REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Master II

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

La symbiose rhizobium - légumineuse et l'effet de stress salin sur la croissance et la réponse physiologique chez les rhizobiums.

Présenté par :

OUARED Affaf

OULD ROUIS Imene

AMAR SETTI Marwa

Soutenu publiquement le: 16/09/2020, Devant le jury composé de :

Mr KERDI.B	MAA	A l'U.Y.F.M	Président
Mr AINAS.M	MCB	A l'U.Y.F.M	Promoteur
Mr CHAMI.B	MAA	A l'U.Y.F.M	Examinateur
Mme BOUHERAMA.A	MAA	A l'U.Y.F.M	Examinatrice

2019/2020

Remerciements

Tout d'abord nous remercions « Dieu » le tout puissant qui nous a donné la volonté et la patience d'accomplir ce travail.

Nos remerciements aux membres de jury : Mr KERDI Bilal, Mme BOUHERAMA Amina et Mr CHAMI Bouazza pour l'évaluation de ce travail.

Nous tenons à adresser nos grands remerciements à notre encadreur Mr AINAS Mahfoud, Nous avons eu l'honneur de travailler sous sa direction. Nous le remercions pour tous ses efforts, son aide, sa patience, son soutien, ses conseils, sa totale disponibilité et surtout pour sa gentillesse en parlant et en traitement respectueux.

Nous ne pouvons pas oublier de remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Médéa pour leurs aides et leurs conseils.

Enfin nous voulons remercier toutes les personnes qui nous ont aidé de près ou de loin.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chères parents décédés qui ont toujours sacrifiés pour me voir réussir avec ma profonde gratitude pour leur amour, leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études, que Dieu ait pitié d'eux et les accueille dans son vaste paradis.

A mes chères sœurs et frère pour qu'ils je souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, à qui étaient toujours à mes côtés, à tout famille Ouldrouis et à mes trinômes Affaf et Marwa

Imene

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mon cher père M'hamed, il n'y a aucune dédicace qui puisse exprimer l'amour, et le respect que j'ai toujours eu pour toi .cet humble travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa, je supplie le Dieu de t'accorder une bonne santé.

À ma chère mère Rachida, Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

À Aymen Boukhelkhal pour ses encouragements son soutien moral et ses effort.

À mes chères sœurs et leur maris : Nassima et Djaafer, sihem et Badis.

À mes frères : Rida et Mohamed

À mon neveu : Mohamed

À mes amis : Amel, Ihcen, Imen et Affaf

Je vous aime !

Marwa

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, qui sont la lumière de mes yeux, qui ont beaucoup sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes aimables soeurs Habiba et Farida et leur conjoints pour leurs encouragements et soutien moral.

A mon très cher frère chez le quelle j'avais trouvé aide.

A mon marie pour sa confiance et tous ces efforts pour moi je remercie dieu de l'avoir protégé pour être témoin de ma réussite.

A mes chers nieces, ayman, noufel, Sami, et nedjme eddine.

A tous mes amis qui ont été toujours présent par leurs conseils et aides plus pricisement Amel Sihem et Rahil.

Mes dédicaces sont également adressées à ma grand-mère et tous mes cousins, cousines, tantes et oncles.

A mon trinôme et leur famille.

A toutes personnes qui portent les noms ouared et cheikh touami.

Affaf

Résumé

Notre étude consiste à mettre en évidence l'effet de contraintes abiotiques (la salinité, la sécheresse et pH) sur la croissance des *rhizobiums* isolés du nodule de légumineuse *Medicago intertexta*. Poussant à l'état spontané dans la willaya de Médéa. Où la collection est réalisée à partir de quatre régions déférentes.

Les souches sont cultivées sur milieu YEMA, et caractérisée phénotypiquement par méthodes : microscopique, macroscopique, biochimique et physiologique.

Nous avons effectué notre étude à la base des trois recherches différentes approuvée au paravent pour définir la tolérance des souches ainsi les réponses physiologiques adaptatives.

Les souches rhizobiennes étudiées présent une large tolérance face aux conditions hostile de milieu certain pourrait croître aux températures extrême jusqu'à 42° C, d'autre tolèrent les pH acide (pH4) et pH alcalins (pH9). En fin quelques isolats supportent jusqu'à 800mM de NaCl accompagné d'une forte synthèse d'EPS.

Mots clés: *rhizobium* .*Medicago intertexta*. Contrainte abiotique. Tolérance. EPS.

Abstract

Our study highlights the effect of abiotic stresses (salinity, drought and pH) on the growth of rhizobium isolated from the nodule of legume *Medicago intertexta*. Pushing spontaneously into Medea city. Where the collection is made from four deferential regions.

The strains are grown on YEMA medium, and characterized phenotypically by microscopic, macroscopic, biochemical and physiological methods.

Our study based on three different approved researches to define strain tolerance as well as adaptive physiological responses.

The rhizobean strains studied present a wide tolerance to hostile conditions of medium, certain could grow at extreme temperatures up to 42°C, others tolerant the acid pH (pH4) and alkaline pH (pH9). In the end, some isolates support up to 800mM of NaCl accompanied by a strong synthesis of EPS.

Key words: *rhizobium*, *Medicago intertexta*. Abiotic constraint. Tolerance. EPS.

ملخص

تتمثل دراستنا في إبراز تأثير العوامل البيئية (الملوحة، الجفاف ودرجة الحموضة) على نمو الريزوبيوم المعزولة من البقوليات ميديكاڤو أنترتيكستا. التي تنمو بشكل عفوي في ولاية المدية. حيث تم عزلها من اربعة مناطق مختلفة.

تزرع العينات في YEMA، لتدرس مظهريا بواسطة الأساليب المجهرية، العيانية، الكيميائية الحيوية والفيزيولوجية.

أجرينا دراستنا على ضوء ثلاث دراسات مختلفة ومعتمدة لتحديد قدرة العينات على التحمل و مختلف أساليب استجابتها الفيزيولوجية

تظهر العينات التي تمت دراستها تحملا واسعا للظروف البيئية القاسية بحيث يمكن لبعضها أن تنمو في درجات حرارة قصوى تصل إلى 42 درجة مئوية، كما يمكن لأخرى تحمل درجة الحموضة الحمضية(pH4) و درجة الحموضة القلوية(pH9) .

والبعض الآخر باستطاعته مقاومة إلى ما يصل 800 ملي مولار كلوريد الصوديوم مصحوبا بإنتاج كبير لمتعدد السكاريد الخارجي.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيوم، ميديكاڤو أنترتيكستا، العوامل البيئية، متعدد السكاريد الخارجي.

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Position taxonomique de S*inorhizobium meliloti.*	6
2	Analyse de la valeur nutritionnelle des graines de légumineuses.	7
3	Position taxonomique de *Medicago intertexta.*	8
4	Spécificité de la symbiose rhizobia / légumineuse.	9
5	Les niveaux des stress salin et sodique.	28
6	Classification de protéines de stress.	31
7	Effet de stress salin sur la production des EPS.	33
8	Propriétés et attributs fonctionnels de certains exopolysaccharides bactériens.	38
9	Effet de NaCl sur la croissance et la production d'EPS du rhizobium.	43
10	Effet de NaCl sur la croissance des rhizobiums.	45
11	Action de la température.	51
12	Température de croissance.	53

Liste des figures

Numéro	Titre	page
1	Aspect morphologique de *Rhizobium leguminosarum.*	3
2	La répartition géographique de *Medicago intertexta.*	4
3	La morphologie de plante *Medicago intertexta* et ces gousses	5
4	La classification des rhizobia.	6
5	Structure chimiques des flavonoïdes.	11
6	L'expression de gènes Nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod.	11
7	les différentes étapes de la nodulation.	13
8	Localisation géographique de la zone de prélèvement.	14
9	Les étapes de collection de nodules de la plante *Medicago intertexta.*.	15
10	L'extraction des nodules de la plante *Medicago intertexta*.	15
11	Nodules conservés sous $CaCl_2$.	16
12	Ajustement de pH de milieu par pH mètre.	17
13	Les solutions utilisées dans la stérilisation des nodules.	18
14	Ensemencement par la technique des quatre cadrans.	19
15	Ensemencement de broyat nodulaire.	19
16	Repiquage sur tube gélose incliné (YEMA).	20
17	Repiquage de rhizobium sur tube inclinées YEMA.	20
18	Obtention des colonies pures.	20

19	Virage de Couleur de bleu de bromothymol.	22
20	Aspect microscopique de rhizobium.	22
21	Galerie API 20 E.	23
22	les différent stress affectant la plante.	25
23	Pertes agricoles dues aux facteurs biotiques et abiotiques au niveau planétaire.	26
24	Les différents stress abiotique influençant la plante.	26
25	Effet du stress et rôle des HSP.	30
26	Structure de cellulose homopolysaccharide.	34
27	Structure de Xanthane hétéropolysaccharide.	35
28	Schéma de l'extraction et de la purification des polysaccharides.	42
29	Effet de NaCl sur la croissance et la production d'EPS des rhizobiums (S1, S2, S3, S4, S5).	44
30	Courbes de la survie bactérienne et la production d'exopolysaccharide par les souches de rhizobium sp stm (1823,2058.2233).	46
31	Effet de NaCl sur la croissance des rhizobiums.	47
32	Effet de ph sur les souches étudiés par Mahboub.	49
33	Effet de PH sur la croissance des souches étudiées par Brahimi. A et Brahimi. S.	49
34	Effet de PH sur la croissance des souches étudiées par Saoudi.	50
35	Courbes de croissance des souches de Rhizobium sp. à différentes températures.	52

Liste d’abréviations

cm : centimètre**.**

mm : millimètre.

% : Pourcentage.

BNF : bactéries fixatrices de l’azote.

Nod : facteurs de nodulation.

LCO : lipochitinooligosaccharides.

°C : degré Celsius.

h : heures.

$CaCl_2$: chlorure de calcium.

YEMA: yeast extraction mannitol agar.

YEMB: yeast extraction mannitol bouillon.

NaCl : chlorure de sodium.

pH : potentiel hydrogène.

HgCl: clorure de mercure.

ml: millilitre.

RC: rouge congo.

GLU: Glucose.

ADH: Arginine.

URE: Urée.

NO3: Nitrate.

TRP: Tryptophane.

mM : milli mol.

nm : nano mètre.

DO : densité optique.

µg : micro gram.

BTB : bleu de bromothymol.

CE : conductivité électrique.

dS/m : décisiemens par mètre.

SAR: SAR Sodium absoption ratio.

kDa: Kilo Dalton (poid moleculaire).

Hsp: heat shock protein.

g: gram.

SDS-PAGE: Sodium Dodécyl Sulfate -Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis.

Rpm : rotation par minute.

KCL: chlorure de Potassium.

NaOH : Hydroxide de sodium.

HCl : chlorure d'hydrique.

Sommaire

Introduction ……1

Chapitre I : généralité sur les rhizobia et les légumineuses

1. Généralité sur les rhizobia …..……....3

2. Généralité sur la plante *Medicago intertexta* ……...…3

3. Classification taxonomique des deux partenaires ……....5

3.1. Classification taxonomique de rhizobia ...…….....5

3.1.1. Définition de la famille de Rhizobia …….…….....5

3.1.2. Position taxonomique des rhizobia (*shinorhizobium meliloti*) ….……....…….…...6

3.2. Classification taxonomique des légumineuses ……..7

3.2.1. Définition de la famille de Légumineuses 7

3.2.2. Position taxonomique des légumineuses (*Medicago intertexta*) ……..……..…8

4. La symbiose rhizobia-légumineuses …….……....……....8

5. Intérêts de rhizobia ……10

6. les étapes de processus de nodulation…….…...…….10

6.1. Phase de pré-infection ……...….10

6.2. Phase de l'infection et de la formation des nodules ……..…… 12

6.3. Phase de fonctionnement ou maturité des nodules ……..12

6.4. Phase de dégénérescence …….…..13

Chapitre II : Méthodes d'isolement et caractérisation des rhizobiums

1. Collection et extraction des Rhizobium ……....…….…..…….....14

1.1. La zone d'étude …….…….……...…..14

1.2. Collection et extraction des nodules …….…...14

1.3. Conservation des nodules …….……..…15

2. Collection et isolement des souches rhizobiennes …….……..…16

2.1. Milieu d'authentification de culture de rhizobia …...……...…….……..16

2.2. Isolement et purification des souches de rhizobiennes…….……...…18

2.2.1. Stérilisation et écrasement des nodules ……..……...……..18

2.2.2. Culture sur le milieu YEMA ……..……..……..…18

2.2.3. Purification des souches ……...……..……...…….19

2.2.4. Conservation des souches …...…….20

2.3. Caractérisation phénotypique ……...…….……..……21

2.3.1. Examen macroscopique ……..……...……...……...21

2.3.2. Examen microscopique ……...…… 22

2.4. Caractérisation biochimique (galrie AP 20 E) ……...……..……....22

2.5. Etude et Caractérisation physiologique ……..…… 23

2.5.1. Effet de stress salin …….….23

2.5.2. Effet de stress de pH ……..24

2.5.3. Effet de stress thermique ……..…….……...24

2.5.4. Résistance aux antibiotiques …….…...24

Chapitre III : l'effet de stress salin

1. Les déférents stress abiotique influençant les plantes ...…….……..…..25

1.1. Définition de stress abiotique ……..…26

1.2. La sècheresse ……..……27

1.3. Stress thermique ……....27

1.4. Stress Salin ……..…27

2. La physiologie de stress salin ……28

2.1. La salinité primaire ……....28

2.2. Salinité secondaire ……..…....29

3. Les réponses au stress salin chez la microsymbiote (rhizobia) ...……...…29

3.1. Les protéines de stress (chaperon) ……..29

3.1.1. Définition et déférents types de protéines de stress ……...……...29

3.1.2. Intérêt et rôle de protéine de stress ……...…….30

3.1.3. classification de protéines de stress …….…….……..…..30

3.1.4. Méthode d'extraction des protéines de stress ……..…31

3.1.5. Purification et caractérisation des protéines de stress ……..……..…31

3.2. Les composés compatibles ……..……....32

3.2.1. Définition des exopolysccharides (EPS) ……..…….....32

3.2.2. Les différents types des composés compatibles de stress salin ……..……....32

3.2.3. Le stress salin et la production des exopolysccharides (EPS) ……...…….……...33

3.2.4. Composition et classification des EPS ……..…...…….34

3.2.4.1. Composition générale des exopolysaccharides ……....34

3.2.4.2. La classification des exopolysaccharides ..…….....34

3.2.5. La biosynthèse des exopolysaccharides ……..……...…..35

3.2.6. Rôle physiologique et application industriel des EPS ……..…...36

3.2.6.1. Rôle Physiologique et biologique ……..……...36

3.2.6.2. Le rôle symbiotique des exopolysaccharides ……...……..…36

3.2.6.3. Les applications médicales des exopolysaccharides ……36

3.2.6.4. L'industrie alimentaire ……...……..37

3.2.6.5. L'industrie du pétrole ……...……37

3.2.7. Facteurs influençant la production d'exopolysaccharides ……...…39

3.2.7.1. La température ……..…39

3.2.7.2. Le pH ……..……..40

3.2.7.3. La source de carbone et d'azote ……...……40

3.2.7.4. La concentration du phosphate ……..…40

3.2.7.5. Les sels minéraux et les cofacteurs ……...…....40

3.2.8. Production d'EPS in vitro chez les rhizobiums ……..……...…40

3.2.9. Méthode d'extraction et purification des exopolysaccharides ……..……41

Chapitre IV : résultats et discussions

1. Effets du NaCl sur la croissance des souches et la production d'EPS……...……...43

2. Effet de pH sur la croissance des souches ……...…….....…49

3. Effet de température sur la croissance des souches ……..……..….50

Conclusion ……...……. 55

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

L'azote est un constituant essentiel des acides aminés, des protéines et par conséquent un élément minéral nécessaire pour tout organisme vivant. Dans la nature, l'azote est très abondamment présent sous forme N_2. Il constitue le principal facteur limitant la croissance de la plante et la production agricole **(Robert et *al*., 2005)**.

La famille des légumineuses est l'une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'Homme, qu'elle soit alimentaire, industrielles ou médicinales. Cet intérêt réside dans leur relation symbiotique avec les bactéries du sol appelé rhizobia **(Chen et *al*., 1995)**.

Les bactéries telle que rhizobia, 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).**

La fixation de l'azote par les *Rhizobium* est limitée par des contraintes environnementales. Ces contraintes sont de nature physique, chimique et biologique.

Le sel est un facteur de stress abiotique qui occupe la troisième position après le stress hydrique et la carence azotée. La salinité cause un stress hyper-osmotique et un déséquilibre ionique au niveau des cellules en plus des différentes réponses moléculaires complexes qui impliquent des particularités morphologiques et développementales avec des mécanismes physiologiques et biochimiques influençant négativement sur les relations symbiotiques et les rendements des plusieurs cultures agricoles **(Tahkoubit, 2017).**

Les exopolysaccharides occupent une place importante dans la protection des bactéries contre le stress environnemental. Selon **(Bekki, 1986 ; Tao et *al*., 1992)**, la richesse en exopolysaccarides de certaines souches participe à leur tolérance à la salinité. Ils semblent donner aux bactéries un avantage compétitif avec les souches des rhizobia indigènes et leur permettre de persister dans le milieu salin.

En Algérie les rhizobia nodulant plusieurs légumineuses tels que le genre *Medicago de* différentes régions du pays et qui ont fait l'objet de nombreuses études (**Amouri et *al*., 2015 ; Mouhous, 2018 ; Mahboub, 2018).**

Cette étude a pour but de présenté les méthodes d'extraction et isolement des rhizobia, de caractérisation morphologique, biochimique et cellulaire, d'illustrer l'effet de stress salin (NaCl), pH, la température du milieu sur leur croissance et leur réponse physiologique.

Ce document est constitué de quatre chapitres : le chapitre un qui présente des généralités sur les partenaires (rhizobia- légumineuses) et leurs interactions, le deuxième chapitre présente les Méthodes d'isolement et caractérisation des rhizobiums, Le troisième chapitre illustre l'effet de stress salin. Le dernier comporte les résultats obtenus des différentes études portées sur l'effet de NaCl, pH, température sur la croissance, la survie des souches de rhizobium et les moyenne de tolérance, dû à l'incapacité de réaliser notre propre travail pratique au niveau de l'laboratoire biologique qui a été fermer à cause de Pandémie (Corona).

Chapitre I :
Généralité sur les rhizobia et les légumineuses

1. généralité sur les Rhizobia :

La biodiversité microbienne constitue une ressource naturelle énorme pour l'humanité. La famille des *Rhizobiaceae* est constituée par un ensemble hétérogène des bactéries qui comprend des espèces, les plus connues les Rhizobia. Ce sont des bactéries capables d'induire des nodules sur les racines ou les tiges des légumineuses et assurer la fixation de l'azote atmosphérique à l'intérieur de ces organes. **(Ben yamina et *al*., 2012).**

En contre partie de la fixation d'azote, les rhizobiums obtiennent un approvisionnement stable de carbone dérivés des composés de la photosynthèse. **(Longfei Zhao et *al*., 2010)**. Les Rhizobia présentent dans différents habitats (ex. sol, rhizosphère, La plante hôte) **(Amarelle et *al*, 2016).**

Les rhizobiums comprennent la forme bâtonnet, gram-négatives, aérobies, non sporulantes. Ils sont généralement mobiles quand ils sont jeunes grâce à un seul flagelle polaire ou deux à six flagelles péritriches, possèdent un ou plusieurs granules réfringents de poly-β-hydroxyburate et forment des colonies incolores, blanches ou de couleur crème sur le milieu de culture classique (mannitol et extrait de levure) **(Émile et Michel, 2004).**



Figure 1 : aspect morphologique de *Rhizobium leguminosarum* **(Pinterest, 2020)**

2. généralité sur la plante *Medicago intertexta :*

Medicago intertexta, le mélange de hérisson, ou trèfle de calvaire, est une plante à fleurs de la famille des Fabacées, fourragère nutritive, hautement savoureuse en azote pour les sols légèrement neutres et alcalins dans les régions climatiques méditerranéennes **(Del Pozo, 2002).** Elle est considérée parmis les légumineuses les plus précieuse pour l'amélioration des pâturages et la stimulation de la matière organique du sol dans les terrains bien drainés. Aussi Elle est à croissance

rapide et dense, capable de fixer l'azote et d'augmenter l'approvisionnement disponible en azote du sol, le rende très utile en tant que fumier vert .elle se trouve principalement dans le bassin méditerranéen occidental **(Amouri ,2016).**

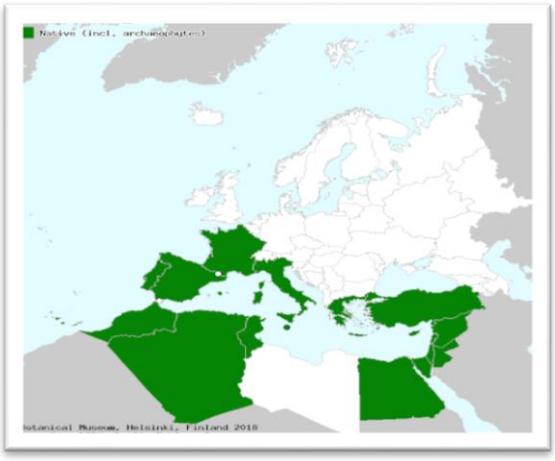


Figure 2 : la répartition géographique de *Medicago intertexta*

(Malta Wild Plants, 2020)

Medicago intertexta se caractérise par un bon développement végétatif (largeur, hauteur, vitesse de croissance et nombre d'entre-nœuds importants), il forme sa première fleur tardivement et sa floraison s'étale sur une courte période. Anneau presque glabre couché ou ascendant jusqu'à 50 cm. Folioles oboval, cunéiformes, denticulées, parfois avec une tache sombre, stipules ovales à ovales-lancéolées, incisées-dentées. Racèmes de 1 à 7 fleurs. Corolle 6-9 mm. Légumineuse de 12-15 mm de diamètre, en spirale de (6-10) tours, ovoïde, cylindrique ou rarement discoïde, convexe aux deux extrémités, glabre sauf souvent pour les épines, veines transversales solides, anastomosées et formant un réseau allongé tangentiellement, épines généralement 3-4 mm, courbées et apposées sur la légumineuse.

Les gousses de *Medicago intertexta* sont lourdes, grandes, comprenant beaucoup de graines dont le poids moyen est faible. **(Laouar et *al*., 2000).**



Figure 3 : la morphologie de plante *Medicago intertexta* et ces gousses **(Flore Alpes, 2020)**

3. classification taxonomique des deux partenaires :

3.1 Classification taxonomique de rhizobia :

3.1.1. Définition de la famille de Rhizobia :

Phylogenétiquement, les rhizobia appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae,* Ils comprennent 14 genres et 98 espèces. Ils représentent le groupe des Alpha-protéobactéries et les bêta-protéobactéries. De nombreux genres et espèces de ces bactéries ont été décrits. Les alpha-protéobactéries comprennent des micro-organismes genre Rhizobium, *Mesorhizobium,* Ensifer (*sinorhizobium meliloti*) *Azorhizobium, Bradyrhizobium, Méthylobacterium, Devosia, Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella* et *Microvirga*, tandis que les bêta-protéobactéries comporte les bactéries des genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* **(Ardley et *al*., 2012 ; Janczarek et *al*., 2014 ; Peix et *al*., 2015 ; Wdowiak-Wrobel et *al*., 2017).**

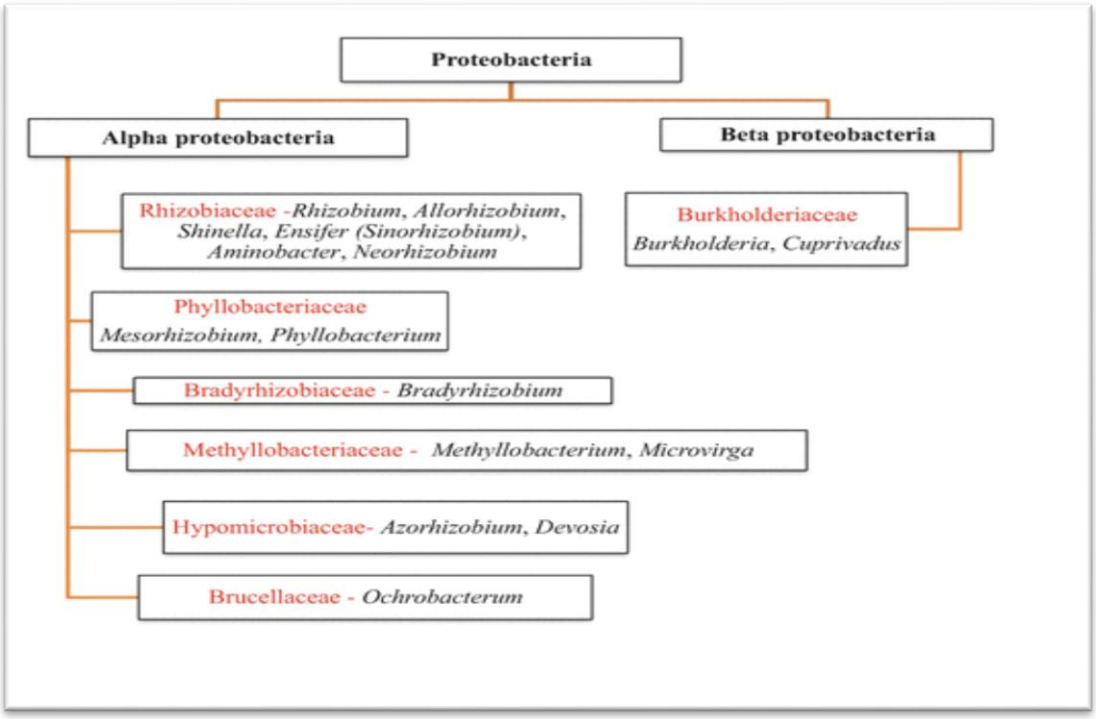


Figure 4 : la classification des rhizobia **(Pojaa et *al*,.2017)**

3.1.2. Position taxonomique des rhizobia (*sinorhizobium meliloti*) :

Sinorhizobium meliloti (Ensifer) est une bactérie du sol gram négative, capable d'induire la formation de nodules chez les légumineuses comme : *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*, où ces bactéries fixent l'azote atmosphérique**. (aizawa, 2014 ; cubo et *al*., 2020)**

Tableau 1 : position taxonomique de S*inorhizobium meliloti* **(aizawa, 2014)**

Règne	*Bacteria*
Embranchement	*Proteobacteria*
Classe	*Alphaproteobacteria*
Ordre	*Rhizobiales*
Famille	*Rhizobiacea*
Genre	*Sinorhizobium*
Espèce	*Sinorhizobium meliloti*

3.2. Classification taxonomique des légumineuses :

3.2.1. Définition de la famille de Légumineuses :

La famille de Légumineuse *(Fabaceae)* est la troisième plus grande famille dans les Angiospermes qui domine les zones arides, semi-aride et les écosystèmes extrêmes **(Hansen et *al*., 2017).** Elle couvert 19300 espèces et 750 genre comprenant des herbustes, arbres, herbes **(Andrews , 2017;Wdowiak-Wrobel et *al*., 2017).** Ils sont reconnus par leur capacité de fixer l'azote atmosphérique à l'aide des bactéries dans leurs nodules racinaires. Ils sont riches en protéines **(NaveenKumar, 2015 ; Meena et *al*., 2018).**

(Graham et Vance 2003) estiment que les légumineuses fournissent pour l'Homme environ un tiers des protéines alimentaires. Leurs graines sont des aliments d'excellente qualité car leur contenu en protéines est parmis les plus élevés de toutes les plantes destinées à l'alimentation (Tableau 2).

Tableau 2 : Analyse de la valeur nutritionnelle des graines de légumineuses **(Boudanga ,2011).**

Nutriments	Teneures
Protéines	20 à 25%
Lipides	Teneurs très variables
Glucides	Teneures de 20 à 50%
Minéraux Vitamines	Variables selon les variétés

Ils améliorent l'approvisionnement en azote, augmentent les réserves de la matière organique, améliorent la structure du sol, aussi réduire l'érosion, accroître l'aération, améliorer la capacité de rétention d'eau du sol et le rendre plus facile à labourer **(Hansen et *al*,. 2017).**

Actuellement, la famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles, les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* .Les *Caesalpinioideae* sont regroupées en quatre tribus, les *Caesalpinieae*, *Cassieae, Cercitae* et *Detarieae* environ 170 genres et 2250 espèces. Les *Mimosoideae* sont regroupés en deux tribus, les *Ingeae* et *Mimoseae* avec environ 80 genres et 3270 espèces, tandis que les *Papilionoideae* se composent de 28 tribus avec environ 480 genres et 13 800 espèces **(Andrews, 2017).**

3.2.2. Position taxonomique des légumineuses : *(Medicago intertexta)*

Tableau 3 : position taxonomique de *Medicago intertexta* **(Benmouhoub, 2016).**

Domain	Eucaryote
Régne	Plante
Embranchment	Spermatophyte
Sous embranchment	Angiosperme
Class	Dicotylédon
Ordere	Fabale
Famille	Fabaceae
Sous famille	Faboideae
Genre	*Medicago* (L)
Espéce	*Medicago intertexta*

4. La symbiose rhizobia-légumineuses :

La symbiose signifie littéralement « vie en commun » C'est la fusion plus ou moin intime de deux êtres vivants d'espèces différentes qui correspond à une association à caractère obligatoire et à avantages réciproques et partagés, entre partenaires. Un exemple de symbiose est l'association entre une bactérie de la famille des *Rhizobiaceae* et une plante de la famille des légumineuses. Cette symbiose à bénéfice réciproque va permettre aux bactéries de profiter d'un micro-habitat exceptionnellement favorable ; les légumineuses leur procurant un apport en substrats carbonés issus de la photosynthèse. En échange, les bactéries vont fixer et réduire l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes hôtes **(Bapaume et Reinhardt, 2012 ; Sakshi et Naveen Kumar, 2013).**

Cette association est reconnue depuis plus de 60 million d'années d'évolution **(wang et *al*,. 2017)**. Elle est très fréquente dans les *Papilionoideae*, moins fréquente dans le clade *mimosoïde* et rare dans le reste du groupe *Ceasalpinoideae* **(Andrews et *al*,. 2018).**

Cette communication entre les deux partenaires joue un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles.

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobium-légumineuse est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de rhizobium donnée n'est capable en général d'établir une relation symbiotique efficace, qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de rhizobium **(Tilak *et a*,. 2005 ; Hansen et *al*,. 2017).**

La spécificité Rhizobia-hôte est probablement déterminée lorsque chaque souche de Rhizobia s'attache aux poils absorbants de son légumineuse, elle doit nécessiter une sorte de reconnaissance entre le symbionte et l'hôte. Cette association noue un dialogue sous la forme de message chimique entre les deux partenaires détaillé dans les étapes de la nodulation.

Tableau 4 : spécifié de la symbiose Rhizobia /légumineuses (**Krishnan, 2006).**

Rhizobia	hôte commun	Reference
Allorhizobium undicola	*Neptunianatans*	De Lajudie et *al*., 1998
Azorhizobium caulinodans	*Sesbania rastrata*	Dreyfus et *al*., 1988
Bradyrhizobium japonicum	*Glycine max*	Jordan, 1980
B. elkanii Glycine	*Glycine max*	Kuykendall et *al*., 1992
Mesorhizobium loti	*Lotus species*	Jarvis et *al*., 1982
		Jarvis et *al*., 1997
M. ciceri	*Cicerarietinum*(chickpea)	Nour et *al*., 1994
		Jarvis et *al*., 1997
M. mediterraneum	*Cicerarietinum*(chickpea)	Nour et *al*., 1995
		Jarvis et *al*., 1997
M. huakuii		Chen et *al*., 1991
,	*Astragalussinicus*	Jarvis et *al*., 1997
Rhizobium leguminosarum		Frank, 1879
biovar*viciae*	*Pisumsativum*	Laguerre et *al*., 1996
biovar*trifolii*	*Trifolium repens*	, Laguerre et *al*., 1996
T. subteraneum	*, T. Pratense*	Laguerre et *al*., 1996

biovar*phaseoli*	*Phaseolus vulgaris*	Laguerre et *al*., 1996
R. tropici	*Phaseolu svulgaris*	Martínez-Romero et *al*.,1991
R. galegae	*Galega orientalis*	Lindström, 1989
R. giardinii	*Phaseolus vulgaris*	Amarger et *al*., 1997
Sinorhizobium meliloti	*Medicago sativa, Melilotus alba*	de Lajudie et *al*., 1994
Sinorhizobium fredii		Scholla&Elkan, 1984;
Sinorhizobium sp	*NGR234* *Vignaunguiculata*	Chen, et *al*., 1988
		Trinick, 1973

5. Intérêts des rhizobia :

Le rôle principal des rhizobia est la conversion de l'azote atmosphérique en ammoniac, grâce à un processus de réduction à forte intensité énergétique. **(Naveen Kumar, 2013)** Les rhizobiums ont la capacité d'établir des interactions symbiotiques avec 100 légumineuses d'importance agricole contribuent près de la moitié de la quantité annuelle de fixation biologique de l'azote (BNF), entrant dans les écosystèmes du sol, ils fournissent un moyen facile et peu coûteux d'améliorer la fertilité des sols et la productivité agricole (**Hansen et *al*., 2017).**

6. Etapes de nodulation :

Le processus d'infection et de formation des nodules est divisé en quatre étapes majeures : la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence **(Benselama, 2015).** Les quatre étapes de nodulation sont illustrées dans la (figure 07).

6.1. Phase de pré-infection :

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère et la croissance des bactéries se fait d'une manière sélective par la plante. En effet le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en ions ammonium (NH4+), les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines **(Patriarca et *al.*, 2004 ; Kazmierczak et *al.*, 2019).**

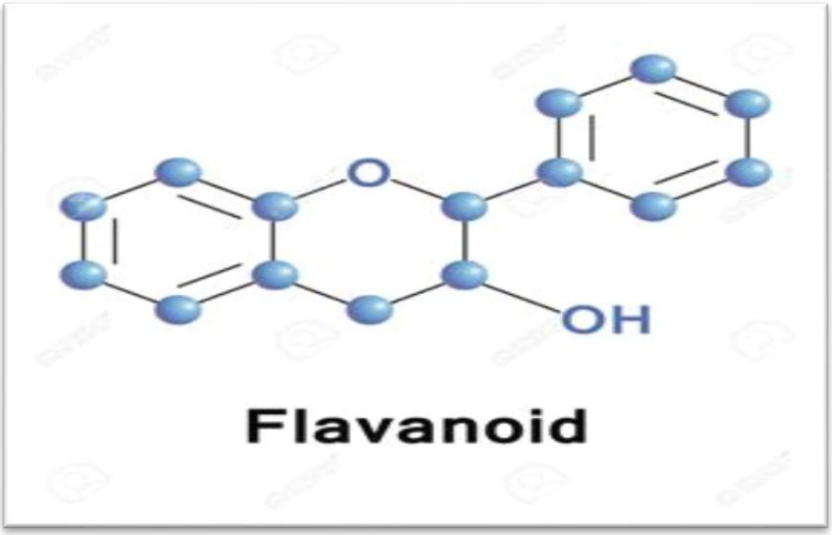


Figure 5 : la structure chimique de flavonoïdes **(Shutter Stock, 2020)**

Ce signal présent dans les exsudats racinaires une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitinooligosaccharides ou LCO) **(Dénarié, 2000 ; Gage, 2004)** (figure 6) ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante **(Patriarca et *al*., 2004)**. Les rhizobiums différents dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte. Les facteurs Nod induisent des modifications 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 (Figure 7, phase 1).

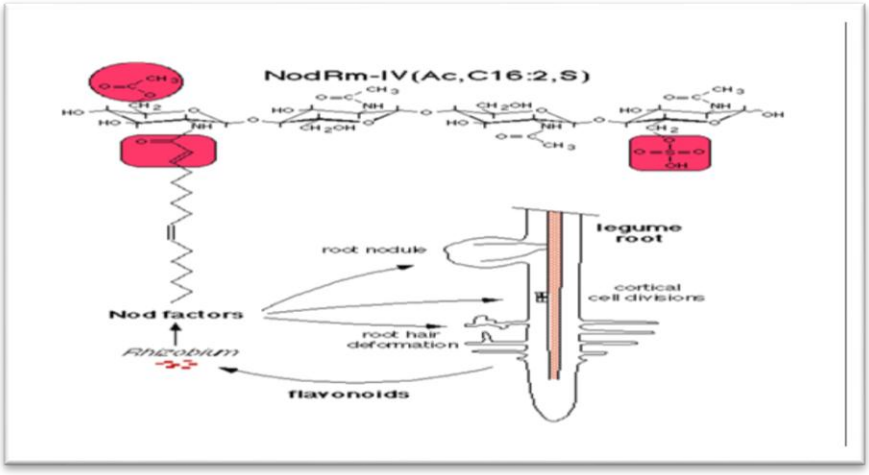


Figure 6 : l'expression de gènes Nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod **(Boudanga, 2004).**

6.2. Phase de l'infection et de la formation des nodules :

A partir de cette niche, les rhizobia pénètrent dans la cellule végétale par la formation d'un cordon d'infection qui traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures **(Gage, 2004 ; Choudhury et Pandy, 2018)** (Figure 7, phase 2).

Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire. Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules arrêtent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréduplication. Elles sont alors envahies par des rhizobia qui sont relâchés des cordons d'infection **(Choudhury et Pandy, 2018)**. Ensuite, la pénétration de la bactérie est faite par endocytose.

Finalement, les cellules végétales infectées et les bactéries infectantes se différencient en cellules capables de fixer et d'assimiler l'azote. La structure nouvellement formée, qui se compose des bactéries qui différencient en bacteroïdes enfermés dans une membrane de cellules de la plante, s'appelle un symbiosome (Figure 7, phase 3 et 4).

6.3. Phase de fonctionnement ou maturité des nodules :

L'infection de la plante par les rhizobia induit la différenciation et la division des cellules du cortex **(Foucher et Kondorosi., 2000 ; Oldroyd, 2013 ; Meilhocet *al.*, 2013).** Les nodules de type indéterminé (Medicagotruncatula, Pisumsativum, Vicia faba) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (Glycine max, Phaseolusvulgaris) 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 l'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 **(Montiel et *al.*, 2016).**

Quand le système racinaire se développe, d'autres régions pouvant être infectées sont continuellement formées. Mais une fois que les nodules sont fonctionnels, la nodulation est inhibée dans les autres parties jeunes. Dans ce cas les plantes contrôlent le nombre de nodules en maintenant un certain équilibre : bénéfice (fixation d'azote) / coût (ressources de carbone) **(Stacey et *al.*, 2006).**

Cette autorégulation est réalisée par des signaux moléculaires émis par la partie racinaire ainsi que par des phytohormones (ex : l'acide abscissique) produits au niveau des tiges **(Oka-Kira et Kawaguchi 2006).**

6.4. Phase de dégénérescence :

L'étape finale dans le processus d'infection se déroule lors de la lyse des bactéroïdes et de la libération des bactéries dans le sol **(Benselama, 2015 ; Chhudery et pandy 2015).**

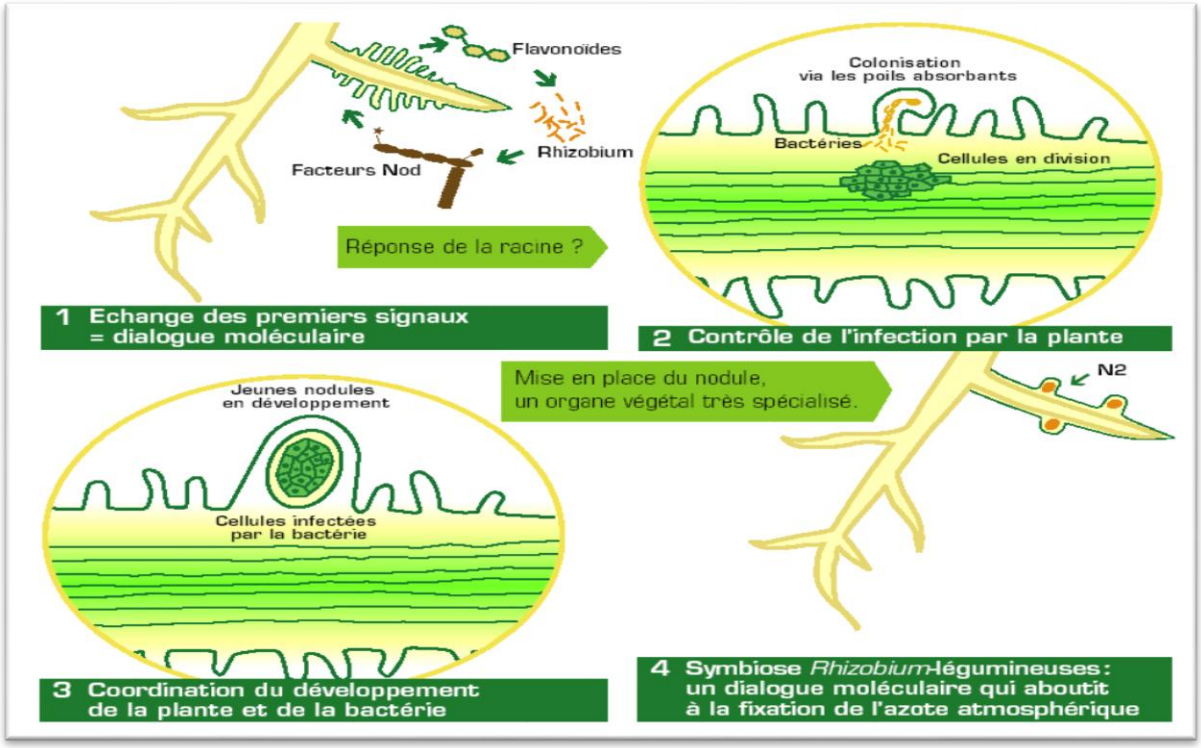


Figure 7 : les différentes étapes de la nodulation **(Ben Friha, 2008).**

1 : Communication Rhizobium-légumineuse. Les bactéries vont percevoir les flavonoïdes sécrétés par les tiges des plantes et vont y répondre spécifiquement en synthétisant des facteurs Nod.

2 : Les facteurs Nod vont agir au niveau des racines et permettre l'entrée des bactéries dans les racines et leur colonisation, contrôlée par les cellules de la plante.

3 : L'infection des cellules par les bactéries va conduire à la formation d'un nodule, organite rempli de bactéries différenciées en bactéroïde (bactéries fixatrices d'azote).

4 : Les nodules vont permettre la fixation d'azote atmosphérique par les bactéroïde au bénéfice de la plante, et l'apport de nutriments pour les bactéries via la plante.

Chapitre II : Méthode d'isolement et caractérisation des rhizobiums

1. Collection et extraction des Rhizobiums :

1.1. La zone d'étude :

La wilaya de Médéa est située Au Nord d'Algérie à 88 km à l'Ouest de la capitale, Au cœur de l'Atlas Tellien, elle est caractérisée par une altitude élevée de 981 m, de climat sub semi-aride. Notre étude porte essentiellement sur la région de Médéa, et plus précisément dans les 4 sites (pole, kouala, loudi, talaiche).



Figure 8 : Localisation géographique de la zone de prélèvement **(WIKI MONDE, 2020).**

1.2. Collection et extraction des nodules :

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante *Medicago intertexta* est en pleine activité 3(phase florissante), la récolte est effectué selon les clés de détermination morphologique durant le mois de novembre et mars d'appris les saisons pluviale. A cette période de l'année, les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines. Elles sont d'une couleur rougeâtre, et peuvent indiquer la présence de la lèghémoglobine et l'activeté fixatrice d'azote. La collecte est réalisée selon la technique préconisée par **Vincent (1970)**. Il s'agit de :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire sans l'abimer (figure 9).

- Se débarrasser de la terre manuellement au niveau des racines sans endommager les nodules.

- Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique.

- Répéter l'opération sur plusieurs pieds pour avoir le maximum de nodules.

- Au laboratoire, enlever la partie aérienne, et laver la partie racinaire soigneusement à l'eau courante.

- Couper les nodules à 2 mm du site d'attache et sécher les avec du papier absorbant.



Figure 9 : les étapes de la collection des nodules de la plante *Medicago intertexta* (photos personnelles)

Les nodules sont détachés de la racine à l'aide d'un bistouri, il est important de couper à quelques millimètres de leur site d'attache, ceci pour les maintenir intacts car dans le cas contraire, il y aurait un risque de les endommager en rompant leur cortex, ce qui réduit les chances d'obtenir des cultures viables.



Figure10 : l'extraction des nodules de la plante *Medicago intertexta* (photo personnelle).

1.3. Conservation des nodules :

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

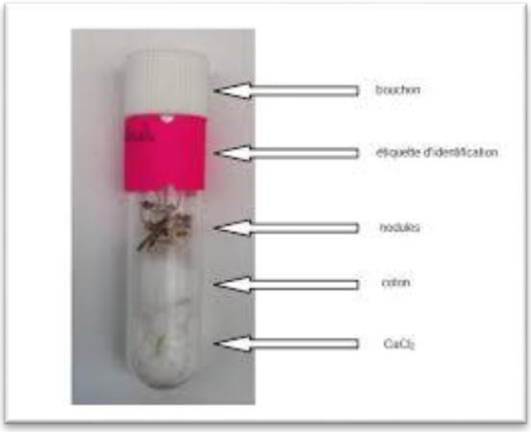


Figure 11 : Nodules conservés sous $CaCl_2$ **(Boukhiet, 2016).**

2. Collection et isolement des souches rhizobiennes :

Le milieu solide (YEMA) qui serve pour la caractérisation biochimique morphologique et des milieux liquides (YEMB) serve pour la production de biomasse et étude de croissance par la méthode de densité optique.

2.1. Milieux d'authentification de culture des rhizobia :

On utilise les milieux suivants : YEMA, YEMB, YEMA + Rouge Congo, voir (l'annexe II).



Figure 12 : ajustement de pH de milieu par pH mètre (photo personnelle)

2.2. Isolement et purification des souches rhizobinnes :

2.2.1. Stérilisation et écrasement des nodules :

Les bactéroïdes sont extraits à partir de 9 à 15 nodules dans des conditions stériles à l'aide d'une tige en verre stérile. Les nodules subissent les traitements suivants :

- Immersion dans l'éthanol 90° pendant 30 secondes.

-Traitement des nodules dans une solution de HgCl, à 0.1% pendant trois minutes. Pour éliminer le plus de bactéries possibles de la rhizosphère

- Lavage des nodules par dix bains d'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces HgCl2 hautement toxique.

- Ecrasement des nodules dans 0,5 ml d'eau physiologique stérile à 0,85% de NaCl. L'extrait est utilisé tel quel ou dilué à 1/10 s'il présente un aspect laiteux.



Figure 13 : les solutions utilisées dans la stérilisation des nodules (photo personnelle).

2.2.2. Culture sur le milieu YEMA :

A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le broyat nodulaire prévalent stérilisé est étalé sur boite de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu YEMA additionné de rouge Congo (0.025%). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière d'avoir des colonies isolées et donc facile à caractériser (**Vincent, 1970)**.

Les boites sont scellées avec du parafilm et incubées à 28°C pendant 48 à 72 heures à étuve bactériologique.

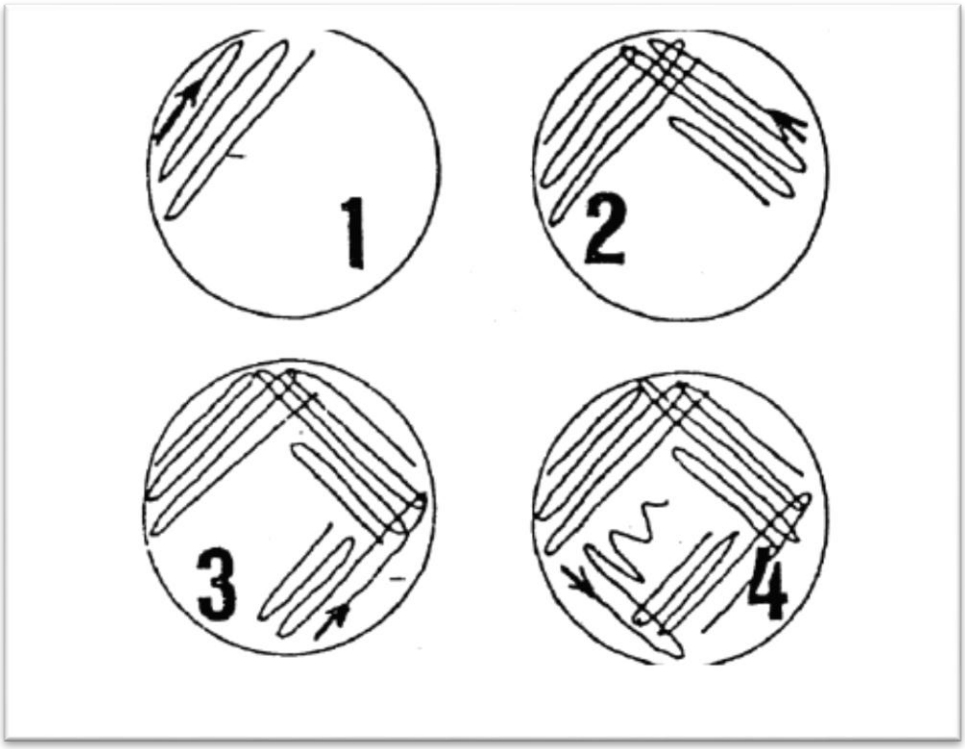


Figure 14 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans **(Vincent, 1970).**

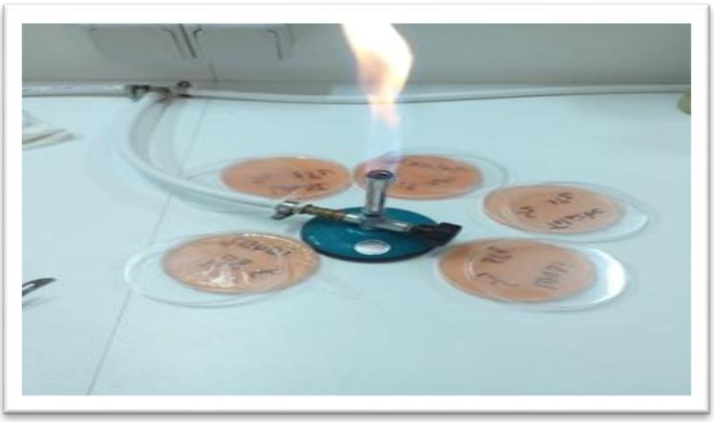


Figure 15 : l'ensemencement de broyat nodulaire (photo personnelles).

2.2.3. Purification des souches :

Après incubation, seules les colonies ayant peu ou pas absorbé le rouge Congo seront repiquées, La purification des souches bactériennes est vérifiée par des repiquages successifs par la technique d'épuisement sur milieu YEMA RC. Ces souches sont incubées à 28 C° pendant 48 à 72 heures. La pureté des souches est confirmée par l'observation de l'aspect macroscopique et microscopique.

2.2.4. Conservation des souches :

Les isolats purifiés sont conservés selon procédés suivantes :

Pour une courte durée, nous les repiquons sur le milieu YEMA incliné ; en effectuant des stries régulières sur la surface (figure 16). Après 48h à 3 jours d'incubation selon la vitesse de croissance des isolats, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4°C, à raison de plusieurs exemplaires par souche selon la méthode de **(Vincent, 1970)**. Des repiquages réguliers sont réalisés tous les 6 mois.

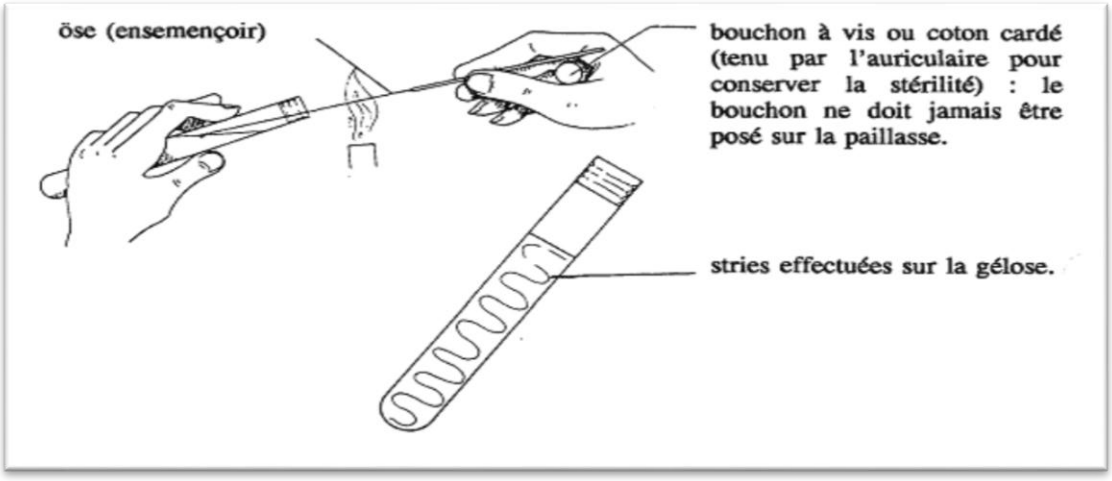


Figure 16 : Repiquage sur tube gélose incliné (YEMA) d'après **(Vincent ,1970).**

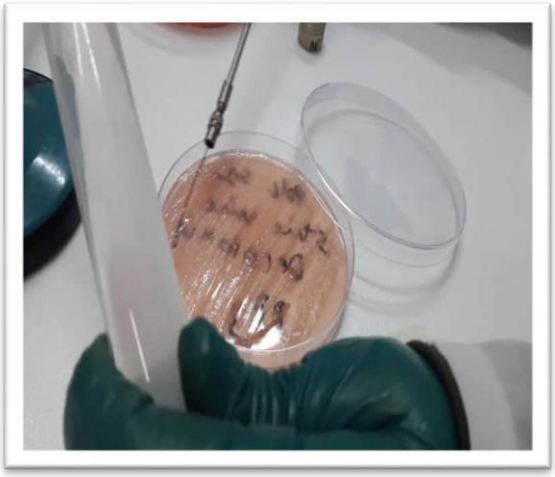


Figure 17 : repiquage de rhizobium sur tube inclinées YEMA (photo personnelle).



Figure 18 : l'Obtention des colonies pures **(**photo personnelles)

2.3. Caractérisation phénotypique :

2.3.1. Examen macroscopique :

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, la durée et la température de l'incubation.

Aspect des colonies : La description des colonies doit mentionner les éléments suivants :

*La taille (diamètre de la colonie) : mesuré à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies.

*La forme (l'élévation) :

- vue en coupe : (bombée, Plate, ombiliquée, à bord surélevés)
- vue par-dessus : (ronde, à bord dentelés, en étoile)

*L'aspect de la surface : il peut être lisse, rugueux.

*L'opacité : les colonies sont décrites comme : Opaque (ne laisse pas passer la lumière), Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers) et Transparents (laissent passer la lumière et voir la forme au travers).

Les colonies de Rhizobium apparaissent soit blanchâtres et translucides soit roses avec synthèse de polysaccharides d'aspect gommeux. Les bactéries contaminantes absorbent fortement le rouge Congo, ce qui permet de les distinguer de Rhizobium (**Tahkoubit, 2018).**

Test de la vitesse de croissance :

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobiums, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium, Sinorhizobium*, …). Pour cela on cultive nos isolats et les souches de référence sur milieu YEMA + bleu de bromothymol **(Boukhiet, 2016).**

Test au bleu de bromothymol (BTB) :

Le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique. Une réaction acide se traduit par le changement de couleur du bleu vers le jaune, par contre la réaction basique se montre par le renforcement de la couleur bleu.

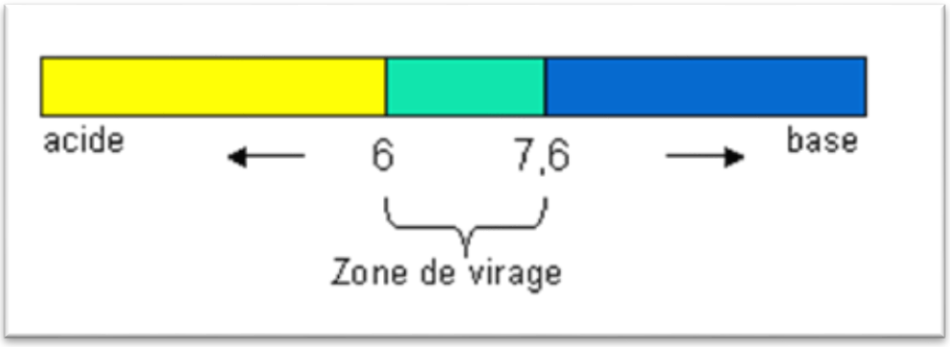


Figure 19 : Virage de Couleur de bleu de bromothymol.

Lecture des résultats :

- croissance rapide acidifie le milieu qui va apparaitre jaune.

- croissance lente alcalinise le milieu qui va apparaitre bleu.

2.3.2. Examen microscopique :

Dans notre étude, on a effectué la coloration de Gram. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier. Son avantage est les classer en deux grands groupes : bactéries dites Gram positive et bactéries dites Gram négative (Annexe III).

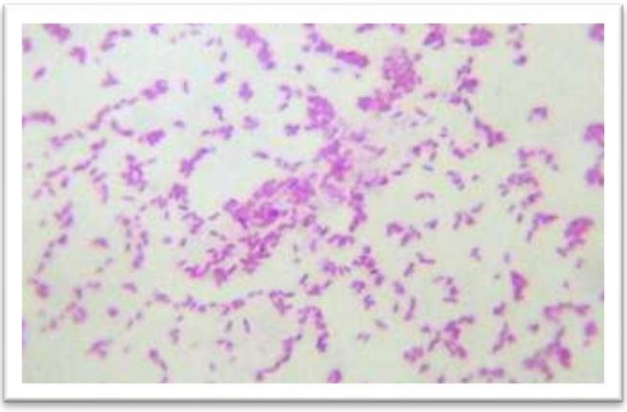


Figure 20 : aspect microscopique de rhizobium (photo personnelles).

L'Observation au microscope optique des souches montre des cellules ayant une forme de petites bâtonnets mobile et Gram négative.

2.4. Caractérisation biochimique (galerie API 20 E) :

Préparation et inoculation de galerie :

Après avoir préparé les cultures des dix souches sur un milieu YEMB, nous avons appliqué le protocole comme suit :

- D'abord la répartition de l'eau distillée dans les alvéoles pour reconstituer les milieux.

- Remplir les cupules de la galerie par une suspension bactérienne à l'aide d'une micropipette en évitant les bulles d'air.

- Concernant les trois tests soulignées GLU, ADH, URE, un remplissage de l'huile de Paraffine a été ajouté pour former un ménisque convexe.

- Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

-. Les galeries inoculées sont incubées à 28°C.

- La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture trouvé en (annexe IV).

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs comme dans le cas des deux tests NO3 et TRP **(MOUHOUS, 2018).**



Figure 21 : Galerie API 20NE **(Tahkoubit, 2018).**

2.5. Etude et Caractérisation physiologique :

2.5.1. Effet de stress salin :

Le milieu utilisé pour réaliser ce test est le YEMA additionné avec différentes concentrations de NaCl : (50 mM), (100 mM), (200 mM), (300 mM), (400 mM), (600 mM). Les boites sont incubées à 28 °C pendant une semaine. La valeur de la croissance est obtenue par lecture de la densité optique (DO) à 630 nm, Après incubation **(Dekak, 2010).**

Il faut noter que le taux de survie de culture en présence de stress est évalué par le pourcentage de survie calculé comme selon équation suivante :

$$x\% = \frac{\mathrm{DOo} - \mathrm{DONaC}}{\mathrm{DOo}}$$

Tel que :

DOo est la densité optique milieu contrôlé sans addition de NaCl.

DO NaCl est la densité optique obtenu sur milieu de culture additionné d'une concentration définie de NaCl.

2.5.2. Effet de stress de pH :

Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des isolats à tolérer des pH extrêmes. Les isolats et les souches références sont cultivés sur le milieu YEMA ajusté à différents pH : 4,0 ; 5,0 ; 6,8 (témoin) ; 8,0 et 10. Trois répétitions sont réalisées pour chaque pH. L'évaluation de la croissance est effectuée par la mesure de la densité optique à 600 nm après incubation à 28°C pendant 24h, 48h et 72h **(Baba Arbi, 2016).**

2.5.3. Effet de stress thermique :

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YEMA solide à différentes températures : 4 ; 28 ; 37 ; 40 ; 42 et 45 °C **(Ceriet, 2015).**

2.5.4. Résistance aux antibiotiques :

Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition sur boîtes de Pétri du milieu YEMA :

- 0.5 ml de chaque suspension préparée à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle a été inondé à la surface du milieu YEMA en boîtes, le liquide en excès a été éliminé.

- Les boîtes ont été laissées pour sécher pendant 30 min avant de placer les disques d'antibiotiques suivants : streptomycine (30 µg), ampicilline (30 µg), chloramphénicol (30µg), tétracycline (30 µg), acide nalidixique (30 µg), kanamycine (30 µg).

- Les boites ont été incubées à 28°C pendant 5 jours **(Baba Arbi, 2016)**.

Lecture des résultats :

Si $Ø > D$ implique que la souche est sensible.

Si $d < Ø \leq D$ implique que la souche a une sensibilité intermédiaire.

Si $Ø < d$ implique que la souche est résistance.

Ø : Diamètre de la zone d'inhibition.

D et d : diamètre de référence fournie par un organisme officielle (société française d'antibiogramme), D et d correspondent respectivement aux concentrations critiques inferieur et concentrations critiques supérieur, détermine dans le plasma humain.

Chapitre III :
L’effet de stress salin

1. Les différents stress abiotique influençant les plantes :

Le terme « stress » défini l'ensemble des perturbations biologiques provoquées par une agression quelconque sur un organisme. C'est un processus qui induit une contrainte potentiellement néfaste sur un organisme vivant **(Benkoli et Bouzeghaia, 2016).**

On distingue deux catégories de stress :

Stress abiotique : provoqué par des facteurs de l'environnement physicochimique comme la salinité, la sécheresse et la température défavorable.

Stress biotique : causé par des organismes vivants tels que les insectes, les bactéries et les champignons **(Benkrinah et *al.*, 2018).**

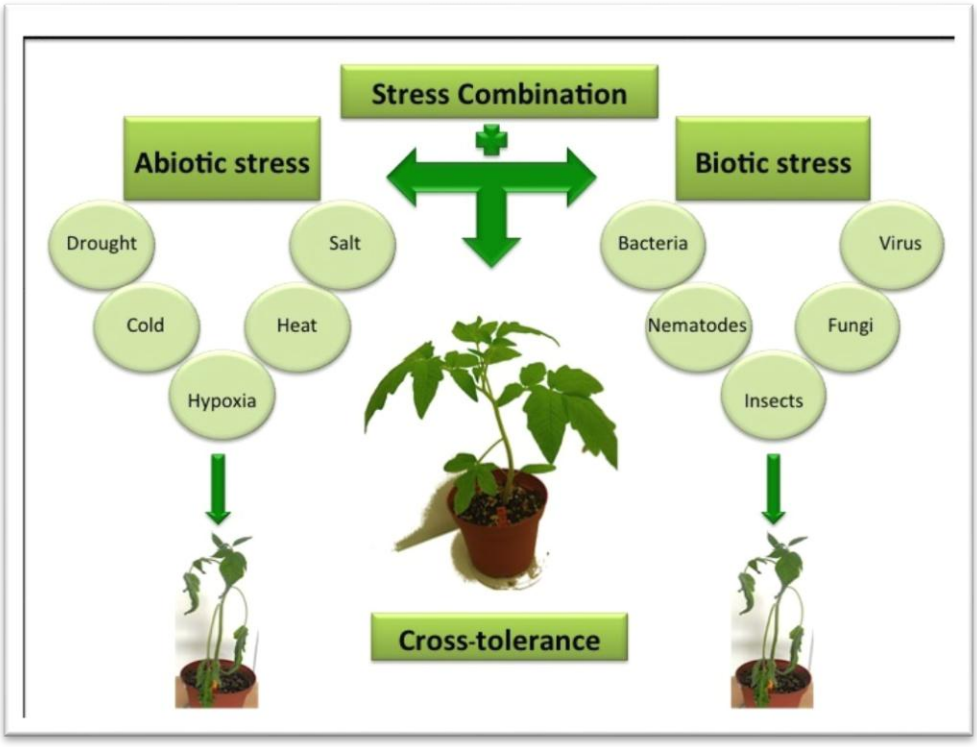


Figure 22 : les différent stress affectant la plante **(unine, 2020).**

Les stress biotique et abiotiques sont les contraintes majeures à la croissance et à la productivité qui cause une importante perte de récolte liées à la sécurité alimentaire autour de monde **(Hasanuzzaman et *al.*, 2019).**

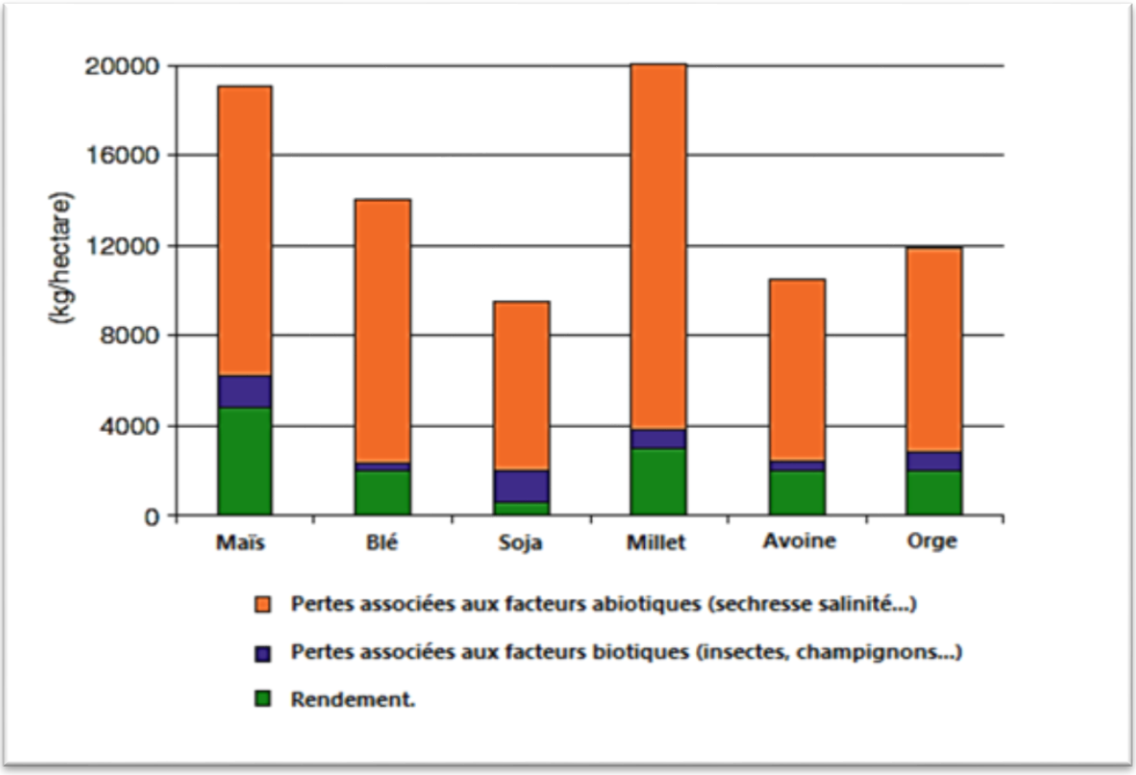


Figure 23 : pertes agricoles dues aux facteurs biotiques et abiotiques au niveau planétaire **(Ashraf et *al.*, 2012).**

1.1. Définition de stress abiotique :

Les facteurs abiotiques sont ceux liés à l'action du non-vivant sur le vivant, ils sont dû Principalement à des facteurs environnementaux. **(lezzar et Meziani, 2015)**.

Les stress abiotiques sont l'ensemble des stress n'étant pas directement provoqués par des êtres vivants. Ces stress ont deux origines différentes : la composition du sol avec l'ensemble des carences ou les excès possibles en certains éléments, et les conditions climatique, par exemple des périodes des sécheresses. **(Pesesse, 2018)**.

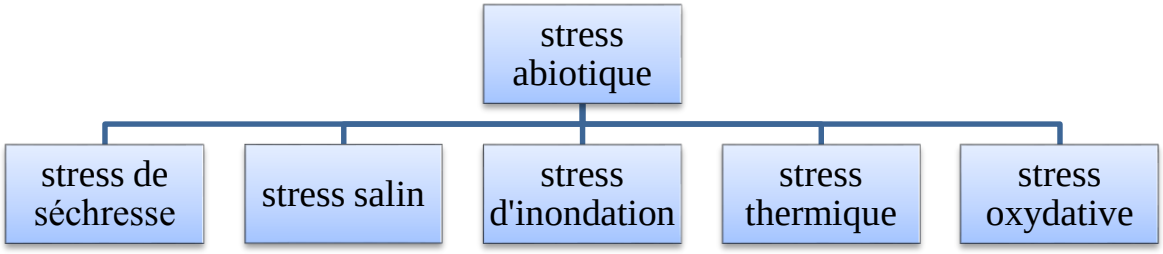


Figure 24 : les différents stress abiotique influençant la plante **(Ahmad et Hossain, 2017).**

1.2. La sècheresse :

L'eau est le principal constituant de tous les organismes vivants et requis par toutes les formes de vie connues, en tant que milieu pour les activités biochimiques **(Hasanuzzaman et *al.*, 2019).**

La sécheresse est décrite comme un phénomène naturel dans lequel les précipitations chutent de façon significative moins que les niveaux normaux enregistrés. la sécheresse est causé par une déficit d'eau, de température élevée et de rayonnement solaire élevé déclenchant un déclin de taux d'assimilation du CO_2, réduction de la taille des feuilles, expansion des tiges, prolifération des racines.***(*Kumar Tripathi et *al.*, 2020)**

1.3. Stress thermique :

Pour effectuer sa croissance et son développement, chaque plante exige une gamme bien particulière de températures. Chaque plante possède une température optimale de croissance et de développement, Lorsque la température avoisine se limites, la croissance diminue et au-delà elle s'annule **(Haichour, 2009 ; Hatfield et Prueger, 2015 ; Kumar Tripathi et *al.*, 2020).**

Le stress thermique est souvent défini quand les températures sont assez hautes ou basses pendant un temps suffisant pour qu'elles endommagent irréversiblement la fonction ou le développement des plantes. Elles peuvent être endommagées de différentes manières, soit par des températures basses ou élevées de jour ou de nuit, par l'air chaud ou froid ou par les températures élevées du sol. La contrainte thermique est une fonction complexe qui varie selon l'intensité (degré de la température), la durée et les taux d'augmentation ou de diminution de la température. **(Oukarroum, 2007).**

On appelle températures critiques, les températures minimal et maximal au-dessous et au-dessus desquelles le végétal est tué. Elles sont extrêmement variables suivant les espèces et selon le stade de végétation.

1.4. Stress Salin

Le stress salin est l'un des principaux stress abiotiques qui affectent la croissance et le rendement des cultures. Il y'a au moins 800 millions d'hectares des terres soumises à la salinité dans le monde, jusqu'à 6 % de la superficie totale. On n'estime que 30 % des zones irriguées dans le monde offrent déjà de problèmes de salinité. Chaque année, la salinité des sols augmente dans le monde entier, à cause de l'impact du changement climatique mondial, l'irrigation avec des eaux de mauvaise qualité, l'utilisation de pesticides, engrais chimiques et les techniques agricoles traditionnelles avec un mauvais drainage Le fort ensoleillement et la faible pluviométrie font

accumuler les sels dissous en surface. Ces accumulations transforment profondément les propriétés physique et chimique du sol avec pour conséquence principale un milieu qui devient non productif voir stérile **(Egamberdieva et Lugtenberg, 2014).** Il est prédit qu'elle causera une perte allant jusqu'à 50% des terres cultivables en 2050. **(Ramakrishna et Gill, 2019).**

Le chlorure de sodium constitue le principal agent responsable du stress salin chez les plantes, son effet peut être observé par la diminution de la croissance ou même la mort de la plante. La salinité du sol provoque le stress chez la plante soit en rendant difficile le captage de l'eau par les racines ou bien par toxicité via l'accumulation d'une grande concentration de sel dans la plante. De plus, la salinité peut affecter la synthèse protéique, la photosynthèse et les métabolismes lipidiques **(Rojas-Tapias et *al.*, 2012 ; Rai, 2017)**

La salinité du sol est déterminée par la mesure de la conductivité électrique (CE) exprimée généralement en décisiemens par mètre (dS/m) qui traduit la capacité d'une solution aqueuse à conduire le courant. La conductivité électrique des solutions de sols saturés en sel est supérieure à 4 dS/m, l'équivalent de 40 mM de NaCl **(Slimani, 2012).**

Tableau 5 : les niveaux des stress salin et sodique **(Gregory, 2005).**

	Faible	Moyen	Fort	Extrême
CEe (dS/m)	< 2	2 à 4	4 à 8	> 8
SARe	< 4	4 à 8	8 à 12	> 12

2. La physiologie de stress salin :

La salinisation des terres est à 80% d'origine naturelle, on a :

2.1. La salinité primaire :

La salinité primaire ou naturelle est le résultat de l'accumulation des sels sur une longue période de temps, dans le sol ou les eaux souterraines **(Antipolis, 2003)**, elle est causée par trois processus naturels. Le premier est l'altération des roches mères contenant des sels solubles. C'est le processus d'altération des roches qui se décomposent et libèrent des sels solubles de divers types, principalement les chlorures de sodium qui est le plus soluble **(Li et *al.*, 2006)**, de calcium et de magnésium, et avec moins de quantité, les sulfates et les carbonates **(Mermut et Arshad, 1987 ; Saâdane El Boukhari, 2018 ; Mohd Sayeed, 2019).**

Le deuxième est le dépôt des sels océaniques par le vent et la pluie. «Sels cycliques" qui sont des sels de l'océan amenés par le vent et déposés par la pluie, qui sont principalement les chlorures

de sodium. L'eau de pluie contient de 6 à 50 mg de sel par kg d'eau, la concentration des sels diminue avec l'éloignement de la côte. La quantité de sel stocké dans le sol varie en fonction du type de sol, elle est faible pour les sols sableux et élevée pour les sols argileux. Elle est également inversement proportionnelle à la pluviométrie moyenne annuelle (**El Boukhari, 2018).**

2.2. Salinité secondaire

La salinisation secondaire est le résultat des activités humaines qui modifient l'équilibre hydrologique du sol entre l'eau appliquée (irrigation ou pluie) et l'eau utilisée par les cultures (transpiration). Les causes les plus communes sont le défrichement et le remplacement de la végétation pérenne par les cultures annuelles, ainsi que les systèmes d'irrigation utilisant l'eau riche en sels ou ayant un drainage insuffisant **(Antipolis, 2003)**. Dans de nombreuses zones irriguées, le niveau des nappes phréatiques a augmenté en raison de la quantité excessive d'eau appliquée associée à un mauvais drainage. Dans la plupart des projets d'irrigation situés dans les zones arides et semi-arides, les problèmes de l'engorgement et la salinisation du sol ont atteint des proportions graves. La plupart des systèmes d'irrigation du monde sont à l'origine de la salinité secondaire, la salinisation ou l'engorgement. (**El Boukhari, 2018**).

3. Les réponses au stress salin chez la microsymbiote (rhizobia) :

Les stress infligés aux bactéries induisent par ailleurs des phénomènes considérés aujourd'hui comme des adaptations physiologiques aux conditions agressives du milieu ce sont surtout des synthèses de protéines originales (les protéines de stress ou protéines de choc)**.**

3.1. Les protéines de stress (chaperon) :

3.1.1. Définition et déférents types de protéines de stress :

Les chaperons sont un groupe de protéines qui ont une similitude fonctionnelle et aident au repliement des protéines. Le terme chaperon, d'origine française, fut proposé par John Ellis et Sean Hemmingsen. Ce sont des protéines qui ont la capacité d'empêcher une agrégation non spécifique en se liant à des protéines non natives. Il existe plusieurs familles de chaperons et chacune possède des fonctions différentes. Les «protéines de choc thermique» (Hsps) sont des exemples de protéines chaperons. Qui protègent les cellules de l'effet d'un stress, De manière générale, ces protéines sont produites dans des conditions stressantes. Le nom Hsp a été donné après la découverte de ces protéines dans une bactérie. Ces bactéries ont produit plus de ces protéines dans des conditions stressantes, telles que des températures plus élevées, des variations de pH et des conditions hypoxiques. **(Wirth et *al.*, 2003)**.

3.1.2. Intérêt et rôle de protéine de stress :

Les protéines chaperon jouent un rôle important dans le pliage des protéines et dans la protection des cellules contre plusieurs contraintes associées aux structures tridimensionnelles indigènes des protéines. Leur production est significativement élevée dans un phénomène connu sous le nom de réponse de choc thermique. **(Morange, 2000 ; Durante et Colucci, 2010),** Cela garantit inévitablement que les protéines se plient correctement et donc maintenir la fonctionnalité.

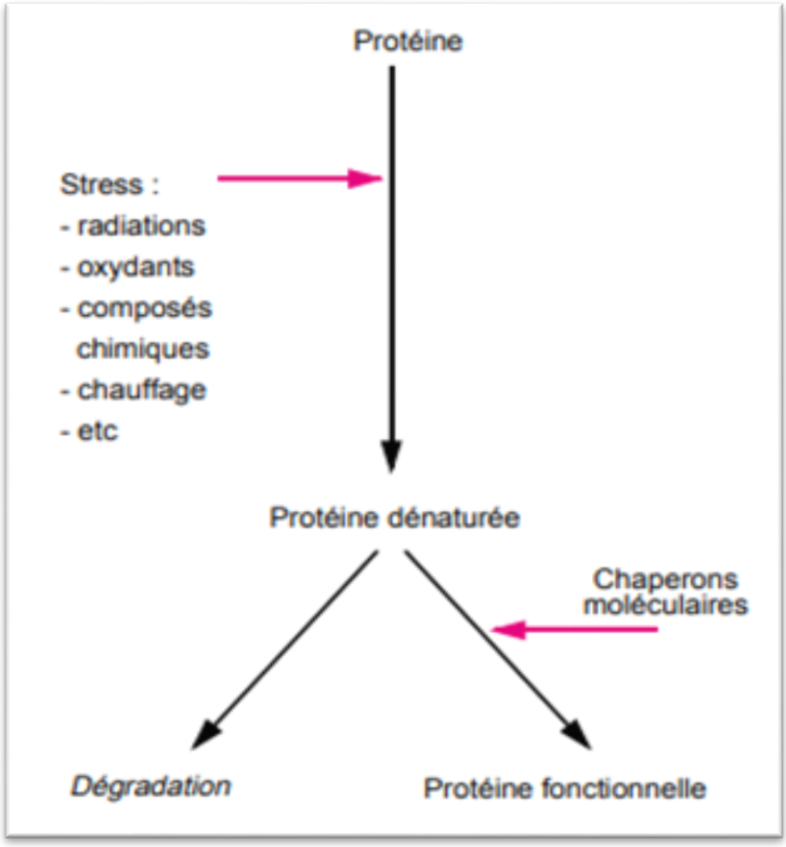


Figure 25 : effet du stress et rôle des HSP **(Morange, 2000).**

3.1.3. Classification de protéines de stress :

Les Hsp sont divisées en cinq familles en fonction de la taille des protéines produites : les Hsp70 (DnaK), les Hsp60, les Hsp90, les Hsp100 (Clp) et les sHsp (smallHsp) dont la taille varie (<40 kDa) **(Drai, 2012).**

Wang et *al* (2004) indique que Les protéines de stress sont classés à plusieurs catégorie selon leurs poids moléculaire, chaque catégorie comporte plusieurs familles assurent différents rôles physiologiques (tableau 6).

Tableau 6 : classification de protéines de stress **(Wang et *al., 2004).***

Empalassent	chaperon	Rôles
Famille Hsp70 Cytosol procaryote	**DnaK** cofacteurs **DnaJ, GrpE**	Stabilise les polypeptides nouvellement synthétisés et préserve la compétence de repliement, réactive les protéines dénaturées par la chaleur, contrôle la réponse au choc thermique
Hsp 60 famille chapronines Cytosol procaryote	**GroEL/ GroES**	Repliement des protéines, y compris le facteur d'élongation, ARN polymérase Requis pour l'assemblage des phages
Petites protéines de choc thermique (hsp25)		protéger contre le stress cellulaire, empêcher l'agrégation dans le cristallin (cataracte)

3.1.4. Méthode d'extraction des protéines de stress :

Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 2100 g pendant 15 min à 4 °C, lavé avec l'eau et centrifugé à 15 000 g pendant 20 min à 4 °C, et remise en suspension dans 200 µL de tampon d'échantillon **(Hames et Rickwood, 1981)**. Les échantillons ont ensuite été soniques 1 min et soumis à 95 °C pendant 3 min. Les lysats ont été centrifugés à15 000 g pendant 20 min à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été recueilli et utilisé pour la séparation des protéines par électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate de sodium et de polyacrylamide (SDS-PAGE), réalisée en gels bis-Tris préfabriqués.

3.1.5. Purification et caractérisation des protéines de stress :

Etude des profile protéique par Electrophorèse (SDS PAGE)

Principe : L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel sous l'effet d'un champ électrique. La vitesse de migration dépend de la charge, la taille et la

dimension des molécules. Cette méthode de séparation, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (ou PAGE pour Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) classique, est une méthode dénaturante en raison d'aident dénaturant, (SDS ou Sodium Dodécyl Sulfate) **(Coyne et Cool, 2002)**. Dans ce gel dénaturant, le SDS, qui se lie aux protéines, est un détergent anionique qui dénature les protéines et confère une charge négative au polypeptide proportionnellement à sa longueur. Les complexes SDS-protéines qui se forment sont chargés négativement et toutes les protéines possèdent la même densité de charge. Cela signifie que dans des conditions de séparation dénaturante de SDS-PAGE le poids moléculaire apparent (et non réel) des protéines sera le seul facteur de leur séparation. Donc la migration est déterminée par le poids moléculaire et non pas par la charge intrinsèque du polypeptide **(Coyne et cool, 2002)**. La séparation des protéines d'une souche bactérienne par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) donne un profil ou électophorégramme caractéristique de la souche et reproductible si les conditions sont standardisées **(Ndiaye et coll, 2002 ; Benahmed, 2010).** Le protocole est illustré dans (L'annexeV).

3.2. Les composés compatibles :

Un osmoprotecteur, ou soluté compatible, est une petite molécule organique polaire, très soluble dans l'eau, ayant un point isoélectrique neutre (pH_i = 7), et qui agit comme osmolyte permettant à un organisme de survivre à un stress osmotique extrême. ces molécules peuvent permettre la survie des cellules dans un état de dessiccation complète appelé cryptobiose dans lequel le cytoplasme saturé d'osmoprotecteurs prend l'apparence d'un solide vitreux qui stabilise les membranes cellulaires et les protéines pour prévenir les dommages dus à la dessiccation **(Long, 2007**).

3.2.1. Définition des exopolysccharides (EPS) :

Les polysaccharides bactériens sont biosynthétisés naturellement par de nombreuses bactéries. Constitués de longues chaînes d'unités répétitives de sucres simples et/ou de dérivés de glucides plus ou moins ramifiées. Ils sont secrétés soit sous forme d'une capsule fixée à la cellule, soit sous la forme d'une gangue visqueuse en solution **(Janczarek et *al.*, 2014).**

Le terme « exopolysaccharide » (EPS) ou « polysaccharide exocellulaire »a été proposé par **(Sutherland, 1972 ; Cerning, 1994)** comme appellation générale pour ce groupe.

3.2.2. Les différents types des composés compatibles de stress salin :

Il existe différents types d'osmoprotecteurs en fonction du type de tolérance aux environnements à forte pression osmotique :

-Les diholosides (tréhalose, saccharose) et les composés soufrés (diméthylsulfoniopropionate) ne sont pas spécifiques aux organismes halophiles ou halotolérants. Les solutés de ce type s'accumulent dans le cytoplasme jusqu'à des concentrations de l'ordre de 0,5 mol·L^{-1}. Le tréhalose, en particulier, est considéré comme un métabolite du stress chez *E. coli*. **(Sussich, 2001**).

-Les polyols tels que le glycérol, l'arabitol, l'inositol.

-Les acides aminés et leurs dérivés sont typiques des organismes supportant les environnements très salés et peuvent atteindre des concentrations cytosoliques supérieures à 0,5 mol·L^{-1} ; il s'agit notamment de la proline, de l'ectoïne (un dérivé tétrahydropyrimidine) et de l'hydroxyectoïne, de la triméthylglycine, d'acides diaminés acétylés et de dérivés de la glutamine**(Mohd Sayeed, 2019).**

3.2.3. Le stress salin et la production des exopolysccharides (EPS) :

Lorsqu'ils se développent sur un milieu YEMA Les Rhizobia possèdent la propriété de former une grande quantité de polysaccharides exocellulaires solubles dans l'eau **(Salducci, 1992)**. Comme une réponse d'adaptation de rhizobia au stress salin.

Tableau 7 : l'effet de stress salin sur la production des EPS **(Tewari et Arora, 2014)**

Stress salin (Mm)	Poid sec des EPS (g/l)	Les composants des EPS
0	0.801 ± 0.01a	Glucose
100	0.811 ± 0.02a	Glucose, galactose
500	0.901 ± 0.03ab	Glucose, galactose
1000	1.010 ± 0.01b	Glucose, rhamnose
1500	1.102 ± 0.02c	Glucose, rhamnose, trehalose
1700	1.210 ± 0.01cd	Glucose, mannose, rhamnose, trehalose
2000	1.323 ± 0.03d	Glucose, mannose, rhamnose, trehalose

Les résultats son discuter et plus détaillé dans le chapitre 4.

3.2.4. Composition et classification des EPS :

3.2.4.1. Composition générale des exopolysaccharides

Les EPS sont composées de résidus glycosidiques, qui peuvent être liés de façon covalente à des substituants organiques ou inorganiques. Les sucres que l'on peut trouver dans les EPS sont extrêmement divers. Le D-glucose, le D-galactose et le D-mannose sous forme pyranosique, sont présents dans de nombreux EPS. Parmi les 6-déoxy-hexoses, le L-fucose et le L-rhamnose sont les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés **(Lakhal, 2011).**

3.2.4.2. La classification des exopolysaccharides :

Devant la grande diversité de compositions des EPS, il est difficile d'établir une classification. La nature de leurs composants permit de les diviser en deux classes : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Cette nomenclature a été proposée par **(Sutherland, 1972)**.

a. Les EPS Homopolysaccharides

Un grand nombre d'EPS microbiens, dont certains possèdent une importance industrielle, sont des homopolysaccharides. Dans lequel la chaîne du polymère se compose d'un seul type de monomère, les propriétés des homopolysaccharides peuvent varier énormément selon leur structure. Bien que seul le D-glucose compose sa chaîne, le curdlane, la cellulose et le dextrane, par exemple démontrent des comportements très différents quant-à leurs capacités épaississantes (formation du gel et solubilité). Les homopolysaccharides ont des poids moléculaires très élevés. **(Lakhal, 2011 ; Ghazali, 2013).**

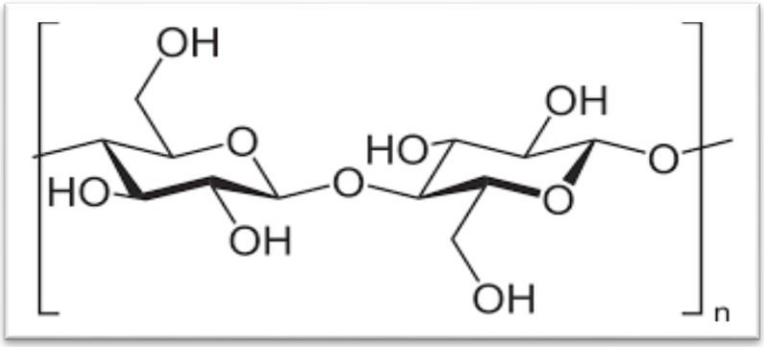


Figure 26 : structure de Cellulose homopolysaccharide **(ResearchGate, 2020)**

b. Les EPS Hétéropolysaccharides

Le groupe d'EPS le plus large et le plus diversifié qui se composent de plusieurs types d'oses constitutifs. Sont formés d'unités répétitives, variables dans leur taille (de di- à octasaccharides),

mais aussi d'autres groupes peuvent être présents, tels des groupements phosphate, amino ou acétyle. Leur production est très fréquente parmi les microorganismes et on y trouve aussi bien des souches d'un intérêt médical comme *Escherichia coli*, *Salmonella spp*. Ou *Enterobacter spp*. Que des bactéries lactiques **(Dirk Bergmaier, 2002)**. Les EPS rhizobiales sont des hétéropolysaccharides spécifiques pour chaque espèce **(Skorupska et coll, 2006 ; Lakhal, 2011).**

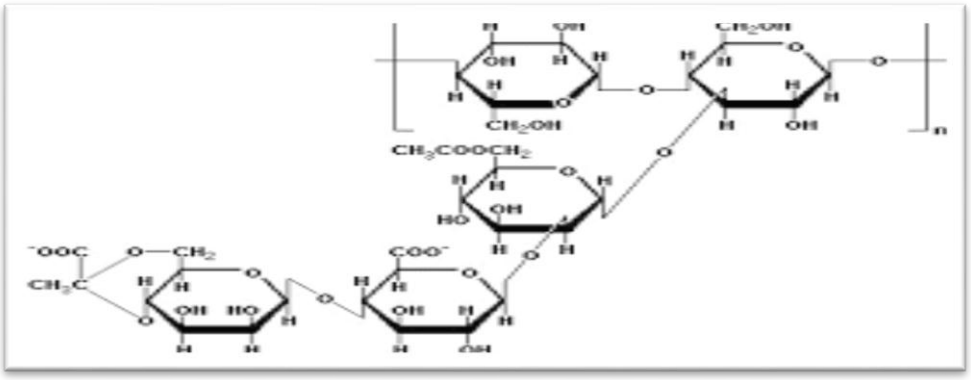


Figure 27 : structure de Xanthaneh hétéropolysaccharide **(Researchgate, 2020).**

3.2.5. La biosynthèse des exopolysaccharides :

La différence dans la composition chimique et la structure des polymères reflètent la complexité de la synthèse des polysaccharides exocellulaires à partir d'une source de carbone. La biosynthèse des hétéropolysaccharides est plus complexe que celle des homopolysaccharides.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides (exo/exs ou pss) Forment un grand groupe de gènes situé sur le megaplasmide symbiotique pSymB **(Gharzouli, 2013).**

Les protéines synthétisées par ce groupe de gènes sont de quatre types : les enzymes impliquées dans la biosynthèse des précurseurs de sucre, les transférases responsables de l'assemblage de l'unité répétitive, les enzymes responsables des substitutions non-sacharidiques et enfin celles permettant la polymérisation des unités répétitives entre elles et l'export des EPS **(Chtaihné, 2007).**

Dans le cas des homopolysaccharides, la synthèse se déroule en dehors de la cellule grâce à des enzymes excrétés par la bactérie. Par exemple les dextranes synthétisés par des bactéries (*Streptococcus* et *Leuconostoc*).

En ce qui concerne les hétéropolysaccharides, les différentes voies glycosyltransférases très spécifiques qui vont permettre la formation d'une séquence répétitive. L'unité répétitive est assemblée à la membrane cytoplasımique par addition successive d'unités glucosyle au polysaccharide.

Dans la deuxième étape, les séquences vont être ensuite exportées, Polymérisées et l'hétéropolysaccharide finalement libérées dans le milieu pour se former (**Simoes et Castro, 2001 ; Alem, 2010).**

3.2.6. Rôle physiologique et application industriel des EPS :

3.2.6.1. Rôle Physiologique et biologique :

Le rôle des EPS pour la cellule le plus souvent proposé est de nature protectrice vis à vis son environnement. La capacité de s'enrober dans une couche d'EPS avec un forte teneur en eau la rend plus résistante à la dessiccation et à la déprédation des protozoaires. La nature anionique de la couche d'EPS autour de la cellule peut aider à capturer des minéraux essentiels et des nutriments. EPS protègent les cellules contre la phagocytose. Il semble qu'il existe une relation entre l'encapsulation de la bactérie et les phénomènes de virulence. En augmentant l'hydrophobicité de la surface bactérienne, la capsule diminue sa disposition à être absorbée par les neutrophiles **(Brahimi. A et Brahimi. S, 2006).**

3.2.6.2. Le rôle symbiotique des exopolysaccharides :

Les polysaccharides extracellulaires (EPS) produits par les rhizobia sont essentiels pour l'établissement d'une fixation symbiotique d'azote avec les légumineuses **(Broughton, 2000 ; Gharzouli, 2006 ; Chataigné, 2007)**.

La fonction réelle des EPS dans la symbiose est la signalisation ils sont aussi contribuent à la fixation de l'azote en empêchant les pressions élevées de l'oxygène **(Kumari, 2008 ; Gallego, 2006),** Où l'absence des exopolysaccharides bactériens provoque chez la plante la production excessive de composés phénoliques qui colorent en brun les racines et provoquent une apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort des bactéries.

3.2.6.3. Les applications médicales des exopolysaccharides :

L'utilisation des EPS dans le domaine médical peut être liée aux propriétés physicochimiques des exopolysaccharides, en particulier leurs propriétés rhéologiques et la capacité de certains exopolymères à retenir l'eau. Ces caractéristiques ont conduit à leur utilisation en médecine en tant que substituts de plasma, de peau ou pour le transport de principes actifs. **(Baddiley et *al.*, 2008).**

a. Substituts de plasma

Les dextranes sont employés comme substituts de plasma sanguin. La majeure partie des dextranes destinés à l'utilisation clinique proviennent de la souche *Leuconostoc mesenteroides.* Les fractions utilisées ont une masse molaire de 75000 ± 25 000 g/mol **(Sutherland, 1996).**

b. Peau artificielle

Des dérivés de dextranes sont également employés pour le traitement de lésions de la peau. Ce produit réduit le dessèchement des plaies et favorise la cicatrisation.

De même la cellulose bactérienne produite par *Acetobacter xylinum* possède une forte capacité d'absorption d'eau et peut être exploitée en chirurgie comme peau artificielle provisoire pour diminuer les pertes d'eau ou pour empêcher la déshydratation des tissus. Appliquée humide, elle semble, après brûlure, activer la croissance des cellules de la peau humaine. (**Lakhal, 2011).**

c. Transport de principes actifs

Les exopolysaccharides de la famille des gellanes ont la propriété de former des gels en solutions aqueuses, ces polymères sont utilisés pour le transport de principes actifs dans la région oculaire **(Meseguer et *al.*, 1996 ; Carlfors et *al.*, 1998).** Les gellanes servent également à la libération progressive de médicaments. D'autres applications concernent leur utilisation Comme agent gélifiant pour des produits d'hygiène corporelle (cosmétiques, dentifrices…) **(Sutherland, 1998).**

3.2.6.4. L'industrie alimentaire :

Il est largement utilisé dans les industries alimentaires comme un agent gélifiant, épaississant, émulsifiant, modificateur de texture en remplacement des hydrocolloïdes commerciaux ***(*Kavitake et *al.*, 2019).**

Le curdlane produit par les bactéries du genre *Agrobacterium* et Rhizobium **(Lee et *al*, 1997)**. Ils sont utilisés au Japon pour améliorer et modifier la texture des aliments comme les pâtes de poisson et les gels de fèves.

Le gellane polysaccharide synthétisé par *Sphingo monaspaucimobilis* est utilisé comme additif alimentaire aux États Unis et en Europe**.**

Le pullulane est un polysaccharide ayant une très bonne solubilité dans l'eau ainsi qu'en présence d'ions. Ce polysaccharide, synthétisé par *Aureobasidium pullulans*, est utilisé au Japon comme film d'emballage alimentaire. Une solution du polymère peut être appliquée directement sur l'aliment et former une couche sans odeur et sans goût **(Sutherland, 1998).**

3.2.6.5. L'industrie du pétrole :

Le xanthane produit par les bactéries *Xanthomonas campestris* est utilisé dans la récupération assistée du pétrole. Il est utilisé en association avec des détergents et il sert d'agent de régulation de la fluidité lors de l'injection d'eau dans les puits. Il permet à l'eau de pénétrer

dans les pores des roches dont elle déloge le pétrole et permet de compenser la baisse de pression dans les puits épuisés, ce qui facilite la remontée et la sortie du pétrole **(Sutherland, 2002 ; lakhal, 2011 ; Alem ,2011).**

Tableau 8 : Propriétés et attributs fonctionnels de certains exopolysaccharides bactériens.**(Nwodo et *al.*, 2012).**

EPS	Composition de EPS	Propriétés	Applications	Souche bactérienne
Dextran	Glucose	Non-ionique, bonne stabilité, comportement fluide	Aliments, Industrie pharmaceutique (Expandeur de volume sanguin) et Support chromatographique	*L. mesenteriodes*
Alginate	Acide guluronique et acide mannuronique	Capacité gélifiante, formation de film	Hydrocolloïde alimentaire et médicales (pansements chirurgicaux, gestion des plaies et la libération contrôlée de drogues)	*P. aeruginosa*
Xanthan	Glucose, mannose Et acide guluronique	Haute viscosité, Stable à une température large,	Aliments, industrie pétrolière, produits pharmaceutiques, cosmétiques et personnels	*Xanthomonas* spp.

		pH et concentration de sel Gammes	produits de soins	
Curdlan	Glucose	Capacité de formation de gel, insolubilité, comestible et non toxique, a une avtivité biologique	Aliments, industrie pharmaceutique, enlèvement des métaux lourds et additif en béton	*Rhizobium meliloti* et *Agrobacterium radiobacter*

3.2.7. Facteurs influençant la production d'exopolysaccharides :

II est important de se rappeler que la production d'EPS dépend d'abord de la souche étudiée. Ce ne sont pas toutes les souches de bactéries qui produisent des polysaccharides qui sont excrétés dans le milieu, la production peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien (**Benahmed, 2010).**

La structure, la composition et la viscosité des exopolysaccharides bactériens dépendent de plusieurs facteurs tel que la composition du milieu de culture, la source de carbone et d'azote, les sels minéraux, le type de la souche et les conditions de fermentation (pH, température, la concentration d'oxygène et l'agitation) **(Duta et coll, 2006 ; Mohous, 2018).**

3.2.7.1. La température :

La température d'incubation est un paramètre ayant un impact important sur la production d'EPS, plusieurs auteurs affirment que la production des exopolysaccharides est plus importante aux températures sub-optimales de croissance chez les bactéries .Ce phénomène s'explique par l'hypothèse émise par Sutherland en 1972 qui suggère que, lorsque la croissance bactérienne est ralentie à des températures basses ou élevées, la synthèse du polymère est stimulée car la plus part des enzymes qui interviennent dans la production des polysaccharides telles que les glycosyltransférases et les polymérases. Dans des conditions de croissance optimales qui stimulent la production de lipopolysaccharides ou de peptidoglycane, la synthèse d'EPS est réduite en raison de non disponibilité des enzymes et des intermédiaires lipidiques **(Dirk bergmaier, 2002).**

3.2.7.2. Le pH :

Le pH du milieu de culture affecte aussi la production d'EPS chez les bactéries lactique. un pH voisin de la neutralité est favorable à la production d'EPS. Le contrôle du pH lors de la fermentation favorise la production d'EPS. La production des EPS par *Delbruekiissp bulgaricus* est trois à quatre fois plus lorsque le pH est contrôlé **(Dirk bergmaier, 2002).**

3.2.7.3. La source de carbone et d'azote :

La source de carbone a une influence majeure sur la biosynthèse des EPS par les bactéries. En plus du type de sucres (glucose, galactose….) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production des EPS **(Bergmaier, 2002).**

La production d'EPS par *Rhizobium* sp est augmentée en présence des 13 sucres testés avec un maximum de production dans un milieu contenant 1% du glucose **(Gharzouli, 2013).**

Chez *Rhizobium*, une limitation de l'azote résulte en une production accrue d'EPS **(Gharzouli, 2013).**

3.2.7.4. La concentration du phosphate :

La biosynthèse des EPS I est stimulée par un stress hyper-osmotique, à des concentrations très élevées en phosphate (›150mM). Par contre la carence en phosphate stimule la production des EPS II, ce qui indique que la concentration en phosphate est un signal qui affecte le type d'EPS produit par *S. meliloti* **(Gharzouli, 2013).**

3.2.7.5. Les sels minéraux et les cofacteurs :

Les sels minéraux ont aussi une forte influence sur la production d'EPS. Des ions comme le Mg^{2+}, K^{+}, Fe^{3+} et Ca^{2+} peuvent agir comme des cofacteurs essentiels à la synthèse des polysaccharides **(Yang et *al*., 2018).**

Fischer et ses collaborateurs (2003) ont rapporté qu'en présence d'un stress salin (300mM du NaCl) induit une modification dans la structure des polysaccharides bactériens **(Gharzouli, 2013).**

3.2.8. Production d'EPS in vitro chez les rhizobiums :

Un inoculum initial est obtenu à partir d'une culture cultivée à 28°C pendant 48 heures et centrifugé à 6000 rpm pendant 15 minutes. Le culot obtenu est resuspendu dans 5 ml de solution de KCl 0.85% et inoculé dans un erlen Meyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture liquide. Les cultures de 100 ml sont incubées à 28°C pendant 5 jours dans un bain-marie avec une agitation constante **(Alem, 2011).**

3.2.9. Méthode d'extraction et purification des exopolysaccharides :

Après 5 jours d'incubation, les solutions de cultures sont soumises à la centrifugation à 6000 rpm pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer les cellules bactériennes du milieu. Le pH du surnageant obtenu est ajusté à pH=7.25 par l'addition de soude (NaOH) de 1N ou d'acide chlorydrique (HCl) de 1N.

Dans la deuxième étape, les polysaccharides contenus dans le surnageant sont ensuite précipités par l'ajout de 6g de NaCl (Concentration finale de 1M) qui peut aider à la précipitation des EPS chargés, suivi par l'addition de 100 ml d'éthanol froid de 95% pour 100 ml de surnageant

Les échantillons sont gardés à 4°C pendant une nuit avant d'être centrifugés de nouveau pendant 15 minutes à 4°C (précipitation des EPS se faite à 14000g) pour donner un culot qui constitue les exopolysaccharides **(Alem, 2011).**

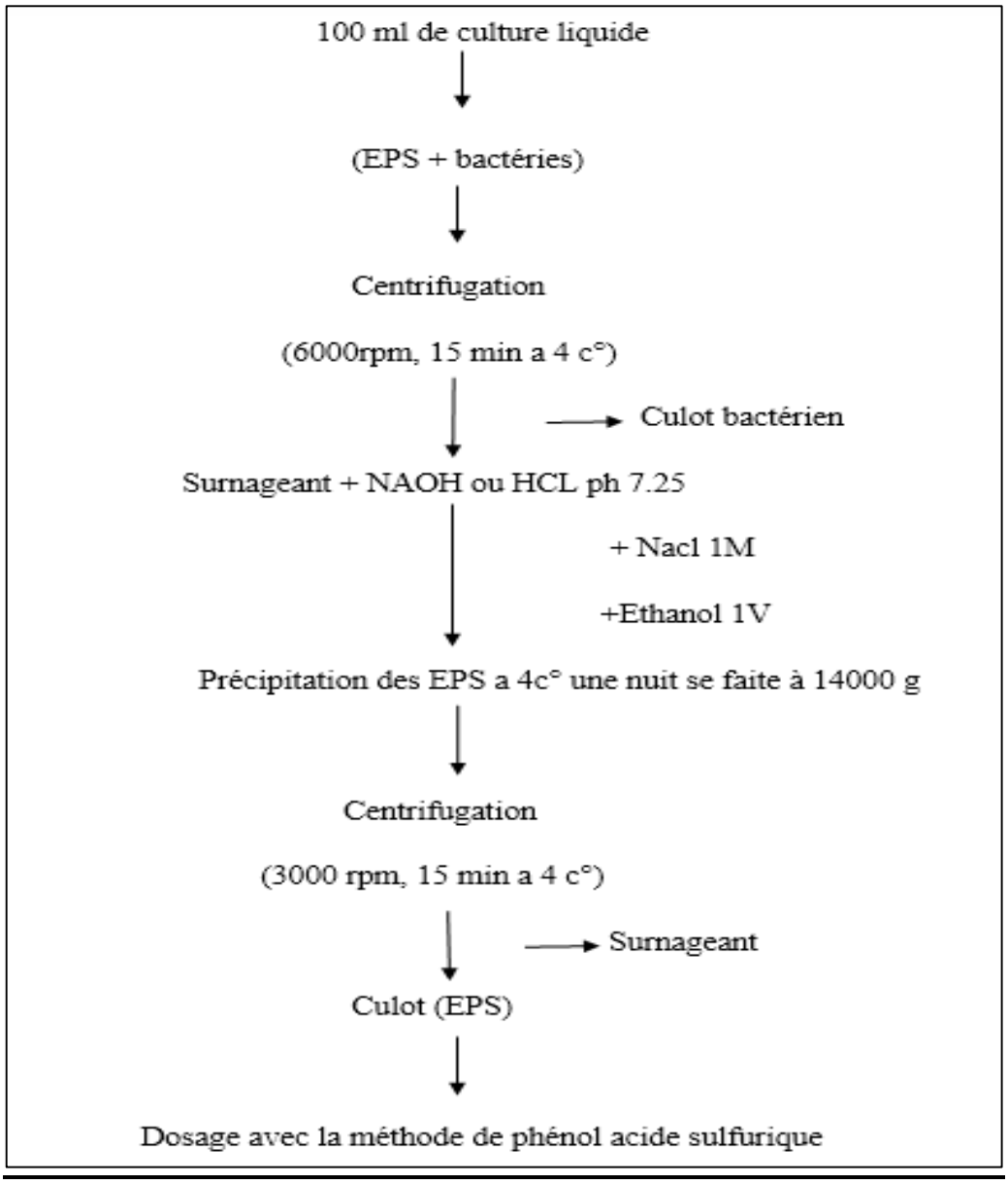


Figure 28 : Schéma de l'extraction et de la purification des polysaccharides **(Alem, 2011).**

Chapitre IV :
Résultats et discussions

La recherche des souches de rhizobium résistantes et les comportements physiologique sous les conditions abiotiques est la préoccupation des projets de recherche et primordiale pour comprendre les différentes réponses vis-à-vis des facteurs du milieu environnementale des deux symbiotes. Dans ce chapitre, on discutera les résultats obtenus des différentes études portées sur l'effet de NaCl, de pH et de température sur la croissance et la survie des souches de rhizobium et les moyenne de tolérance.

1. Effets du NaCl sur la croissance des souches et la production d'EPS :

a. Les résultats obtenus par **Brahimi.S et Brahimi.A (2006)** sur l'étude de l'effet de NaCl, sur la croissance et la production d'EPS des souches isoller de la région de Médéa à partir de la plante *Medecago Polymorpha* sont illustré dans le tableau 9. La tolérance des souches est suivie sur milieu YEMA additionnée de la concentration croissante de NaCl (2, 100, 200, 300,400 mM).

Tableau 9 : effet de NaCl sur la croissance et la production d'EPS du rhizobium. **(Brahimi.S et Brahimi.A, 2006)**

NaCl (mM)	Diamètre (mm)	S1	S2	S3	S4	S5
2	Nombre de la colonie	4	2	1	2	2
	poids d'EPS (µg)	5	8	4	6	6
100	Nombre de la colonie	2	3	1	1	3
	poids d'EPS (µg)	5	5	3	3	4
200	Nombre de la colonie	1	4	1	1	1
	poids d'EPS (µg)	2	5	3	2	2
300	Nombre de la colonie	1	1	1	1	2
	poids d'EPS (µg)	2	4	2	3	3
400	Nombre de la colonie	1	4	1	2	4
	poids d'EPS (µg)	3	9	4	4	8

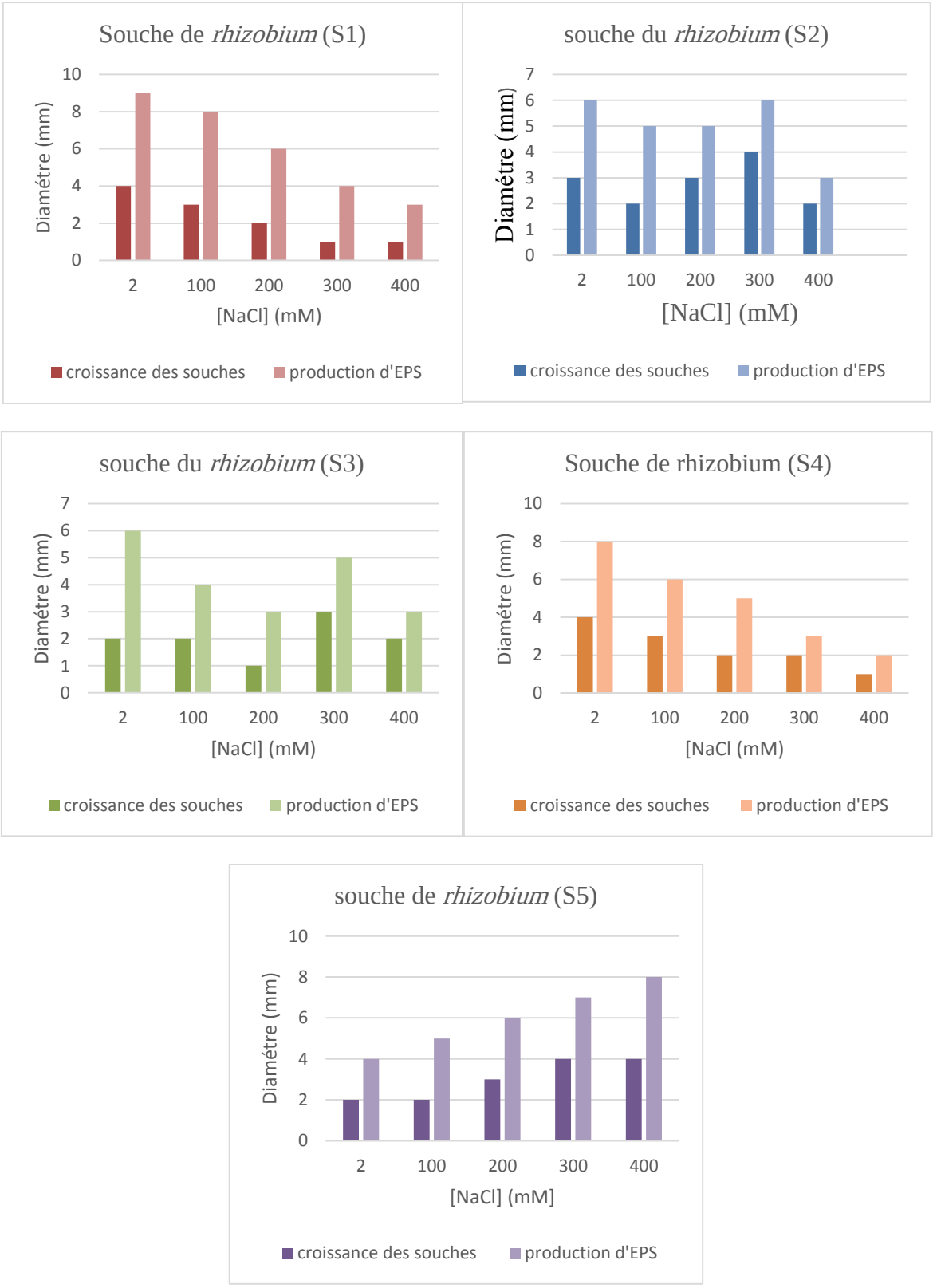


Figure 29 : L'effet de NaCl sur la croissance et la production d'EPS des rhizobiums (S1,S2, S3, S4, S5). **(Brahimi.A et Brahimi.S, 2006).**

La variation de la croissance et la production d'EPS et la capacité des rhizobia a supporté une augmentation de salinité, est varié considérablement d'une souche a l'autre. (S1 et S4) : est inversement proportionnelle à la concentration de NaCl de milieu ; elle est maximal dans les conditions normales et diminue progressivement avec la concentration de NaCl du ce fait les souches S1, S4 ne tolèrent pas la forte concentration de NaCl. Les mêmes constatations décrites par Sebbane, N (2001).qui a signalé la faible tolérance des souches de rhizobium de nord d'Algérie.

A 300 mM, les souches S2, S3 semblent reprendre l'activité puis ralentissent à 400 mM de NaCl ce résultat ressembles à celles décrie par **(Taguette, 1997; Ramdani, 2011).** Par contre la croissance et la production d'EPS des souches S5 sont proportionnelles avec les concentrations d'NaCl du milieu. Ce comportement n'est pas tenir en compte de faite que la croissance et la production d'EPS prend la même variation.

b. L'étude munie par **(Alem, 2010)** montre que Les souches collecter de la plante *Medecago Sativa* de la région d'Oran ont été cultivées sur milieu YEMA solide additionné de NaCl, des concentrations allant de 100 jusqu'à 800 mM sont utilisées. Les résultats de la tolérance à la salinité de l'ensemble des souches sont présentés dans le (tableau 10**).**

Tableau 10 : Effet de NaCl sur la croissance des rhizobiums **(Alem, 2010).**

NaCl / souches	Témoin	100mM	200mM	400mM	600mM	800mM
Stm2233	+++	+++	+++	++	++	+
Stm1081	+++	+++	+++	++	+	-
Stm1823	+++	+++	+++	++	+	-
Stm1825	+++	+++	+++	++	+	-
Stm1082	+++	+++	++	+	+	-
Stm2058	++	++	++	+	-	-

+faible croissance ++ bonne croissance +++ très bonnes croissance -pas de croissance

Les souches se sont avéré très tolérantes a des concentrations élevée de NaCl peuvent être justifiée par l'isolement de ces souches d'une zone salée (la sebkha de misserghine). Située dans la région d'Oran il est souvent dit que les sols salins sélectionnent naturellement des souches plus tolérantes à la salinité.

Tous les souches peuvent croitre jusqu'à une concentration de 600 mM de NaCl à l'exception de souche stm 2058 qui est inhibé a cette concentration. Toutefois un développement a une concentration saline de 800 mM a été rapporté pour la souche S*inorhizobium medicae* stm 2233 extrêmement tolérante.

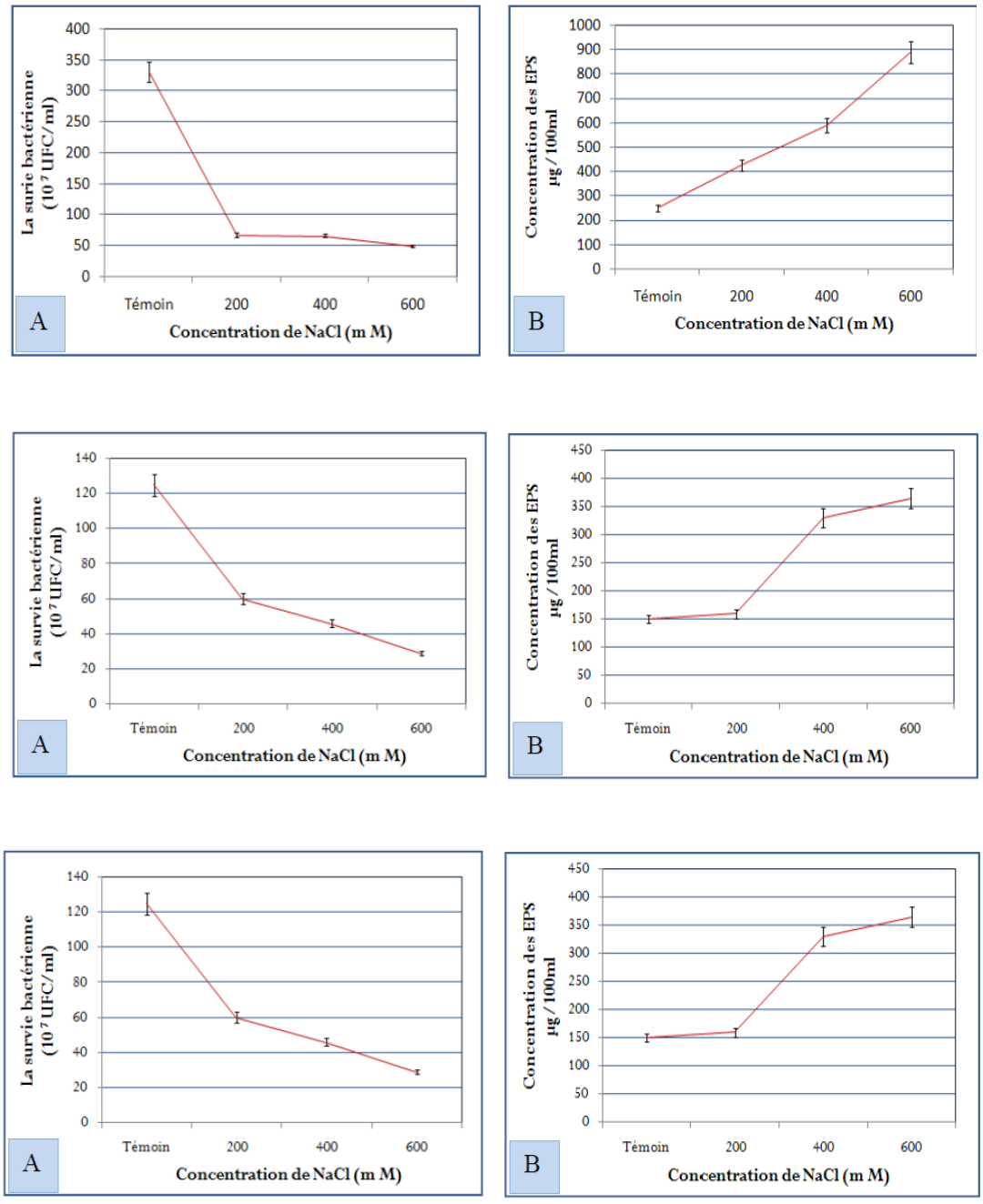


Figure 30 : courbes de la survie bactérienne et la production d'exopolysaccharides par les souches de rhizobiums sp stm (1823, 2058, 2233) **(Alem, 2010).**

La figure 30 présente les courbes de viabilité et de production d'EPS des souches stm 1823, stm 2058, stm 2233 en fonction de différente concentration de NaCl.

Les résultats montrent que le nombre de cellules viables diminue avec l'augmentation de la concentration de la salinité, cette diminution semble être plus importante lorsque la souche est cultivée à 600 mM de NaCl, Par contre, la production d'EPS est toujours augmentée en fonction de la salinité.

c. l'étude porté par (**Mouhous, 2018)** indique les souches bactériennes isolées de la région de Béjaia à partir de légumineuse sont mises en culture dans des tubes contenant 5 ml du milieu YEMB, additionné de quantités croissantes de NaCl (100, 200, 400, 500 mM). La valeur de la croissance est obtenue par lecture de la densité optique (DO) à 630 nm, Après incubation sous agitation à 28°C pendant 6 jours.

Les résultats de l'effet du NaCl sur la croissance des souches de rhizobia, sont illustrés dans la (figure 31).

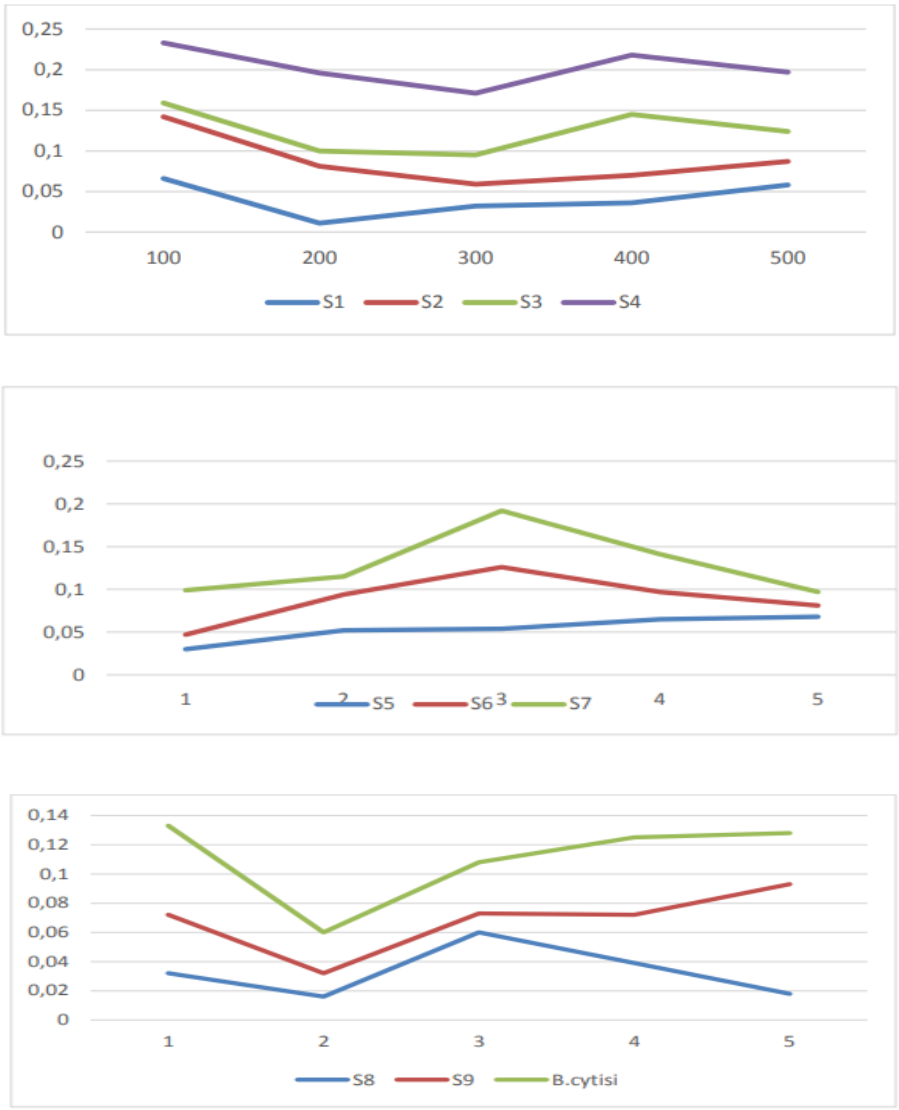


Figure 31 : l'effet de NaCl sur la croissance des rhizobiums **(mouhous, 2018**).

La figure 31 présente les courbes de viabilité des souches de rhizobium en fonction de déférente concentration de NaCl.

Ces résultats montrent une variabilité de réponse vis-à-vis du NaCl. En effet, la croissance à 100 mM de NaCl. Au–delà de cette concentration, la croissance des souches 1,2 et la souche *Bradyrhizobium cytisi* présentent un optimum de souches S1 et S2 diminue progressivement. Les souches 4, 6 ,7 et 8 présent un optimum de croissance à 300 mM de NaCl, au-delà de cette concentration les souches subissent une diminution de leur croissance. Concernant la souche S3, l'optimum de sa croissance est à 400 mM. La croissance de la souche S5 augmente avec l'augmentation de la teneur en NaCl.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les souches S3, S4, S5, S6, S7 et S8 supportant une salinité au-delà de 300 mM.

Selon les trois expériences on dit :

La salinité agit négativement sur la persistance et sur le développement des rhizobia **(Zahran et *al.*, 1994 ; Graham, 1998)**. Les rhizobia (**Mandal, 2014).** Différent dans leur aptitude à tolérer de fortes concentrations en sels. Cette tolérance dépend des espèces et des souches **(El Sheikh et wood, 1989, 1990).**

Selon **Wilson et Noris (1970)**, puis **Rai (1983)** montre que les limites de tolérance au sel de différentes souches de Rhizobium varient considérablement de 50 à 400 mM. De même **(Subba Rao et *al.*, 1972 ; Rudulier et *al.*, 1983)** ont signalé des tolérances des *Rhizobium meliloti* à la salinité peuvent attendre jusqu'à 35g NaCl.

Selon **Taguett (1997)** la tolérance des Rhizohium durant le stress osmotique suit l'une des stratégies suivantes : soit un arrêt de la croissance cellulaire et augmentation de synthèse des exopolysaccharides. Soit une augmentation de la biomasse cellulaire en diminution de la synthèse des exopolysaccharides**. (Taguett, 1997 ; Ramdani et *al.*, 2001)** ont constaté une forte production des EPS, par les souches de Rhizobiums lorsque le milieu contient des concentrations de NaCl élevé. La survie d'une souche bactérienne en présence d'une osmolarité croissante du milieu extérieur, nécessite une stratégie adaptative pour que la bactérie maintienne une pression osmotique intracellulaire supérieure à celle du milieu extracellulaire. La réponse des micro-organismes aux variations de pression osmotique (osmorégulation) se traduit généralement par une accumulation plus ou moins importante des molécules organiques protecteurs, come par exemple les acides aminés et les carbohydrates, afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel **(Botsford et Lewis, 1997 ; Le Rudulier, 2005).**

De plus, plusieurs auteurs s'entendent pour dire que les carbohydrates d'EPS ont un rôle essentiel dans l'adaptation osmotique chez les rhizobiums, et que la quantité de ces carbohydrates ont été influencé lorsque ces souches sont cultivées en conditions d'osmolarité élevée **(Leigh et Coplin, 1992 ; Breedveld et Miller, 1994).**

2. Effet de pH sur la croissance des souches :

a. Les résultats obtenus par **Mahboub (2018)** concernant l'étude de l'effet de pH, sur la croissance des souches isolées de la région Oum Elbouaghi à partir de la plante *Hedysarum pallidum* sont illustrés dans (la figure 32).

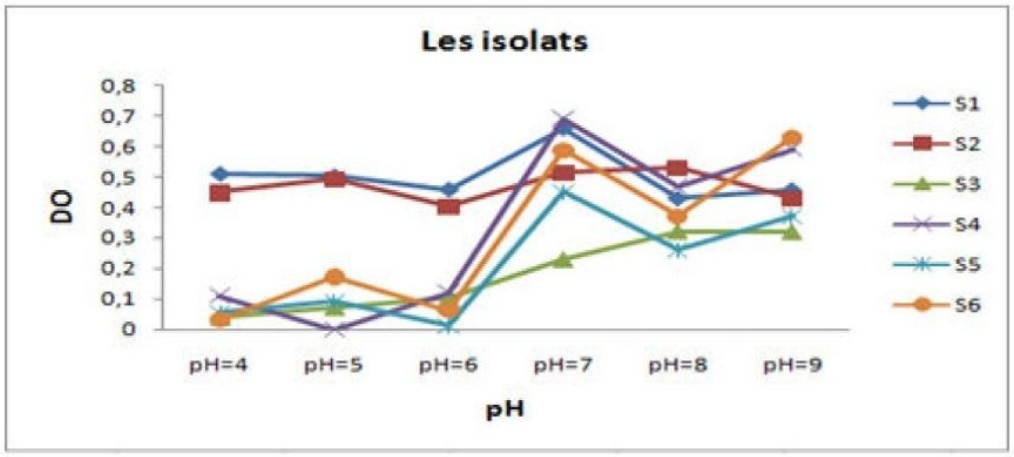


Figure 32 :l'effet de pH sur les souches étudiés par **Mahboub (2018).**

Les souches (S1, S2, S3, S4, S5, S6) ont la capacité de croitre dans l'intervalle de pH 4 à pH9. D'après les résultats, l'optimum de croissance de toutes les souches étudiées est observé à pH7. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Torche (2006) qui ont montré que la majorité de ses souches ont la capacité de pousser dans l'intervalle de pH 4 à 10.

b. Les résultats obtenus par **Brahimi. A et Brahimi. S (2006)** isolées de la région Médéa à partir de la plante *Medicago polymorpha* sont illustrés dans (la figure 33).

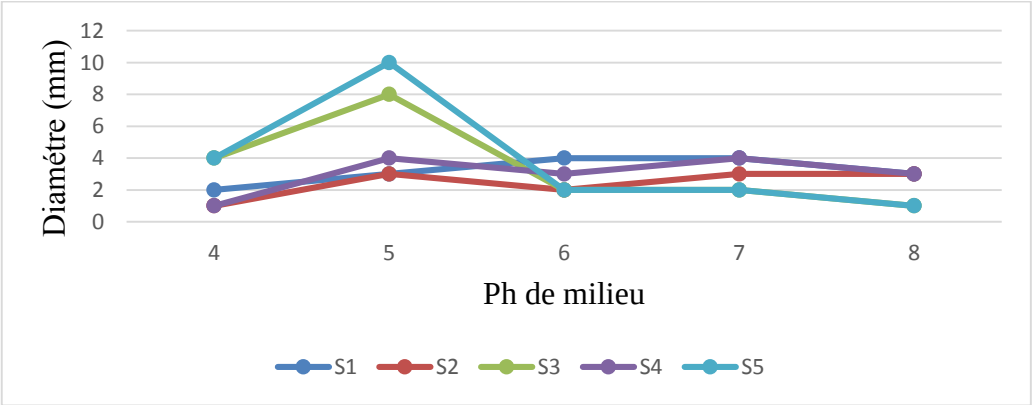


Figure 33 : effet de pH sur la croissance des souches étudiées par **Brahimi. A et Brahimi. S(2006)**

La plus part des souches sembles tolèrent à une large gamme du pH de milieu. Pour le pH acide les souches S3 et S5 pousse mieux à pH 5. Pour les autres souches l'optimum de croissance se situe entre pH 6 et pH 7. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Brock et Anyango cité par (Ballen et *al*., 1998) ont montré que les pH optimum de croissance de *sinorhizobium meliloti* et *rhizobium etli* sont pH 6.8 et pH 7.

c. Les résultats obtenus par **Saoudi (2008)** isolées de la région Biskra à partir de la plante *Astragalu sarmatus* sont illustrés dans la (figure 34).

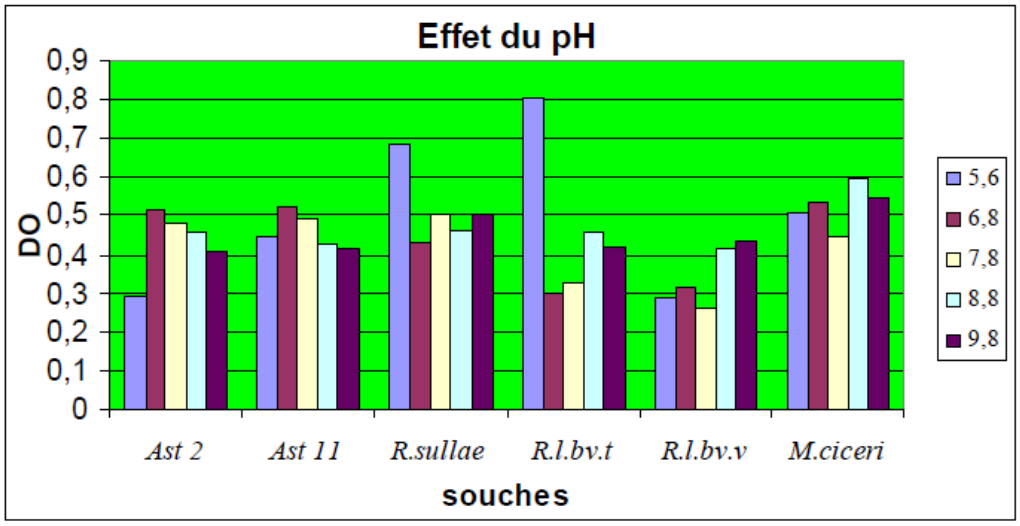


Figure 34 : effet de PH sur la croissance des souches étudiées par **Saoudi (2008).**

Au-delà du pH optimum de croissance (pH 6.8), on observe une croissance normale aussi au pH légèrement acide (pH 5.6) ou basique (pH 8.8, 9.8).Ceci est en accord avec la bibliographie où les rhizobia se cultivent aux pH intermédiaires **(Vincent, 1970 ; Struffi, 1998).**

Selon les trois expériences on dit :

La croissance des souches est capable entre pH 4 et pH 9 avec un optimum de croissance généralement à pH 7. Pour faire face à l'effet de pH de milieu la bactérie oriente les voies de biosynthèse vers des mécanismes de tolérance tel que la synthèse des tampons cytoplasmiques, translocation de proton H+ et amélioration de pH interne de la cellule.

3. Effet de température sur la croissance des souches :

a. (Saoudi ,2008) a travaillés sur les souches de l'études (*Ast 11*, *Ast* 2) isolées de la région de Biskra, Algérie à partir de la plantes hôte *Astragalus armatus*. Les résultats sont illustrés dans le (tableau 11).

Tableau 11 : Action de la température (**Saoudi, 2008).**

souches	**4°**	**28°**	**37°**	**45°**
Ast 11	+	+	+	-
R.sullae	+	+	+	-
R.l*.bv.*t	+	+	+	-
***Ast* 2**	+	+	+	-
R.l*.bv.*v	+	+	+	-
M.ciceri	+	+	+	-

+ : il y'a de croissance - pas de croissance

Les résultats de (tableau 11) montres que Les isolats *Ast 2* et *Ast 11* et les souches de *Rhizobium* se cultivent bien aux températures normales de croissance (4°C, 28°,37° C). À 45°C, la croissance n'est pas observée. Ce résultat s'observe aussi pour la souche de *Mesorhizobium ciceri* (isolée à partir des nodules de *Cicer arietinum).* Aussi en retrouve ça chez *Mesorhizobium huakuii* **(Chen, 1991)**, espèce isolée à partir de la légumineuse *Astragalus sinicus.*

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

b. (Aderrahim et Imakhloufene, 2016) ont travaillés sur les onze souches de *Rhizobium sp.* Appartenant à la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne sont utilisées dans cette étude. Ces souches (AKE1, AM11R, EA2, EB1, EC6, ES8, MEK6, MT2, UE28, UM2 et la souche de référence RLV) proviennent de différentes régions de Bejaia et sont isolées à partir des nodules de *Vicia faba.* Les résultats sont illustrés dans (Figure 35).

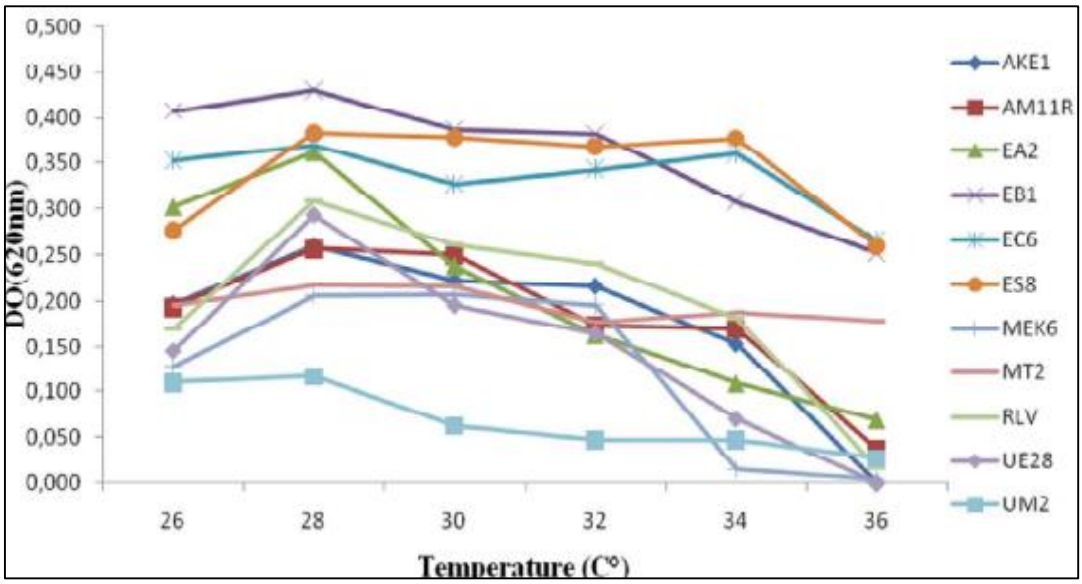


Figure 35 : Courbes de croissance des souches de Rhizobium sp à différentes températures **(Aderrahim et Imakhloufene, 2016).**

Les résultats montres que la majorité des souches qui sont étudiées présentent un optimum de croissance situé entre 26°C et 30°C (Figure 35). Au-delà de cette gamme, on remarque que la croissance des souches EB1, EC6 et ES8 reste stable jusqu'à 34°C puis diminue progressivement. Il y a lieu de signaler que la croissance de ces souches est plus importante que celles des autres souches aux différentes températures testées. A l'exception de la souche MT2 qui présente une croissance faible mais stable, les souches AM11R, EA2, AKE1, UE28, MEK6 ainsi que la souche de référence RLV sont très affectées par les températures à 32°C puisque leurs charges finales sont inférieures à la charge initiale.

D'après (**Gauri et *al.*, 2011)** la majorité des souches isolées de *Trifolli umalexandrinum* ont la capacité de croitre à 36°C, tandis que certaines souches survivent à 38°C. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les souches EB1, EC6, ES8 et MT2 Selon **(Yadav, 2013).**

c. Pour s'avoir le seuil de tolérance à la température des rhizobiums au niveau de laboratoire **(Mahboub, 2018)** extrait 6 souches appartiennes à la plante *Hedysarum pallidum* proviennent de Oum Elbouaghi, Algérie et les examiner sous différents température. Les résultats sont illustrés dans le (tableau 12).

Tableau 12 : température de croissance **(Mahboub, 2018).**

T(C°) / Souches	4°C	22°C		30°C		37°C		44°C	
	10j	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
S1	-	++	+++	++	+++	+	+	-	+
S2	+ (8j)	++	+++	++	+++	-	-	-	-
S3	-	+	++	+	++	+	++	-	+
S4	+ (3j)	++	+++	++	+++	-	-	-	-
S5	-	+	++	+	++	-	+	-	-
S6	+ (2j)	+	++	++	+++	++	+++	-	-
R4	+ (3j)	++	+++	++	+++	+++	+++	-	-
R5	+ (7j)	+	+++	++	+++	+	+	++	+++
R6	+ (6j)	++	+++	++	++	+	+	-	-

+ : faible croissance, ++ : moyenne croissance, +++ : bonne croissance

Généralement, la plupart des souches sont capables de croitre à une température varie de 4°C à 37°C avec une bonne croissance dans l'intervalle de 20 °C à 30 °C. Concernant la température 44°C, les isolats sont incapables de pousser à cette température contrairement aux souches S1, S3 et R5 qui sont thermotolérantes. Pour la température 4°C, les isolats S1, S3 et S5 n'ont pas pu pousser. Les souches isolées par **(Benselama, 2015)** montrent une croissance optimale entre 20 et 37°C et celle isolées par **(Hatimi et *al.*, 2000)** sont relativement tolérantes aux températures élevées jusqu'à 42°C. Les températures élevées inhibent généralement la croissance des micro-organismes. Ainsi chez les rhizobia, les hautes températures peuvent empêcher la nodulation et inhiber la fixation d'azote **(Cacciari et *al.*, 2003).**

D'après les trois expériences c'est dessus on peut conclure que :

Généralement les souches rhizobiennes sont bien développer dans l'intervalle (15 -30) °C sachant que 20°C est la température optimale.

Les hautes températures (36, 40 et 42°C) altèrent également la composition de la surface cellulaire (EPS et LPS) **(Yadav, 2013),** et engendrent la déshydration et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries.

La tolérance aux hautes températures serait due à un changement de la quantité des EPS au niveau de la surface cellulaire et à l'induction de la synthèse des protéines appartenant à un groupe spécifique de lipopeptides connus comme des protéines de choc thermique (HPS). Toutefois, trois protéines de choc thermique (106.9, 83.1, 59.5 KDa) ont étaient rapportées pour être produites et accumulées par différentes espèces de rhizobiums **(Nandal et *al*., 2005).**

Conclusion

Conclusion

La salinité des sols joue un rôle majeur dans le processus de sélection microbienne, le NaCl et en général un bon indicateur de tolérance bactérienne à la salinité. La sensibilité des souches de rhizobium à la salinité varie d'une souche à l'autre.

Les souches à croissance lente n'ont pu croître au-delà de 0,2 M de NaCl alors que les souches à croissance rapide ont toléré des concentrations jusqu'à 0,4 M de NaCl.

L'addition de faible et de moyennes concentrations de NaCl dans le milieu de culture retarde la croissance bactérienne, se traduisant par une augmentation du temps de génération des souches bactériennes. A fortes concentrations, la croissance est inhibée. Le retard est liée à une phase de latence plus longue, qui serait dû à une adaptation au milieu salé, caractériser par la production d'exopolysachharides et accumulation des composée compatibles et synthèse des protéines chaperons.

La plus part des souches tolèrent à une large gamme du pH (entre pH 4 et pH 9) avec un optimum de croissance généralement à pH 7. Pour faire face à l'effet de pH de milieu la bactérie oriente les voies de biosynthèse vers des mécanismes de tolérance tel que la synthèse des tampons cytoplasmique, translocation de proton H+ et amélioration de pH interne de la cellule.

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des souches a permis de mettre en évidence une grande diversité de réponses, les souches rhizobiennes peuvent tolèrent la haute température 36-42 °C avec une croissance optimal dans l'intervalle de 20 à 30 °C.

La tolérance aux hautes températures serait due à un changement de la quantité des EPS au niveau de la surface cellulaire et la synthèse des protéines de choc thermique (HPS). Produites et accumulées par différentes espèces de rhizobiums pour faire face les valeurs de température extrêmes **(Nandal et *al*., 2005).**

Références bibliographiques

A

Aderrahim, S., Imakhloufene, S., 2016. Etude de la tolérance aux stress abiotiques de bactéries nodulant la féverole. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master : Microbiologie de l'Environnement. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie, Université A. MIRA - Bejaia 1, 37 p.

Ahmad, I., Hossain, F.M., 2017. Biofilms in plant and soil health. 1ére edition. SPi Global, Chennai, India, 567 p.

Aizawa, S.I., 2014. *Sinorhizobium meliloti*-Nitrogen-Fixer in the Grassland.*in* : The Flagellar World, 1ére Ed. Academic Press Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 82-83.

Alem, Y., 2010. Étude des exopolysaccharides produits par des souches rhizobiennes : leur relation avec la nodulation et l'influence de la salinité sur leur production. Diplome De Magistére En Biotchnologie. Spécialité : Exploitation Des Interaction Plantes- Microorganismes. Faculté Des Sciences, Université d'Oran 1 1, 75 p.

Amarelle,V.,Rosconi,F.,Lázaro-Martínez,J.M.,GracielaBuldainNoya,F.,O'Brian.,M.R, .Fabiano, E., 2016. HmuS and HmuQ of *Ensifer/Sinorhizobium meliloti* degrade heme in vitro and participate in heme metabolism in vivo. Biometals 29, 333–347.

Amouri, A. A., FyadLameche, F. Z., Karkachi, N., 2015. Variabilité de la tolérance au stress salin chez deux génotypes contraste d'une légumineuse *Medicago truncatula* au stade de germination. Algerian journal of aridenvironment 2, 17-25.

Amouri A.A., 2016. Effet du stress Salin sur la variation d'isoenzyme d'esterases de deux génotypes contrastes de Medicago. Algerian journal of arid environment 2, 67-72.

Andrews, M., Andrews, M.E., 2017. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses.International Journal of Molecular Sciences, 18.

Andrews, M., De Meyer, S., James, E., Stępkowski, T., Hodge, S., Simon, M., Young, J., 2018. Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance. Genes 9, 321.

Antipolis S., 2003. Les menaces sur les sols dans les pays méditerranéens. Les cahiers du plan bleu, Vol.2, pp : 44-49.

Ardley, J.K., Parker MA, De Meyer, S.E., Trengove, R.D., O'Hara G.W., Reeve, W.G., Yates, R.J., Dilworth, M.J., Willems,A., Howieson, G.J.,2012. *Microvirgalupini* sp. nov., *Microvir galotononidis* sp.nov.and *Microvir gazambiensis* sp. Nov.are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. Int J SystEvolMicrobiol 62, 2579–2588.

Ashraf, M., Ahmad, M. S. A., Öztürk, M. etAksoy A. 2012. Crop Improvement through Different Means: Challenges and Prospects. In: Ashraf, M. et al. (eds). *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, the Netherlands, pp 1-15.

B

Baba Arbi, S., 2016. Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicagolittoralis*Rhode et *Melilotusindicus* (L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse de doctorat en microbiologie : microbiologie appliqué. Université Badji Mokhtar- Annaba, 182p.

Baddiley, J., Carey, N.H., Higgins, I.J., Potter, W.G., 2008. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 171p.

Ballen, K.G., Graham, P.H., Jones, R.K., Bowers, J.H., 1998. Acidity and calcium interaction affecting cell envelope stability in rhizobium. Canadien journal of microbiologie 44, 582-587.

Bapaume, L., Reinhardt, D., 2012. How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscularmycorrhiza. Front Plant Sci 3, 1-29.

Benahmed,A .,2010 .Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la Légumineuses du genre *Hedysarum.* Mémoire de Magister. Université Mentouri.

Benkolli M et Bouzeghaia B., 2016 .Etude biochimique de dix variétés de blé dur (Triticum durum Desf.) Sous l'effet d'un stress oxydatif gènèrè par un stress hydrique. Mémoire. Universitè. Mentouri.Constantine.P :1-5-23.

Benkrinah, K., Hafiani, A., Saidi, S., 2017. Etude de paramètres morphologiques, physiologiques et biochimique due aux stress hydrique chez trois variétés du blé dur (*Triticum durum Desf*). Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master : Phytopharmacie et protection des végétaux. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers : Département : Ecologie et Génie de l'Environnement, Université 8 Mai 1945 Guelma 1, 50.

Benmouhoub, J., 2016. Les méthodes de reconstruction phylogénétique : modèles, exploitation des logiciels et application à *Medicago L* (Fabaceae). Mémoire de master : Génomique et biotechnologie végétale. Université de Saad Dahleb Blida1, 94p.

Benselama, A., 2015. Réhabilitation de la culture du *lablabpurpureus*L. Ex sweet et etude de son partenaire symbiotique. Thèse de doctorat en biotechnologie : Interaction plante -microorganisme. Université d'Oran Es-Senia, 133p.

Benyamina,S.M., Baldacci-Cresp, F., Couturier, J., Chibani,K., Hopkins,J., Bekki,A., Lajudie,F., Rouhier,N., Jacquot,J.P., Alloing,G. et *al*., 2012. Two *Sinorhizobium meliloti* glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation. Environmental Microbiology 15, 795-810.

Bostford, F.M, Cerning, J., Desmazeaud, M,.1997. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production of glutamic acid in response to osmotic stress .J Appl Env Microbial. 56:488-494.

Boudanga, L ,2011.étude de la perfermance de la symbiose fève (vicia faba)-rhizobia cultivée sous differents niveaux de phosphore du sol et selection des souches local a haute potentiel de solubilisation de phosphore.mémoire master siences et techniques : biotechnologie vegetale.université de cadi ayyad- marrakech.1 ,62p.

Boukhiet I ,2016. L'effet des facteurs abiotiques sur le contenu Nodulaire d'une espèce fourragère Hedysarum pallidum Defs., poussant dans deux régions différentes. mémoire master : Ecologie Microbienne. Constantine. Université des Frères Mentouri.68p.

Brahimi A,.Brahimi S.,2006. caracterisation de quelque souches de rhizobium isolées dans la région de médea et l'éffet de NaCl sur la production des exopolysaccharides.mémoire de master en pharmaceutique faculté des siences de l'ingenieur université yahya fares.medea 74 P.

Breedveld, M,.W.,Miller,K.J., 1994. Cyclic ß –glucans of members of the family rhizobiaceae microbial .rev. 58:145-161

Broughton, W.J., 2000. Interaction entre plantes et microorganismes. Cours de BMC.

Broughton, W; Jabbouri, S. & Perret, X., 2000. Keys to Symbiotic Harmony. Journal of Bacteriology 182, 5641-5652p.

C

Cacciari, I.,Mattia,E. Di.,Quatrini,P.,Moscatelli,M. C.,Grego,S.,Lippi,D.,De paolis,M. R, 2003. Réponses adaptatives des isolats de Rhizobium aux stress. Unarbre au désert Acacia raddiana. Edition IRD.Marseille. P183-200.

Carlfors, J., Edsman, K., Petersson, R., Jornving, K., 1998. Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use. Eur. J. Pharm. Sci., 6: 11-39.

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, W.X., Wange, S. Y., Ly, Y.B., Chen, X.Q., Li, Y., 1995. Characterisatics 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.

Cheriet, D. ,2015. Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris* L.) fixatrices d'azote. Thèse de Doctorat En Microbiologie : Microbiologie Appliquée. Faculté Des Sciences Département De Biochimie, Université Badji Mokhtar – Annaba 1, 116 p.

Choudhury, S.R., Pandey, S., 2018. Use of Hairy Root System to Study Signaling Pathways during Nodule Formation. In : Hairy Roots An Effective Tool of Plant Biotechnology, Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, MO, USA, pp. 243-274.

Chtaigné, G., 2007. Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse.

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

Cubo, M.T.,Alías-Villegas, C., Balsanelli, E., Mesa, D., de Souza, E.,Espuny,M.R., 2020. Diversity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* Bacteriophages in the Rhizosphere of Medicago marina: Myoviruses, Filamentous and N4-Like Podovirus. Front. Microbiol 11.

D

Dekak, A., 2010. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista*et *Argyrolobium*. Mémoire de magister : Biotechnologie végétale. Université de Tébessa, 119p.

Del Pozo, Alegendro Ovalle, Carlos, Aronson, James & Avendaño, J. U. L. I. A. 2002. Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. I. Phenology, biomass production and reproductive patterns. *Plant Ecology*, *159*(2), 119-130.

Denarie, J., 2000. Les symbioses racinaires, dans le monde végétal, du génome à la plante entière. Académie des sciences, rst n ° 10. Editions TEC et DOC des sciences. Université Laval.

Dirk Bergmaier., 2002. Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de LB. Rhamnosus RW -9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de Philosophiae Doctor (Ph.D.). De l'Université Laval.

Drai, L., 2012. Effet d'un stress hydrique sur la formation des protéines de stress et quelques activités enzymatique chez deux variétés de lentille *lensculinaris* L. Mémoire de magister : biologie et physiologie cellulaire et moléculaire. Université Des Sciences Et De La Technologie Houari Boumedienne, 98p.

Durante, P., colucci, L., 2010. Handbook of Molecular Chaperones: Roles, Structures and Mechanisms. Nova Biomedical Books, New York, 588 p.

E

Egamberdieva D., Lugtenberg B., 2014. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants, in *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses* Vol. 1 ed. Miransari M. (New York, NY: Springer;), 73–96.

El Sheikh EE, Wood M 1989. Response of chikpea and soybean rhizobia to salt: influence of carbon source, temperature and pH. Soil Biol Biochem 21:883-887

El Sheikh EE, Wood M., 1990. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. Soil Biol Biochem 22:343–347.

F

Fischer SE, Miquel MJ, Mori JB., 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. FEMS Microbiology Letter219: 53-62.

Foucher, F. Kondorosi, E., 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in Medicago. Plant Mol Biol. 43: 773-786.

G

G.W.,Reeve,W.G.,Yates,R.J.,Dilworth, M.J., Willems,A., Howieson, G.J., 2012. *Microvirgalupini* sp. nov., *Microvirgalotononidi s*sp. Nov.and *Microvirgazambiensi s*sp. nov. Arealphaproteobacterial root -nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. Int J Syst Evol Microbiol 62, 2579–2588.

Gage D.J., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during Acclimation of white lupine to phosphorus deficiency involved enhanced expression of genes advances 24: 382-388.

Gallego, M., 2006. Les protéobactéries : mécanismes communs d'interaction avec la cellule hôte. Master de recherche, Université PAUL SABASTIER. ToulouseIII.

Garzouli, R., 2013. Etude Structurale et Génétique des Exopolysaccharides produits par l'espèce *Rhizobium sullae.* Mémoire de doctorat en science : Génétique moléculaire. Université de Constantine 1 ,150P.

Gauri., Singh A.K., Bhatt R.P., Pant S., Bedi M.K. et Naglot A., 2011. Characterization of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum. Journal of Agricultural Technology*, 7(6), pp. 1705-1723.

Gharzouli, R., 2006. Influence d'agents mutagènes, les rayons Uilta-violet, sur la sur la nodulation et les caractères phénotipiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. . Mémoire de Magister en génétique moléculaire. Université Mentouri Constantin.

Graham, P H., 1998. Biological dinitrogenfixation: symbiotic.in sylvia, D. M .principles and applicationof soil microbiology. Prentice hall inc .upper saddle river, NJ., 322-345.

Graham, P.H., Vance, C.P., 2003. Legumes importance and constraints to greater utilization to greater utilization. *Plant Physiology*, 131: 872-877.

Gregory, .B. 2005. Écophysiologie de semis de conifères éctomycorhizés en milieu salinet sodique. Thèse de mémoire **.**Université Lava Canada .Chapitre 1.

H

Haichour R., 2009. Stress thermique et limite écologique du Chêne vert. Mémoire. Université Mentouri, Constantine p : 12-24-49.

Hansen, A.P., Chouchary, D.K., Agrawal, P.K., Varma, A., 2017. Rhizobium Biology and Biotechnology. Springer International Publishing, India, 348 p.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., Oku, M., Islam, M.T., 2019. Approaches for enhancing abiotic stress tolerance in plants. 1ére edition. CRC Press Taylor and fancies Group, Boca Raton, London, New York, 531 p.

Hatfield, J.L., Prueger, J.H., 2015. Temperature extremes: effect on plant growth and development. Weather Clim. Extrem10, 4-10.

Hatimi, A., Bani-Aameur,F., Oihabi,A., 2001. Caractérisation de souches de Rhizobiums autochtones des dunes : effet sur la croissance et la nutrition azotée d'Acacia cyanophyllaLindl. Acta Bot. Gallica.148 (3):191-199.

J

Janczarek, M., Rachwal, R., Marzec, A., Grzadziel, J., Palusinska-Szysz, M., 2014. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. Applied Soil Ecology 85, 94-113.

Janczarek, M; Skorupska, A., 2003. Exopolysaccharide synthesis in Rhizobium. leguminosarum bv. Trifolii is related to various metabolic pathways Research in Microbiology 154, 433–442.

K

Kara S et Zerguine M., 2016. Dosage des anthocyanes et de la glycine bétaine en conditions de stress hydrique et étude des mécanismes de tolérances chez dix variétés du blé dur *(triticum durum Desf.*). Mémoire. Université des Frères Mentouri Constantine1. p : 1-9-19-28-29-34.

Kavitake, D., Delattre, C., Bruntha Devi, P., Pierre, G., Michaud, P., Halady Shetty, P., Andhare, P., 2019. Physical and functional characterization of succinoglycanexopolysaccharide produced by Rhizobium radiobacter CAS from curd sample. International Journal of Biological Macromolecules 134, 1013–1021.

Kazmierczak, T., Yang, L., Boncompagni,E ., Meilhoc, E., Frugiera,F., Frendob, P., Bruandc, B., Grubera,V ., Brouquisseb, R., 2020. Legume nodule senescence: a coordinated death mechanism between bacteria and plant Cells.In: Advances in Botanical Research, 7éme Ed. Pierre Frendo, Florian Frugier, Catherine Masson-Boivin, France, pp. 188-203.

Kumar Triohati, D.K., Pratap Singh, V., Kumar CHauhan, D., Sharma, S., Prasad, S.M., Kishore Dubey, N., Ramwat, N., 2020. Plant Life under Changing Environment Responses and Management. Academic Press, Chennai, India, 994 p.

Kumari, B. S; Ram, R. M; Mallaiah, K. V., 2008. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by Rhizobium strains from Indigofera. African Journal of Microbiology Research Vol 3(1) pp.010-014.

Krishnan H.B., Bennett J.O. 2007. Rhizobium-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulati. In: Gnanamanickam S.S. (eds) Plant-Associated Bacteria. Springer, Dordrecht. 57–104.

L

Lakhal,. A. 2011 .effets de certains inducteures de génes nod composées phénoliques sur la croissance des de *rhizobium* en symbiose avec *vicia faba* caracterisation et lutte biologique. Thése doctorat.en biologie moléculaire et cellulaire .faculté des siences de la nature et dela vie .université abou bakr belkaid.tlemcen.170p

Lang, F. 2007. Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation. Journal of the American College of Nutrition, 26(sup5), 613–623.

Laouar, M., Abdelguerfi, A., Kouchi, K., 2000. Etude du complexe d'espèces *Medicagociliaris-M.intertexta*.Variabilité morphologique et phénologique. Annales de l'institut National Agronomique El Harrach 21, 51-70.

Le Rudulier, D., 2005. Osmoregulation in rhizobia: the key role of compatible solutes. Grain.legue., 42 :18-19

Lee, J. Y., Seo, W. T., Kim, G. J., Kim, M. K., Park, C. S., Park, Y. H., 1997. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of Agrobacterium species. J. Indust. Microbiol. Biotechnol., 18: 255-259.

Lezzar H et Meziani A., 2015. Recherche in silico et conception d'amorce des gènes de tolérance au stress abiotique chez le blé. Mémoire .Université des Frères Mentouri Constantine1.P :3-10.

Longfei Zhao, Zhenshan Deng, Wenquan Yang, Ying Cao. Entao Wang, Gehong Wei, 2010. Diverse rhizobia associated with Sophora alopecuroides grown in different regions of Loess Plateau in China.

M

Mahboub, A., 2018. Contribution à l'étude de l'interaction microbienne avec les plantes légumineuses. Mémoire de Master : Microbiologie Appliquée. Université 8 Mai 1945 Guelma, 78p.

Mandal HK, 2014. Isolation of salt tolerant strains of rhizobium trifoli. International. Journal of Agriculture and Food technology 5(4):325-332.

Meena, R.M., Singh Yadav, A.D.J., Lal, R., 2018. Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Springer Nature Singapore Pte Ltd, India, 541 p.

Meilhoc, E., Blanquet, P., Cam, Y., & Bruand, C., 2013. Control of NO level in rhizobium-legume root nodules: Not only a plant globin story. Plant Signaling & Behavior, 8, 25-923.

Mermut A.R., and Arshad M.A., 1987. Significance of sulfide oxidation in soil salinization in southern Saskatchewan, Canada. Soil Sci. Amer. J. 51:247-251.

Meseguer, G., Buri, P., Plazonnet, B., Rozier, A., Gurny, R., 1996. Gamma scintigraphic comparison of eye drops containing pilocarpine in healthy volunteers. J. Ocul. Pharmacol. Ther. 12: 481-8.

Mohd_Sayeed, A., 2019. Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Mechanisms and Molecular Approaches. 2 ed. Mohd_Sayeed, A, India, 300 p.

Montiel, J., Arthikala, M. K., Cardenas, L., & Quinto, C., 2016. Legume NADPH oxidases have crucial roles at different stages of nodulation. International Journal of Molecular Sciences, 17- 680.

Morange, M., 2000. Protéines chaperons. médecine/sciences 16, 630-634.

Mouhous ., F .Aliouat, S .2018 . Etude de la croissance des rhizobia isolées des zones arides sous l'effet de différents pH et teneurs en NaCl. Mémoire master

N

Nandal K., Sehrawat A.R., Yadav A.S., Vashishat R.K., Boora K.S. 2005. High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat- resistant mutants of *Rhizobium sp. (Cajanus)*. Microbial Research, 160, pp. 367-373.

Naveen kumar, A., 2013. Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances. Springer, New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 460 p.

Naveen Kumar, A., 2015. Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. Springer, New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 383 p.

Ndiaye, A.A; S.N. Sylla; M. Gueye; P. Delajudie; I.Ndoye, 2002. Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totalessur gel de polyacrilamide SDS (SDS-PAGE), pour l'étude de la diversité des rhizobiums d'*Acacia tortilis* (forsk). Hayne subsp. *Raddiana* (savi) brenan. African journal of science and technology.61.1.pp.33-43.

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

Nwodo, U.U., Green, E., Okoh, A.I., 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. International Journal of Molecular Sciences 13, 1402-1415.

O

Oka-Kira E, Kawaguchi M., 2006. Long-distance signaling to control root nodule number. Current Opinion in Plant Biology 9: 496-502

Oldroyd, G. E., 2013. Speak friend and enter signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nature Reviews Microbiology, 11-252.

Oukarroum A., 2007.Vitalité des plantes d'orge (Hordeum vulgare L.) en conditions de stress hydrique et thermique analysée par la fluorescence chlorophyllienne. Thèse doctorat. Université De Genève.

P

Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M., 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* 234: 201-62.

Peix, A., Ramırez-Bahena, M.H., Velazquez, E., Bedmar, E.J., 2015. Bacterial associations with legumes. Crit Rev Plant Sci 34, 17–42.

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.

Pesesse, N., 2018. Évaluation de composés organiques volatils par des capteurs chimiques en culture de froment d'hiver soumis à des stress biotiques. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master : sciences et technologies de l'environnement. Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT), Liége Université 1, 67 p

pooja, S.,joginder ,S.,namita ,B.,surjit ,D. ,2017 .Recent biotechnological approaches to study taxonomy of legume nodule forming rhizobia . Suresh Kumar Gahlawat. Sirsa, Haryana, India.394p.

R

Radmani N., boilila A., benallaoua S., 2001. Etude de la production de polysaccharides extracellulaires chez rhizobium mellilotti.université Abderahmane Mira de béjaia.

Rai, A., 2017. Effet du stress salin sur les bactéries du sol : rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis,Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica*sur la relation bactérie-plante sous stress salin. These de Doctorat : Microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1, 247p.

Rai, R., 1983. The salt tolerance of rhizobium strains, lentil genotypes, and the effect of salinity on the aspects of symbiotic N-fixation. J Agric .Sci., 100:81-86

Ramakrishna, A, Gill, S.S., 2019. Metabolic Adaptations in PlantsDuring Abiotic Stress. CRC Press Taylor and fancies Group, Boca Raton, London, New York, 441 p.

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

Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., Bonilla, R., 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (Zea mays). Appl. Soil Ecol. 61: 264-272.

S

Saâdane El Boukhari, M., 2018. Etude de paramètres morphologiques, physiologiques et biochimique due aux stress salin chez trois variétés de céréales. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master : Spécialité / Option : Phytopharmacie et protection des végétaux. Département : Ecologie et Génie de l'Environnement 1, 52 p

Saoudi, M., 2008. Les bactéries nodulant les legumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalusarmatus*. Mémoire de Magister : Génomique et Techniques Avancées des Végétaux. Université Mentouri de Constantine, 99p.

Simoes, R., Castro, J., 2001. Ozone depolymerization of polysaccharides in different materials. J. Pulp. Paper. Sci., 27: 82-87.

Skorupska, A; Janczarek, M; Marczak, M; Mazur,M; Król, J.,2006 . Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. Microbial Cell Factories 5:7.1475-2859

Slimani, K., 2012. Mécanismes physiologiques et biochimiques de la réponse à un insecticide, le thiaméthoxame, chez les plantules de blé soumises à un stress salin. Mémoire de Magister en

sciences de la nature : Biologie et Physiologie Cellulaire et Moléculaire. Université Des Sciences Et De La Technologie Houari Boumedienne, 120p.

Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, D May G., 2006. Genetics and functional genomics of legume nodulation. Current Opinion in Plant Biology 9: 110–121

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

Sussich Fabiana, Catherine Skopec, John Brady et Attilio Cesàro,2001 .Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal , Carbohydrate Research. 165-176p

Sutherland, I. W., 1996. Extracellular polysaccharides. In: Rehm, H. J., Reed, G. (Eds.), Biotechnology. 6: 613-65

Sutherland, I. W., 2002. A sticky business. Microbial polysaccharides: Current products and future Trends. Microbiology. 29: 70-71.

Sutherland,I W.,1972. bacterial exopolysaccharides. Advances. Microbial. Physiol., 8 :143-213

T

Taguett F.1997.diversités des souches de rhizobium mellilotti des sols d'algérie.aspet physiologique et génitique .thése magister USTHB.alger.

Tahkoubit, A. ,2017. Isolement et caractérisation de souches bactériennes nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* en milieu salin. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master : Biotechnologies et Génomiques Végétale. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département : Biologie et Ecologie Végétale, Université des Frères Mentouri Constantine 1 1, 31 p.

Tewari, S., Arora, N.K., 2014. Multifunctional Exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* PF23 Involved in Plant Growth Stimulation, Biocontrol and Stress Amelioration in Sunflower under Saline Conditions. CurrMicrobiol 13, 1402-1415.

Torche, Asma., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les Légumineuses du genre *Hedysarum.* Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie.166p.

V

Vincent, J.M., 1970. The Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Black wwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom, 164p.

W

Wang, L., Wang, L., Zhou, Z., Duanmu, D., 2017. Use of CRISPR/Cas9 for Symbiotic Nitrogen Fixation Research in Legumes. Progress in Molecular Biology and Translational Science 149, 187-213.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. TRENDS in Plant Science Review 9, 245-252.

Wdowiak-Wrobel, S., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Karas, M., Wojcik, M., Małek, M., 2017. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobia

Wirth D., Gustin P., Drion P.V., Dessy-Doize C., Christians E.S., 2002. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). I : Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. Article de synthèse 146, 201-216.

Y

Yadav A.S. and Nehra K. 2013. Selection/ Isolation of High Temperature Tolerant Strains of *Rhizobium f*or Management of High Temperature Stress on *Rhizobium*- Legume Symbiosis. International Journal of Microbial Ressource Technology, 2(1), pp. 47- 57.

Yang SH, Chen WH, Wang ET, Chen WF, Yan J, Han XZ, Tian CF, Sui XH, Singh RP, Jiang GM, Chen WX. 2018. Application de la biogéographie rhizobienne ET de l'inoculation au soja dans quatre régions à Travers la Chine. J Appl Microbiol. 125 (3) : 853–66.

Zahran, H. H., Rasanen, L. A., Karsisto, M., Lindostrom, K., 1994.Alteration of lipopolysaccharide protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic heat stress. World J. Microbiol. Biotech. 10: 100-1 05.

Sites web

Mifsud.maltawildplants.http://www.maltawildplants.com/FABC/Medicagointertexta.php consulter (17/08/2020).

Médéa carte géographique. Http://wikimonde.com/article/M%C3%A9d%C3%A9a. Consulter (19 /08/2020).

Unine. Stress biotique et abiotique https://www.unine.ch/lbmc/home/projets-de recherche/resistance-aux-stress-abiotique.html. Consulter (19/08/2020).

Shutterstock. Flavonoids. https://image.shutterstock.com/image-vector/flavonoids-class-plant-secondary-metabolites-600w-330277451.jpg. Consulter le (16/8/2020). .

https://i.pinimg.com/originals/7e/ad/eb/7eadebe67b4b9c2e6e8869e295cbcb68.jpg. consulter (16/8/2020).

https://www.researchgate.net/profile/Wenbo_Wang22/publication/278654976/figure/fig28/AS:667069334966286@1536053131285/Chemical-structure-of-xanthan-gum-60.png.

https://www.researchgate.net/profile/TaimurAlMobarak2/publication/321756571/figure/fig2/AS:570790522179584@1513098473404/Chemic l-structure-of-cellulose.png.

Annexes

Annexes

Annexe I : matériel

Matériels non biologiques :

A. solutions, produits et milieux :

Ethanol à 90°.

Solution de $HgCl_2$ à 0.1%.

Eau distillé stérile .

Eau physiologique stérile à 0.85% de NaCl.

Solution de rouge congo (2.5g/l).

Mannitol en poudre.

Extrait de levure.

K_2HPO_4.

$MgSO_4$, $7H_2O$.

Chlorure de sodium (NaCl).

Agar Agar.

Solution de violet de gentiane (I P A).

Solution de lugole (I P A).

Solution de fushine.

Huile à immersion.

Huile de paraffine stérile.

Solution étalon pour l'étalonage de pH-métre.

Solution de HCL.

Solution de NaOH.

B. petits matériel et verrerie :

Verrerie (Béchers, Burette, Flacons en verres, verres de montres et Spatule, Pipettes, Tubes en verre, Tiges en verre).

Matériels microbiologique :

Lames et lamelles.

Pipettes pasteurs.

Bisterie.

Bec bunsen.

Seringues de 5 ml et de 10 ml stérile.

Boites de pétrie en plastique.

Autres thermomètre, micropipette a volume réglable, règle, marqueur, papiers d'aluminiums, plats propre.

Grands matériels :

Balance.

pH-métres.

Étuve 28°C/50°C.

Bain marie.

Microscope optique.

Autoclave.

Annexe II : milieu de culture

Composition de Milieu YEMA solide pour la culture des rhizobiums :

Mannitol 10g

Extrait de levure .....0,4 g

KH_2PO_4..... ……0,5 g

$MgSO_47H_2O$..... ..0,2 g

NaCl..... 0.12 g

Agar-Agar ..... ……15g

Eau distillée .... 1000 ml

pH final du milieu 6,8

Préparation de milieu YEMA :

- Dissoudre les sels dans 1 litre d'eau distillé.

- Ajouter Mannitol et extrait de levure.

- Ajouter Agar Agar et rouge Congo.

- Ajuster pH à 6.8.

- Autoclave à 121°Cdurant 20 minutes.

Composition de Milieu YEMB liquide pour la culture des rhizobiums :

Mannitol 10g

Extrait de levure .....0,4 g

KH2PO4..... ……0,5 g

$MgSO_4$, $7H_2O$…..... ..0,2 g

NaCl..... 0.12 g

Eau distillée .... 1000 ml

Préparation de milieu YEMB :

- Dissoudre les sels dans 1 litre d'eau distilé

- Ajouter Mannitol et extrait de levure

- Ajuster pH à 6.8

- Autoclaver à 121°C durant 20 minutes

Annexe III : coloration de Gram :

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier en deux grands groupes : bactéries dites Gram positive et bactéries dites Gram négative.

Protocol :

- Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant basique le violet de Gentiane.

- Laisser agir pendant 1minute.

- Chasser le violet avec le lugol, ensuite recouvrir le frottis pendant 30 secondes.

- Laver à l'alcool-acétone et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau courante.

- Recouvrir le frottis par la Fushine et laisser agir durant 1 minute.

- Laver à nouveau avec de l'eau, puis égoutter la lame sur du papier absorbant et enfin observer au microscope.

Annexe IV : galerie API 20NE :

La galerie API 20NE (BioMérieux, 20050) (Appareillage et Procédé d'Identification) est un système standardisé pour l'identification facile et rapide des bacilles à Gram négatif non entérobactéries à l'aide de vingt tests biochimiques.

Tableau : API 20 NE teste d'identification les non entérobactéries

Tests	Réaction	Négatif	Positif
NO3	potassium nitrate	incolore	Rose – rouge
TRP	L-tryptophane	Incolore/ jaune	Rose
GLU	D-glucose	Blue/vert	Jaune
ADH	L-arginine	jaune	Orange/rose
URE	Urée	jaune	Orange/rose
ESC	Esculine: citrate de fer	jaune	gris/noir
GEL	Gelatine	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	D-galactopyranosideβ4-nitrophenyl-	incolore	Jaune
GLU	Glucose assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose assimilation	Transparence	Trouble

MNE	Mannose assimilation	Transparence	Trouble
MAN	Mannitol assimilation	Transparence	Trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine assimilation	Transparence	Trouble
MAL	Maltose assimilation	Transparence	Trouble
GNT	Gluconate assimilation	Transparence	Trouble
CAP	Caprate assimilation	Transparence	Trouble
ADI	Adipate assimilation	Transparence	Trouble
MLT	Malat assimilation	Transparence	Trouble
CTT	Citrat assimilation	Transparence	Trouble
PAC	Phenyl-acetate assimilation	Transparence	Trouble

Annexe V : (SDS PAGE) :

Protocole expérimentale :

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par **Laemmli (1970)**. La quantité d'une anse de platine remplie de bactéries, est ensemencée sur un milieu de TRY et incubée à 28°C pendant 24h. Une aliquote de 200 µl de chaque culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, est centrifugée à 7000 tours/min pendant 15 min. La lyse des cellules s'effectue après traitement du culot bactérien obtenu par l'addition de 100 µl de tampon de lyse et agitation pendant 20mn ensuite mis dans l'étuve à 60°C pendant 20 min pour interrompre les ponts disulfures.

Un dépôt de 35 µl de chaque échantillon est mis dans un puit. L'électrophorèse est réalisée sur un gel de polyacrylamide de 12 %. Après migration et démoulage, le gel est mis dans une solution de coloration contenant le bleu de Comassie et l'acide trichloracétique (60%) pendant une nuit sous une faible agitation. Enfin le gel est décoloré dans l'eau distillée sous faible agitation jusqu'à l'apparition des bandes polypeptidiques. Le gel est photographié à l'aide d'un appareil photo numérique.