hôte qui a montré la formation de nodules de couleur blanche, ce qui indique que nos isolats sont infectifs et ils (cette formation) confirment la relation symbiotique entre la plante hôte et le micro-symbion qui est une relation spécifique. L'étude moléculaire réalisée a confirmé l'appartenance de l'isolat T8 à l'espèce *Bacillus subtilis* avec une similitude de 98%.

Mot clés : *Rhizobium*, *Phaseolus*, *P.vulgaris*, *P.coccineus*, micro-symbion, *Bacillus subtilis*, haricot

Abstract

The symbiosis *Rhizobium*-legumes is a natural process, which can benefit the plant by the assimilation of atmospheric nitrogen. In Algeria, beans or *Phaseolus* are leguminous plants that play a prominent role in human nutrition, thanks to its protein and carbohydrate value, and for its economic value for the country and the citizen. In order to improve the outcome of this legume, 86 isolates were collected from the root nodules of two species of *Phaseolus*; *P. vulgaris* and *P. coccineus* grown in five orchards located in Eastern and Northeastern Algeria. These isolates are characterized by a phenotypic study (physiological, biochemical and nutritional tests) with the reference strains, which gives a description comparing with *Rhizobium*. Also our isolates present a positive reaction to direct contact with the bacteriophages, that permits their use as markers for the identification of bacteria. A nodulation test under bacteriologically controlled conditions is carried out by demonstrating the ability of the isolates to nodulate the roots of the host plant which has shown the formation of white nodules, indicating that our isolates are infectious and they (This formation) confirm the symbiotic relationship between the host plant and the micro-symbion which is a specific relationship. The molecular study carried out confirmed the belonging of the T8 isolate to the *Bacillus subtilis* species with a similarity of 98%.

Key words: *Rhizobium*, *Phaseolus*, *P. vulgaris*, *P.coccineus*, micro-symbion, *Bacillus subtilis*, bean

ملخص

يعتبر التعايش بين الريزوبيوم و البقوليات ظاهرة طبيعية تزود النبتة بخاصية اكتساب الأزوت. و في الجزائر تعد الفاصولياء أو *Phaseolus* من البقوليات التي تحتل مرتبة أساسية في سلم تغذية الإنسان و ذلك لما توفره من بروتين و كربوهيدرات ناهيك عن قيمتها الاقتصادية للبلاد و المواطن. من أجل تحسين المردودية لهذه البقوليات ، تم عزل 86 عزلة من العقد الجذرية لنوع *P.vulgaris P.coccineus et* زرعت في خمسة مناطق تتمركز بالشرق بالشمال الشرقي للجزائر و لقد تم دراسة هذه العزلاتمظهرها (اختبارات فسيولوجية و بيوكيميائية و غذائية) و بتواجد سلالات مرجعية أعطت وصفا مشابها للريزوبيوم. كما حقق الاتصال المباشر للبكتيريا المعزولة مع الفيروسات البكتيرية تفاعلا ايجابيا، مما سيسمح باستخدام هذه الأخيرة كواسم للتعرف على البكتيريا. أما اختبار التعايش فلقد أظهر في ظروف خاضعة للرقابة الميكروبيولوجية قدرة العزلات على تشكيل عقيدات جذرية للنبات العائل ذات لون أبيض ، مما يفيد بأن هذه الأخيرة معدية و بأن العلاقة بين النبات العائل و العضو التكافلي المجهري هي علاقة تكافلية خاصة. ولقد تم إجراء دراسة جزيئية للعزلة T8 التي أكدت انتماء هذه الأخيرة للنوع *Bacillus subtilis* بنسبة تشابه قدرها 98%.

كلمات مفتاحية: *Bacillus subtilis, P. vulgaris, P. coccineus, Rhizobium* عقيداتالعضو التكافلي المجهري.

Liste des figures

Figure 1: L'enzyme de la nitrogénase et mécanismes d'action (Yann., 2006).....	4
Figure 2: a- Fleur blanche de <i>Phaseolus coccineus</i> (site Benzouit, Skikda) b- fleur rose de <i>Phaseolus vulgaris</i> c- La disposition des feuilles trifoliales sur une tige angulaire.....	7
Figure 3: Couleur et forme des graines : (a)- Graines de <i>Phaseolus vulgaris</i> . (b)- Graines de <i>Phaseolus coccineus</i>	9
Figure 4: Organisation de l'opéron des l'ADNr observés chez les Procaryotes (El Hilali 2006).....	15
Figure 5: a-Tige portant des nodules aériens matures (Duhoux et Nicole, 2004) b- racine de <i>Phaseolus coccineus</i> portant des nodosités (site Mdjez Ammar, Guelma)	22
Figure 6: Etapes de la formation d'un nodule racinaire chez une légumineuse infectée par rhizobia Madigan & Martinko .,2006.....	25
Figure 7: Champ de <i>Phaseolus vulgaris</i> (Site Boumaaza , Annaba,Mars 2012).....	26
Figure 8: Champ de <i>Phaseolus coccineus</i> (Site Mdjez Ammar, Guelma, Février 2012).....	26
Figure 9: collecte des nodules (Site Tamalous, Skikda, 2012)	27
Figure 10: (a)- Nodules après rinçage (b)- Nodules séchés au papier filtre.....	28
Figure 11: Conservation des nodules	28
Figure 12: a-Graine de <i>Phaseolus vulgaris</i> b- Graine <i>Phaseolus coccineus</i>	37
Figure 13: Observation microscopique des bactéries à Gram négatif (objectif x 100) : a- l'isolat S11, b- l'isolat T10, c- l'isolatG9, d- l'isolatB4,e- l'isolat Z9, f- l'isolat S3.....	41
Figure 14: Aspect morphologique des isolats : (a) ; Aspect des colonies sur YMA; (b) aspect des colonies sur YMA RG(c) test de vitesse de croissance.	42
Figure 15: Tests enzymatiques : (a) : Test nitrate réductase positif(b) ; Test uréase positif (c)Test cellulase positif(d): Test pectinase positif.....	48
Figure 16: Utilisation des sucres par les isolats provenant du site Salah Salah Salah, Wilaya de Guelma	49
Figure 17: Utilisation des sucres par les isolats provenant du site Mdjez Ammar,	50
Figure 18: utilisation des sucres par les isolats provenant du site Tamalous, Wilaya de Skikda	51
Figure 19: Utilisation des sucres par les différents isolats provenant du site Benzouit, Wilaya de Skikda.....	52
Figure 20: Utilisation des substrats carbonés par les isolats provenant du site Boumaaza, Wilaya de Annaba	53

Figure 21: Assimilation des aminoacides par les isolats provenant du site Boumaaza, Wilaya de Annaba.....	54
Figure 22: Assimilation des aminoacides par les isolats provenant du site Benzouit, Wilaya de Skikda.....	55
Figure 23: Assimilation des aminoacides par des isolats provenant du site Tamalous, Wilaya de Skikda.....	56
Figure 24: Assimilation des acides aminés par les isolats provenant du site Mdjez Ammar, Wilaya de Guelma.....	57
Figure 25: Assimilation des aminoacides par les isolats provenant du site Salah Salah Salah, wilaya de Guelma.....	58
Figure 26: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Mdjez Ammar, Wilaya de Guelma	59
Figure 27: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant su site Benzouit, Wilaya de Skikda.....	60
Figure 28: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Boumaade Annaba. ..	61
Figure 29: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Salah Salah Salah, Wilaya de Guelma.	62
Figure 30: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Tamalous, wilaya de Skikda.	63
Figure 31: Effet du NaCl sur la croissance des isolats provenant du site Mdjez Ammar, Wilaya de Guelma.	64
Figure 32: Effet du NaCl sur la croissance des isolats provenant du site Tamalous, Wilaya de Skikda.....	65
Figure 33: Tolérance des isolats provenant du site Salah Salah Salah, Wilaya de Guelma à différentes concentrations du NaCl.	66
Figure 34: Tolérance des isolats provenant du site Benzouit, Wilaya de Skikda, à différentes concentrations du NaCl.	67
Figure 35: Tolérance des isolats provenant du site Boumaaza, Wilaya de Annaba, à différentes concentrations du NaCl.	68
Figure 36: Résultat de la sensibilité des bactéries aux phages ; à droite absence des plages de lyse(B9), à gauche présence des plages de lyses.....	75
Figure 37: Test de nodulation : (a) le dispositif du test de nodulation, (b) racine de Phaseolus coccineus nodulée par T8, (c) racine de Phaseolus coccineus nodulée par S11, (d) racine de P.vulgaris nodulée par B8	76
Figure 38: a-nodule sous forme de grappe b- prendre de mesure d'un nodule formé.	77

Figure 39: différence de couleur entre un nodule et un autre issu d'un test de nodulation in vitro.	77
Figure 40: Profil electrophorétique de l'ADN génomique des isolats	79
Figure 41: Profil électrophorétique du produit PCR des isolats ndulant la légumineuse du genre Phaseolus.	80
Figure 42: Alignement de la souche T8 avec la séquence de Bacillus subtilis	81

Listes des Tableaux et des planches

Tableau 1: Classification des Rhizobium (Berrada et Fikri-Benbrahim., 2014)	16
Tableau 2: La séquence nucléotidique des amorces fD1 et rD1	39
Tableau 3: Liste des isolats et lessouches de référence.....	43
Tableau 4: Résultats de la croissance des isolats à différentes températures.	70
Tableau 5: Concentration minimale inhibitrice de métaux lourds.....	72
Tableau 6: Nombre et caractéristique des nodules produit par les plantes les deux variétés de la légumineuse	78

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

ARN : Acide ribonucléique

BNL: Bactéries Nodulant les Légumineuses

C: Cytosine

G: Guanine

FAME : Fatty Acid Methyl Ester

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight

MS : Mass Spectrometry

N: Azote

N : Diazote

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de polymérisation)

pH : potentiel d'hydrogène

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des

R : *Rhizobium*

P : *Phaseolus*

PHB : polyhydroxybutyrate

T-RFLP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism

Leu : Leucine

Ser : serine

Pro : Proline

Cys : Cystéine

Ala : Alanine

Lys : Lusine

Met : Méthionine

Ileu : Isoleucine

Asp : Asparagine

Ac-glu : Acide-glutamique

Tyr : Tyrosine

His : Histidine

Phe-ala : Phenyl-alanine

Thr: Threonine

Pb : Plomb

Cu : Cuivre

Zn : Zinc

HgCl₂ : Clorure de Mercure

SbO₃ : Antimoine

Cd : Cadmium

YMA : Yeast Agar Mannitol

TY: Triptonne Yeast

Introduction

Introduction

De manière à faire face à l'augmentation de la population mondiale et aux besoins croissants sur le plan alimentaire qui en découle, l'augmentation des rendements en agriculture est devenue un enjeu majeur. En effet, les récents rapports de la FAO indiquent que d'ici 2050 il sera nécessaire de doubler la production agricole mondiale actuelle pour nourrir les 9 milliards d'êtres humains.

L'azote, en tant que composant aminé présent dans les biomolécules (protéines, acides nucléiques, vitamines...) est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Malheureusement, la concentration de ses formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, etc.) est souvent limitante pour la bonne croissance des plantes et constitue de ce fait, très fréquemment, le facteur clé de la production agricole (Roger *et al.*, 1996).

De plus, l'apport en azote aux organismes régule la productivité primaire dans de nombreux écosystèmes naturels. L'azote existe dans de multiples états d'oxydation et des formes chimiques dans la nature, et les transformations entre ces différentes formes sont typiquement catalysées par des micro-organismes (Hayatsu *et al.*, 2008).

Les microorganismes du sol constituent une part majeure de la biodiversité des sols et jouent un rôle central dans les processus du sol (Fierer et Jackson., 2006 ; Schimel et Schaeffer., 2012 ; Philippot *et al.*, 2013), qui affectent finalement le fonctionnement des écosystèmes terrestres. Étant donné que les contributions biogéochimiques des microbes et la dynamique des communautés microbiennes, peuvent être associées à la variation temporelle et spatiale des processus et des taux de l'azote. Ainsi, la compréhension du lien entre les processus biogéochimiques de l'azote et la dynamique des communautés microbiennes peut fournir une compréhension plus mécaniste du cycle d'azote que l'observation directe de la dynamique. En outre, il est important de connaître les facteurs qui influent sur la biodiversité et le fonctionnement des microbes du sol qui interviennent dans ces processus afin de prédire les réponses des écosystèmes à un environnement en évolution (Singh *et al.*, 2010).

Le faible rendement dans les systèmes de culture de l'haricot en Afrique, a fait développer d'autres moyens de production bio plus performants; qui contribue à l'amélioration de la culture des céréales sans se référer aux engrais chimiques.

Les rapports ont montré que l'azote est l'un des nutriments, le plus indispensable à la croissance des plantes car il joue un rôle crucial dans la vie des plantes et leurs processus physiologiques (Prosper *et al.*, 2016)

Vu ces qualités, il n'est pas étonnant que les légumineuses à graines aient été domestiquées dans tous les foyers d'agriculture du globe. La distribution géographique de plusieurs plantes cultivées dont les légumineuses, l'haricot domine et ne cède la première place qu'au soja. Il est encore cultivé de façon importante en Amérique, en Afrique et en Asie. En Algérie, malgré le climat méditerranéen qui rend possible la culture de cette plante, on note seulement la présence de deux espèces de la légumineuse du genre *Phaseolus* (*P. vulgaris* et *P. coccineus*) et comme toute légumineuse, cette plante développe des nodules. Les rhizobies fixent l'azote atmosphérique en le réduisant en ammoniac disponible pour la nutrition azotée de la plante.

Un certain nombre d'espèces de *Rhizobium* nodulent des légumineuses de manière spécifique. Les deux organismes, en interaction, communiquent par un échange mutuel de molécules signales diffusibles à des niveaux multiples avec des degrés de spécificité distincts (Den Herder et Parniske., 2009). La première étape de cette interférence moléculaire se produit dans l'interface du sol entourant la racine de la plante - la rhizosphère - qui représente une avant-garde très dynamique pour les interactions entre les plantes et les microorganismes du sol.

L'isolement des rhizobies pour la production de légumineuses a attiré une certaine attention en Afrique en raison de la recherche insuffisante ou de la négligence des chercheurs et l'ignorance de son potentiel dans la production de légumineuses ainsi que l'absence d'intention du personnel qualifié pour populariser la technologie (Simon *et al.*, 2014).

La taxonomie des rhizobies a changé significativement ces dernières années avec le développement des nouvelles techniques d'études. Toutefois, cette taxonomie restera toujours dynamique car bien que les rhizobies soient étudiés depuis plus de 100 ans, des symbiotes ont été identifiés pour moins de 10 % des 720 genres de légumineuses. Ainsi, il est probable qu'avec ces nouveaux outils d'étude, de nouveaux genres de rhizobies soient découverts parmi les sous-classes alpha et beta des Protéobactéries et peut-être même parmi d'autres taxons (Verine., 2008) et que cette probabilité peut être même élevée (Minja., 2001).

En Algérie, la diversification des cultures fourragères est très limitée en raison du manque perçu sur les travaux y afférent.

·
Nous rappelons qu'en Algérie, peu d'études n'ont rapporté ou mentionnées que le genre *Phaseolus* est nodulé par les *Rhizobium*.

A cet effet, nous avons abordé ce travail par l'étude de cette symbiose en appliquant une stratégie qui consiste à :

- Étudier les caractères morphologiques et culturels des bactéries nodulantes légumineuses du genre *Phaseolus* cultivées en Algérie suivi par une caractérisation phénotypique,
- Évaluer la tolérance des isolats aux différents facteurs abiotiques,
- Étudier la sensibilité des isolats aux bactériophages du sol,
- Établir *in vivo* la relation symbiotique entre les bactéries et leur plante hôte,
- identification moléculaire des isolats par la méthode de l'ADNr16S,
- Faire une comparaison de la structure caractéristique et diversité génétique des populations nodulantes dans les différents sites de l'est du pays avec des populations bactériennes provenant des sites d'origine à l'échelle mondiale,
- Discuter des résultats obtenus de cette caractérisation phénotypique et génotypique.

Revue
bibliographique

1. La fixation biologique de l'azote

Dans les sols, les quantités d'azotes assimilables par les plantes sont faibles alors que cet élément constitue souvent, avec le manque d'eau et de phosphate, un principal facteur limitant la croissance des végétaux (Cleland et Harpole., 2010). Bien que l'azote est très abondant sur la planète puisque l'atmosphère contient 78% de diazote (N_2) mais cette forme est inaccessible à la plupart des êtres vivants. En effet les seuls organismes capables de l'utiliser sont des bactéries. (Day *et al.*, 2001 ; Downie, 2005).

La fixation biologique de l'azote qui est la transformation de l'azote gazeux atmosphérique par des microorganismes du sol en azote combiné assimilable par les plantes peut constituer une alternative à l'utilisation d'engrais chimique azoté ou du moins permettre de réduire son utilisation dans les systèmes agricoles. Diof, 1997. De ce fait, un quart de l'azote fixé dans le sol provient de symbioses rhizobiales (Madigan *et al.* 1997; Zahran, 1999; Werner et Newton, 2005 ; Ollivier *et al.*, 2011).

Ce processus permet de réduire l' N_2 en ammoniac NH_3 en présence d'un complexe enzymatique réducteur appelé nitrogénase (figure 1), en présence d'une faible teneur en oxygène. (Simms et Taylor., 2002). Wallenstein *et al.* (2006) ; Philippot *et al.* (2007) ; Hayatsu *et al.* (2008) ; Braker et Conrad (2011) ; Levy-Booth *et al.* (2014) annoncent que les informations actuellement disponibles sur la relation entre l'écologie microbienne du sol et la fixation biologique de l'azote atmosphérique régissent sur l'avenir du N_2 dans les sols.

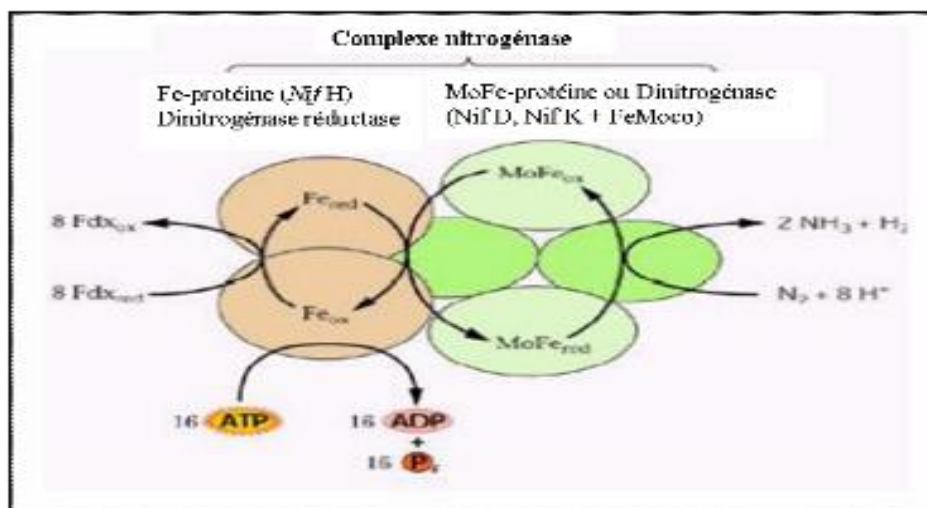


Figure 1: L'enzyme de la nitrogénase et mécanismes d'action (Yann., 2006)

2. Les Légumineuses

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les angiospermes, eudicotylédones à gousses (Sprent, 1995, Doyle et Luckow, 2003). Elles constituent la troisième plus grande famille de plantes supérieures en nombre d'espèces après *Orchidaceae* et les *Asteraceae*, avec plus de 727 genres, 18.000 espèces, et la deuxième en importance agricole (Raven *et al* 2000 ; Doyle, 2001 ; Cronk *et al* 2006). Ces espèces sont réparties en trois sous-familles ;

-Les *Caesalpinioideae* : dans leur majorité des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux avec une fleur pseudo-papillonacée, possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles.

-Les *Mimosoideae* : la plus part sont des arbres tropicaux avec une fleur régulière, petite, groupées souvent sous forme de pompons.

Les *Papilionoideae* : Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » (Guignard et Dupont., 2005). Elle renferme des plantes herbacées avec des fleurs irrégulières, composées de 5 pétales. Elles représentent plus de deux tiers des espèces des trois sous-familles, 97% parmi elles peuvent être nodulées. (Judd *et al* 2001; Gage., 2004; Patriarca *etal.*, 2004 ; Stacey *et al* 2006).

Les légumineuses sont cultivées sur environ 250 Mha et capables de fixer environ 90 Tonne de N₂ par an à la suite de la symbiose avec les Rhizobia (Kinzig et Socolow., 1998). Elles diffèrent avec la plupart des plantes parce qu'elles utilisent l'azote à la fois de sources minérales et symbiotiques.

Les petits agriculteurs qui sont les principaux producteurs de légumineuses en Afrique appliquent rarement des engrais pendant la production des légumineuses. Par conséquent, la culture dépend largement de l'azote fixé à partir de fixateurs d'azote naturels. (Simon *etal.*, 2014).

2.1. Le genre *Phaseolus*

Le haricot est l'une des légumineuses les plus importantes au monde en raison de sa valeur commerciale, sa production extensive, l'utilisation par les consommateurs et la valeur nutritive (Xavery *etal.*, 2006, Cabi, 2007). Citant par exemple, la consommation de l'haricot par un habitant de l'Afrique orientale et australe est de 40 à 50 kg par an (Blair *etal.*, 2010). Ces graines sont la bonne source de protéines, de vitamines et de minéraux comme le Fe, le Zn, le P, le Ca, le Cu, le K et le Mg. Aussi elles sont d'excellentes sources de glucides complexes (Camacho et Gonzalez de Mejia., 1998). Le *Phaseolus* a un impact

positif sur la fertilité du sol et l'amélioration du rendement par le processus de la fixation biologique de l'azote et l'incorporation de résidus dans les sols (Blair *et al.*, 2010).

Le genre *Phaseolus* ou l'haricot est une légumineuse qui comprend 5 genres, avec environ 70 espèces. Ces dernières sont originaires du Mexique et l'Amérique où la majorité des espèces sont cultivées et domestiquées depuis plus de 8000 ans. (Gepts et Deouk., 1991 ; Freytag and Debouck, 2002; Chacon *et al.*, 2005 ; Delgado-Salinas *et al.*, 2006). De plus cette légumineuse était connue au moins 5000 ans avant Jésus-Christ. (Purseglove., 1984 ; Clat., 1987).

La distribution géographique de l'haricot dans le monde est très diversifiée, tant de point de vue climatique que de point de vue pédologique, en ont fait une culture adéquate pour des systèmes agro-cultureux très variés. (Woolley et, Davis., 1991 ; Belay *et al.*, 2009).

L'apparition de génotypes neutres dans toutes les espèces du *Phaseolus* a permis leur propagation dans les zones tempérées fraîches et humides. Il est donc possible de cultiver une ou plusieurs espèces de ce genre dans la plupart des régions du monde où la culture peut être pratiquée. Ainsi les espèces *Phaseolus vulgaris* et *P. coccineus* qui font l'objet de notre étude possèdent toute les deux un pool de gènes commun au contraire des autres espèces. (Smartt., 2008).

Le *Phaseolus* a un intérêt dans l'amélioration de la production alimentaire ; en effet, ces graines avec celle du blé *Triticum durum* font l'objet de l'incorporation de la farine de produits des nouilles de meilleures qualités (Bharath et Prabhasankar., 2015).

-Description botanique :

Le haricot est une plante herbacée annuelle à croissance déterminée ou indéterminée. A la germination, la plante est généralement à racine pivotante mais qui forme après des racines secondaires longues de 10 à 15 cm se développant sur toute la racine principale (Ndèye FD., 2002). A l'issue de la germination épigée, deux feuilles opposées simples puis des feuilles trifoliées à folioles cordiformes se forment sur une tige angulaire. Les fleurs sont portées en grappes axillaires et terminales. Elles sont regroupées en inflorescence, sur de longs pédoncules axillaires (figure 2). La couleur des fleurs peut être blanche, roses ou violettes.

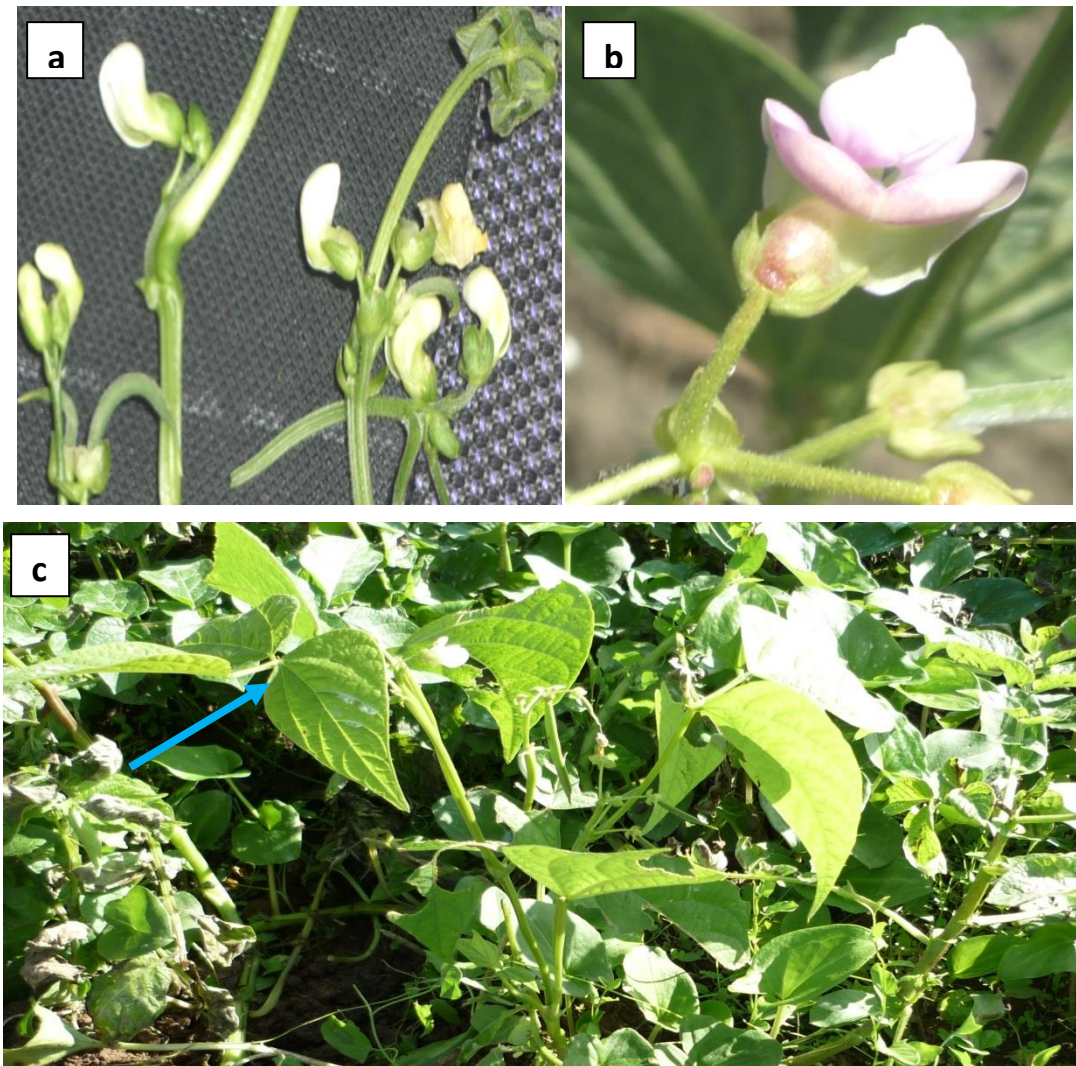


Figure 2: a- Fleur blanche de *Phaseolus coccineus* (site Benzouit, Skikda) b- fleur rose de *Phaseolus vulgaris* c- La disposition des feuilles trifoliales sur une tige angulaire

2.1.1. La légumineuse *P. vulgaris*

L'haricote de *Phaseolus vulgaris* est une plante herbacée avec un port qui peut changer d'une variété à une autre. deux grands groupes sont distingués les variétés à tige volubile qui peut atteindre 3m de hauteur ces variétés ont besoin de support pour soutenir la tige ,et les variétés naines à tige ramifiée de 40 à 60 cm de hauteur (Dupont et Guignard.,1989). L'espèce *P. vulgaris* est une plante annuelle à végétation rapide son cycle est de 90 à 120 jours (Peron., 2006). Le système racinaire est profond et peut descendre jusqu' à 1.20m, Après 15 à 20 jours des semis, des nodules peuvent se former sur ces radicelles (Adams *etal.*, 1985). Ces graine sont de forme ovale (figure 3-a) avec des tailles différentes tailles allant de 0.5cm jusqu'à 2.7cm (celles qui en existent en Algérie). Cette variété est baptisée par Linné en 1753, probablement sur un matériel amené en Suède.

(Daniel *etal.*, 1989). Plus d'une trentaine de synonymes ont été décrits (Prakken., 1934 ; Brucher., 1988) ; on retiendra surtout :

Phaseolus communis L. ex Pritzel (1855)

Phaseolus esculentus Salisb. (1797)

Phaseolus gonospermus Savi (1825)

Phaseolus nanus L. (1753)

La liste des noms vernaculaires est tout aussi longue, mais on rencontre le plus souvent : haricot commun, haricot vert, mange-tout, princesse.....ect. Gepts *etal.*, 1986.

Selon Guinard (1998), la position systématique du *P. vulgaris* est la suivante ;

-Règne : végétal

-Embranchement : Spermaphytes

-Sous Embranchement : Angiospermes

- Classe : Dicotylédone

-Ordre : Fabales

-Famille : Fabacées

-Genre : *Phaseolus*

- Espèce : *Phaseolus vulgaris l*

2.1.2. La légumineuse *Phaseolus coccineus*

Le haricot d'Espagne est une plante herbacée vivace à rames, défini par Linné en 1753. La liste de ses synonymes est moins abondante ;

Phaseolus bicolor Arrab. (1825)

Phaseolus multiflorus Willdenow (1803)

Phaseolus vulgaris var. coccineus L. (1763)

C'est une légume oublié, appréciée pour ses fleurs rouge écarlate ou blanches en bouquets s'épanouissant en été et pour leurs graines comestibles de taille peu réduite à celles de *P. vulgaris* avec une couleur marron mouchetée en rouge (selon la variété cultivée en Algérie) (figure 3- b). A la différence des autres espèces du genre *Phaseolus*, c'est une plante par sa racine pivotante tubérisée mais uniquement en climat chaud. C'est pour cette raison qu'elle est habituellement cultivée comme plante annuelle. Elle a des tiges volubiles pouvant atteindre quatre mètres de long.

Les feuilles, alternes, vert foncé, sont composées de trois folioles ovales-acuminées. Les fleurs papilionacées, qui sont de couleur rouge, orange ou blanche, selon le cultivar ; les graines de l'haricote d'Espagne germent au bout de 10-14 jours après le semis, la floraison débute 40-60 jours après le semis ces fleurs s'ouvrent à l'aube et se fanent au moment où il se couche. (Brink et Belay., 2006).

Comme ce matériel a été peu diffusé hors des territoires américains, un petit nombre de noms vernaculaires sont connus. Cette situation contraste avec le grand nombre de noms donnés par les différentes cultures amérindiennes. Il convient de signaler que cette situation prévaut également pour toutes les autres espèces cultivées : l'abondance de noms n'est finalement qu'un reflet de la diversité des matériels, des usages et de la longue tradition culturelle de la part des peuples amérindiens. Signalant seulement en langue anglaise : scarlet runner bean, runner bean, dutch caseknife...ect. La *P. coccineus* suit la taxonomie suivante

- Ordre : Fabales
- Famille : fabaceae
- Sous-famille : Faboideae,
- tribu : Phaseoleae
- Sous-tribu : Phaseolinae
- Genre : *Phaseolus*
- Espèce : *phaseolus coccineus*



Figure 3: Couleur et forme des graines : (a)- Graines de *Phaseolus vulgaris*. (b)- Graines de *Phaseolus coccineus*

3. Le microsymbiont

Avec leur potentiel à fixer jusqu'à 300 kg d'azote moléculaire / ha de terres cultivées, les bactéries symbiotiques contribuent de manière significative à une offre d'azote écologiquement rationnelle et rentable. La plupart des rhizobia (ordre Rhizobiales) appartiennent à des familles de la subdivision α -protéobactéries (Garrity *et al.*, 2002), bien que des β -protéobactéries symbiotiques moins potentiellement fixateurs de l'azote atmosphérique aient été rapportées (Chen *et al.*, 2003, Rasolomampianina *et al.*, 2005).

Les Rhizobium sont des bactéries du sol Gram-négatives unicellulaires qui forment un groupe diversifié de onze genres qui sont capables d'induire des nodules de fixation d'azote sur les racines de légumineuses comme *Vicia faba*. La symbiose entre Rhizobium et les légumineuses est très importante et représente 50% de 175 millions de tonnes de fixation biologique totale de l'azote utilisée dans l'agriculture. Le *Rhizobium leguminosarum symbiovar. Viciae* est parmi les rhizobies à croissance rapide et capable de noduler *Vicia sativa* et *Pisum sativum* (Doyle, 1998).

Les *Rhizobium* sont des bactéries qui fixent l'azote en symbiose avec les plantes, notamment les légumineuses (Spaink *et al.*, 1998). Cette relation symbiotique est cruciale pour le cycle de l'azote, et la compréhension des mécanismes symbiotiques est un défi scientifique avec des applications directes dans l'agronomie et le développement des plantes (Resendis-Antonio *et al.*, 2007).

3.1 Classification des Rhizobium

Il est impératif de connaître les caractéristiques phénotypiques, génotypiques et biologiques d'un micro-organisme afin de le différencier des organismes pathogènes et/ou toxigènes apparentés ou des autres organismes nuisibles pour la santé végétale, animale, humaine et pour l'environnement. Par conséquent, l'identification précise du ou des micro-organismes actifs constitue une composante fondamentale de toutes les évaluations d'innocuité des suppléments microbiens. Jusque dans les années 1970, les microbiologistes ne disposaient pas de beaucoup de techniques pour la classification, ils se basaient essentiellement sur des critères phénotypiques (capacité à noduler une espèce de légumineuse pour un *Rhizobium* par exemple), mais la généralisation des techniques de caractérisation basées sur la réaction de polymérisation en chaîne a révolutionné la taxonomie bactérienne. Les bactéries nodulant les légumineuses ont vu leur classification sans cesse remaniée,

Surtout ces dernières années, grâce aux techniques de l'ataxonomie polyphasique. Nous présentons ici un aperçu des principales techniques moléculaires actuellement employées pour la caractérisation bactérienne, avec des exemples d'application de ces techniques puisés dans les bactéries nodulantes légumineuses (Zakhia et de Lajeudi., 2006) .

Aussi, la taxonomie des rhizobia a changé significativement ces dernières années avec le développement des nouvelles techniques d'études. Toutefois, cette taxonomie restera toujours dynamique car bien que les rhizobia soient étudiés depuis plus de 100 ans, des symbioses ont été identifiées pour moins de 10% des 720 genres de légumineuses (Fossou.,2011).Ainsi, il est probable qu'avec ces nouveaux outils d'étude, de nouveaux genres de rhizobia soient découverts parmi les sous-classes alpha et beta des Protéobactéries et peut-être même parmi d'autres taxons (Vernie., 2008).

3.2. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des *Rhizobiums*

Depuis plus d'une trentaine d'années, les taxonomistes bactériens reconnaissent que le système de classification des bactéries ne plus se fait baser sur des similarités de fonctions (diazotrophes, phototrophes, nodulation) et qu'il est nécessaire d'adopter une approche nécessitant la convergence du maximum de données (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) pour déterminer les groupes taxonomiques ou taxons bactériens. Cette approche, appelée taxonomie polyphasique a considérablement modifié la perception que les taxonomistes bactériens avaient des relations entre divers groupes de microorganismes (Olsen *et al.*, 1994).

3.2.1 Méthodes phénotypique

Les méthodes phénotypiques sont celles qui ne sont pas directement basées sur l'ADN ou l'ARN. Elles font appel principalement aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries en utilisant des techniques standardisées (Vandamme *et al.*, 1996 ; Graham *et al.*, 1991). Dans la majorité des laboratoires de microbiologie les tests phénotypiques classiques sont utilisés pour l'identification et constituent la base de la description formelle des taxa. Le développement des systèmes miniaturisés et automatisés tels que les API ou BIOLOG, la généralisation du traitement des données par ordinateur et l'analyse numérique ont rendu plus aisée la classification des microorganismes par l'approche phénotypique. Cependant pour certains groupes de bactéries, le manque de caractéristiques phénotypiques pose souvent des problèmes

pour leur description ou leur différenciation. Dans ces cas, les méthodes génétiques ou chimiotaxonomiques sont nécessaires pour identifier de manière sûre les souches. Actuellement les techniques phénotypiques les plus couramment utilisées par les microbiologistes sont :

a. L'analyse phénotypique classique

Cette méthode concerne la caractérisation des microorganismes par une série de tests sur la base de critères de vitesse de croissance, de pH, de tolérance à la salinité ou à d'autres facteurs de l'environnement, croissance en présence de substrats donnés. Cette analyse phénotypique est classique et constitue la base de la microbiologie.

b. Les systèmes commerciaux

Ce sont des systèmes miniaturisés (Galerie API, BIOLOG...). Il s'agit d'une batterie de tests de caractérisation de microorganismes en présence de substrats (croissance, activité enzymatique...). Très pratiques d'utilisation et performants, ces systèmes permettent de créer des bases de données intéressantes. Cependant ils restent coûteux, et leur fabrication n'est pas assurée dans le temps.

c. La composition des parois cellulaires

Cette approche peut servir pour caractériser les bactéries mais elle est utilisée plutôt pour les bactéries à gram-positif, car la composition de leur paroi contient une variabilité d'éléments informatifs (Schleifer et Kandler., 1972).

d. FAME (« Fatty Acid Methyl Ester ») ou analyse des acides gras cellulaires

Les acides gras sont les composants majoritaires des lipides cellulaires. Étant donné la variabilité de longueur de leur squelette lipidique, de la position de la double liaison ou aussi la variabilité des groupes de substitution présents sur leur chaîne, leur utilisation en taxonomie de procaryotes a donné de bons résultats (Jones et Krieg 1984; Suzuki *et al.*, 1993). La technique FAME a été introduite pour la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL) par Jarvis et Tighe., 1994. Cette méthode consiste en l'extraction des acides gras totaux de la cellule bactérienne et l'obtention de profils d'acides gras qui sont caractéristiques de la souche étudiée. Cependant, cette méthode doit procéder à une standardisation du milieu et des conditions de culture, car la composition d'acides gras dans

les cellules peut varier selon les conditions environnementales. So *etal.*,1994 ont appliqué cette méthode pour étudier la diversité d'isolats de *Bradyrhizobium* isolés d'*Aeschynomene*, et la technique FAME donnait un résultat concordant avec les résultats obtenus avec le séquençage de l'ADNr 16S. D'autre part, plusieurs auteurs ont appliqué cette technique pour l'étude de la diversité de bradyrhizobia (Graham *etal.*,1995; Zhang *etal.*,1999). Cette technique a un pouvoir résolutif qui peut aller jusqu'à la séparation des différentes espèces de BNL (les espèces de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Agrobacterium*) sauf pour *R. etli* et *R. leguminosarum* (Jarvis *et al.*,1996). Récemment, Ngom *etal.*, 2004 ont utilisé cette méthode avec le séquençage de l'ADNr 16S pour affilier au genre *Ochrobactrum*, une souche bactérienne fixatrice d'azote en symbiose avec *Acacia mangium*.

e. Le MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry)

Le (MALDI-TOF) spectrométrie de masse (MS) est devenue une méthode de choix pour l'identification des bactéries (Sauer et Kliem, 2010). Au laboratoire de microbiologie clinique cette technique est utilisée pour l'identification des bactéries et des mycètes grâce à l'étude des protéines totales. En effet, le MALDI-TOF a remplacé de plus en plus les procédures basées sur l'ADN pour l'identification des bactéries, en particulier dans les laboratoires de diagnostic responsable de caractériser les isolats cliniques (Seng *etal.* 2009 ; Ziegler *etal.*, 2015). MALDI-TOF MS offre la possibilité d'une identité bactérienne et la résolution en genre, en l'espèce et même à la sous-espèce. Avec certains taxons, le MALDI-TOF a été appliquée avec succès aux diverses souches rhizobiales isolés des nodules racinaires des légumineuses. (Ferreira *etal.* 2011; Sánchez-Juanes *et al.* 2013; Ziegler *etal.* 2012) .Le spectre de masse obtenu pour une souche pure est comparé aux spectres d'une base de données pour identification. Cette technique comme toute autre technique a des avantages, car elle est rapide et peu coûteuse (hors coût appareil), permet une identification possible des bactéries et des mycètes, peu de gestes techniques, simplification de la démarche d'identification, et des inconvénients ; en cas de prélèvement contaminé, ou de mauvais dépôt l'identification est impossible ou erronée aussi cette identification est limitée aux micro-organismes présents dans la base de données (Moreda., 2015).

3.2.2. Méthodes utilisées pour une identification Moléculaire

L'étude des populations par isolement de bactéries sur milieux de culture ne permet la mise en évidence que d'une très faible proportion des espèces bactériennes présentes (Nocker *et al.*, 2007). Il existe beaucoup de choix au niveau des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des populations bactériennes. La technique utilisée dépendra du but de l'étude, du budget, des habitudes du laboratoire, de la complexité de la population étudiée et du temps disponible. (Huybens *et al.*, 2009). En effet il s'agit de techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Elles sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne. Ceci est la conséquence des progrès technologiques, mais également surtout du fait que la nouvelle conception de la taxonomie est qu'elle doit refléter les similarités entre les génomes (Zakhia et De Lajudie, 2006).

Les approches moléculaires ont offert la possibilité de caractériser les populations et les communautés de micro-organismes avec des capacités de traitement compatibles avec les impératifs de réplique et de diversification de l'échantillonnage des systèmes naturels.

Ces micro-organismes (micro-algues, bactéries, archées ...) qui étaient jusque-là considérés comme des compartiments types « boîtes noires », apparaissent désormais comme des populations et communautés dont il convient d'appréhender la dynamique temporelle et les patrons de répartition spatiale au même titre que ceux des macro-organismes (Meisterhans, 2012).

a. Détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G + C)

Le premier élément des acides nucléiques à avoir été utilisé en taxonomie est le pourcentage (mol %) de bases guanine et cytosine (Johnson, 1984). Ce pourcentage varie chez les bactéries de 25 % à 75 %. Deux organismes proches phylogénétiquement ont des valeurs de mol % G + C voisines, mais deux organismes qui ont les mêmes valeurs de mol %

G + C ne sont pas nécessairement proches phylogénétiquement. En effet, la détermination du % G + C ne prend pas en compte l'arrangement des nucléotides dans les molécules d'ADN. Les valeurs de ce pourcentage d'une souche à une autre au sein d'une même espèce ne doivent pas présenter une variation supérieure à 3 %. Les valeurs de ce pourcentage des espèces d'un genre donné ne doivent pas présenter une variation supérieure à 10 % (Stackebrandt et Liesack, 1993). Pour les BNL, ce taux varie de 56 % (*Ochrobactrum*) à 72,4 % (*Methylobacterium*). Cette valeur de mol % G + C est généralement donnée dans la

description d'une nouvelle espèce, d'autant qu'il est nécessaire de la déterminer pour définir les conditions d'hybridation ADN:ADN.

b. Le séquençage de l'ADNr 16S, et d'autres gènes ribosomiques:

Chez les procaryotes particulièrement, les gènes codant pour les ARN ribosomiaux sont organisés en opérons qui contiennent également des espaces intra-géniques ainsi que d'autres gènes codant pour les ARN de transfert (ARNt); Puisque, l'ADNr 16S codant pour la petite sous unité ribosomique d'environ 1500 pb (opéron *rrs* : *ribosomal RNA small subunit*) et l'ADNr 23S codant pour la grande sous unité d'environ 2500 à 3000 pb (opéron *rrl* : *ribosomal RNA large subunit*) (Gurtler et Stanisich, 1996) donc, ils sont très utilisés en vue de la taille de ces derniers. Au contraire, l'ADNr 5S est très peu utilisé dans les études de diversité en raison de sa petite taille d'environ 120 nucléotides. L'espace entre ces deux opérons est transcriptionnel d'où la désignation ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Normand *et al*, 1996) (figure 4).

Toutefois, depuis que Woese (1987) a montré que le gène de l'ADNr 16S est présent chez toutes les bactéries, qu'il a la même fonction et que sa structure est conservée, plusieurs chercheurs l'ont préférentiellement utilisé comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de rhizobia (Laguerre *et al*, 1994 ;Nour *et al*, 1994b).

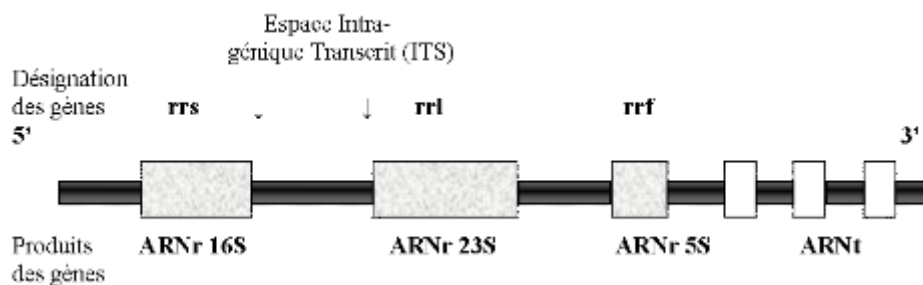


Figure 4: Organisation de l'opéron des l'ADNr observés chez les Procaryotes (El Hilali 2006)

Les gènes ribosomiques sont utilisés comme marqueurs moléculaires dans l'étude phylogénétique de différents organismes en raison de leur universalité, leur abondance, leur taille convenable aux analyses comparatives (Ludwig et Schleifer, 1999). Le gène 16SrDNA est composé de régions conservées très utiles pour la désignation des amorces (Hillis et Dixon, 1991 ; Stahl et Amman, 1991) et d'autres régions de séquences suffisamment variables

pour servir comme un excellent moyen taxonomique (Grimont et Grimont, 1986). Ces gènes permettant l'appariement d'amorces « universelles » comprennent 9 zones hypervariables (de V1 à V9) (Baker *et al.*, 2003), permettant la distinction de l'espèce (Van de Peer *et al.*, 1996). Donc, la séquence du 16S rDNA est utilisée pour clarifier la taxonomie de certains taxons (McInerney *et al.*, 1995).

c. Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

basée sur le polymorphisme de taille de séquences d'ADNr 16S après restriction enzymatique c'est-à-dire après coupure de la séquence d'ADN au niveau de motifs nucléiques particuliers dépendants du choix de l'enzyme (Avaniss-Aghajani *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1997).

L'ADNr 16S est amplifié à l'aide d'un couple d'amorces situées de part et d'autre de l'ADNr 16S, et dont l'amorce amont est couplée à un fluorochrome permettant comme pour l'ARISA la détection des fragments par le séquenceur. Lors de la restriction enzymatique, les fragments d'ADN sont chacun clivés en plusieurs fragments de tailles différentes mais seul le fragment couplé au fluorochrome pourra être détecté d'où l'appellation « Terminal » de cette technique de RFLP.

d. L'hybridation ADN-ADN

La technique d'hybridation ADN-ADN est une méthode génétique commune utilisée pour étudier l'hétérogénéité, la spéciation et la taxinomie (Martens *et al.*, 2008; Degefu *et al.*, 2013). La valeur de cette hybridation est un indicateur de similarité des séquences entre génomes entiers qui exprimée sous forme d'un pourcentage d'hybridation ADN/ADN et de la stabilité thermique de l'hybride (De Ley *et al.*, 1970 ; Grimont *et al.*, 1980 ; Wayne *et al.*, 1987)

Tableau 1: Classification des Rhizobium (Berrada et Fikri-Benbrahim., 2014)

Genre espèce	La plante hôte
Class: Alphaproteobacteria	
Order: Rhizobiales	
Family: Rhizobiaceae	
Genus: Rhizobium	
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>Symbiovarviciae</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Symbiovartrifolii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galegaorientalis</i>
<i>Symbiovarofficinalis</i>	<i>Galegaofficinalis</i>
<i>Symbiovarorientalis</i>	

<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
<i>Symbiovarmimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunianatans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>
<i>Symbiovargallicum</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>
<i>Symbiovarphaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Symbiovargiardinii</i>	<i>Phaseolusvulgaris</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodiumsinuatum, Centrosema, etc.</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicagoruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigoferasp.</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. multihospitium</i>	Plusieurs espèces de légumineuses
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryzaalta</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Pisumsativum</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsisthaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caraganaintermedia</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonellaarchiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropisglabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	usine de dunes côtières
<i>R. radiobacter</i>	*
<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. rubi</i>	*
<i>R. vitis</i>	*
<i>R. nepotum</i>	*
Genus: Ensifer	
<i>E. meliloti</i>	Medicago, Melilotus, Trigonella
<i>E. fredii</i>	
<i>symbiovarfredii</i>	Glycine, Vigna, Cajanus
<i>symbiovarsensis</i>	Glycine
<i>E. sahelense</i>	Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena
<i>E. terangae</i>	les plantes hôtes différentes
<i>symbiovaracaciae</i>	Acacia
<i>symbiovar sesbania</i>	Sesbania
<i>E. medicae</i>	Medicagotruncatula, Melilotus
<i>E. arboris</i>	Acacia, Prosopis
<i>E. kostiense</i>	Acacia, Prosopis
<i>E. xingianense (Formerly: Sinorhizobiumxingianense)</i>	Glycine max
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	Kummerowia stipulaceae
<i>E. americanum</i>	Acacia
<i>E. mexicanus</i>	Acacia angustissima
<i>E. numidicus</i>	Medicagosativa

Genus: <i>Shinella</i>	
<i>S. kummerowiae</i>	Kummerowia stipulacea
Family: <i>Phyllobacteriaceae</i>	
Genus: <i>Mesorhizobium</i>	
<i>M. loti</i>	Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.
<i>M. huakuii</i>	Astragalus sinicus
<i>M. ciceri</i>	Cicer arietinum
<i>M. tianshanense</i>	Glycyrrhizapallidiflora
<i>M. mediterraneum</i>	Cicer arietinum
<i>M. plurifarium</i>	Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,
	Amorpha fruticosa
<i>M. amorphae</i>	Prosopis alba
<i>M. chacoense</i>	Astragalus adsurgens
<i>M. septentrionale</i>	Astragalus adsurgens
<i>M. temperatum</i>	*
<i>M. thioganicum</i>	
<i>M. albiziae</i>	Albizia kalkora
<i>M. caraganae</i>	Caragana spp.
<i>M. gobiense</i>	Wild legumes
<i>M. tarimense</i>	Wild legumes
<i>M. australicum</i>	Biserrula pelecina
<i>M. opportunistum</i>	Biserrula pelecina
<i>M. metallidurans</i>	Anthyllis vulneraria
<i>M. alhagi</i>	Alhagi
<i>M. camelthorni</i>	Alhagi sparsifolia.
	Différents arbres agroforestiers de légumineuses
<i>M. abyssinicae</i>	Cicer arietinum
<i>M. muleiense</i>	Différents arbres agroforestiers de légumineuses
	Astragalus sinicus
<i>M. hawassense</i>	Robiniapseudoacacia
<i>M. qingshengii</i>	Différents arbres agroforestiers de légumineuses
<i>M. robiniae</i>	Caragana espèce
	Astragalus espèce
<i>M. shonense</i>	Anagyris latifolia, Lotus berthelotii
<i>M. shangrilense</i>	
<i>M. silamurunense</i>	
<i>M. tamadayense</i>	
Genus: <i>Phyllobacterium</i>	
<i>P. trifolii</i>	Trifolium pratense
Family: <i>Methylobacteriaceae</i>	
Genus: <i>Methylobacterium</i>	
<i>M. nodulans</i>	Crotalaria spp.
Genus: <i>Microvirga</i>	
<i>M. lupini</i>	Lupinus spp.
<i>M. lotononidis</i>	hôte légumineuse Différent
<i>M. zambiensis</i>	hôte légumineuse Différent
Family: <i>Brucellaceae</i>	
Genus: <i>Ochrobactrum</i>	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	Cytisus
<i>Ochrobactrum lupini</i>	Lupinus albus
Family: <i>Hyphomicrobiaceae</i>	
Genus: <i>Azorhizobium</i>	
<i>A. caulinodans</i>	Sesbania rostrata
<i>A. dobereineriae</i>	Sesbania virgata
<i>A. oxalatifilum</i>	
Genus: <i>Devosia</i>	

<i>Devosianeptunia</i>	Neptunianatans
Family: Bradyrhizobiaceae	
<i>B. japonicum</i>	Glycine max, Glycine soja
<i>B. elkanii</i>	Glycine max
<i>B. liaoningense</i>	Glycine max
<i>B. yuanmingense</i>	Lespedeza
<i>B. betae</i>	Betaevulgaris
<i>B. canariense</i>	Genisteae et Loteae
<i>B. iriomotense</i>	Entadakoshunensis
<i>B. jicamae</i>	Pachyrhizuserosus
<i>B. lablabi</i>	Lablabpurpureus
<i>B. huanghuaihaiense</i>	Glycine max
<i>B. cytisi</i>	Cytisusvillosus
<i>B. daqingense</i>	Glycine max
<i>B. denitrificans</i>	Aeschynomene
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	Pachyrhizuserosus
Class: Beta Proeobacteria	
Order: Burkholderiales	
Family: Burkholderiaceae	
Genus: Burkholderia	

4. La génétique de la nodulation

Le nodule est le résultat d'un complexe dialogue moléculaire entre le *Rhizobium* et la légumineuse (Garg et Geetanjali, 2007). Ce dernier, fait naître d'une symbiose fixatrice d'azote, qui débute par la formation de nodosités au niveau des racines ou des tiges de la plante hôte. La formation de ces nodosités survient quand les rhizobia pénètrent leur hôte d'une manière coordonnée et contrôlée. De nombreux gènes appartenant aussi bien aux bactéries qu'à la plante hôte interviennent au cours de ce processus.

4.1. Les flavonoïdes

Les médiateurs végétaux de l'interaction, de type flavonoïdes qui sont des composés phénoliques, ont été décrits comme un groupe structurellement diversifié de métabolites secondaires (Wong, 1973), et leur rôle dans la mise en place de l'interaction symbiotique est bien documenté. Ainsi nous avons vu précédemment qu'un grand nombre de flavonoïdes des légumineuses étaient des inducteurs de gène *nod* de rhizobia. Ces flavonoïdes se répartissent en différentes classes telles que les flavones, les chalcones, les isoflavones, anthocyanines ou flavonol. Ces composés sont décrits dans de nombreuses espèces végétales, mais la capacité de production ne suffit pas, bien entendu, à la mise en place de l'interaction. Par ailleurs, certains flavonoïdes sont à la fois des inducteurs des gènes *nod* chez certaines espèces de rhizobia, mais des inhibiteurs pour d'autres. La balance entre flavonoïdes

inducteurs et inhibiteurs produits par une plante participe donc certainement à la régulation de la nodulation et également à la spécificité d'interaction (Walker, 2010).

4.2. Les gènes de nodulation

4.2.1. Gènes nod communs (ABCIJ)

Les gènes *nod* communs (*nod* A, B, C, I et J) sont des gènes de nodulation communs à tous les rhizobia jusqu'ici étudiés. Ils sont situés sur un opéron duquel les *nod* ABC sont essentiels pour la nodulation. Ces derniers sont physiquement et fonctionnellement conservés chez toutes les espèces de rhizobia et leurs mutations provoquent une perte complète de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes. En effet, ces gènes sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse (*curling*) et inciter les cellules végétales à se diviser (Brewin *et al.*, 1992 ; Pelmont, 1995).

4.2.2. Gènes nod spécifiques (nod H, nod FE, nod G, nod MN, nod Q etc.)

Les gènes *hsn* (*host specific nodulation*) sont des gènes spécifiques de la plante à infecter (Pelmont, 1995). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia (Sharma *et al.*, 1993). Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet, 1996). Leur mutation provoque un retard, une réduction de la nodulation ou une modification de leur spécificité d'hôte (Debelle et Sharma, 1986 ; Debelle *et al.*, 1986; Horvath *et al.*, 1986 ; Cervantes *et al.*, 1989). Après leur transcription, les gènes *nod* produisent des enzymes qui contrôlent la synthèse de molécules indispensables au processus de nodulation. Ces signaux, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod, sont des molécules lipo-chito-oligosaccharidiques (LCOs) (Terefework, 2002). La synthèse du noyau lipooligosaccharide de ces molécules est contrôlée par les gènes *nod* ABCD tandis que les gènes *hsn* assurent les diverses substitutions de celles-ci (Debelle *et al.*, 2001).

Les facteurs Nod sont responsables de la spécificité de la reconnaissance entre les symbiotes et du déclenchement de l'organogenèse nodulaire. En effet, même émis à des concentrations minimales, ces signaux peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Debelle *et al.*, 2001). L'identification du signal Nod est une étape essentielle dans l'établissement du dialogue moléculaire à l'origine de la symbiose entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote.

4.2.3. Gènes *nif*

Les gènes *nif* existent chez plusieurs bactéries dont les rhizobia (Young et Haukka., 1996). Chez ces derniers, ces gènes codent pour la synthèse d'un complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote et connu sous le nom de nitrogénase ou dinitrogénase (HOPKINS, 2003). Ce complexe enzymatique est constitué de deux métalloprotéines de tailles différentes : le site de la réduction du substrat correspondant à la MoFe-protéine ou dinitrogénase (245 KDa) et le donneur d'électrons correspondant à la Fe-protéine ou dinitrogénase réductase (64 KDa). La Fe-protéine est un dimère de deux sous unités polypeptidiques identiques codé par le gène *nif* H. Quant à la Mo-Fe-protéine, elle est un tétramère composée de deux sous unités non identiques (Werner, 1992 ; Hopkins, 2003). Celle-ci est codée par les gènes *nif* D et *nif* K.

5. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse

La symbiose, relativement récente dans l'évolution, dérive d'une ancienne symbiose mycorhizienne qui était répandue dans le règne végétal et permettait à la plante d'obtenir des nutriments phosphatés essentiels (Harrison, 2005). La capacité des *Rhizobia* à coloniser les racines des plantes aurait été acquise par un événement de transfert horizontal de gène symbiotique il y a 60 millions d'années, date à laquelle seraient apparues des légumineuses dans le monde vivant (Sprent, 2008). L'étude de cette importante symbiose depuis plus de 100 ans a permis de comprendre certains mécanismes de son établissement et d'explorer la diversité biologique des deux types de partenaires associés. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours de ces interactions, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines (Figure 1-a) (Lafay *et al.*, 2006 ; Noel, 2009) ou plus rarement sur les tiges à partir de primordia racinaires dormants et disposés en rang le long de la tige (Figure 1-b). C'est au sein de cet organe protecteur que l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries. Dans certains cas, ces études ont conduit à la sélection de souches très performantes de bactéries fixatrices d'azote et le développement de leur inoculum. Les inoculats permettent en effet d'améliorer la productivité des légumineuses en culture, de mieux réduire leur dépendance vis-à-vis des engrais azotés et de s'inscrire par conséquent dans la logique d'un développement agricole durable (Fossou 2011).

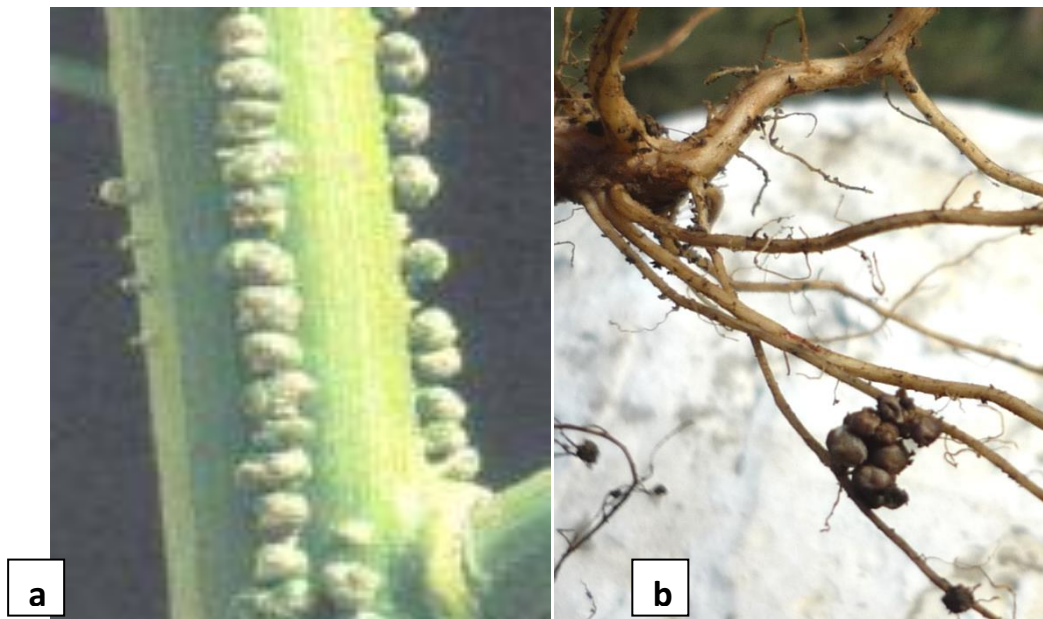


Figure 5: a-Tige portant des nodules aériens matures (Duhoux et Nicole, 2004) b- racine de *Phaseolus coccineus* portant des nodosités (site Mdjez Ammar, Guelma)

D'après la littérature, au moins six rhizobiums (*Bradyrhizobium Spp.*, Lange 1961; *Rhizobium leguminosarum* Bv. *Phaseoli*, Jordanie 1984; *R. tropici*, Martinez-Romero *et al.* 1991; *Rhizobium etli*, Segovia *et al.*, 1993; *Rhizobium giardinii* et *Rhizobium gallicum*, Amarger *et al.* 1997;) nodulent cette légumineuse (le *Phaseolus*) (Michiels *et al.*, 1998). Malgré ça, la plupart des rhizobiums associés aux haricots sont seulement *R. etli* et *R. tropici*, et se sont généralement localisés dans le site d'origine de leur plante hôte, l'Amérique du centre. Puisque le germoplasme de *Phaseolus* dans chaque centre d'origine est impliquant suffisamment des différentes Hybridations, des représentants de chaque région donne naissance à des variants génétiques (Gepts et Bliss 1985; Koinange et Gepts, 1992), les différences au niveau des bactéries nodulant la plante, les rhizobia, associées Avec ces hôtes sont également à prévoir.

Bien que la symbiose légumineuse-*Rhizobium* soit une interaction hautement adaptée et régulée, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente. En effet, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment et de manière autonome, et chaque nouvelle génération de plante doit être infectée par de nouvelles bactéries (Kneip *et al.*, 2007). Lorsque cette symbiose a lieu, elles présentent de nombreux intérêts aussi bien pour les deux partenaires que pour la pratique agricole.

6.L'organogénèse d'un nodule racinaire

6.1. Formation des bactéroïde

L'envahissement des bactéries dans des cellules de la plante hôte est débuté par la formation d'une gouttelette d'infection. Les gouttelettes d'infection peuvent former au bout des fils intracellulaires courts d'infection (par exemple dans haricots de *Phaseolus* ou, plus habituellement, aux positions dans l'infection filète où la paroi des cellules devient abrupte et les cellules bactériennes entrent en contact direct avec la membrane de plasma de centre-cellule. Les bacteroides mûrs de membrane de cellules de la plante continuent à accumuler de grandes quantités de PHB ou polyhydroxybutyrate (Juergen Prell *etal.*, 2006).

6.2. Les étapes de la nodulation

6.2.1. Préinfection

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la croissance des bactéries se fait de manière sélective par la plante (Savka *etal.*, 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances de type flavonoides et isoflavonoides, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine (Kape *etal.*, 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado *etal.*, 1995).

Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes *nod* bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod, des lipochitooligo-saccharides (Perret *etal.*, 2000).

Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte ;

La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures ; les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints qui enferme les *Rhizobium* (Wais *etal.*, 2002). Elle fait intervenir des changements dans l'arrangement des microtubules (Timmers *etal.*, 2007) ; plus précisément, les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement (Wood et Newcomb, 1989).

6.2.2.L'infection

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

6.2.3.Développement du nodule

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi., 2000). Les nodules de type indéterminé (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe.

La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée. Dans les deux cas, les cellules du cortex se divisent de manière anticline puis péricline (Timmers *et al.*, 1999).

Toutes les cellules du cortex ne se divisent pas, ce qui semble indiquer que la susceptibilité de ces cellules pourrait être liée à un statut particulier, notamment une modification de la concentration en hormones (Mathesius *et al.*, 2000a).

De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de préinfection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (Van Brussel *et al.*, 1992). Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation. L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de « pseudonodules » (Fang et Hirsch, 1998) suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule. De plus, les facteurs Nod produits par *Rhizobium* avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante.

Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements sont inconnus mais il semble que les facteurs Nod agissent sur les flux d'auxine à deux niveaux : une inhibition du transport de l'auxine (Mathesius *et al*, 1998 ; Boot *et al*, 1999) et l'induction de la synthèse de flavonoïdes (Mathesius *et al*, 2000a). Les flavonoïdes sont susceptibles de provoquer l'accumulation de l'auxine en réduisant son oxydation de manière directe (substrats de l'enzyme) ou indirecte en réagissant avec H_2O_2 (Mathesius, 2001). Leur rôle dans l'inhibition du transport de l'auxine est également supposé (Brown *et al*, 2001). Des travaux récents montrent que l'extinction par la technique d'ARN interférent de l'expression du gène de la chalcone synthase (CHS) chez *M. truncatula* entraîne une augmentation du transport de l'auxine associée à une inhibition de la nodulation (Wasson *et al*, 2006)

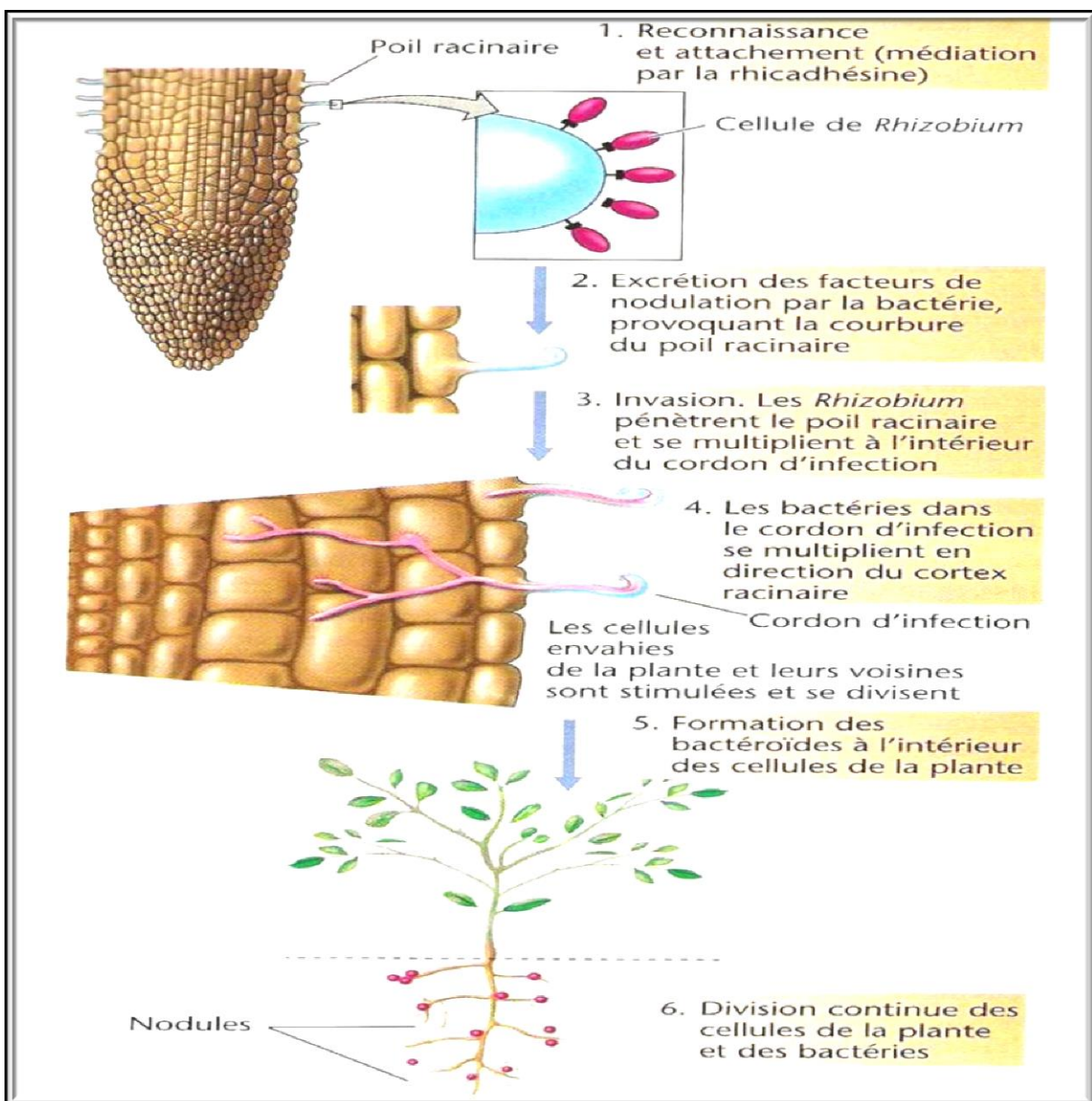


Figure 6: Etapes de la formation d'un nodule racinaire chez une légumineuse infectée par rhizobia Madigan & Martinko ,2006

Chapitre 2:Matériel et méthodes

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au laboratoire d'Ecologie microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université des Frères Mentourie Constantine I (Algérie) et le laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production des Protéines chez les Eucaryotes, au niveau du centre de recherche CBS Sfax, Tunisie.

Après une longue inspection et une enquête faite au niveau de l'ITGC de Constantine nous avons déduit la présence de deux espèces de la légumineuse du genre *Phaseolus*, dont en *Phaseolus vulgaris* (figure 8) et *P. coccineus* (figure 7), uniquement qui sont cultivées en Algérie à des fins économiques et dont la nature sont les plus adaptées à l'environnement et au climat du territoire algérien.



Figure 7: Champ de Phaseolus vulgaris (Site Boumaaza , Annaba,Mars 2012).



Figure 8: Champ de Phaseolus coccineus (Site Mdjez Ammar, Guelma, Février 2012)

I. Isolement des bactéries à partir des nodules

I.1. Collecte des nodules

Cette étude a été menée sur deux espèces du genre *Phaseolus* qui sont *Phaseolus coccineus* (haricot rouge) cultivée dans trois régions différentes ; deux zones semi arides (Mdjaz Ammar, Salah Salah Salah wilaya de Guelma) et une région subhumide (Tamalous, El kol, Wilaya de Skikda) . La deuxième espèce est *Phaseolus vulgaris* (haricot blanc) cultivée sur deux régions subhumides différentes de l'Est du pays ; Benzouit, Wilaya de Skikda et Boumaaza, Wilaya de Annaba.

Ce recueil des nodules est en guise d'en effectuer des collectes de deux à cinq populations différentes pour chaque site de prélèvement. On note que la période pendant laquelle la collecte des nodules a été réalisée est entre la fin du stade de floraison jusqu'à l'apparition des gousses (mis février jusqu'à mis mars) selon les techniques préconisées par Vincent,(1970) et Somasegaran, etHoben ,(1994).

En effet, 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 (figure 9). 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 (figure 10).



Figure 9: collecte des nodules (Site Tamalous, Skikda, 2012)

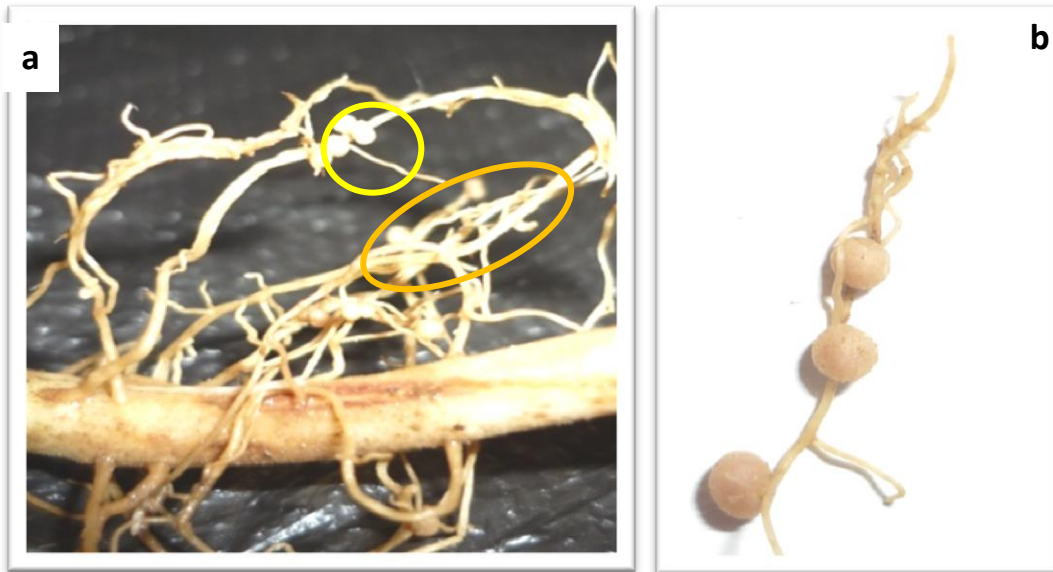


Figure 10: (a)- Nodules après rinçage (b)- Nodules séchés au papier filtre

I.2. Conservation et stérilisation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4° C jusqu'à 48h pour un usage immédiat. Pour une longue conservation, il est recommandé d'utiliser un dessiccateur spécial : le chlorure de Calcium (CaCl_2) (Vincent., 1970) (figure 11).

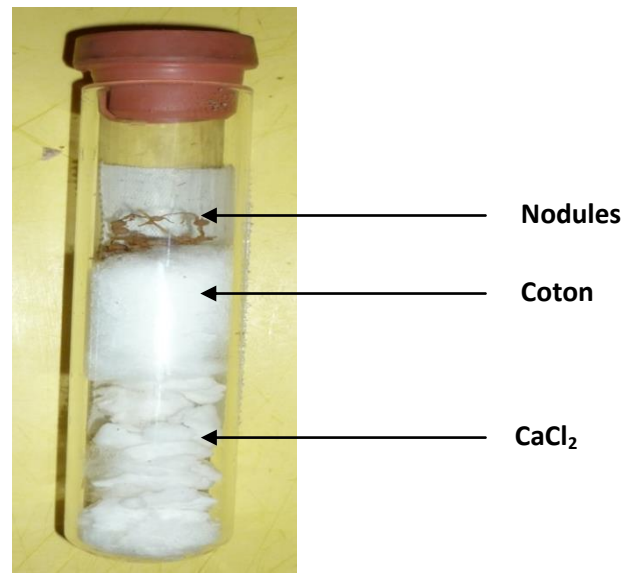


Figure 11: Conservation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont préalablement 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 (HgCl_2) acidifié à 0.1% (p/v) pendant 3mn, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent.,1970).

I.3. Isolement, purification et conservation des bactéries

L'isolement des bactéries est réalisé selon la méthode de Vincent (1970) et de Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile.

Le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, Yeast-Mannitol-Agar (YMA), (Vincent, J.M., 1970) additionné de rouge Congo et incubée 2-3 jours à 28°C (Singh et *al.*, 2008). Ceci pour mettre en évidence les souches absorbant très peu le colorant, puis on ensemence ces dernières sur boîtes de YMA (Yeast- Mannitol- Agar), et sur le BTB afin de déterminer leur vitesse de croissance (Vincent, 1970; Jordan, 1984 ;Somasegan et Hoben., 1994). 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 CaCO_3 (3g/l) en tube incliné (Vincent, J.M., 1970 ; Beck *etal.*,1993). Après incubation les souches sont stockées au réfrigérateur en vu de leur caractérisation.

2. Caractérisation métabolique 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 (Vincent, J.M., 1970, 1982 ; Jordan, 1984 ; 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, et la production de 3-cétolactose sur milieu lactosé.

2.1. Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

2.1.1. Test du 3-Cétolactose (Bernaerts et De Ley, 1963)

Ce test permet de distinguer les colonies de *Rhizobium* et d'*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 :

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	173g
Na_2CO_3	100g
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	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_2O de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict.

2.1.2. 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).

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

2.2. Recherche d'enzymes spécifiques pour la nodulation

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 , un degré restreint d'uréase, et la présence d'une β -galactosidase , en faisant croître les isolats sur des milieux spécifiques.

2.2.1. Réduction des nitrates

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Behringer., 1974) contenant 0,1% de KNO_3 (p/v) pendant 4 jours avec agitation. Au terme de l'incubation, on ajoute à chaque tube les réactifs suivants : a- nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique dans l'acide acétique 5M) et b- nitrate réductase 2 (α -naphtylamine dans l'acide acétique 5M). L'apparition d'une coloration rouge révèle la réduction des nitrates en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et l'observation de la teinte obtenue après quelques minutes.

2.2.2. Activité cellulosique (Struffi *et al.*, 1997)

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode du rouge Congo de Teather et Wood (1982), un 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 boîte de milieu BIII (Dazzo, 1984) contenant 0.25% de CMC. Après incubation à 30°C, les boîtes 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 de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1 M ; les boîtes sont ensuite abandonnées sur paillasse à température ambiante puis vidées. Un halo jaune-orangé entoure des colonies qui témoignent d'une présence de l'enzyme recherché.

2.2.3. Activité pectinolytique

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 polygalacturonique.

2.2.4. 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 de l'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.

2.2.5. La recherche de la β -galactosidase

La β galactosidase est un enzyme inductible, c'est-à-dire qu'il n'est synthétisé que lorsque le lactose a pénétré dans la cellule bactérienne ; il suffit de quelques molécules de lactose intracellulaire pour que la synthèse de la β 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 ose on fait une suspension bactérienne épaissée 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- β -D-galactopyranoside). Ce réactif, comme le lactose, possède le radical β -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 30 mn à 37°C.

2.3. Tests nutritionnels

2.3.1. Utilisation de la source de carbone (Jordan, 1984)

Les souches sont cultivées sur le milieu BIII (Annexe I) où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D- Arabinose, D- Fructose, D- Galactose, D- Saccharose, D- Glucose, D- Xylose, Sorbitol, 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 bactérien et incubés à 28°C pendant 24 heures, 48 heures et 72 heures. L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée l'estimation de la croissance en mesurant la densité optique à 600 nm.

2.3.2. Utilisation des acides aminés comme source d'azote

Le milieu utilisé pour ce test est le milieu défini 8 (Lindström et Lehtomäski., 1988) (Annexe 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.

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 composition est la suivante :

Solution A: g/l

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

Solution B : mg/l

H ₃ BO ₃	10
ZnSO ₄	1
CuSO ₄	1
MnCl ₂ 4H ₂ O	1
FeCl ₃ 6H ₂ 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. λ_{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 4 ; 4.5 ;5 ; 5.5 ; 5.8 ;6.8 ; (témoin) ; 7.8 ; 8.8 ; 9.8 ;10 et 11. 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 (Cd), Plomb (pb), Mercure (Hg), Zinc(Zn), 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 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 20 à 1500 μ g/ml de milieu) des métaux lourds suivants : Cuivre ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mercure ; HgCl_2 ,Cadmium ; $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,Zinc ; ZnCl_2 ,Plomb ; $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, et l'Antimoine ; SbO_3 . Les boîtes sont mises à incubation à 28°C pendant 5 à 7 jours.

4.Caractérisation des rhizobia par la sensibilité aux phages (Vincent., 1970 ; Semasegaran 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 séro groupe. 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 cultivaient les plantes. Prendre un échantillon de sol de la rhizosphère avec tout le matériel racinaire, nodules, ... Récolter les échantillons des sites, mélanger et conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

Dans quatre 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 (20h 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 25-30°C.

Centrifuger la suspension à 10000g 15mn ensuite filtrer le surnageant sur membrane 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.

[Na₂HPO₄ anhydre14,2 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 10-15 mn 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. Prestation symbiotique avec la plante hôte

L'habilitation 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 al.*,2003). Les tests de nodulation doivent être conduits dans des jarres traditionnelles de Leonard (Vincent., 1970) en présence de graines germées et stériles de la légumineuse.

Après l'isolement et les caractéristiques morphologiques, culturelles, et enzymatiques, une première approche doit avoir lieu pour identifier les isolats, leur capacité et aptitude à former des nodules avec la plante-hôte, *Phaseolus coccineus*,*Phaseolus vulgaris* en conditions bactériologiquement contrôlées.

5.1.Stérilisation des graines

Les graines des deux espèces de la légumineuse ont été stérilisées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3% pendant 30 min, ensuite été lavées à l'eau distillée stérile dix fois et abandonnées dans la dernière eau pendant 1 heure. Une fois les graines sont bien gonflées, une scarification mécanique du tégument est faite, en utilisant des pinces préalablement stériles à l'autoclave, pour faciliter la germination dans des boîtes de Pétri contenant du coton imbibé de l'eau stérile.



Figure 12: a-Graine de Phaseolus vulgaris b- Graine Phaseolus coccineus

5.2. Préparation des jarres de Léonard(Vincent, 1970)

Le test de nodulation doit être réalisé dans des jarres traditionnelles de Leonard qui sont remplacées dans notre études par des bouteilles en plastique découpées latéralement en deux parties.

Ces jarres sont stérilisées sous la hottes à flux laminaire par l'eau de javel concentrée laissées séchées. La partie supérieure de chaque jarre est remplie d'un mélange de sable et vermiculite (2/3, 1/3) humidifié avec la solution nutritive de Fahreus (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.

5.3. Inoculation des jarres

Après germination, les graines sont plantées dans le mélange sable-vermiculite (partie supérieure de la jarre) à raison de 2 à 3 graines par jarre, puis inoculées immédiatement avec 1ml/graine 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.

6. Identification moléculaire des isolats :

Les isolats les plus performants ;qui présentent des caractères proches du genre *Rhizobium* et qui infectent les racines de la plantes, ont fait l'objet d'une identification moléculaire, réalisée au laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production des Protéines chez les Eucaryotes, au niveau du centre de recherche CBS Sfax, Tunisie.

6.1. Extraction de l'ADN génomique

Des cellules cultivées pendant 24 à 48h sur milieu YMA, ont été raclées et mises dans un tube Eppendorf stérile contenant 467µl TE (10mM Tris + 1mM EDTA). Avec un vortex faire bien dissoudre les cellules bactériennes dans le tampon pendant 2-3 mn. Puis ajouter 30µl de SDS (10%) et 2-3 µl protéinase K (20mg/l), agiter bien afin d'homogénéité le mélange, une incubation est assurée durant 1h à 37°C. On additionne le phénol/chloroforme au mélange précédent (v/v) :500µl.

Le tout est centrifugé 5mn à 1200t/min en utilisant une mini centrifugeuse de Gyrozen AC 220v/50-60HZ .Corea.

On transfère le surnageant délicatement dans un autre tube eppendorf stérile et on fait ajouter 1 ml d'Ethanol ou 600µl Isopropanol +50 µl Ac Na(3M), on le laisse sur paillasse pdt 10s. On recentrifuge pdt 10mn puis on récupère le culot en le lavant avec l'Ethanol 70% et le centrifugeant pendant 10s. le culot doit être bien séché, ensuite on fait reprendre dans 50ml d'eau stérile.

L'ADN extraite a été d'abord vérifiée par la mesure de la densité optique (DO) à 260nm puis sur gel d'agarose (0.8%). En effet, 10µl d'ADN plus 2µl de tampon de charge (Promega) déposé dans les puits du gel, ont été migrés dans le tampon TBE (Tampon Tris Borate) pendant 1h à 80volte en utilisant l'appareil Mupid-ex Intelligent Power supply Ac 100-240v Japan .Le gel, après coloration du gel dans un bain de Bromure d'Ethidium (0.1%) a été visualisé sous UV.

6.2. Amplification du matériel génétique par une réaction de polymérisation en chaine (PCR)

La quantité d'ADN récupérée est trop faible, pour l'étudier, cette dernière doit être amplifiée par la réaction de polymérisation en chaine(PCR). Cette technique a été mise au point en (1986) par Mulliset ses collaborateurs .D'où le mérite du prix Nobel en chimie en 1993.

Les deux amorces utilisées pour cette amplification fD1 et rD1(Tableau 2) proviennent de la région de l'ADNr 16S. cette réaction (PCR) s'effectue en utilisant un thermocycleur Bio-Gener de type GE 9612 Volts :AC85-264V Frequency : 50-60HZ dans un volume final de 50µl contenant 1U/µl Taq polymérase (Dream taq),1µl d'ADN, 1µl de DNTP,1µl rD1 , 1µl fD1,5µl MgSO₄,et 5µl de tampon avec un programme d'amplification qui se déroule en trois étapes avec 50 cycles : étape de dénaturation 30 seconde à 95°C, hybridation 30 secondes à 55°C et extension 30secondes à 72°C.

Tableau 2: La séquence nucléotidique des amorces fD1 et rD1

Primer	Séquence 5` 3`
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	AAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

Les séquences d'ADN ainsi amplifiées sont séquencées à l'aide d'un séquenceur Big Dyes Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in the ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer.

Les fragments de l'ADNr 16S séquencés des souches étudiées sont comparés à l'ensemble des séquences préalablement entreposées dans les bases de données (Altschul et *al.*, 1990) Siteweb du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Chapitre 3:

Résultats et discussion

1-Aspect morphologique et cultural des isolats et vitesse de croissance

Les isolats présentent des colonies, après 48 à 72 heures à 28°C sur milieu YMA, circulaires légèrement élevées lisses, opaques et mucilagineuses, avec une texture translucide blanchâtres. L'observation microscopique révèle des bâtonnets Gram négatif (figure 13). Les deux isolats B15 et T8, à l'exception des autres isolats présentent un Gram positif.

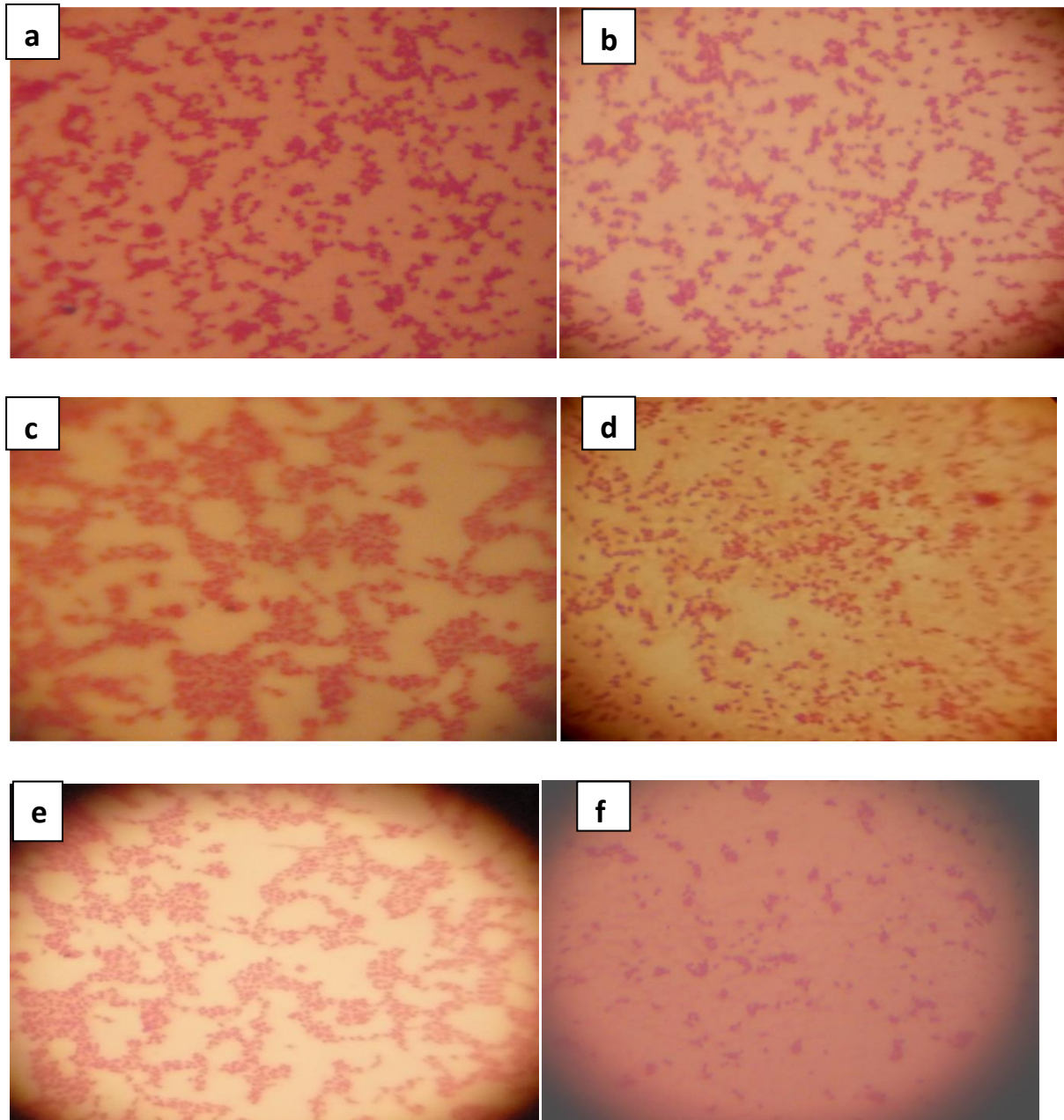


Figure 13: Observation microscopique des bactéries à Gram négatif (objectif x 100) : a- l'isolat S11, b- l'isolat T10, c- l'isolat G9, d- l'isolat B4, e- l'isolat Z9, f- l'isolat S3

Ces caractéristiques sont en accord avec celles décrites pour les *Rhizobium* (Vincent, 1970 ; Dommergues et Mangenot, 1970). Aussi, les travaux de Sadowsky (1983) ; Vaishali (2014) ; et Kumari Banu (2016) ont confirmé les mêmes résultats. L'étude des caractères morphologiques ainsi la coloration de Gram des bactéries est indispensable pour une éventuelle identification (Gachande et Khansole, 2011).

Les souches isolées à partir des nodules de *Phaseolus coccineus* absorbent très peu le rouge Congo sur milieu YMA RC. Ceci est observé chez la majorité des rhizobia (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984). Cette propriété est commune avec le genre *Bradyrhizobium* ; par contre le genre *Agrobacterium* et les formes contaminantes absorbent fortement ce colorant (Jordan, 1984).

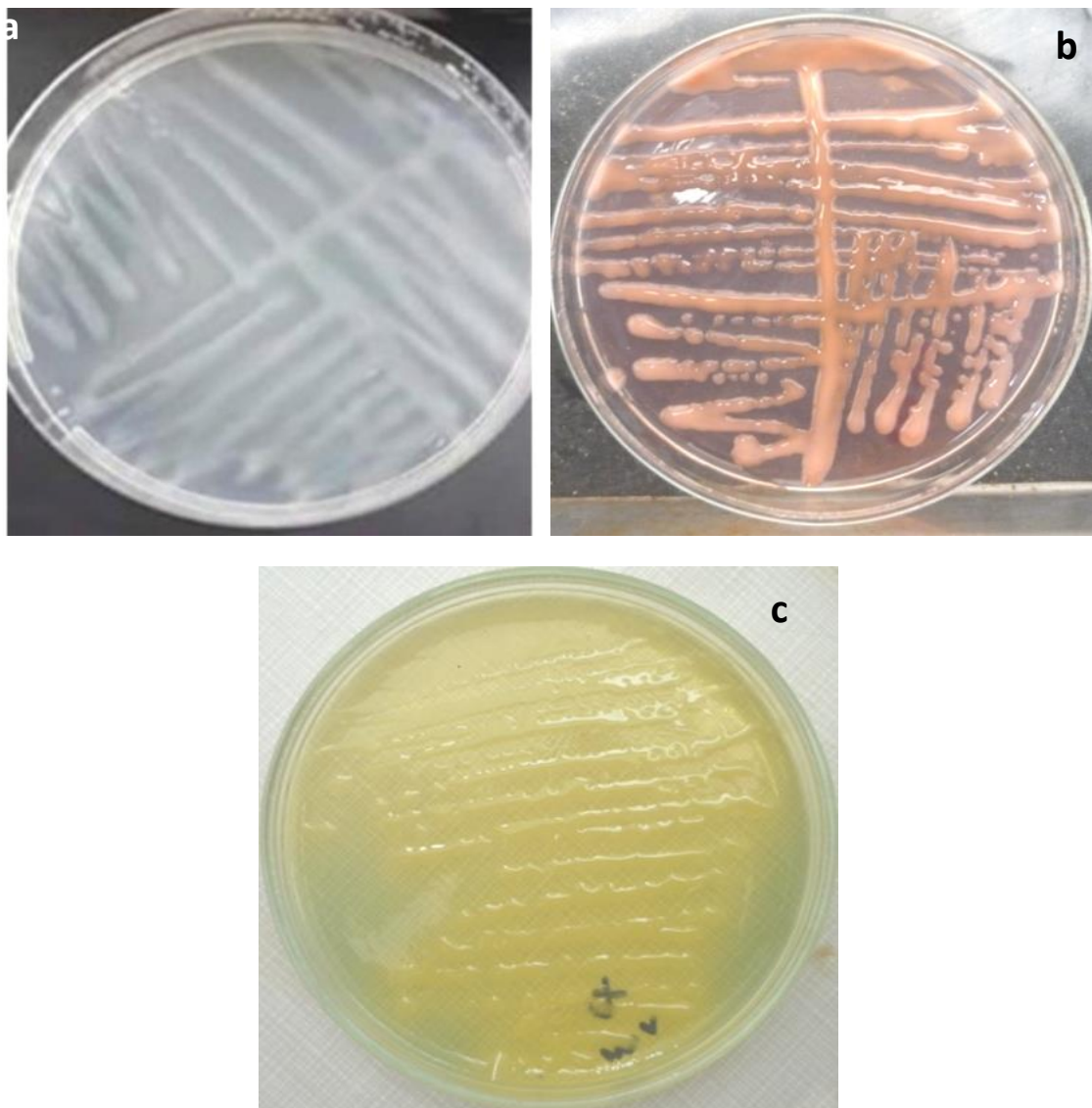


Figure 14: Aspect morphologique des isolats : (a) ; Aspect des colonies sur YMA; (b) aspect des colonies sur YMA RG(c) test de vitesse de croissance.

En outre, nos souches appartiennent à un genre de bactérie à croissance rapide puisque le milieu YMA +Bleu de Bromothymol (BTB) est acidifié après 24h d'incubation (virage au jaune de l'indicateur de pH) (Vincent, 1970 et 1982; Jordan, 1984; Chen *et al.*, 1991; Alberton *et al* 2005).

Dans cette étude, 86 isolats ont été isolés des nodules de la plante du genre *Phaseolus* cultivée sur différents sites de l'est de l'Algérie : 18 isolats issus du site Tamalous wilaya de Skikda, 16 isolats du site Mdjez Ammar, wilaya de Guelma, 14 isolats du site Salah Salah wilaya de Guelma, ont été isolés de la plante *Phaseolus coccineus* . De plus, 21 isolats obtenus du site Benzouit Wilaya de Skikda, 17 isolats du site Boumaaza , Wilaya de Annaba, en présence de deux souche de références, *Rhizobium leguminosarum sllae* et *Mezorhizobium ciceri* . Les 86 isolats qui répondent positivement aux caractères étudiés précédemment servent d'identification phénotypique et génotypique (Tableau 3).

Tableau 3: Liste des isolats et lessouches de référence

	Souches	Plante- hôte	Origine géographique	Source
A6	<i>Rhizobium sllae A6</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar- Constantine
CIII	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	S. Dekkiche- Constantine
T1	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T2	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T3	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T4	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T5	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T6	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T7	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T8	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T9	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T10	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T11	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T12	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude

T13	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T14	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T15	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T16	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T17	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
T18	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Skikda, Algérie	Présente étude
M1	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M2	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M3	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M4	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M5	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M6	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M7	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M8	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M9	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M10	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M11	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M12	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M13	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M14	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M15	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
M16	Object d' etude	<i>Phaseolus coccineus</i>	Guelma, Algérie	Présente étude
Z1	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z2	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z3	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude

Z4	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z5	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z6	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z7	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z8	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z9	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z10	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z11	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z12	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z13	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z14	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z15	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z16	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
Z17	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Boumaaza, Annaba, Algerie	Présente étude
B1	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B2	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B3	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B4	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B5	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B6	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B7	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B8	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B9	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B10	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude
B11	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit, Skikda, Algérie	Présente étude

B12	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude
B13	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude
B14	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude
B15	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude
B16	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude
B17	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude
B19	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude
B21	Object d' etude	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Benzouit,Skikda, Algérie	Présente étude

2. Etude des caractères métaboliques des isolats

2.1 Les tests distinctifs

2.1.1. Test du 3-cetolactose

Toutes les bactéries en présence de souches témoins montrent un résultat négatif après l'addition de réactif de Benedict ; aucun halo n'est observé. De ce fait les isolats n'oxydent pas le C₃ du glycosyl du Lactose et ne produisent pas de 3-cetoglucosidase.

2.1.2. Test du glycérophosphate de calcium

Aucun brunissement ni de précipitation ne sont observés chez nos isolats à l'exception de l'apparition d'une couleur jaune (Struffi., 1998).

Ces résultats ont montré que nos isolats n'appartiennent pas aux *Agrobacterium*.

2.2. Recherche d'enzymes spécifiques

Tous nos isolats, en présence de souches témoins (*R. sulae*, *Mesorhizobium ciceri*) donnent des réactions positives pour les enzymes spécifiques : enzymes liés au processus de nodulation (Polygalacturonase, endoglucanase) ou liés au métabolisme azoté du sol (uréase, nitrate-réductase).

2.2.1. 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. (figure15-a) (Lindström et Lehtomaki, 1988 ; Struffi *et al.* 1998).

2.2.2.L'Uréase

Toutes les souches produisent une uréase sur milieu spécifique additionné d'urée. Sa présence se manifeste par une alcalinisation du milieu (production de NH_3). Les *Rhizobium* à croissance rapide dans leur majorité disposent une nitrate réductase, ils sont uréase + et nitrate réductase+ Sadowsky *et al* 1983. (Figure 15-b).

2.2.3. L'Activité cellulosique

L'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies des isolats révèle la présence d'une endoglucanase (cellulase). Toutes les souches donnent une réaction positive (Lindström et Lehtomak, 1988). On note que cet enzyme (cellulase) est indispensable pour établir les premières infections symbiotiques des racines des légumineuses par les *Rhizobium* en dégradant la paroi des cellules des poils racinaires de la plante hôte et sans endommager les cellules de cette dernière (Robledo *etal.*, 2007). (Figure 15-c).

2.2.4. L'Activité pectinolytique

Après l'addition du rouge de ruthénium et le rinçage avec de l'eau, un halo clair est observé autour des colonies indiquant une réaction positive. Tous les isolats ont une activité polygalacturonasique. (Figure 15 -d).

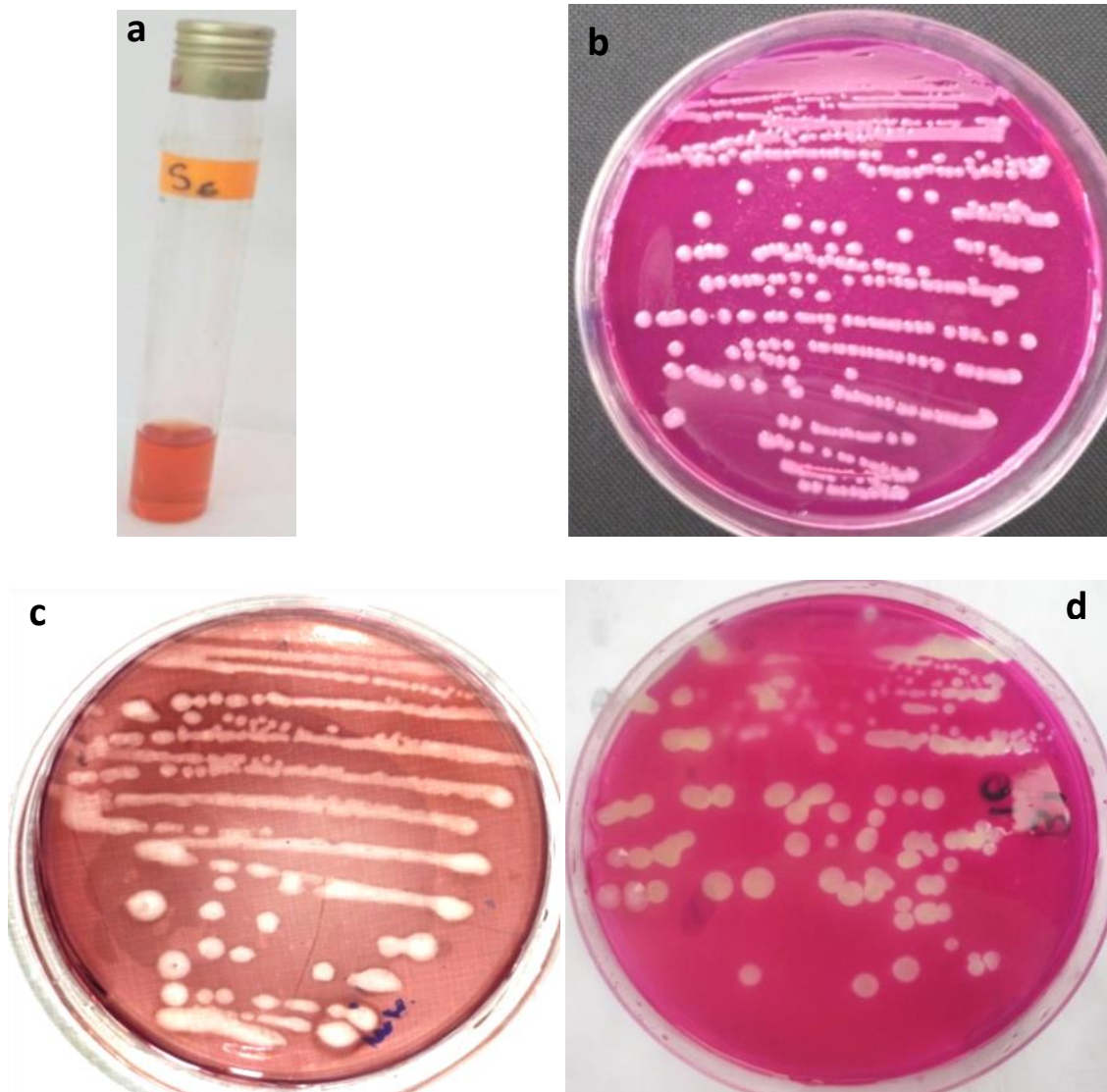


Figure 15: Tests enzymatiques : (a) : Test nitrate réductase positif(b) ; Test uréase positif (c)Test cellulase positif(d): Test pectinase positif.

2.3. Les besoins nutritionnels

Ce test est réalisé dans le but de connaître la source carbonée ou azotée préférée par les différentes souches étudiées, il est l'une des bases de l'identification biochimique.

2.3.1. Source de carbone

En remarquant les histogrammes, tous les isolats sans exception, en présence des souches de référence, utilisent bien le glucose et le galactose comme source de carbone. De même, la figure 16 révèle que les isolats provenant du site Salah Salah Salah, présentent une hétérogénéité métabolique des substrats carbonés. Cela signifie que cette catégorie

des isolats capable d'utiliser une large gamme des sucres. Ce qui est confirmé par les résultats obtenus par Gaur et Sen (1981) ; Nour *et al* (1994) ; Nour *et al* (1995) ; Struffi *et al* (1998).

En comparant avec les souches témoin, une assimilation préférentielle de sucres simples ; le glucose et le galactose a été signalée par tous les isolats collectionnés du site Salah Salah Salah. La figure 16 montre que la majorité des isolats ne dégradent plus le fructose. Celui-ci peut être considéré comme facteur limitant la croissance bactérienne, même constatation pour l'arabinose.

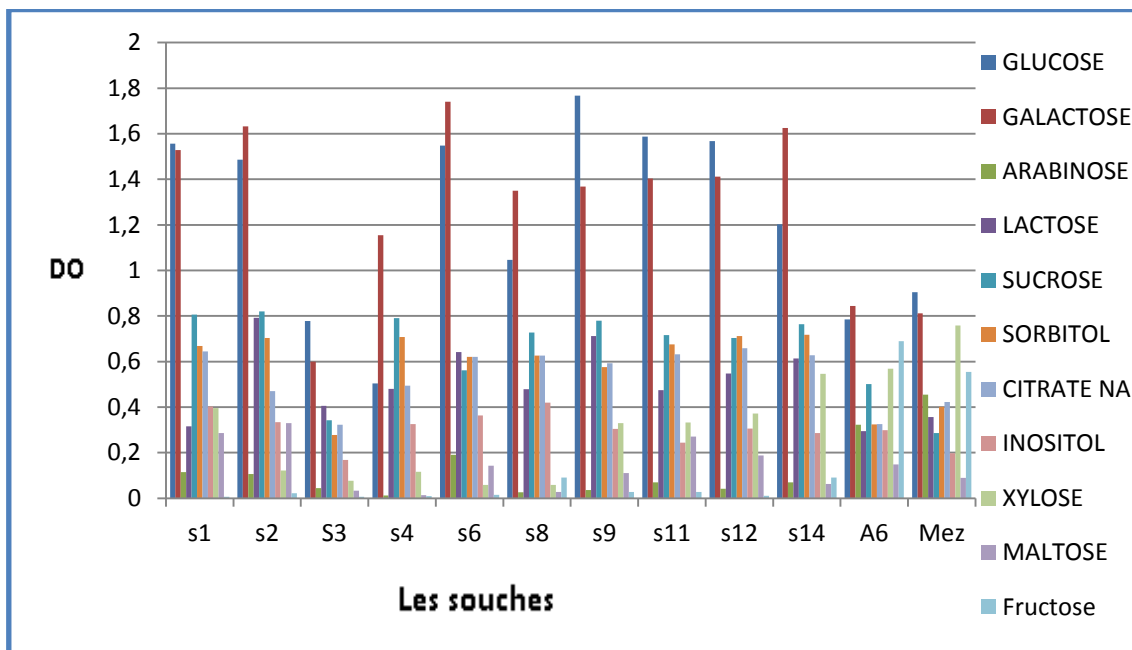


Figure 16: Utilisation des sucres par les isolats provenant du site Salah Salah Salah, Wilaya de Guelma

Une DO plus élevée a été saisie pour les deux monosaccharides ; le glucose et le galactose. Ces derniers sont les plus utilisés comme source de carbone par les isolats dérivés du site Mdjez Ammar, wilaya de Guelma. Ce groupe montre aussi l'assimilation des autres sucres, notamment les disaccharides et les polyalcools. Au sein du même groupe, l'isolat G1 fait l'exception par une DO très faible pour le sucrose. Alors les souches de référence utilisent presque la totalité des sucres examinés (figure 17). En effet, Wei *et al* .;2008) prouvent que certaines souches nodulant la légumineuse, *Astragalus*, ne peuvent utiliser que le citrate de sodium et le xylose afin qu'elles puissent avoir une source de carbone.

Alors Wang *et al.*, 2006 montrent qu'il existe d'autres souches rhizobiales utilisant un seul substrat carboné qui est le xylose. On enregistre aussi, cette catégorie des isolats, ne dégrade pas l'arabinose (à l'exception des isolats ; G3, G5, et G15). Ce qui concorde avec les résultats trouvés de la première catégorie des isolats issus du site Salah Salah Salah.

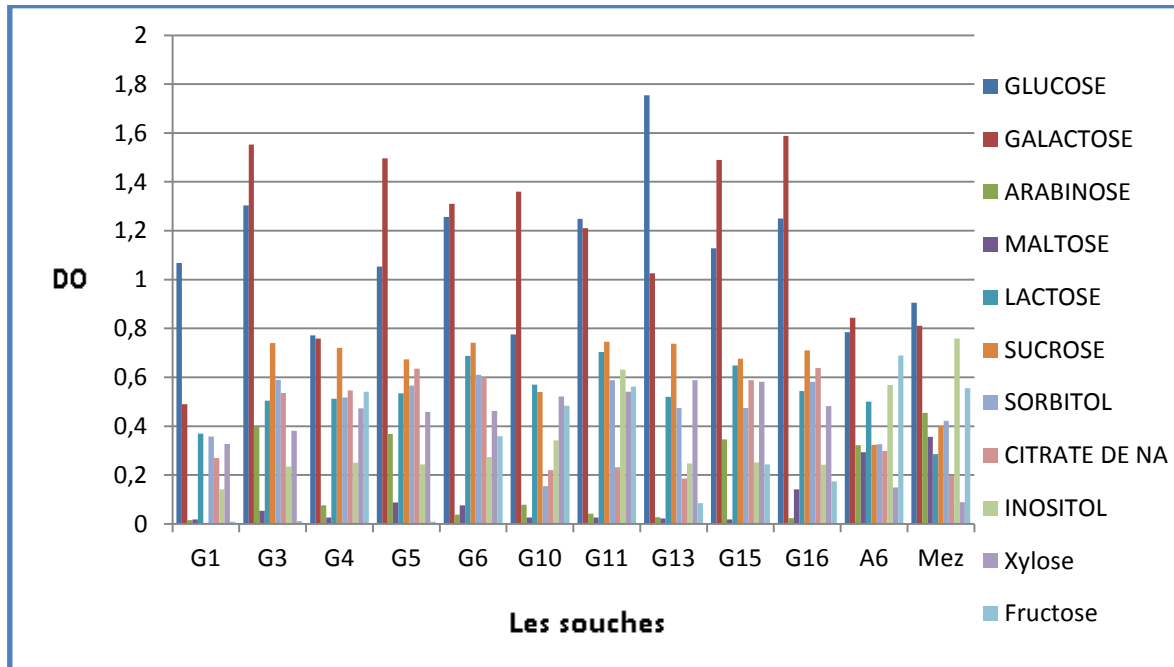


Figure 17: Utilisation des sucres par les isolats provenant du site Mdjez Ammar,

Chakrabarti *et al.*, (1981) précisent que chez *Rhizobium meliloti* le classement suivant peut être établi en fonction de la rapidité de la croissance : mannitol, glucose, puis gluconate alors pour *Rhizobium léguminosarum* bv. *trifoli* l'ordre est : mannitol, glucose, arabinose puis legluconate. La variété du métabolisme des bactéries du sol procure à ces dernières une plasticité importante dans leur adaptation à des environnements variés, tels que le sol et la rhizosphère (Latour, et Lemanceau., 1997).

Par ailleurs, les isolats nodulant la légumineuse *Phaseolus coccineus* proviennent du site Tamalous, présentent dans l'ensemble une bonne utilisation des sucres simples en présence des souches de référence mis à part l'isolat T15 qui utilise beaucoup mieux l'arabinose que les autres sucres pour avoir une source de carbone (figure 18). Ceci montre que ces bactéries n'exigent pas le mannitol comme seule source de carbone, ce qui est confirmé par Gaur et Sen (1981), Struffi *et al.* (1998) Un nombre important de travaux

s'est penché sur ce métabolisme, on peut citer les travaux de Allen et Allen (1950) qui ont constaté que tous les *Rhizobium* à croissance rapide utilisent facilement les mono et les disaccharides et de manière restreinte les trisaccharides et les sucres contenant des fonctions alcools.

De même Graham (1964 a/b) a montré que toutes les souches de *Rhizobium* sont capables de se développer sur des composés représentant des tri et disaccharides, des aldoses et polyalcools.

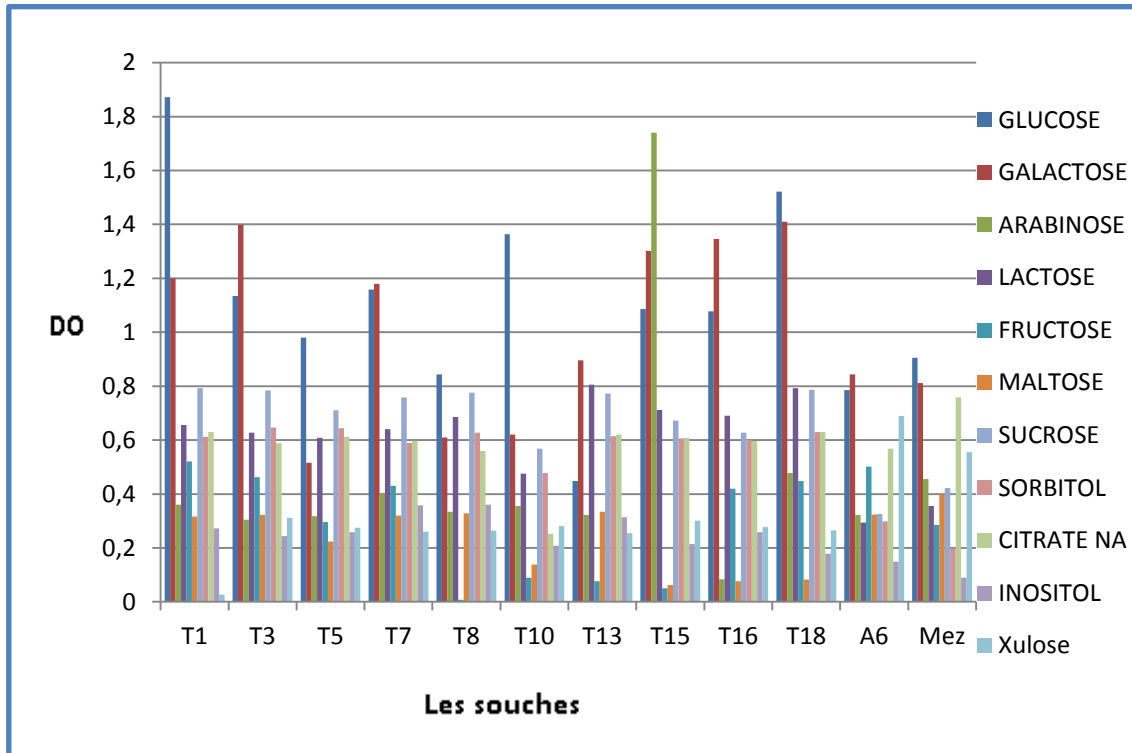


Figure 18: utilisation des sucres par les isolats provenant du site Tamalous, Wilaya de Skikda

Pour les isolats collectés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *P. coccineus*, on présume que le métabolisme des glucides indique la variabilité dans la source du carbone, ainsi ces bactéries possèdent une préférence commune pour les deux monosaccharides, le glucose et le galactose.

Selon l'histogramme, quasiment toutes les bactéries nodulant la légumineuse *Phaseolus vulgaris*, provenant du site Benzouit mise à part la souche B8, en présence de souches de référence ; *Rhizobium leguminosarum snullae* et *Mezorhizobium cicerie* utilisent bien le citrate de Na et les monosaccharides comme source de carbone tels que : le glucose,

le galactose et le fructose à l'exception des deux isolats B4 et B10 qui assimilent faiblement les mêmes sucres testés. Cependant, on note une utilisation remarquable pour les disaccharides qui consiste à une disposition des enzymes nécessaires. Aussi, la figure 19 montre que le polyalcool, le sorbitol, est mieux dégradé par les bactéries, à l'exception des isolats B12 et B4 qui donnent une DO faible en présence du sorbitol dans le milieu.

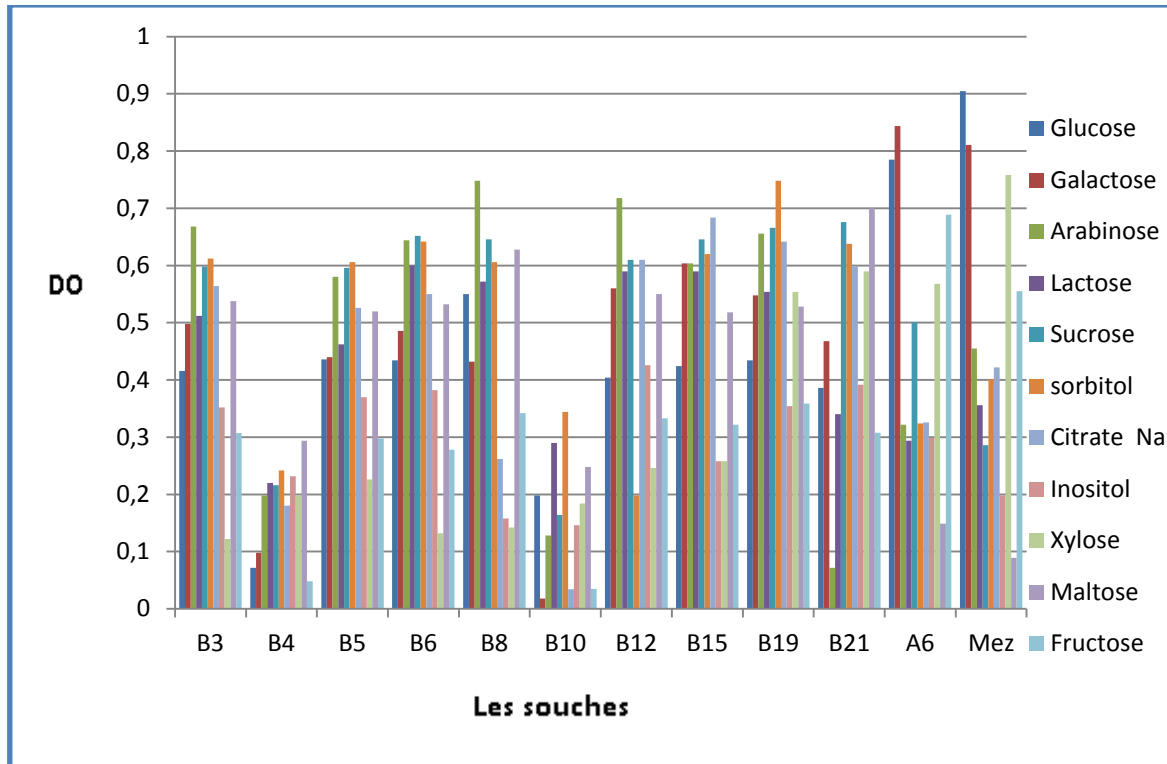


Figure 19: Utilisation des sucres par les différents isolats provenant du site Benzouit, Wilaya de Skikda

En effet, les souches isolées de Boumaaza assimilent d'une manière préférentielle le polyalcool, et le xylose que les autres sucres. L'isolat Z12 dégrade équitablement les deux polyalcools ; le xylose et l'inositol. Néanmoins, on remarque pratiquement que la même DO a été enregistrée pour le reste des sucres ; notamment le sucrose, galactose, arabinose, le maltose et le sorbitol (Figure 20). Ceci explique la non exigence des bactéries au mannitol comme seule source de carbone. Ces résultats concordent avec les travaux de Vincent(1984) et Jordan(1982).

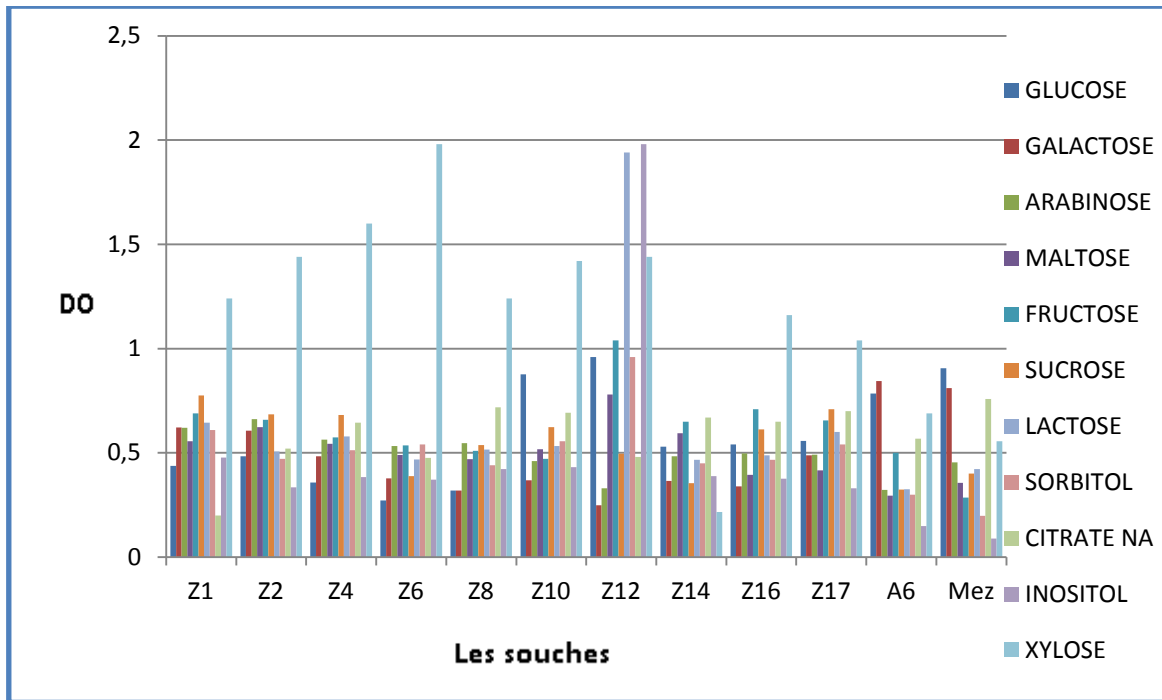


Figure 20: Utilisation des substrats carbonés par les isolats provenant du site Boumaaza, Wilaya de Annaba

2.3.2. Utilisation des acides aminés comme source d'azote

L'utilisation des aminoacides fait dévoiler une biodiversité au sein des isolats nodulant les deux variétés de la légumineuse du genre *Phaseolus*, ainsi une assimilation différentielle a été enregistrée dans le même groupe de bactéries isolées de la légumineuse provenant du même site de prélèvement. Les travaux de Yang *etal*(2008) font démontrer que les rhizobia n'exigent pas la présence d'un seul aminoacide bien précis.

Les isolats nodulant la légumineuse *Phaseolus vulgaris* provenant du site Boumaaza, wilaya de Annaba, n'assimilent pas les acides aminés de la même manière ; souvent, une biodiversité du métabolisme azoté a été signalée par cette catégorie des isolats. La tyrosine, l'histidine et la thréonine sont moins assimilés par rapport au reste des amino-acides. En outre, Z12, Z14, Z16 et Z17 utilisent d'une manière remarquable la tyrosine.

Les mesures de la DO montrent que les acides aminés : Leu, Ileu, Asp, Gly, et Ac-glu sont peu utilisés par les bactéries, sauf Z10 qui assimile bien la Leucine (figure 21).

D'une manière générale, cette catégorie peut subdivisée en trois sous-groupes :

- le premier consiste des isolats qui préfèrent d'utiliser la tyrosine comme source d'azote,
- le second regroupe les bactéries qui assimilent la thréonine avec une DO plus élevée,
- le dernier sous-groupe contient des souches assimilent mieux le phényl-alanine.

On rajoute aussi, l'isolat Z10, tout seul, construit un autre groupe dont une DO remarquable pour l'acide aminé leucine.

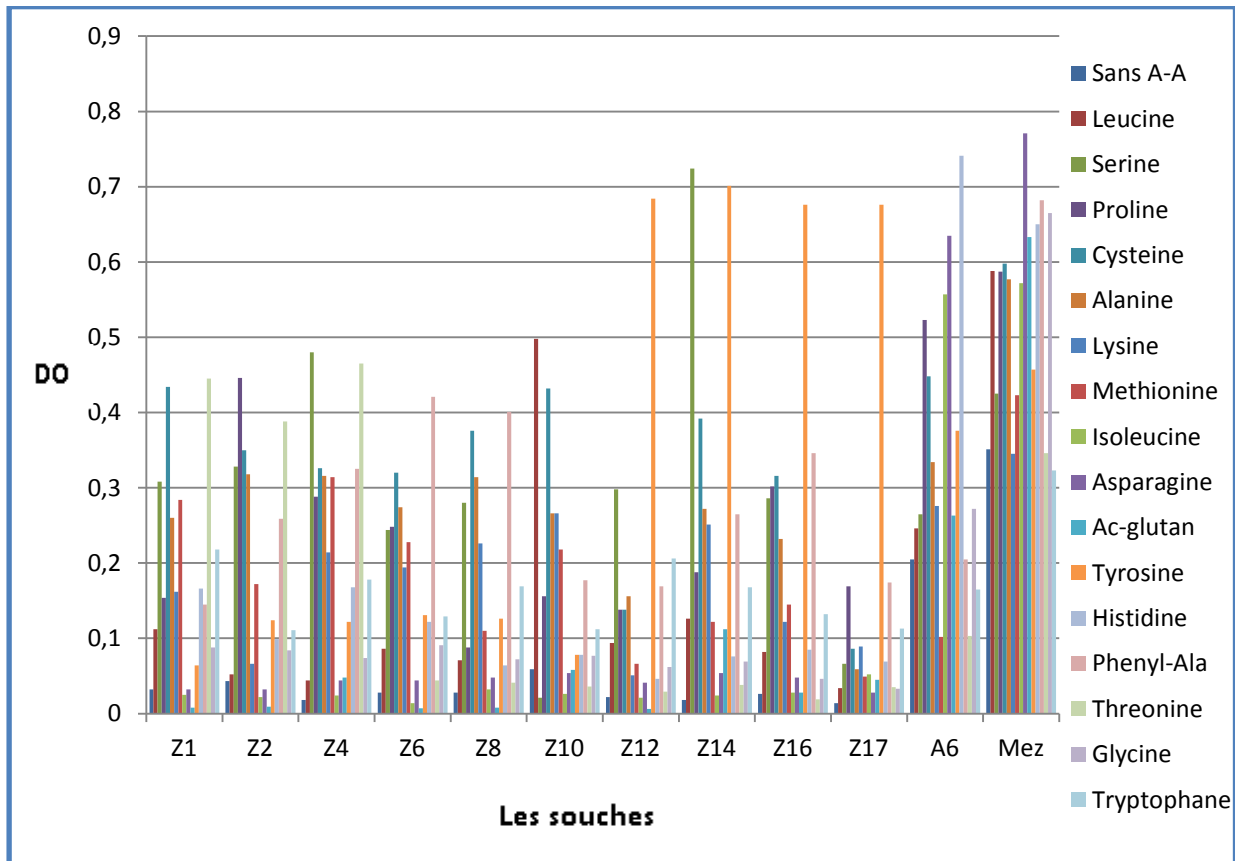


Figure 21: Assimilation des aminoacides par les isolats provenant du site Boumaaza, Wilaya de Annaba

On présume que les isolats du site Bomaaza utilisent, dans leur majorité une large gamme des acides aminés, comme source d'azote. Ce qui indique la mise en place d'une biodiversité métabolique pour cette catégorie des isolats. Cependant, les travaux de Taté *et al* .;1998) montrent que le *Rhizobium etli* nodulant le *P.vulgaris* possède une dépendance de croissance pour l'acide aminé, la Méthionine, et qu'à son absence, la bactérie devient incapable de produire des flavonoïdes inducibles ; Oligosaccharides lipo-chitine (facteurs Nod), ou induire des nodosités sur les racines de cette légumineuse.

La figure 22 révèle une bonne assimilation, premièrement de l'histidine qui a été enregistrée par les isolats du site Benzouit, wilaya de Skikda, puis la tyrosine en deuxième position. Idem pour la lysine avec une DO plus élevée pour l'isolat B6 qui croit beaucoup mieux en présence de l'acide aminé la lysine.

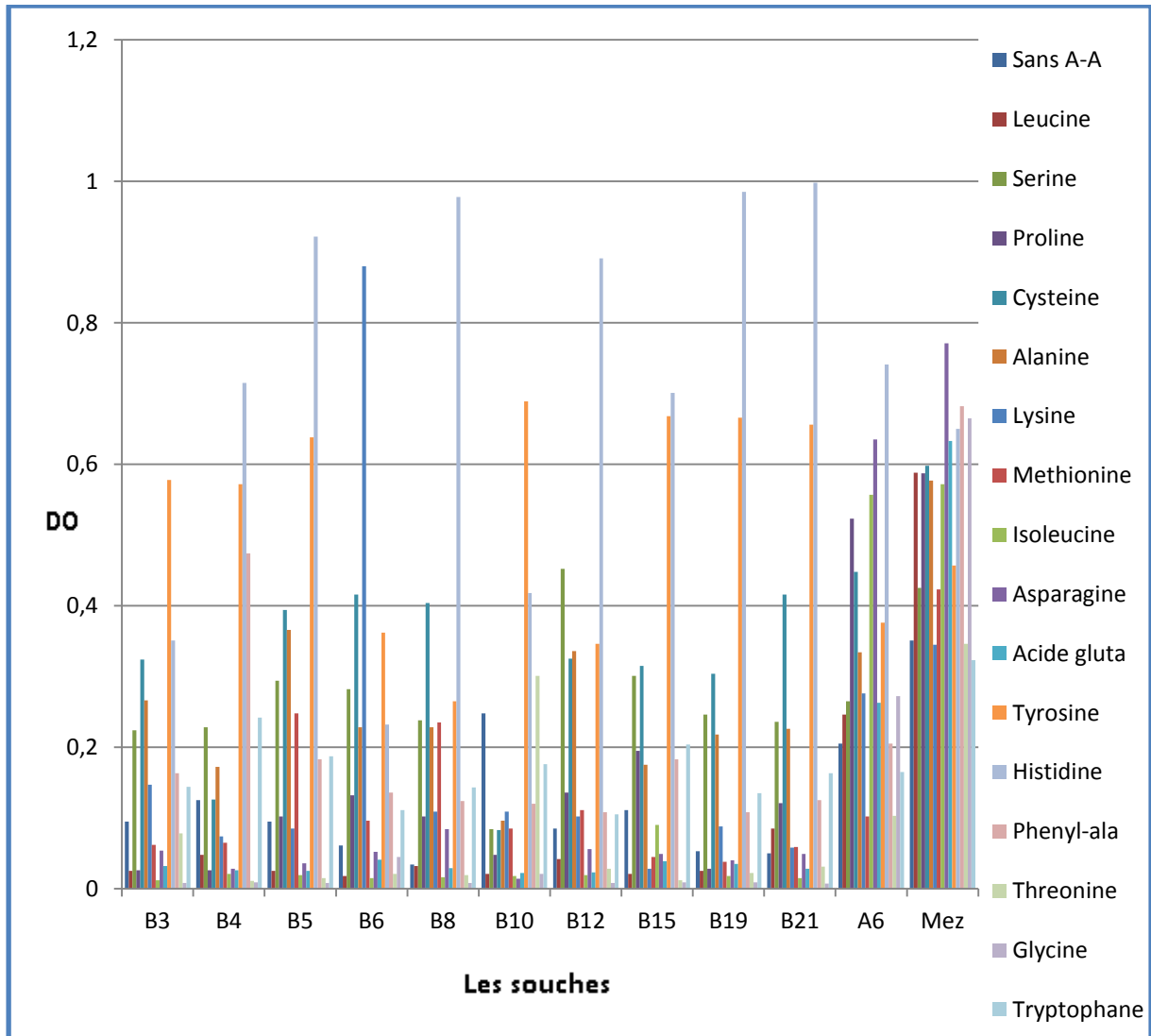


Figure 22: Assimilation des aminoacides par les isolats provenant du site Benzouit, Wilaya de Skikda

Alors, les bactéries provenant du sol de Tamalous, dans l'ensemble, assimilent bien la méthionine que les autres aminoacides (avec une DO plus élevée enregistrée par la souche T7) (figure 23). On remarque que ce groupe assimile un nombre restreint des acides aminés par rapport aux souches témoin vis à vis à leur utilisation large de ces substrats comme source d'azote. En effet, certains substrats de ces amino-acides ne sont pas bien assimilés par les isolats notamment la Leu, Ser, Pro, Cys, Ala, Thre, Gly, et Phe-ala. De ce fait, on peut déduire que ces derniers sont considérés comme des inhibiteurs de la croissance bactérienne. L'isolat T3 fait l'exception par une assimilation assez importante des substrats azotés ; la méthionine, la proline, et l'asparagine.

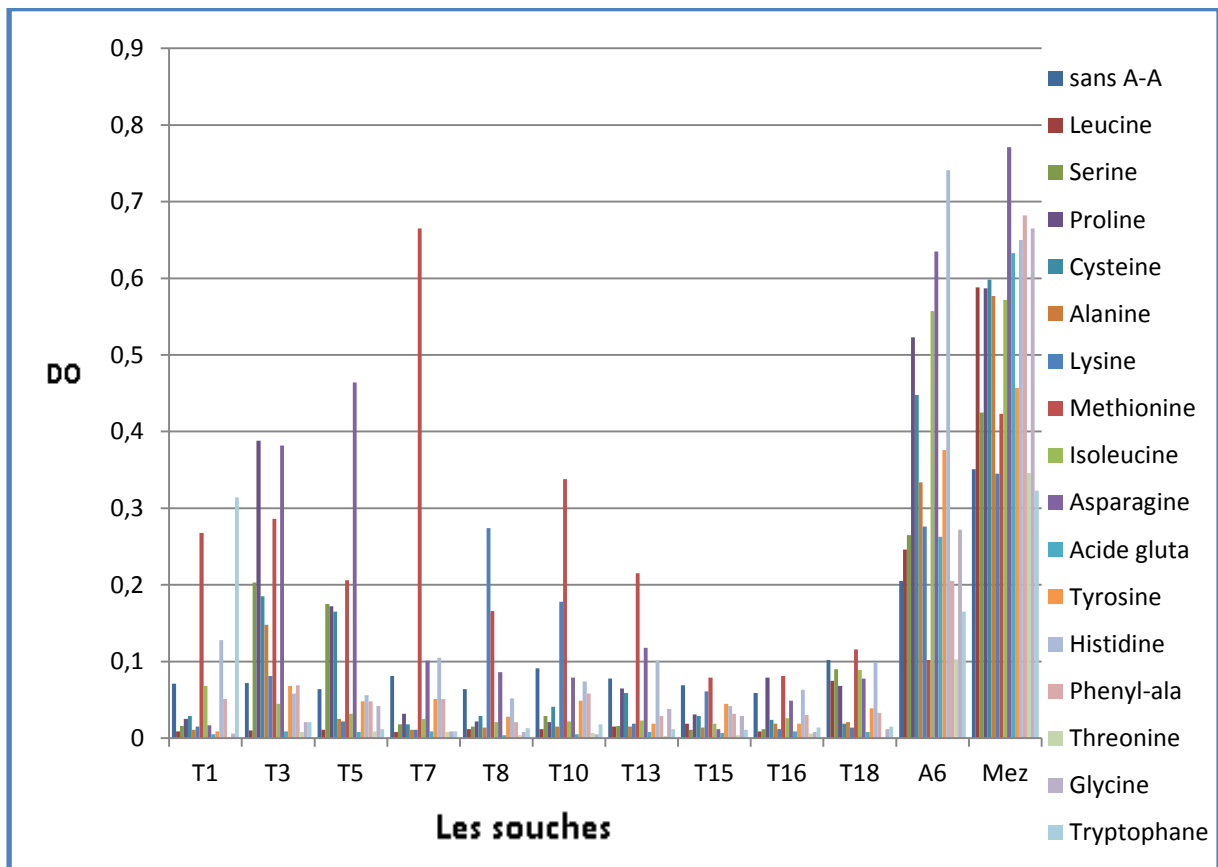


Figure 23: Assimilation des aminoacides par des isolats provenant du site Tamalous, Wilaya de Skikda

On note, que les isolats issus des sites ; Mdjez Ammar, Salah Salah Salah et Tamalous, présentent dans leur quasi-totalité, une assimilation différentielle des différents acides aminés. Plus détaillant, les bactéries du site Mdjez Ammar utilisent la proline, la sérine, l’alanine, l’asparagine et l’histidine comme source d’azote avec une DO plus élevée de la proline a été signalée par l’isolat G15 (figure 24). D’une manière générale, cette dégradation variable des acides aminés provoque une biodiversité au sein de ce métabolisme pour ce groupe des isolats.

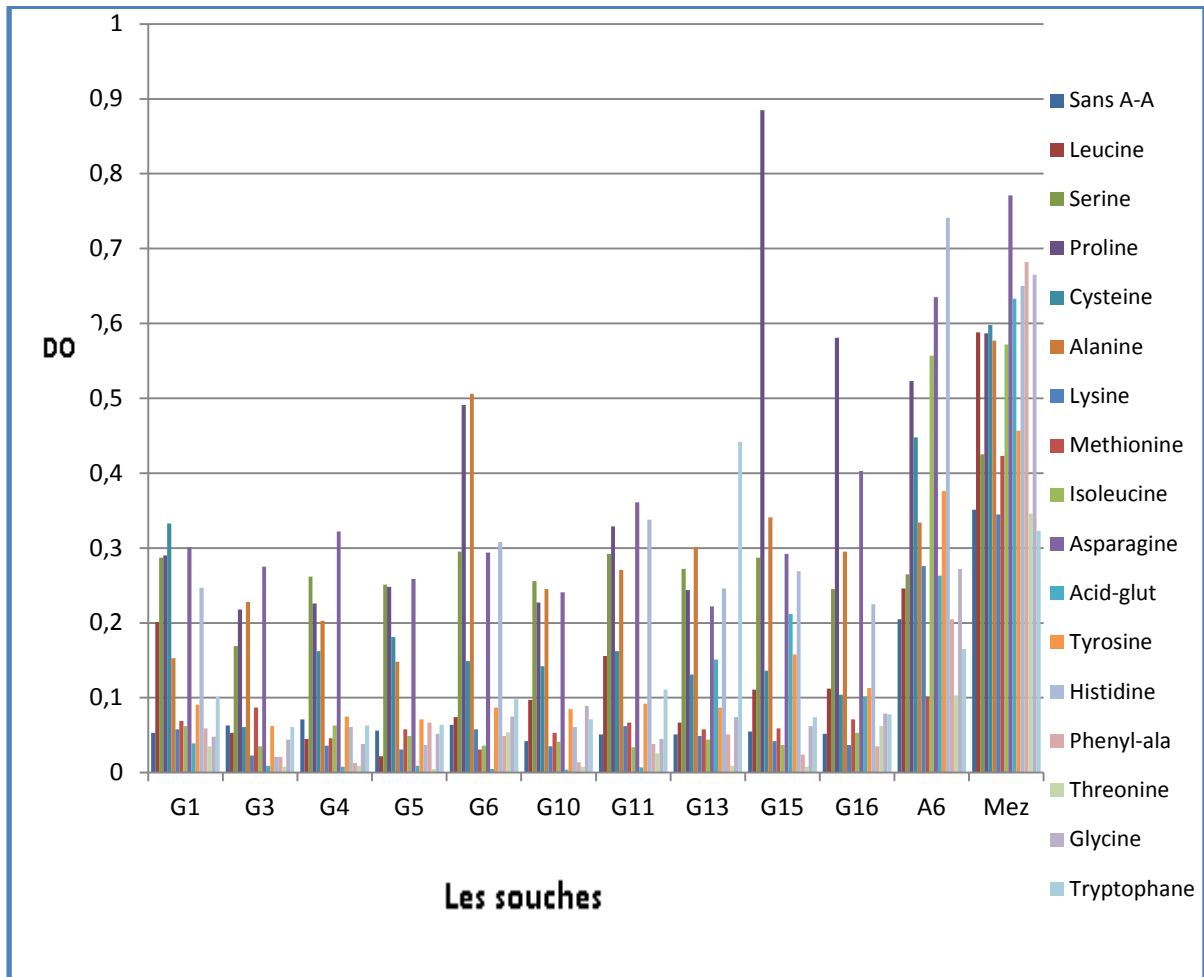


Figure 24: Assimilation des acides aminés par les isolats provenant du site Mdjez Ammar, Wilaya de Guelma

Cependant, les souches issues du site Salah Salah Salah assimilent bien l'isoleucine et la proline, pratiquement avec le même degré, cela est observé chez les isolats S1, S2, S3 et S11. Au contraire, on enregistre une assimilation faible pour les autres acides aminés (figure 25).

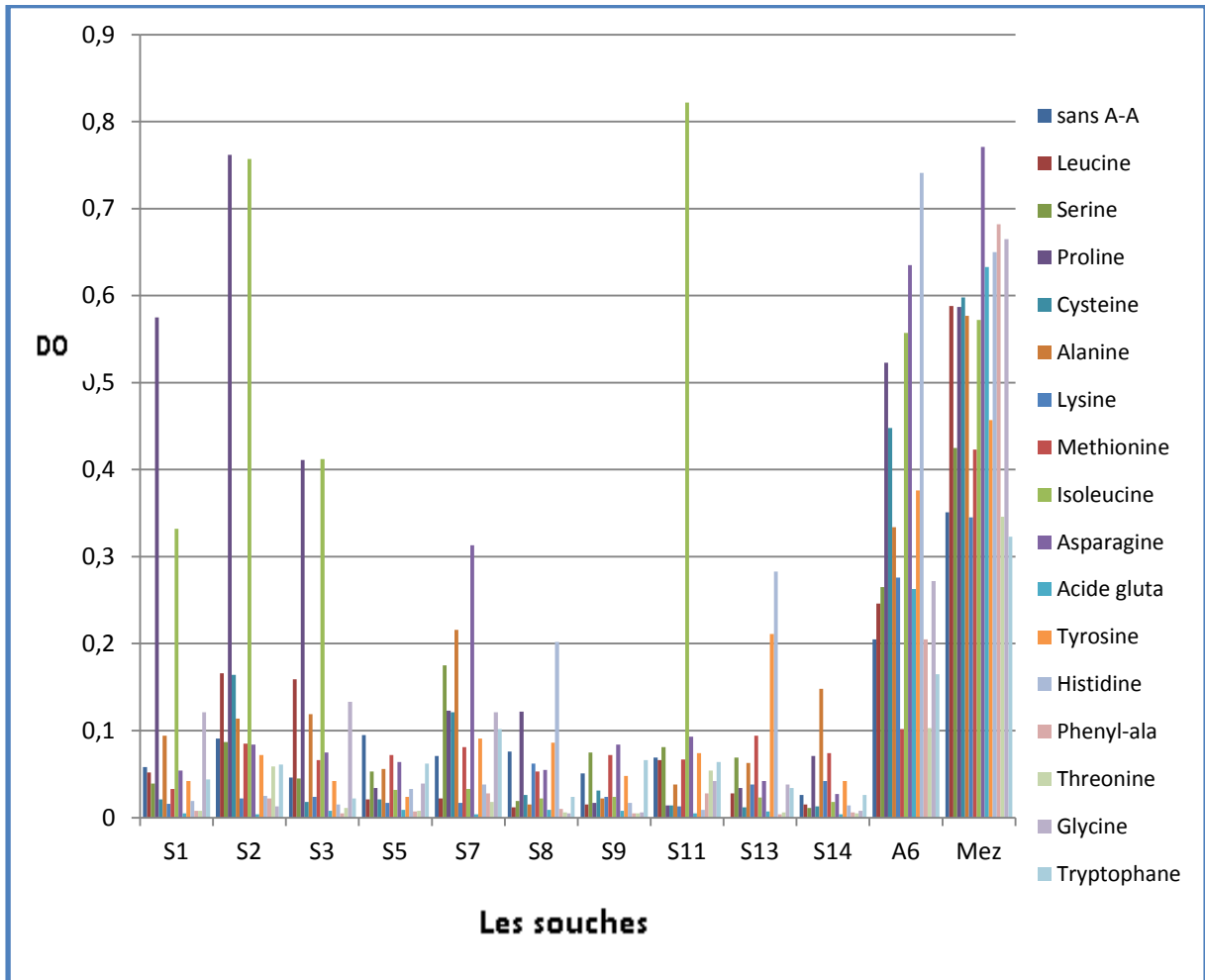


Figure 25: Assimilation des aminoacides par les isolats provenant du site Salah Salah Salah, wilaya de Guelma

3. Les facteurs abiotiques

Plusieurs conditions environnementales sont des facteurs limitant la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote. Ces facteurs stressants environnementaux typiques auxquels sont confrontés aux nodules de légumineuses et les partenaires symbiotiques. Ces facteurs peuvent inclure le stress hydrique, la salinité, le pH du sol, la température, les métaux lourds, etc. (Zahran 1999).

3.1. Effet du pH

Parmi tous les isolats, les souches isolées de la légumineuse *P. coccineus* cultivées dans la région de Mdjez Ammar présentent une tolérance remarquable aux pH acides et alcalins avec un pH optimum de 5, à l'exception de la souche G3 qui montre une bonne croissance seulement aux pH acides (5, 5.5, 5.8)(figure 26). Les travaux de Vincent (1970) ; Jordan (1984) ; de Lajudie (1998) et de Struffi (1998) ont corroboré nos résultats.

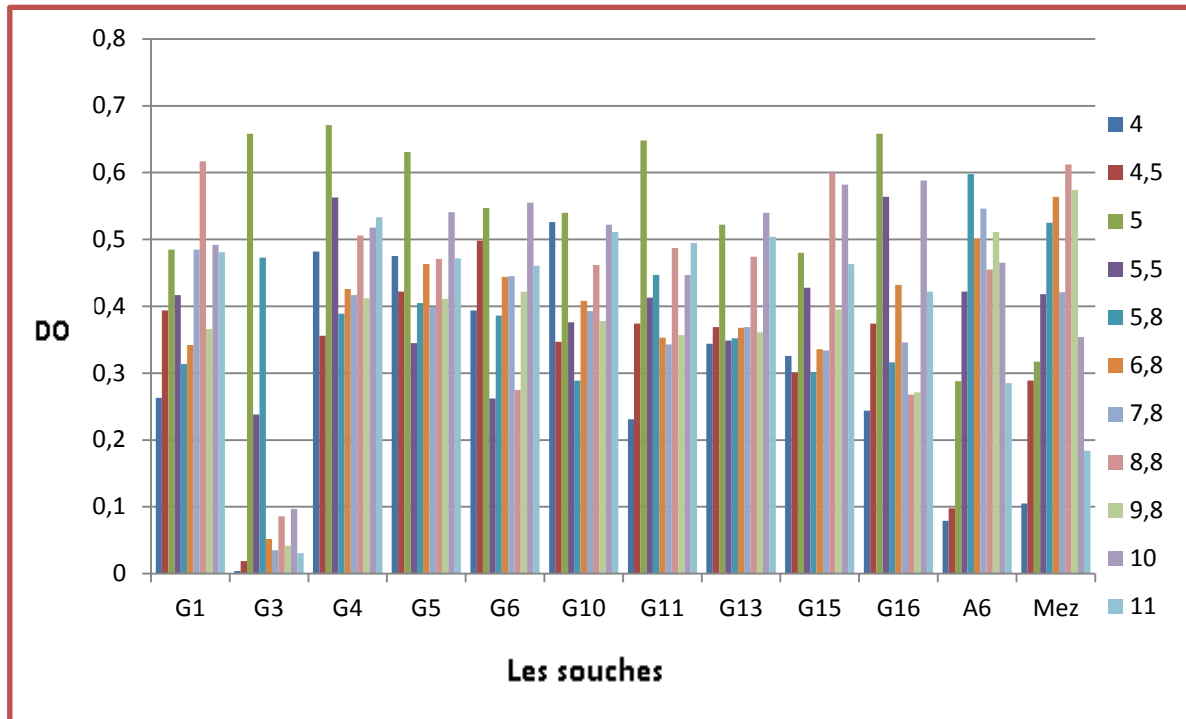


Figure 26: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Mdjez Ammar, Wilaya de Guelma

Par ailleurs, l'acidité et l'alcalinité n'inhibent ni la croissance des plantes ni la formation des nodules racinaires, mais le nombre des nodules ainsi la biomasse de ces derniers à pH 6.8 étaient plus importants qu'à pH 4 (Benselama *etal.*, 2013).

Cependant, une biodiversité a été décelée dans l'étude de la tolérance des isolats aux différents pH, notamment les isolats du site Benzouit. La figure 27 fait montrer que certains isolats ont la capacité d'être poussés dans un milieu dont le pH acide comme l'isolat B6, d'autres en milieu basique, le cas de l'isolat B19. On remarque que l'isolat B4 donne des résultats comparables à ceux des souches de référence.

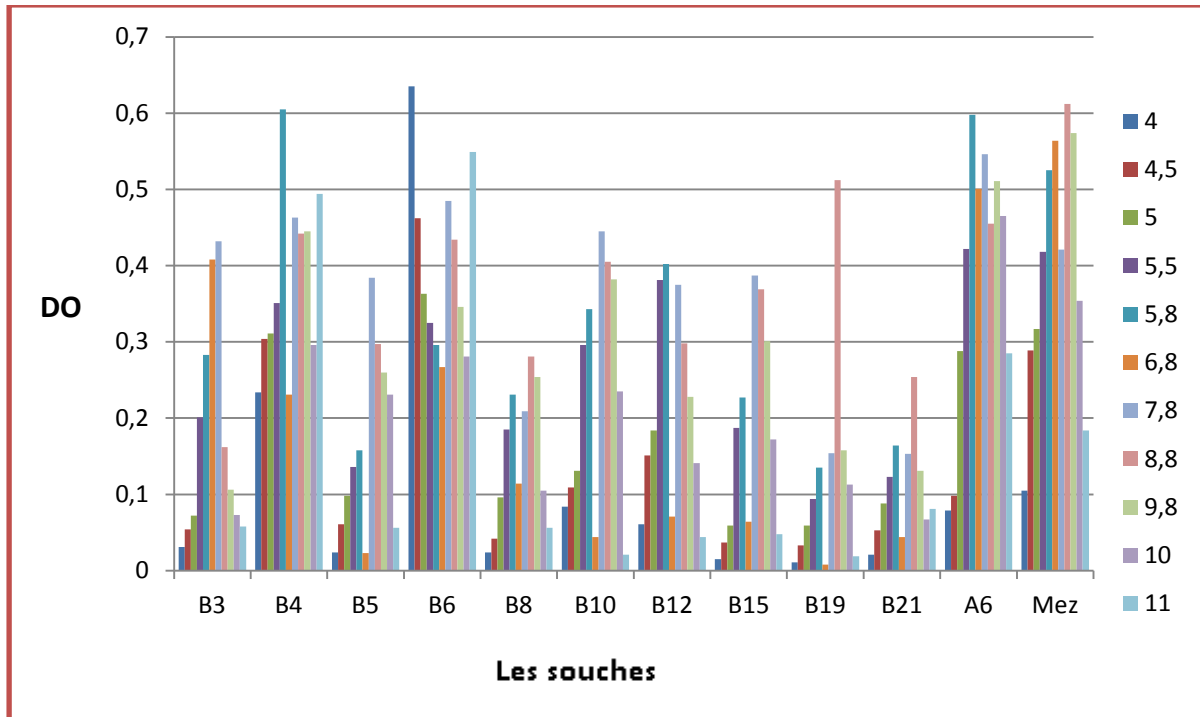


Figure 27: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Benzouit, Wilaya de Skikda

Plus encore, Raza *et al* (2001) ont montré que les souches de *Rhizobium* isolées des nodules *Lupinus albus* de l'Égypte tolèrent des pH extrêmes dont l'intervalle allant de 4 à 10. Dans le même contexte, Maâtallah *et al* (2001), selon l'analyse de cinquante-six souches de *Rhizobium* nodulant deux cultivars de pois chiche (*Cicer arietinum* L.), isolées de différentes régions du Maroc, montrent que certaines d'entre elles sont capables de pousser à un pH allant de 5 à 8. Alors Liu *et al* (2005), Wei *et al* (2008) ont fait contredire ces résultats étant donné que tous les rhizobies sont incapables de pousser à pH acide.

Des résultats contradictoires ont démontré que les *Bradyrhizobium* isolés à partir de lupin (Graham et Parker 1964) et certaines souches de *Rhizobium*, notamment les espèces *Rhizobium leguminosarum* ANU1173 (Chen *et al* 1993), croissent d'une façon préférentielle sur des pH acides. Également Tiwari *et al* (1998) affirment que le *Rhizobium meliloti* WSM419 est capable de croître à pH 5,7.

Entre autre, les isolats collectionnés du site Boumaaza croissent dans un milieu dont le pH allant d'un pH acide (pH 4) jusqu'un un pH alcalin (pH 10) avec des pH optimum: à titre d'exemple un pH optimum à 6.8 pour les isolats Z14, et Z16, pH 5.5 pour Z1, Z, Z10 et Z12(figure 28).

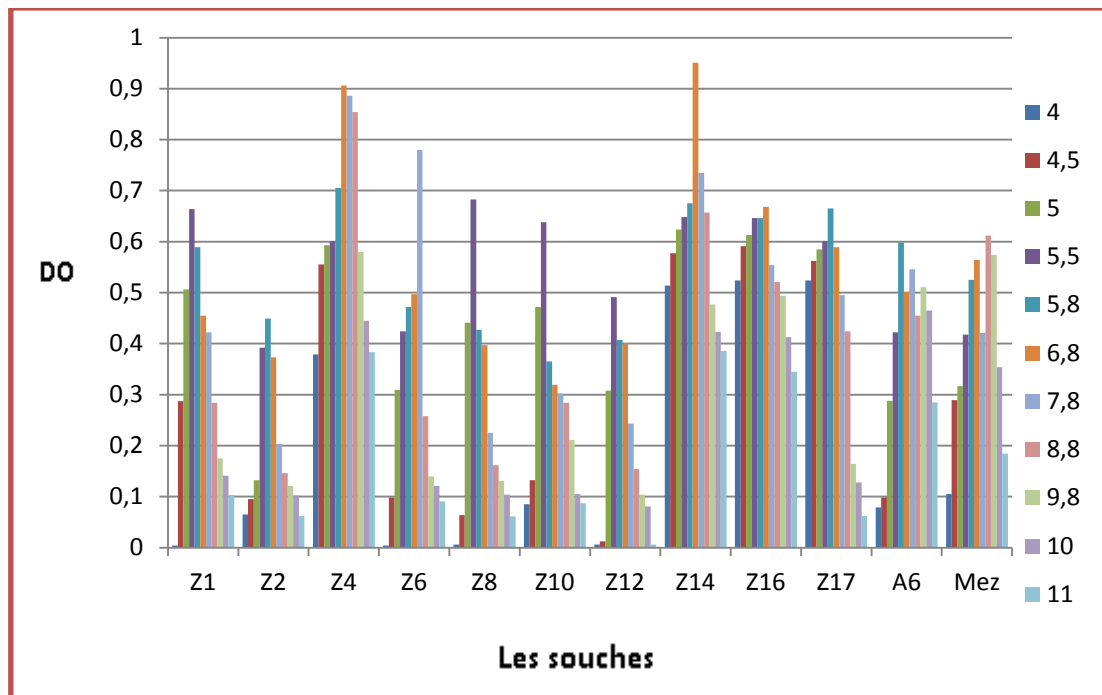


Figure 28: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Boumaade Annaba.

Brígido *etal*(2007) trouvent qu'une efficacité symbiotique supérieure a été obtenue en utilisant une solution d'arrosage à une valeur de pH la plus proche du pH de la croissance bactérienne maximale. Au total, ces études suggèrent que le pH est un facteur environnemental clé pour la composition de la population de *rhizobium*, agissant sur des bactéries, à la fois en vie libre et en symbiose.

Un autre groupe des souches, celui du site Salah Salah Salah, en présence de souches de référence, donne une DO plus faible notamment avec les pH acide et surtout à pH 6,8, à l'exception de souche S7, qui présente des résultats comparables à A6 et Mez (figure 29). Néanmoins, la plus part des isolats croissent mieux dans un bouillon à un pH 7,8.

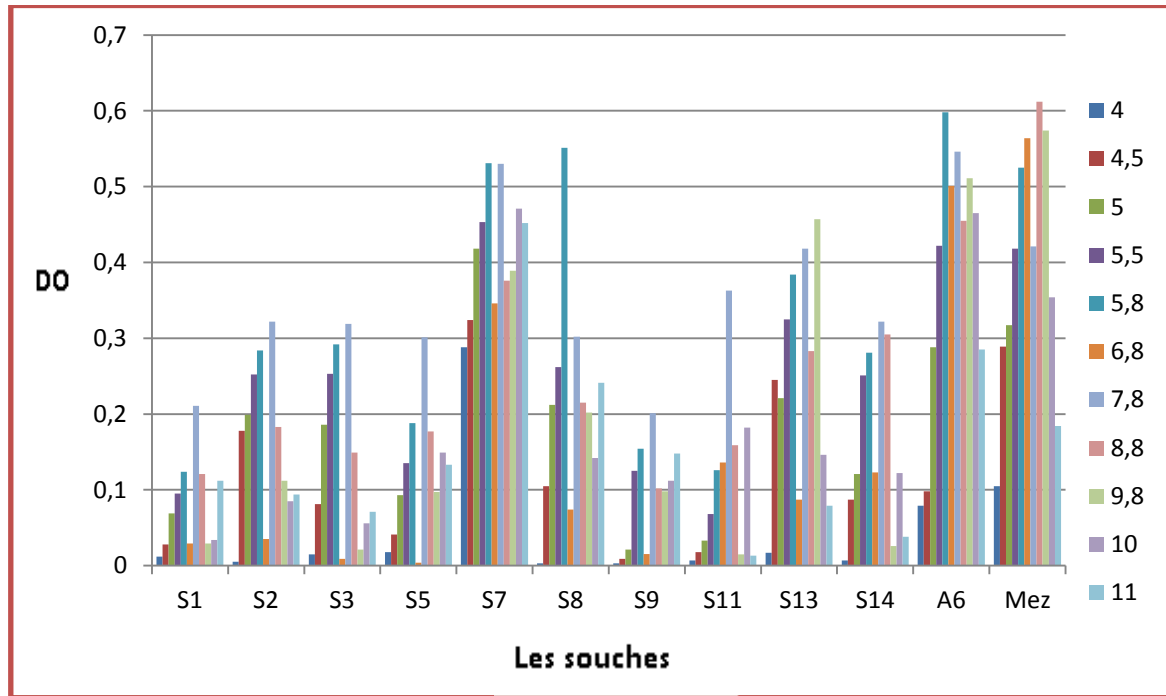


Figure 29: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Salah Salah Salah, Wilaya de Guelma.

Graham et al(1994) démontrent qu'un pH acide limite la persistance de souches de *Rhizobium* dans un sol, ainsi que la nodulation des légumineuses et la fixation d'azote et que la composition et la structure de la membrane externe des ces bactéries pourraient être un facteur de tolérance aux pH acides. En outre, Moron et al(2005) trouvent que la souche *Rhizobium tropici* nodulan la légumineuse *Phaseolus vulgaris*, dans un milieu acide, va augmenter la production des facteurs Nod (52 molécules) possédant des différences structurales significatives par rapport aux molécules produites avec un milieu neutre ; ce qui influe négativement sur l'effet de nodulation. De même, Mahammadi et al 2012 suggèrent qu'au pH acide, les *Rhizobium* perdent la capacité d'infecter les racines de plantes. Donc, les rizobia se développent mieux dans un milieu alcalin qu'un milieu acide. (Lakhal., 2011 ; Perez-Galdon et al.,1994).

Un dernier groupe des isolats, celui des bactéries issues du site Tamalous, révèle des résultats hétérogènes, ceux-ci sont représentés dans la figure 30. On trouve que la majorité des isolats n'a pas pu se croître à pH 4, sauf les isolats T3, T5 et T16 qui, au même pH, donnent une DO assez élevée. Ces mêmes souches tolèrent toute une gamme de pH avec une valeur optimale de 8.8. Le reste des bactéries croissent mieux à un pH 6.8.

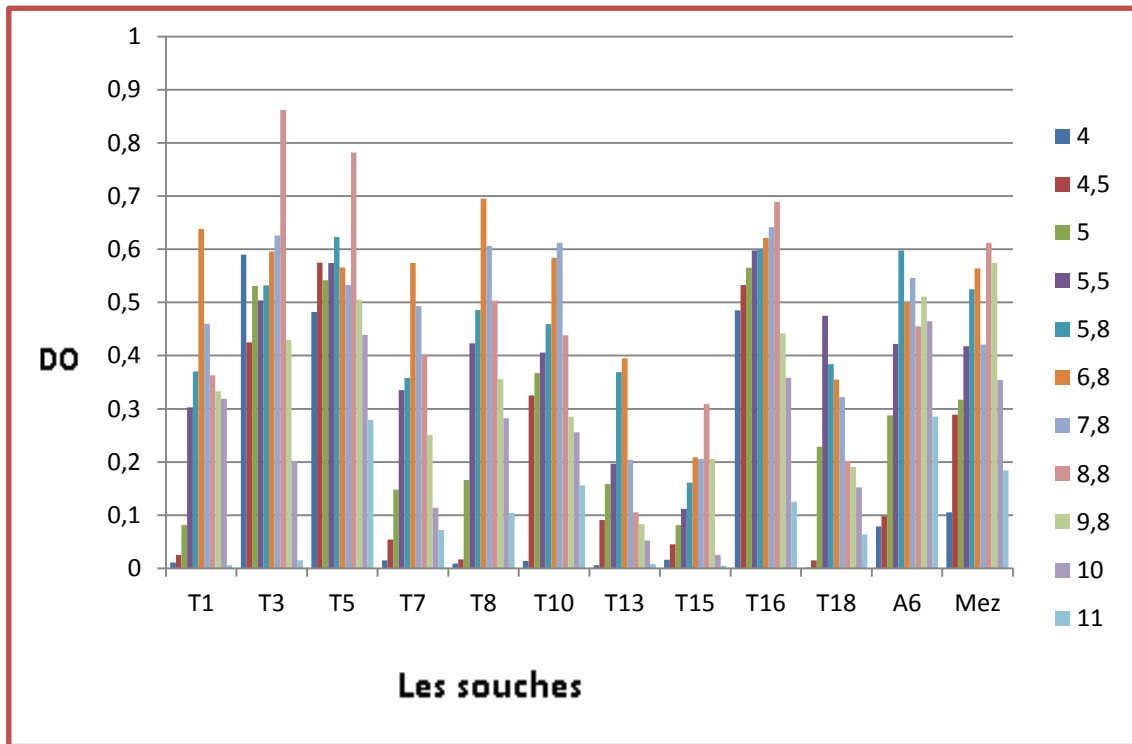


Figure 30: Effet du pH sur la croissance des isolats provenant du site Tamalous, wilaya de Skikda.

Il y a eu des changements dans le pourcentage de survie, le nombre de nodules et plantes, la taille des nodules et le poids sec des racines et le rendement des semences aux différents pH. Dans tous les paramètres, une large gamme de pH allant de 5 à 8, avec des valeurs optimales enregistrées. Les valeurs les plus faibles en termes de pourcentage de survie et de rendement en graines ont été enregistrées à pH 3 (Mensah *et al.*, 2006).

3. 2. Tolérance à la salinité

Dans les zones arides et semi-arides, la salinité est l'un des facteurs majeurs responsables de la détérioration des sols en les rendant impropres à l'agriculture. Par leur concentration excessive en sels, les sols salins constituent un environnement défavorable pour la croissance de la plupart des légumineuses. (Benidire *et al.*, 2014).

En observant les histogrammes, la totalité des isolats en présence des souches de référence ne tolèrent plus des concentrations élevées de NaCl .

Cependant, les bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse *Phaseolus coccineus*, celles qui proviennent du site Mdjaz ammar, wilaya de Guelma sont moins sensibles que les autres souches car elles peuvent tolérer jusqu'à 200mM ce qui est comparable avec *R.sullae* et *Mezorhizobium ciceri* (figure 31). Donc, nous pouvons estimer que cette tolérance est certainement liée à une présence particulière des osmoprotecteurs permettant aux *Rhizobium* d'être plus résistantes aux concentrations plus ou moins élevées de NaCl (Nour *et al.*, 1994). Ainsi Stuffi *et al.*(1998) montrent que la tolérance au NaCl varie d'une espèce à l'autre, prenant l'exemple de *Rhizobium hydysari* avec une concentration de sel qui ne dépasse pas 0,5% et 3% pour *R.meliloti*.

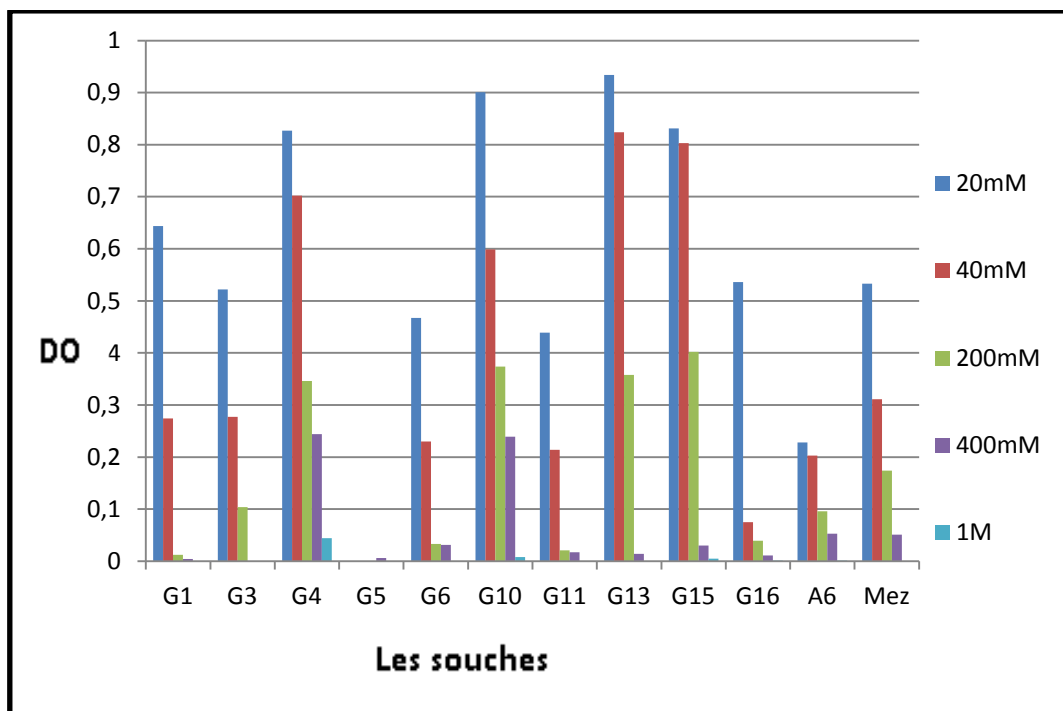


Figure 31: Effet du NaCl sur la croissance des isolats provenant du site Mdjez Ammar, Wilaya de Guelma.

Concernant l'efficacité de l'activité symbiotique, peu d'information est disponible pour les légumineuses et leurs rhizobia associées et qui (cette efficacité) dépend de la plante hôte, des bactéries qu'elles infectent et des conditions environnementales.

Idem pour les bactéries provenant du site Tamalous, cette catégorie des bactéries présentent pratiquement les mêmes caractéristiques, vis-à-vis à l'influence du sel sur la

croissance bactérienne, que celles du site Mdjez Ammar, et que ces deux catégories des bactéries nodulent la même légumineuse : *P.coccineus* (figure 32).

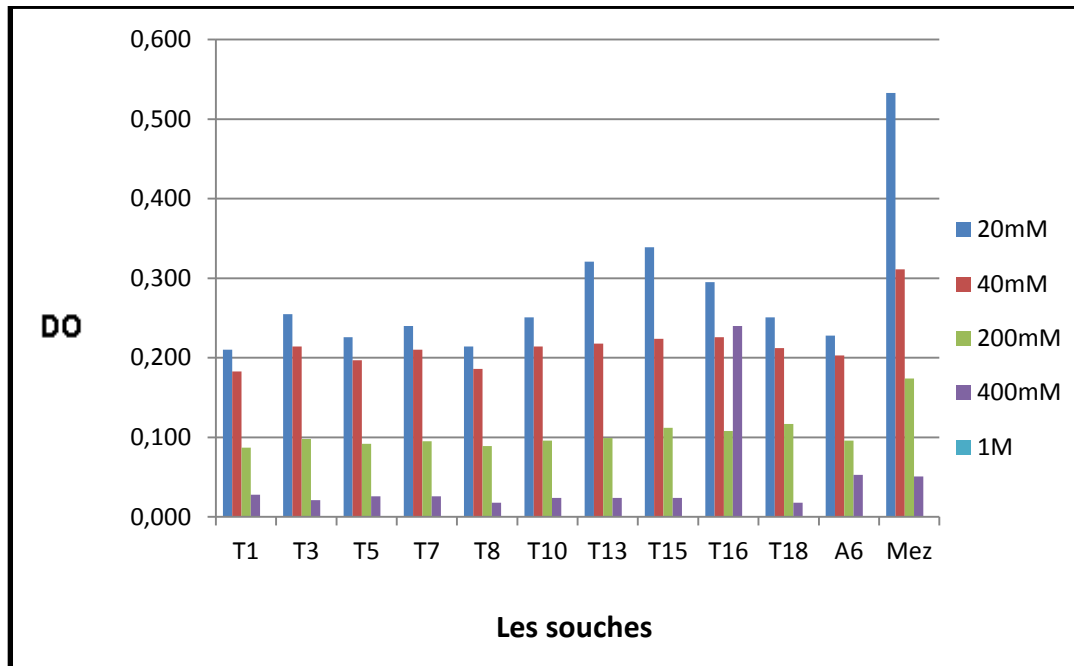


Figure 32: Effet du NaCl sur la croissance des isolats provenant du site Tamalous, Wilaya de Skikda.

Sur le plan de la tolérance au sel, les isolats provenant du site Salah Salah Salah peuvent être regroupés en deux groupes distincts ;

-le premier groupe renferme des bactéries qui peuvent croître à des concentrations du NaCl jusqu'à 40mM /litre de milieu de culture.

-le second groupe constitué des bactéries dont l'incapacité de se développer en présence du sel même avec une faible concentration de ce dernier, c'est le cas des deux isolats; S8 et S9(figure 33). Par conséquent, nous pouvons conclure que le NaCl dans ce cas est considéré comme un inhibiteur de croissance.

A la lumière de ces résultats, on peut prédire que les isolats isolés des racines de la légumineuse du genre *Phaseolus* présentent une biodiversité de la tolérance au NaCl, cela peut influencer le processus de la nodulation.

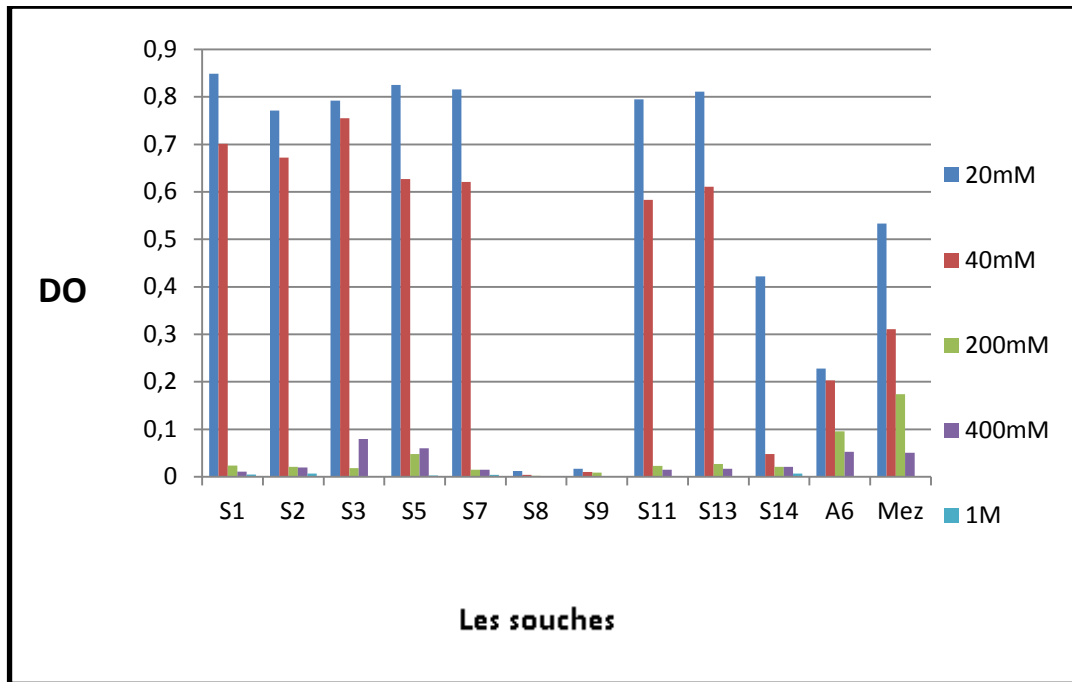


Figure 33: Tolérance des isolats provenant du site Salah Salah Salah, Wilaya de Guelma à différentes concentrations du NaCl.

Par ailleurs, Bouhmouch *et al* (2004) montrent qu'en absence ou en présence d'une faible concentration du NaCl (250-350mM), les souches *Rhizobium tropici* et *Rhizobium giardinii* ont induit une augmentation significative du nombre de nodules sur les racines de la légumineuse *Phaseolus vulgaris*, par contre, la présence en forte concentration du NaCl a un effet nocif sur la formation des nodules ; ce dernier affecte l'étape de l'infection des racines par la bactérie et par conséquent aucun nodosité est formé, malgré le fait que cette variété (la plante) est considérée comme la plus tolérante au sel .Outre, les nodules racinaire de luzerne et de haricot, la salinité influe négativement sur la survie et la prolifération des rizobia, et parla suite affecte le processus de la fixation biologique d'azote. (Farissi *et al.*, 2014 ; Faghire., 2012). Aussi elle provoque une inhibition des activités phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) et de la malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37), ces dernières sont nécessaires pour fournir aux bactéroïdes le carbone à partir des hexoses-6P (López *et al*, 2008a ; Faghire *et al*, 2011). En revanche, Benata *et al.*(2008)suggèrent que les légumineuses semblent être nodulées par des souches rhizobiales soient sensibles ou tolérantes au sel temps qu'elles disposent le gène *nod C*.

En observant la figure 34, les isolats en présence des souches témoin ne supportent plus la présence du NaCl en forte concentration. En plus, la présence du sel dans le milieu, même en faible concentration, va inhiber la croissance de certaines bactéries, comme

le cas des isolats : B19 et B21. Donc, dans ce cas, le sel est un facteur limitant la croissance bactérienne

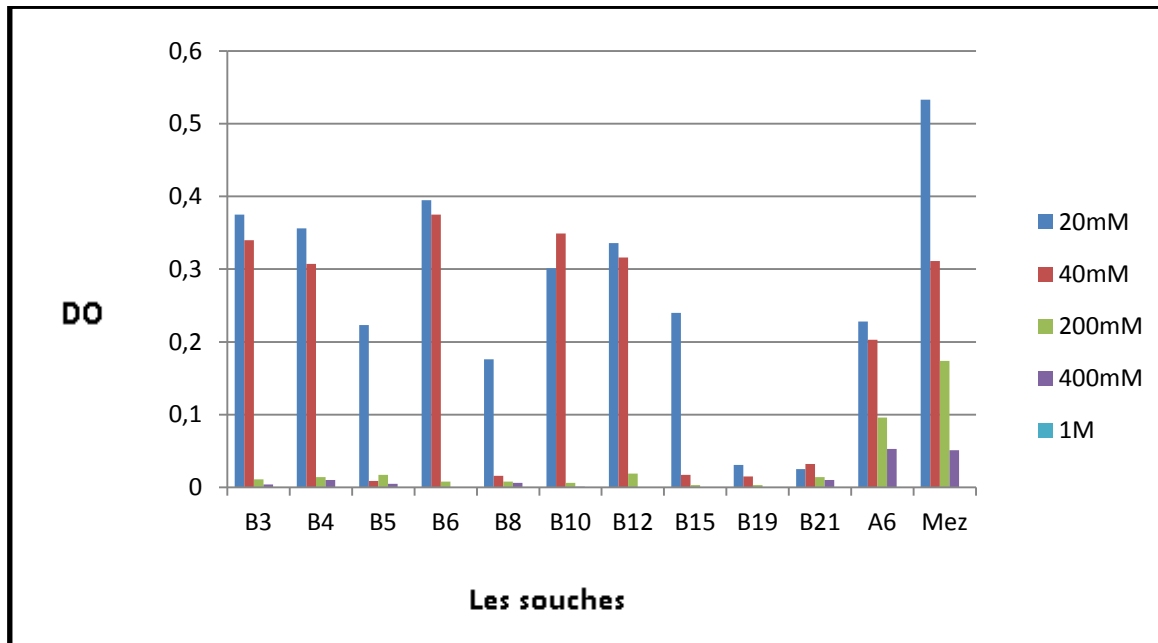


Figure 34: Tolérance des isolats provenant du site Benzouit, Wilaya de Skikda, à différentes concentrations du NaCl.

Cependant, La salinité affecte différents mécanismes physiologiques et la nécessité de survivre dans un environnement salin fait intervenir de multiples mécanismes d'adaptation pour les plantes (Yeo et Flowers.,1986). L'évolution de ces mécanismes adaptatifs implique un ensemble complexe de paramètres parmi lesquels beaucoup ne sont pas encore connu.

Parallèlement aux isolats issus du site Benzouit, les bactéries nodulant la même légumineuse, *P.vulgaris*, ne possèdent pas un pouvoir tolérant la présence du sel à des concentrations élevées (figure 35).

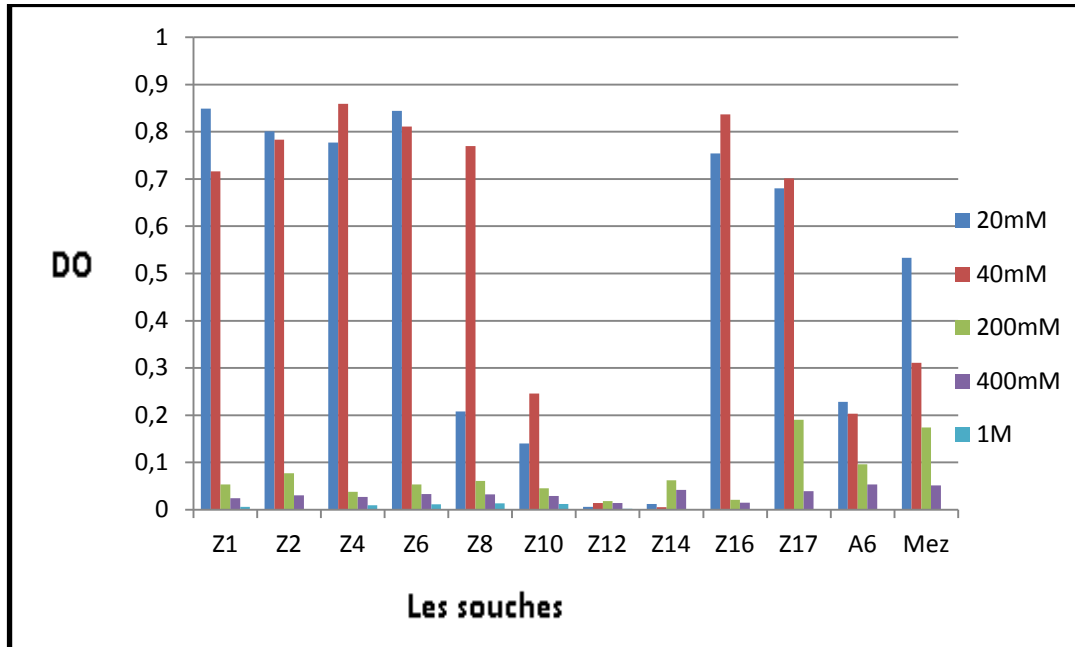


Figure 35: Tolérance des isolats provenant du site Boumaaza, Wilaya de Annaba, à différentes concentrations du NaCl.

En outre, Craig *et al*(1991) ont montré que des souches rhizobiales isolées d'*Acacia redolens*, se développant dans des zones salines en Australie, produisent des nodules efficaces avec *A.redolens* et *A. cyclops*, se développant dans un sol sableux avec une salinité supérieure à 80 mM NaCl. Ainsi d'autres exemples ont été aussi étudiés avec l'*Acacia* (Lal et Khanna.,1995; Zou *et al.*,1995) aussi Lazrek (2008) fait rejoindre les mêmes constatations.

3.3. Effet de la température

L'association symbiotique légumineuses-*Rhizobium* est fortement influencée par divers facteurs environnementaux, la température étant la plus importante. La croissance et la survie des rhizobia dans les sols sont altérées par les fortes températures du sol (Pereira Alexandre., 2010). Diverses études ont été menées pour examiner les réponses de croissance de différentes souches de *Rhizobium* à des températures croissantes; donc une propriété souhaitable pour la préparation de l'inoculum utilisée dans les régions avec des températures élevées/ basses au moment de la plantation ne sont pas inhabituelles (Yadav et Kiran Nehra, 2013).

La présente étude fait dévoiler une certaine diversité concernant la tolérance des isolats à des températures assez élevées ;

Tous les isolats et les souches de référence donnent une bonne croissance à une température située entre 22 et 45°C avec une optimale de 30°C ce qui retrouve aussi chez *Mesorhizobium huakuii* (Chen, 1991), espèce isolée des racines de la légumineuse *Astragalus sinicus*. En plus Graham (1992) a prouvé que les rhizobia sont des bactéries mésophiles, aussi nos résultats sont corroborés par les travaux de Moschetti *et al* 2005 qui ont constaté que les souches *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* isolées des nodosités des légumineuses *Viciae*, *Pisum* et *Lathyrus* prélevées des différentes régions de l'Italie présentent une tolérance de différentes températures allant de 37° jusqu'à 44°C.

Par contre à 0°C, uniquement les bactéries extraites des nodules de la légumineuse *Phaseolus coccineus* cultivée dans la wilaya de Guelma qui peuvent être croître.

En outre, nous avons enregistré que parmi les isolats provenant du site Tamalous (Skikda) ; T5, T7, T13, T15, T16 sont pourvus d'une tolérance de température de 55°C (Tableau 3). Ceci procure aux isolats d'être des bactéries thermophiles, ces résultats font joindre ceux de Michiels *et al.* 1994 Nehra *et al.* 2007, Pento *et al* 1998 qui démontrent une tolérance de *Rhizobium leguminosarum bv phaseoli* à haute température. Cet acte procure un meilleur rendement pour la fixation de l'azote. Aussi, *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* a amélioré le teneur en azote fixé semble avoir le potentiel d'améliorer le rendement des sols tropicaux.

Plusieurs études sur les *Rhizobium* indiquent que la tolérance aux facteurs abiotiques semble être liée à l'espèce (Reeve *etal*, 2006 ; Laguerre *etal*, 2006 ; Alexandre *etal*, 2006). Alors Michiels *et al* (1994) font expliquer une telle thermorésistance acquise des rizobia par la synthèse des protéines dont les poids moléculaires différents et que la bactérie produisant la protéine avec un PM plus important sera la plus résistante.

Tableau 4: Résultats de la croissance des isolats à différentes températures.

souche températures	T1	T3	T5	T7	T8	T10	T13	T15	T16	T18	A6	Mez
4°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
45°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
65°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Isolats provenant du site Tamalous.

souche températures	S1	S2	S3	S5	S7	S8	S9	S11	S13	S14	A6	Mez
0°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
22°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Isolats provenant du site Salah Salah Salah.

souche températures	G1	G3	G4	G5	G6	G10	G11	G13	G15	G16	A6	Mez
0°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4°	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
22°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Isolats provenant du site Mdjez Ammar

souche températures	B3	B4	B5	B6	B8	B10	B12	B15	B19	B20	A6	Mez
4°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Isolats provenant du site Benzouit

souche températures	Z1	Z2	Z4	Z6	Z8	Z10	Z12	Z14	Z16	Z17	A6	Mez
4°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Isolats provenant du site Tamalous

3.4. Résistance aux métaux lourds

Les aspects écologiques de la restauration des sols minés, mettent particulièrement l'accent sur le maintien d'une végétation durable à long terme sur les sites de mines de métaux toxiques. Les sols contaminés par des métaux sont des habitats artificiels qui sont très instables et deviennent des sources de pollution de l'air et de l'eau.

La phytostabilisation et la phytoextraction sont deux techniques courantes de phytoremédiation dans le traitement des sols contaminés par des métaux, la stabilisation des dépouilles toxiques des mines et l'élimination des métaux toxiques des détritiques, l'application doit être régulière. Des amendements aux sols devraient être ajoutés pour assurer la stabilisation des déblais miniers et l'augmentation de l'absorption des métaux en conséquence (Salt *et al.*, 1995, Wong *et al.*, 2002).

Nous remarquons que tous les isolats en présence des souches témoins tolèrent une concentration assez élevée du Cadmium cela veut dire que ces isolats ont pourvus d'une certaine résistance à ce métal avec une CMI de 1000 (Tableau 5). Le Cd est considéré parmi les métaux lourds les plus dangereux vu son impact phytotoxique sur la réduction de la croissance de la plante voire sa survie, il peut même provoquer une inhibition de croissance des racines et la formation des nodules chez les légumineuses (Chen *et al.*, 2003; Gerhardt *et al.*, 2009; Gallego *et al.*, 2012; Sheirdil *et al.*, 2012). Dans ces dernières années, il y a un intérêt croissant afin de bien comprendre l'effet du Cd et ces interactions dans l'établissement de la relation symbiotique entre les légumineuses et les rhizobiums (Gomez-Sagati *et al.*, 2015). Shvaleva *et al.*, (2009) trouvent que la souche *Sinorhizobium meliloti* nodulant la légumineuse *Medicago sativa* (Luzerne) capable de supporter la présence du cadmium dans le sol tout en produisant un substrat; les flavodoxines, qui sont des flavoprotéines transporteuses d'électrons et interviennent dans la réponse au stress oxydatif chez les bactéries et les cyanobactéries. Donc la flavodoxine pourrait avoir des applications comme outil biotechnologique pour améliorer la performance symbiotique de la luzerne et d'autres légumineuses dans les sols pollués par le cadmium (Tableau 5).

Tableau 5: Concentration minimale inhibitrice de métaux lourds

Souches	Métaux lourds (Concentration Minimale Inhibitrice $\mu\text{g/mlTY}$)					
	HgCl ₂	Zn	Cu	Pb	Cd	SbO ₃
G1	100	6000	1000	6000	1000	10000
G3	100	6000	1000	6000	1000	6000
G4	100	6000	1000	6000	1000	10000
G5	100	6000	1000	6000	1000	6000
G6	100	6000	1000	6000	1000	6000
G10	100	6000	1000	6000	1000	10000
G11	100	6000	1000	6000	1000	6000
G13	100	6000	1000	6000	1000	6000
G15	200	6000	1000	6000	1000	6000
G16	100	6000	1000	6000	1000	6000
A6	500	6000	1000	6000	1000	10000
Mez	500	1000	1000	6000	1000	10000

Isolats issus du site Mdjez Ammar, Guelma

Souches	Métaux lourds (Concentration Minimale Inhibitrice $\mu\text{g/mlTY}$)					
	HgCl ₂	Zn	Cu	Pb	Cd	SbO ₃
Z1	100	6000	1000	6000	1000	10000
Z2	100	6000	1000	6000	1000	6000
Z4	100	6000	1000	6000	1000	10000
Z6	100	6000	1000	6000	1000	6000
z8	100	6000	1000	6000	1000	6000
Z10	100	6000	1000	6000	1000	10000
Z12	100	6000	1000	6000	1000	6000
Z14	100	6000	1000	6000	1000	6000
Z16	200	6000	1000	6000	1000	6000
Z17	100	6000	1000	6000	1000	6000
A6	500	6000	1000	6000	1000	10000
Mez	500	1000	1000	6000	1000	10000

Isolats issus du site Boumaaza, Annaba

Métaux lourds (Concentration Minimale Inhibitrice µg/mlTY)						
Souches	HgCl2	Zn	Cu	Pb	Cd	SbO3
S1	200	6000	1000	6000	1000	10000
S2	200	6000	1000	6000	6000	6000
S3	200	6000	1000	6000	1000	1000
S5	200	6000	1000	6000	1000	6000
S7	200	6000	1000	6000	1000	6000
S8	200	6000	1000	6000	1000	6000
S9	200	6000	1000	6000	1000	6000
S11	200	6000	1000	6000	6000	6000
S13	200	6000	1000	6000	1000	6000
S14	200	6000	1000	6000	1000	6000
A6	500	6000	6000	6000	1000	10000
Mez	500	1000	6000	6000	1000	10000

Isolats issus du site Salah Salah Salah, Guelma

Métaux lourds (Concentration Minimale Inhibitrice µg/mlTY)						
Souches	HgCl2	Zn	Cu	Pb	Cd	SbO3
B3	100	6000	1000	6000	1000	10000
B 4	100	6000	1000	6000	1000	10000
B5	100	6000	1000	6000	1000	10000
B6	100	6000	1000	6000	1000	10000
B8	100	6000	1000	6000	1000	10000
B10	100	6000	1000	6000	1000	10000
B12	100	6000	1000	6000	1000	10000
B15	100	6000	1000	6000	1000	10000
B19	100	6000	1000	6000	1000	10000
B21	100	6000	1000	6000	1000	10000
A6	500	6000	6000	6000	1000	10000
Mez	500	1000	6000	6000	1000	10000

Isolats issus du site Benzouit, Skikda

Métaux lourds (Concentration Minimale Inhibitrice µg/mlTY)						
Souches	HgCl2	Zn	Cu	Pb	Cd	SbO3
T1	100	6000	1000	6000	1000	10000
T3	100	6000	1000	6000	1000	10000
T5	100	6000	1000	6000	1000	10000
T7	100	6000	1000	6000	1000	10000
T8	100	6000	1000	6000	1000	60000
T10	100	6000	1000	6000	1000	10000
T13	100	6000	1000	6000	1000	10000
T15	100	6000	1000	6000	1000	10000

T16	100	6000	1000	6000	1000	10000
T18	100	6000	1000	6000	1000	10000
A6	500	6000	6000	6000	1000	10000
Mez	500	1000	6000	6000	1000	10000

Isolats issus du site Tamalous, Skikda

Quant au Zinc, nous avons persuadé une forte résistance fournie par les bactéries étudiées (avec une CMI 6000 µg/ml) mis à part la souche de référence *Mezorhizobium ceciri*(1000). Yoon *etal*(1991) ; [Redondo *etal*\(2009\)](#) ont repéré une telle résistance au zinc et au cadmium chez les *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* à l'existence d'un plasmide pI258 doté de trois gènes ; *Cad A*, *Cad B* et *Cad C* codent pour le déterminant de résistance.

De même pour le Pb, qui a été supporté par les souches. Pajuelo *et al*(2007) révèlent queles bactéries ayant une résistance pour le plomb ont la particularité de produire un enzyme ;O-acétylsérine (thiol) lyase, et que le nombre de ces transcrits (ARNm) est régulé par la concentration de ce métal dans le sol.

La CMI de Cuivre est de 6000 pour tous les isolats, alors nous constatons que ces derniers tolèrent bien la présence de Cu. Ceci concorde avec les travaux de Smith (1997) ; les *Rhizobium* peuvent tolérer des concentrations maximales autorisées de Cu et Zin mais moins de Cd.

Au contraire, une résistance plus faible a été enregistrée pour le Chlorure de mercure (HgCl₂) avec une CMI qui ne dépasse pas 200 pour les isolats et 500 pour les souches témoins signifie que tous les isolats sont sensibles à la présence de mercure.

La CMI la plus élevée est signalée par la présence de l'oxyde d'antimoine(SbO₃), Ce qui prouve que tous les isolats ont résisté à sa forte présence dans le sol par rapport aux autres CMI des métaux étudiés. Silver *et al*(1981), Rosenstein *etal* (1992) suggèrent que cette résistance a été expliquée par la présence d'un plasmide chez les bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*,*Staphylococcus xylosum* possède d'un opéron conférant à la résistance aux métaux toxique et que l'antimoine est son inducteur et que le métal sera lié avec des thiols excrétés par ces cellules.

La présence des métaux lourds en très faible concentration dans le sol est indispensable à l'établissement de certaines activités métaboliques, soit pour les légumineuses ou bien pour les bactéries qu'elles nodulent. Par contre s'il y aura une augmentation au niveau de cette concentration, ces même métaux provoquent des effets

néfastes pour la plante hôte et les bactéries nodulants en affectant la relation symbiotique (Carrasco *et al.*,2005 ; Ahmed *et al.*,2012), quoiqu'il y ait des études contradictoires qui montrent un effet mineur ou inaperçu des métaux sur le taux de fixation de l' N_2 atmosphérique notamment chez le pois et l'haricot (Obbard *et al.*, 2001).

4. La sensibilité aux bacteriophages

Bien que les plantes soient entourées de phages, la grande majorité de l'impact du phage sur les plantes est transmise par des bactéries associées aux plantes.

L'activité des bactériophages pose une menace majeure à la survie bactérienne, dont certains affectent le Pilus et l'antigène O et d'autres qui fonctionnent à l'intérieur de la cellule (Bondy-Denomy2016). Il y a eu un certain nombre de rapports de présence relative de phage, dans des expériences à petite échelle, qui ont pour résultat une réduction de la croissance des plantes ou une réduction de la teneur en azote des plantes (Ahamd, et Morgan., 1994 ; Johnson., 1994; Hammad.,1998) .

Dans notre étude, après isolement et enrichissement des phages, nous avons enregistré une réaction positive vis-à-vis à la sensibilité des isolats : B9, G11, T9, B3, B17, T5, S10 au bacteriophages isolée du sol du site Salah Salah Salah qui va être révélée par la présence des plages de lyses. La figure suivante présente bien la formation des plages de lyse suite à une infection des bactéries par des bactériophages lytiques (figure 36).

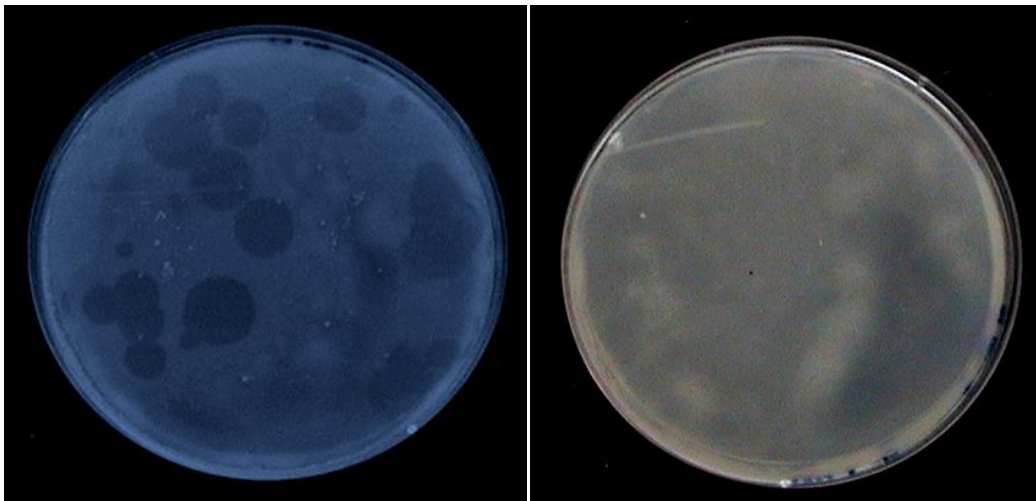


Figure 36: Résultat de la sensibilité des bactéries aux phages ; à droite absence des plages de lyse(B9), à gauche présence des plages de lyses.

Anupama *etal.*,(2015) trouvent que l'espèce bactérienne *R. gallicum* nodulant la légumineuse *Vicia cracca* est seulement être lysée par un seul bacteriophage du genre *Siphoviridae* d'où l'identification de cette bactérie par ce dernier (Patel *etal.*, 1985).

Par ailleurs, Kleczkowski*etal*(1953)ont démontré que les *rhizobium* peuvent être infectés par plus d'un bactériophage. Dhar *etal* (1993) démontrent cette caractéristique avec la souche *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* dont la présence de deux phages H2V et H3V.

5. Test de nodulation

Après 4-5 jours d'incubation à l'obscurité, la germination des graines est observée avec succès. Dès que les radicules atinent une longueur de 2-3 cm, les graines sont plantées dans les jarres(Figure 37-a).

Le test de nodulation aboutit à un bon résultat : la formation des nodules indique que nos isolats sont infectifs . Cette formation confirme également la relation symbiotique entre la plante hôte et le micro-symbiont qui est une relation spécifique (figure 37-b).



Figure 37: Test de nodulation : (a) le dispositif du test de nodulation, (b) racine de Phaseolus coccineus nodulée par T8, (c) racine de Phaseolus coccineus nodulée par S11, (d) racine de P.vulgaris nodulée par B8

Après dix semaines dans une chambre bactériologiquement contrôlée (figure 38-a), ce test montre l'aptitude des isolats de former des nodules sur les racines des deux légumineuse *Phaseolus coccineus* et *Phaseolus vulgaris* (figure 38-b, c, et d) de tailles varie entre 1 à 6mm généralement en forme de grappe de raisin avec une couleur blanche (Tableau 3) Alors que la couleur rose ou rouge indique la présence d'une hémoglobine (Riah.,2014) (figure 39)



Figure 38: a-nodule sous forme de grappe b- prendre de mesure d'un nodule formé.

L'isolement des bactéries, leur caractérisation culturale et biochimique (production d'enzymes nécessaires à la nodulation) ainsi que l'établissement de l'effet de nodulation font prouver l'appartenance de ces dernières (bactéries) au genre *Rhizobium* (Vaishali., et al., 2014).

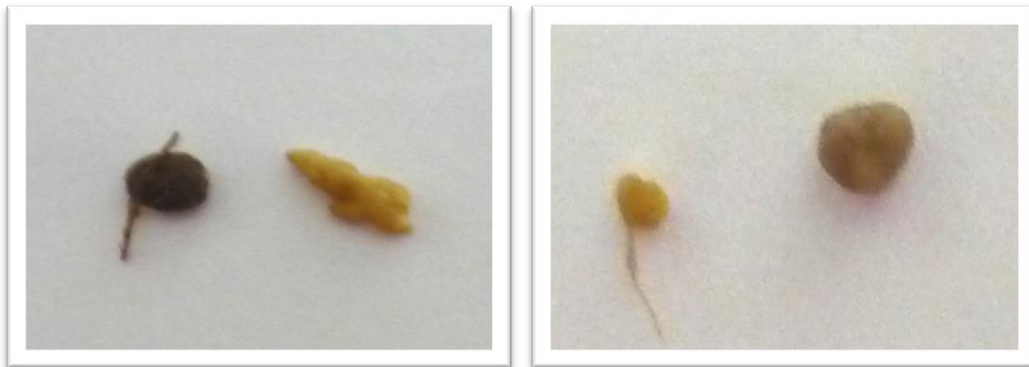


Figure 39: différence de couleur entre un nodule et un autre issu d'un test de nodulation in vitro.

Par ailleurs, en Brésil, des études montrent que la légumineuse, *Phaseolus lunatus* peut établir des symbioses avec plusieurs genres rhizobiaux notamment les genres : *rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Bradyrhizobium*, et *Sinorhizobium*, ce qui signifie une grande diversité génétique des bactéries nodulant cette légumineuse (Santos et al 2008) , contrairement

au Ormeno-Orrillo *etal*(2007) qui déduisent que la même légumineuse est nodulée uniquement par le genre *rhizobium* et rarement par le genre *Sinorhizobium*.

Tableau 6: Nombre et caractéristique des nodules produit par les plantes les deux variétés de la légumineuse

Isolat	Nombre de nodules	Couleur des nodules	La taille des nodules
Z1	07 nodules	blanc	1.7-2.1
Z2	02 nodules	Blanc	1.5-3.5 mm
Z5	11 nodules	Blanc	1.5-2.5 mm
Z9	8nodules	Blanc	1-2.5 mm
Z11	5nodules	Blanc	1.5-3 mm
B8	16 nodules	Blanc	1-6 mm
B1 0	23 nodules	Blanc	1.5-2.5 mm
B 12	15nodules	Blanc	1-2 mm
B21	4 nodules	Blanc	1-4 mm
S3	2 nodules	Blanc	2.2-2.5mm
S8	7 nodules	Blanc	0.5-1.5 mm
S9	8 nodules	Blanc	2.5-3.5 mm
S11	42 nodules	Blanc	1-6 mm
T5	17 nodules	Blanc	1-3.5 mm
T8	13 nodules	Blanc	1.5-6 mm
T18	10 nodules	Blanc	4-5.7 mm
G3	Des pallettes	Blanc	/
G4	3 nodules	Blanc	2-4.8 mm
G 5	1 nodule	Blanc	2 mm

Aussi, en Tunisie, Mhamdi *et al* (2002) ont montré que *P. vulgaris* est nodulée par une diversité d'espèces, y compris *Rhizobium gallicum*, *R. leguminosarum*Bvs. *Phaseoli* et *viciae*, *R. etli*, *R. giardinii*, *Sinorhizobium Fredii*, *S. meliloti* et *S. medicae* .

Yadegarietal (2008) a trouvé que pour bien améliorer le rendement des haricots notamment chez l'espèce *Phaseolus vulgaris*, il faut qu'il y aura une co-inoculation de la plante par des bactéries rhizobiennes et d'autres souches rhizobium favorisant la croissance des plantes(PGPR).

6. Caractérisation génotypique des isolats

Les comités internationaux présidés par Wayne (1987) et Starcke et al. (2002) ne se basent pas pour la définition d'une espèce sur des critères phénotypiques. Toutefois, ils demandent que ces critères soient pris en compte lorsqu'il s'agit de donner un nom à une espèce.

Les gènes ribosomiaux sont présents chez tous les organismes, et possèdent la même fonction vitale : la synthèse protéique. Ces caractéristiques font des ribosomes d'excellents candidats d'études pour les taxonomistes. En effet ces molécules possèdent un niveau d'évolution assez élevé pour assurer une variabilité entre les différentes espèces ; mais avec un degré de conservation suffisant pour assurer que ces différences correspondent à des catégories taxonomiques stables comme les genres et les espèces. Parmi tous les ARN ribosomiaux seul le gène ARNr16S remplit ces deux caractéristiques (Peix *et al.*, 2009).

6.1. Amplification de l'ADN génomique

Amplification de l'ADN génomique des 86 souches isolées de la légumineuse du genre *Phaseolus* a révélé l'existence d'une bande unique de taille 1500 pb. La taille de la bande a été visualisée en utilisant un marqueur de taille de 1 Kb (Figure 40).

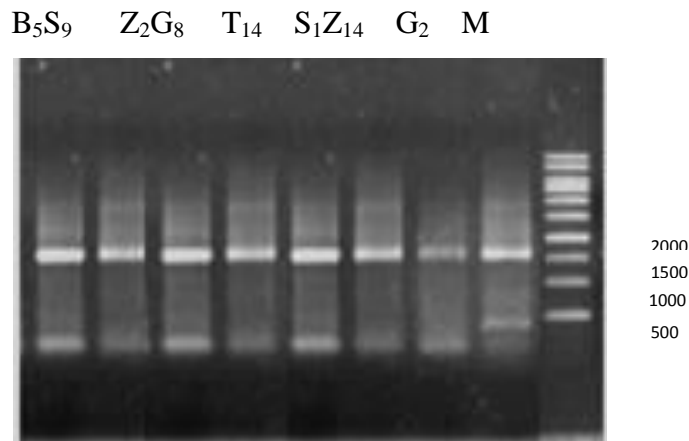


Figure 40: Profil électrophorétique de l'ADN génomique des isolats

6.2. PCR de l'ADNr 16S

Les produits de l'amplification de l'ADNr 16S par PCR donnent une bande de 1500 pb d'environ ce qui est conforme aux résultats des travaux de Weisburg *et al* (1991) et ceux de Laguerre *et al* (1994) (Figure 41).

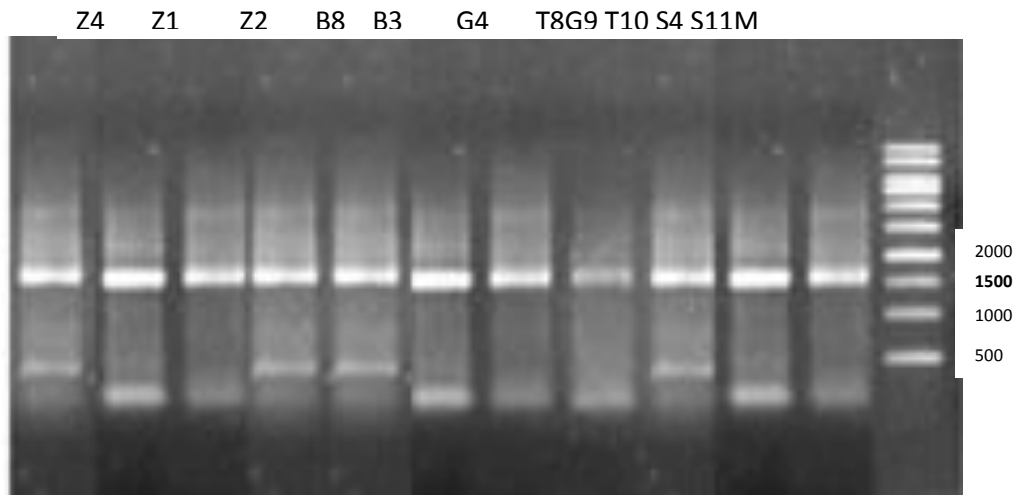


Figure 41: Profil électrophorétique du produit PCR des isolats nodulant la légumineuse du genre *Phaseolus*.

L'analyse des séquences nucléotidiques de la souche infective T8 fait apparaître l'appartenance de cette dernière à l'espèce *Bacillus subtilis* avec une similitude de 98%. Par ailleurs, Merckey (1999) a expliqué que la coexistence du genre *Bacillus* au sein des nodules, a la faculté de produire des spores lorsque les conditions de croissance ne lui sont pas favorables et peut également produire des antibiotiques contre les autres micro-organismes coexistants. Donc ce dernier est particulièrement à un pouvoir compétitif, ce qui fait expliquer sa présence dans un nodule.

Séquence appelée « 10 » du fragment T8 à l'aide du primer rD1 :

```
ACGAATTCACCCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGGTCCTAAAAGGTTAC
CTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG
GCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGC
TTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTGAGAACAGATTTGTGGGATT
GGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAG
CCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTTCTCCGTTTGGT
CACCGGCGGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGACTAAGATCAAGGGTTG
GGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA
```

Bacillus subtilis strain ITBCC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KM115537.1](#) Length: 1467 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1040 to 1460 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
719 bits (389)	0.0	411/421 (98%)	3/421 (0%)	Plus/Minus
Query 1	ACGAATTCACCCCA-TCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGGTCCTAAAAGGTTACCTCA	59		
Sbjct 1460	ACGAATTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGGTCCTAAAAGGTTACCTCA	1401		
Query 60	CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA	119		
Sbjct 1400	CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA	1341		
Query 120	CGTATTCACCGGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAG	179		
Sbjct 1340	CGTATTCACCGGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAG	1281		
Query 180	TTGCAGACTGCGATCCGACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTC	239		
Sbjct 1280	TTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTC	1221		
Query 240	GCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG	299		
Sbjct 1220	GCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG	1161		
Query 300	ATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTGGTCCACCGGCGGTACCTTAGAGTGCCCAA	359		
Sbjct 1160	ATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTGGTCCACCGGCGGTACCTTAGAGTGCCCAA	1101		
Query 360	CTGAATGCTGG--ACTAAGATCAAGGGTTGGGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC	417		
Sbjct 1100	CTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC	1041		
Query 418	A 418			
Sbjct 1040	A 1040			

Figure 42: Alignement de la souche T8 avec la séquence de Bacillus subtilis

Conclusion et perspectives

Conclusion et Perspectives

Dans cette étude nous avons essayé d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse *Phaseolus coccineus* et *Phaseolus vulgaris* cultivées dans cinq régions différentes ; deux régions situées dans l'Est de l'Algérie (Mdjez Ammar et Salah Salah Salah) et trois localisées dans le Nord Est du payé (Tamalous, Benzouit et Boumaaza) en présence de deux souches témoin: *Mesorhizobium cicer*, et *Rhizobium sllae*. Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux rhizobia.

Les études phénotypiques, notamment la morphologie des colonies sur YMA, la vitesse de croissance, culture des souches sur milieu YMA RC, la présence d'enzymes spécifique au processus de nodulation,nous laisse supposer que les isolats correspondent à une description du genre *Rhizobium*.

La disponibilité des enzymes nécessaires à l'hydrolyse des constituants de la paroi végétale est testée (cellulase), ainsi que les enzymes en relation avec le processus de nodulation (pectinase), et avec le métabolisme azoté (uréase, nitrate-réductase).

Toutes les souches y compris celles de référence sont douées d'une activité uréasique, polygalacturonique, cellulosique (ces deux derniers sont impliqués dans le processus infectieux des racines de la Légumineuse par les isolats). Par ailleurs un enzyme impliqué dans le processus de fixation et transformation de l'azote atmosphérique est retrouvé chez toutes les souches (Nitrate-réductase). Aussi le test nutritionnel et la tolérance aux facteurs abiotique font dévoiler une biodiversité entre les isolats.

La prestation symbiotique est concluante étant donné que le test de nodulation en conditions contrôlées donne de vrais nodules avec une couleur blanche qui signifie probablement l'absence de l'hémoglobine.

D'autre part, les isolats assurent une réaction positive en les mettant en contact avec des bactériophages du sol dont on a effectué la collecte des nodules, qui est prouvée par la présence des plages de lyse et que les interactions hautement spécifiques entre les bactéries et les Rhizobiophages font ces derniers un excellent marqueur pour l'identification des isolats. Aussi nos isolats, dans des conditions bactériologiquement contrôlées, sont capables d'infecter les racines de plantes en formant une structure spécialisée nommés; les nodules et par conséquent, ces bactéries sont cultivables.

Notre étude nous a permis d'identifier nos souches pas seulement selon leurs caractères phénotypique mais aussi selon leurs séquence d'ADN. La bactérie T8 isolée à partir de la légumineuse *P.coccineus* cultivé dans les sols de Tamalous, Wilaya de Skikda en utilisant la technique d'identification ADNr 16S, fait distinguer l'appartenance de cette dernière à l'espèce *Bacillus subtilis*.

Bien que, les légumes secs revêtent une importance stratégique pour l'alimentation surtout humaine, l'Algérie souffre toujours d'une production agricole insuffisante, raison pour laquelle, l'Algérie devrait promouvoir les recherches visant le développement et l'amélioration du rendement agricole des légumineuses.

L'Algérie doit dévier ces investissements vers une production agro-alimentaire pour fuir la crise économique liée aux hydrocarbures surtout qu'elle possède des capacités qui lui procurent un épanouissement spectaculaire.

Enfin, dans ce travail de thèse, les travaux présentés dans cette étude s'inscrivent dans le cadre de l'amélioration du rendement agricole du *Phaseolus* en Algérie par le biais d'une fixation biologique de l'azote atmosphérique tout en établissant une symbiose *Rhizobium*-légumineuse qui présente un intérêt économique et agronomique considérable.

Références bibliographique

References bibliographiques

Adams M.W, Coyne D.P, Davis J.H.C, Graham H.P, Francis C.A., 1985. Common bean (*Phaseolus vulgaris*L.), p. 433-476. In R.J. Summerfield and E.H Roberts (eds), Grain Legume Crops, Colin London.

Ahamd, M. H., and Morgan, V. 1994.Characterization of a cowpea (*Vigna unguiculata*) rhizobiophage and its effects on cowpea nodulation and growth. *Biol. Fertil. Soils* 18:297-301.

Ahmad E , Zaidi A, Khan M.S , Oves M.,2012.Heavy Metal Toxicity to Symbiotic Nitrogen-Fixing Microorganism and Host Legumes.

Alberton O, Kaschuk G , Hungria M .2005. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology & Biochemistry* 38 1298–1307.

Alexandre A, Laranjo M & Oliveira S.,2006. Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods.*Microb. Ecol.* **51**: 128-136.

Allen E. k and Allen O. N.,1950.Biochemical and symbiotic properties and symbiotic properties of the Rhizobia. *Bact. Rev.* pp. 14; 273-330.

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

Avaniss-Aghajani E, Jones K, Chapman D, Brunk C.F.,1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 17: 144-149.

Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A., 2003.Review and re-analysis of domainspecific 16S primers.*J. Microbiol.Methods*, **55**, 541-555.

Bantu K N N , BantuN , Tirupati Rao Y R .,2016.Isolation and purification of Rhizobium from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root nodules.

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

Belay D, Schulthess F, Omwega C., 2009.The profitability of maize–haricot bean intercropping techniques to control maize stem borers under low pest densities in Ethiopia. *Phytoparasitica* 37:43-50.).

Benata H, Ourarhi M, Boukhatem N.E, Berrichi A.B, Hanaa A.M, Muresu R , Squartini A, Missbah El Idrissi M., 2008.Diversity of bacteria that nodulate *Prosopis juliflora* in the eastern area of Morocco.

Benidire L, Daoui K, Fatemi Z.A., Achouak W., Bouarab L, Oufdou K-2014-

Effet du stress salin sur la germination et le développement des plantules de *Vicia faba* L.(Effect of salt stress on germination and seedling of *Vicia faba* L.) *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (3) (2015) 840-851.

Benselama A, Abed N.D, Bouhketem F, Ounane S.M and Bekki A.K-2013- Diversity of rhizobia nodulating *Lablab purpureus* and the effect of the acidity, aluminium AND ferric deficit on their symbiosis. Vol 4, Issue 4, 2013, pp 586-598.

Beringer, J.E -1974 –R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.

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

Berrada.H et Benbrahim.K., 2014. *Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives.* *British Microbiology Research Journal* 4(6): 616-639.

Bharath Kumar S, Prabhasankar P-2015-A study on starch profile of ajma bean (*Phaseolus vulgaris*) incorporated noodle dough and its functional characteristics.

Blair M. W, Gonzalez L. F, Kimani P. M, Butare, L.,2010. Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from central Africa. *Theor Appl Genet.*, 121, 237-248.

Bondy-Denomy J, Qian J , Westra E.R , Buckling A , Guttman D. S , Davidson A.R and Maxwell K.L .,2016. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5S3E1

Bouhmouch I , Mouhsine B. S-, Brhada.F, Aurag J.,2004.Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress.

Braker G., Conrad R., 2011. Diversity, structure, and size of N₂O-producing microbial communities in soils-what matters for their functioning? *Adv. Appl. Microbiol.* 75 33–70. 10.1016/B978-0-12-387046-9.00002-5.

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.

Brígido, C., A. Alexandre, M. Laranjo & S. Oliveira., 2007. Moderately acidophilic mesorhizobia isolated from chickpea. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**: 168-174.

Brink M, Belay G.M., 2006. Ressources végétales de l’Afrique tropicale 1 Céréales et légumes secs. Fondation Prota/ Backhuys publishers/CTA Wageningen.

Brucher H., 1988.The Wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. In: “Genetic Ressources of *Phaseolus* beans”, P. Gepts (ed), Kluwer Academic, Publishers, Dordrecht, Holland, p. 185-214.

CABI (CAB International),2007. Retieved March 30, 2016, from <http://www.cabi.org>

Camacho, B. M., & Gonzalez de Mejia, E.,1998.Comparative study of enzymes related to proline metabolism in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) under drought and irrigated conditions, and various urea concentrations. *Plant Food Hum.Nutr.*, 52, 119-132.

Chakrabarti S. K. M., Lee and Gibson A. H.,1981. Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species. *Soil Biol. Biochem.* pp. 13; 349-354.

CIAT.,1987.Standaed system for the evaluation of bean germplasm. CIAT, Cali, Colombia.20pp. In press.

Cronk Q., Ojeda I. and Pennington R.T.,2006. Legume comparative genomics: progress in phylonetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* 9: 99-103.

Daniel G, Debook I, Luz M.M., 1989.Diversité génétique dans le genre *Phaseolus*. Centro Intrnational de Agricultura tropical(CIAT) Agricultura Aero 6713. Cali, Colombia.

Debelle F., Moulin L., Mangin B., Denarie J. & Boivin C., 2001.Nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimia Polonia Minireview*, 48 (2), 359-365.

Debelle F., Rosenberg C., Vasse J., Maillet F., Martinez E., Denarie J. & Truchet G., 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to cornmon and specifie nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 168, 1075- 1086.

Debelle F. & Sharma S.B., 1986. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR 2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucl. Acids Res. H.*, 14,7453-7472.

De Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins M. D, Kersters K, Dreyfus B. and Gillis M., 1998.*Allorhizobiumundicola* gen. nov., sp .nov. Nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate*Neptunia natans* in Senegal.*Int. J. Syst. Bacteriol.* pp. 48; 1277-1290.

Delarras C., 1998.Microbiologie, 90 heures de travaux pratiques, pp. 56-125 Gaetan Morin Europe.

Delgado-Salinas A, Bibler R, Lavin M., 2006.Phylogeny of the genus *Phaseolus* (leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Syst. Bot.* 31, 779–791.

Delgado-Salinas, A., Turley, T., Richman, A., Lavin, M.,1999. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Syst. Bot.* 24, 438–460.

Den Herder G, Parniske M., 2009. The unbearable naivety of legumes in symbiosis current opinion plant Biology 12: 491-499.

Caetano-Anollés, G., 1997. Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. *Field Crops Res.* **53**: 47 - 68.

Cervantes E., Sharma S.B., MaIllet F., Vasse J., Truchet G. & Rosenberg C., 1989. The *Rhizobium meliloti* host range *nod O* genes encodes a proteine which shares homology with translation elongation and initiations factors. *M. Microbiol.*, **3**, 745-755

Chacón MI, Pickersgill SB, Debouck DG., 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor. Appl. Genet.* 110:432-444.).

Carrasco J.A, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes M.A, Lopez R, Chamber M.A, Palomares A.J., 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metal after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. *Soil Biol. Biochem.* 37:1131-1140.

Chen H., Alan E., Richardson and Barry G. R -1993-: Plant Microbe Interaction Group, Research School of Biological Sciences, Institute of Advanced Studies, Australian National University, GPO Box 475, Canberra City, *Appl. Environ Microbiol.* pp. 59(6); 1798-1804.

Chen W. X. ; G. S. Qi ; E.T. Wang ; H.L. Huan and J.L Li(1991) – *Rhizobium huakii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 275-280.

Chen, Y. X., He, Y. F., Yang, Y., Yu, Y. L., Zheng, S. J., Tian, G. M., (2003). Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. *Chemosphere* 50, 781–787.

Chen WM, James EK, Prescott AR, Kierans M, Sprent JI-2003- Nodulation of *Mimosa* spp. by the *Beta-proteobacterium Ralstonia taiwanensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:1051–1061.

Cleland EE, Harpole WS.,2010. Nitrogen enrichment and plant communities. *New York Academy of Sciences.* **1195**: 46–61.

Craig G.F, Atkins C.A, Bell D.T.,1991. Effect of salinity on growth of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant Soil* 133: 253-262

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

- Davet P., 1996.** *Vie microbienne du sol et production végétale*. Institut National de la Recherche Agronomique. INRA, Paris, 384 p.
- Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L., 2001.** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **58**: 61–71.
- Debelle F., Rosenberg C., Vasse J., Maillet F., Martinez E., Denarie J, Truchet G., 1986.** Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, **168**, 1075- 1086.
- Debelle F. & Sharma S.B., 1986.** Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR 2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucl. Acids Res. H.*, **14**, 7453-7472.
- Degefu T, wolde-meskel E, Liu B, Cleenwerck I, Willems A, Frostegård Å., 2013.** *Mesorhizobium shonense* sp. nov., *Mesorhizobium hawassense* sp. nov. and *Mesorhizobium abyssinica* sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**:1746-1753.
- De Ley J, Cattoir H, et Reynaerts A., 1970.** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12** : 133–142.
- Dhar B., Upadhyay K. K., Singh R. M., 1993,** Isolation and characterization of bacteriophages specific for *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Revue canadienne de microbiologie*, **39**(8): 775-779.
- Diouf A., 1997.** Caractérisation et utilisation de souches de *Rhizobium* isolées du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) dans la zone des Niayes au Sénégal.
- Dommergues Y., Mangenot F., 1970.** *Ecologie microbienne du sol*. MASSON, Paris, 783 p. J
- Doyle JJ., 2001.,** Leguminosae. *Encyclopedia of Genetics*. Brenner S, Miller JH (Editors), Academic, San Diego, USA, 1081-1085.
- Doyle J.J., 1998.** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* **3**: 473-478.
- Doyle J.J., Luckow M.A., 2003.,** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a Phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900-10.
- Downie JA., 2005.** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology*. **15**: 6.
- Duhux M. & Nicole M., 2004.** *Biologie Végétale. Associations et Interactions chez les plantes*. Dunod-IRD, Paris, 176 p.
- Dupon M, Guignard A, Van Onckelen H.A, De Greef J.A., 1989.** Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*. **1399-3054**. 1987.tb04301.

- Faghire M.,2012** .Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin.University Ibn Zohr – Agadir.
- Faghire M, Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K, Ghoulam C., 2011**. Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55:69-75.
- Farissi1 M, Aziz F, Bouizgaren A, and Ghoulam C .,2014**. Legume-rhizobia symbiosis under saline conditions: Agro-physiological and biochemical aspects of tolerance. *International Journal of Innovation and Scientific Research* ISSN 2351-8014 Vol. 11 No1 pp 96-104.
- Fossou K.R .,2011**. Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'Angole (*Cajanus cajan I.*) à Yamoussoukro (centre de la Cote d'Ivoire).Ecole supérieur d'agronomie de l'institut national polytechnique Felix Houphouët Boigny de Yamoussoukro .
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, García-Fraile P, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, González-Buitrago JM, Velázquez E., 2011**.MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLoS ONE* 6:e20223. doi:10.1371/journal.pone. 0020223.
- Fierer N., Jackson R. B., 2006**. The diversity and biogeography of soil bacterial communities.*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*103 626–631. 10.1073/pnas.0507535103
- Freytag, G.F., Debouck, D.G., 2002**. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae–Papilionoideae*) in North America, Mexico and Central America. *Sida* 23, 1–300.
- Gachande, B.D. and Khansole, G.S.** 2011.Morphological, cultural and biochemical characteristics of *Rhizobiumjaponicum* syn. and *Brady Rhizobium japonicum* of Soybean.*Biosci.Discov.*2(1): 1-4.
- Gallego S. M, Pena L. B,Barcia R. A, Azpilicueta C. E, Iannon, M.F, Rosales E.P., 2012**. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* 83, 33–46.
- 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.
- Garg N., Geetanjali .,2007**. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signalling: a review, *Agron. Sustain. Dev.* 27,59-68.
- Garrity GM, Johnson KL, Bell JA, Searles D.B.,2002**. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Release 3.0. Second Edition. New York: Springer-Verlag. Taxonomic Outline of the Procaryotes.

- Gaur Y.D, Sen A.N.,1981.**Cultural and biochemical characteristics of roots nodule bacteria of Chickpea (*cicer arietinum L.*). *Zbl. Bakt. II. Abt.*, 136, 307-316.
- Gepts P et Bliss F.A.,1985.** F₁ hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated common bean. *J. Heredity* 76:447–450.
- Gepts P, Deboouk D.,1991.** Origin, domestication , and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) .p. 7-53. In A. van Schoonloven and O. Voysest (ed) Common bean: Research for crop improvement. C.A.B.Intl, Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia.
- Gepts P, Osborn T.C, Rashka K, Bliss F.A., 1986.**Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40(4): 451-468.
- Gerhardt, K. E., Huang, X.-D., Glick, B. R., and Greenberg, B. M.,2009.** Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci. J.* 176, 20–30.
- Gloux. K et D. Rudulier.,1989.**Transport and catabolism of praline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.*151:143-148.
- Gomez –Sagati M.T, Marino D .,2015.** PGPRs and nitrogen-fixing legumes: a perfect team for efficient Cd phytoremediation.
- Graham P.H.,1992.**stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38: 475-484.
- Graham P. H, Draegerk J, Ferreym L, Conroy J, Hammerb E, Martinez , Aaronss R, and Quinto.,1994.** Acid pH tolerance in strains of *Rhizohirrrn* and *B~arlyr.llizobirrr~al,n d* initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhtohirrru tr.opici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.*40: 198-207.
- Graham P. H andParker C. A.,1964.**Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil.* pp.20:383-396.
- Graham, P.H., Sadowsky, M.J., Tighe, S.W., Thompson, J.A., Date, R.A., Howieson, J.G., et Thomas, R.,1995.** Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid methyl ester analysis.*Can. J. Microbiol.*41 : 1038–1042.
- Graham P.H et Vance C.,2003.** Legumes:importance and contraintes to greater use. *Plantphysiol.* 131:872-877.
- Graham P. H.,1964 a-** The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* pp. 35; 511-517.
- Graham P. H.,1964 b-** Studies on the utilisation of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leewenhoek J. Microbiol. Serol.* pp. 30; 68-72.

Graham PH, Sadowsky MJ, Kersters HH, Barnet YM, Bradley RS, Cooper JE, De Ley DJ, Jarvis BDW, Roslycky EB, Strijdom BW, Young JPW.,1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *International journal of systematic bacteriology*. **41**: 582–587.

Grimont P.A.D, Popoff M.Y, Grimont F, Coynault C, et Lemelin M.,1980,Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* **4** : 325–330.

Guignard J.L., 1998. Microbiologie alimentaire DUNOD. Paris

Guignard J.L., Dupont F., 2005. Botanique.13ème Edition Masson.Sprent : 164-179.

Gurtler V. & Stanisich V.A .,1996.New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, **142**, 3-16

Halmillawewa A. P., Restrepo-Cordoba M, Yost C. K.and Hynes M. F..2015.

Genomic and phenotypic characterization of *Rhizobium gallicum* phage vB_RglS_P106B.

Hammad, A. M. M., 1998. Evaluation of alginate-encapsulated *Azotobacter chroococcum* as a phage-resistant and an effective inoculum. *J. Basic Microbiol.* **38**:9-16.

Harrison MJ .,2005.Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.*Annu.Rev.Microbiol.* **59**: 19-42.

Hayatsu M., Tago K., Saito M., 2008. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci. Plant Nutr.* **54** 33–45. 10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x.

Horvath B., Kondorasi E., Johnson M., Schmidt J., Torok L., Gyorgypal Z., Barabas L., Wieneke V., Schell J. & Kondorosi A., 1986. Organization structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell*, **46**, 335-343.

Huybens N, Mainil J. et Marlier D., 2009.Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Ann. Méd. Vét.,153*, 112-128.

Jarvis, B.D.W., Sivakumaran, S., Tighe, S.W., et Gillis, M.,1996.Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant and Soil*, **184** : 143–158.

Johnson, J.L., 1984.Bacterial classification. III. Nucleic acids in bacterial classification. *Dans* Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. *Sous la direction de* : N.R. Krieg et J.G.Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. pp. 8–11.

Johnson, K. B., 1994. Dose-response relationships and inundative biological control. *Phytopathology* **84**:780-784.

Jones, D., et Krieg, N.R., 1984. Serology and chemotaxonomy. Dans Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Sous la direction de : N.R. Krieg et J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. pp. 15–18.

Jordan, D.C., 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. p. 234-254. In : N.R. Krieg and J.H. Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.1 The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

Kinzig AP, Socolow R.H., 1994. Is nitrogen fertiliser use nearing a balance-reply. *Physics Today* 14: 24-35.

Kleczkowski J and Kleczkowski A., 1953. The Behaviour of *Rhizobium* Bacteriophages during and after Exposure to Ultraviolet Radiation. *J. gen. Microbiol.* 8, 135-144.

Kneip C., Lockhart P., Voss C. & Maier U.G., 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes -new models for symbiosis. *BMC Evol Biol*, 7, 55.

Koinange EMK, Gepts P., 1992. Hybrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. *J Hered* 83: 135-139.

Laguerre G, Allard M.R, Revoy F, and Amarger N., 1994. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 56-63.

Laguerre. G, Courde.L, Nouaim.R, Lamy.I, Revellin.C, Breuil M. C & Chaussod.R., 2006. Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microb. Ecol.* 52: 426-435.

Lal B, Khanna S., 1995. Selection of salt tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 637-639

Latour .X, Lemanceau.P., 1997. Métabolisme carbone et énergétique des *Pseudomonas* spp uorescents saprophytes à oxydase positive.

Lafay B., Bullier E. & Burdon J.J., 2006. Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia* (Ulmaceae) do not constitute a separate coherent lineage. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 1013-1018.

Lazrek. F., 2008. Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin.

Levy-Booth D. J., Prescott C. E., Grayston S. J., 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 75 11–25. 10.1016/j.soilbio.2014.03.021

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

Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Fornay L., 1997.Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA.Applied and Environmental Microbiology. 63: 4516-4522.

Liu J, Wang E.T, chen W.X., 2005. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China.Syst.appl.Microbiol. 28: 465-477.

Lopez-Lopez A, Negrete-Yankelevich S, Rogel M A, Ormeno-Orrilo E, Martinez J, RomeroE.,2012.Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are of *Phaseolus lunatus* (*Lima bean*).

Lopez M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera NA, Lluch C., 2008a. Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: nodule carbon metabolism. Journal of Plant Physiology 165: 641-650.

Maatallah J., El Bekkay B., Juan S., and Carmen L., 2001.Phenotypic characterisation of rhizobia isolated from *chickpea* (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. Agronomie 22 (2002). pp. 321-329.

Madigan, MT.; Martinko, JM.; Parker, J.; Madigan, MT., 1997.Brock Biology of Microorganisms.Vol. Eighth edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; p. 986 .

Madigan M.T & Martinko J.M .,2006. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn. Pearson Education, Upper Saddle River, NJ.

Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A ., 2008.. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: A case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:200-214.

Mcinerney J.O, Wilkinson M, Patching J.W, Embley.M, Powell R.,1995. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl.Environ. Microbiol*, **61**, 1646-1648.

Meisterhans M.G .,2012.Dynamique de la structure génétique des communautés procaryotes en zone benthique côtière : caractérisation de la microflore des sédiments et des bivalves fouisseurs par empreintes moléculaires.

Mensah J.K, Esumeh F, Lyamu M, Omeifi C., 2006. Effect of different salt concentrations and pH on growth of *Rhizobium sp.* And a Cowpea *Rhizobium* association. American Eurasian J. Agric. And environ.Sci., 1(3) 198-202

Merckey Sylvia.,1999. Rhizobactéries Natives de nouvelle-Calédoni promotrices de la croissance des plantes.

Mergaert P.,2013.Favoriser la croissance des plantes grâce à des bactéries. Institut des Sciences du Végétal (CNRS Gif).

Mhamdi R., Laguerre G., Aouani M.E., Mars M., Amarger N., 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia cannodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils, FEMS Microbiol.Ecol. 41, 77–84.

Michiels, J., Verreth, C. and Vanderleyden, J., 1994.Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1206-1212.

Minja E.M., 2001. Yield losses due to field pests and integrated pest management strategies for pigeonpea a synthesis: In, Silim SN, Mergeai G, Kimani PM (ed). *Status and potential of pigeonpea in East and southern Africa :Proceedings of a regional workshop*, 12-15 Sep, 2000, Nairobi, Kenya. B-5030 Gembloux, Belgium: Gembloux Agricultural University, and Pantecheru, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the semi-Arid Tropics.

Mohammadi K , Sohrabi Y, Heidari G, Khalesro S and Majidi M-2012- Effective factors on biological nitrogen fixation. African Journal of Agricultural Research Vol. 7(12), pp. 1782-1788.

Moreda R., 2015.Identification de micro-organismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry).

Morón B, Eugenia Soria-Díaz M, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro D N., Gil-Serrano A, Thomas-Oates J, MegíasM,and SousaC., 2005.Low pH Changes the Profile of Nodulation Factors Produced by *Rhizobium tropici* CIAT899.Chemistry & Biology, Vol. 12, 1029–1040,

Moschetti G, Peluso A.L, Protopapa A, Anastasio M, Pepe O, Defez R., 2005.Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16SrDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*.*Syst. Appl. Microbiol.* 28: 619-631.

- Mullis K., Faloona f., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H ., 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *ColdSpring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1986, **51 Pt 1**, 263-273.
- Nehra, K., Yadav, A.S., Sehrawat, A. and Vashishat, R.K., 2007.** Characterization of heat resistant mutant strains of *Rhizobium* sp. (*Cajanus*) for growth, survival and symbiotic properties. *Indian J. Microbiol.*, 47: 329-335.
- Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi, S., et 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.
- Nocker A., Burr M., Camper A., 2007.** Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol.*, **54**, 276-289.
- Noel K.D., 2009.** Bacteria Rhizobia. Encyclopedia of microbiology, SCHAECHTER M. San Diego. Marquette University, Milwaukee, WI, USA, **3**, 877-893.
- Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Beck D., Effosse A., Fernandez M.P., 1994.** Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.*, 44, 345-354.
- Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Normand P., Fernandez M.P., 1995.** Genotypic heterogeneity of strains nodulating Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium Mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 640-648.
- Normand P, Ponsoet C, Nesme X., Neyra M. & Simonet P., 1996.** ITS analysis of prokaryotes. *Mol. Microbial. Ecol. Manual.*, **3**, 1-12.
- Obbard J.P, Jones K.C., 2001.** Measurement of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plants grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge. *Environ Pollut.* 111: 311-320.
- Ollivier J, We ST, Bannert A, Hai B, Kastl EM, Meyer A, Su MX, Kleineidam K Schloter M., 2011.** Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiology Ecology* . **78**: 3–16.
- Olsen G.J., Woese C.R, et Overbee R., 1994.** The winds of (evolutionary) changes : breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176** : 1–6.
- Ormino-Orrillo E, Torres R, Mayo J, Rivas R, Peix A, velazquez E, Zunoga D., 2007.** *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. In: Velazquez E, Rodriguez-Brucco C (Eds) *Developments in Plant and soil Science*, Springer-Verlag, The Netherlands, pp 243-247.

- Patel J.J, Craig A.S & Chandra P., 1985.** Characterisation of bacteriophages virulent to field isolates of *Rhizobium trifolii*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1985. Vol. 28: 283-288 .
- Patriarca EJ, Tatér, Ferraili S et Iaccarino M., 2004.** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* 234:201-262.
- Pelmont J., 1995.** Bactérie et environnement : adaptation physiologique. Vol 2. Office des Publications Universitaires, 897 p.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E., 2009.** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, **9**: 1132–1147.
- Perez-Galdonat R and. Kahn M.L., 1994.** Effects of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, Washington **991 64-6340**, USA.
- Pereira Alexandre A.I ., 2010.** Temperature stress tolerance in chickpea rhizobia. Universidade de Évora.
- Peron H., 2006.** Production légumineuse, 2ème édition Lavoisier, 389P.
- Philippot L., Spor A., Hénault C., Bru D., Bizouard F., Jones C. M., et al., 2013.** Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J.* 7 1609–1619. 10.1038/ismej.2013.34
- Pinto P.P, Raposeiras R, Macedo A.M, Seldin L, Paiva E., Sá N.M.H ., 1998.** Effects of high temperature on survival, symbiotic performance AND genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains.
- Philippot L., Hallin S., Schloter M., 2007.** Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Adv. Agron.* 96 249–305. 10.1016/S0065-2113(07)96003-4.
- Prakken R., 1934.** Inheritance of colours and pod characters in *Phaseolus vulgaris* L. *Genetica.* 16: 177-294.
- Prosper I. Massawe, Mtei K.M, Linus K. Munishi & Ndakidemi P.A., 2016.** Improving Soil Fertility and Crops Yield through Maize-Legumes (*Common bean* and *Dolichos lablab*) Intercropping Systems. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 8, No. 12 ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760.
- Purseglove J. W., 1984.** Tropical Crops Dicotyledons. the 3rd impression. Longman Group Ltd. England.
- Rasolomampianina R, Bailly X, Fetiarison R, Rabevohitra R, Bena G, Ramaroson L, Raherimandimby M, Moulin L, De Lajudie P, Dreyfus B, Avarre J.C., 2005.** Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. *Mol. Ecol.* 14:4135–4146.

- Raven L, Evert R.F, Eichlorn S.E.,2000.**Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris
- Raza S., Jùrnsgard B., Abou-Taleb H., and Christiansen J. L., 2001.**Tolerance of *Bradyrhizobium sp. (Lupini)* strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics Letters in Applied Microbiology.pp. 32; 379-383.
- Redondo, F. J., de la Peña, T. C., Morcillo, C. N., Lucas, M. M., and Pueyo, J. J., 2009.**Overexpression of flavodoxin in bacteroids induces changes in antioxidant metabolism leading to delayed senescence and starch accumulation in alfalfa root nodules. *J. Plant Physiol.* 149, 1166–1178.
- Reeve W.G, Ardley J, Tian R, Eshragi1 L,Yoon J.W, Pinyaruk Ngamwisetkun, Seshadri R, Ivanova N.N and Kyrpides N.C .,2015.** A Genomic Encyclopedia of the Root Nodule Bacteria: assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey.
- Reeve, W. G., L. Brau, J. Castelli, G. Garau, C. Sohlenkamp, O. Geiger, M. J. Dilworth, A. R. Glenn, J. G. Howieson & R. P. Tiwaril., 2006.**The *Sinorhizobium medicae* WSM419 IpiA gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions. *Microbiology-Sgm* 152: 3049-3059.
- Resendis-Antonio O, Reed J.L, Encarnación S, Collado-Vides J, Palsson BØ.,2007.***Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in Rhizobium etli.*PLoS Comput Biol. 3: 1887-1895.
- Riah N., 2014.** Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien.
- Robledo M., Jime J. I,´ Nez-Zurdo E, Velazquez M. E. Trujillo, Zurdo-Pin~ eiro J. L.,, Ramírez-Bahena M. H, Ramos B. J, Díaz-Mínguez M. F, Dazzo E. Martínez M, and Mateos P. F., 2007.**Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots.
- Roger P., Dommergues Y., Balandreau J., Dreyfus B.& SOUGOUFARA B., 1996.** Résumé et introduction. In : ROGER P., DOMMERGUES Y., BALANDREAU J., DREYFUS B. & SOUGOUFARA B., eds. *La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement ? Compte rendu de conférence-débat de l'ORSTOM, 30 Mai, 1996, Paris. 2-7.*
- Rosenstein R, Peschel A, Wielnd B, Gttz F .,1992.** Expression and Regulation of the Antimonite, Arsenite, and Arsenate Resistance Operon of Staphylococcus xylosus Plasmid pSX267J urnal of Bacteriology, June 1992, p. 3676-3683 Vol. 174, No. 11
- Sadowsky, M.J., Keyser, H.H. and Bohlool, B.B., 1983.**Biochemical characterization of fast and slow growing rhizobia that nodulate soybean.*Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 716-722.

Sánchez-Juanes F, Ferreira L, Alonso de la Vega P, Valverde A, Barrios ML, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, González-Buitrago JM, Trujillo ME, Velázquez E., 2013. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of Bradyrhizobium species: application to the identification of Lupinus nodulating strains. *Syst Appl Microbiol* 36:565–571. doi:10.1016/j.syapm.2013.09.003

Santo J.O, Araujo A.S.F, Gomes R.L.F, Lopes A.CA, Figueiredo M.V.B., 2008. - Rhizobia-*Phaseolus lunatus* symbiosis: importance and diversity in tropical soil: Dynamic soil, *Dynamic plant* 2: 56-60.

Salt D. E. Blaylock M, Kumar N. P.B.A. , Dushenkov V, Ensley B. D., Chet I & Raskin I, 1995- Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants .*Nature Biotechnology* 13, 468 - 474.

Sauer S, Kliem M ., 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8: 74–82.

Schleifer, K.H., et Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36** : 407–477.

Schimmel J. P., Schaeffer S. M., 2012. Microbial control over carbon cycling in soil. *Front. Microbiol.* 3:348 10.3389/fmicb.2012.00348

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:543–551. doi: 10.1086/600885.

Sharma P.K, Kundu B.S, Dogra R.C., 1993. Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. *Biotech. Adv.*, **11**, 741-779.

Sheirdil, R. A., Bashir, K., Hayat, R., and Akhtar, M. S., 2012. Effect of cadmium on soybean (*Glycine max* L.) growth and nitrogen fixation. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 1886–1891.

Silver S.K, Budd K, Leahy M., Shaw W. V, Hammond D, Novick R. P, Willsky G. R, M. Malamy H.S, Rosenberg H., 1981. Inducible Plasmid-Determined Resistance to Arsenate, Arsenite, and Antimony(III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, June 1981, p. 983-996.

Simon Z, Mite K, Gessesse A, Ndakidemi P.A., 2014. Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Rhizobia from Cultivated and Uncultivated Soils of Northern Tanzania. *American Journal of Plant Sciences*, **5**, 4050-4067.

Simms E, Taylor D., 2002. Paterner choice in nitrogen fixation mutualisms of legumes and rhizobial. *Boil.* 42: 369-380.

- Smartt J., 2008.** Evolution of Grain Legumes. IV. Pulses in the Genus *Phaseolus*. Volume 21, Issue 3pp. 193-207. *Phaseolus lunatus* Symbiosis: Importance Diversity in Tropical Soil
- Smith S.R., 1997.** *Rhizobium* in soils contaminated with copper and zinc following the long-term application of sewage sludge and other organic wastes. *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 29, Issues 9-10 Pages 1475-1489.
- Singh B.K, Kaur, R. and Singh, K., 2008.** Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek). *Afri. J. Biotechnol.* 7(20): 3671-3676.
- Singh B. K., Bardgett R. D., Smith P., Reay D. S., 2010.** Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 779–790. 10.1038/nrmicro2439.
- So, R.B., Ladha, J.K., et Young, J.P.W., 1994.** Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(3) : 392–403.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994.** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin.
- Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J., 1998.** The Rhizobiaceae, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sprent JI., 2008.** 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J. Exp. Bot.* 59: 1081-1084.
- Sprent J.I., 1995.** Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem* 27: 401-407.
- Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J et May GD., 2006.** Genetic and functional genomic of legume nodulation. *Curr Opin PlantBiol.* 9:110-121.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper H.G, Vauterin L, Ward A.C, Whitman WB., 2002.** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002 May;52(Pt 3):1043-7.
- Stackebrandt, E., et Goebel, B.M., 1994.** Taxonomic note: A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4) : 846–849.
- Struffi P, Corich V, Giacomini A, Benguedouar A, Squartini A, Casella S, Nuti M.P., 1998.** Metabolic properties, stress tolerance and molecular profiles of *Rhizobium* nodding *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 81-89.
- Suzuki, K., Goodfellow, M., et O'Donnell, A.G., 1993.** Cell envelopes and classification. Handbook of new bacterial systematics. *Sous la direction de* : M. Goodfellow et A.G. O'Donnell. Academic Press, Ltd., London. pp. 195–250.

Taté R, Riccio A, Caputo E, Iaccarino M, and Patriarca E J., 1998.The *Rhizobium etli* metZ Gene Is Essential for Methionine Biosynthesis and Nodulation of *Phaseolus vulgaris* International Institute of Genetics and Biophysics, CNR, via Marconi 10, 80125 Naples, Italy

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.

Terefework Z., 2002.Diversity and phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. In *microbiology*. Academic dissertation eds., University of Helsinki, pp.1239-9469.

Tiwari R. P. R., Dilworth M. J. and Glenn A. R., 1998.Can. J. Microbiol. pp.44 (6); 582-587

Vaishali A. Pawar, Pooja R. Pawar, Asshok M. Bhosale and Sourabh V.Chavan., 2014.Effect of Rhizobium on seed germination and growth of plants.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiology Research. **60**:407–438.

Van De Peer Y., Chapelle S, De Wachter R., 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *NucleicAcids Res*, **24**, 3381-3391.

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

Verine T., 2008. Analyse fonctionnelle d'EFD, Un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat. Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, 263 p.

Wayne L.G, Brenner D.J, Colwell R.R, Grimont P.A.D, Kandler O, Krichevsky M.I, Moore L.H, Moore W.E.C, Murray R.G.E, Stackebrandt E., Starr M.P, et Truper H.G .,1987.Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. **37**(4) : 463–464.

Walker M.V., 2010.Impact de l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays* L.L'université Claude Bernard Lyon 1. Ecole doctorale évolution, écosystème microbiologie modélisation.

Wang F.Q, Wang E.T, Zhang Y.F, et Chen W.X., 2006. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. In comparison with microsymbiont of *Acacia* spp. And *Leucaena leucocephala* grown in china. Syst. Appl. Microbiol. **29**: 502-517.

Wei G.H, Zhang Z.X, Chen W.M et Ju W.T., 2008. Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. *Microbiol. Research*. 163: 651-662.

Weisburg WG¹, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ.,1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991 Jan;173(2):697-703.

Werner, D.; Newton W.E., 2005. editors. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. The Netherlands: Springer, Dordrecht. p. 347.

Wallenstein M. D., Myrold D. D., Firestone M., Voytek M.,2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecol. Appl*. 16:2143–2152. 10.1890/1051-0761(2006)016[2143:ECODCA]2.0.CO;2

Wong E ., 1973. Plant phenolics. *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, vol 1 London: Academic Press:265-322.

Wong M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, Volume 50, Issue 6, Pages 775-780.

Woolley J, Davis JHC., 1991. The agronomy of intercropping with beans schoonhoven, A van;Voyses, O (ed.). *Common beans: Research for crop improvement*. Melksham, Wiltshire, UK:Redwood Press Ltd. p.707-735.

Woese C. R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.*, **512**, 221-71.

Xavery, P., Kalyebara, R., Kasambala, S., & Ngulu, F-2006- The Impact of Improved Bean Production Technologies in Northern and North Western Tanzania. *Occasional Publication Series No. 43* (p. 89). Pan African Bean Research Alliance, CIAT Africa Region, Kampala, Uganda.

Yadav A. S. and Nehra K-2013- Selection/ Isolation of High Temperature Tolerant Strains of *Rhizobium* for Management of High Temperature Stress on *Rhizobium*- Legume Symbiosis.

Yadegari M, Rahmani HA, Noormohammadi G, Ayneband A.,2008. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. 1;11(15):1935-9.

Yang C.Y, Yang J.K, Li Y.G, Zhou J.C-2008- Genetic diversity of root Nodulating bacteria isolated from pea (*Pisum sativum*) in subtropical regions of china. *Sci china ser. C.Life Sci*. 51, 854-862.

Yann P., 2006. Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium* légumineuses. Master Recherche. Microorganisme du génome aux interactions avec l'hôte. Université de Paul Sabatier. Toulouse III.

Yeo A, R., Yeo M, E., Flowers T.J., 1990. Screening of rice (*Oryza sativa L.*) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance, theoretical and applied genetics 79, 377-384.

Yoon KP, Silver S., 1991. A second gene in the *Staphylococcus aureus* cadA cadmium resistance determinant of plasmid pI258. Bacteriol. Dec; 173(23):7636-42.

Zahran, H. H., 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:968-989.

Zakhia F et de Lajudie P., 2006. La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques - application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). Laboratoire des symbioses tropicales et Méditerranéennes (L.S.T.M.), Unité mixte de recherche (UMR) 113, Institut de recherche pour le développement (IRD).

Zhang, X., Nick, G., Kaijalainen, S., Terefework, Z., Paulin, L., Tighe, S.W., Graham, P.H., et Lindström, K., 1999. Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in Sichuan. Syst. Appl. Microbiol. 22 : 378–386

Ziegler D, Mariotti A, Pfluger V, Saad M, Vogel G, Tonolla M, Perret X., 2012. In situ identification of plant-invasive bacteria with MALDITOF mass spectrometry. PLoS ONE 7:e37189. doi:10.1371/journal.pone.0037189.

Ziegler D, Pothier J.F, Ardley J R .K Fossou , Pflüger V de Meyer S ,Vogel G, Tonolla M, Howieson J, Reeve W, Perret X., 2015. Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification by MALDI-TOF MS. Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-015-6515-3

Zou N, Dort P.J, Marcar N.E., 1995. Interaction of salinity and rhizobial strains on growth and nitrogen fixation by *Acacia ampliceps*. Soil Biol. Biochem 27: 409-413.

www.ncbi.nlm.nih.gov

ANNEXEX

Annexe 1

Fiche technique : La coloration de Gram

L'examen microscopique a une importance majeure lors de la purification, car une lame homogène, suppose une bonne purification des isolats.

Préparer des frottis à partir des cultures sur YMA, puis colorées selon les étapes suivantes :

- recouvrir la lame de violet de Gentiane, laisser agir 1min,
- chasser le violet de Gentiane par la solution de Lugol, recouvrir la lame de solution de Lugol et laisser agir 30 secondes,
- incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool-acétone.
- rincer à l'eau distillée courante,
- Couvrir la lame d'une solution de Fushine pendant 1 min.
- Laver à l'eau, sécher la lame et observer au microscope à immersion à l'objectif X100.

Annexe - 2

Milieux de Culture

<u>Yeast-Mannitol-Agar (YMA) (Vincent, 1970)</u>	(g/l)
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	1 0
Extrait de levure	0.4
Agar	1 5
Eau distillée	1000 ml

pH : 6.9

Yeast-Mannitol-Broth : Milieu YMA sans Agar

Yeast-Mannitol-Agar + Rouge Congo : Avant de stériliser le milieu on rajoute 10ml d'une solution aqueuse de Rouge Congo à 0.25%.

<u>Milieu au Mannitol-Calcium Glycérophosphate(Hofer, 1941)</u>	(g/l)
KNO ₃	5
NaCl	3.8
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.0
KCl	0.16
MgSO ₄ .7H ₂	0.6
Ca-Glycérophosphate	0.8
Mannitol	2 0

<u>Tryptone-Yeast-Agar (TY) (Beringer, 1974)</u>	(g/l)
Tryptone	10
Extrait de levure	3
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.1
Eau distillée	1000 ml

pH : 6.8

Milieu Minimum BIII(Dazzo, 1984) (g/l)

K ₂ HPO ₄	0.23
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.10
Glutamate de Na	1.10
Solution - stock de vitamines *	1ml

Solution - stock d'oligoéléments ** 1ml

*Solution-stock de vitamines (mg/l dans tampon Na₂HPO₄, 0.05M, pH 7.0)

Riboflavine	20
Acide .p-aminobenzoïque	20
Acide Nicotinique	20
Biotine	20
Thiamine-HCl	20
Pyridoxine-HCl	20
Panthotenate de Ca	20
Inositol	120

*Solution – stock d'oligoéléments (g/l)

CaCl ₂	5
H ₃ BO ₃	0.145
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.125
CoSO ₄ .7H ₂ O	0.070
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.005
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.0043
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.108
Na ₂ MoO ₄	0.125
Nitril triacetate	1.000

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

Observation: Le stock-vitamines est stérilisé par filtration (0.22µm) et le stock-oligoéléments par autoclavage).

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

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

*Solution-stock de vitamines (100mg/l)

Acide Nicotinique

Biotine

Thiamine-HCl

Panthotenate de Ca

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

H ₃ BO ₃	50
FeSO ₄ .7H ₂ O	350
CuSO ₄ .5H ₂ O	8
MnSO ₄ .4H ₂ O	40
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.108
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	50
CoCl ₂ .6H ₂ O	50

pH 6.8

Annexe -3

Solutions nutritives

<u>Solution McKnight</u> : Solution des macroéléments	(g/l)
CaSO ₄	24
MgSO ₄ .7H ₂ O	4
KH ₂ PO ₄	4
KCl	4
FeCl ₃	0.20
Eau distillée	1000ml
Stock-microéléments *	1ml

pH : 6.8-7.0

*Stock- microéléments	(g/l)
MnSO ₄ .H ₂ O	1.54
H ₃ BO ₃	2.80
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
MnCl ₂ .4H ₂ O	2.49
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08
NaMoO ₂ .H ₂ O	0.021
CoSO ₄ .7H ₂ O	0.286
Eau distillée	1000ml

<u>Solution de Fahreus</u> : Macroéléments	(g/l)
CaCl ₂	0.100
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.120
KH ₂ PO ₄	0.100
Na ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.100
Citrate ferrique	0.005
Eau distillée	1000 ml
Stock-microéléments *	1ml

pH 6.8-7.0

*Stock-microéléments	(g/l)
H_3BO_3	2.86
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.03
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.14

Annexe-4

Mesure de la Densité Optique (DO_{λ600})

- Influence des facteurs abiotiques

Mesure de la DO de la croissance des isolats provenant des différents sites à différents Ph

pH \ souche	G1	G3	G4	G5	G6	G10	G11	G13	G15	G16
4	0,263	0,004	0,482	0,475	0,394	0,526	0,231	0,344	0,326	0,244
4,5	0,394	0,019	0,356	0,422	0,498	0,347	0,374	0,369	0,301	0,374
5	0,485	0,658	0,671	0,631	0,547	0,540	0,648	0,522	0,480	0,658
5,5	0,417	0,238	0,563	0,345	0,262	0,376	0,413	0,349	0,428	0,564
5,8	0,314	0,473	0,389	0,405	0,386	0,289	0,447	0,352	0,302	0,316
6,8	0,342	0,052	0,426	0,463	0,444	0,408	0,353	0,368	0,336	0,432
7,8	0,485	0,035	0,417	0,399	0,445	0,393	0,343	0,369	0,334	0,346
8,8	0,617	0,086	0,506	0,471	0,275	0,462	0,487	0,474	0,600	0,268
9,8	0,366	0,042	0,412	0,411	0,422	0,378	0,357	0,361	0,395	0,271
10	0,492	0,097	0,518	0,541	0,555	0,522	0,447	0,54	0,582	0,588
11	0,481	0,031	0,533	0,472	0,461	0,511	0,495	0,504	0,463	0,422

pH \ souche	B3	B4	B5	B6	B8	B10	B12	B15	B19	B21
4	0,031	0,234	0,024	0,635	0,024	0,084	0,061	0,015	0,011	0,021
4,5	0,054	0,304	0,061	0,462	0,042	0,109	0,151	0,037	0,033	0,053
5	0,072	0,311	0,098	0,363	0,096	0,131	0,184	0,059	0,059	0,088
5,5	0,201	0,351	0,136	0,325	0,185	0,296	0,381	0,187	0,094	0,123
5,8	0,283	0,605	0,158	0,296	0,231	0,343	0,402	0,227	0,135	0,164
6,8	0,408	0,231	0,023	0,267	0,114	0,044	0,071	0,064	0,008	0,044
7,8	0,432	0,463	0,384	0,485	0,209	0,445	0,375	0,387	0,154	0,153
8,8	0,162	0,442	0,297	0,434	0,281	0,405	0,298	0,369	0,512	0,254
9,8	0,106	0,445	0,26	0,346	0,254	0,382	0,228	0,301	0,158	0,131
10	0,073	0,296	0,231	0,281	0,105	0,235	0,141	0,172	0,113	0,067
11	0,058	0,494	0,056	0,549	0,056	0,021	0,044	0,048	0,019	0,081

pH \ souche	S1	S2	S3	S5	S7	S8	S9	S11	S13	S14
4	0,012	0,005	0,015	0,018	0,288	0,003	0,003	0,007	0,017	0,007
4,5	0,028	0,178	0,081	0,041	0,324	0,105	0,009	0,018	0,245	0,087
5	0,069	0,199	0,186	0,093	0,418	0,212	0,021	0,033	0,221	0,121
5,5	0,095	0,252	0,253	0,135	0,453	0,262	0,125	0,068	0,325	0,251
5,8	0,124	0,284	0,292	0,188	0,531	0,551	0,154	0,126	0,384	0,281
6,8	0,029	0,035	0,009	0,004	0,346	0,074	0,0152	0,136	0,087	0,123
7,8	0,211	0,322	0,319	0,301	0,53	0,302	0,201	0,363	0,418	0,322
8,8	0,121	0,183	0,149	0,177	0,376	0,215	0,102	0,159	0,283	0,305
9,8	0,029	0,112	0,021	0,097	0,389	0,202	0,098	0,015	0,457	0,026
10	0,034	0,085	0,056	0,149	0,471	0,142	0,112	0,182	0,146	0,122
11	0,112	0,094	0,071	0,133	0,452	0,241	0,148	0,013	0,079	0,038

pH \ souche	Z1	Z2	Z4	Z6	Z8	Z10	Z12	Z14	Z16	Z17
4	0,004	0,065	0,379	0,004	0,006	0,085	0,006	0,514	0,524	0,524
4,5	0,287	0,095	0,555	0,098	0,064	0,132	0,012	0,577	0,591	0,562
5	0,506	0,132	0,593	0,309	0,441	0,472	0,308	0,624	0,613	0,585
5,5	0,664	0,392	0,601	0,424	0,683	0,638	0,491	0,648	0,646	0,601
5,8	0,589	0,449	0,705	0,472	0,427	0,365	0,407	0,675	0,646	0,665
6,8	0,455	0,373	0,906	0,497	0,397	0,319	0,401	0,951	0,668	0,589
7,8	0,422	0,203	0,886	0,78	0,225	0,302	0,243	0,735	0,554	0,495
8,8	0,284	0,146	0,854	0,258	0,162	0,284	0,154	0,657	0,521	0,424
9,8	0,175	0,121	0,58	0,14	0,131	0,211	0,104	0,477	0,494	0,164
10	0,141	0,102	0,445	0,121	0,104	0,105	0,081	0,423	0,413	0,128
11	0,103	0,062	0,383	0,091	0,061	0,087	0,006	0,386	0,345	0,062

pH \ souche	T1	T3	T5	T7	T8	T10	T13	T15	T16	T18
4	0,011	0,59	0,482	0,015	0,009	0,014	0,006	0,016	0,485	0,002
4,5	0,025	0,425	0,575	0,054	0,017	0,325	0,091	0,045	0,533	0,015
5	0,081	0,531	0,542	0,148	0,166	0,367	0,158	0,081	0,565	0,229
5,5	0,303	0,504	0,574	0,335	0,423	0,406	0,197	0,112	0,598	0,475
5,8	0,370	0,532	0,623	0,358	0,486	0,459	0,369	0,161	0,601	0,384
6,8	0,638	0,596	0,566	0,574	0,695	0,584	0,395	0,209	0,621	0,355
7,8	0,460	0,626	0,533	0,493	0,606	0,612	0,204	0,206	0,642	0,322
8,8	0,363	0,862	0,782	0,402	0,503	0,438	0,105	0,309	0,689	0,202
9,8	0,333	0,43	0,505	0,251	0,356	0,285	0,083	0,206	0,442	0,191
10	0,319	0,201	0,439	0,114	0,282	0,256	0,052	0,025	0,358	0,152
11	0,006	0,015	0,279	0,072	0,104	0,156	0,008	0,005	0,125	0,064

Mesure de la DO de la croissance des isolats des différents sites à différentes concentration de NaCl

<small>souche</small> Nacl	T1	T3	T5	T7	T8	T10	T13	T15	T16	T18	A6	Mez
20mM	0.210	0.255	0.226	0.240	0.214	0.251	0.321	0.339	0.295	0.251	0.228	0.533
40mM	0.183	0.214	0.197	0.210	0.186	0.214	0.218	0.224	0.226	0.212	0.203	0.311
200mM	0.087	0.098	0.092	0.095	0.089	0.096	0.099	0.112	0.108	0.117	0.096	0.174
400mM	0.028	0.021	0.026	0.026	0.018	0.024	0.024	0.024	0.24	0.018	0.053	0.051
1M	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00	0.00	0.001	0.000

<small>souche</small> Nacl	B3	B4	B5	B6	B8	B10	B12	B15	B19	B21	A6	Mez
20mM	0.375	0.356	0.223	0.395	0.176	0.301	0.336	0.240	0.031	0.025	0.228	0.533
40mM	0.340	0.307	0.009	0.375	0.016	0.349	0.316	0.017	0.015	0.032	0.203	0.311
200mM	0.011	0.014	0.017	0.008	0.008	0.006	0.019	0.003	0.003	0.014	0.096	1.174
400mM	0.004	0.010	0.005	0.000	0.006	0.001	0.000	0.000	0.000	0.010	0.053	0.051
1M	0.000	0.000	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

<small>souche</small> Nacl	Z1	Z2	Z4	Z6	Z8	Z10	Z12	Z14	Z16	Z17	A6	Mez
20mM	0.849	0.801	0.777	0.844	0.208	0.140	0.006	0.012	0.754	0.680	0.228	0.533
40mM	0.716	0.783	0.859	0.811	0.770	0.246	0.014	0.005	0.837	0.701	0.203	0.311
200mM	0.053	0.077	0.038	0.053	0.061	0.045	0.018	0.062	0.021	0.190	0.096	1.174
400mM	0.024	0.030	0.027	0.033	0.032	0.029	0.014	0.042	0.015	0.039	0.053	0.051
1M	0.006	00	0.009	0.011	0.013	0.012	0.002	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

<small>souche</small> Nacl	S1	S2	S3	S5	S7	S8	S9	S11	S13	S14	A6	Mez
20mM	0.849	0.771	0.792	0.825	0.816	0.012	0.017	0.795	0.811	0.422	0.228	0.533
40mM	0.701	0.672	0.755	0.627	0.621	0.004	0.010	0.583	0.611	0.048	0.203	0.311
200mM	0.024	0.021	0.018	0.048	0.015	0.002	0.009	0.023	0.027	0.021	0.096	0.174
400mM	0.011	0.020	0.08	0.060	0.015	0.000	0.001	0.015	0.017	0.021	0.053	0.051
1M	0.005	0.007	0.001	0.003	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.001	0.000

<small>souche</small> Nacl	G1	G3	G4	G5	G6	G10	G11	G13	G15	G16	A6	Mez
20mM	0.644	0.522	0.827	0.548	0.467	0.901	0.439	0.934	0.831	0.536	0.228	0.533
40mM	0.274	0.277	0.702	0.247	0.230	0.599	0.214	0.824	0.803	0.075	0.203	0.311
200mM	0.012	0.104	0.346	0.029	0.033	0.374	0.021	0.358	0.402	0.039	0.096	0.174
400mM	0.004	0.000	0.244	0.006	0.031	0.239	0.017	0.014	0.030	0.011	0.053	0.051
1M	0.000	0.000	0.044	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.005	0.001	0.001	0.000

- Source d'azote (Acides aminés)

Acides- Aminés \ souche	B3	B4	B5	B6	B8	B10	B12	B15	B19	B21	A6	Mez
Sans A-A	0,095	0,125	0,095	0,061	0,034	0,248	0,085	0,111	0,053	0,050	0.205	0.351
Leucine	0,025	0,048	0,025	0,018	0,032	0,021	0,042	0,021	0,025	0,085	0.246	0.588
Serine	0,224	0,228	0,294	0,282	0,238	0,084	0,452	0,301	0,246	0,236	0.265	0.425
Proline	0,026	0,026	0,102	0,132	0,102	0,048	0,136	0,195	0,028	0,121	0.523	0.587
Cystéine	0,324	0,126	0,394	0,416	0,404	0,083	0,325	0,315	0,304	0,416	0.448	0.598
Alanine	0,266	0,172	0,366	0,228	0,228	0,096	0,336	0,175	0,218	0,226	0.334	0.577
Lysine	0,147	0,074	0,085	0,88	0,109	0,109	0,102	0,028	0,088	0,058	0.276	0.345
Méthionine	0,062	0,065	0,248	0,096	0,235	0,085	0,111	0,045	0,038	0,059	0.102	0.423
Isoleucine	0,012	0,021	0,019	0,015	0,016	0,018	0,019	0,09	0,018	0,015	0.557	0.572
Asparagine	0,054	0,028	0,036	0,052	0,084	0,014	0,056	0,049	0,040	0,049	0.635	0.771
Acide-glut	0,032	0,026	0,025	0,041	0,029	0,022	0,023	0,039	0,035	0,028	0.263	0.633
Tyrosine	0,578	0,572	0,638	0,362	0,265	0,689	0,346	0,668	0,666	0,656	0.376	0.457
Histidine	0,351	0,715	0,922	0,232	0,978	0,418	0,891	0,701	0,985	0,998	0.741	0.650
Phényle-ala	0,163	0,474	0,183	0,136	0,124	0,120	0,108	0,183	0,108	0,125	0.205	0.682
Thréonine	0,078	0,011	0,015	0,021	0,019	0,301	0,028	0,012	0,022	0,031	0.103	0.346
Glycine	0,008	0,009	0,008	0,045	0,008	0,021	0,008	0,009	0,009	0,007	0.272	0.665
Tryptophane	0,144	0,242	0,187	0,111	0,143	0,176	0,105	0,204	0,135	0,163	0.165	0.323

Acides- Aminés \ souche	G1	G3	G4	G5	G6	G10	G11	G13	G15	G16	A6	Mez
Sans A-A	0,053	0,063	0,071	0,056	0,064	0,042	0,051	0,051	0,055	0,052	0.205	0.351
Leucine	0,201	0,053	0,045	0,022	0,074	0,097	0,156	0,067	0,111	0,112	0.246	0.588
Serine	0,287	0,169	0,262	0,251	0,295	0,256	0,292	0,272	0,287	0,245	0.265	0.425
Proline	0,290	0,218	0,226	0,248	0,491	0,227	0,329	0,244	0,885	0,581	0.523	0.587
Cystéine	0,333	0,061	0,162	0,181	0,149	0,142	0,162	0,131	0,136	0,104	0.448	0.598
Alanine	0,153	0,228	0,203	0,148	0,506	0,245	0,271	0,301	0,341	0,295	0.334	0.577
Lysine	0,058	0,023	0,036	0,031	0,058	0,035	0,062	0,049	0,042	0,037	0.276	0.345
Méthionine	0,069	0,087	0,046	0,058	0,031	0,053	0,067	0,058	0,059	0,071	0.102	0.423
Isoleucine	0,062	0,035	0,063	0,049	0,036	0,041	0,034	0,044	0,037	0,053	0.557	0.572
Asparagine	0,301	0,275	0,322	0,259	0,294	0,241	0,361	0,222	0,292	0,403	0.635	0.771
Acide-glut	0,039	0,009	0,008	0,009	0,005	0,004	0,007	0,151	0,212	0,102	0.263	0.633
Tyrosine	0,091	0,062	0,075	0,071	0,087	0,085	0,092	0,087	0,158	0,113	0.376	0.457
Histidine	0,247	0,021	0,061	0,037	0,308	0,061	0,338	0,246	0,269	0,225	0.741	0.650
Phényle-ala	0,059	0,021	0,013	0,067	0,049	0,014	0,038	0,051	0,024	0,035	0.205	0.682
Thréonine	0,035	0,008	0,009	0,005	0,054	0,008	0,026	0,009	0,008	0,062	0.103	0.346
Glycine	0,048	0,044	0,038	0,052	0,075	0,089	0,045	0,074	0,062	0,079	0.272	0.665
Tryptophane	0,101	0,061	0,063	0,064	0,098	0,071	0,111	0,442	0,074	0,078	0.165	0.323

Acides- Amines \ souche	Z1	Z2	Z4	Z6	Z8	Z10	Z12	Z14	Z16	Z17	A6	Mez
Sans A-A	0,032	0,043	0,018	0,028	0,028	0,059	0,022	0,018	0,026	0,014	0.205	0.351
Leucine	0,112	0,052	0,044	0,086	0,071	0,498	0,094	0,126	0,082	0,034	0.246	0.588
Serine	0,308	0,328	0,480	0,244	0,280	0,021	0,298	0,724	0,286	0,066	0.265	0.425
Proline	0,154	0,446	0,288	0,248	0,088	0,156	0,138	0,188	0,302	0,169	0.523	0.587
Cystéine	0,434	0,350	0,326	0,320	0,376	0,432	0,138	0,392	0,316	0,086	0.448	0.598
Alanine	0,260	0,318	0,316	0,274	0,314	0,266	0,156	0,272	0,232	0,059	0.334	0.577
Lysine	0,162	0,066	0,214	0,194	0,226	0,266	0,051	0,251	0,122	0,089	0.276	0.345
Méthionine	0,284	0,172	0,314	0,228	0,110	0,218	0,066	0,122	0,145	0,049	0.102	0.423
Isoleucine	0,025	0,022	0,024	0,014	0,032	0,026	0,021	0,024	0,028	0,052	0.557	0.572
Asparagine	0,032	0,032	0,044	0,044	0,048	0,054	0,041	0,054	0,048	0,028	0.635	0.771
Acide-glut	0,008	0,009	0,048	0,007	0,008	0,058	0,006	0,112	0,028	0,045	0.263	0.633
Tyrosine	0,064	0,124	0,122	0,131	0,126	0,078	0,684	0,701	0,676	0,676	0.376	0.457
Histidine	0,166	0,099	0,168	0,122	0,064	0,078	0,046	0,076	0,085	0,069	0.741	0.650
Phényle-ala	0,145	0,259	0,325	0,421	0,401	0,177	0,169	0,265	0,346	0,174	0.205	0.682
Thréonine	0,445	0,388	0,465	0,044	0,041	0,036	0,029	0,038	0,019	0,035	0.103	0.346
Glycine	0,088	0,084	0,074	0,091	0,072	0,077	0,062	0,069	0,046	0,033	0.272	0.665
Tryptophane	0,218	0,111	0,178	0,129	0,169	0,112	0,206	0,168	0,132	0,113	0.165	0.323

Acides- Amines \ souche	T1	T3	T5	T7	T8	T10	T13	T15	T16	T18	A6	Mez
Sans A-A	0,071	0,072	0,064	0,081	0,064	0,091	0,078	0,069	0,059	0,102	0.205	0.351
Leucine	0,009	0,01	0,011	0,008	0,012	0,012	0,015	0,019	0,009	0,075	0.246	0.588
Serine	0,016	0,203	0,175	0,018	0,015	0,029	0,016	0,011	0,012	0,09	0.265	0.425
Proline	0,025	0,388	0,172	0,032	0,022	0,021	0,065	0,031	0,079	0,068	0.523	0.587
Cystéine	0,029	0,185	0,165	0,018	0,029	0,041	0,059	0,029	0,024	0,019	0.448	0.598
Alanine	0,011	0,148	0,025	0,011	0,014	0,015	0,015	0,014	0,019	0,021	0.334	0.577
Lysine	0,015	0,081	0,022	0,011	0,274	0,178	0,019	0,061	0,012	0,014	0.276	0.345
Méthionine	0,268	0,286	0,206	0,665	0,166	0,338	0,215	0,079	0,081	0,116	0.102	0.423
Isoleucine	0,068	0,045	0,032	0,025	0,021	0,022	0,023	0,019	0,026	0,089	0.557	0.572
Asparagine	0,017	0,382	0,464	0,101	0,086	0,079	0,118	0,012	0,049	0,078	0.635	0.771
Acide-glut	0,005	0,009	0,008	0,009	0,004	0,005	0,008	0,007	0,009	0,008	0.263	0.633
Tyrosine	0,009	0,068	0,048	0,051	0,028	0,049	0,019	0,045	0,019	0,039	0.376	0.457
Histidine	0,128	0,058	0,056	0,105	0,052	0,074	0,101	0,042	0,063	0,099	0.741	0.650
Phényle-ala	0,051	0,069	0,048	0,051	0,021	0,058	0,029	0,032	0,030	0,033	0.205	0.682
Thréonine	0,002	0,008	0,009	0,008	0,004	0,007	0,003	0,004	0,006	0,001	0.103	0.346
Glycine	0,006	0,021	0,042	0,009	0,008	0,005	0,038	0,029	0,008	0,012	0.272	0.665
Tryptophane	0,314	0,021	0,012	0,009	0,013	0,018	0,012	0,011	0,014	0,015	0.165	0.323

Acides- Amines / souche	S1	S2	S3	S5	S7	S8	S9	S11	S13	S14	A6	Mez
Sans A-A	0,058	0,091	0,046	0,095	0,071	0,076	0,051	0,069	0,039	0,026	0.205	0.351
Leucine	0,052	0,166	0,159	0,021	0,022	0,012	0,015	0,066	0,028	0,015	0.246	0.588
Serine	0,039	0,087	0,045	0,053	0,175	0,019	0,075	0,081	0,069	0,011	0.265	0.425
Proline	0,575	0,762	0,411	0,034	0,123	0,122	0,017	0,014	0,034	0,071	0.523	0.587
Cystéine	0,021	0,164	0,018	0,021	0,121	0,026	0,031	0,014	0,012	0,013	0.448	0.598
Alanine	0,094	0,114	0,119	0,056	0,216	0,015	0,022	0,038	0,063	0,148	0.334	0.577
Lysine	0,016	0,022	0,024	0,017	0,017	0,062	0,024	0,013	0,038	0,042	0.276	0.345
Méthionine	0,033	0,085	0,066	0,072	0,081	0,053	0,072	0,067	0,094	0,074	0.102	0.423
Isoleucine	0,332	0,757	0,412	0,032	0,033	0,022	0,024	0,822	0,023	0,018	0.557	0.572
Asparagine	0,054	0,084	0,075	0,064	0,313	0,055	0,084	0,093	0,042	0,027	0.635	0.771
Acide-glut	0,005	0,004	0,008	0,009	0,004	0,009	0,008	0,005	0,007	0,004	0.263	0.633
Tyrosine	0,042	0,072	0,042	0,024	0,091	0,086	0,048	0,074	0,211	0,042	0.376	0.457
Histidine	0,019	0,025	0,015	0,033	0,038	0,202	0,017	0,009	0,283	0,014	0.741	0.650
Phényle-ala	0,008	0,022	0,005	0,007	0,028	0,010	0,005	0,028	0,004	0,006	0.205	0.682
Thréonine	0,008	0,059	0,011	0,008	0,018	0,006	0,005	0,054	0,006	0,005	0.103	0.346
Glycine	0,121	0,0128	0,133	0,039	0,121	0,005	0,006	0,042	0,038	0,008	0.272	0.665
Tryptophane	0,044	0,061	0,022	0,062	0,102	0,024	0,066	0,064	0,034	0,026	0.165	0.323

-Source de carbone (Sucres)

Sucres / souche	Z1	Z2	Z4	Z6	Z8	Z10	Z12	Z14	Z16	Z17	A6	Mez
Glucose	0,438	0,484	0,358	0,272	0,320	0,876	0,960	0,530	0,540	0,558	0,785	0,905
Galactose	0,622	0,606	0,484	0,378	0,320	0,368	0,248	0,366	0,340	0,488	0,844	0,811
Fructose	0,690	0,658	0,574	0,536	0,510	0,472	1,040	0,650	0,710	0,656	0,322	0,455
Arabinose	0,620	0,662	0,564	0,532	0,546	0,460	0,330	0,484	0,498	0,492	0,294	0,356
Xylose	1,240	1,440	1,600	1,980	1,240	1,420	1,440	0,216	1,160	1,040	0,501	0,286
Lactose	0,644	0,506	0,578	0,468	0,516	0,532	1,940	0,466	0,488	0,600	0,324	0,401
Sucrose	0,776	0,684	0,682	0,388	0,538	0,624	0,496	0,354	0,612	0,710	0,326	0,422
Maltose	0,556	0,624	0,544	0,49	0,470	0,518	0,780	0,594	0,394	0,416	0,299	0,198
Inositol	0,478	0,334	0,384	0,372	0,422	0,432	1,980	0,388	0,376	0,330	0,568	0,758
Citrate Na	0,200	0,52	0,644	0,476	0,718	0,692	0,480	0,670	0,650	0,700	0,149	0,089
Sorbitol	0,610	0,472	0,512	0,540	0,440	0,556	0,960	0,450	0,466	0,540	0,689	0,555

souche Sucres	G1	G3	G4	G5	G6	G10	G11	G13	G15	G16	A6	Mez
Glucose	1,068	1,304	0,772	1,054	1,256	0,776	1,248	1,754	1,128	1,250	0,785	0,905
Galactose	0,490	1,552	0,758	1,496	1,310	1,360	1,210	1,026	1,490	1,588	0,844	0,811
Fructose	0,009	0,012	0,541	0,009	0,359	0,483	0,562	0,085	0,243	0,174	0,322	0,455
Arabinose	0,016	0,398	0,076	0,368	0,038	0,078	0,042	0,028	0,346	0,024	0,294	0,356
Xylose	0,328	0,381	0,473	0,458	0,463	0,522	0,541	0,588	0,582	0,482	0,501	0,286
Lactose	0,370	0,504	0,512	0,534	0,688	0,570	0,704	0,520	0,648	0,544	0,324	0,401
Sucrose	0,342	0,740	0,720	0,674	0,742	0,540	0,746	0,738	0,676	0,710	0,326	0,422
Maltose	0,018	0,054	0,026	0,088	0,076	0,026	0,026	0,022	0,018	0,142	0,299	0,198
Inositol	0,142	0,234	0,250	0,244	0,274	0,342	0,632	0,248	0,252	0,242	0,568	0,758
Citrate Na	0,270	0,536	0,546	0,636	0,6	0,220	0,232	0,186	0,588	0,638	0,149	0,089
Sorbitol	0,358	0,590	0,518	0,566	0,610	0,154	0,588	0,474	0,474	0,582	0,689	0,555

souche Sucres	T1	T3	T5	T7	T8	T10	T13	T15	T16	T18	A6	Mez
Glucose	1,872	1,134	0,980	1,158	0,844	1,364	0,448	1,086	1,078	1,522	0,785	0,905
Galactose	1,200	1,398	0,516	1,180	0,610	0,620	0,896	1,302	1,346	1,410	0,844	0,811
Fructose	0,520	0,462	0,296	0,430	0,008	0,090	0,076	0,050	0,420	0,448	0,322	0,455
Arabinose	0,360	0,304	0,318	0,404	0,334	0,356	0,322	1,740	0,084	0,478	0,294	0,356
Xylose	0,026	0,311	0,275	0,261	0,264	0,281	0,254	0,301	0,277	0,265	0,501	0,286
Lactose	0,656	0,628	0,608	0,640	0,686	0,476	0,806	0,712	0,690	0,792	0,324	0,401
Sucrose	0,792	0,784	0,710	0,758	0,776	0,568	0,772	0,672	0,628	0,786	0,326	0,422
Maltose	0,316	0,322	0,224	0,320	0,328	0,138	0,334	0,062	0,076	0,082	0,299	0,198
Inositol	0,272	0,244	0,258	0,358	0,360	0,208	0,314	0,214	0,258	0,178	0,568	0,758
Citrate Na	0,630	0,588	0,612	0,598	0,560	0,252	0,620	0,608	0,596	0,630	0,149	0,089
Sorbitol	0,612	0,646	0,644	0,590	0,628	0,478	0,614	0,606	0,600	0,630	0,689	0,555

souche Sucres	S1	S2	S3	S4	S6	S8	S9	S11	S12	S14	A6	Mez
Glucose	1,556	1,486	0,778	0,504	1,548	1,046	1,768	1,588	1,568	1,202	0,785	0,905
Galactose	1,528	1,632	0,599	1,154	1,740	1,350	1,368	1,404	1,412	1,626	0,844	0,811
Fructose	0,006	0,022	0,006	0,009	0,015	0,009	0,028	0,028	0,011	0,09	0,689	0,555
Arabinose	0,114	0,106	0,045	0,012	0,190	0,026	0,036	0,070	0,042	0,070	0,322	0,455
Xylose	0,396	0,121	0,077	0,116	0,058	0,058	0,330	0,332	0,372	0,546	0,568	0,758
Lactose	0,316	0,792	0,405	0,480	0,642	0,478	0,712	0,474	0,548	0,614	0,294	0,356
Sucrose	0,806	0,820	0,342	0,790	0,562	0,728	0,780	0,716	0,704	0,764	0,501	0,286
Maltose	0,286	0,330	0,033	0,014	0,142	0,028	0,110	0,270	0,188	0,062	0,149	0,089
Inositol	0,402	0,334	0,168	0,326	0,364	0,420	0,304	0,244	0,306	0,286	0,299	0,198
Citrate Na	0,644	0,470	0,322	0,494	0,620	0,626	0,592	0,632	0,658	0,628	0,326	0,422
Sorbitol	0,668	0,704	0,278	0,708	0,620	0,626	0,576	0,676	0,712	0,718	0,324	0,401

<i>souche</i> Sucre	B3	B4	B5	B6	B8	B10	B12	B15	B19	B21	A6	Mez
Glucose	0,416	0,072	0,436	0,434	0,550	0,198	0,404	0,424	0,434	0,386	0,785	0,905
Galactose	0,498	0,098	0,440	0,486	0,432	0,018	0,560	0,604	0,548	0,468	0,844	0,811
Fructose	0,307	0,048	0,298	0,278	0,342	0,035	0,333	0,322	0,359	0,308	0,689	0,555
Arabinose	0,668	0,198	0,580	0,644	0,748	0,128	0,718	0,604	0,656	0,072	0,322	0,455
Xylose	0,512	0,220	0,462	0,600	0,572	0,290	0,590	0,590	0,554	0,340	0,294	0,356
Lactose	0,598	0,216	0,596	0,652	0,646	0,164	0,610	0,646	0,666	0,676	0,501	0,286
Sucrose	0,122	0,198	0,226	0,132	0,142	0,184	0,246	0,258	0,554	0,590	0,568	0,758
Maltose	0,538	0,294	0,520	0,532	0,628	0,248	0,550	0,518	0,528	0,700	0,149	0,089
Inositol	0,352	0,232	0,370	0,382	0,158	0,146	0,426	0,258	0,354	0,392	0,299	0,198
Citrate Na	0,564	0,180	0,526	0,550	0,262	0,034	0,610	0,684	0,642	0,598	0,326	0,422
Sorbitol	0,612	0,242	0,606	0,642	0,606	0,344	0,198	0,620	0,748	0,638	0,324	0,401

Titre : Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries nodulant la légumineuse du genre *Phaseolus*

Résumé : L'association symbiotique légumineuses- Rhizobium est un processus naturel et, donne des avantages pour la plante par l'acquisition d'azote et fournit une alternative unique, favorable au point de vue environnemental aux engrais azotés. Le *Phaseolus* est une légumineuse a un grand intérêt économique pour ses valeurs protéiques et glucidiques importants. Des bactéries isolées à partir des nodules de la légumineuse du genre *Phaseolus* avec deux variétés ; *P.vulgaris* et *P.coccineus* sont caractérisés par une étude phénotypique (tests physiologiques, biochimiques et nutritionnels) avec les souches de référence, qui donne une description comparable à celle des *Rhizobium*.

Aussi nos isolats présentent une réaction positive en contacte directe avec les bactériophages ce qui permet de les utiliser comme marqueurs pour l'identification des bacteries.

Un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est effectué en mettant en évidence l'aptitude des isolats à noduler les racines de la plante hôte qui a montré la formation des nodules dont une couleur blanche, ce qui indique que nos isolats sont infectifs et elle (cette formation) confirme la relation symbiotique entre la plante hôte et le micro-symbion qui est une relation spécifique.

Une étude moléculaire est réalisée fait aboutir l'appartenance de l'isolat T8 à l'espèce *Bacillus subtilis* avec une similitude de 98%.

Mot clés : Rhizobium, *Phaseolus*, *P.vulgaris*, *P.coccineus*, micro-symbion, *Bacillus subtilis*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'écologie microbienne, Faculté des sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine.

Directeur de thèse : Mr Y. Benhizia

Devant le jury :

Président :	Kitouni Mahmoud	Prof à Univ. Frères Mentouri Constantine.
Rapporteur :	Benhizia Yacine	Prof à Univ. Frères Mentouri.Constantine .
Examineurs :	Bendjoumana katia	Prof à Univ Abbas laghrour Khenchela .
	Rouag Noureddine	MCA à Univ Ferhat abbes Setif 1.
	Chaib Ghania	MCA à Univ Mentouri Constantine.
	Halis Youcef	MCA à CRSTRA, Biskra.