

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA**

Faculté des Sciences

Département de la nature et de la vie

N° : .....



**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE  
ET DE LA VIE**

**FILIERE : BIOTECHNOLOGIES**

**OPTION : BIOTECHNOLOGIE  
VEGETALE**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par :**

**FEKKANI Fatiha, GUELMINE Khaoula & CHABANI Souad.**

**Intitulé :**

**Caractérisation phénotypique des souches isolées de**  
*Cytisus linifolius*

**Soutenu devant le jury composé de :**

<b>Mr</b> BOUNAR Rabah	Professeur	UMBM	Président
<b>M<sup>me</sup></b> ZOUBIRI Asma	MCB	UMBM	Examinatrice
<b>M<sup>me</sup></b> AHNIA Hadjira	MCB	UMBM	Encadreur

**Année universitaire : 2021 /2022**

## Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH, le tout puissant qui nous a donné, la patience et la santé durant toutes les années de nos études et surtout en accomplissant ce modeste travail.

Tout d'abord, nous tenons à remercier Madame AHNIA Hadjira pour nous avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour sa confiance en nous et ses encouragements mais surtout pour sa générosité dans le travail, qu'elle trouve en ces mots toute notre gratitude.

Nous tenons à adresser l'expression de nos vifs remerciements aux membres du jury :

**Mr** BOUNAR Rabah qui nous a fait l'honneur de présider ce Jury ;

**M<sup>me</sup>** ZOUBIRI Asma qui a bien voulu examiner ce travail.

Nos sincères remerciements à toutes personnes qui nous ont aidés, conseillés, orientés et encouragés tout au long de la genèse de ce mémoire.

## **Dédicaces**

Je dédie ce travail À mes très chers parents, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie, que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, Leur suivis Durant toutes mes années d'études, et aussi pour leurs sacrifices, Leur patience sans limite, leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que Dieu les protège et leur donne le bonheur et la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie. À ma chère sœur **Aicha** ; aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. À mes chères frères **Salah, Cherif, Djilil** et mon petit prince **Amine** ; merci pour vos encouragements permanents. À ma chère adorable copine **Nadjat**. À tous les membres de ma promotion biotechnologie végétale. À tous mes enseignants depuis mes premières années d'études. À tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et m'ont Souhaité du bien de près ou de loin.

**Souad**

## **Dédicaces**

Je dédie ce modeste travail : Aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde, qui sont la lumière de mes yeux et les deux bougies de ma vie et qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études. À mon très cher père qui a toujours été là pour moi et mes frères et sœur, à nous aider et conseiller pour choisir toujours le bon chemin à suivre. À ma noble mère, cette grande et douce amie qui a toujours su garder le sourire et me réconforter même dans les moments les plus difficiles. Que Dieu les garde pour moi en bonne santé et leurs donne une longue vie pour qu'ils assistent à tous mes succès. À mes très chères sœurs : **Loubna** et **Samah** : À mon très cher frère : **Mebark** ; À *Souad* et *fatiha*, mes très chère binôme et amie pour toute sa patience, sa compréhension. À toute la promotion d'Environnement et santé publique

***Khaoula***

## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

- ✚ Mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,
- ✚ Mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,
- ✚ Mes chers frères pour leur appui et leur encouragement,
- ✚ Toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

*fatiha*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

## Introduction

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

#### I. Symbiose rhizobiums-légumineuses

I.1. Légumineuses.....3

1.2. Rhizobia.....4

#### II. Processus de la nodulation.....5

II.1. Pré-infection .....6

II.2. Infection .....6

II.3. Organogenèse.....6

#### III. Facteurs limitant la symbiose rhizobia-légumineuses.....7

III.1. Stress hydrique.....7

III.2. Stress thermique.....7

III.3. Stress salin .....8

## **Chapitre II : Matériels et Méthode**

<b>I. Matériel biologique.....</b>	<b>11</b>
<b>II. Méthodes.....</b>	<b>11</b>
II.1. Caractérisation culturelle des souches.....	11
II.2. Morphologie des bactéries.....	11
II.3. Caractérisation physiologique.....	12
II.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	12
II.3.2. Effet du pH sur la croissance bactérienne.....	13
II.3.3. Effet de NaCl sur la croissance bactérienne.....	13
II.4. Analyse numérique .....	13

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1. Caractérisation culturelle des souches.....	15
III.2. Morphologie des bactéries.....	15
III.3. Caractérisation physiologique.....	16
III.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	16
III.3.2. Effet du pH sur la croissance bactérienne.....	17
III.3.3. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne.....	17
III.4. Analyse numérique des données.....	18

## **Conclusion et perspectives**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Liste de figures

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénique de rhizobia.-----	5
<b>Figure 2</b> : Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais. -----	10
<b>Figure 3</b> : Effet de la température sur la croissance bactérienne. -----	15
<b>Figure 4</b> : Effet du pH sur la croissance bactérienne. -----	16
<b>Figure 5</b> : Effet du NaCl sur la croissance des souches-----	17
<b>Figure 6</b> : Classification Ascendante Hiérarchique des souches sur la base des données -----	18

## **Liste de photos**

- Photo 1:** Aspect des colonnes bactériennes sur milieu YMA. ----- 14
- Photo 2:** Observation microscopique de quelques colonies de souches étudiées à l'état frais 14
- Photo 3:** Observation microscopique d'un frottis de bactérienne. ----- 15

## **Liste de Tableaux**

**Tableaux I** : La moyenne des Do obtenue aux différentes températures.

**Tableau II** : La moyenne des Do obtenue aux différents Ph.

**Tableau III** : La moyenne des Do obtenue aux différents NaCl.

**Tableau VI** : matrice des caractères phénotypiques



# *Introduction*

### Introduction

Les légumineuses forment l'une des familles les plus remarquables du règne végétal. Elles sont des plantes herbacées, des arbustes, des lianes ou des arbres à racines présentant souvent des nodosités traduisant une symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote.

Cette famille occupe une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elle est sur le plan agricole importante et est spontanée ou cultivée dans le monde entier à des fins diverses, notamment la production de nourriture et de fourrage, comme les engrais verts, ou l'assurance du sol pour réduire l'érosion. Cette importance réside surtout dans leur relation symbiotique avec les bactéries du sol appelé rhizobia (Chen et *al.*, 1995).

Les bactéries telle que rhizobium, sont d'une importance considérable en agriculture et en forestières à cause de leur capacité d'établir une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. Ces dernières peuvent jouer un rôle important dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols (Ndoy, 1999).

L'association symbiotique entre rhizobia et légumineuses à bénéfices réciproque fournit pour la bactérie, les ressources carbonées nécessaires à sa croissance, et pour la plante, la fixation d'azote atmosphérique essentielle à son développement (Pellerin, et *al.*, 2014).

En Algérie, plusieurs légumineuses de la *tribu des Genisteae* de différentes régions du pays ont fait l'objet de nombreuses études (Boulila et *al.* 2009 ; Ahnia 2014 ; Bourebaba et *al.*,2016).

Ce document est constitué de trois chapitres :

- Une synthèse bibliographique qui présente des généralités sur les partenaires (rhizobia et légumineuses) et leurs interactions (symbiose rhizobia-légumineuses),
- Chapitre matériel et méthodes.
- Le dernier chapitre comporte les résultats obtenus et leurs discussions.

# **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

## I. Symbiose rhizobium-légumineuses

La symbiose rhizobia-légumineuse est le résultat d'une interaction spécifique entre la plante et la bactérie du sol. Cette interaction commence par une communication entre ces deux partenaires grâce à des signaux moléculaires (Perret et *al.*, 2000). En effet, la bactérie induit chez la légumineuse la formation d'un organe spécialisé sur les racines ou des tiges appelé nodule à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bacteroides capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant en ammoniac (Gibson et *al.*, 2008). Cette relation symbiotique continue à constituer le principal mécanisme biologique d'apport d'azote dans les écosystèmes de production agricole (Boddy et *al.*, 2000)

### I.1. Légumineuses

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobia appartiennent toutes à la famille des fabacées ou légumineuses qui contient environ 20 000 espèces, la plaçant en seconde position après les Poaceae en matière de diversité. Les fabacées présentent une grande diversité. Les fabacées représentent une large famille chez les angiospermes, comprenant plus de 650 genres et 18000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les Poaceae en matière de diversité.

Les Fabacées sont divisées en trois sous-familles : les Mimosoideae, les Caesalpinoideae et les Papilionoïdées. La sous-famille des caesalpinoideae, comprenant environ 150 genres, rassemblant principalement des arbres ou des arbustes retrouvés en région tropicale et subtropicale.

La sous-famille des Mimosoideae rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres.

Enfin, les Papilionoïdées représentent la sous-famille la plus diverse avec environ 430 genres. Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes, mais comprenant aussi des arbres et des arbustes, présents en région tempérée et tropicale (Cheriat, 2016).

- **Genre *Cytisus*** : Le genre *Cytisus* compte, d'après "The Plant List" 67 espèces végétales [dicotylédones](#) appartenant à la famille des Fabacées (sous-famille des *Faboïdées*, tribu des Génistées originaires d'Europe, d'Asie occidentale et d'Afrique du nord (<https://www.quelleestcetteplante.fr/genres.php?genre=Cytisus>)).

- ***Cytisus linifolius*** C'est un Sous-arbrisseau de 20-50 cm, non épineux, très rameux, dressé, à rameaux épais, raides, striés, pubescents, très feuilles. Ces feuilles sont trifoliolées, sessiles, à folioles linéaires oblongues, enroulées par les bords, coriaces, velues-soyeuses en dessous. Cette espèce a des fleurs 3-8 en grappes terminales courtes, ovoïdes, denses, feuillées à la base. Elle a des pédicelles bractéoles, plus longs que le tube du calice. Le calice est velu-soyeux, à lèvres presque égales (<https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-75466-description>).

## I.2. Rhizobia

Ce sont des bactéries Gram-négative, strictement aérobies dont l'oxygène est l'accepteur final des électrons d'une longueur de 1,2 à 3,0  $\mu\text{m}$  et une largeur de 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$ , non sporulant. Contiennent souvent des granules de poly- $\beta$ -hydrox butyrate (PHB), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien 2 à 6 flagelles péritriches (Cheriet, 2016).

Ces bactéries sont nodulatrices de légumineuses, appartenant aux  $\alpha$ -protéobactéries, qui enrichissent le sol en fixant le  $\text{N}_2$  atmosphérique et qui ont donc une grande importance écologique.

Les organismes de cet ordre ne sont pas tous des symbiotes ; certains sont des méthanotrophes, tandis que d'autres sont même pathogènes. Leur application comme bioinoculants en agriculture est suivie depuis des décennies. Ils réduisent les besoins en engrais chimiques azotés et améliorent la productivité des légumineuses dans les champs.

L'inoculation rhizobienne, en plus d'entraîner une nodulation et une fixation d'azote accru, déclenche la production de sidérophores, de phytohormones et de HCN. Il contribue également à la solubilisation du phosphate ainsi qu'à l'absorption de P et de N (Alexander et al, 2017).

La classification actuelle des rhizobia est sur la base des séquences de l'ADNr 16S les bactéries nodulantes les légumineuses actuellement décrite appartient à trois sous-classes phylogénétiques distinctes principales :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -Proteobacteria.

Plus de 98 espèce groupée dans 11 genres appartenant à la sous-classe  $\alpha$ -Proteobacteria et 2 genres appartenant à l'ordre Burkholderiales dans sous-classe  $\beta$ Proteobacteria et finalement, un genre appartenant à l'ordre Pseudomonales dans la sous-classe  $\gamma$ Proteobacteria (figure 1) (Benhizia,2004).

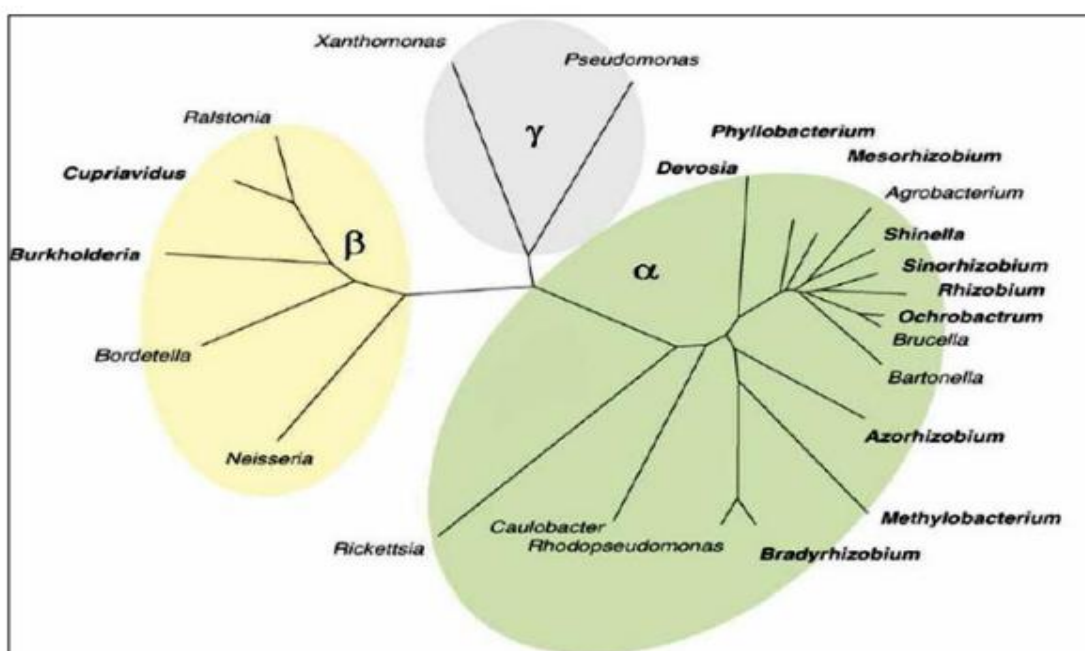


Figure 1 : Arbre phylogénique de rhizobia (Cheriat, 2016).

## II. Processus de nodulation

Les interactions symbiotiques sont caractérisées chez les légumineuses par la formation des nodules racinaires colonisés par des bactéries fixatrices d'azote. L'association symbiotique légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. Elle est essentiellement basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires (Gage, 2004).

## II.1. Pré-infection

Les rhizobiums sont en général présents dans le sol et se multiplient dans la rhizosphère de la plante quand la graine germe. Très tôt ces rhizobiums pénètrent dans la racine de la plante grâce à un mécanisme encore mal connu, soit en traversant les poils absorbant soit en utilisant les blessures dans l'écorce présentes à la base des radicelles. On peut alors distinguer au microscope un cordon d'infection qui circule entre les cellules de l'écorce, puis éclate en libérant les bactéries dans les cellules qui formeront l'ébauche du nodule. Les cellules de la plante hôte se multiplient en entraînant des rhizobiums qui se multiplient également dans chacune des cellules filles. Finalement, la nodosité apparaît comme un organe comportant 5 éléments (FAO, 1992).

## II.2. Infection

Il existe une variabilité dans le type d'infection et dans la morphologie des nodules chez les légumineuses. Les rhizobia sont capables de pénétrer à l'intérieur des légumineuses via deux modes d'infection distincts. Par voie intracellulaire : dans ce cas, l'infection se produit par l'intermédiaire d'un cordon d'infection qui achemine les bactéries du chevelu racinaire vers le cortex et les distribue aux cellules, qui deviennent les cellules infectées du nodule fixateur d'azote. Ce mode est par exemple observé chez le pois, la luzerne ou encore le soja.

Le second mode d'infection est l'infection par voie intercellulaire ou « crack-entry ». Dans ce cas, l'infection se fait généralement au niveau des passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, par des blessures occasionnées par des éléments extérieurs ou parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme. Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection. Il est communément accepté que les facteurs de nodulation sécrétés par les rhizobia soient capables d'initier la formation de nodules sur les plantes hôtes. Or, très récemment, Giraud et al. (2007) ont révisé cette théorie.

## II.3. Organogenèse

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex. Les nodules de type indéterminé sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé 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. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée.

### **III. Facteurs limitant la symbiose rhizobiums – légumineuses**

Plusieurs conditions de l'environnement sont considérées comme étant des facteurs limitant la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote dans la symbiose rhizobiums légumineuses. Le processus de la fixation de N<sub>2</sub> est fortement lié à l'état physiologique de la plante hôte. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce qu'une souche rhizobienne concurrente et persistante exprime sa pleine capacité pour la fixation de l'azote si certains facteurs (salinité, pH, insuffisance nutritive, toxicité minérale, températures, humidité insuffisante ou excessive du sol, métaux et certains antibiotiques...etc.) imposent des limitations à la vigueur de la légumineuse hôte.

#### **III.1. Stress hydrique**

La sécheresse ou la déshydratation est un facteur abiotique majeur qui conduit à la réduction de la production agricole, due au déficit de l'eau. Les réponses des plantes à cet effet seront par des changements cellulaires, métaboliques et moléculaires pour l'adaptation à ce stress. Il exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixée car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige. Le principal résultat de la sécheresse est le déséquilibre métabolique et osmotique de la plante suivit de l'expression de la croissance cellulaire et d'une photosynthèse inadéquate à cause de dioxyde du carbone limité rapidement grâce à la fermeture du stroma.

#### **III.2. Stress thermique**

Le stress thermique induit généralement l'expression de protéines de stress thermique HSP (Heat Shock Proteins), qui assurent la protection des enzymes clés de la physiologie microbienne. L'effet des basses températures sur les rhizobiums est moins rapporté par rapport aux températures élevées. Il a été rapporté que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes nod et donc l'infection et la nodulation. A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité. La température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce.

**III.3. Stress salin** La salinité affecte le processus d'infection (Paye Kapay 2006), le développement et le fonctionnement des nodules (Rao et *al.*, 2002). En première lieu l'activité des nodules est plus sensible au stress salin que la nodulation (Payakapong et *al.*, 2006). La réduction de l'activité de fixation d'azote consiste à :

- Une réduction de la respiration.
- Une déformation de la structure du nodule.
- Une réduction de l'activité photosynthétique.

## *Chapitre II : Matériel et Méthodes*

## I. Matériel biologique

Dans cette étude, nous avons utilisé 03 souches bactériennes endosymbiotes de *C.linifolius*. Ces souches appartiennent à la collection du laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université de Bejaia. Une analyse génotypique, en cours, a permis de les identifier comme appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Trois (03) souches de références ont été également prises à titre comparatif.

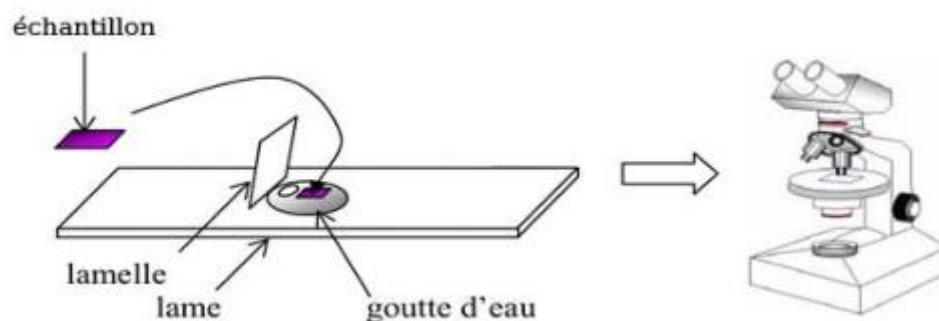
## II. Méthodes

### II.1. Caractérisation culturelle des souches

Les souches étudiées sont cultivées sur boîtes de Pétri contenant le milieu de culture solide YMA (Annexe I). Après incubation à 28°C pendant 10 jours, nous avons étudié la couleur, la forme, l'aspect et la production d'exopolysaccharides de ces souches.

### II.2. Morphologie des bactéries

L'examen à l'état frais des suspensions bactériennes permet de mettre en évidence, la forme ainsi que la mobilité des souches étudiées. En effet, après avoir homogénéisé la culture liquide YMB (Annexe I) contenant les bactéries jeunes, nous avons pris une suspension bactérienne et déposée sur une lame et observé sous microscope optique au Grossissement 10 ×



40 (figure 2).

**Figure 2** : Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais.

## Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant la division des bactéries en deux groupes distincts ; Gram + et Gram -, par leur affinité pour les colorants. À Cet effet nous avons appliqué ce test sur les souches étudiées en suivant la technique classique qui consiste à :

- La préparation est recouverte par la Fuchsine, laissé agir durant 1 min. Après un nouveau
- Lavage à l'eau, on égoutte la lame sur du papier absorbant puis on observe à l'huile Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet d'identifier les bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif (Tortora et al., 2003). Le protocole suivi est ci-dessous :
- Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant
- Basique le violet de Gentiane, laissé agir pendant 1min.
- Le violet est éliminé avec le Lugol et laissé agir pendant 30 secondes.
- Après un lavage à l'alcool-acétone, le surplus de la solution décolorante est chassé par une immersion.
- Laver à l'eau distillée.
- Observer au microscope (Gx100).

### II.3. Caractérisation physiologique

Les souches isolées ont subi une série de tests physiologiques impliquant plusieurs facteurs tels que la température, le pH et NaCl sur la croissance des isolats de *C.linifolius*. Après incubation, la croissance des souches est estimée par l'absorbance à une longueur d'onde  $\lambda=620\text{nm}$ . Trois exemplaires ont été pris en considération pour chaque test.

#### II.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne

La croissance des souches bactériennes à différentes températures a également fait l'objet d'une étude sur milieu YMB à raison de 3 répétitions par souche. Les cultures sont incubées à différentes températures : 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C et 37°C. la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde  $\lambda=620\text{ nm}$  pendant 10 jours.

### II.3.2. Effet du PH sur la croissance bactérienne

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB liquide à différents pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9, et 10. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 630 nm pendant 10 jours.

### II.3.3. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

L'étude de la croissance des souches en présence de NaCl a été effectuée sur milieu YMB à différentes concentrations : 100Mm, 200Mm, 300Mm ,400Mm et 500Mm. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 620 nm pendant 10 jours.

## II.4. Analyse numérique

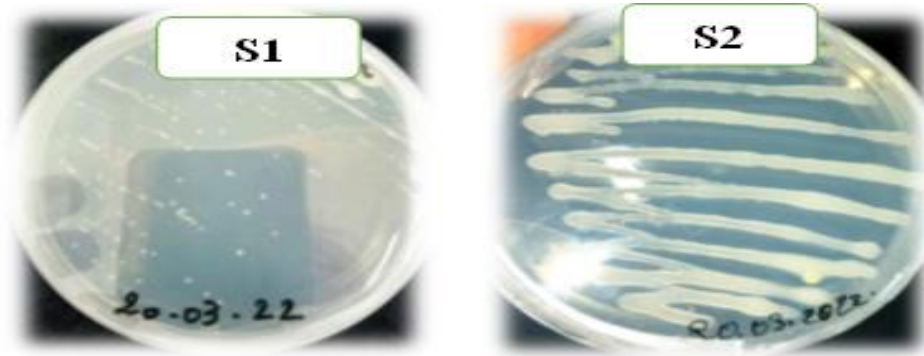
Pour bien situer le degré de rapprochement et le regroupement entre les souches isolées des nodules racinaires de *C.linifolius* d'une part, et entre ces souches et les souches de référence utilisées d'autre part, les résultats de l'ensemble des caractères phénotypiques étudiés ont été soumis à une analyse numérique.

La comparaison entre les souches a été réalisée par une Classification Ascendante hiérarchique (CAH), basée sur le calcul des distances Euclidiennes à l'aide du logiciel XL STAT (2009). Dans cette méthode, nous avons réalisés une matrice tableau IV (Annexe II) dans laquelle les variables sont introduites qualitativement et codées « 1 » pour tout résultat positif ou présent et « 0 » pour le négatif ou absent.

## *Chapitre III : Résultats et discussion*

### III.1. Caractérisation culturelle des souches

Les isolats étudiés forment sur milieu solide YMA des colonies qui ont une forme ronde, avec contours réguliers et des diamètres allant de 1 à 2 mm. Elles sont beiges, opaques et ont un aspect gluant, d'autres sont opaques et de couleur blanche (Photo 1). Les souches S1 et S3 ne possèdent pas d'exopolysaccharides.



**Photo 1 :** Aspect des colonies bactériennes sur milieu YMA.

### III.2. Morphologie des bactéries

L'observation microscopique à l'état frais d'une suspension bactérienne âgée de 10 jours, montre des cellules qui ont la forme de bâtonnets à extrémités arrondies et mobiles (Photo 2). Ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly  $\beta$ -hydroxybutyrates (Pedrosa, 1988). La coloration de Gram réalisée a montré leurs appartenances aux bactéries Gram négatif (Photo 3).



**Photo 2 :** Observation microscopique de quelques colonies de souches étudiées à l'état frais.



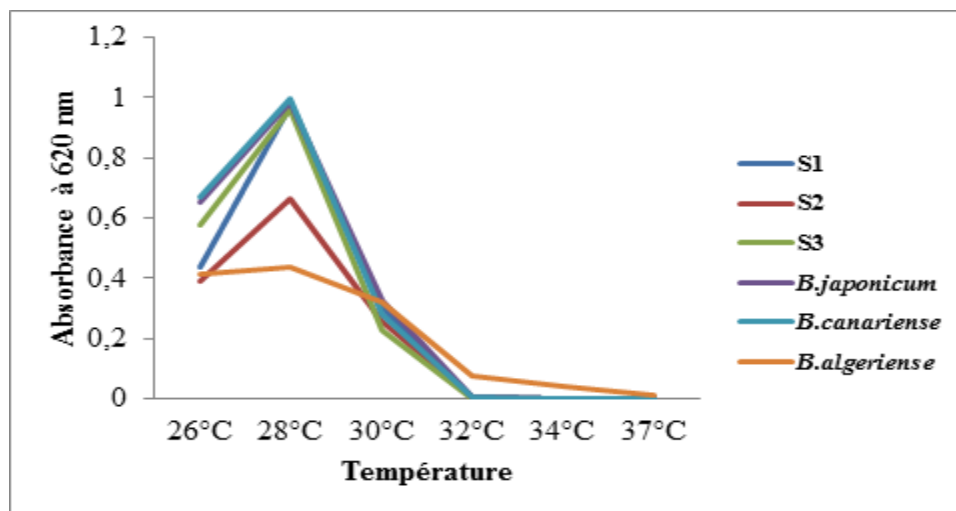
**Photo 3 :** Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif

### III.3. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la température, du pH et du NaCl sur la croissance des rhizobia isolées de nodules racinaire de *Cytisus linifolius*. Les souches ont été incubées à 28°C sur milieu YMB pendant 10 jours.

#### III.3.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne

Les résultats obtenus lors du test de température montrent que toutes les souches y compris les souches de références montrent une croissance entre 26 à 30°C avec un optimum à 28°C pour la plupart des souches. Aucune croissance n'a été remarquée à partir de 32°C pour toutes les souches (Figure 3).

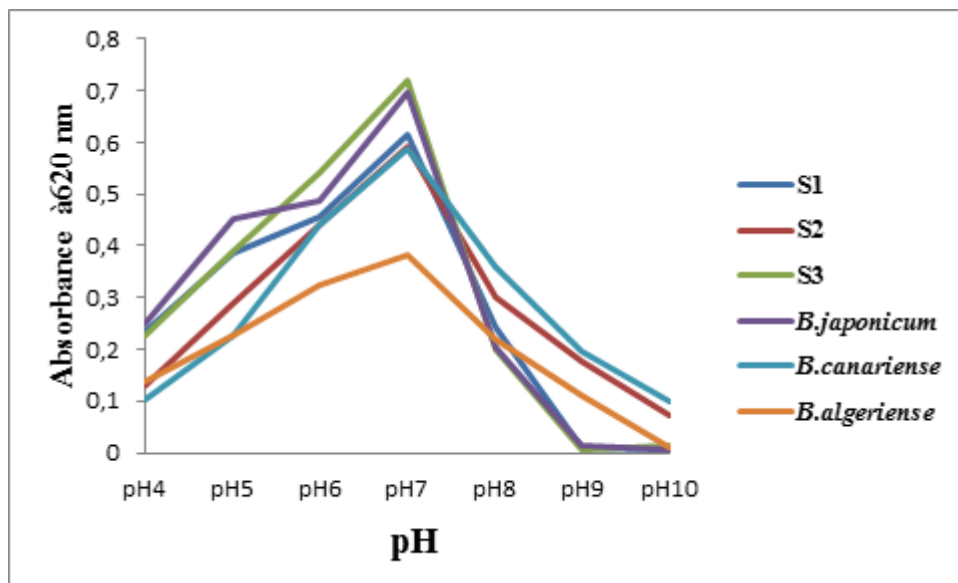


**Figure 3 :** Effet de la température sur la croissance des souches.

Le caractère mésophile des rhizobia a été déjà signalé par Graham (1992) et Zahran (1999) indiquant que la gamme de température optimale pour la croissance des rhizobia se situe entre 28° à 31°C, et beaucoup ne peuvent pas se développer à 37°C.

### III.3.2. Effet du pH sur la croissance bactérienne

Les résultats de l'effet de pH sur la croissance des souches sont présentés dans la (Figure 4). Les résultats montrent que toutes les souches testées présentent une bonne croissance entre pH 6 et 7. Aucune croissance n'a été observée à pH 10 pour la plupart des souches.

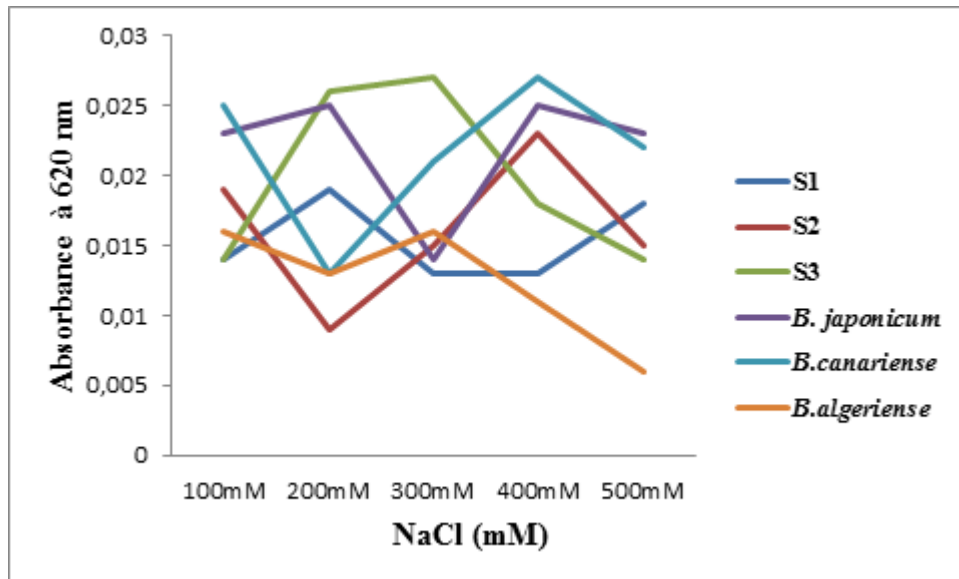


**Figure4** : Effet du pH sur la croissance des souches.

Ces résultats sont également en accord avec ceux de Kishinevsky et *al.* (2002) qui ont montré qu'aucune des souches de rhizobia isolées à partir d'*Hedysarum spinosissimum* n'est capable de croître à un pH 4 et que leur optimum de croissance est situé entre pH 7 et pH 8, alors que Rasa et *al.* (2001).

### III.3.3. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Les résultats obtenus lors du test de NaCl (Figure 5) montrent que toutes les souches sont affectées en présence de NaCl, aucune croissance n'a été observée.



**Figure 5 :** Effet du NaCl sur la croissance des souches.

La plupart des rhizobia sont inhibés par des concentrations de 100 mmol NaCl (Singleton et al., 1982). Différentes souches de *Bradyrhizobium* sont complètement inhibées entre 100 et 500 mmol NaCl.

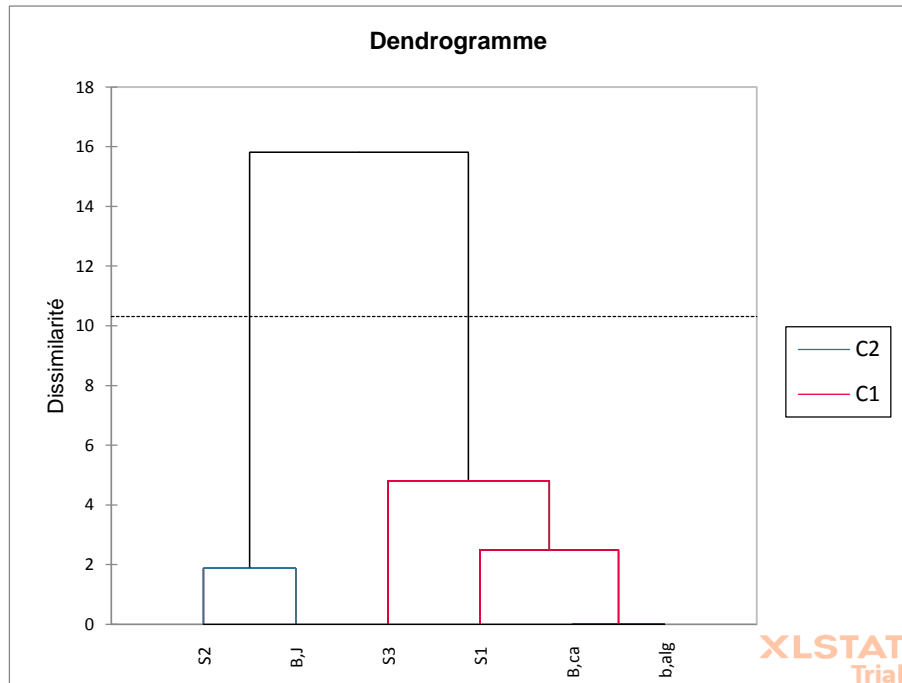
Miller et Wood (1996) ont rapporté que les rhizobia sont des bactéries sensibles à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais elles peuvent tolérer des concentrations élevées. Cette tolérance est en rapport avec des mécanismes d'adaptation qui permettent de surmonter l'effet du stress salin.

Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs. Certains auteurs ont rapporté aussi que les rhizobia sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Swaraj et Bishnoi, 1999).

#### III.4. Analyse numérique des données

La caractérisation phénotypique des souches bactériennes a été basée sur 25 caractères. Ces dernières ont été groupés et présentés dans le tableau IV (Annexe III). Le dendrogramme établi

par une classification ascendante hiérarchique (CAH) montre une diversité entre ces souches, ces souches sont réparties en deux principaux groupes C1 et C2 (figure 6).



**Figure6** : Classification Ascendante Hiérarchique des souches sur la base des données.

Le groupe C1 est constitué des souches S3, S1 groupés avec *B.algeriense* et *B.canariense*. Ce groupe est lui-même subdivisé en deux sous-groupes C1a qui regroupe S1 avec *B.japonicum* et *B.canariense*, et le sous-groupe C1b comporte que la S3 et qui semble un peu différente des autres souches. Le groupe C2 est composé des souches S2 et *B.japonicum* qui semblent un peu plus proches.



*Conclusion et perspectives*

### Conclusion et perspectives

Dans cette étude nous avons réalisé une caractérisation phénotypique de 03 souches isolées à partir de nodules racinaires de *Cytisus linifolius* et trois souches de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium* prises à titre de comparaison.

L'étude de la caractérisation culturale et cellulaire ont montré que les souches isolées sont des colonies beiges, opaques et ont un aspect gluant, d'autres sont opaques et de couleur blanche, les cellules sont des petits bâtonnets, mobiles et à Gram négatif.

Ces souches ont une bonne croissance entre 26°C et 30°C avec un optimum à 28°C. Elles présentent aussi une bonne croissance entre pH 6 et pH7. Cependant aucune tolérance en présence de NaCl.

L'analyse numérique des données présente deux groupes distincts dont le premier comporte les souches S3, S1 groupés avec *B.algeriense* et *B.canariense* et le second groupe comprend les souches suivantes S2 et *B.japonicum* qui semblent être un peu plus proches.

En perspective, il serait nécessaire d'élargir le spectre d'étude des souches de rhizobia isolées de légumineuses sur d'autres régions arides et semi arides non étudiées dans le but de contribuer à l'étude des bactéries endosymbiotiques pour une éventuelle utilisation dans les projets de bioremédiation.

## **Références bibliographiques**

### Références

**Benhizia Y, Goudjil H, Benguedouar A, Rosella M, Giacomini A, Squartini A. (2004).** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol*.27:462-468.

**Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benellaoua S, Laguerre G (2009)** Retama Species growing in different ecological-climatic areas of northeastern. Algeria have an arrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst Appl Microbiol* 32 : 245-255.

**CHERIET D. (2016).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister.

**Chen, W.X., Wange, S. Y., Ly, Y.B., Chen, X.Q., et Li, Y. (1995)** Characteristics of rhizobium *tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acide saline environment in X ingjiang. Poepl's Republic of china *Int. J. Syst.Bacterio.*, 45: 153-159.

**DEKAK A. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Mémoire de Magister. Université de Tébessa. Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie. Algérie

FAO. 1992.fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote.

**Gage DJ. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 280– 300

**Ndoye, I., (1999).** Caractérisation taxonomique des bactéries fixatrices d'azote nodulant *Acacia nilotica* var. *andansonii* et var. *tomentosa* (mimosoideae, sous famille des acacieae). Rapport de stage séjour scientifique haut niveau, Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier (France). PP,1

**Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P.W., Borthakur D., (2006).** Identification of two clusters of genes Involved in salt Tolerance in *Sino rhizobium* Sp. Strain BLB. *Symbiosis*. 41 :47-51.

**Pellerin S., Bulter F., Guiard-Van L.G., (2014).** Fertilisation et environnement. Quelles pistes pour l'aide à la décision. Ed. Quae et Acta. France. 194p.

**Rae D., Giller K. E., Yea A. R., Flowers T.J., (2002).** The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann.Bot.*89 :563-570.

Robert E., Ricklefs G., Miller L., (2005). *Ecologie*. Ed. De Boeck. Paris. 214p

**SAOUDI M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L) : Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Mentouri University of Constantine. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Algérie

**SKERMAN P.J. (1982).** Les légumineuses fourragères tropicales. 666 pages.

**TORCHE A. (2006).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine. Faculté des Sciences de la nature et de la vie.

### Sites web:

<https://www.quelleestcetteplante.fr/genres.php?genre=Cytisus>

<https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-75466-description>



**Annexes**

## Annexe I

Composition des milieux de cultures (pour 1 litre) (Vincent, 1970).

### Milieu YMA (Yeast Mannitol Agar)

Mannitol .....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
NaCl.....	0,1g
Agar .....	15g

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

### Milieu YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol .....	10g
Extrait de levure.....	0,4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	0.1g
Eau distillé .....	1l

Ajusté à pH 6.8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

## Annexe II

### La moyennes des différents tests effectués

**Tableaux I :** La moyenne des Do obtenue aux différentes températures

Souches	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	37°C
S1	<b>0,239</b>	<b>0,272</b>	<b>0,105</b>	<b>0,005</b>	<b>0,003</b>	<b>0,004</b>
S2	<b>0,69</b>	<b>1,065</b>	<b>0,258</b>	<b>0,006</b>	<b>0,003</b>	<b>0,003</b>
S3	<b>0,679</b>	<b>0,964</b>	<b>0,228</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>
<i>B.japonicum</i>	<b>0,153</b>	<b>0,283</b>	<b>0,13</b>	<b>0,005</b>	<b>0,004</b>	<b>0,003</b>
<i>B.canariense</i>	<b>0,669</b>	<b>0,995</b>	<b>0,28</b>	<b>0,005</b>	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>
<i>B.algeriense</i>	0,415	0,440	0,319	0,075	0,044	0,014

**Tableau II :** La moyenne des Do obtenue aux différents pH

Souches	4	5	6	7	8	9	10
S1	<b>0,235</b>	<b>0,288</b>	<b>0,357</b>	<b>0,515</b>	<b>0,343</b>	<b>0,009</b>	0,008
S2	<b>0,429</b>	<b>0,489</b>	<b>0,54</b>	<b>0,692</b>	<b>0,601</b>	<b>0,376</b>	0,073
S3	<b>0,429</b>	<b>0,489</b>	<b>0,54</b>	<b>0,721</b>	<b>0,601</b>	<b>0,398</b>	0,140
<i>B.japonicum</i>	<b>0,25</b>	<b>0,453</b>	<b>0,487</b>	<b>0,498</b>	<b>0,203</b>	<b>0,013</b>	0,008
<i>B.canariense</i>	<b>0,305</b>	<b>0,529</b>	<b>0,54</b>	<b>0,589</b>	<b>0,601</b>	<b>0,495</b>	0,098
<i>B.algeriense</i>	0,137	0,226	0,323	0,383	0,221	0,111	0,011

**Tableau III** : La moyenne des Do obtenue aux différentes NaCl

Souches	100	200	300	400	500
S1	<b>0,014</b>	<b>0,019</b>	<b>0,013</b>	<b>0,03</b>	<b>0,018</b>
S2	<b>0,019</b>	<b>0,009</b>	<b>0,035</b>	<b>0,023</b>	<b>0,015</b>
S3	<b>0,014</b>	<b>0,026</b>	<b>0,027</b>	<b>0,018</b>	0,014
<i>B.japonicum</i>	0,023	0,025	0,014	0,025	0,023
<i>B.canariense</i>	0,025	0,013	0,031	0,027	0,022
<i>B.algeriense</i>	<b>0,06</b>	<b>0,013</b>	<b>0,016</b>	<b>0,011</b>	<b>0,06</b>

## Annexe III

**Tableau VI :** matrice des caractères phénotypiques

code	S1	S2	S3	B.j	B.ca	B.alg
forme	1	1	1	1	1	1
contour	1	1	1	1	1	1
couleur	1	0	1	0	1	1
Aspect	0	1	0	1	0	0
EPS	0	1	0	1	0	0
ADC	1	1	1	1	1	0
Mobilité	1	1	1	1	1	1
Gram	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1
32	0	0	1	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
4	1	1	0	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1
9	0	1	1	0	1	1
10	0	0	1	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0

Forme	0 : autres formes 1 : arrondies
Mobilité	0 : non mobile 1 : mobile
Aspect	0 : rugueux 1 : lisse
Couleur	0 : non blanchâtre 1 : blanchâtre
EPS	0 : absence 1 : presence
Test Gram	0 : négatif 1 : positif
Contour	0 : non circulaire 1 : circulaire
Temps d'apparition des colonies	0 : ≤ 4jours 1 : > 4 jours
Elevation des colonies	0 : plate 1: bomber
T26	Croissance à 26°C
T28	Croissance à 28°
T30	Croissance à 30°C
T32	Croissance à 32°C
T37	Croissance à 37°C
PH4	Croissance à PH4
PH5	Croissance à PH5
PH6	Croissance à PH6
PH8	Croissance à PH7
PH9	Croissance à PH8
PH10	Croissance à PH9
100Mm	Croissance à PH10
200Mm	Croissance à 100Mm
300Mm	Croissance à 200Mm
400Mm	Croissance à 300Mm
500Mm	Croissance à 400Mm

## Résumé

Trois souches bactériennes *endosymbiotes* de *Cytisus linifolius* ont fait l'objet d'une caractérisation cellulaire, culturelle et physiologique. Ainsi que trois souches de références ont été prises en considération à titre de comparaison. La caractérisation cellulaire et culturelle répond aux critères fondamentaux des Bactéries Nodulantes des Légumineuses (BNL). Ces souches ont une bonne croissance entre 26°C et 30°C avec un optimum à 28°C. Elles présentent aussi une bonne croissance entre pH 6 et pH 7. Cependant aucune croissance n'est observée en présence de NaCl.

L'analyse numérique montre la présence de deux groupes où le premier possède les souches S1, S3 groupés avec *B.algeriense* et *B.canariense*, et le deuxième composé des souches S2 et *B.japonicum* qui semblent être un peu plus proches.

**Mots clés :** *Cytisus linifolius*, *endosymbiotes*, caractérisation physiologique, BNL

## Abstract

Three bacterial endosymbiont strains of *Cytisus linifolius* were characterized in terms of cells, culture and physiology. As well as three reference strains were taken into consideration for comparison. The cellular and cultural characterization meets the basic criteria of the Legume Nodulating Bacteria (LNB). These strains have a good growth between 26°C and 30°C with an optimum at 28°C. They also show good growth between pH 6 and pH 7. However, no growth was observed in the presence of NaCl.

The numerical analysis shows the presence of two groups where the first one has the strains S1, S3 grouped with *B.algeriense* and *B.canariense*, and the second one composed of the strains S2 and *B.japonicum* which seem to be a little bit more similar.

**Key words:** *Cytisus linifolius*, *endosymbionts*, physiological characterization, BNL

## ملخص

تعرضت ثلاث سلالات *endosymbiotes* من *Cytisus linifolius* للتوصيف الخلوي والزراعي والفيزيولوجي. كما تم اختيار ثلاث سلالات مرجعية للمقارنة. يفي التوصيف الخلوي والزراعي بالمعايير الأساسية للبقوليات العقيدية (BNL). هذه السلالات لها نمو جيد بين 26 درجة مئوية و 30 درجة مئوية مع الحد الأمثل عند 28 درجة مئوية. كما أن لديهم نموًا جيدًا بين pH6 و pH7. ومع ذلك، لم يلاحظ أي نمو في وجود NaCl.

يوضح التحليل الرقمي وجود مجموعتين حيث تحتوي الأولى على سلالات S1 و S3 مجمعة مع *B.algeriense* و *B.canariense*، والثانية على سلالات S2 و *B.japonicum* والتي تبدو أقرب قليلاً.

الكلمات الرئيسية: *endosymbiotes*، التوصيف الفيزيولوجي، BNL، *Cytisus linifolius*